ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Εφαρμογή μεταβολομικών μεθόδων για την ανάλυση της απόκρισης 2 οικοτύπων *Robinia pseudoacacia* σε καταπόνηση με αλατότητα

Κωνσταντίνος Α. Τορνεσάκης

Επιβλέπων καθηγητής:
Εμμανουήλ Φλεμετάκης

ΑΘΗΝΑ

2020

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Εφαρμογή μεταβολομικών μεθόδων για την ανάλυση της απόκρισης 2 οικοτύπων *Robinia pseudoacacia* σε καταπόνηση με αλατότητα

Application of metabolomics methodologies for response analysis of 2 *Robinia pseudoacacia* ecotypes under salinity stress

Κωνσταντίνος Α. Τορνεσάκης

Εξεταστική επιτροπή:

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)

Ρήγας Σταμάτης, Επίκουρος Καθηγητής

Δάρας Γεράσιμος, Επίκουρος Καθηγητής

Εφαρμογή μεταβολομικών μεθόδων για την ανάλυση της απόκρισης 2 οικοτύπων Robinia pseudoacacia σε καταπόνηση με αλατότητα

Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Περίληψη

Τεράστιες εκτάσεις ανά την υφήλιο χαρακτηρίζονται από διαβρωμένα και μη παραγωγικά εδάφη λόγω της παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης αλάτων νατρίου. Τα εδάφη αυτά παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα θρεπτικών στοιχείων όπως ο άνθρακας, το φώσφορο και το άζωτο. Η έλλειψη επαρκώς παραγωγικών εδαφών σε μια χρονική στιγμή αυξημένης ζήτησης τροφίμων, λόγω του φαινομένου του υπερπληθυσμού, καθιστά αναγκαία την εύρεση μεθόδων, από την επιστημονική κοινότητα, αξιοποίησης και διαχείρισης των παραπάνω προβληματικών εδαφών. Ένα πρώτο βήμα για την αξιοποίηση τους μπορεί να αποτελέσει η εγκατάσταση καλλιεργειών ανθεκτικών φυτών, τα οποία μπορούν παράλληλα να τα ενισχύσουν σε επίπεδο θρεπτικών, όπως είναι τα ψυχανθή. Επιπλέον, με τη χρήση αναλυτικών μεθόδων, όπως για παράδειγμα των ομικών τεχνολογιών, μπορεί να γίνει κατανοητή η επίδραση της αλατότητας στην ανάπτυξη αυτών των φυτών καθώς και η απόκριση των τελευταίων. Με αυτόν τον τρόπο επίσης είναι δυνατή η επιλογή των αποδοτικότερων ειδών και ποικιλιών στη βιοαποκατάσταση των παραπάνω εδαφών.

Σε αυτά τα πλαίσια παρουσιάζεται το πείραμα της παρούσας διατριβής με στόχο τη μελέτη των αποκρίσεων των ιστών φύλλων και ρίζας δυο ποικιλιών ψευδοακακίας (*Robinia pseudoacacia*) σε διάφορα επίπεδα αλατότητας, τόσο με άμεσο όσο και με σταδιακό εγκλιματισμό. Η βιομετρική ανάλυση παρουσιάζει τις μεταβολές που προκαλούνται από την αλατότητα στην φυσιολογική ανάπτυξη του φυτού μακροσκοπικά ενώ η μεταβολομική ανάλυση με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας αναδεικνύει τις μεταβολές στην περιεκτικότητα των μεταβολιτών. Παρατηρείται ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών που επηρεάζονται στατιστικά σημαντικά ανά ιστό σε κάθε ποικιλία, με τα παραπάνω αποτελέσματα να υποδεικνύουν πιθανούς μεταβολικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανεκτικότητα της ψευδοακακίας στην υψηλή αλατότητα και που με μεθόδους κλασσικής βελτίωσης και γονιδιακών παρεμβάσεων θα μπορούσαν να βελτιωθούν περαιτέρω.

Επιστημονική περιοχή: Περιβαλλοντική βιοτεχνολογία

Λέξεις κλειδιά: Βιοαποκατάσταση, Μεταβολομική ανάλυση, Ομική ανάλυση Ψυχανθή, Ροβίνια ψευδοακακία

Application of metabolomics methodologies for response analysis of 2 *Robinia pseudoacacia* ecotypes under salinity stress

Department of Biotechnology
Laboratory of Molecular Biology

Abstract

Vast areas around the world are characterized by eroded and unproductive soils due to the presence of high concentrations of sodium salts. These soils have reduced levels of nutrients such as carbon, phosphorus and nitrogen. The lack of sufficiently productive soils at a time of increased food demand, due to the phenomenon of overpopulation, makes it necessary for the scientific community to find methods to exploit and manage these problematic soils. A first step in their development can be to reclaim crops that can withstand this stressful condition and provide the soils with nutrients, such as legumes. In addition, using analytical methods, such as omics technologies, can understand the effect of salinity on the growth of these plants as well as their response. In this way it is also possible to choose the most efficient species and varieties in the bio-restoration of the above soils.

In this context, the experiment of the present dissertation is presented with the aim of studying the responses of leaf and root tissue of two varieties of pseudoacacia (*Robinia pseudoacacia*) at different levels of salinity, both with direct and gradual acclimatization. The biometric analysis shows the changes caused by the salinity in the normal growth of the plant macroscopically while the metabolic analysis with gas chromatography-mass spectrometry highlights the changes in the content of the metabolites. There is a large number of metabolites that are statistically significantly affected at the tissues in each variety, with the above results suggesting possible metabolic mechanisms involved in high salt salinity tolerance that could be improved with classical improvement and gene intervention methods.

Scientific area: Environmental biotechnology

Key words: Bioremedation, Metabolomics analysis, Omics analysis, Legumes, *Robinia pseudoacacia*

Ευχαριστίες

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή έλαβε χώρο στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών ύπο την άμεση επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Φλεμετάκη Εμμανουήλ στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών της Βιολογίας Συστημάτων του τμήματος Βιοτεχνολογίας.

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φλεμετάκη Εμμανουήλ που με δέχθηκε στην εργαστηριακή του ομάδα και μου παρείχε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με το τομέα της μεταβολομικής στα πλαίσια της διπλωματικής μου εργασίας. Τον ευχαριστώ επίσης για την καθοδήγηση του τόσο κατά τη διάρκεια του πειράματος καθώς και για τις συμβουλές του κατά τη συγγραφή της διατριβής.

Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τους επίκουρους Καθηγητές κ. Ρήγα Σταμάτη και κ. Δάρα Γεράσιμο, για την συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της εργασίας μου και για τον χρόνο που αφιέρωσαν.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον μεταδιδάκτορα κ. Σκληρό Δημήτριο, που κατά την εκτέλεση του πειράματος και τη συγγραφή της διατριβής, οι συμβουλές και η βοήθεια που μου παρείχε συνετέλεσαν στην επιτυχή ολοκλήρωση των προαναφερθέντων.

Ευχαριστώ επίσης τη μεταδιδάκτορα Καλλονιάτη Χρυσάνθη για το χρόνο που διέθεσε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων μου όπως και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την υποστήριξη και τις συμβουλές τους κατά τη διεξαγωγή του πειράματος καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που υφίσταται εντός του εργαστηρίου.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή 7
1.1 Βιολογική αζωτοδέσμευση και σημασία της 7
1.2 Τα φυτά και τα ψυχανθή ως μοντέλα και η σημασία τους 11
1.2.1 *Arabidopsis thaliana* 11
1.2.2 *Lotus japonicus* 12
1.2.3 *Medicago truncatula* 13
1.2.4 *Phaseolus vulgaris* 13
1.2.5 *Populus trichocarpa* 14
1.3 Εδαφική αλατότητα 15
1.4 Φυσιολογικές αποκρίσεις στην αλατότητα του εδάφους 15
1.5 Μοριακές αποκρίσεις στην αλατότητα 20
1.5.1 Βιοχημικές αποκρίσεις 20
1.5.2 Γονιδιακές αποκρίσεις 22
1.5.3 Πρωτεϊνικές αποκρίσεις 23
1.6 Αλατότητα και ψυχανθή 23
1.6.1 *Medicago truncatula* 24
1.6.2 *Lotus japonicus* 24
1.6.3 *Phaseolus vulgaris* 25
1.7 Σημασία και βιοτεχνολογική εφαρμογή ψυχανθών δένδρων 25
1.8 *Robinia pseudoacacia* 26
1.8.1 Γεωγραφική κατανομή 26
1.8.2 Κλιματικές συνθήκες 26
1.8.3 Εδαφολογικές συνθήκες 27
1.8.4 Ανάπτυξη φυταρίου 27
1.8.5 Ανάπτυξη υπέργειου τμήματος και ριζικού συστήματος 27
1.8.6 Παραγωγή σπόρων 27
1.8.7 Γενετική σύσταση 27
1.8.8 Βιοχημεία 27
1.8.9 Οικονομική αξία και διατήρηση 27
1.8.10 Αποκρίσεις στην αλατότητα 28
2. Υλικά και μέθοδοι 30
2.1 Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης 30
2.1.1 Το φυτό 30
2.1.2 Προετοιμασία και προβλάστηση σπόρων 30
2.1.3 Συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης του *R. pseudoacacia* 30
2.1.4 Συνθήκες καταπόνησης του *R. pseudoacacia* 30
2.1.5 Συγκομιδή φυτών 30
2.2 Βιομετρία 30
2.3 Προσδιορισμός της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του εδαφικού υποστρώματος 30
2.4 Ανάλυση μεταβολιτών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) 31
2.4.1 Εκχύλιση μεταβολιτών από ιστούς φύλλων και ρίζας 31
2.4.2 Παραγωγοποίηση μεταβολιτών 31
2.4.3 Λειτουργία και χαρακτηριστικά του GC-MS 32
2.5 Σύνθεση ρυθμιστικών διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων 32
2.5.1 Θρεπτικά διαλύματα ανάπτυξης φυτών 32

2.5.2 Διαλύματα εκχύλισης και παραγωγοποίησης μεταβολιτών 32
3. Αποτελέσματα 33
3.1 Προσδιορισμός ηλεκτρικής αγωγιμότητας εδαφικού υποστρώματος 33
3.2 Βιομετρία 33
3.3 Μεταβολομική ανάλυση 35
4. Συζήτηση 67
Βιβλιογραφία 70

1. Εισαγωγή

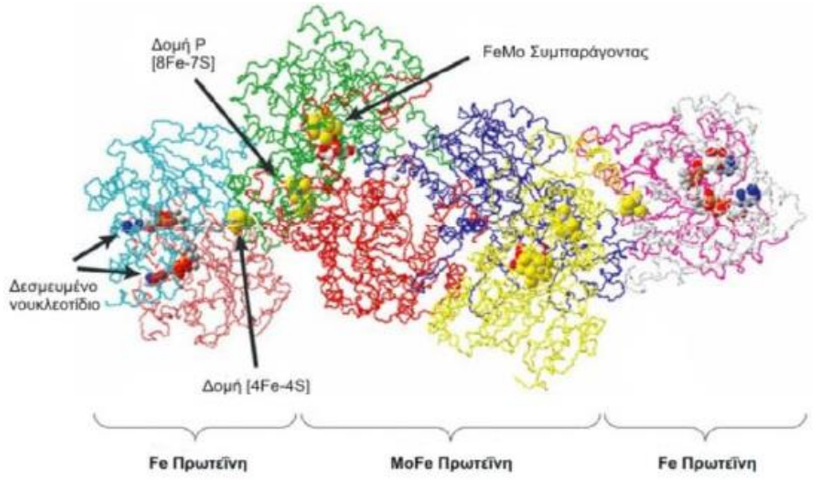
1.1 Βιολογική αζωτοδέσμευση και σημασία της

Το άζωτο αποτελεί ένα θρεπτικό στοιχείο το οποίο συχνά απουσιάζει τόσο σε φυσικές όσο και καλλιεργούμενες εκτάσεις. Στις καλλιεργούμενες εκτάσεις παρέχεται σε αφομοιώσιμη, για το φυτό, μορφή είτε ως αμμωνιακό ή νιτρικό λίπασμα που παράγεται μέσω χημικών διαδικασιών, όπως για παράδειγμα η διαδικασία Haber-Bosch στην οποία το ατμοσφαιρικό άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνία αξιοποιώντας υψηλές ποσότητες ενέργειας, είτε, περιστασιακά, από εξόρυξη ορυκτών εναποθέσεων. Ανεξαρτήτως της διαδικασίας παραγωγής όμως, το περιβαλλοντικό και ενεργειακό κόστος σύνθεσης των λιπασμάτων είναι πολύ υψηλό. Παρόλα αυτά, στις περισσότερες ανεκμετάλλευτες φυσικές περιοχές, όπως και σε ορισμένες καλλιεργούμενες εκτάσεις, διαλυτοποιημένο άζωτο, υπό τη μορφή αμμωνιακών κατιόντων, διατίθεται προς αξιοποίηση από τα φυτά, μέσω μιας διαδικασίας που είναι γνωστή ως βιολογική αζωτοδέσμευση. Βακτήρια που διαθέτουν το ενζυμικό σύμπλεγμα της νιτρογενάσης, μπορούν να δεσμεύσουν ατμοσφαιρικό άζωτο υπό τη μορφή αμμωνίας χρησιμοποιώντας ενέργεια από ATP και αναγωγικό δυναμικό από την αερόβια, ή και την αναερόβια, αναπνοή (James, 2017). Η αμμωνία, μετατρέπεται συνήθως άμεσα σε αμινοξέα ή αμίδια για χρήση από τα διαζοτροφικά βακτήρια ώστε να παραχθούν πρωτεΐνες και πεπτίδια που συμβάλλουν στην ανάπτυξη τους. Το δεσμευμένο άζωτο που έχει ενσωματωθεί στα διαζοτροφικά βακτήρια απελευθερώνεται στο περιβάλλον έπειτα από το θάνατο τους, συνήθως υπό τη μορφή αμινοξέων τα οποία μεταλλοποιούνται και γίνεται διαθέσιμα για πρόσληψη από άλλα βακτήρια και φυτά. Επιπλέον, παρόλο που το σύστημα της νιτρογενάσης εμφανίζει ευρεία κατανομή στα βακτήρια και στα αρχαία, στην πραγματικότητα περιορίζεται σε ένα σχετικά μικρό αριθμό ειδών. Επίσης, πολλά φυτά, κυρίως ψυχανθή αλλά και ορισμένα άλλα ανώτερα φυτά, σχηματίζουν συμβιωτικές συνεργατικές σχέσεις με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Στα παραπάνω συστήματα, βακτήρια του εδάφους, που εντοπίζονται σε εξειδικευμένα όργανα, δεσμεύουν άζωτο από την ατμόσφαιρα και το μετατρέπουν σε διαλυτό άζωτο που γίνεται διαθέσιμο στα φυτά. Μάλιστα, τα ψυχανθή αποτελούν μια από τις βασικές πηγές εμπλουτισμού των εδαφών σε άζωτο τόσο σε φυσικά όσο και σε καλλιεργούμενα περιβάλλοντα. Ωστόσο, παρότι τα μονοπάτια που ελέγχουν την βιολογική αζωτοδέσμευση, καθώς και οι βακτηριακοί συμβιώτες που εμπλέκονται στη παραπάνω διαδικασία, έχουν μελετηθεί εκτενώς σε ένα μεγάλο αριθμό καλλιεργούμενων και πρότυπων(μοντέλων) ψυχανθών, η πληροφορία που υφίσταται για την ποικιλομορφία των συμβιωτικών συστημάτων στα φυσικά περιβάλλοντα, όσον αφορά τους ξενιστές ή τα βακτήρια, είναι μικρή. Το παραπάνω φαινόμενο εντοπίζεται ιδιαίτερα σε περιοχές με τροπικό κλίμα όπου εμφανίζεται και η μεγαλύτερη ποικιλομορφία στα βακτήρια και τα ψυχανθή (James, 2017).

Όσον αφορά την οικογένεια των ψυχανθών, Leguminosae, ή παλιότερα Fabaceae, αυτή αποτελεί μια από τις 3 μεγαλύτερες οικογένειες ανθοφόρων φυτών και αποτελείται από περισσότερα από 640 γένη με περισσότερα από 18000 είδη. Έχει διαχωριστεί ταξινομικά σε 3 υποοικογένειες και πιο συγκεκριμένα στην *Papilionoideae* με 468 γένη, στην *Mimosoideae* με 78 γένη και στην *Caesalpinioideae* με 157 γένη, όπου μόνο η πρώτη εντοπίζεται φυσικά σε εύκρατες περιοχές. Η πλειονότητα των ψυχανθών εκτείνεται σε περιοχές με τροπικό ή υποτροπικό κλίμα και είναι ιδιαιτέρως διαδεδομένα σε δάση, σαβάνες και υγροτόπους. Παρότι έχει δημιουργηθεί η εικόνα ότι όλα τα ψυχανθή μπορούν να σχηματίσουν φυμάτια και να αζωτοδεσμεύσουν, ένα μεγάλο μέρος της οικογένειας *Caesalpinioideae* και ένα μικρό μέρος των άλλων 2 οικογενειών αδυνατούν να πραγματοποιήσουν τα παραπάνω. Πάντως ένα μεγάλο μέρος των ψυχανθών, και ιδιαίτερα τα είδη της οικογένειας *Caesalpinioideae*, δεν έχει μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά την ικανότητα σχηματισμού φυματίων οπότε υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να αλλάξει σε μεγάλο βαθμό η τωρινή εικόνα (James, 2017).

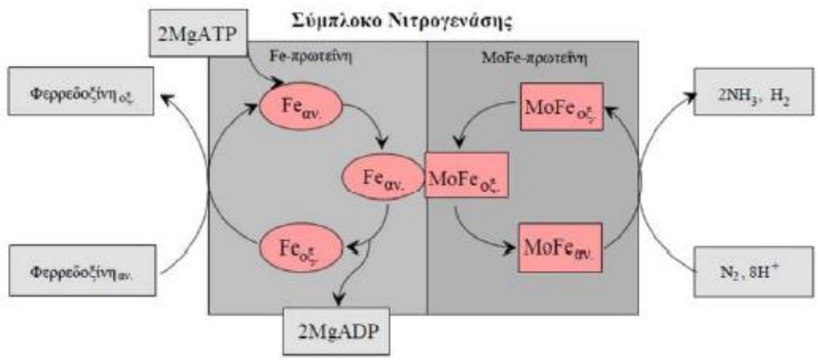
Συνοπτικά, τα φυμάτια χαρακτηρίζονται από μια κεντρική ζώνη που εμπεριέχει τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που περιβάλλονται από μη προσβεβλημένο φλοιό, ο οποίος μπορεί να καλύπτεται από την επιδερμίδα. Ο φλοιός και η επιδερμίδα αποτρέπουν την είσοδο του οξυγόνου και παθογόνων ενώ παρεμποδίζουν και την αποξήρανση του ιστού. Η νιτρογενάση όμως, είναι ιδιαιτέρως ευαίσθητη στο οξυγόνο, αλλά τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια χρειάζονται οξυγόνο ώστε να πραγματοποιήσουν την αναερόβια αναπνοή που παρέχει την απαραίτητη ποσότητα ATP για την αζωτοδέσμευση. Για αυτό το λόγο, στα φυμάτια των ψυχανθών υπάρχει σε πολύ υψηλή συγκέντρωση μια οξυγονοδεσμευτική πρωτεΐνη, που ονομάζεται λεγκουμογλοβίνη, και περιβάλλει τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια στα προσβεβλημένα κύτταρα. Η παραπάνω πρωτεΐνη λοιπόν, μεταφέρει οξυγόνο στα βακτήρια ενώ η παρουσία της στα φυμάτια είναι απαραίτητη για τη λειτουργία τους (James, 2017). Σε βιοχημικό επίπεδο, βασικό ρόλο στη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης διαδραματίζει το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης. Η νιτρογενάση αποτελείται από μια οικογένεια ομόλογων πρωτεϊνών που είναι ικανές να καταλύσουν την αναγωγή του αζώτου σε αμμωνία.

Συνοπτικά, το ένζυμο φέρει μια δινιτρογενάση που ανάγει το άζωτο και μια αναγωγάση της δινιτρογενάσης που ανάγει την πρώτη στην πρότερη της μορφή (Bazhenova & Shilov, 1995). Η πλέον μελετημένη νιτρογενάση είναι η Mo-εξαρτώμενη νιτρογενάση που φέρει μια Fe-αναγωγάση της δινιτρογενάσης και μια MoFe-δινιτρογενάση, με τη δομή της τελευταίας, όπως επίσης και την επίδραση της στην αντίδραση, να αποτελούν ένα θέμα εκτεταμένης μελέτης στο οποίο δεν έχει αποδοθεί κάποιος συγκεκριμένος μηχανισμός μέχρις στιγμής (Hoffman & al., 2013).



Εικόνα 1.1: Δομή του συμπλόκου της νιτρογενάσης.

Παρόλα αυτά, η δομή της κεντρικής μονάδας της MoFe-δινιτρογενάσης έχει περιγραφεί σε πολύ μεγάλο βαθμό και θεωρείται ότι το κέντρο, όπου τοποθετείται το μολυβδαίνιο, προσδένει το άζωτο και εκεί επιτελείται η αναγωγή του τελευταίου. Πιο αναλυτικά, η υδρόλυση μορίων ATP προς ADP οδηγεί στη μεταφορά ηλεκτρονίων προς τη δινιτρογενάση, όπου το άζωτο ανάγεται σε αμμωνία, με τα 6 από αυτά να ανάγουν την πρωτεΐνη και τα άλλα 2 να οδηγούν στην παραγωγή υδρογόνου, με την απόδοση να φτάνει στο 75% (Burris & Roberts, 1993). Η αφομοίωση της αμμωνίας που προκύπτει επιτελείται κυρίως μέσω του GS-GOGAT μονοπατιού. Αρχικά, η συνθετάση της γλουταμίνης ενσωματώνει την αμμωνία στο γλουταμινικό, με τη βοήθεια ATP, καταλήγοντας στην σύνθεση γλουταμίνης, ενώ στη συνέχεια η συνθάση του γλουταμινικού καταλύει την αναγωγική μεταφορά της αμιδικής ομάδας της γλουταμίνης στο α-κετογλουταρικό σχηματίζοντας 2 μόρια γλουταμινικού, με αναγωγικά μόρια το NAD(P)H ή την ανηγμένη φερρεδοξίνη. Ως αποτέλεσμα, ένα μόριο γλουταμινικού εξυπηρετεί την διατήρηση του μονοπατιού ενώ τα υπόλοιπα αποτελούν το κέρδος στο οργανικό άζωτο (Rascio & La Rocca, 2008).

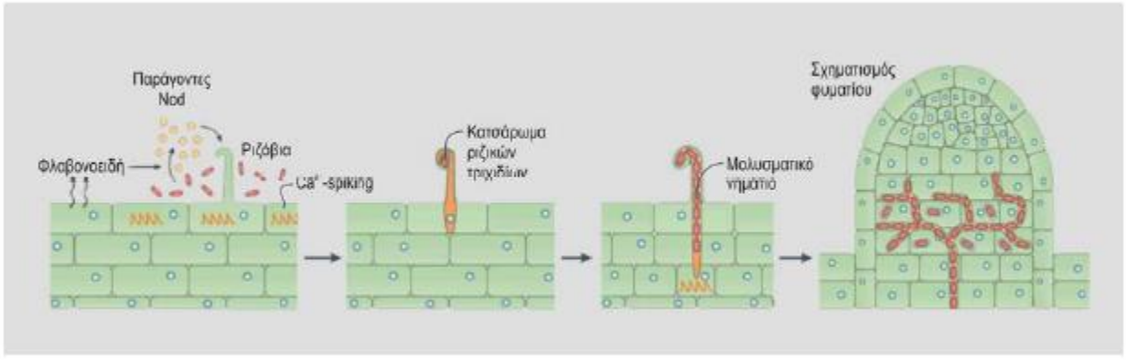


Εικόνα 1.2: Μηχανισμός δράσης της νιτρογενάσης.

Σήμερα, όλα τα βακτήρια, που ήταν γνωστό ότι σχημάτιζαν συμβιωτικές σχέσεις με ψυχανθή, αποτελούσαν γένη εντός της οικογενείας Rhizobiaceae καθώς και συγγενικά γένη της τάξης Rhizobiales των Alphaproteobacteria. Εκεί εμπεριέχονταν τα *Allorhizobium, Azorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium* και *Sinorhizobium.* Η έλευση των μοριακών τεχνικών όπως η PCR, που δίνει τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού του βακτηριακού DNA, έχει επιτρέψει την ανακάλυψη πολλών βακτηρίων που σχετίζονται με τα ψυχανθή, μέσω σύγκρισης των αλληλουχιών ορισμένων γονιδίων που θεωρούνται πολύ διατηρημένα με αλληλουχίες άλλων βακτηρίων αξιοποιώντας μεγάλες βάσεις δεδομένων. Αυτό έχει οδηγήσει σε μια εκρηκτική αύξηση του αριθμού νέων στελεχών και ειδών ριζοβίων που ταυτοποιούνται κάθε χρόνο (James, 2017).

Όπως προαναφέρθηκε, είδη βακτηρίων μπορούν να σχηματίσουν συμβιωτικές σχέσεις με ένα ή μερικά είδη ψυχανθών. Αυτό οφείλεται στη διαδικασία της αναγνώρισης ξενιστή-συμβιώτη, που συμβαίνει στη

ριζόσφαιρα διαμέσου της ανταλλαγής μοριακών σημάτων. Αρχικά, το πρώτο βήμα προς το σχηματισμό του φυματίου, αποτελεί η χημειοτακτική κίνηση του βακτηρίου προς τη ρίζα του ξενιστή ως απόκριση σε μόρια σινιάλα, όπως φλαβονοειδή ή βεταϊνες, που εκκρίνονται από τη ρίζα υπό συνθήκες τροφοπενίας αζώτου. Αυτές οι ουσίες επάγουν την έκφραση, εξειδικευμένων ως προς το ξενιστή, βακτηριακών γονιδίων(γονίδια *nod*) που κωδικοποιούν τους παράγοντες Nod(λιποχιτινολιγοσακχαρίτες), οι οποίοι επάγουν με τη σειρά τους την απόκριση του φυτού και ενεργοποιούν τη διαδικασία ανάπτυξης του φυματίου. Η προσβολή της ρίζας ξεκινά με την, επαγόμενη από το βακτήριο, κύρτωση του ριζικού τριχιδίου και συνεχίζει με την πρόσδεση του βακτηρίου στην επιφάνεια του, τη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος και το σχηματισμό του νήματος προσβολής. Το νήμα αυτό αποτελεί μια προέκταση της πλασματικής μεμβράνης του τριχιδίου που μεταφέρει τα πολλαπλασιαζόμενα ριζόβια από την επιφάνεια της ρίζας εντός του φλοιού. Παράλληλα, ορισμένα κύτταρα του φλοιού υποβάλλονται σε ταχύτατες διαιρέσεις που οδηγούν στο σχηματισμό του πρωτεύοντος φυματίου. Όταν η διακλαδισμένη προσβολή φτάσει τα κύτταρα στόχους εντός του αναπτυσσόμενου φυματίου, η άκρη της δημιουργεί φυσαλίδες απελευθερώνοντας έτσι βακτήρια ενσωματωμένα σε μια μεμβράνη που προέρχεται από το πλασμόλυμα του κυττάρου ξενιστή. Τα ριζόβια υφίστανται λίγες διαιρέσεις και αμέσως μετά διαφοροποιούνται σε διαζοτροφικά βακτηριοειδή, τα οποία μαζί με τη περιβακτηριοειδή μεμβράνη σχηματίζουν το συμβιόσωμα στο οποίο επιτελείται η αζωτοδέσμευση (Rascio & La Rocca, 2008).



Εικόνα 1.3: Η διαδικασία της μόλυνσης της ρίζας ενός ψυχανθούς από τα ριζόβια.

Στο ώριμο φυμάτιο αναπτύσσονται ορισμένες εξειδικευμένες δομές γύρω από τον προσβεβλημένο ιστό. Η μία από αυτές είναι μια ενδοδερμίδα, η άλλη αποτελείται από ένα αγγειακό σύστημα το οποίο είναι συνέχεια του κεντρικού κυλίνδρου, καθώς επίσης και μια στοιβάδα κυττάρων που παρεμποδίζει την διάχυση του οξυγόνου στο εσωτερικό του φυματίου. Σχετικά με τη δημιουργία του μικροαερόβιου περιβάλλοντος που απαιτείται τόσο για τη διατήρηση της παραγωγής ATP σε ικανοποιητικά επίπεδα όσο και της δραστικότητας της νιτρογενάσης, το φυμάτιο διαθέτει μια ποικιλία μηχανισμών. Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο εμπόδιο στην είσοδο του οξυγόνου στα κύτταρα υφίσταται στο παρέγχυμα του φυματίου, όπου εντοπίζεται ένας μηχανικός φραγμός διάχυσης. Επιπλέον, η λεγκουμογλοβίνη που συντίθεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ξενιστών, μεταφέρει το οξυγόνο στην επιφάνεια των βακτηριοειδών, τα οποία με την αποτελεσματική αναπνοή τους δεν επιτρέπουν στο οξυγόνο να περάσει στο κυτταρόπλασμα. Ακόμα, τα περισσότερα ριζόβια διαθέτουν μια υδρογονάση που επικουρεί στην προστασία της νιτρογενάσης από την τοξικότητα του οξυγόνου. Από την άλλη, τα βακτηριοειδή δεν διαθέτουν ένζυμα για την αφομοίωση της αμμωνίας, έτσι η τελευταία απελευθερώνεται στο κύτταρο της ρίζας όπου αφομοιώνεται μέσω του μονοπατιού GS-GOGAT. Ως αποτέλεσμα παράγεται γλουταμίνη, γλουταμινικό και άλλα αζωτούχα μόρια. Ορισμένες από αυτές τις ουσίες επιστρέφουν στα βακτηριοειδή άλλα οι περισσότερες μεταφέρονται στο φυτικό βλαστό διαμέσου του ξυλήματος. Για την διατήρηση όμως της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας των βακτηριοειδών απαιτείται και μια πηγή άνθρακα που παρέχεται από το φυτό στο φυμάτιο με τη μορφή σακχαρόζης. Εκεί, η σακχαρόζη μεταβολίζεται σε C_4 δικαρβοξυλικά οξέα τα οποία εν συνεχεία μεταφέρονται διαμέσου της περιβακτηριοειδούς μεμβράνης στα βακτηριοειδή (Rascio & La Rocca, 2008).

Σε μοριακό επίπεδο υπάρχουν 3 κατηγορίες γονιδίων στα ριζόβια που σχετίζονται με τις διαδικασίες σχηματισμού των φυματίων και της αζωτοδέσμευσης. Αρχικά, στα πλασμίδια *Sym* εντοπίζονται τα γονίδια εξειδίκευσης, τα οποία καθορίζουν την αλληλεπίδραση συγκεκριμένων στελεχών *Rhizobium* με συγκεκριμένο φυτικό ξενιστή. Σε αυτά τα πλασμίδια, τα γονίδια *nif*, που αφορούν τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης, τοποθετούνται εκατέρωθεν των γονιδίων *nod* που ρυθμίζουν την διαδικασία σχηματισμού των φυματίων ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο και στην εξειδίκευση. Τα γονίδια *nod* έχουν μελετηθεί εκτεταμένα στο *Rhizobium leguminosarum*. Στο παραπάνω είδος, εντοπίζονται 10 τέτοια γονίδια

με προσδιορισμένη την πλήρη αλληλουχία τους. Από αυτά, τα γονίδια *nodABC* συνδέονται με την παραγωγή των παραγόντων *nod*, δηλαδή μορίων που φέρουν έναν υποκατεστημένο σκελετό N-ακετυλογλυκοζαμίνης και που ευθύνονται για τα αρχικά αναπτυξιακά στάδια του φυματίου, όπως για παράδειγμα την κύρτωση των τριχιδίων και τις διαιρέσεις των φυτικών κυττάρων. Μάλιστα, οι τροποποιήσεις που φέρει ο εκάστοτε σκελετός N-ακετυλογλυκοζαμίνης είναι υπεύθυνες για την εξειδίκευση που εμφανίζεται ως προς τον ξενιστή. Ακόμα, στο *Rhizobium leguminosarum*, υφίστανται και άλλοι παράγοντες Nod, όπως ο NodD που αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την έκφραση των υπόλοιπων *nod* γονιδίων. Η τοποθέτηση του *nodD* σε σημείο πριν τη θέση των οπερονίων *nod* και η αλληλεπίδραση του με μόρια επαγωγείς οδηγούν σε αλλαγή της διαμόρφωσης του DNA που έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη την μεταγραφής των γονιδίων. Η πιο συνήθης κατηγορία μορίων επαγωγέων είναι τα φυτικά φλαβονοειδή που εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες από τη ρίζα του φυτού στη ριζόσφαιρα, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα από αυτά, παρότι θυμίζουν δομικά τους επαγωγείς των φλαβονοειδών αναστέλλουν την έκφραση του *nodD*, συμβάλλοντας στην εξειδίκευση που παρατηρείται. Ο NodF από την άλλη ακετυλιώνει έναν παράγοντα Nod, με τη βοήθεια του NodA. Ακόμα, οι παράγοντες NodE και NodL σχετίζονται το εύρος των δυνητικών ξενιστών, ενώ ο NodM αποτελεί μια συνθάση της γλυκοζαμίνης και εμπλέκεται στη σύνθεση των παραπάνω παραγόντων. Επίσης, οι παράγοντες nodI και nodJ ρυθμίζουν τη μεταφορά των υπολοίπων παραγόντων εκτός βακτηριακού κυττάρου (Madigan & al., 2015).

Πέρα από τη συμβιωτική σχέση μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων έχουν εντοπιστεί και άλλες παρόμοιες περιπτώσεις αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών. Μια από αυτές είναι μεταξύ του, Gram-θετικού αερόβιου, ακτινομύκητα του γένους *Frankia*, ο οποίος ανήκει στα διαζοτροφικά βακτήρια, με πολλά δικοτυλήδονα αγγειόσπερμα. Τα είδη του παραπάνω γένους δύναται να σχηματίσουν αζωτοδεσμευτικά φυμάτια στις ρίζες περισσότερων από 200 φυτών που ανήκουν σε 8 διαφορετικές οικογένειες, εκ των οποίων τα περισσότερα είναι θάμνοι ή δένδρα με ευρεία κατανομή σε όλες τις περιοχές του πλανήτη με εξαίρεση την Ανταρκτική. Μάλιστα, τα παραπάνω αγγειόσπερμα έχει παρατηρηθεί ότι είναι ιδιαιτέρως ανθεκτικά σε ποικίλες περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως για παράδειγμα η υψηλή αλατότητα, η ξηρασία, το κρύο, οι ακραίες τιμές pH και η παρουσία βαρέων μετάλλων (Rascio & La Rocca, 2008). Όσον αφορά τον νηματοειδή ακτινομύκητα, έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να επιβιώνει και ως ελεύθερος διαζοτροφικός οργανισμός, ενώ σε εργαστηριακή καλλιέργεια δημιουργεί ένα εκτεταμένο δίκτυο υφών και σποραγγείων. Ως απόκριση στην έλλειψη αζώτου, έχει την ικανότητα να διαφοροποιεί κυστίδια, που ονομάζονται διαζοκυστίδια, τα οποία εμπεριέχουν το ένζυμο νιτρογενάση και αποτελούν σημείο αζωτοδέσμευσης. Επιπλέον, τα διαζοκυστίδια είναι εγκλωβισμένα σε μια σειρά λιπιδιακών μεμβρανών που είναι πλούσιες σε ουδέτερα λίπη, γλυκολιπίδια και οπανοειδή. Ο φάκελος αυτός, του οποίου η πυκνότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του οξυγόνου στο περιβάλλον, λειτουργεί ως φραγμός στη διάχυση οξυγόνου, προστατεύοντας τη νιτρογενάση εντός των κυστιδίων. Όπως και στην περίπτωση των ψυχανθών με τα ριζόβια, έτσι και στη δεδομένη συμβίωση, ο σχηματισμός των φυματίων στη ρίζα ξεκινά με την αναγνώριση μεταξύ συμβιώτη και ξενιστή, μέσω μοριακών σημάτων και ακολουθεί η προσβολή, που μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ενδοκυτταρικών ή διακυτταρικών μηχανισμών. Στην πρώτη περίπτωση, η βακτηριακή υφή αρχικά διαπερνά το ριζικό τριχίδιο και έπειτα κινείται στα φλοιώδη κύτταρα εγκλωβισμένη σε μια στοιβάδα υλικού από το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο περιβάλλεται από πλασμόλυμα. Από την άλλη, στη διακυτταρική προσβολή, η υφή διαπερνά την επιφάνεια μεταξύ 2 γειτονικών κυττάρων του ριζοδέρματος και αναπτύσσεται αποπλαστικά διαμέσου των κυττάρων του φλοιού. Η αζωτοδεσμευτική ικανότητα του ακτινομύκητα συσχετίζεται με τη διαφοροποίηση των διαζοκυστιδίων, των οποίων η μορφολογία ελέγχεται από το φυτό ξενιστή (Rascio & La Rocca, 2008). Πρόσφατα ανακαλύφθηκε και μια συμβιωτική αζωτοδεσμευτική σχέση μεταξύ μονοκοτυλήδονων και ενδοφυτικών διαζοτροφικών βακτηρίων, που αποικίζουν το εσωτερικό των ξενιστών χωρίς να προκαλούν συμπτώματα ασθένειας. Τα βακτήρια αυτά εισέρχονται εντός των φυτών από τις άκρες των ριζών και διαπερνούν το φλοιό της ρίζας καθώς και τα ξυλώδη αγγεία οπότε μεταναστεύουν προς το βλαστό. Η παρουσία τους περιορίζεται στις διακυτταρικές περιοχές με χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου ενώ η υψηλή βακτηριακή αναπνοή δημιουργεί το μικροαερόβιο περιβάλλον που απαιτείται για τη δράση της νιτρογενάσης. Μάλιστα, ορισμένα από τα παραπάνω διαζοτροφικά βακτήρια, όπως αυτά που ανήκουν στα γένη *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum* και *Azoarcus* έχουν μεγάλη σημασία διότι παρέχουν μια μεγάλη ποσότητα αζώτου στα σιτηρά (Rascio & La Rocca, 2008). Συμπερασματικά, η δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου σε αμμωνία και η συνεπακόλουθη ενσωμάτωση του σε οργανικές ενώσεις, αποτελούν πολύ βασικό τμήμα του κύκλου του αζώτου. Παγκοσμίως, η βιολογική αζωτοδέσμευση ευθύνεται για την εναπόθεση, περίπου, 50-200 μεγατόνων αζώτου, ανά έτος, στα οικοσυστήματα καθώς και για την δέσμευση του 80% του συνολικού δεσμευμένου αζώτου, με το υπόλοιπο να δεσμεύεται μέσω φυσικών διαδικασιών, όπως οι κεραυνοί.

Παρότι θεωρείται ότι η βιολογική αζωτοδέσμευση αποτελεί το κύριο αίτιο της συσσώρευσης αζώτου στο έδαφος, στην πραγματικότητα δεν είναι εύκολο να υπολογιστεί η ποσότητα αζώτου που εναποτίθεται από τα ψυχανθή. Οι περισσότερες μέθοδοι εκτίμησης της βιολογικής αζωτοδέσμευσης στο πεδίο στηρίζεται στον επιλεκτικό διαχωρισμό του βαρέως σταθερού ισοτόπου αζώτου, ^{15}N, με τη delta ^{15}N να αποτελεί τη μόνη μέθοδο που να είναι εφαρμόσιμη στο πεδίο. Παρά τις επιπλοκές που έχουν εμφανιστεί κατά την εφαρμογή της, όπως μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ κοντινών περιοχών και διαφορετικών ειδών, έχει γίνει επιτυχής εκτίμηση της ποσότητας αζώτου σε τροπικά δάση. Κοινό χαρακτηριστικό όλων όμως, είναι ότι η συμβιωτική σχέση ψυχανθών και ριζοβίων είναι πολύ εκτεταμένη στους τροπικούς υγροτόπους και τα εποχιακώς πλημμυρισμένα δάση, οπότε συσχετίζεται με την έντονη έκπλυση διαλυτού αζώτου από το έδαφος που προκαλείται από τις πλημμύρες και την ορυκτοποίηση κατά την ξηρά περίοδο (James, 2017).

1.2 Τα φυτά και τα ψυχανθή ως μοντέλα και η σημασία τους

1.2.1 *Arabidopsis thaliana*

Το *Arabidopsis thaliana* αποτελεί τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο οργανισμό σε μελέτες μοριακής γενετικής πληθώρας βιολογικών διαδικασιών στα φυτά. Οι λόγοι που το καθιστούν τόσο θελκτικό στην έρευνα της βιολογίας φυτών είναι αρκετοί. Αρχικά, διαθέτει ικανότητα τόσο σταυρογονιμοποίησης όσο και αυτογονιμοποίησης ενώ επίσης ο βιολογικός του κύκλος ολοκληρώνεται σε μόλις 45 ημέρες. Χαρακτηρίζεται ακόμα από μικρό μέγεθος και υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό, κάτι δηλαδή που δίνει το πλεονέκτημα στον ερευνητή να διαθέτει σε μια πολύ μικρή έκταση έναν πολύ μεγάλο αριθμό φυτών. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες έχουν συντελέσει ώστε το συγκεκριμένο φυτό μοντέλο να βοηθήσει στην ταχεία ανακάλυψη πολλών μηχανισμών ανάπτυξης των φυτών. Επιπλέον, το γονιδίωμα του έχει αλληλουχηθεί και χαρακτηριστεί σε υψηλό επίπεδο, γεγονός που συντελεί σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση της λειτουργίας πολλών πρωτεϊνών και RNAs στα πλαίσια ποικίλων κυτταρικών ρυθμιστικών μονοπατιών. Πιο συγκεκριμένα, σε ορισμένες περιπτώσεις η ομοιότητα μεταξύ των προβλεπόμενων πρωτεϊνών του *Arabidopsis* και των αντίστοιχων άλλων οργανισμών παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δράση τους. Παρόλα αυτά, το 45% περίπου των προβλεπόμενων πρωτεϊνών δε χαρακτηρίζεται από κάποια γνωστή λειτουργία. Ο κύριος λόγος χρήσης του *Arabidopsis* αποτελεί η ταχεία γνώση που παρέχει σχετικά με τη λειτουργία των γονιδίων και τον τρόπο με τον οποίο εμπλέκονται στο μεταβολισμό και στην ανάπτυξη του φυτού (Szymanski, 2013). Οι περισσότερες λειτουργικές αναλύσεις αξιοποιούν μεθόδους πρόσθιας γενετικής ώστε να αναγνωριστούν, επαγόμενες, γενετικές μεταλλάξεις που διαταράσσουν τη λειτουργία ενός συγκεκριμένου βιοχημικού ή αναπτυξιακού μονοπατιού. Η αναγνώριση τόσο της ακριβούς εκλειπόμενης αλληλουχίας του γονίδιου του μεταλλάγματος όσο και του ελάχιστου τμήματος DNA του αγρίου τύπου γονιδίου που μπορεί να προστεθεί ώστε να επανέλθει η φυσιολογική λειτουργία αποτελεί το πρώτο βήμα για την αναγνώριση του τρόπου με τον οποίο τα γονιδιακά προϊόντα ελέγχουν τη βιολογία φυτών. Παράλληλα, το χαρακτηρισμένο γονιδίωμα του *Arabidopsis* επιτάχυνε την διαδικασία ανίχνευσης γονιδίων. Με το χρωμοσωμικό βάδισμα ανιχνεύονται μεταλλαγμένα γονίδια μέσω πολυμορφισμών της αλληλουχίας του DNA που χρησιμοποιούνται ώστε να περιοριστεί σε ένα μικρού μεγέθους τμήμα του γονιδιώματος η τοποθεσία της μετάλλαξης. Αρκετά συχνά, προβλεπόμενες περιοχές κωδικοποίησης πρωτεϊνών στο παραπάνω στενό τμήμα γονιδιώματος μπορούν να εξεταστούν εύκολα για μεταλλάξεις που μπορεί να διαταράσσουν τη λειτουργία του γονίδιου καθώς και για να αποκαλύψουν την ταυτότητα νέων γονιδίων (Alonso & Ecker, 2006).

Τα φυτά, αξιοποιούν μια πληθώρα ορμονών, όπως είναι η αυξίνη, το αιθυλένιο, το αμπσισικό οξύ, οι κυτοκινίνες και οι γιββερελλίνες για να ρυθμίσουν την αύξηση. Η εφαρμογή μεθόδων πρόσθιας γενετικής στο *Arabidopsis* λοιπόν, δεν έχει επιτρέψει μόνο την αναγνώριση πρωτεϊνικών υποδοχέων που αναγνωρίζουν τις παραπάνω ορμόνες, αλλά έχει συμβάλλει και στην κατανόηση του τρόπου επαγωγής, εκ μέρους τους, του σχηματισμού συμπλόκων εντός του πυρήνα, που μεταφράζει το σήμα σε απόκριση με καθορισμένη έκφραση γονιδίων. Για παράδειγμα, η αυξίνη αποτελεί ένα ρυθμιστή της φυτικής αύξησης, της οποίας η δράση πλέον είναι γνωστό ότι εξηγεί τις κατευθυνόμενες αποκρίσεις στην αύξηση των φυτών που παρατήρησε ο Κάρολος Δαρβίνος. Στο *Arabidopsis*, ο υποδοχέας TIR1 δεσμεύει την αυξίνη και προκαλεί την καθορισμένη αποδόμηση μιας πυρηνικής πρωτεΐνης που ρυθμίζει αρνητικά ένα σετ γονιδίων που ενεργοποιείται από την αυξίνη. Μάλιστα, χάρη στο *Arabidopsis* ανακαλύφθηκε και ένα παρόμοιο ρυθμιστικό δίκτυο που αφορά τη σηματοδότηση από την ορμόνη γιββερελλίνη (Dharmasiri, 2005). Μια ακόμα εφαρμογή του συγκεκριμένου είδους εντοπίζεται στη γενετική πληθυσμών. Το γονιδίωμα της ποικιλίας Columbia-0, που αποτελεί το βασικό εργαστηριακό μοντέλο, χαρακτηρίστηκε πρώτο και από τότε

έχει μελετηθεί το γονιδίωμα περισσότερων από 170 ποικιλιών παγκοσμίως. Κάθε μια όμως από αυτές έχει εξελιχθεί σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, οπότε η γενετική ανάλυση τους παρέχει στο ερευνητές σημαντικές πληροφορίες, σε μοριακό επίπεδο, σχετικά με την προσαρμογή των φυτών. Η ενδοειδική φυσική παραλλακτικότητα ορίζεται ως η φαινοτυπική παραλλακτικότητα εντός του είδους, που προκλήθηκε από αυθόρμητες μεταλλάξεις και συντηρήθηκε στη φύση εξαιτίας εξελικτικών διαδικασιών που περιλαμβάνουν την επιλογή είτε φυσική είτε από τον άνθρωπο. Στο παρελθόν, ο καθορισμός πολυμορφισμών που σχετίζονταν με την προσαρμογή, αποτελούσε μια πολύ δύσκολη διαδικασία. Σήμερα όμως, το χαμηλό κόστος της αλληλούχισης του DNA επιτρέπει την παραγωγή γονιδιακών δεδομένων για εκατοντάδες αγρίου τύπου συγγενείς του *Arabidopsis,* ενώ η δημιουργία ενδοειδικών διασταυρώσεων και η μελέτη των απόγονων τους μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση των γονιδίων που ευθύνονται για την βελτιστοποίηση της ανάπτυξης του φυτού υπό ιδιαίτερες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η υψηλή αλατότητα του εδάφους και η ξηρασία (Szymanski, 2013) .

1.2.2 *Lotus japonicus*

Το *Lotus japonicus* αποτελεί οργανισμό μοντέλο για τη μελέτη των ψυχανθών. Το συγκεκριμένο φυτό προέρχεται από την ανατολική Ασία και τα είδη του κατανέμονται στα νησιά της Ιαπωνίας, την Κορέα, την ανατολική και κεντρική Κίνα, καθώς και στην Ινδία, το Πακιστάν και το Αφγανιστάν. Οι οικότυποι Gifu και Miyakojima αποτελούν τα εργαστηριακά μοντέλα, ενώ φυλογενετικά, το *Lotus* ανήκει στην υπο-οικογένεια Papilionoideae, την μεγαλύτερη υποκατάταξη δηλαδή της οικογένειας Leguminosae. Αρκετά είδη της παραπάνω οικογένειας, όπως το φασόλι και η σόγια χαρακτηρίζονται από πολύπλοκα γονιδιώματα και άλλα στοιχεία τα οποία τα καθιστούν ακατάλληλα για μελέτες μοριακής γενετικής. Αντιθέτως, το *Lotus* διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα τα οποία επιτρέπουν την ευρεία αξιοποίηση του σε πειράματα κλασικής και μοριακής γενετικής. Αρχικά, το γονιδίωμα του έχει μικρό μέγεθος, μόλις 450Mb, είναι διπλοειδές και αποτελείται από 6 ζεύγη χρωμοσωμάτων. Επιπλέον, είναι αυτογόνιμο, αλλά τα μεγάλα μεγέθους άνθη του επιτρέπουν την σταυρογονιμοποίηση, και παράγει έναν επαρκή αριθμό σπόρων. Χαρακτηρίζεται επίσης από μικρό βιολογικό κύκλο και είναι επιδεκτικό στην ιστοκαλλιέργεια και στο μετασχηματισμό από τα *Agrobacterium tumefaciens* και *rhizogenes*, παρέχοντας τη δυνατότητα δημιουργίας και ανάλυσης ενός μεγάλου αριθμού μεταλλαγμάτων. Επιπλέον, υφίσταται εύκολη επιμόλυνση με ριζόβια, προς σχηματισμό καθορισμένων φυματίων, και μυκόρριζες. Σχετικά με τα καθορισμένα φυμάτια, η αύξηση τους προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων, με την ανάπτυξη να ολοκληρώνεται παράλληλα με τη διαφοροποίηση τους. Η αζωτοδέσμευση ξεκινά πριν την ολοκλήρωση της διαφοροποίησης και είναι παροδική καθώς τα φυμάτια φτάνουν στη γήρανση (Stougaard, 2017).

Η δυνατότητα μοριακής ανάλυσης της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών και ριζοβίων στο συγκεκριμένο οργανισμό μοντέλο αποτελεί μάλιστα και ένα από τα πιο ενδιαφέροντα πεδία έρευνας. Για αυτόν τον σκοπό έχουν αξιοποιηθεί αρκετά εργαλεία και μέθοδοι όπως για παράδειγμα η μεταλλαξιγένεση ένθεσης με T-DNA ή το τρανσποζόνιο του αραβόσιτου. Από την άλλη, με τη χρήση EMS επιτυγχάνεται αποτελεσματική χημική μεταλλαξιγένεση ενώ πρόσφατα ανακαλύφθηκε και ένα ενδογενές ρετρανσποζόνιο, με την ονομασία LORE1, που χαρακτηρίζεται από την ικανότητα δημιουργίας πολλών ενθέσεων στο γονιδίωμα του *Lotus*. Μέχρι σήμερα, έχει σχηματιστεί ένας μεγάλος πληθυσμός μεταλλαγμάτων LORE1, ο οποίος αξιοποιείται για την ανίχνευση φαινοτύπων υψηλού ενδιαφέροντος, μέσω τεχνικών πρόσθιας γενετικής, και μεταλλαγμάτων ένθεσης σε γονίδια ενδιαφέροντος, μέσω ανάστροφης γενετικής. Η εφαρμογή όλων των παραπάνω τεχνικών έχει συμβάλλει στην ανίχνευση παραπάνω από 40 γονιδιακών τόπων που σχετίζονται με τη συμβιωτική σχέση φυτού-ριζοβίων. Οι φαινότυποι των παραπάνω αναπτυξιακών μεταλλαγμάτων κατηγοριοποιούνται πλέον σε 3 κατηγορίες. Στις 2 από αυτές εκλείπει η ικανότητα σχηματισμού φυματίων είτε λόγω αδυναμίας αναγνώρισης του ριζοβίου από το φυτό είτε λόγω προβλημάτων κατά τα στάδια της οργανογένεσης. Στην 3^{η} περίπτωση, αυτορρυθμιζόμενα μεταλλάγματα, χαρακτηρίζονται από έλλειψη ελέγχου του αριθμού των σχηματιζόμενων φυματίων καθώς και από αυθόρμητο σχηματισμό των οργάνων απουσία συμβιώτη (Urbanski, 2007). Όπως προαναφέρθηκε, η ανάπτυξη των φυματίων στις ρίζες είναι μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από μια σειρά βημάτων, όπου για καθένα από αυτά όμως έχει πλέον απομονωθεί και χαρακτηριστεί ένας μεγάλος αριθμός εμπλεκόμενων γονιδίων. Για παράδειγμα, μια νέα κατηγορία LysM υποδοχέων κινάσης, που αντιλαμβάνεται τα σήματα των ριζοβιακών Nod-παραγόντων επάγει την ανάπτυξη του φυματίου και επίσης εμπλέκεται στην αναγνώριση της δομής του σήματος του παράγοντα Nod, άρα συμμετέχει στον καθορισμό της εξειδίκευσης μεταξύ των συμβιωτών. Πιο πρόσφατα, τα διαθέσιμα gain-of-function και loss-of-function μεταλλάγματα κατέστησαν δυνατή τη μελέτη του ρόλου μεμονωμένων γονιδίων κατά τη μόλυνση της ρίζας και των αναπτυξιακών διαδικασιών που οδηγούν στο σχηματισμό λειτουργικών φυματίων. Ο συνδυασμός τους

μάλιστα, σε συνθετικά μεταλλάγματα, έδειξε ότι το *Lotus* μπορεί να μολυνθεί με 3 διαφορετικούς τρόπους και παρείχε στοιχεία υπέρ της θεωρίας ότι η αρχή της προσβολής εντοπίζεται στο σημείο όπου γίνεται η επιδερμική διακυτταρική επαφή, με τη συνεπακόλουθη μόλυνση που εξελίσσεται από το σημείο εισόδου (Radutoiu, 2003).

1.2.3 *Medicago truncatula*

Το *Medicago truncatula*, όπως και το *Lotus*, αν και αξιοποιήθηκε αρχικά ως οργανισμός μοντέλο σε μελέτες που αφορούσαν τη συμβίωση αζωτοδεσμευτικών ριζοβίων με ψυχανθή, προς σχηματισμό μη καθορισμένων φυματίων. σήμερα χρησιμοποιείται στην έρευνα κάθε πτυχής της βιολογίας φυτών, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης των φύλλων και των άνθεων, των αλληλεπιδράσεων με άλλους οργανισμούς, όπως έντομα και μύκητες, καθώς και την αντοχή στην ξηρασία. Επιπλέον, αποτελεί οργανισμό μοντέλο και για την μελέτη του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών διότι παράγει μια πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών, με σημαντικότερους τα φλαβονοειδή (Liu, 2017).

Με την ολοκλήρωση λοιπόν της γονιδιωματικής ανάλυσης του *Medicago truncatula*, η έρευνα έχει περάσει στο μετα-γονιδιωματικό επίπεδο και η κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων επιτελείται, όπως και στους υπόλοιπους οργανισμούς μοντέλα, με δημιουργία μεταλλαγμάτων. Όπως και στο *Lotus japonicus*, η χημική μεταλλαξιγένεση με EMS έχει συμβάλλει στο σχηματισμό ενός μεγάλου πληθυσμού μεταλλαγμάτων. Ο βομβαρδισμός νετρονίων επίσης έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ώστε να δημιουργηθεί ένα πληθυσμός με ελλείψεις μεγάλων γονιδιακών τμημάτων. Πιο επιτυχημένη όμως μέθοδος μεταλλαξιγένεσης από τις 2 παραπάνω, έχει αποδειχθεί η χρήση του *Tnt1* σημασμένου τρανσποζόνιου. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την ανίχνευση της θέσης της μετάλλαξης με εφαρμογή απλών μεθόδων PCR διευκολύνοντας τις πρόσθιες και οπίσθιες γενετικές αναλύσεις (Tadege, 2008).

Η κοινή μηδική (*Medicago sativa*) αποτελεί στενό συγγενή του *Medicago truncatula,* αλλά και το σπουδαιότερο κτηνοτροφικό ψυχανθές παγκοσμίως και το ενδιαφέρον σχετικά με την τροποποίηση του μεταβολισμού του, με στόχο να βελτιωθούν οι κτηνοτροφικές αποδόσεις, είναι πάρα πολύ υψηλό (Reddy, 2005). Παρόλα αυτά, το γονιδίωμα του είναι τετραπλοειδές και σε συνδυασμό με την ανικανότητα αυτογονιμοποίησης, το συγκεκριμένο είδος δεν επιτρέπει άμεσες γενετικές αναλύσεις. Αντιθέτως, το διπλοειδές και αυτογονιμοποιούμενο *Medicago truncatula* αξιοποιείται με μεγάλη επιτυχία για την κατανόηση των μεταβολικών μονοπατιών του *Medicago sativa* (Liu, 2017). Μια κατηγορία ουσιών, με μεγάλη σημασία στην κτηνοτροφία, είναι τα πολυμερή φλαβαν-3-ολης (Pas) διότι ένα μέτριο περιεχόμενο σε PAs, της ζωοτροφής, μπορεί να αποτρέψει μια δυνητικά θνησιγόνα κατάσταση στα εκτρεφόμενα μηρυκαστικά. Με στόχο τη βελτίωση του περιεχομένου σε PAs, στο *Medicago sativa,* πραγματοποιούνται μελέτες όσον αφορά τη βιοσύνθεση των PAs στο *Medicago truncatula*. Οι παραπάνω έρευνες έχουν αποκαλύψει σημαντικές διαφορές στο συγκεκριμένο μονοπάτι μεταξύ του *Medicago truncatula* και του *Arabidopsis thaliana*. Παρόμοιες μελέτες γίνονται και με στόχο την ελάττωση του περιεχομένου σε λιγνίνη ώστε να επιτελείται καλύτερη πέψη από τα εκτρεφόμενα ζώα (Zhou, 2010).

1.2.4 *Phaseolus vulgaris*

Τα είδη του γένους *Phaseolus*, στα οποία συμπεριλαμβάνεται και το κοινό φασόλι, εμφανίζουν ένα μεγάλο εύρος παραλλακτικότητας σε πολλά μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Ο βιολογικός του κύκλος μπορεί να είναι ετήσιος ή πολυετής, με την ανάπτυξη του να χαρακτηρίζεται από θαμνώδη έως αναρριχητική. Επίσης, η αναπαραγωγή του επιτυγχάνεται είτε με αυτογονιμοποίηση είτε με σταυρογονιμοποίηση και οι διαφορετικές ποικιλίες του μπορούν να ανταπεξέλθουν σε διαφορετικά περιβάλλοντα, δηλαδή ψυχρά, θερμά, ξηρά ή με υψηλή υγρασία. Το συγκεκριμένο γένος περιλαμβάνει 5 καλλιεργούμενα είδη με διακριτά συστήματα προσαρμογής και αναπαραγωγής. Το *Phaseolus vulgaris* αναπτύσσεται σε εύκρατα κλίματα με αναπαράγεται με αυτογονιμοποίηση, το *Phaseolus lunatus* σε ζεστά με υψηλή υγρασία και αναπαράγεται επίσης με αυτογονιμοποίηση, το *Phaseolus cocineus* σε ζεστά και ξηρά και είναι κλειστόγαμο, ενώ τα *Phaseolus acutifolius* και *Phaseolus polyantus* σε ψυχρά με υψηλή υγρασία και αναπαράγονται με σταυρογονιμοποίηση (De Ron & Santalla, 2001). Από αυτά, το *Phaseolus vulgaris* χρησιμοποιήθηκε ως καλλιεργούμενος οργανισμός μοντέλο ώστε να κατανοηθούν σημαντικές αρχές της γενετικής. Οι πρόσφατες εξελίξεις στη φυλογενετική των γενών, σε συνδυασμό με τη μεγάλη γνώση σχετικά με την εξέλιξη του συγκεκριμένο είδους, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που έχουν καταστήσει το κοινό φασόλι ως μοντέλο έρευνας. Αρχικά, το γονιδίωμα του είναι διπλοειδές και διαθέτει 22 χρωμοσώματα, ενώ αποτελεί ένα από τα μικρότερα στην οικογένεια των ψυχανθών, με μεσαίο μέγεθος και τις εκτιμήσεις να το τοποθετούν στα 590 με 640Mbp. Επίσης, ο αριθμός των γονιδίων που έχουν αλληλουχηθεί ξεπερνά τα 1000 και το περιεχόμενο σε G+C κυμαίνεται στο 40% (Gepts, 2001). Παραπάνω

από 25 συνδετικοί χάρτες χαμηλής ποιότητας έχουν αναπτυχθεί για το κοινό φασόλι και 12 από αυτούς έχουν συσχετιστεί μέσω ενός μοριακού χάρτη σύνδεσης, ο οποίος σχεδιάστηκε με χρήση RFLP, RAPD, ισοενζύμων, AFLP, ISSR, μικροδορυφόρων και φαινοτυπικών δεικτών, με συνολικό μέγεθος 1200cM. Αρκετές δημοσιεύσεις περιγράφουν αλληλουχίες τρανσποζονίων και έχουν πλέον συντεθεί αρκετές BAC βιβλιοθήκες για τα παραπάνω είδη. Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός γονίδιων και QTLs έχει εντοπιστεί στο χάρτη, όπως και ομάδες γονιδίων ανθεκτικότητας σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Σημαντική είναι και η δυνατότητα μετασχηματισμού που έχει επιτευχθεί μέχρις σήμερα, με μεγάλη επιτυχία, τόσο με βιολιστικές μεθόδους όσο και με τη χρήση Agrobacterium. Τέλος, η αλληλούχιση του *Phaseolus vulgaris* είναι πλέον διαθέσιμη και αναμένεται να συμβάλλει σημαντικά στη μελέτη των ψυχανθών. Μερικές εφαρμογές αναμένεται να αποτελέσουν η ανάπτυξη δεικτών DNA με στόχο την επιλογή και τη βελτίωση, η ανίχνευση και η ταυτοποίηση γονιδίων καθώς και η συγκριτική ανακάλυψη γονιδίων στα ψυχανθή (Freyre, 1998).

1.2.5 *Populus trichocarpa*

Από άποψη φυσιολογίας και γενετικής, τα δέντρα αντιπροσωπεύουν κάτι εκ διαμέτρου αντίθετο με το *Arabidopsis* και τα είδη που αναφέρθηκαν παραπάνω, διότι χαρακτηρίζονται από μεγάλους χρόνους γενεάς, μεγάλη διάρκεια ζωής και αποτελούν πολυετή ξυλώδη είδη. Παρόλα αυτά, τα δέντρα δεν σχηματίζουν μια μονοφυλογενετική ομάδα αλλά εντοπίζονται σε ποικίλες οικογένειες φυτών, με το *Populus* πιο συγκεκριμένα, να ανήκει στον κλάδο Eurosidae I μαζί με το *Arabidopsis.* Έτσι, το *Arabidopsis* είναι πιο συγγενικό με το *Populus* από ότι με τη μεγάλη πλειονότητα των υπόλοιπων ομάδων δικοτυλήδονων, στις οποίες εμπεριέχονται δέντρα, πολύ περισσότερο δε, σε σύγκριση με τα μονοκοτυλήδονα όπως το *Oryza* ή τα γυμνόσπερμα δέντρα όπως τα κωνοφόρα, που διαχωρίστηκαν από τα ευδικοτυλήδονα πολύ πριν την ανάπτυξη των οικογενειών των ευδικοτυληδόνων πριν από 100 με 120 εκατομμύρια χρόνια. Το *Populus* παρέχει τη δυνατότητα να μελετηθεί ως μοντέλο πληθώρας βιολογικών διαδικασιών που αντιπροσωπεύουν καλύτερα το εύρος της βιολογίας φυτών (Jansson & Douglas, 2007). Η ανάδειξη του όμως, ως οργανισμό μοντέλο, δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί δίχως την ραγδαία ανάπτυξη γονιδιωματικών και μοριακών δεδομένων για το γένος, γεγονός που κορυφώθηκε με την ολοκλήρωση της γονιδιωματικής ανάλυσης του *Populus trichocarpa*. Οι πληροφορίες αυτές αποτελούν τη βάση μελετών συγκριτικής βιολογίας, μεταξύ του *Arabidopsis* και του *Populus,* ως εκπροσώπων δύο άκρων της κατηγορίας των αγγειόσπερμων, που επιτρέπουν την ανίχνευση μηχανισμών που έχουν διατηρηθεί στα ευκοτυλήδονα. Ίσως, το πιο σημαντικό είναι η κατανόηση του πως διαφορετικές γενεαλογίες, που έχουν υποστεί διαφορετικές εξελικτικές πιέσεις, έχουν αξιοποιήσει κοινούς μηχανισμούς με διαφορετικούς τρόπους. Ένα παράδειγμα αποτελεί η μελέτη της έκφρασης του ρυθμιστικού συστήματος CONSTANS(CO)/FLOWERING(FT). Στο *Arabidopsis,* το συγκεκριμένο μονοπάτι ρυθμίζει τη φωτοεξαρτώμενη επαγωγή της άνθησης. Στο *Populus* όμως, δε ρυθμίζει μόνο την άνθηση αλλά σχετίζεται και με τη εμφάνιση των οφθαλμών στο τέλος της περιόδου, μια διαδικασία που απουσιάζει από το *Arabidopsis.* Προφανώς, το σήμα που παρέχεται από τις φωτοεξαρτώμενες ταλαντώσεις στην παρουσία των mRNA των CO και FT έχει αξιοποιηθεί από το *Populus* ώστε να ρυθμίζει 2 διαφορετικά αναπτυξιακά μονοπάτια. Η παραπάνω περίπτωση αντικατοπτρίζει τη σημασία της συγκριτικής βιολογίας στην παροχή γνώσης στο φαινόμενο της μεταγωγής σήματος, που δε θα μπορούσε να αποκτηθεί από τη μελέτη μόνο ενός μοντέλου (Koornneef, 1998). Παράλληλα με την αλληλούχιση αξιοποιούνται και άλλα εργαλεία λειτουργικής γονιδιωματικής όπως οι μικροσυστοιχίες DNA. Σε επίπεδο πρωτεωμικής προς το παρόν, τα δεδομένα είναι σε πολύ αρχικό επίπεδο, αλλά ο χαρακτηρισμός 45555 γονιδιακών μοντέλων από την αλληλούχιση του γονιδιώματος πρόκειται να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της πρόβλεψης πρωτεϊνών από τα δεδομένα της φασματομετρίας μαζών. Μέχρι στιγμής, έχουν αποκτηθεί σετ δεδομένων για πρωτεΐνες που συσσωρεύονται κατά τη δημιουργία του ξύλου, τον εγκλιματισμό του βλαστού στο κρύο και τη ξηρασία, από ανάλυση LC-MS/MS σημείων σε 2-D gels. Παρότι η περίπλοκη βιοχημεία του *Populus* προσφέρει την ευκαιρία για σύγκριση του βιοχημικού φαινοτύπου με τον γονότυπο, το περιβάλλον και την ανάπτυξη, οι δημοσιευμένες μελέτες είναι ελάχιστες. Παρόλα αυτά, έχουν μελετηθεί ολιστικές μεταβολές στους μεταβολίτες, με ανάλυση GC-TOFMS, και ποσοτικοποίηση μεταγραφημάτων κατά το σχηματισμό του ξύλου, επιτρέποντας τη δημιουργία μοντέλων με αναπρογραμματισμένο μεταβολισμό υδατανθράκων (Morreel, 2006). Επίσης, προσεγγίσεις γενετικής μεταβολωμικής έχουν αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό QTLs που ελέγχουν την ροή πολύπλοκων ομάδων φλαβονοειδών. Τέλος, η μελέτη του μεταβολικού προφίλ μεταλλαγμάτων για τη σύνθεση της λιγνίνης αποκάλυψε μεταβολές στην ποσότητα των υδατανθράκων και άλλων μεταβολιτών σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά, επιτρέποντας το διαχωρισμό μεταξύ στενών συγγενικά ατόμων (Jansson & Douglas, 2007).

1.3 Εδαφική αλατότητα

Η εδαφική αλατότητα αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τις αρδευόμενες καλλιέργειες. Σε θερμές και ξηρές περιοχές του πλανήτη τα εδάφη είναι πολύ συχνά αλατούχα με μικρές προοπτικές εγκατάστασης καλλιεργειών. Σε αυτές τις περιοχές οι περισσότερες καλλιέργειες που εγκαθίστανται, εν τέλει, αναπτύσσονται με άρδευση, επιδεινώνοντας το πρόβλημα στις περιπτώσεις που υφίσταται ανεπαρκής διαχείριση της και οδηγώντας σε δευτερογενή αλάτωση που επηρεάζει το 20% των αρδευόμενων εκτάσεων παγκοσμίως.

Τα άλατα στο έδαφος εντοπίζονται φυσικά υπό τη μορφή ιόντων που είτε απελευθερώνονται από διαβρωμένα ορυκτά, είτε ανέρχονται από υπόγεια επιφανειακά υδάτινα ρεύματα. Όταν όμως η βροχόπτωση δεν είναι επαρκής ώστε να ξεπλυθούν τα ιόντα από την επιφάνεια του εδάφους, αυτά συσσωρεύονται με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται υψηλή αλατότητα (Blaylock & al., 1994). Όλα τα εδάφη περιέχουν υδατοδιαλυτά άλατα, από τα οποία τα φυτά απορροφούν όσα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη τους. Εν τούτοις, η συσσώρευση η αλάτων παρεμποδίζει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη των φυτών. Κατά τη διάρκεια του προηγούμενου αιώνα, ποικίλες φυσικοχημικές και βιολογικές διαδικασίες υποβάθμισαν την ποιότητα των εδαφών θέτοντας σε κίνδυνο φυσικούς πόρους μεγάλης κλίμακας, με την έκταση των εδαφών που επηρεάζεται από την αλατότητα να αυξάνεται συνεχώς λόγω της εγκατάστασης αρδευόμενων καλλιεργειών σε νέες περιοχές (Patel & al., 2011).

Τα καλλιεργούμενα φυτά επιδεικνύουν ένα φάσμα αποκρίσεων υπό το στρες αλατότητας, διότι η αλατότητα όχι μόνο ελαττώνει την παραγωγικότητα, στις περισσότερες καλλιέργειες, αλλά επηρεάζει επίσης τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και την οικολογική ισορροπία της περιοχής. Οι επιδράσεις της αλατότητας αποτελούν το αποτέλεσμα περίπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ πληθώρας μορφολογικών, φυσιολογικών και βιοχημικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένων της βλάστησης, της αύξησης και της πρόσληψης νερού και θρεπτικών. Κάθε πτυχή της ανάπτυξης των φυτών επηρεάζεται και πιο συγκεκριμένα, η αλατότητα προκαλεί στους φυτικούς οργανισμούς συνθήκες τοξικότητας από ιόντα, ωσμωτικού στρες, έλλειψης θρεπτικών στοιχείων, οξειδωτικού στρες και έτσι περιορίζει την απορρόφηση νερού από το έδαφος. Για παράδειγμα, η διαθεσιμότητα του φωσφόρου περιορίζεται διότι τα ιόντα φωσφόρου καθιζάνουν με τα ιόντα ασβεστίου (Bano & Fatima, 2009). Ορισμένα στοιχεία, όπως το νάτριο, το χλώριο και το βόριο, έχουν εξειδικευμένες επιπτώσεις τοξικότητας στα φυτά. Για παράδειγμα, η ευρεία συσσώρευση νατρίου στα κυτταρικά τοιχώματα μπορεί να οδηγήσει ταχύτατα σε ωσμωτικό στρες και κυτταρικό θάνατο. Επειδή πολλά άλατα αποτελούν επίσης και θρεπτικά συστατικά, τα υψηλά επίπεδα αλατότητας μπορούν να διαταράξουν την ισορροπία των θρεπτικών ή να παρεμποδίσουν την πρόσληψη άλλων. Ακόμα, η αλατότητα επηρεάζει τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα κυρίως μέσω του περιορισμού της φυλλικής επιφάνειας, του περιεχομένου σε χλωροφύλλη και της αγωγιμότητας των στομάτων, καθώς και, σε χαμηλότερο βαθμό, μέσω του περιορισμού της αποτελεσματικότητας του φωτοσυστήματος ΙΙ. Επιπλέον, σημαντική είναι η επίδραση της στην αναπαραγωγική ανάπτυξη διότι η μικροσποριογένεση και η επιμήκυνση του στήμονα παρεμποδίζονται σε συνθήκες στρες και επάγεται η γήρανση γονιμοποιημένων εμβρύων (Ashraf, 2004).

Η διατήρηση του ωσμωτικού δυναμικού είναι απαραίτητη για την επιβίωση των φυτών που αναπτύσσονται σε αλατούχα εδάφη και οποιαδήποτε μεταβολή της οδηγεί σε απώλεια της σπαργής, κυτταρική αφυδάτωση και εν τέλει στον κυτταρικό θάνατο. Από την άλλη, δυσμενείς επιδράσεις στην αύξηση του φυτού επέρχονται από την ελάττωση των προϊόντων της φωτοσύνθεσης και των ορμονών στα αναπτυσσόμενους ιστούς. Η τοξικότητα των ιόντων, προκύπτει ως αποτέλεσμα της αντικατάστασης των ιόντων καλίου από τα αντίστοιχα του νατρίου, στις βιοχημικές αντιδράσεις, και της επαγόμενης, από τα ιόντα νατρίου και χλωρίου, αλλαγής διαμόρφωσης διάφορων πρωτεϊνών. Για πολλά ένζυμα, το ιόν καλίου δρα ως συμπαράγοντας και δεν μπορεί να αντικατασταθεί από το ιόν του νατρίου, ενώ απαιτείται υψηλή συγκέντρωση καλίου και για την πρόσδεση του tRNA στα ριβοσώματα. Τα 2 παραπάνω φαινόμενα προκαλούν μεταβολική ανισορροπία που καταλήγει σε οξειδωτικό στρες (Chinnusamy et al., 2006). Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλεται προσωρινά ο κυτταρικός κύκλος, λόγω ελάττωσης της έκφρασης και της δραστικότητας των κυκλινών και των εξαρτωμένων από κυκλίνη κινασών, που οδηγεί στη δημιουργία λιγότερων κυττάρων στο μερίστωμα και άρα περιορισμό της ανάπτυξης (Seckin & al., 2009).

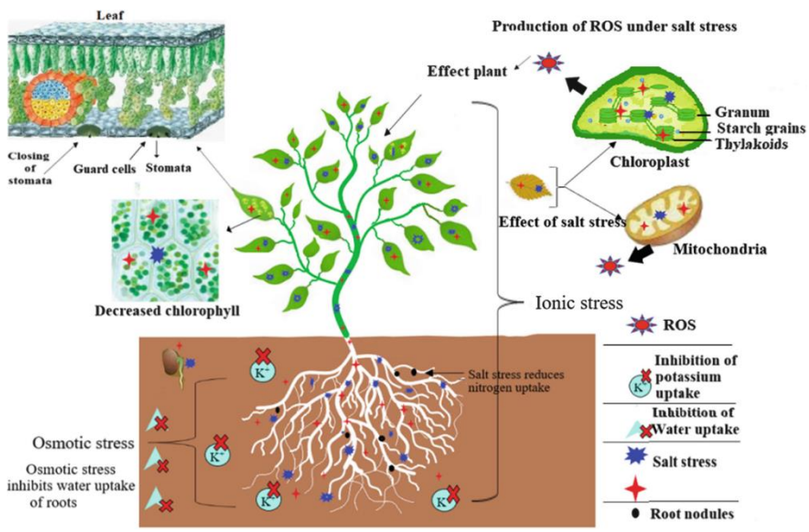
1.4 Φυσιολογικές αποκρίσεις γλυκόφυτων στην αλατότητα του εδάφους

Η αλατότητα στο έδαφος καταπονεί τα φυτά με 2 τρόπους. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων δυσχεραίνουν την πρόσληψη νερού από τις ρίζες, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων εντός του φυτού

μπορεί να προκαλέσουν τοξικότητα. Τα άλατα που βρίσκονται στο εξωτερικό των ριζών έχουν άμεση επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη και στο μεταβολισμό, εν αντιθέσει με την ενδοκυττάρια συσσώρευση τους που απαιτεί χρόνο ώστε να επηρεάσει τη λειτουργία του φυτού (Munns & Tester, 2008). Επειδή το χλωριούχο νάτριο αποτελεί το πιο διαλυτό και διαδομένο άλας, παρατηρείται ότι όλα τα φυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη συσσώρευση του και την επιλογή άλλων θρεπτικών στοιχείων, που βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις, όπως τα νιτρικά και τα καλιούχα, σε σχέση με αυτό. Στα περισσότερα φυτά, τα ιόντα νατρίου και χλωρίου απομακρύνονται επιτυχώς από τις ρίζες παράλληλα με την πρόσληψη νερού από το έδαφος. Μάλιστα, τα αλόφυτα, συγκριτικά με τα γλυκόφυτα, διατηρούν την παραπάνω ικανότητα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις άλατος (Munns, 2005).

Η παραλλακτικότητα που παρατηρείται, όσον αφορά την αντοχή στην αλατότητα, στα δικοτυλήδονα είδη είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι στα μονοκοτυλήδονα. Ορισμένα ψυχανθή είναι εξαιρετικά ευαίσθητα, άλλα όμως, όπως η μηδική έχουν υψηλή ανθεκτικότητα, ενώ τα αλόφυτα αναπτύσσονται και σε επίπεδα αλατότητας υψηλότερα του αλατόνερου. Μάλιστα, αρκετά αλόφυτα δικοτυλήδονα απαιτούν υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (100-200mM) για να έχουν τη βέλτιστη ανάπτυξη (Flowers & al., 1986)

Η απόκριση των φυτών στην αλατότητα μπορεί να περιγράφει ως ένας περιορισμός στην ανάπτυξη του βλαστού που συμβαίνει σε 2 φάσεις. Η πρώτη από αυτές είναι ταχεία και οφείλεται στην άυξηση της εξωτερικής ωσμωτικής πίεσης, ενώ η δεύτερη οφείλεται στη συσσώρευση των ιόντων νατρίου στα φύλλα (Munns, 2005). Κατά τη διάρκεια της ωσμωτικής φάσης, η οποία ξεκινά αμέσως μετά την αύξηση των επιπέδων της αλατότητας πέρα ενός σημείου, ο ρυθμός αύξησης του βλαστού μειώνεται σημαντικά, με το σημείο αυτό να ορίζεται περίπου στα 40mM χλωριούχου νατρίου για τα περισσότερα φυτά. Επιπλέον, ο ρυθμός αύξησης των φύλλων ελαττώνεται, με τους οφθαλμούς να εμφανίζουν επίσης μια καθυστερημένη ανάπτυξη, οπότε σχηματίζονται λιγότεροι βλαστοί. Ο περιορισμός στο μέγεθος των φύλλων ή τον αριθμό των βλαστών που παρατηρείται στα δικοτυλήδονα είδη είναι εκτενής, με την ανάπτυξη του βλαστού να παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία από την αντίστοιχη της ρίζας, κάτι που συμβαίνει και στα ξηρά εδάφη αλλά δεν έχει δοθεί προς το παρόν εξήγηση. Μια θεωρία αναφέρει ότι ο περιορισμός της ανάπτυξης της φυλλικής επιφάνειας μπορεί να ελαττώσει τη χρήση νερού από το φυτό, άρα με τη διατήρηση της εδαφικής υγρασίας να αποτραπεί η κλιμάκωση της συγκέντρωσης του άλατος στο έδαφος. Στη δεύτερη φάση, που είναι εξειδικευμένη ως προς το ιόν, η συγκέντρωση του άλατος έχει ξεπεράσει τα όρια της τοξικότητας στα παλιά φύλλα, τα οποία δεν αναπτύσσονται και άρα το άλας δε διαλύεται περαιτέρω όπως συμβαίνει στα νεότερα, οπότε και νεκρώνονται. Αν ο ρυθμός νέκρωσης είναι υψηλότερος από το ρυθμό παραγωγής νέων φύλλων, τότε η φωτοσυνθετική δυνατότητα του φυτού δεν επαρκεί για την κάλυψη των αναγκών των τελευταίων σε υδατάνθρακες, ελαττώνοντας περαιτέρω την αύξηση τους. Το ωσμωτικό στρες συμπερασματικά, όχι μόνο έχει άμεση επίδραση στην αύξηση αλλά επηρεάζει και σε μεγαλύτερο βαθμό τους ρυθμούς ανάπτυξης από το ιοντικό, το οποίο μόνο σε περιπτώσεις ευαίσθητων ειδών ή υψηλών επιπέδων αλατότητας, μπορεί να ξεπεράσει την επίδραση του πρώτου. Ακόμα, στα περισσότερα είδη, τα ιόντα νατρίου φαίνεται ότι φτάνουν τα επίπεδα τοξικότητας πιο γρήγορα από τα αντίστοιχα του χλωρίου (Munns & Tester, 2008).



Εικόνα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση των φυσιολογικών και μεταβολικών αλλαγών στα φυτά κατά τη διάρκεια της καταπόνησης με χλωριούχο νάτριο

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στην αλατότητα εμπίπτουν σε 3 κατηγορίες. Η πρώτη από αυτές αφορά την αντοχή στο ωσμωτικό στρες, το οποίο άμεσα ελαττώνει την κυτταρική επιμήκυνση στις άκρες τις ρίζας

και στα νεαρά φύλλα, προκαλώντας παράλληλα κλείσιμο των στομάτων. Μια ανεπαρκής απόκριση στο ωσμωτικό στρες οδηγεί σε μεγαλύτερη ανάπτυξη των φύλλων και άνοιγμα των στομάτων, αλλά η αυξημένη φυλλική επιφάνεια μπορεί να ωφελήσει μόνο τα φυτά σε εδάφη με επάρκεια νερού καθώς σε αντίθετη περίπτωση το διαθέσιμο νερό εξαντλείται προτού ωριμάσει η καλλιέργεια. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά τον αποκλεισμό των ιόντων νατρίου από το έλασμα των φύλλων. Στις ρίζες, ο αποκλεισμός των ιόντων διασφαλίζει ότι δε θα συσσωρευτούν σε τοξικές συγκεντρώσεις εντός των φύλλων, κάτι που όμως αν δεν επιτευχθεί οδηγεί στην εμφάνιση τοξικότητας, έπειτα από ημέρες ή εβδομάδες, αναλόγως το είδος, και στο πρώιμο θάνατο τα παλαιότερα φύλλα. Τέλος, οι ιστοί εμφανίζουν αντοχή στη συσσώρευση ιόντων, που στηρίζεται στη διαμερισματοποίηση τους τόσο σε κυτταρικό όσο και σε υποκυτταρικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, τα χυμοτόπια των κυττάρων του μεσοφύλλου αποθηκεύουν τα παραπάνω ιόντα προστατεύοντας έως ενός βαθμού τη λειτουργία του φυτού (Munns & Tester, 2008).

Η σχετική σημασία των παραπάνω μηχανισμών ποικίλλει ξεκάθαρα μεταξύ των ειδών, αλλά εξαρτάται επίσης και από τη διάρκεια της έκθεσης στην αλατότητα, τη συγκέντρωση του άλατος καθώς και περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα του νερού και η υγρασία. Για τη διατήρηση της σπαργής και την απουσία τοξικότητας απαιτείται από το φυτό μια ισορροπία στη διαχείριση των ιόντων χλωρίου και νατρίου, η οποία εξαρτάται από το είδος και τις συνθήκες (Greenway & Munns, 1980).

Οι επιδράσεις της ωσμωτικής και της ιοντικής φάσης δεν διαχωρίζονται εύκολα όταν η αλατότητα είναι υψηλή ή τα είδη είναι ευαίσθητα στα ιόντα νατρίου. Παρόλα αυτά, στα περισσότερα φυτά και στις πιο συχνές συνθήκες, οι 2 φάσεις διαχωρίζονται ξεκάθαρα, κάτι που επιτρέπει τον πειραματικό διαχωρισμό των 3 μηχανισμών αντοχής. Η αυξημένη αντοχή στην ώσμωση και η αυξημένη ανθεκτικότητα των ιστών οδηγούν σε μια βελτιωμένη ικανότητα αύξησης για μια δεδομένη συσσώρευση ιόντων νατρίου στα φύλλα. Όμως μπορούν να διακριθούν διότι η μεν πρώτη επιδρά θετικά στην παραγωγή νέων φύλλων, ενώ η δεύτερη γίνεται εμφανής λόγω της αυξημένης επιβίωσης των παλαιότερων (Munns & al., 1995).

Όσον αφορά την επίδραση της αντοχής στο ωσμωτικό στρες, ο ρυθμός αύξησης των φύλλων μειώνεται όταν αυξάνεται η αλατότητα του εδάφους και για αυτό ευθύνεται κυρίως η ωσμωτική επίδραση του άλατος γύρω από τις ρίζες. Μια ξαφνική αύξηση στην αλατότητα του εδάφους οδηγεί σε απώλεια νερού από τα φύλλα, αλλά η παραπάνω απώλεια όγκου και σπαργής είναι παροδική καθώς εντός μερικών ωρών τα κύτταρα επανέρχονται στα φυσιολογικά τους επίπεδα λόγω της ωσμωτικής ρύθμισης. Παρόλα αυτά, οι ρυθμοί επιμήκυνσης και διαίρεσης παραμένουν μειωμένοι με αποτέλεσμα να εμφανίζονται πιο αργά τα νέα φύλλα, τα οποία χαρακτηρίζονται και από μέγεθος μικρότερο του φυσιολογικού. Οι διαστάσεις αλλάζουν με βάση τον άξονα του μήκους κυρίως και έτσι τα φύλλα γίνονται πιο μικρά και πυκνά. Στην περίπτωση των ακραίων βλαστών, μέτρια επίπεδα αλατότητας παρεμποδίζουν την ανάπτυξη τους, κάτι που γίνεται αντιληπτό έπειτα από μήνες, ενώ έπειτα από εβδομάδες επηρεάζεται η αναπαραγωγική ανάπτυξη, όπως η πρώιμη άνθηση ή παρατηρείται μειωμένος αριθμός άνθεων. Κατά την παραπάνω περίοδο, ένας αριθμός παλαιότερων φύλλων μπορεί να πεθάνει, με τα νεότερα φύλλα να εξακολουθούν να σχηματίζονται. Οι παραπάνω αλλαγές αποτελούν αποκρίσεις του φυτού στην ωσμωτική επίδραση του άλατος και είναι αντίστοιχες με αυτές της ξηρασίας (Fricke & Peters, 2002). Ο μηχανισμός που ελέγχει τον περιορισμό της ανάπτυξης των φύλλων και των βλαστών δεν είναι ακόμα γνωστός. Στην περίπτωση των φύλλων, η υπόθεση που κυριαρχεί αναφέρει πιθανή ορμονική σηματοδότηση καθώς ο ελαττωμένος ρυθμός είναι ανεξάρτητος της παροχής υδατανθράκων και νερού. Το αμπσισικό οξύ αποτελεί μια ένωση που παίζει κεντρικό ρόλο στη σηματοδότηση μεταξύ των κυττάρων καθώς και μεταξύ του βλαστού με τη ρίζα. Επίσης σχετίζεται με τη ρύθμιση της αύξησης και της αγωγιμότητας των στομάτων. Παρόλα αυτά, μετρήσεις που έγιναν σε φύλλα από κριθάρι και αραβόσιτο, σε συνθήκες αλατότητας, δεν υποστηρίζουν έναν αποκλειστικό, από το αμπσισικό έλεγχο, η συγκέντρωση του οποίου αυξάνεται παροδικά στην ζώνη ανάπτυξης αλλά επιστρέφει στις αρχικές χαμηλές τιμές έπειτα από 24 ώρες, με τον ρυθμό αύξησης των φύλλων να παραμένει μειωμένος. Οι γιββερελλίνες αποτελούν επίσης μια ακόμα υποψήφιο κατηγορία σηματοδοτικών μορίων αφού μπορούν να παρεμποδίσουν την επιμήκυνση των φύλλων στο κριθάρι. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί συσσώρευση αρνητικών ρυθμιστών αύξησης, πιο συγκεκριμένα των DELLA πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη δράση των γιββερελλινών σε πολλά είδη, ενώ λαμβάνουν και σήματα από ένα πλήθος ορμονών και αβιοτικών καταπονήσεων. Μάλιστα, υφίσταται η υπόθεση ότι αποτελούν τους κεντρικούς ρυθμιστές της προσαρμογής της ανάπτυξης σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Cramer, 2002). Από την άλλη, η αύξηση της ρίζας επηρεάζεται γενικώς λιγότερο από εκείνη των φύλλων, με το ρυθμό επιμήκυνσης της να επανακάμπτει σε ικανοποιητικό βαθμό έπειτα από έκθεση σε χλωριούχο νάτριο (Munns & Tester, 2008).

Η πιο δραστική απόκριση του φυτού στην αλατότητα αποτελεί το κλείσιμο των στομάτων. Αναμφισβήτητα, οι αποκρίσεις των στομάτων επάγονται από την ωσμωτική επίδραση του άλατος και

θεωρούνται άμεσες, πρωταρχικές και παροδικές λόγω των διαταραχών στο υδατικό ισοζύγιο και τη σύνθεση του αμπσισικού (Fricke & al., 2004). Παρόλα αυτά, η φωτοσυνθετική δραστηριότητα ανά μονάδα φυλλικής επιφάνειας παραμένει αμετάβλητη λόγω των μεταβολών που υφίσταται η κυτταρική ανατομία, όπως περιεγράφηκαν πιο πάνω, και που αυξάνουν την πυκνότητα των χλωροπλαστών ανά μονάδα επιφάνειας (James & al., 2002). Γενικώς, οι σχέσεις αιτίου αποτελέσματος μεταξύ της φωτοσύνθεσης και της αύξησης είναι δύσκολο να διαλευκανθούν και είναι βέβαιο πως κατά την έναρξη της καταπόνησης, ο μειωμένος ρυθμός φωτοσύνθεσης δεν αποτελεί το αποκλειστικό αίτιο του περιορισμού της αύξησης λόγω της ταχύτητας αλλαγής του ρυθμού ανάπτυξης των φύλλων καθώς και της αύξησης στην ποσότητα των αποθηκευμένων υδατανθράκων. Όμως, με την πάροδο του χρόνου, η ανάδρομη αναστολή μπορεί να ρυθμίσει τη φωτοσύνθεση ώστε να αντιστοιχεί στις μειωμένες απαιτήσεις που επάγονται από την αναστολή της αύξησης. Σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, τα άλατα συσσωρεύονται στα φύλλα σε υπερβολικό βαθμό, αλλά ο τρόπος με τον οποίο εκδηλώνεται η τοξικότητα είναι ακόμη άγνωστος. Τα άλατα μπορεί να αφυδατώνουν το κύτταρο, να συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα παρεμποδίζοντας τη δράση ενζύμων ή να κατευθύνονται προς το χλωροπλάστη επιδρώντας άμεσα στη φωτοσυνθετική διαδικασία (Cramer & Bowman, 1991).

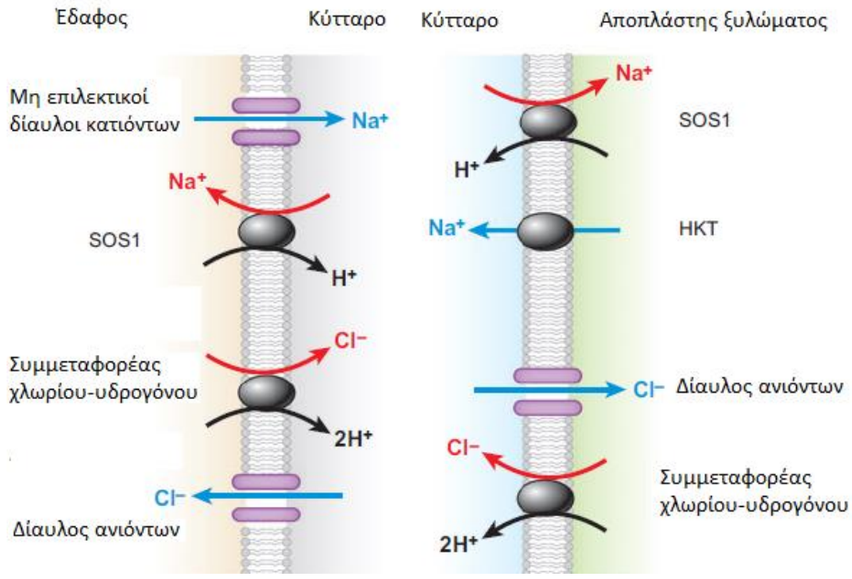
Ο μειωμένος φωτοσυνθετικός ρυθμός ευνοεί το σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου(ROS) και αυξάνει ταυτόχρονα τη δραστικότητα των ενζύμων που αποτοξινώνουν το κύτταρο από αυτές. Τα φυτά, κατά τον εγκλιματισμό τους σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα, υφίστανται μεταβολές στη μορφολογία των φύλλων, τη σύσταση των χρωστικών στο χλωροπλάστη και στη δραστηριότητα βιοχημικών διαδικασιών που αποτρέπουν την οξειδωτική καταπόνηση στα φωτοσυστήματα. Οι 2 διαδικασίες λοιπόν που αποτρέπουν τη φωτοαναστολή λόγω υπερβολικού φωτός είναι η θερμική απόσπαση από τις ξανθοφύλλες και η μεταφορά ηλεκτρονίων σε δότες οξυγόνου εκτός του νερού. Η τελευταία απόκριση μάλιστα, είναι εκείνη που επάγει τη δράση ενζύμων που ρυθμίζουν τα επίπεδα των ROS, όπως για παράδειγμα η καταλάση, η περοξειδάση του ασκορβικού και άλλες, επιτυγχάνοντας εντός των κυτταρικών διαμερισμάτων μια ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης τους, διατηρώντας ταυτόχρονα τα επίπεδα του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε επίπεδα κατάλληλα για σηματοδότηση. Πολλές μελέτες έχουν εντοπίσει διαφορές στην έκφραση και τη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων, που κάποιες φορές συσχετίζονται με πιο ανθεκτικούς γονοτύπους, ενώ άλλες, με πιο ευαίσθητους (Logan, 2005).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η κυτταρική σηματοδότηση κατά τη διάρκεια της καταπόνησης. Τα φυτά έχουν την ικανότητα να αποκρίνονται άμεσα και εξειδικευμένα στην προσθήκη ιόντων νατρίου εντός δευτερολέπτων, όμως οι μηχανισμοί με τους οποίους ανιχνεύουν τα ιόντα και την αλλαγή στην ωσμωτική πίεση παραμένουν ασαφείς. Η εξωκυτταρική συγκέντρωση ιόντων νατρίου μπορεί να ανιχνευθεί είτε μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, είτε εντός του κυττάρου και άρα η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελεί είτε τον ανιχνευτή είτε τοποθετείται αμέσως πριν αυτόν. Στην αρχική απόκριση του φυτού παρατηρείται μια αύξηση στη συγκέντρωση των κυτταροπλασματικών ιόντων ασβεστίου, μέρος του οποίου εισέρχεται και στο χυμοτόπιο. Οι παραπάνω αλλαγές είναι πολύπλοκες και περιλαμβάνονται στην πορεία του βασικού σηματοδοτικού μονοπατιού που σχετίζεται με την καταπόνηση από την αλατότητα. Πιο συγκεκριμένα, η επαγόμενη, από το χλωριούχο νάτριο, αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου μπορεί να ανιχνευθεί από μια πρωτεΐνη με δράση καλσινευρίνης-Β, την SOS3. Παρότι η συγγένεια της SOS3 με το ασβέστιο δεν έχει προσδιοριστεί, αύξηση της συγκέντρωσης του τελευταίου στο κυτταρόπλασμα πιθανώς διευκολύνει το διμερισμό του συμπλόκου CBL3/SOS3 και την επακόλουθη αλληλεπίδραση με την CBL-κινάση. Το σύμπλοκο αυτό μεταφέρεται στη κυτταροπλασματική μεμβράνη διαμέσου μιας αλυσίδας λιπαρού οξέος, επιτρέποντας έτσι τη φωσφορυλίωση και εν τέλει την ενεργοποίηση του αντιμεταφορέα ιόντων νατρίου και υδρογόνου, SOS1 (Tracy & al., 2008).

Το σημείο που η τοξικότητα των ιόντων νατρίου είναι ιδιαιτέρως έντονη είναι το έλασμα των φύλλων, όπου συσσωρεύονται διαμέσου της διαπνοής (Munns, 2002). Η ποσότητα του νατρίου που μεταφέρεται στο βλαστό παραμένει εκεί διότι, στα περισσότερα φυτά, στην αντίστροφη κίνηση προς τη ρίζα, μέσω των αγωγών ιστών, επιτρέπεται η μεταφορά μόνο ενός μικρού ποσοστού. Γίνεται κατανοητό λοιπόν ότι οι διαδικασίες που καθορίζουν τη συσσώρευση του νατρίου στο βλαστό είναι αυτές που ελέγχουν τη μεταφορά του στο ξυλώδη ιστό και χωρίζονται σε 4 τύπους. Πιο αναλυτικά, γίνεται αναφορά στην εισροή εντός των κυττάρων, και στην εκροή εκτός αυτών, από το εξωτερικό μισό της ρίζας και στην εκροή από τα κύτταρα του εσωτερικού μισού της ρίζας προς το ξυλώδη ιστό και την επανεισροή τους (Munns & al., 2006).

Τα ιόντα νατρίου εισέρχονται στη ρίζα παθητικά, μέσω ανεξάρτητων από το μεμβρανικό δυναμικό, μη επιλεκτικών, κατιοντικών διαύλων και πιθανώς μέσω άλλων μεταφορέων όπως οι υψηλής συγγένειας προς

το κάλιο μεταφορείς (Haro et al., 2005). Η ταυτότητα των μη επιλεκτικών κατιοντικών διαύλων παραμένει αβέβαιη, αν και συμμετοχή θεωρείται ότι έχουν οι CNG και οι IGRL δίαυλοι (Demidchik & al., 2002).



Εικόνα 4.2: Προτεινόμενος μηχανισμοί ενεργητικής και παθητικής μεταφοράς ιόντων νατρίου και χλωρίου εντός από το έδαφος προς το κύτταρο και από το κύτταρο προς τον αποπλάστη.

Εντός της ρίζας, καθώς το νερό κινείται από το φλοιό προς το εσωτερικό, τα ιόντα μεταφέρονται από το ρεύμα προς τα κύτταρα, όπου αποθηκεύονται στα χυμοτόπια τους. Το παραπάνω φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε μικροανάλυση ακτίνων Χ, όπου φαίνεται ότι οι χυμοτοπιακές συγκεντρώσεις των ιόντων νατρίου και χλωρίου ελαττώνονται κατά μήκος του φλοιού λαμβάνοντας μέγιστες τιμές στα κύτταρα της επιδερμίδας και της υποεπιδερμίδας και ελάχιστες σε αυτά της ενδοδερμίδας. Επιπλέον, το μεγαλύτερο μέρος των ιόντων νατρίου που εισέρχονται εντός των κυττάρων της ρίζας, στο εξωτερικό της τμήμα, πιθανώς απομακρύνεται μέσω των αντιμεταφορέων ιόντων νατρίου και υδρογόνου, μια διαδικασία που απαιτεί υψηλά ποσά ενέργειας, δεδομένων και των ροών που μετριόνται. Μάλιστα, λόγω του ότι απαιτείται εκροή από όλα τα κύτταρα του φυτού, είναι πιθανό ότι υφίστανται και άλλα γονίδια που κωδικοποιούν αντίστοιχους με τους παραπάνω αντιμεταφορείς (Tester & Davenport, 2003). Επίσης, η πιθανότητα εκροής των ιόντων νατρίου με άλλους μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα με δράση ATPασων, θεωρείται πιθανή. Τέλος, όση ποσότητα νατρίου παραμείνει εντός της ρίζας μπορεί να αποθηκευτεί όπως προαναφέρθηκε στα χυμοτόπια, με το υπόλοιπο να μεταφέρεται στο βλαστό (Cheeseman & al., 1982).

Στη συνέχεια, παρατηρείται κίνηση των ιόντων προς το συμπλάστη, κατά μήκος της ενδοδερμίδας, απελευθέρωση τους στον αποπλάστη και μεταφορά στα ξυλώδη αγγεία μέσω του ρεύματος της διαπνοής. Στα κύτταρα του κυλίνδρου, ο κυτταροπλασματικός αντιμεταφορέας νατρίου και υδρογόνου, SOS1, μπορεί να σχετίζεται με το τελευταίο σκέλος της διακίνησης, μια θεωρία που ωστόσο χρειάζεται αναθεώρηση διότι σε knock out μεταλλάγματα του γονιδίου, τα επίπεδα του νατρίου στο βλαστό αυξήθηκαν αντί να μειωθούν. Ίσως, η αδρανοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στην αρχική είσοδο του νατρίου στη ρίζα να έχει σημαντικότερη επίδραση από ότι η αδρανοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων που εμπλέκονται στη μεταφορά. Ο παραπάνω μεταφορέας ακόμα, εμπλέκεται στην ανάκτηση των ιόντων νατρίου από το ξύλωμα. Με δεδομένο όμως ότι υφίσταται μεγάλη διαφορά μεταξύ του κυτταροπλασματικού και του αποπλαστικού pH, αυτή η ηλεκτρικά ουδέτερη ανταλλαγή θα καθίστατο δυνατή μόνο με μια μεγάλη διαφορά στη δραστικότητα των ιόντων, που θεωρείται αρκετά απίθανη. Ακόμα, προκύπτουν συνεχώς στοιχεία για το ρόλο ορισμένων μελών της *HKT* οικογένειας γονιδίων, σχετικά με την ανάκτηση από το ξύλημα (Shi & al., 2002).

Στο κυτταρικό επίπεδο, οι μορφολογικές αναπροσαρμογές των φύλλων και η ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση καθιστούν δυνατή την ανοχή του ιστού στις υψηλές ποσότητες ιόντων χλωρίου και νατρίου που μεταφέρονται από το βλαστό. Τα δικοτυλήδονα αλόφυτα παρουσιάζουν 2 τύπους αναπροσαρμογής. Πιο αναλυτικά, παρατηρείται αύξηση του κυτταρικού μεγέθους λόγω της αύξησης στο μέγεθος του χυμοτοπίου καθώς και έκκριση των ιόντων από αδένες ή κύστες. Παρόλα αυτά, η μεγέθυνση των χυμοτοπίων δεν συμβαίνει στα μονοκοτυλήδονα και μόλις το 15% των ειδών της παραπάνω κατηγορίας εμφανίζουν αδένες, αλλά σε όλα τα είδη είναι κοινό χαρακτηριστικό η διαμερισματοποίηση εντός του φύλλου (Flowers et al., 1986).

Η συγκέντρωση του νατρίου στο κυτταρόπλασμα πρέπει να διατηρείται χαμηλή, έως την τιμή των 30mM, με τη συγκέντρωση στην οποία να θεωρείται τοξικό να μην έχει καθοριστεί με ακρίβεια. Σε in vitro μελέτες έχει αποδειχθεί ότι 100mM νατρίου αναστέλλουν τη δράση των περισσότερων ενζύμων, με κάποια από αυτά να εμφανίζουν ευαισθησία και σε χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης. Όσον αφορά το χλώριο θεωρείται τοξικό στα ίδια επίπεδα με το νάτριο και ιδανικά, τα 2 αυτά ιόντα πρέπει να αποθηκεύονται σε μεγάλο βαθμό στο χυμοτόπιο. Η παραπάνω διαδικασία έχει αποδειχθεί διότι σε λειτουργικά φύλλα, υπό συνθήκες στρες, αποθηκεύονται υψηλές ποσότητες νατρίου. Ιδιαίτερη σημασία έχει η παρατήρηση ότι τα ένζυμα των αλόφυτων δεν είναι πιο ανθεκτικά στο αλάτι από τα αντίστοιχα των γλυκόφυτων, απλά η διαμερισματοποίηση είναι πιο αποτελεσματική στα πρώτα από ότι στα τελευταία (Flowers & Dalmond, 1992). Η αποτελεσματικότητα στη διαμερισματοποίηση μπορεί όμως να εξηγήσει και διαφορές στην ανθεκτικότητα και μεταξύ συγγενών ειδών. Για να μπορέσει το χυμοτόπιο να αποθηκεύσει τέτοιες ποσότητες νατρίου απαιτείται μια συντονισμένη αύξηση της ωσμωτικής πίεσης στα υπόλοιπα υποκυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένου του κυτταροπλάσματος, ώστε να διατηρηθεί ο όγκος τους, κάτι που μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων καλίου καθώς και συμβατών διαλυμένων ουσιών (Tester & Davenport, 2003).

Όταν τα ιόντα νατρίου και χλωρίου συσσωρεύονται στο χυμοτόπιο ενός κυττάρου, οργανικές διαλυμένες ουσίες που είναι συμβατές με τη μεταβολική δραστηριότητα ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις συσσωρεύονται παράλληλα στο κυτταρόπλασμα και τα οργανίδια για να εξισορροπηθεί η ωσμωτική πίεση των ιόντων. Οι ενώσεις που συσσωρεύονται συνηθέστερα είναι η σακχαρόζη, η προλίνη και η γλυκίνη βεταΐνη, αν και άλλα μόρια μπορούν να συσσωρευτούν σε υψηλές συγκεντρώσεις σε ορισμένα είδη. Σε πολλά αλόφυτα, η προλίνη και η γλυκίνη βεταΐνη εμφανίζονται σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις στα φύλλα (πάνω από 40mM) συμβάλλοντας στην ωσμωτική πίεση (πάνω από 0,1MPa) του κυττάρου συνολικά. Στα γλυκόφυτα από την άλλη, οι συγκεντρώσεις συμβατών οργανικών ουσιών, δεν είναι τόσο υψηλές, καθώς κυμαίνονται στη τάξη των 10mM, αλλά η αποκλειστική τοποθέτηση τους στο κυτταρόπλασμα, τις καθιστά αποτελεσματικούς ωσμολύτες παρέχοντας σημαντική ωσμωτική πίεση. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αυτές οι διαλυμένες ουσίες έχουν κατά πάσα πιθανότητα έναν άλλο ρόλο, πιθανώς σχετικό με τη σταθεροποίηση της τριτογενούς δομής των πρωτεϊνών και λειτουργούν ως ωσμοπροστατευτικά (Flowers et al., 1997).

1.5 Μοριακές αποκρίσεις στην αλατότητα

1.5.1 Βιοχημικές αποκρίσεις

Οι συμβατές διαλυμένες ουσίες, γνωστές και ως συμβατοί ωσμολύτες, αποτελούν μια ομάδα χημικά ποικιλόμορφων οργανικών ενώσεων που είναι αφόρτιστες, πολικές και διαλυτές ενώ επιπλέον δεν παρεμβαίνουν στο κυτταρικό μεταβολισμό ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (Gupta & Huang, 2014). Σε συνθήκες καταπόνησης με αλάτι, πολλά φυτά συνθέτουν και συσσωρεύουν ωσμολύτες ώστε να διατηρούν σταθερή την κυτταρική ωσμωτική ισορροπία και να σταθεροποιούν τις μεμβράνες και τις πρωτεΐνες τους. Με βάση την χημική τους βάση, οι ωσμολύτες ανήκουν σε 3 ομάδες: τις βεταΐνες, τα αμινοξέα και τις πολυόλες με τα μη αναγωγικά σάκχαρα. Με βάση τα ευρήματα ποικίλων ερευνών είναι γνωστό ότι, εντός των κυττάρων, επάγονται μεταβολές στην περιεκτικότητα τους κατά τη διάρκεια της καταπόνησης, καθώς και ότι εξωτερική εφαρμογή τους περιορίζει τις αρνητικές επιδράσεις της αλατότητας. Μελέτες σε μεταβολομικό, μεταγραφομικό, πολυομικό και διαγονιδιακό επίπεδο έχουν επίσης αποδείξει ότι φυτά που υπερεκφράζουν γονίδια υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση και το μεταβολισμό τους παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή στην αλατότητα (Nahar & al., 2016).

Αμινοξέα όπως η κυστεΐνη, η αργινίνη και η μεθειονίνη, που αποτελούν το 55% του συνόλου των ελεύθερων αμινοξέων, ελαττώνονται όταν τα φυτά εκτίθενται σε καταπόνηση με αλάτι, ενώ αντιθέτως η συγκέντρωση της προλίνης αυξάνεται ως απόκριση (El-Shintinawy & El-Shourbagy, 2001). Μάλιστα, η συσσώρευση της προλίνης αποτελεί και ένα γνωστό μέτρο που υιοθετείται για την προστασία από το στρες που προκαλεί η αλατότητα και παράλληλα προμηθεύει το κύτταρο με οργανικό άζωτο κατά την επαναφορά του στη φυσιολογική λειτουργία (Matysik & al., 2002). Η σύνθεση του παραπάνω αμινοξέως αξιοποιεί ως πρόδρομη ένωση το γλουταμινικό οξύ ή την ορνιθίνη, με το γλουταμινικό να έχει κατά βάση αυτή τη λειτουργία στα καταπονημένα από την ώσμωση κύτταρα. Επίσης, το βιοσυνθετικό μονοπάτι περιλαμβάνει 2 ένζυμα, τη συνθετάση και την αναγωγάση του καρβοξυλικού οξέος της πυρρολίνης, που χαρακτηρίζουν βασικά ρυθμιστικά στάδια για την υπερπαραγωγή της προλίνης στα φυτά. Ακόμα, δρα ως συλλέκτης οξυγόνου επιτελώντας και αντιοξειδωτική λειτουργία (Ben Ahmed, 2010).

Η γλυκίνη-βεταΐνη από την άλλη, είναι μια αμφοτερική αζωτούχος ένωση που εντοπίζονται ευρέως σε πληθώρα οργανισμών και χαρακτηρίζεται από ηλεκτρική ουδετερότητα σε ένα μεγάλο εύρος pH. Επιπλέον, είναι εξαιρετικά διαλυτή στο νερό αλλά διαθέτει και μη πολικό χαρακτήρα λόγω της παρουσίας των 3 μεθυλομάδων. Εξαιτίας της μοναδικής δομής της μπορεί να αλληλεπιδρά τόσο με υδρόφοβα όσο και με υδρόφιλα μόρια, όπως ένζυμα και πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Οι λειτουργίες του μορίου αυτού σχετίζονται κυρίως με την αύξηση της ωσμωτικότητας του κυττάρου κατά τη διάρκεια του στρες, τη σταθεροποίηση πρωτεϊνών και τη προστασία της φωτοσύνθεσης από τη δράση οξειδωτικών παραγόντων. Η σύνθεση της βασίζεται στη μετατροπή είτε της χολίνης είτε της γλυκίνης, με την πρώτη να οξειδώνεται αρχικά σε βεταΐνη αλδεΰδη, μια αντίδραση που καταλύεται από τη μονοοξυγενάση της χολίνης που οξειδώνεται ξανά έπειτα σε βεταΐνη από την αφυδρογονάση της βεταΐνης αλδεΰδης. Στο δεύτερο μονοπάτι, που αφορά τη σύνθεση της ουσίας από τη γλυκίνη, επιτελούνται 3 διαδοχικές N-μεθυλιώσεις και οι παραπάνω αντιδράσεις καταλύονται από 2 S-αδενοσυλομεθειονινοεξαρτώμενες μεθυλοτρανσφεράσες, την GMST και την SDMT (Ahmad & al., 2013).

Οι πολυόλες είναι ουσίες με πολλαπλές λειτουργικές υδροξυλομάδες, οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν για την πραγματοποίηση ποικίλων οργανικών αντιδράσεων. Οι σακχαρικές πολυόλες αποτελούν μια κατηγορία πολυολών που δρουν ως συμβατές διαλυμένες ουσίες, ως χαμηλού μοριακού βάρους μεταφορείς και ως συλλέκτες δραστικών μορφών οξυγόνου, ενώ κατηγοριοποιούνται σε 2 ομάδες, τις κυκλικές και τις άκυκλες (Ashraf & Foolad, 2007). Μια χαρακτηριστική πολυόλη είναι η μαννιτόλη που συντίθεται στα φυτά κατά της περίοδο της καταπόνησης χάρη στη δράση της NADPH-εξαρτώμενης αναγωγάσης της 6-φωσφορικής μαννόζης. Ουσίες σαν τη μαννιτόλη λοιπόν προστατεύουν τα ένζυμα και τις μεμβρανικές δομές του κυττάρου που εμφανίζουν ευαισθησία στην αφυδάτωση και στη δράση των προσλαμβανόμενων ιόντων. Έχει αποδειχθεί ότι ο μετασχηματισμός φυτών *Arabidopsis* και *Nicotiana* με το γονίδιο *mltd,* το οποίο κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της 1-φωσφορικής μαννιτόλης, βελτιώνει την ανθεκτικότητα στην αλατότητα, με αποτέλεσμα να διατηρείται η φυσιολογική πορεία αύξησης και ανάπτυξης του φυτού όταν υποβάλλεται σε υψηλά επίπεδα καταπόνησης με αλάτι (Binzel & al., 1988). Η πινιτόλη αποτελεί ακόμα μια πολυόλη που συσσωρεύεται στα φυτικά κύτταρα που υποβάλλονται σε στρες αλατότητας. Το βιοσυνθετικό της μονοπάτι περιλαμβάνει 2 κύρια βήματα, όπου στο πρώτο, η μεθυλίωση της μυο-ινοσιτόλης καταλήγει στη δημιουργία ενός ενδιάμεσου προϊόντος, της ονονιτόλης, το οποίο υφίσταται επιμερίωση ώστε να σχηματιστεί η πινιτόλη. Παρόμοια επίδραση με το *mltd* χαρακτηρίζει και το γονίδιο *imt,* που ευθύνεται για το 1^{ο} βήμα της παραπάνω διαδίκασιας και έτσι, γίνεται κατανοητό ότι και η πινιτόλη εμπλέκεται στο περιορισμό των αρνητικών επιδράσεων του στρες. Καταλήγοντας, η συσσώρευση τόσο ευθύγραμμων, όπως η μαννιτόλη και η σορβιτόλη, όσο και κυκλικών, όπως η μυο-ινοσιτόλη και τα μεθυλιωμένα παράγωγα της, πολυολών έχει συσχετιστεί με αντοχή στη ξηρασία και στην αλατότητα σε πληθώρα ειδών που ανήκουν στους φυτικούς, τους βακτηριακούς, ακόμα και τα ζωικούς οργανισμούς (Bonhert & al., 1995).

Παρόμοια, η παρουσία, σε υψηλές συγκεντρώσεις, σακχάρων, όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η τρεχαλόζη, είναι ένα κοινό φαινόμενο σε φυτά που αντιμετωπίζουν υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, με σκοπό την ωσμωπροστασία, τη διατήρηση του άνθρακα και τη συλλογή δραστικών μορφών οξυγόνου. Η τρεχαλόζη λοιπόν, εκτός από αποθήκη υδατάνθρακα, όταν συσσωρεύεται προστατεύει το κύτταρο από πληθώρα φυσικών και χημικών καταπονήσεων. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται στη ντομάτα, όταν παρουσιαστεί αυξημένη εδαφική αλατότητα, λόγω της αύξησης της δραστικότητας του ενζύμου της συνθάσης της φωσφορικής σακχαρόζης. Επίσης, στο ρύζι έχει παρατηρηθεί ότι το υδατανθρακικό περιεχόμενο μεταβάλλεται αναλόγως του μελετώμενου ιστού, διότι ενώ στη ρίζα καταναλώνεται το άμυλο, δεν ισχύει το ίδιο στο βλαστό. Από την άλλη, στο *Bruguiera parviflora,* το άμυλο καταναλώνεται στα φύλλα, με τα αναγωγικά και μη-αναγωγικά σάκχαρα να αυξάνονται (Parida & al., 2004).

Οι πολυαμίνες είναι μικρού μοριακού βάρους, πολυκατιονικά αλειφατικά μόρια με ευρεία διάδοση στο φυτικό βασίλειο, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση και την ανάπτυξη. Πιο συγκεκριμένα, εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τη σωματική εμβρυογένεση, τη διαφοροποίηση, τη μορφογένεση, την ανάπτυξη των άνθεων και των καρπών καθώς και στη γήρανση. Επιπλέον, η δράση τους έχει συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις όπως η αλατότητα. Οι πιο κοινές πολυαμίνες που εντοπίζονται στα φυτά είναι η διαμινο-πουτρεσκίνη (PUT), η τριαμινο-σπερμιδίνη (SPD) και η τετραμινο-σπερμίνη (SPM) (Al& & al., 2012). Η πρώτη από αυτές, αποτελεί τη μικρότερη πολυαμίνη, και συντίθεται είτε από την ορνιθίνη είτε από την αργινίνη μέσω της δράσης του ενζύμου της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης και της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης αντίστοιχα και αποτελεί βασικό υπόστρωμα για την παραγωγή μεγαλύτερων πολυαμινών, όπως για παράδειγμα των

υπολοίπων δυο που προαναφέρθηκαν (Gupta & al., 2013). Οι SPD και SPM συντίθενται μέσω επιτυχούς προσθήκης αμινοπροπυλικών ομάδων στις PUT και SPD αντίστοιχα, χάρη στα ένζυμα συνθάση της σπερμιδίνης και συνθάση της σπερμίνης (Alcazar & al., 2006). Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης αποτελεί το πιο κοινό μονοπάτι βιοσύνθεσης πολυαμινών στα φυτά και τα περισσότερα γονίδια που εμπλέκονται σε αυτό έχουν εντοπιστεί και κλωνοποιηθεί. Παρόλα αυτά, σε κάποια φυτά, όπως το *Arabidopsis*, απουσιάζει και έτσι η βιοσύνθεση γίνεται μέσω του μονοπατιού της ADC (Kusano & al., 2007). Αυξημένα επίπεδα ενδογενών πολυαμινών στα φυτά έχουν παρατηρηθεί παρουσία υψηλών επιπέδων αλατότητας στο έδαφος με τον καταβολισμό τους να αποτελεί το βασικό τρόπο ρύθμισης τους σε ενδοκυτταρικά. Πιο αναλυτικά, οξειδώνονται από οξειδάσες της αμίνης που περιλαμβάνουν σιδηροεξαρτώμενες οξειδάσες της διαμίνης και FAD-εξαρτώμενες οξειδάσες των πολυαμινών, με τα παραπάνω ένζυμα να διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του στρες (Takahasi & Kakehi, 2010). Αν και οι μεταβολές στα κυτταρικά επίπεδα των πολυαμινών παρέχουν κάποια στοιχεία για τη πιθανή εμπλοκή τους στο στρες, δεν παρέχουν κανένα στοιχείο σχετικά με το ρόλο τους στην αντιμετώπιση του. Έτσι, με εξωγενή εφαρμογή τους αυξήθηκαν τα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών και η θετική τους επίδραση αποδόθηκε στη προστασία της ακεραιότητας των μεμβρανών, τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης που σχετίζεται με τη σύνθεση ωσμωπροστατευτικών μορίων, τη ρύθμιση της συσσώρευσης των ιόντων στα διάφορα όργανα και τον περιορισμό των δραστικών μορφών οξυγόνου (Tisi & al., 2008). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι knock out μεταλλάγματα στα γονίδια ADC1 και ADC2 εμφανίζουν υπερευαισθησία στο στρες ενώ υπερέκφραση των γονιδίων PUT, SPD και SPM στο ρύζι, τον καπνό και το *Arabidopsis,* βελτιώνει την αντοχή στην αλατότητα. Ο έλεγχος της βιοσύνθεσης και του καταβολισμού των πολυαμινών από την αλατότητα πραγματοποιείται χάρη στη δράση της τελευταίας ως κυτταρικό σήμα σε ορμονικά μονοπάτια και επομένως ελέγχοντας το αμπσισικό οξύ. Επιπλέον, τα SPM και SPD θεωρούνται πιθανοί επαγωγείς του νιτρικού οξέος που αποτελεί ένα ακόμη σημαντικό σηματοδοτικό μόριο του οποίου η συνεισφορά στην ανθεκτικότητα στην αλατότητα θα συζητηθεί παρακάτω (Moschou & al., 2008). Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι η εξωτερική εφαρμογή πολυαμινών επιδρούν θετικά στον περιορισμό της αναστολής της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, όμως η παραπάνω επίδραση εξαρτάται σημαντικά από τον τύπο και τη συγκέντρωση των πολυαμινών που αξιοποιούνται, καθώς επίσης και από το είδος της καταπόνησης (Duan & al., 2008).

1.5.2 Γονιδιακές αποκρίσεις

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε συνθήκες καταπόνησης από αλατότητα περιλαμβάνει μια πληθώρα μηχανισμών που αξιοποιούνται από τα φυτά ώστε να αυξήσουν ή να ελαττώσουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδιακών προϊόντων, είτε RNA είτε πρωτεϊνών (Kim & al., 2007). Τα γονίδια που ρυθμίζεται η έκφραση τους μπορούν να ταξινομηθούν σε 7 ομάδες: ενέργεια, μεταβολισμός, μεταγραφή, κυτταρική μεταφορά, κυτταρική επικοινωνία, κυτταρική άμυνα και άλλες. Η κατηγορία με τα περισσότερα που γονίδια που επηρεάζονται είναι συνήθως αυτή του μεταβολισμού ενώ σημαντικό ποσοστό επί του συνόλου των γονίδιων κατέχει και η ομάδα που σχετίζεται με τη κυτταρική άμυνα, με τα περισσότερα γονίδια να ρυθμίζονται θετικά. Όμοια, ρυθμίζονται και οι περισσότερες από τις υπόλοιπες ομάδες γονιδίων (Kim & al., 2006). Η μεταγραφομική ανάλυση παρέχει ακριβείς πληροφορίες σχετικά με τη γονιδιακή έκφραση και έτσι γίνεται η ανίχνευση υποψηφίων γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση στο στρες. Επίσης, γονιδιωματικές προσεγγίσεις συμβάλλουν στην κλωνοποίηση και το χαρακτηρισμό σχετικών σημαντικών γονιδίων (Gupta & Huang, 2014).

Οι οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων bZIP, WRKY, AP2, NAC και DREB συνθέτουν μια μεγάλη ομάδα παραγόντων ρύθμισης της απόκρισης στις καταπονήσεις. Οι παραπάνω μεταγραφικοί παράγοντες ελέγχουν την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων στόχων μέσω πρόσδεσης του cis-δραστικού στοιχείου τους με τους υποκινητές των παραπάνω γονιδίων. Στην περίπτωση λοιπόν των γονιδίων που κωδικοποιούν τους bZIP παράγοντες, έχει παρατηρηθεί ότι υπερεκφράζονται σε ευαίσθητες ποικιλίες σιταριού, που εκτίθενται σε μακροχρόνια καταπόνηση με αλάτι, αλλά έχουν μειωμένη έκφραση στις αντίστοιχες ανθεκτικές (Johnson & al., 2002). Παρομοίως, η υπερέκφραση του NAC μεταγραφικού παράγοντα τόσο στο ρύζι όσο και στο σιτάρι βελτιώνει την ανθεκτικότητα στην αλατότητα, παρέχοντας έτσι ενδείξεις ότι εμπλέκεται στον περιορισμό των αρνητικών επιπτώσεων της αλατότητας (Nakashima & al., 2007). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί στο ρύζι η θετική επίδραση των μεταγραφικών παραγόντων DREB1/CBF και AREB/ABF στην αντιμετώπιση αβιοτικών καταπονήσεων (Mizoi & al., 2012). Από την άλλη, οι παράγοντες OsNAC5 και ZFP179 παρουσιάζουν μια αύξηση στην έκφραση τους υπό συνθήκες αλατότητας, κάτι που πιθανόν σχετίζεται με τη συσσώρευση προλίνης, σακχάρων και πρωτεϊνών LEA που με τη σειρά τους διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του στρες (Song & al., 2011). Όσον αφορά τα

γονίδια-στόχους, αυτά ταξινομούνται σε 4 λειτουργικές κατηγορίες: μεταφορά ή ομοιόσταση ιόντων, γήρανση, μοριακοί μεταφορείς και μεταγραφικοί παράγοντες σχετικοί με την αφυδάτωση (Hasegawa & al., 2000). Ακόμα, ορισμένα ωσμορυθμιστικά και αντιοξειδωτικά γονίδια εμφανίζουν υπερέκφραση σε κάποια φυτικά είδη παρουσία αυξημένης αλατότητας. Για παράδειγμα, η συνεχής έκθεση φυτών ρυζιού σε αλάτι για 24 ώρες οδήγησε στην αύξηση της δραστικότητας των ενζύμων της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και της περοξειδάσης του ασκορβικού, εκ των οποίων και τα 2 χαρακτηρίζονται από ενεργό ρόλο στη συλλογή δραστικών μορφών οξυγόνου, ενώ επίσης, η αύξηση της χρονικής διάρκειας της καταπόνησης οδήγησε στην επαγωγή μεταλλοθειονινών και πρωτεϊνών καναλιών νερού (Kawasaki & al., 2001). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι στο ρύζι, το γονίδιο *SERF1* έχει ιστοειδική επαγωγή στη ρίζα έπειτα από προσθήκη άλατος και υπεροξειδίου του υδρογόνου καθώς και ότι μεταλλάγματα περιορισμένης έκφρασης του παρουσιάζουν προβληματική έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο MAPK μονοπάτι. Πιο συγκεκριμένα, η πρόσδεση του παράγοντα SERF1 στους υποκινητές των γονιδίων *MAP3K6*, *DREB2A* και *ZFP179*, παρατηρήθηκε τόσο in vivo όσο και in vitro ενώ επιπροσθέτως, έχει την ικανότητα να επάγει την έκφραση του (Schmidt & al., 2013). Το γονίδιο *OsRMC* κωδικοποιεί μια RLK πρωτεΐνη που έχει περιγραφεί ως αρνητικός ρυθμιστής των αποκρίσεων στην αλατότητα στο ρύζι. 2 μεταγραφικοί παράγοντες, οι OsEREBP1 και OsEREBP2, που ανήκουν στην οικογένεια AP2/ERF μπορούν να προσδεθούν στο ίδιο μοτίβο αλληλουχίας του υποκινητή του *OsRMC*, ρυθμίζοντας αρνητικά την έκφραση του. Μετέπειτα μελέτες των 2 παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων απέδειξαν ότι παρότι τα επίπεδα mRNA του *OsEREBP1* παραμένουν αμετάβλητα παρουσία άλατος, αμπσισικού ή πολύ χαμηλών θερμοκρασιών και επηρεάζονται αισθητά από τη ξηρασία ή το σχετικό ήπιο κρύο, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα του *OsEREBP2* επηρεάζονται από καθένα από τους παραπάνω παράγοντες, υποδεικνύοντας την πιθανότητα ότι κατέχει βασικό ρόλο στη διαμεσολάβηση της απόκρισης στις αβιοτικές καταπονήσεις (Mukherjee & al., 2006).

1.5.3 Πρωτεϊνικές αποκρίσεις

Η ανάπτυξη της πρωτεομικής τεχνολογίας, σε σχέση με την ικανότητα διαχωρισμού και ανίχνευσης των πρωτεϊνών, αλλά και την ταυτοποίηση τους με φασματοσκοπία μάζας, έχει σημαντικό αντίκτυπο στη μελέτη των αποκρίσεων των φυτών στην καταπόνηση αλατότητας.

Η ανοχή στη αλατότητα έχει συσχετιστεί θετικά με την αποτελεσματική αντιοξειδωτική λειτουργία των φυτικών οργανισμών. Τα αντιοξειδωτικά συστήματα των φυτών εμπεριέχουν ένζυμα όπως η δισμουτάση, η καταλάση, η περοξειδάση του ασκορβικού, η αναγωγάση της γλουταθειόνης και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης αλλά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη και τα καροτενοειδή. Η γλουταθειόνη αποτελεί μια θειόλη που αξιοποιείται από την τρανσφεράση της γλουταθειόνης με στόχο τη δημιουργία συζευγμάτων της με τοξικά παραπροϊόντα της δράσης δραστικών μορφών οξυγόνου στο κύτταρο. Εν συνεχεία, τα παραπάνω συζεύγματα απομακρύνονται από το κύτταρο. Σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της καταπόνησης φέρουν και οι heat shock πρωτεΐνες, που λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί εντός του κυττάρου (Joseph & Jini, 2010).

1.6 Αλατότητα και ψυχανθή

Η καταπόνηση από την αλατότητα αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους περιοριστικούς παράγοντες όσον αφορά την παραγωγικότητα των ψυχανθών σε ξηρές και ημι-ξηρές περιοχές. Όπως έχει αναφερθεί, η διατήρηση της ομοιόστασης των ιόντων είναι πολύ κρίσιμη για την προσαρμογή των ανθεκτικών φυτών στην αλατότητα.

Στη μηδική, ο ανθεκτικός γονότυπος TN1.11 παρουσιάζει αυξημένη ανάπτυξη σε σχέση με το γονότυπο αναφοράς Jemalong A17, ο οποίος εμφανίζει μέτρια ανθεκτικότητα στην αλατότητα (Zahaf & al., 2012). Στη σόγια, η ανθεκτικότητα έχει αποδοθεί, εν μέρει, στη διαμερισματοποίηση των ιόντων νατρίου στα χυμοτόπια των κυττάρων της ρίζας, αποτρέποντας έτσι τη μεταφορά τους στα φύλλα, ενώ επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα ιόντα χλωρίου, τόσο στον ανθεκτικό γονότυπο Dare όσο και στον ευαίσθητο γονότυπο Tachiyutaka, μεταφέρονται στα φύλλα. Οι επιλεκτικοί μηχανισμοί μεταφοράς συνεισφέρουν στη σχέση που υφίσταται μεταξύ συσσώρευσης και ανθεκτικότητας (An & al., 2002). Επιπλέον, στο *L. japonicus* έχει παρατηρηθεί επίσης η ικανότητα αποτροπής της μεταφοράς των ιόντων νατρίου στους βλαστούς (Rubio & al., 2009), με συγκριτικές ιονομικές μελέτες διαφόρων γονιδιωμάτων του φυτού, να αποδεικνύουν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των ιόντων χλωρίου στους βλαστούς εγκλιματισμένων φυτών και της θνησιμότητας υπό την επίδραση θανατηφόρων επιπέδων αλατιού (Sanchez & al., 2011). Συνολικά, η διατήρηση της ομοιόστασης των ιόντων αποτελεί μια περίπλοκη διαδικασία που εξαρτάται από την ικανότητα προσαρμογής του εκάστοτε γονοτύπου και την ένταση της καταπόνησης. Όπως έχει αναφερθεί

σε άλλα φυτικά είδη, οι λόγοι ιόντων καλίου/νατρίου και ασβεστίου/νατρίου καθώς και η εκλεκτικότητα πρόσληψης τους ελέγχουν το διαχωρισμό μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών γονοτύπων στην αλατότητα (Sanchez & al., 2008). Ακόμα, ομόλογα γονίδια στα ψυχανθή, υπεύθυνα για την κωδικοποίηση μεταφορέων ιόντων, έχουν συσχετιστεί με τις αποκρίσεις στην αλατότητα και συμπεριλαμβάνουν μεταφορείς ιόντων νατρίου και αντιμεταφορείς ιόντων νατρίου και υδρογόνου. Μεταξύ τους, ο χυμοτοπιακός αντιμεταφορέας ιόντων νατρίου και υδρογόνου NHX1 θεωρείται βασικός υπεύθυνος για τη διαμερισματοποίηση του νατρίου (Phang & al., 2008).

1.6.1 *Medicago truncatula*

Σε μεταγραφωμικό επίπεδο, ιδιαίτερη σημασία έχει η μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί στο είδος *M. Truncatula*, όπου ανιχνεύθηκαν 328 γονίδια που εμπλέκονται στην επαναφορά της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος, έπειτα από καταπόνηση με αλάτι, στο γονότυπο R108. Μεταξύ των παραπάνω γονιδίων εντοπίστηκε το *MtZPT2-1*, ένας παρόμοιος με το TFIIIA μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στη ρύθμιση της προσαρμογής της ρίζας στην καταπόνηση (Merchan & al., 2007). Μια ακόμα συγκριτική ανάλυση μεταξύ του συνόλου της ρίζας και της κορυφής της, που πραγματοποιήθηκε με 2 ξεχωριστές μεθοδολογίες που περιλάμβαναν ποσοτική RT-PCR και Mt16K+ μικροσυστοιχίες, απέδειξε ότι 824 γονίδια είχαν διαφορική έκφραση όταν τα φυτά υποβάλλονταν στα πρώτα στάδια της καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένων και 84 μεταγραφικών παραγόντων. Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που σχετίζονται με την αντιμετώπιση της αλατότητας εμφανίζει υψηλή έκφραση στις ρίζες ανθεκτικών γονοτύπων στο *M. truncatula*, σε σχέση με ευαίσθητους ακόμα και σε απουσία καταπόνησης, παρατήρηση που οδήγησε στη σύνδεση των γονιδίων αυτών με εξειδικευμένα, ως προς το γονότυπο, ρυθμιστικά μονοπάτια που σχετίζονται με τις αποκρίσεις στην αλατότητα (Gruber & al., 2009). Σχετικά πρόσφατα, μια μεταγραφωμική μελέτη στην οποία συγκρίθηκε ο, προσαρμοσμένος στην αλατότητα, γονότυπος TN1.11 με τον γονότυπο αναφοράς Jemalong A17, επέτρεψε την ανίχνευση σημαντικών παραλλαγών στα προφίλ γονιδιακής έκφρασης της ρίζας ως απόκριση στην καταπόνηση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο Mtb*HLH*-658, που κωδικοποιεί ένα βασικό μεταγραφικό παράγοντα αποτελεί ένα από τα γονίδια που εμφανίζουν αλλαγές στα πρότυπα έκφρασης, με την απορρύθμιση του σχετικού μονοπατιού να πιθανολογείται ότι ευθύνεται για τις φυσιολογικά αποκλίνουσες αποκρίσεις, των παραπάνω γονοτύπων. Η μηδική έχει χαρακτηριστεί ως ένα σχετικά ευαίσθητο φυτό στην αλατότητα, του οποίου η απόδοση ελαττώνεται αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα της τελευταίας. Η βελτίωση του φυτού, πέρα από την επιλογή, πραγματοποιήθηκε μέσω βλάστησης σε αλατούχα υποστρώματα και περαιτέρω αξιολόγησης σε καλλιέργειες κάλλων ή ολόκληρων φυτών. Η απόδοση σε βιομάζα διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ποικιλιών παρουσία άλατος στο έδαφος ενώ το ινώδες ριζικό σύστημα παρέχει τη δυνατότητα διαφυγής σε κάποιο βαθμό. Εν κατακλείδι, παρότι έχουν ταυτοποιηθεί ποικίλες κυτταρικές και μοριακές αποκρίσεις στην εδαφική αλατότητα, οι ακριβείς μηχανισμοί ανθεκτικότητας παραμένουν άγνωστοι, με τις αρχικές εκτιμήσεις να αναφέρουν ότι η μηδική διαθέτει τη δυνατότητα ρύθμισης της πρόσληψης και μεταφοράς των ιόντων ώστε να μη γίνει υπερσυσσώρευση στα φύλλα (Zahaf & al., 2012).

1.6.2 *Lotus japonicus*

Το γένος *Lotus* αποτελεί μια ετερογενής ομάδα ετήσιων και πολυετών φυτών, με τους οικοτύπους MG20 και Gifu, του *Lotus japonicus,* να έχουν υιοθετηθεί ως τα κύρια μοντέλα ψυχανθών σε γονιδιωματικές μελέτες, και τα είδη *Lotus burtii* και *Lotus filicaulis* να συμπληρώνουν την ομάδα των ειδών που αξιοποιούνται γενικώς σε ερευνητικές μελέτες, διότι φέρουν την ικανότητα παραγωγής γόνιμων απογόνων όταν διασταυρώνονται με το *Lotus japonicus.* Οι φυσιολογικές αποκρίσεις των παραπάνω ειδών στην καταπόνηση από αλατότητα, έχουν μελετηθεί σε σχέση με την ικανότητα ανάπτυξης και παραμέτρους όπως η φωτοσύνθεση, το περιεχόμενο σε νερό και ιόντα, η οξειδωτική βλάβη και οι αντιοξειδωτικές αποκρίσεις, σε μελέτες τόσο μικρής όσο και μακράς χρονικής διάρκειας. Οι αναπτυξιακές αποκρίσεις που εμφανίζουν οι 4 αυτοί γενότυποι εμφανίζουν σημαντική παραλλακτικότητα (Melchiorre & al., 2009). Πιο αναλυτικά, στις δοκιμές σύντομης χρονικής διάρκειας, χαμηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου οδηγούν στην καταπόνηση του οικοτύπου Lj Gifu διότι ελαττώνεται σημαντικά το μήκος της ρίζας και του βλαστού. Από την άλλη, ο οικότυπος Lj MG20 κατατάσσεται στην κατηγορία των ήπια αλόφιλων καθώς στις ίδιες συγκεντρώσεις παρουσιάζει την βέλτιστη ανάπτυξη (Melchiorre & al., 2009). Επιπλέον, ελάττωση στο λόγο μεγέθους ρίζας προς βλαστό θεωρείται ότι μπορεί να ελαττώσει τη χρήση νερού (Munns & Tester, 2008), με τη μείωση του μεγέθους της ρίζας να παρατηρείται σε όλους τους γονοτύπους παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου. Παρόλα αυτά, η παρατηρούμενη μείωση του μεγέθους της ρίζας είναι λιγότερο έντονη στον οικότυπο Lj MG20, ενώ αντιθέτως στο είδος *L. filicaulis* και στον οικότυπο Lj Gifu η μείωση ήταν ιδιαιτέρως έντονη τόσο στο μέγεθος της ρίζας όσο και στο λόγο μεγέθους ρίζας προς βλαστό.

Οι παραπάνω διαφορές, στις δοκιμές μικρής χρονικής διάρκειας, μπορούν να συσχετιστούν σε μεγάλο βαθμό με την δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού συστήματος και την περιεκτικότητα σε ιόντα. Σχετικά με την αντιοξειδωτική δραστηριότητα λοιπόν, ο οικότυπος Lj MG20 παρουσιάζει αυξημένη δραστικότητα δισμουτάσης του υπεροξειδίου και αναγωγάσης της γλουταθειόνης καθώς και υψηλή περιεκτικότητα σε ανηγμένη γλουταθειόνη, με το περιέχομενο σε ιόντα νατρίου να είναι το χαμηλότερο στα φύλλα αλλά και στις ρίζες. Από την άλλη, τα *L. burtii* και *L. filicaulis* χαρακτηρίζονται από υψηλότερο περιεχόμενο σε ιόντα νατρίου από τους οικοτύπους του *L. japonicus*. Ακόμα, αφού στο Lj Gifu το περιεχόμενο σε ιόντα νατρίου ήταν χαμηλό, η παρατηρούμενη ελάττωση του ρυθμού ανάπτυξης μπορεί να αποδοθεί σε άλλους παράγοντες όπως το υψηλό περιεχόμενο της ρίζας στα παραπάνω ιόντα, την έλλειψη επαγωγής αντιοξειδωτικών ενζύμων και το χαμηλό περιεχόμενο σε γλουταθειόνη. Όσον αφορά τις δοκιμές μεγάλης χρονικής διάρκειας, σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, οι αποκρίσεις των φυτών διέφεραν σημαντικά από ότι στις μικρής διάρκειας και η ελάττωση του μεγέθους της ρίζας και του βλαστού ήταν πολύ εντονότερη από ότι στα νεαρά φυτά. Όσον αφορά τη βιομάζα, η μείωση της αποδείχθηκε ότι είναι εντονότερη στα Lj MG20 και *L. burtii* φτάνοντας το 60%, ενώ η ελάττωση της βιομάζας της ρίζας ήταν εντονότερη σε κάθε γονότυπο από την αντίστοιχη του βλαστού, με το λόγο μεγέθους ρίζας προς βλαστό να παραμένει αμετάβλητος. Εν αντιθέσει με τις δοκιμές μικρής χρονικής διάρκειας, στη μακρόχρονη έκθεση στην αλατότητα δεν παρουσιάζεται μεταβολή στη δραστικότητα δισμουτάσης στα Lj MG20 και *L. burtii*. Από την άλλη, η επαγωγή της αναγωγάσης της γλουταθειόνης στα *L. burtii* και Lj Gifu δε συνοδεύεται από αύξηση της περιεκτικότητας σε ανηγμένη γλουταθειόνη (Melchiorre & al., 2009).

1.6.3 *Phaseolus vulgaris*

Το *Phaseolus vulgaris* αποτελεί ένα ευρέως καλλιεργούμενο φυτό, με υψηλή διατροφική σημασία και οικονομική αξία παγκοσμίως. Καθώς όμως καλλιεργείται σε εδάφη με έντονα αλατούχες συνθήκες, αντιμετωπίζει σε μεγάλο βαθμό καταπόνηση από το αλάτι. Δύο επαρκώς χαρακτηρισμένοι γονότυποι του συγκεκριμένου είδους είναι ο υψηλής απόδοσης Tema και ο χαμηλής απόδοσης Djadida. Οι 2 αυτοί γονότυποι, παρουσία αλατιού στο υπόστρωμα ανάπτυξης, έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται φυσιολογικά εάν η συγκέντρωση του άλατος διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Σε περίπτωση που η συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου αυξηθεί περαιτέρω παρατηρείται δραστική μείωση της βιομάζας και των 2 γονοτύπων, με την απόκριση όμως σχετικά με τη μεταβολή του ξηρού βάρους να διαφέρει. Το παραπάνω οφείλεται στο ότι ο γονότυπος Tema παρουσιάζει καλύτερο ρυθμό ανάπτυξης. Όσον αφορά την ενδοκυτταρική παρουσία των ιόντων νατρίου, τόσο η αποδοτική όσο και η μη αποδοτική ποικιλία συσσωρεύουν πολύ μεγάλες ποσότητες ιόντων νατρίου, ενώ παράλληλα ελαττώνεται η περιεκτικότητα σε ιόντα καλίου. Παρόλα αυτά, στην περίπτωση του γονοτύπου Tema, η ανεκτικότητα των ιστών στην παρουσία του νατρίου είναι εντονότερη, με τα επίπεδα των ιόντων καλίου να είναι και αυτά υψηλότερα, σε σχέση με του Djadida. Σε βιοχημικό επίπεδο, η δραστικότητα χαρακτηριστικών αντιοξειδωτικών ένζυμων, όπως η καταλάση, η αναγωγάση της γλουταθειόνης και η περοξειδάση του ασκορβικού, είναι υψηλότερη στον αποδοτικό γονότυπο από τον ευαίσθητο, του οποίου μάλιστα, ο βιοχημικός κύκλος του ασκορβικού με τη γλουταθειόνη είναι λιγότερο ενεργός, κάτι που υποδεικνύει ότι πιθανώς το μονοπάτι Halliwell-Asada διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα του είδους στην αλατότητα (Khaled & al., 2016).

1.7 Σημασία και βιοτεχνολογική εφαρμογή ψυχανθών δένδρων

Τα ψυχανθή δένδρα, λόγω των διατροφικών, οικολογικών και οικονομικών χαρακτηριστικών τους, έχουν προσελκύσει τα τελευταία χρόνια σε σημαντικό βαθμό το ερευνητικό ενδιαφέρον. Μάλιστα, η καλλιέργεια τους σε υποβαθμισμένες εκτάσεις έχει συμβάλλει ώστε να γίνουν κατάλληλες για γεωργική ανάπτυξη, χάρη στην ικανότητα τους να αζωτοδεσμεύουν καθώς και να ελέγχουν την εδαφική διάβρωση και τη μικροβιακή βιοποικιλότητα (Castro & al., 2017).

Τα συστήματα αγροδασοπονίας, όπου συνδυάζονται οι καλλιέργειες ποωδών ειδών με δένδρα, με στόχο τη βελτίωση της ανάπτυξης καλλιεργειών οικονομικού ενδιαφέροντος και τη συντήρηση του εδάφους, αποτελούν ένα σημαντικό μέσο στήριξης της γεωργίας μικρής κλίμακας. Τα *Acacia*, *Anadenanthera*, *Calliandra*, *Faidherbia* και *Prosopis* αποτελούν ιδιαίτερα αποδοτικά γένη, με το πρώτο να έχει εισαχθεί στις άγονες και ημι-άνυδρες περιοχές της Μαδαγασκάρης και του Κονγκό βοηθώντας στην ανάκτηση των εδαφών που υποβαθμίζονται λόγω της γεωργικής παραγωγής (Tassin et al., 2012). Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη την αυξημένη ζήτηση ορυκτών καυσίμων, η ανάπτυξη νέων εναλλακτικών λύσεων όπως η παραγωγή βιοενέργειας αποτελεί μια ελπιδοφόρα εναλλακτική λύση για τη μείωση της εξάρτησης από τα τελευταία. Υπό αυτήν την οπτική, είδη δένδρων αυτά όπως της οικογένειας των ψυχανθών, έχουν μεγάλες δυνατότητες

παραγωγής βιοντίζελ και βιοαιθανόλης διότι εμφανίζουν υψηλή ανθεκτικότητα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και έχουν ταχεία ανάπτυξη (Guo et al., 2015).

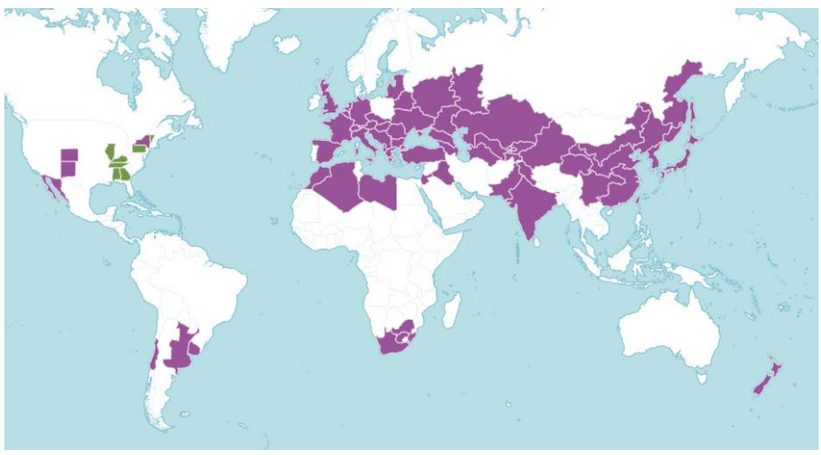
1.8 *Robinia pseudoacacia*

Το είδος *Robinia pseudoacacia* αναπτύσσεται φυσιολογικά σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών αλλά η βέλτιστη ανάπτυξη του παρατηρείται σε πλούσια σε ασβεστόλιθο, υψηλής υγρασίας εδάφη. Ανήκει στην οικογένεια Leguminosae και ως εκ τούτου διαθέτει αζωτοδεσμευτική ικανότητα, κάτι που σε συνδυασμό με την ταχεία του ανάπτυξη καθιστούν το συγκεκριμένο είδος ιδανικό για βιοαποκατάσταση εδαφών. Επιπλέον, είναι κατάλληλο για την παραγωγή καυσόξυλων και παρέχει κάλυψη για την διαβίωση της πανίδας (Huntley).

Εικόνα 8.1: *Robinia pseudoacacia*

1.8.1 Γεωγραφική κατανομή

Το *Robinia pseudoacacia* χαρακτηρίζεται από μια διευρυμένη περιοχή προέλευσης, στη βορειοαμερικανική ήπειρο, το εύρος της οποίας δεν είναι γνωστό. Στα ανατολικά εντοπίζεται στα Απαλάχια Όρη και εκτείνεται από τη κεντρική Πενσυλβάνια και το νότιο Οχάιο έως τη βόρεια Αλαμπάμα και τη βόρεια Τζόρτζια. Στα δυτικά, εντοπίζεται σε μία έκταση που περιλαμβάνει το νότιο Μισσούρι, το βόρειο Αρκάνσας και τη βορειοανατολική Οκλαχόμα. Επίσης, πληθυσμοί του έχουν παρατηρηθεί στο Ιλλινόις και το Κεντάκι ενώ έχει εισαχθεί και εξαπλωθεί και σε περιοχές εκτός της αμερικανικής ηπείρου, όπως σε τμήματα της Ευρώπης και της Ασίας (Little, 1971).



Εικόνα 8.2: Κατανομή του είδους ανά ήπειρο. Με πράσινο χρωματισμό έχουν σημειωθεί οι περιοχές στις οποίες το είδος είναι ιθαγενές ενώ με μωβ οι περιοχές στις οποίες έχει εισαχθεί.

1.8.2 Κλιματικές συνθήκες

Οι κλιματικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται το συγκεκριμένο είδος χαρακτηρίζονται από υψηλή υγρασία και πληθυσμοί του παρατηρούνται κυρίως σε ψυχρά και υγρά δάση καθώς και σε ήπια θερμά και υγρά ορεινά δάση (Sawyer & Lindsey, 1964). Όσον αφορά τα εύρη θερμοκρασιών, τον Ιανουάριο αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από -7 έως 13^{o}C ενώ τον Αύγουστο από 13 έως 27^{o}C, με τη μέση διάρκεια

της ελεύθερης από παγετό περιόδου να κυμαίνεται από 150 έως 210 μέρες, το συνολικό ύψος βροχόπτωσης να κυμαίνεται από 1020 έως 1830 χιλιοστά βροχής και τη μέση ετήσια συνολική χιονόπτωση αντίστοιχα από 5 έως 152 εκατοστά. Όπως προαναφέρθηκε, το *Robinia pseudoacacia* έχει εισαχθεί σε πολλά άλλα μέρη του κόσμου με συνθήκες διαφορετικές από τις παραπάνω (U.S. Department of Commerce, 1968).

1.8.3 Εδαφολογικές συνθήκες

Οι πιο συνηθισμένοι τύποι εδάφους που επιτρέπουν την εγκαθίδρυση ενός πληθυσμού του συγκεκριμένου είδους χαρακτηρίζονται είτε από υψηλή υγρασία και υψηλή περιεκτικότητα σε άργιλο είτε από υψηλή περιεκτικότητα σε ασβεστόλιθο ενώ ιδανικές είναι οι επικλινείς τοποθεσίες σε υψόμετρο χαμηλότερο των 1040 μέτρων. Αντιθέτως, η ψευδοακακία είναι πολύ ευαίσθητη σε μη αποστραγγισμένα ή συμπαγή εδάφη με pH εκτός των συνηθισμένων ορίων (Roach, 1965).

1.8.4 Ανάπτυξη φυταρίου

Επειδή το *Robinia pseudoacacia* έχει καλλιεργηθεί εκτενώς, οι πρώιμες καλλιεργητικές τεχνικές έχουν χαρακτηριστεί σε μεγάλο βαθμό. Οι ξηροί σπόροι μπορούν να αποθηκευτούν σε κλειστά δοχεία στους 2.5^{o}C και να διατηρήσουν τη ζωτικότητα τους μέχρι και 10 χρόνια. Επιπλέον, το τοίχωμα των σπόρων είναι μη διαπερατό οπότε απαιτείται σκαριφισμός, που επιτυγχάνεται είτε με διάβροχη με θειϊκό οξύ, είτε με εμβάπτιση σε βραστό νερό, είτε τέλος με μηχανικά μέσα (Olson, 1974). Κατά την ανάπτυξη του φυταρίου, που είναι ταχεία σε συνθήκες έλλειψης ανταγωνισμού, το πρώτο φύλλο εμφανίζεται εντός μιας εβδομάδας από τη φύτρωση και έχει μέγεθος 8 με 10 εκατοστά μετά από 2 μήνες. Από την άλλη, το μέσο ετήσιο ύψος ανάπτυξης καλλιεργειών ηλικίας 5 ετών κυμαίνεται από 0,3, σε διαβρωμένες περιοχές, έως 0,8 μέτρα, σε περιοχές δίχως διάβρωση (Maisenhelder, 1969).

1.8.5 Ανάπτυξη υπέργειου τμήματος και ριζικού συστήματος

Αποτελεί ένα μεσαίου μεγέθους δέντρο, με ύψος που κυμαίνεται στα 12 με 18 μέτρα και διάμετρο στα 30 με 80 εκατοστά. Το ριζικό της σύστημα είναι επιφανειακό αλλά εξαπλώνεται σε μεγάλο βαθμό, κάνοντας το έδαφος πιο συμπαγές, ενώ έχει τη δυνατότητα να αναπτύξει τις ρίζες της σε μεγάλο βάθος (Roach, 1965).

1.8.6 Παραγωγή σπόρων

Η σποροπαραγωγή ξεκινά στην ηλικία των 6 ετών και παράγει καλές σοδειές ανά διαστήματα διάρκειας 1 με 2 ετών. Η σποροπαραγωγή όμως είναι βέλτιστη στις ηλικίες μεταξύ 15 με 40 έτη και συνεχίζει μέχρι τα 60, με απόδοση που κυμαίνεται στα 11 κιλά σπόρων ανά 45 κιλά καρπών (Chang & al., 1998).

1.8.7 Γενετική σύσταση

Το συγκεκριμένο είδος είναι διπλοειδές και χαρακτηρίζεται είτε από 20 είτε από 22 χρωμοσώματα ενώ τετραπλοειδή στελέχη έχουν δημιουργηθεί μέσω διπλασιασμού με κολχικίνη in vitro σε κορυφές βλαστών κλώνων ψευδοακακίας (Ewald & al., 2009).

1.8.8 Βιοχημεία

Πολλά μέρη του φυτού είναι τοξικά, ειδικά στον κορμό, λόγω της ύπαρξης υψηλών συγκεντρώσεων της τοξαλβουμίνης ροβινίνης και έχουν αναφερθεί περιστατικά δηλητηρίασης τόσο ανθρώπων όσο και εκτρεφόμενων ζώων. Τα φύλλα και τα άνθη περιέχουν γλυκοσυλιωμένες φλαβόνες ενώ στο εσωτερικό του ώριμου κορμού έχει εντοπιστεί υψηλό περιεχόμενο σε φαινολικά και φλαβονοειδή (Veitch et al. 2010). Αντιθέτως, στο μη ώριμο κορμό, οι αντίστοιχες ποσότητες αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών είναι πολύ μικρότερες. Όσον αφορά τα φύλλα, έχουν απομονωθεί 3 ενώσεις, η ροβινετίνη, η μυρικετίνη και η κερκετίνη, καθεμία από τις οποίες μπορεί να παρεμποδίσει την ανάπτυξη ζιζανίων (Dunisch & al., 2010).

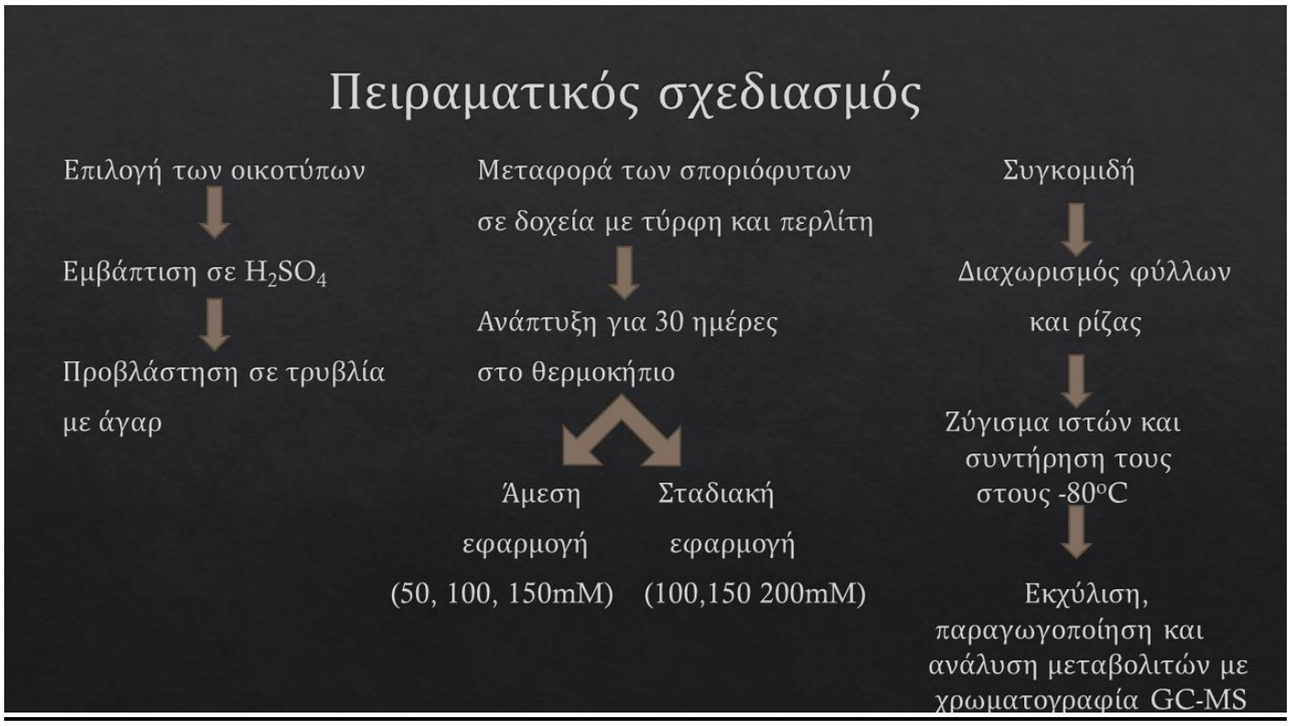
1.8.9 Οικονομική αξία και διατήρηση

Το *Robinia pseudoacacia* αποτελεί ένα ιδιαίτερα πολυδιάστατο δέντρο με μεγάλη οικονομική σημασία. Το ανθεκτικό ξύλο του αξιοποιείται ως καύσιμη ύλη και ξυλοπολτός για την κατασκευή φραχτών και επίπλων. Ακόμα, γίνεται εκμετάλλευση του για παραγωγή βιοελαίων καθώς και βιοαιθανόλης από τη βιομάζα του. Άλλες χρήσεις του συμπεριλαμβάνουν τη σταθεροποίηση εδαφών, τον έλεγχο της διάβρωσης καθώς και τη βιοαποκατάσταση ξερότοπων και περιοχών εξορύξεων. Τέλος, η ικανότητα του να αζωτοδεσμεύει έχει αποδειχθεί ότι μεταβάλλει τα χαρακτηριστικά του εδάφους καθώς όχι μόνο αυξάνει το συνολικό εδαφικό άζωτο αλλά ταυτόχρονα αυξάνει και τον οργανικό άνθρακα, τροποποιεί το εδαφικό pH και ελαττώνει την ποσότητα του συνολικού φωσφόρου (Cierjacks & al., 2013).

1.8.10 Αποκρίσεις στην αλατότητα

Μελέτη στην οποία φυτάρια αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα με αλάτι απέδειξε ότι η βιομάζα του φυτού ελαττώνεται σημαντικά καθώς όσο αυξάνονται τα επίπεδα αλατότητας. Πιο συγκεκριμένα, η ξηρή βιομάζα της ρίζας ελαττώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τις αντίστοιχες των φύλλων και του στελέχους, κάτι που υποδεικνύει ότι έχει σημαντική επίδραση στη συνολική ελάττωση της βιομάζας. Επίσης, μείωση παρουσιάζει το συνολικό μήκος ρίζας, όπως επίσης και η συνολική επιφάνεια, οπότε η ικανότητα πρόσληψης νερού και ιόντων περιορίζεται. Επιπλέον, η μείωση τόσο της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας όσο και της δραστηριότητας της ρίζας υποδεικνύουν ότι παρεμποδίζεται η φυσιολογική λειτουργία του φυτού παρουσία αλατιού. Συμπερασματικά, η ελάττωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας προκύπτει από τα σχετικά χαμηλά επίπεδα νερού εντός του φυτικού οργανισμού, καθώς επίσης και από το κλείσιμο των στομάτων που παρατηρείται σε τέτοιες περιπτώσεις (Mao et al., 2016). Από μια ακόμα μελέτη που διεξήχθη και ανέλυσε τις διαφορές στην απόκριση που εμφανίζουν τα διπλοειδή με τα τετραπλοειδή στελέχη προέκυψαν εξίσου σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις μεταβολές σε φυσιολογικό και πρωτεωμικό επίπεδο. Τα διπλοειδή φυτά λοιπόν, αντιμετωπίζουν με μεγαλύτερη δυσχέρεια τις επιδράσεις της αλατότητας από ότι τα τετραπλοειδή. Ο λόγος που συμβαίνει το παραπάνω, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της ανάλυσης με ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων είναι διαφορές που περιλαμβάνουν αυξημένη περιεκτικότητα σε ένζυμα με δραστικότητα συλλογής ελευθέρων ριζών και φωτοσυνθετικές πρωτεΐνες στα τετραπλοειδή φυτά σε σχέση με τα διπλοειδή (Wang et al., 2013).

Πειραματικός σχεδιασμός



Η επιλογή των μελετώμενων οικοτύπων στηρίχτηκε στα αποτελέσματα προκαταρκτικού πειράματος στο οποίο μελετήθηκε η ανάπτυξη τριών διαφορετικών οικοτύπων ψευδοακακίας σε τρεις συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου. Πιο συγκεκριμένα, φυτάρια των οικοτύπων G5, SD και DB αφότου φύτρωσαν σε τρυβλία με διηθητικό χαρτί και νερό, μοιράστηκαν και μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με αλατούχο απεσταγμένο νερό, συγκεντρώσεων 0, 50, 100 και 150 mM χλωριούχου νατρίου (NaCl), και αναπτύχθηκαν για 2 μέρες. Έπειτα λήφθηκαν μετρήσεις βάρους και μήκους του υπέργειου τμήματος τους καθώς και της ρίζας τους. Από την επεξεργασία των μετρήσεων προέκυψε ότι ο οικότυπος DB είχε καλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με τους υπόλοιπους δυο οικοτύπους.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

2.1.1 Το φυτό

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *Robinia pseudoacacia* (οικότυποι DB και SD).

2.1.2 Προετοιμασία και προβλάστηση σπόρων

Για την ομοιόμορφη και γρήγορη βλάστηση των σπερμάτων του *R. pseudoacacia* τοποθετήθηκαν σε πυκνό θειικό οξύ (H_2SO_4) για 60 λεπτά. Έπειτα, ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με απιονισμένο νερό διάρκειας περίπου 10 λεπτών. Η αποστείρωση των σπερμάτων πραγματοποιήθηκε με εμβάπτισή τους σε διάλυμα 3% υποχλωριώδους νατρίου 10 λεπτά. Στη συνέχεια, τα σπέρματα ξεπλύθηκαν 6 φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Ακολούθως, μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε τρυβλία που περιείχαν άγαρ 1,5% και τοποθετήθηκαν στους 4^oC για 24 ώρες, μετα το πέρας των οποίων, μεταφέρθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο ανάπτυξης, σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες.

2.1.3 Συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης του *R. pseudoacacia*

Για την ανάπτυξη τους, τα νεαρά έκφυτα μετά την προβλάστηση, μεταφέρθηκαν ανά ζεύγη σε δοχεία που περιείχαν ως εδαφικό υπόστρωμα τύρφη και αποστειρωμένο περλίτη σε αναλογία 3:1. Έπειτα, τα δοχεία μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, που ανήκει στο Εργαστήριο Πειραματισμού και Βελτίωσης. Το θερμοκήπιο ήταν ανοικτού τύπου, με τον αερισμό του να γίνεται με αυτόματα μηχανικά μέσα από τα πλάγια και τοποθέτηση κατά τον άξονα ανατολής-δύσης. Οι θερμοκρασίες που αναπτύχθηκαν κατά τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο, όταν και διεξάχθηκε το πείραμα, ήταν εντός του εύρους 18-28^oC. Επιπλέον, τοποθετήθηκε κάλυψη άνωθεν των δοχείων, καθώς και παγίδες, για την προστασία των φυτών από τα έντομα. Το πότισμα των εκφύτων, κατά το στάδιο της ανάπτυξης, πραγματοποιούνταν, ανά 3 ημέρες εναλλάξ, με 70mL θρεπτικού διαλύματος B&D συγκέντρωσης 50% και απεσταγμένου νερού για 30 ημέρες.

2.1.4 Συνθήκες καταπόνησης του *R. pseudoacacia*

Για την καταπόνηση των νεαρών φυταρίων αξιοποιήθηκαν 2 διαφορετικές προσεγγίσεις. Κατά τον άμεσο εγκλιματισμό στην αλατότητα, μελετήθηκε η επίδραση διαλυμάτων συγκέντρωσης 50, 100 και 150mM, ενώ κατά τον σταδιακό εγκλιματισμό, μελετήθηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 100, 150 και 200mM. Το πότισμα των φυτών σε αυτό το στάδιο πραγματοποιούνταν, ανά 3 ημέρες εναλλάξ, με 70mL θρεπτικού διαλύματος B&D συγκέντρωσης 50%, στο οποίο είχε διαλυθεί κατάλληλη ποσότητα άλατος ανάλογα με την εφαρμογή, και απεσταγμένου νερού για 3 εβδομάδες.

2.1.5 Συγκομιδή φυτών

Η συλλογή του φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 2 ημερών, κατά τις ώρες 10:00 με 13:00. Τα φυτά ζυγίστηκαν σε φαρμακευτικό ζυγό ακρίβειας 3 ψηφίων, για τον προσδιορισμό του νωπού τους βάρους, φωτογραφήθηκαν και αφού διαχωρίστηκαν τα φύλλα και οι ρίζες έγινε ψύξη των παραπάνω ιστών με υγρό άζωτο και αποθήκευση τους στους -80^oC.

2.2 Βιομετρία

Για τον προσδιορισμό του νωπού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο φαρμακευτικός ζυγός, όπως προαναφέρθηκε, ενώ η μέτρηση του μήκους των φυταρίων έγινε με χρήση του προγράμματος ανάλυσης εικόνας ImageJ, στο οποίο αναλύθηκαν οι φωτογραφίες των φυτών παρουσία κατάλληλης κλίμακας.

2.3 Προσδιορισμός της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του εδαφικού υποστρώματος

Για τον προσδιορισμό της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του εδαφικού υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε το αγωγιμόμετρο ακριβείας Hanna HI993310 αφού προηγουμένως βαθμονομήθηκε με πρότυπο διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- Συλλογή 5g εδαφικού δείγματος από κάθε εφαρμογή
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε φούρνο στους 65^oC με σκοπό την απομάκρυνση της υγρασίας

- Μεταφορά των δειγμάτων σε ξεχωριστά γυάλινα beaker και προσθήκη 100mL dH_2O.
- Ανάδευση για 2 λεπτά και διατήρηση τους σε ακινησία για 1 ώρα
- Προσεκτικό φιλτράρισμα με διηθητικό χαρτί ώστε να αποκλειστεί η παρουσία σωματιδίων εδάφους στο προκύπτον διάλυμα
- Μέτρηση της αγωγιμότητας του διαλύματος με το αγωγιμόμετρο

2.4 Ανάλυση μεταβολιτών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)

2.4.1 Εκχύλιση μεταβολιτών από ιστούς φύλλων και ρίζας

Με τη διαδικασία της εκχύλισης επιτυγχάνεται η επιτυχής απομόνωση των προς μελέτη ουσιών. Αρχικά, η μηχανική διάρρηξη των κυττάρων, με την ομογενοποίηση των ιστών, σε συνδυασμό με την προσθήκη του εκχυλιστικού μέσου οδηγούν στην απελευθέρωση του ουσιών στο εκχυλιστικό διάλυμα. Έπειτα, με την επώαση των δειγμάτων σε υψηλή θερμοκρασία αδρανοποιούνται τα ένζυμα που θα μπορούσαν να τροποποιήσουν ποικίλους μεταβολίτες αλλοιώνοντας το μεταβολικό προφίλ του ιστού. Εν συνεχεία, η προσθήκη του χλωροφορμίου οδηγεί στο διαχωρισμό των φάσεων, με τις πολικές ουσίες να κατανέμονται στην υδατική φάση και τις μη πολικές, δηλαδή λιπίδια κ.α, στην οργανική φάση. Ακολούθως, η προσθήκη απιονισμένου νερού αυξάνει τον όγκο της υδατικής φάσης, που με τη φυγοκέντρηση διαχωρίζεται πλήρως από την οργανική. Τέλος, η προσθήκη αέριου N_2 πραγματοποιείται για την προστασία των μεταβολιτών από την οξείδωση. Πιο αναλυτικά το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- Ομογενοποίηση του φυτικού υλικού σε γουδί με γουδοχέρι παρουσία ποσότητας υγρού N_2
- Μεταφορά 50mg ομογενοποιημένου ιστού σε φιαλίδιο eppendorf
- Αποθήκευση του eppendorf σε υγρό N_2 μέχρι την ολοκλήρωση της ομογενοποίησης του συνόλου των δειγμάτων
- Προσθήκη 400μL εκχυλιστικού διαλύματος μεθανόλης-ριβιτόλης
- Τοποθέτηση τους στο πάγο
- Ανάδευση των φιαλιδίων σε μηχανικό αναδευτήρα Vortex για περίπου 30 δευτερόλεπτα
- Μεταφορά των φιαλιδίων σε φούρνο για επώαση, σε θερμοκρασία 70^oC, και ανάδευση τους ανά 3 με 5 λεπτά
- Προσθήκη 200μL χλωροφόρμιο στα φιαλίδια
- Ανάδευση των φιαλιδίων σε μηχανικό αναδευτήρα Vortex για περίπου 30 δευτερόλεπτα
- Επώαση για 5 λεπτά στους 37°C στο υδατόλουτρο με ανάδευση ανά 2 λεπτά
- Προσθήκη 400μL ddH_2O
- Ανάδευση των φιαλιδίων σε μηχανικό αναδευτήρα Vortex για περίπου 30 δευτερόλεπτα
- Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά
- Μεταφορά 100μL από το υπερκείμενο σε νέο eppendorf για ανάλυση και 500μL από το υπερκείμενο σε άλλο eppendorf για αποθήκευση στους -80^oC
- Εξάτμιση των δειγμάτων για ανάλυση σε φυγόκεντρο με αντλία κενού για 2 ώρες σε πρόγραμμα εξάτμισης αλκοολούχων διαλυμάτων
- Προσθήκη αέριου N_2

2.4.2 Παραγωγοποίηση μεταβολιτών

Η παραγωγοποίηση αποτελεί μια διαδικασία μετατροπής ουσιών σε νέες με παρόμοια χημική σύσταση αλλά νέες ιδιότητες επιτρέποντας, κατά την εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων όπως του GC-MS, τον βέλτιστο διαχωρισμό και την καλύτερη ανίχνευση τους. Στην περίπτωση μάλιστα του GC-MS, οι πολικές ενώσεις μετατρέπονται σε πτητικές μέσω 2 χημικών διαδικασιών. Με την 1^η, την προσθήκη της μεθοξυαμινομάδας, σταθεροποιούνται οι καρβονυλομάδες και αποτρέπεται ο κετοενολοταυτομερισμός και ο σχηματισμός πολλαπλών ακέτυλο ή κετυλοδομών. Κατά τη 2^η διαδικασία, γίνεται αντικατάσταση των ενεργών πρωτονίων πολλών λειτουργικών ομάδων από τριμεθυλοσιλυλομάδα, δηλαδή σιλανοποίηση, οπότε μειώνεται η

πολικότητα και αυξάνεται παράλληλα η πτητικότητα. Πιο αναλυτικά το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- Προσθήκη 25μL διαλύματος μεθοξυαμίνης σε άνυδρη γουανίνη
- Επώαση στους 30^{o}C για 90 λεπτά στο υδατόλουτρο
- Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές ανά λεπτό για 30 δευτερόλεπτα
- Προσθήκη 75μL MSTFA
- Επώαση στους 37^{o}C για 30 λεπτά στο υδατόλουτρο
- Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές ανά λεπτό για 2 λεπτά
- Μεταφορά 80 με 90μL υπερκειμένου σε glass micro-inserts, τα οποία τοποθετούνται σε γυάλινα φιαλίδια αέριας χρωματογραφίας των 1,5mL

2.4.3 Λειτουργία και χαρακτηριστικά του GC-MS

Το GC-MS αποτελεί πλέον μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την απόκτηση μεταβολομικών δεδομένων λόγω της ευκολίας στη χρήση, της εξαιρετικής ισχύος διαχωρισμού και της επαναληψιμότητας στα αποτελέσματα του. Στο GC-MS, οι ουσίες εξατμίζονται και διαχωρίζονται σε υψηλή θερμοκρασία με βάση την αλληλεπίδρασή τους με την στατική φάση της στήλης και ακολούθως ιονίζονται καθώς εισέρχονται στο MS. Η ανίχνευση των ιόντων επιτυγχάνεται συχνά με τετραπολικού τύπου όργανα χαμηλής ανάλυσης, αν και οι ανιχνευτές MS υψηλής ταχύτητας σάρωσης(TOF) χρησιμοποιούνται πλέον όλο και ευρύτερα.

Για την ανάλυση των παραγωγοποιημένων δειγμάτων, ποσότητα 1μL από το καθένα εγχύθηκε στο σύστημα GC-MS με τη βοήθεια αυτόματου δειγματολήπτη σε θερμοκρασία 230^{o}C, με φέρον αέριο He και ρυθμό ροής 1.1mL/min. Η θερμοκρασία του θαλάμου μεταβαλλόταν σύμφωνα με προκαθορισμένο πρόγραμμα. Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία αρχικά ήταν 80^{o}C για 2 λεπτά και αυξήθηκε στους 325°C, με ρυθμό 5°C/min, όπου διατηρήθηκε για 10 λεπτά. Τέλος, ο συνολικός χρόνος διέλευσης ήταν 61 λεπτά. Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό AMDIS ενώ η ταυτοποίηση των ουσιών χρησιμοποιώντας τις βιβλιοθήκες FiehnLab και Golm με βάση το χρόνο έκλουσης από τη χρωματογραφική κολώνα και την ομοιότητα των φασμάτων μαζών.

2.5 Σύνθεση ρυθμιστικών διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων

2.5.1 Θρεπτικά διαλύματα ανάπτυξης φυτών

Στερεό υπόστρωμα ανάπτυξης με άγαρ για προβλάστηση

Σε 800mL dH_2O διαλύονται 12g άγαρ.

Διάλυμα B&D (full nitrogen)

Για την παρασκευή 1L διαλύματος B&D αναμιγνύονται 979.5μL dH_2O με 10mL $CaCL_2$ $2H_2O$ 0,1M, 0,5mL KH_2PO_4 1M, 0,25mL $MgSO_4$ $7H_20$ 1M, 2,5mL $K2SO_4$ 0,1M, 1mL κιτρικού σιδήρου 10mM, 1mL ιχνοστοιχείων, 5mL KNO_3 1M και 1mL NH_4NO_3 1M.

2.5.2 Διαλύματα εκχύλισης και παραγωγοποίησης μεταβολιτών

Εκχυλιστικό διάλυμα μεθανόλης-ριβιτόλης

Για την παρασκευή 10mL MEB αναμιγνύονται 9.875mL μεθανόλης με 0.125mL διαλύματος ριβιτόλης.

Διάλυμα ριβιτόλης

Σε 1mL ddH_2O διαλύεται 1mg ριβιτόλης.

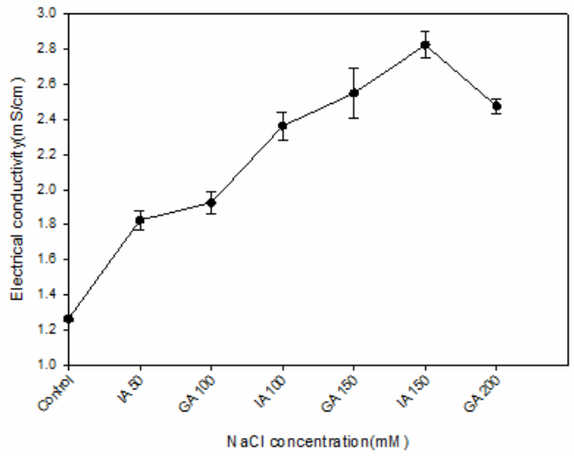
Διάλυμα μεθοξυαμίνης

Σε 1 mL άνυδρης πυριδίνης διαλύονται 20mg υδροχλωρικής μεθοξυαμίνης.

3. Αποτελέσματα

3.1 Προσδιορισμός ηλεκτρικής αγωγιμότητας εδαφικού υποστρώματος

Με στόχο του προσδιορισμού του πρότυπου συσσώρευσης NaCl στο εδαφικό διάλυμα κατά την εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl με την πάροδο του χρόνου προσδιορίστηκε η συσχέτιση της αγωγιμότητας του εδαφικού υποστρώματος συναρτήσει του πρότυπου εφαρμογής χλωριούχου νατρίου του θρεπτικού διαλύματος με το οποίο αναπτύσσονταν τα φυτά (**διάγραμμα 1**).

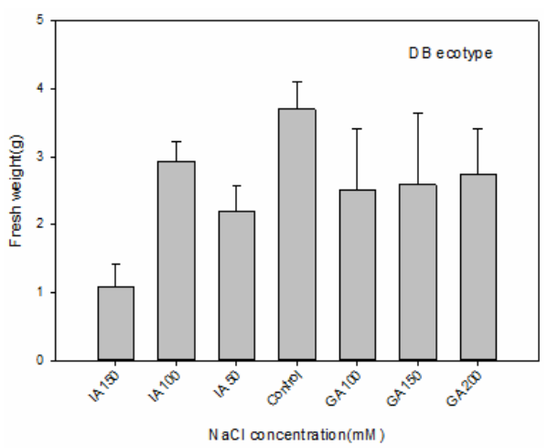


Διάγραμμα 1. Αγωγιμότητα εδαφικού υποστρώματος ανά εφαρμογή αλατότητας κατά το τέλος του πειράματος

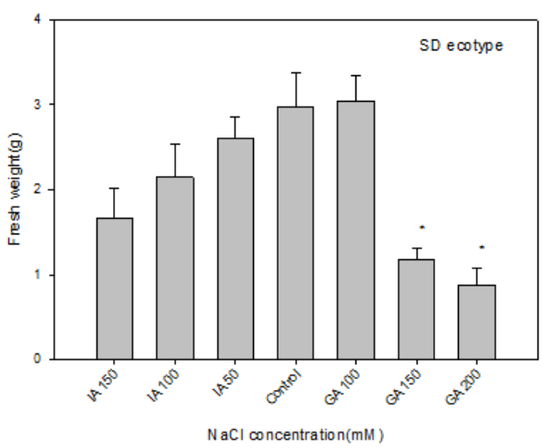
Η συσχέτιση της περιεκτικότητας σε χλωριούχο νάτριο του κάθε χειρισμού φαίνεται ότι συμπίπτει με την αγωγιμότητα των υποστρωμάτων στο τέλος του πειράματος.

3.2 Βιομετρία

Στη συνέχεια, με στόχο την κατανόηση της επίδρασης των διαφορετικών εφαρμογών χλωριούχου νατρίου σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του φυτού, προσδιορίστηκε το νωπό βάρος των φυτών ανά ποικιλία λίγο πριν τη συλλογή του φυτικού ιστού (**διαγράμματα 2,3**), με τον χειρισμό του μάρτυρα τοποθετημένο στο κέντρο ώστε να είναι πιο ευδιάκριτες οι διαφορές (με αστερίσκο παρατηρούνται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα).



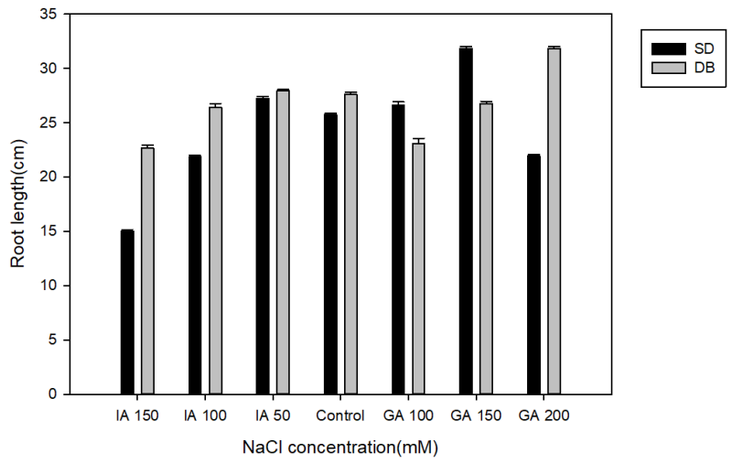
Διάγραμμα 2. Νωπό βάρος φυτών οικοτύπου DB ανά εφαρμογή αλατότητας



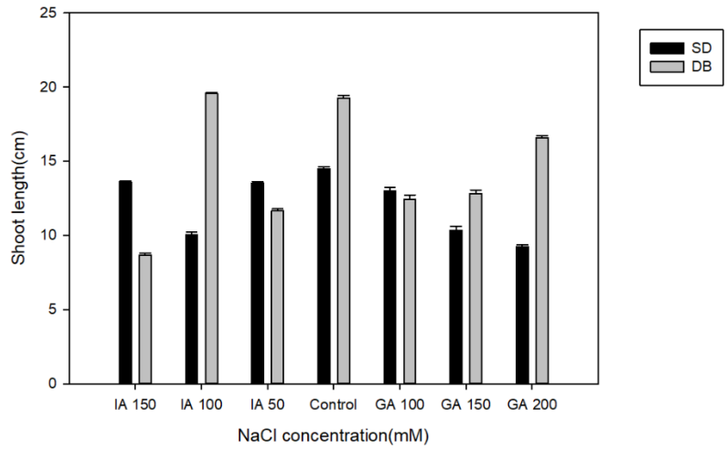
Διάγραμμα 3. Νωπό βάρος οικοτύπου SD ανά εφαρμογή αλατότητας

Είναι εμφανές ότι ο οικότυπος DB παρουσιάζει μια μη γραμμική πτώση του νωπού βάρους, εν αντιθέσει με τον SD ο οποίος παρουσιάζει γραμμικότητα αλλά και στατιστικά σημαντική μείωση στις 2 ακραίες σταδιακές εφαρμογές.

Εκτός του νωπού βάρους, προσδιορίστηκαν και άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως το μήκος της ρίζας και του βλαστού των δύο ποικιλιών για κάθε μεταχείριση αλατότητας (**διαγράμματα 4,5**), ώστε να διασαφηνιστεί περαιτέρω η επίδραση των εφαρμογών χλωριούχου νατρίου στην αύξηση του φυτού.



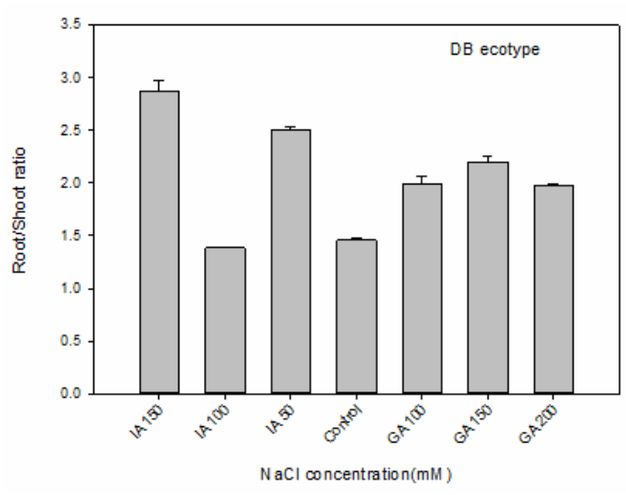
Διάγραμμα 4. Μήκος ρίζας οικοτύπων SD και DB ανά εφαρμογή αλατότητας



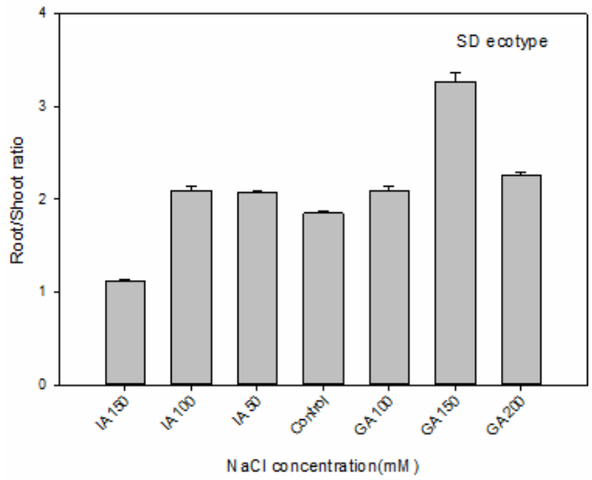
Διάγραμμα 5. Μήκος βλαστού οικοτύπων SD και DB ανά εφαρμογή αλατότητας

Παρατηρείται ότι, όσον αφορά τη μεταβολή του μεγέθους της ρίζας, ο οικότυπος DB παρουσιάζει στις ακραίες μεταχειρίσεις μικρότερες μεταβολές από τον SD, ενώ σχετικά με την αντίστοιχη μεταβολή του βλαστού ο οικότυπος SD παρουσιάζει πιο μικρή μεταβολή στις περισσότερες εφαρμογές από τον DB.

Επίσης, προσδιορίστηκε η τάση του λόγου μεγέθους της ρίζας προς το μέγεθος του βλαστού για κάθε ποικιλία ξεχωριστά (**διαγράμματα 6, 7)**, που αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη αξιολόγησης της επίδρασης της καταπόνησης στο φυτό.



Διάγραμμα 6. Λόγος μήκους ρίζας προς μήκος βλαστού φυτών οικοτύπου DB ανά εφαρμογή αλατότητας



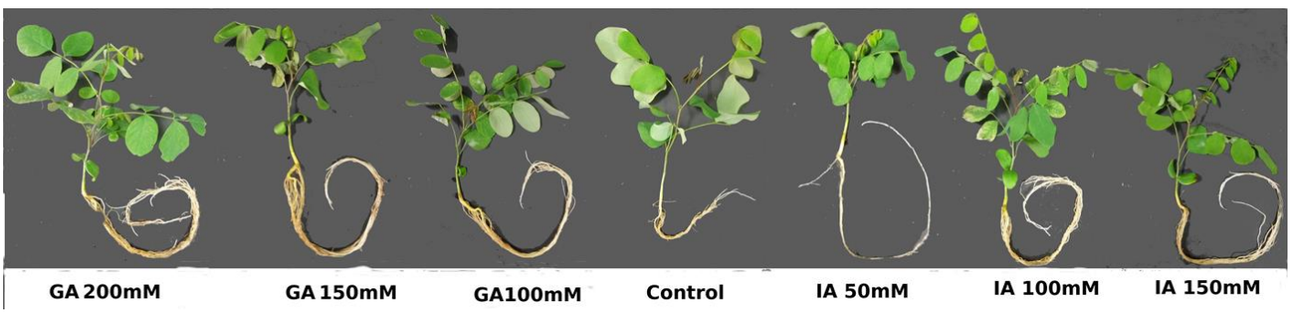
Διάγραμμα 7. Λόγος μήκους ρίζας προς μήκος βλαστού φυτών οικοτύπου SD ανά εφαρμογή αλατότητας

Υφίσταται αύξηση του παραπάνω λόγου και στους δύο οικοτύπους, όμως στον οικότυπο DB, στις περισσότερες μεταχειρίσεις, είναι πολύ υψηλότερη από ότι στις αντίστοιχες μεταχειρίσεις του οικοτύπου SD.

Τέλος, παρατίθενται ενδεικτικά φωτογραφίες των φυτών μετά το πέρας του πειράματος.

Οικότυπος SD

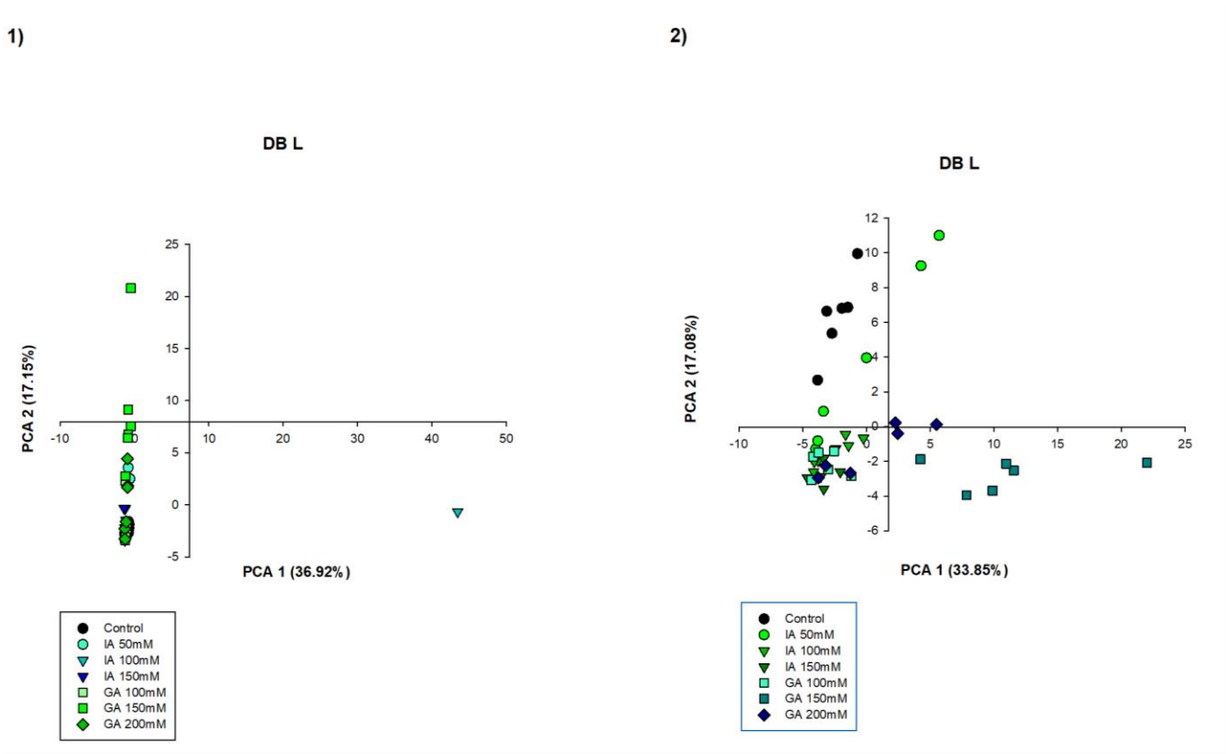
Οικότυπος DB



Παρατηρείται κατ' αρχάς ότι στον οικότυπο SD οι ακραίες συγκεντρώσεις αλατότητας έχουν, μακροσκοπικά, μεγαλύτερη επίδραση από ότι στον DB. Η ανάπτυξη των φύλλων είναι περιορισμένη στον οικότυπο SD ενώ και οι δυο οικότυποι παρουσιάζουν μια αναμενόμενη αύξηση του μήκους της ρίζας τους. Επιπλέον, είναι εμφανής μια έντονη χλώρωση στην άμεση ακραία συγκέντρωση στον οικότυπο SD.

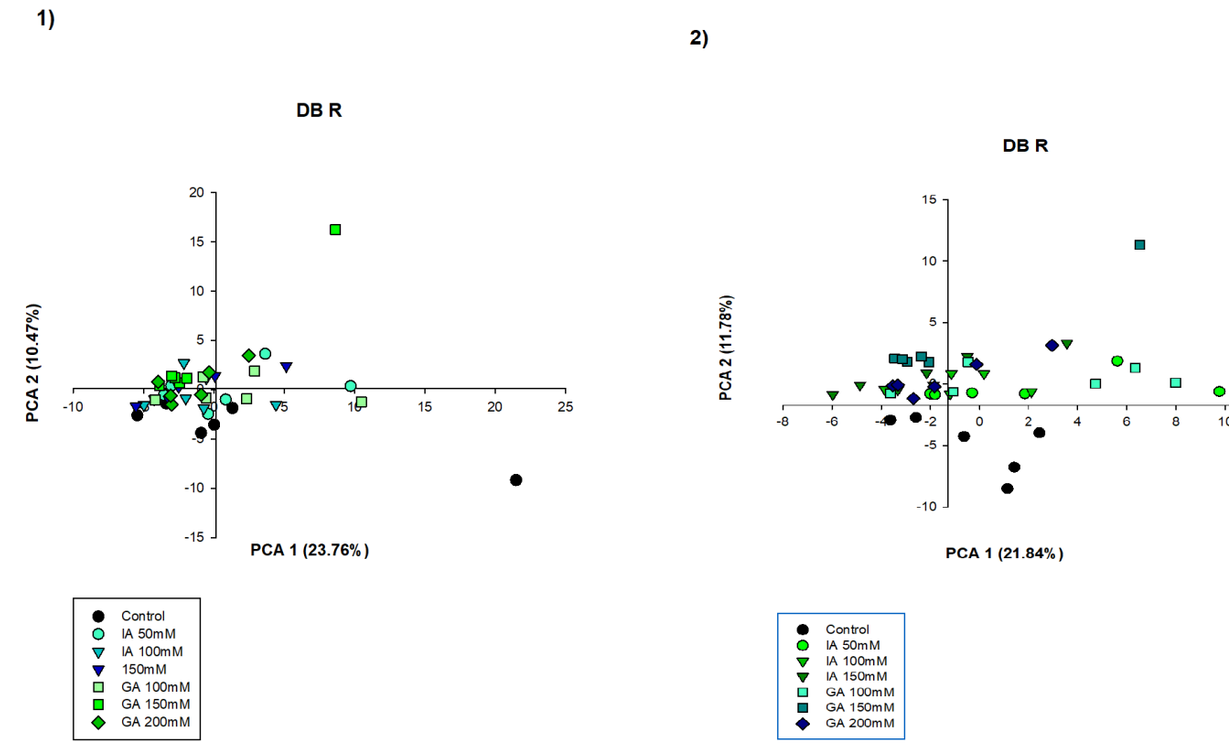
3.3 Μεταβολομική ανάλυση

Η ανάλυση του μεταβολομικού προφίλ των οικοτύπων SD και DB πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για τους ιστούς ρίζας και φύλλων. Η ανάλυση GC-MS παρουσίασε πληθώρα μεταβολιτών από τους οποίους επιλέχθηκε ένα μέρος τους. Οι επιλεγμένοι μεταβολίτες ανήκαν στις κατηγορίες των αμινοξέων, των σακχάρων, των πολυολών, των αζωτούχων και φωσφορούχων ενώσεων καθώς και άλλες. Με τη πολυμεταβλητή ανάλυση με τη μέθοδο των κύριων συνιστωσών (PCA) αρχικά, έγινε ομαδοποίηση των δειγμάτων ανά τύπο ιστού και ανά οικότυπο ώστε να προσδιοριστεί ο βαθμός διαχωρισμού των εφαρμογών μεταξύ τους. Έπειτα, απεικονίζονται οι μεταβολές των διαφόρων ουσιών και γίνεται διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων μεταβολής τους, με χρωματισμό στις εφαρμογές που παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (πράσινο για συσσώρευση, κόκκινο για ελάττωση).



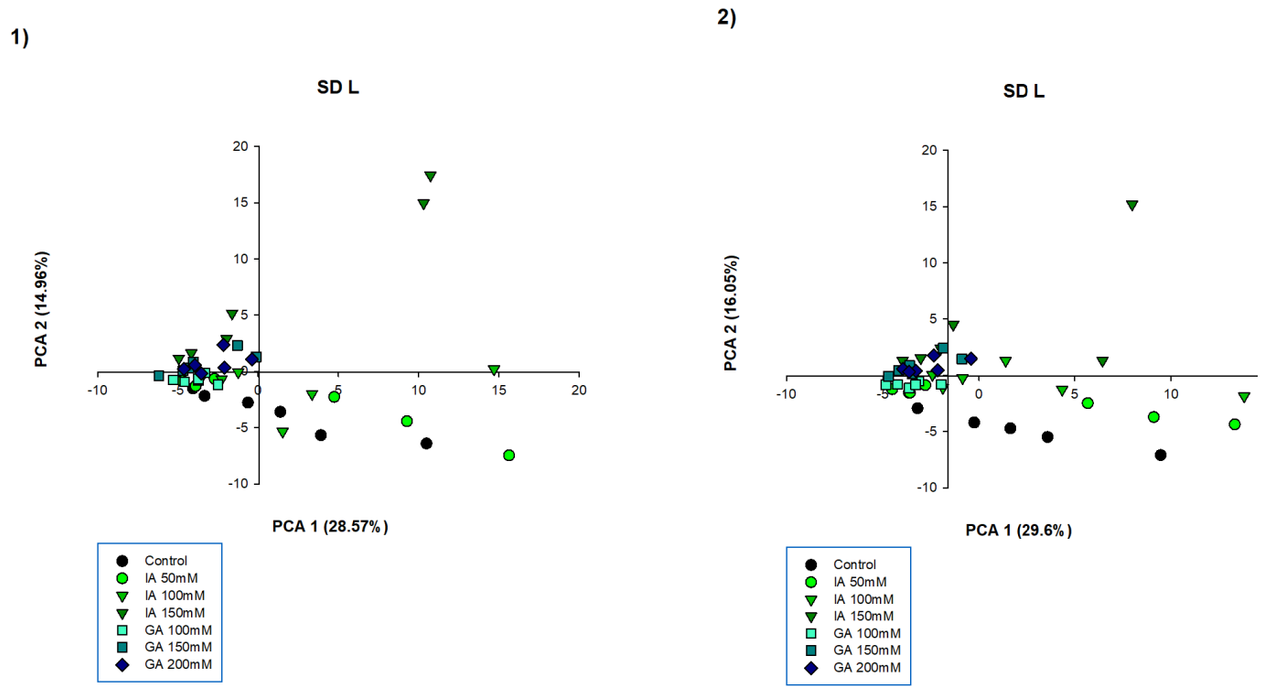
Εικόνα 3.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων φύλλων φυτών του οικοτύπου DB του είδους *Robinia pseudoacacia* πριν (1) και μετά (2) τον έλεγχο των τιμών των επαναλήψεων

Στην περίπτωση των φύλλων του οικοτύπου DB, η συνολική παραλλακτικότητα που προκύπτει από τις πρώτες δυο συνιστώσες, πριν τον έλεγχο των τιμών, κυμαίνεται στο 54,07%, ενώ η αντίστοιχη, μετά τον έλεγχο, στο 50,91%.



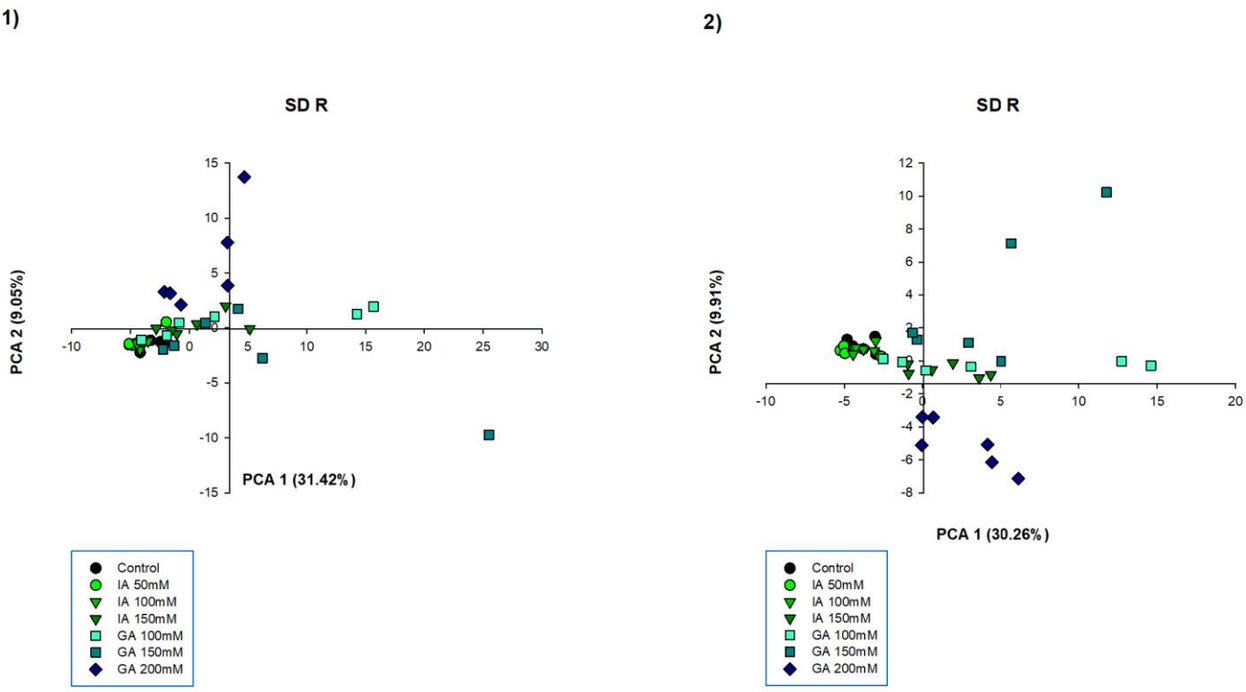
Εικόνα 3.2. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων ρίζας φυτών του οικοτύπου DB του είδους *Robinia pseudoacacia* πριν (1) και μετά (2) τον έλεγχο των τιμών των επαναλήψεων

Παρατηρείται ότι στην περίπτωση της ρίζας του οικοτύπου DB, η συνολική παραλλακτικότητα που προκύπτει από τις πρώτες δυο συνιστώσες, πριν τον έλεγχο των τιμών, κυμαίνεται στο 34,23%, ενώ η αντίστοιχη, μετά τον έλεγχο, στο 33,62%.



Εικόνα 3.3. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων φύλλων φυτών του οικοτύπου SD του είδους *Robinia pseudoacacia* πριν (1) και μετά (2) τον έλεγχο των τιμών των επαναλήψεων

Από τα παραπάνω, παρατηρείται ότι στην περίπτωση των φύλλων του οικοτύπου SD, η συνολική παραλλακτικότητα που προκύπτει από τις πρώτες δυο συνιστώσες, πριν τον έλεγχο των τιμών, κυμαίνεται στο 43,53%, ενώ η αντίστοιχη, μετά τον έλεγχο, στο 45.65%.



Εικόνα 3.4. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων ρίζας φυτών του οικοτύπου SD του είδους *Robinia pseudoacacia* πριν (1) και μετά (2) τον έλεγχο των τιμών των επαναλήψεων

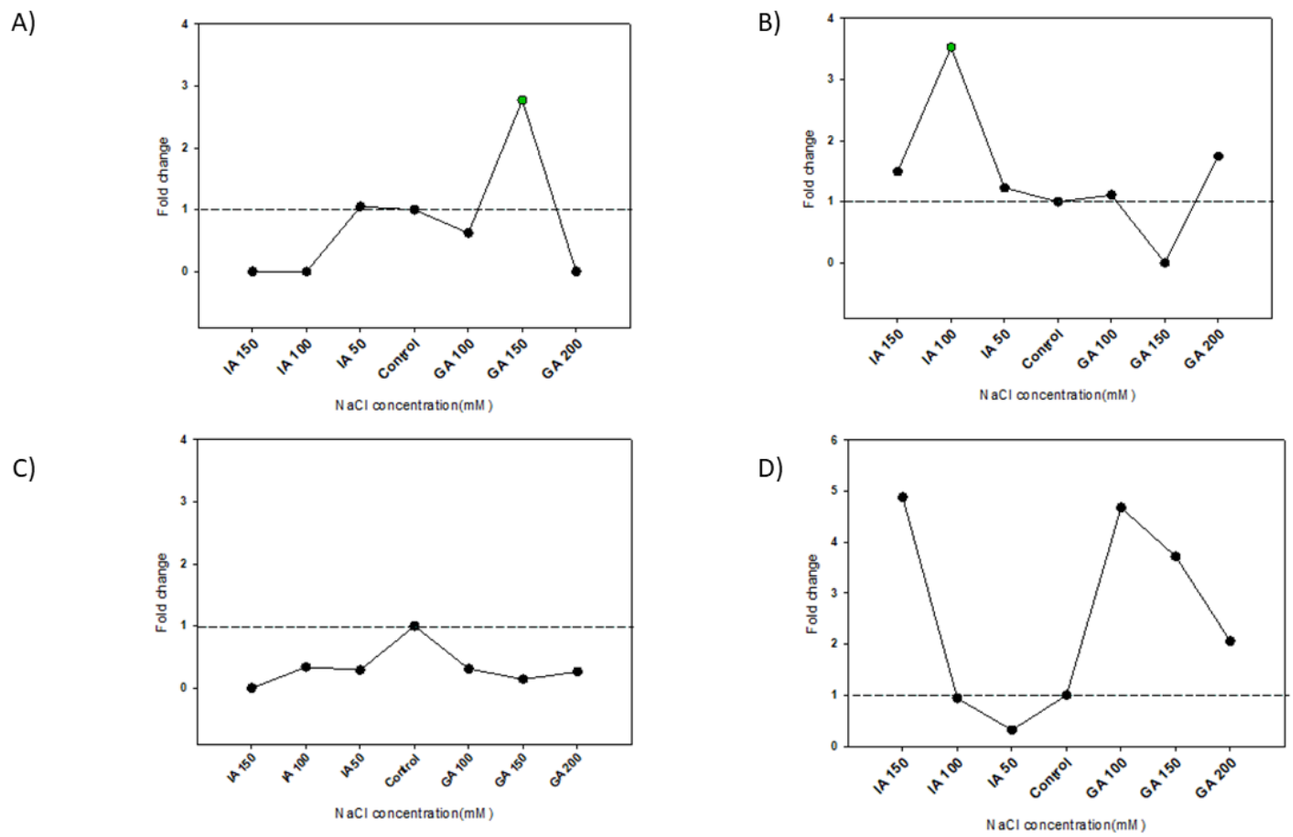
Παρατηρείται ότι στην περίπτωση της ρίζας του οικοτύπου SD, η συνολική παραλλακτικότητα που προκύπτει από τις πρώτες δυο συνιστώσες, πριν τον έλεγχο των τιμών, κυμαίνεται στο 40,47%, ενώ η αντίστοιχη, μετά τον έλεγχο, στο 40,17%.

Οργανικά οξέα

Όσον αφορά τα φύλλα των δύο οικοτύπων παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική μείωση του περιεχομένου τους σε γνωστά οργανικά οξέα όπως το κιτρικό και το μηλικό οξύ, τα οποία αποτελούν και ενδιάμεσους μεταβολίτες του κύκλου του κιτρικού οξέος, καθώς και σε άλλα όπως το φουμαρικό, που αποτελεί αποθηκευτικό μόριο άνθρακα. Από την άλλη, το πυροσταφυλικό οξύ παρουσιάζει συσσώρευση, ενώ ορισμένα οργανικά οξέα παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των δύο οικοτύπων. Πιο συγκεκριμένα, το λακτοβιονικό οξύ αν και συσσωρεύεται στον οικότυπο SD, στον οικότυπο DB η περιεκτικότητα του ελαττώνεται. Το 4-γουανιδινοβουτυρικό οξύ, που αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση του GABA, το οποίο εμπλέκεται στην αντιμετώπιση της καταπόνησης, παρουσιάζει ξεκάθαρη συσσώρευση στον οικότυπο SD αλλά ο οικότυπος DB συσσωρεύει το μεταβολίτη μόνο στις σταδιακές εφαρμογές (βλ. παράρτημα).

Στις ρίζες αντιθέτως, παρατηρείται διαφορετικό πρότυπο συσσώρευσης και ελάττωσης. Από τα οργανικά οξέα του κύκλου του κιτρικού, το πυροσταφυλικό και το μηλικό συσσωρεύονται στον SD αλλά καταναλώνονται στον DB, με το μηλικό από την άλλη να συσσωρεύεται, αλλά σε διαφορετικά επίπεδα. Από τα υπόλοιπα, το νικοτινικό ελαττώνεται στον DB, όμως στον SD στις άμεσες εφαρμογές ελαττώνεται και στις σταδιακές συσσωρεύεται. Το 4-γουανιδινοβουτυρικό οξύ δε μεταβάλλεται σημαντικά στον οικότυπο DB, αλλά συσσωρεύεται στον SD. Αντίθετα, το γλουκονικό οξύ δε μεταβάλλεται στον DB, όμως ελαττώνεται στον SD. Γενικά, φαίνεται ότι ο οικότυπος SD συσσωρεύει οργανικά οξέα, ενώ ο DB τα καταναλώνει ή διατηρεί αμετάβλητα τα επίπεδα τους (βλ. παράρτημα).

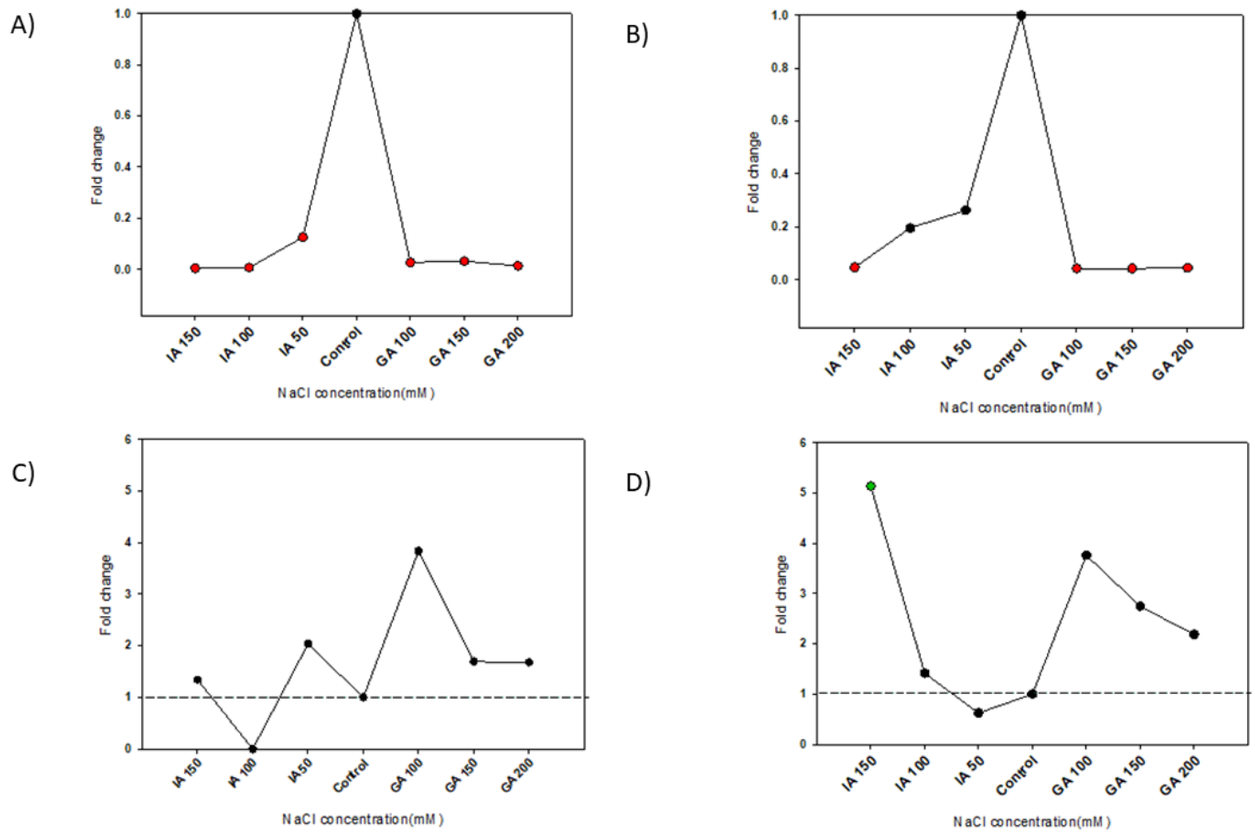
Πυροσταφυλικό οξύ



Διάγραμμα 8: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης του πυροσταφυλικού οξέος σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Τα επίπεδα του πυροσταφυλικού στις ρίζες των δύο οικοτύπων παρουσιάζουν ένα διαφορετικό πρότυπο, χωρίς όμως οι μεταβολές αυτές να έχουν κάποια στατιστική σημασία, με τον SD να συσσωρεύει πυροσταφυλικό οξύ ενώ ο DB να το καταναλώνει. Στα φύλλα παρατηρείται ότι σε μια εφαρμογή σε κάθε οικότυπο το πυροσταφυλικό οξύ συσσωρεύεται με στατιστική σημασία και ότι ενώ στον SD οι περισσότερες εφαρμογές το συσσωρεύουν, στον DB ισχύει το αντίθετο.

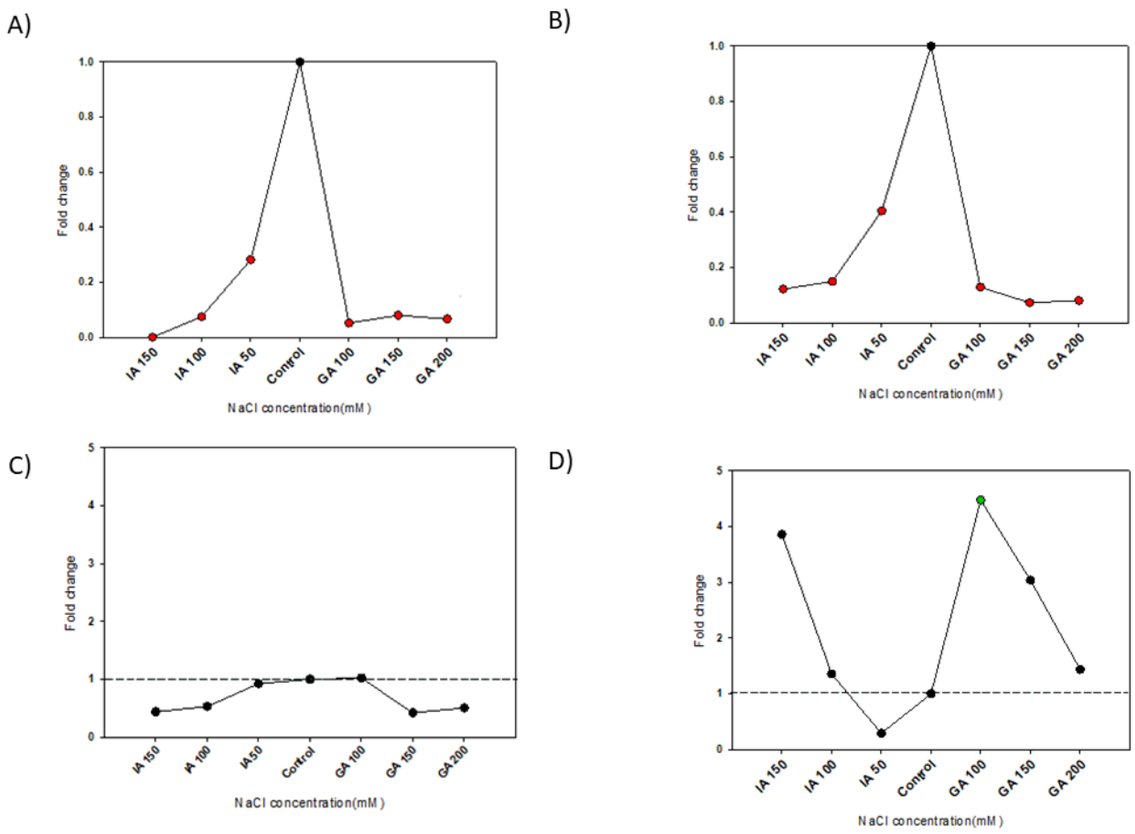
Κιτρικό οξύ



Διάγραμμα 9: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης του κιτρικού οξέος σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Το κιτρικό οξύ μειώνεται σημαντικά στα φύλλα των δύο οικοτύπων, ενώ στις ρίζες παρατηρείται γενικά μια μη στατιστικά σημαντική συσσώρευση στις περισσότερες εφαρμογές. Εξαίρεση αποτελεί η άμεση εφαρμογή των 150mM άλατος στον οικότυπο SD, όπου ο 5-πλασιασμος των επιπέδων του οξέος καταγράφεται ως στατιστικά σημαντικός.

D-μηλικό οξύ



Διάγραμμα 10: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης του μηλικού οξέος σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

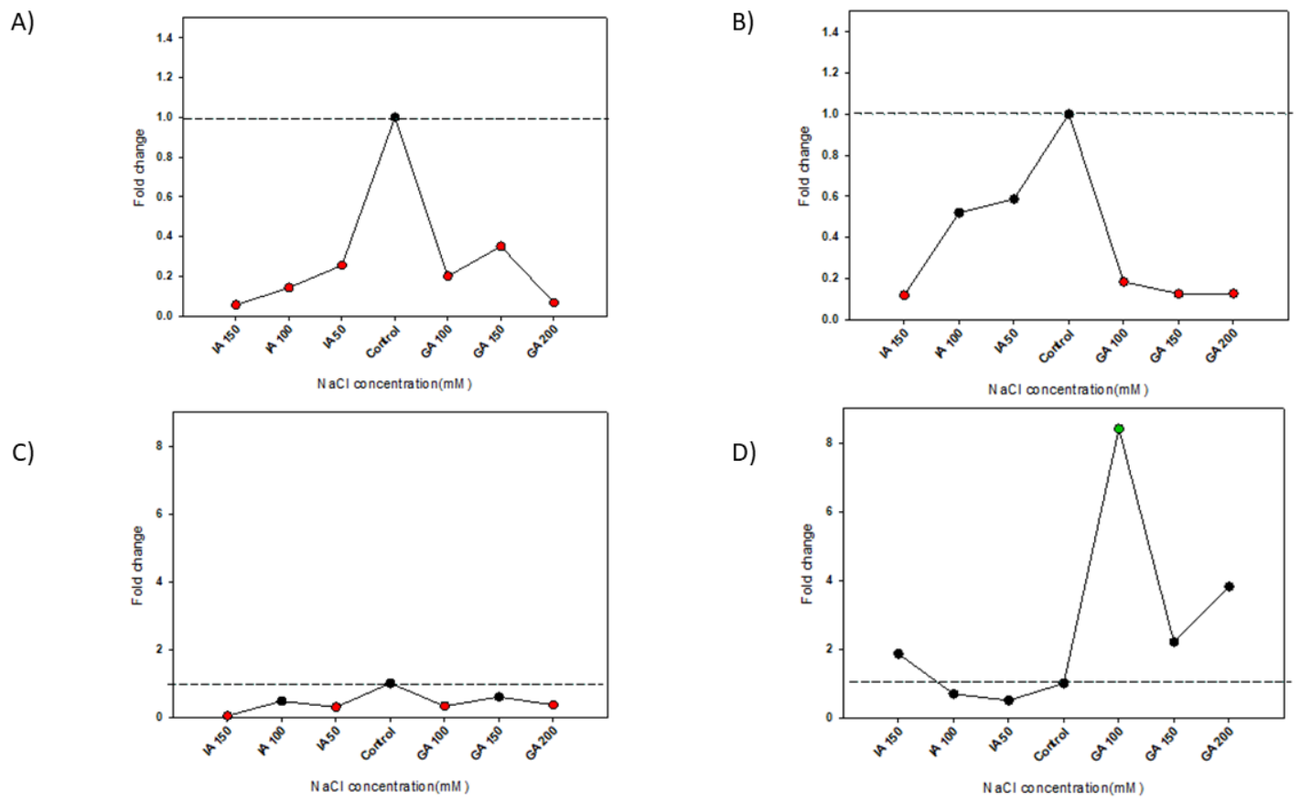
Το D-μηλικό οξύ παρουσιάζει στα φύλλα των δύο οικοτύπων και στις ρίζες του SD παρόμοιο πρότυπο με το κιτρικό οξύ, αλλά στις ρίζες του DB ελαττώνεται στις ακραίες εφαρμογές αλατότητας.

Σάκχαρα

Από τα σάκχαρα, οι δύο οικότυποι συσσωρεύουν ραφινόζη και σακχαρόζη στα φύλλα τους, πιθανώς για διατήρηση του ωσμωτικού τους δυναμικού, και καταναλώνουν μαννόζη και φρουκτόζη, με στόχο ίσως τη διατήρηση της ενεργειακής τους ισορροπίας κατά την καταπόνηση. Ακόμα παρατηρείται ότι ενώ ο SD καταναλώνει τη μεθυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη, ο DB την συσσωρεύει, όπως επίσης και την ταγατόζη, ένα σάκχαρο που στον οικότυπο SD δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μεταβολή στα φύλλα (βλ. παράρτημα).

Στις ρίζες, ο οικότυπος DB καταναλώνει μαννόζη και φρουκτόζη όπως στα φύλλα, όμως ο SD παρουσιάζει μια συσσώρευση αυτών των μεταβολιτών. Συσσώρευση ραφινόζης και σακχαρόζης παρατηρείται και στους δύο οικοτύπους, σε διαφορετικό βαθμό, ενώ η λυξόζη συσσωρεύεται μόνο στον SD (βλ. παράρτημα).

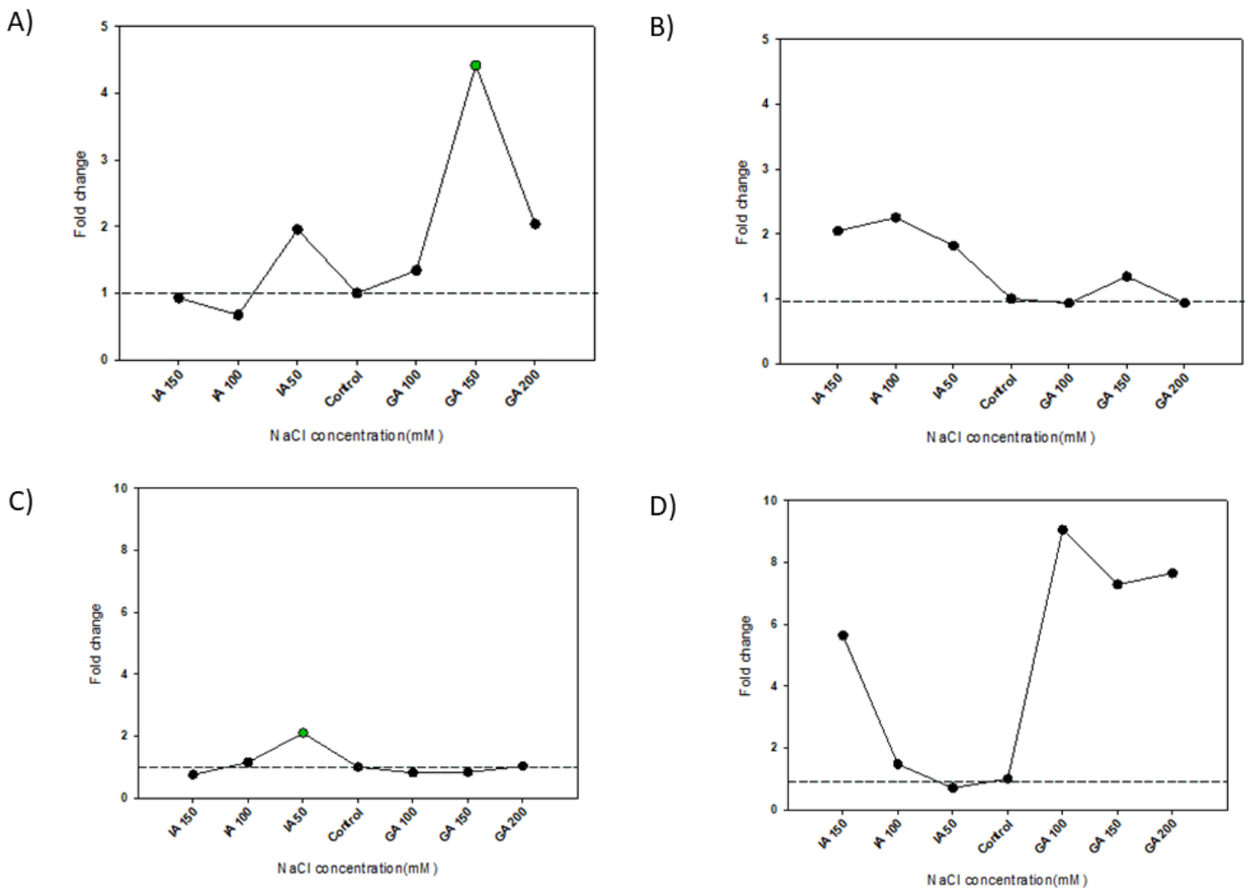
Φρουκτόζη



Διάγραμμα 11: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της φρουκτόζης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Παρατηρείται ότι μεταξύ των οικοτύπων, τα επίπεδα της φρουκτόζης στα φύλλα είναι στατιστικά μειωμένα σε κάθε εφαρμογή στο DB, υποδεικνύοντας μια έντονη κατανάλωση του μεταβολίτη με πιθανό στόχο την παραγωγή ενέργειας, εντονότερης σε σχέση με τον SD ειδικά στις άμεσες εφαρμογές των 50 και 100mM. Στις ρίζες των οικοτύπων, ο DB εξακολουθεί να καταναλώνει τον μεταβολίτη ενώ ο SD παρουσιάζει συσσώρευση του στις ακραίες τιμές, αξιοποιώντας τον πιθανώς για ρύθμιση του ωσμωτικού δυναμικού που έχει διαταραχθεί σε σημαντικό βαθμό.

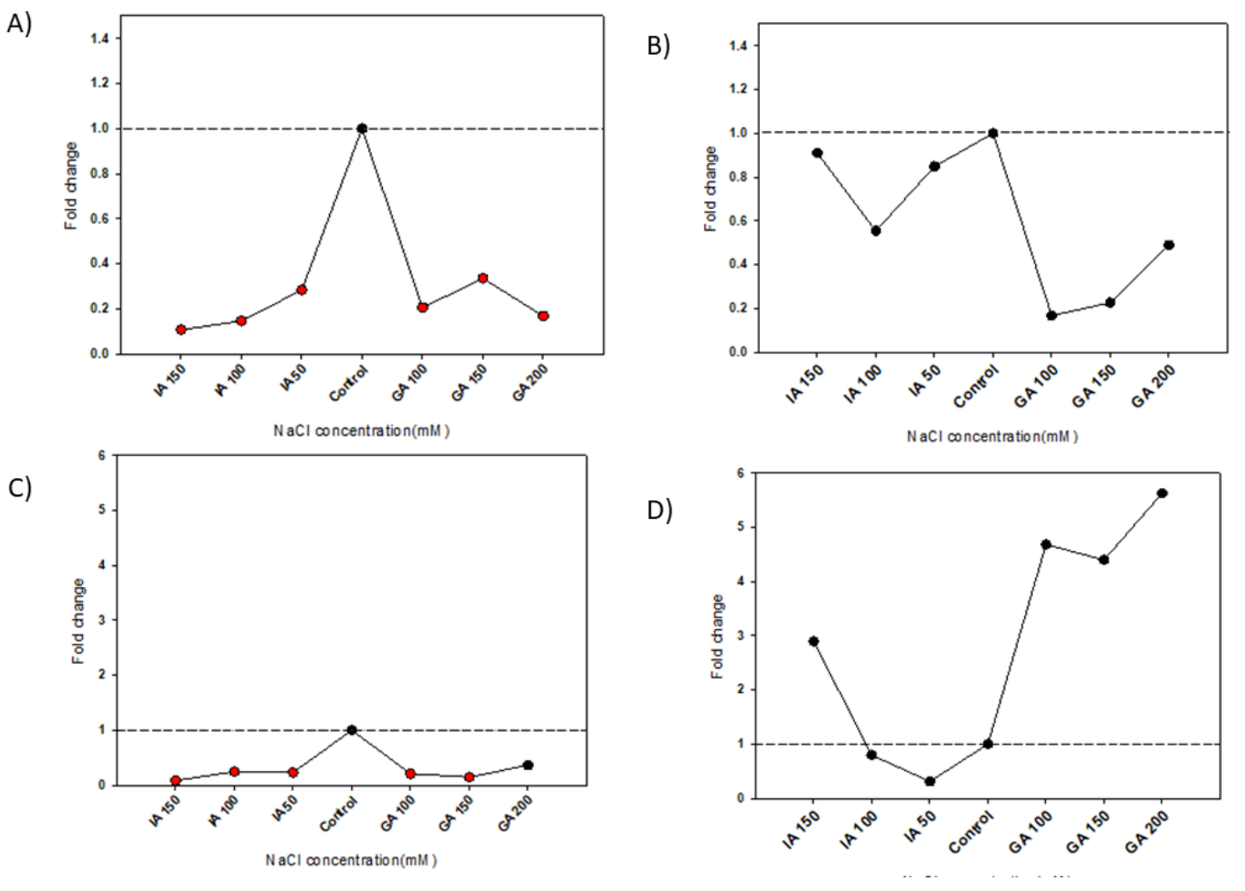
Σακχαρόζη



Διάγραμμα 12: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της σακχαρόζης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Η σακχαρόζη συσσωρεύεται ως απόκριση στο ωσμωτικό στρες, με τον οικότυπο DB να 5-πλασιαζει τα επίπεδα της στα φύλλα και τον SD να τα 9-πλασιαζει στις ρίζες.

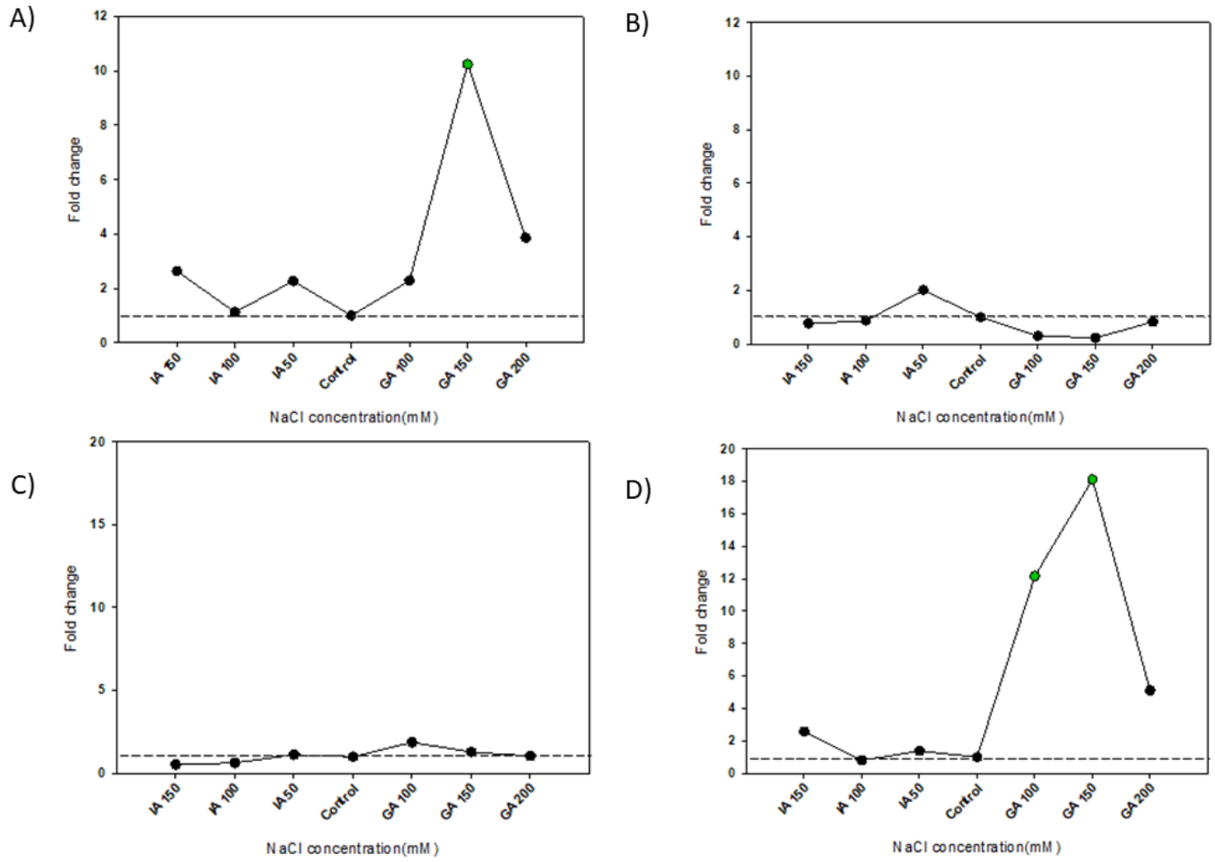
D-μαννόζη



Διάγραμμα 13: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της D-μαννόζης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Μεταξύ των οικοτύπων, τα επίπεδα της της D-μαννόζης στα φύλλα είναι στατιστικά μειωμένα σε κάθε εφαρμογή στο DB, υποδεικνύοντας μια έντονη κατανάλωση του μεταβολίτη με πιθανό στόχο την παραγωγή ενέργειας, εντονότερης σε σχέση με τον SD. Στις ρίζες των οικοτύπων, ο DB εξακολουθεί να καταναλώνει τον μεταβολίτη ενώ ο SD παρουσιάζει συσσώρευση του στις ακραίες τιμές, έως και 5-πλασιασμο των επιπέδων, αξιοποιώντας τον πιθανώς για ρύθμιση του ωσμωτικού δυναμικού που έχει διαταραχθεί σε σημαντικό βαθμό.

Ραφινόζη



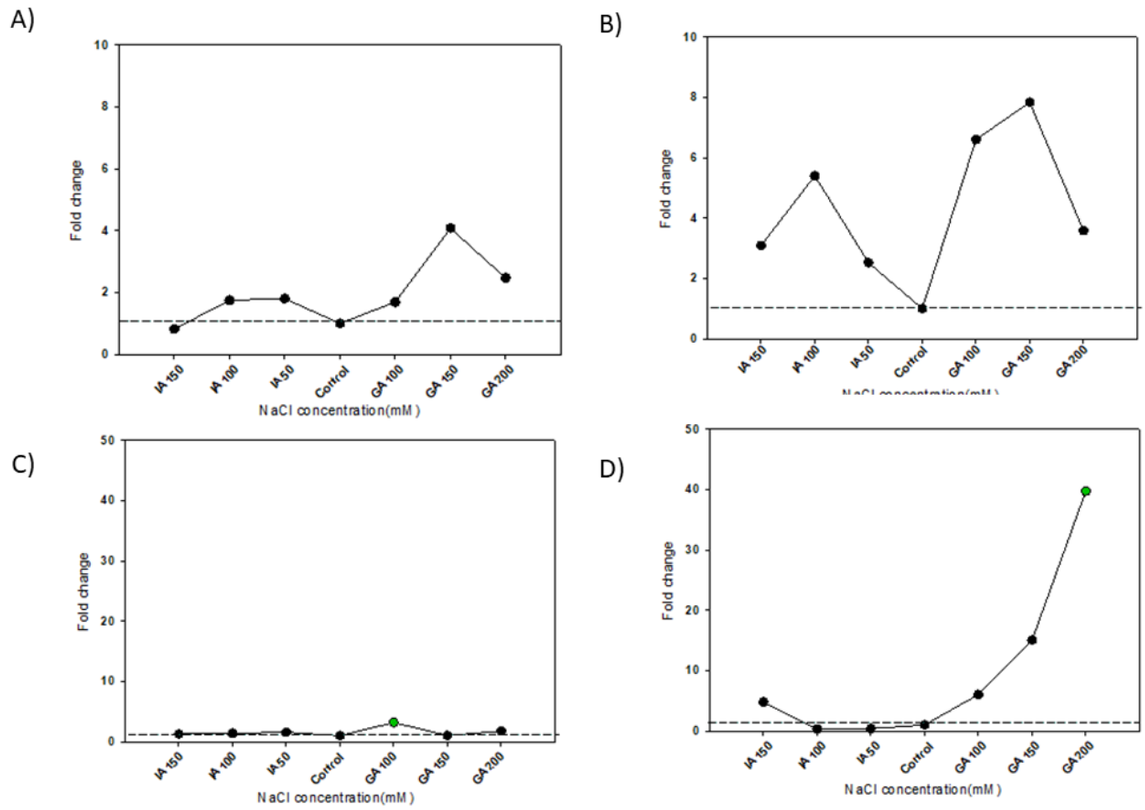
Διάγραμμα 14: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της ραφινόζης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Η ραφινόζη παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσσώρευση στα φύλλα του οικοτύπου DB και στις ρίζες του οικοτύπου SD, με τα επίπεδα της μάλιστα στην τελευταία περίπτωση να 18-πλασιαζονται.

Αμινοξέα

Αναφορικά με τα αμινοξέα, παρατηρείται συσσώρευση τους με ελάχιστες εξαιρέσεις. Τα επίπεδα συσσώρευσης διαφέρουν μεταξύ των αμινοξέων, των ιστών και των οικοτύπων. Η προλίνη και η τρυπτοφάνη 40-πλασιαζουν και 25-πλασιαζουν αντίστοιχα τα επίπεδα τους στις ρίζες του SD, η βαλίνη και η ισολευκίνη 20-πλασιαζουν και 35-πλασιαζουν αντίστοιχα στα φύλλα του DB ενώ η θρεονίνη τα 10-πλασιαζει στις ρίζες του. Πτώση παρατηρείται σε κάθε συνδυασμό οικοτύπου και ιστού στην περίπτωση του ασπαραγινικού και της ασπαραγίνης, με υψηλή στατιστική σημασία, με εξαίρεση την περίπτωση των ριζών του DB όπου η πτώση δεν είναι τόσο έντονη. Μερικές ακόμα εξαιρέσεις είναι η πτώση της περιεκτικότητας σε γλυκίνη στις ρίζες του DB, μια αντίστοιχη πτώση του γλουταμινικού στα φύλλα του SD και η πτώση της μεθειονίνης στα φύλλα του SD και τις ρίζες του DB.

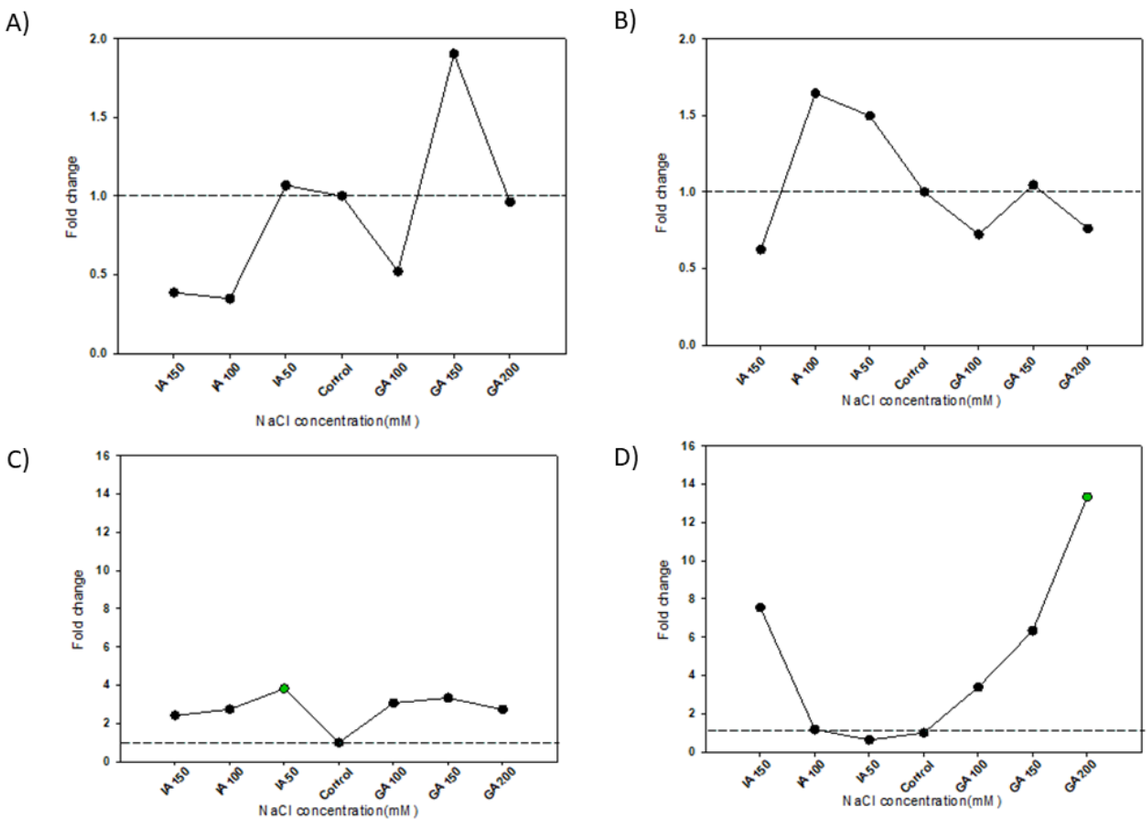
Προλίνη



Διάγραμμα 15: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της προλίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

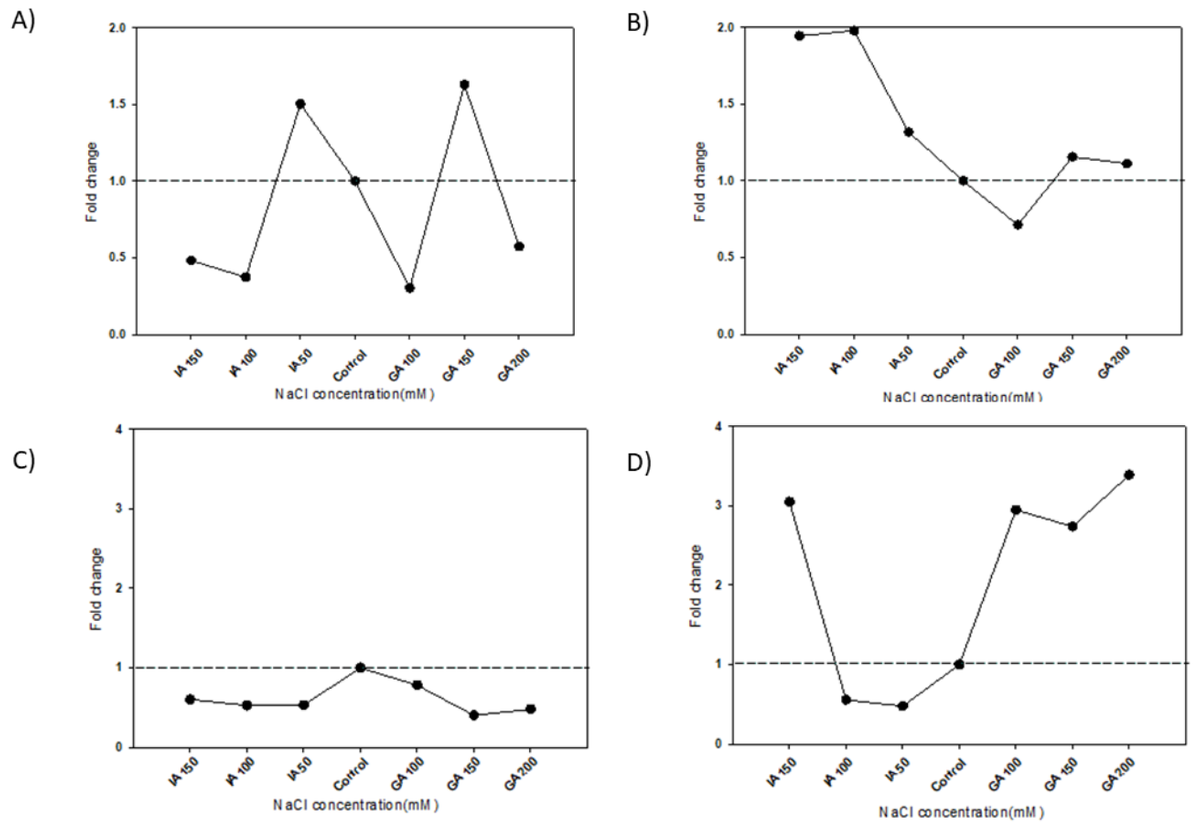
Η προλίνη συσσωρεύεται και στους 2 οικοτύπους ως απόκριση στο ωσμωτικό στρες. Μεταξύ των φαινοτύπων, υψηλότερη συσσώρευση της προλίνης προσδιορίστηκε στους ιστούς του οικοτύπου SD, όπου στις ρίζες τα επίπεδα της στην σταδιακή εφαρμογή των 200mM 40-πλασιαζονται, ενώ στα φύλλα στην αμέσως προηγούμενη εφαρμογή 8-πλασιαζονται. Στον οικότυπο DB, η συσσώρευση του αμινοξέως κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα μεταξύ των ιστών.

Μεταβολισμός σερίνης, θρεονίνης και γλυκίνης



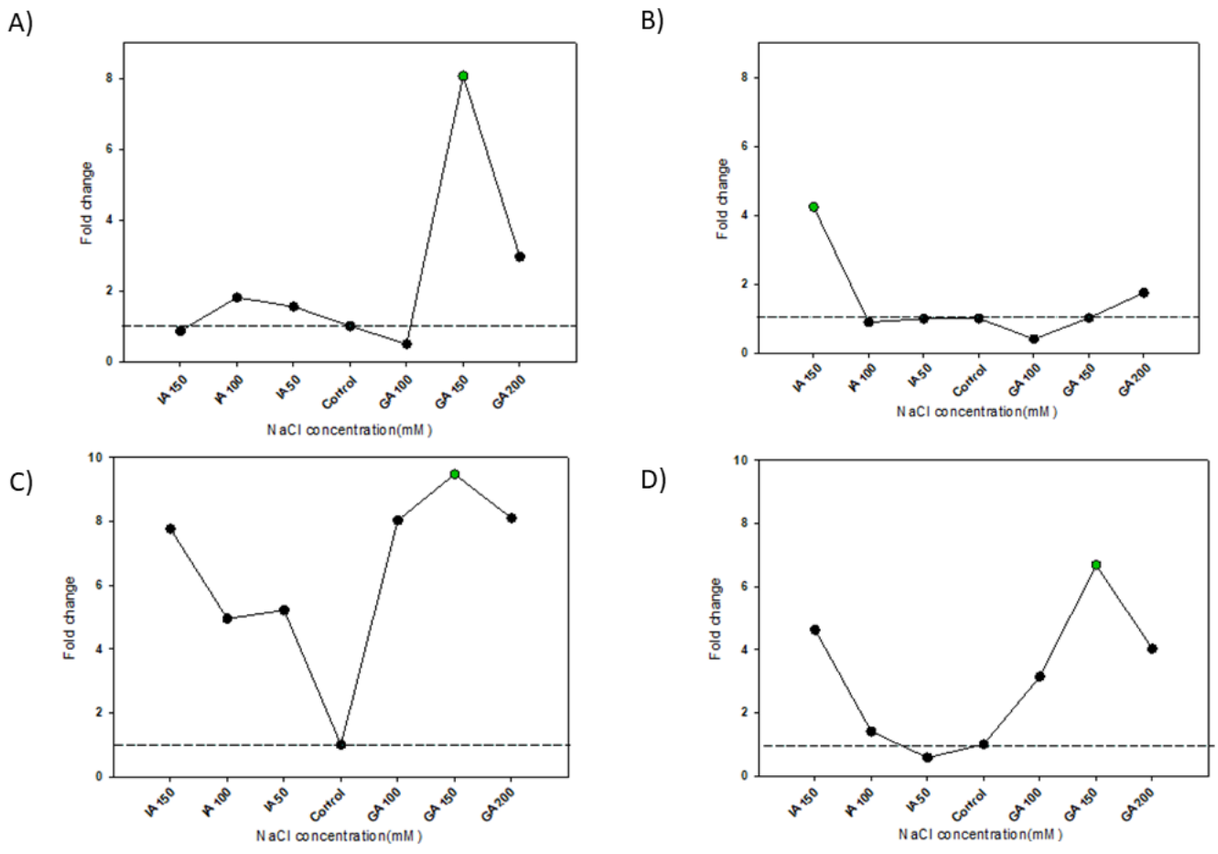
Διάγραμμα 16: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της σερίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Η σερίνη παρουσιάζει συσσώρευση στα φύλλα και τις ρίζες των 2 οικοτύπων, με στατιστικά σημαντική αύξηση να παρατηρείται μόνο στις ρίζες του οικοτύπου SD όπου τα επίπεδα της 14-πλασιαζονται.



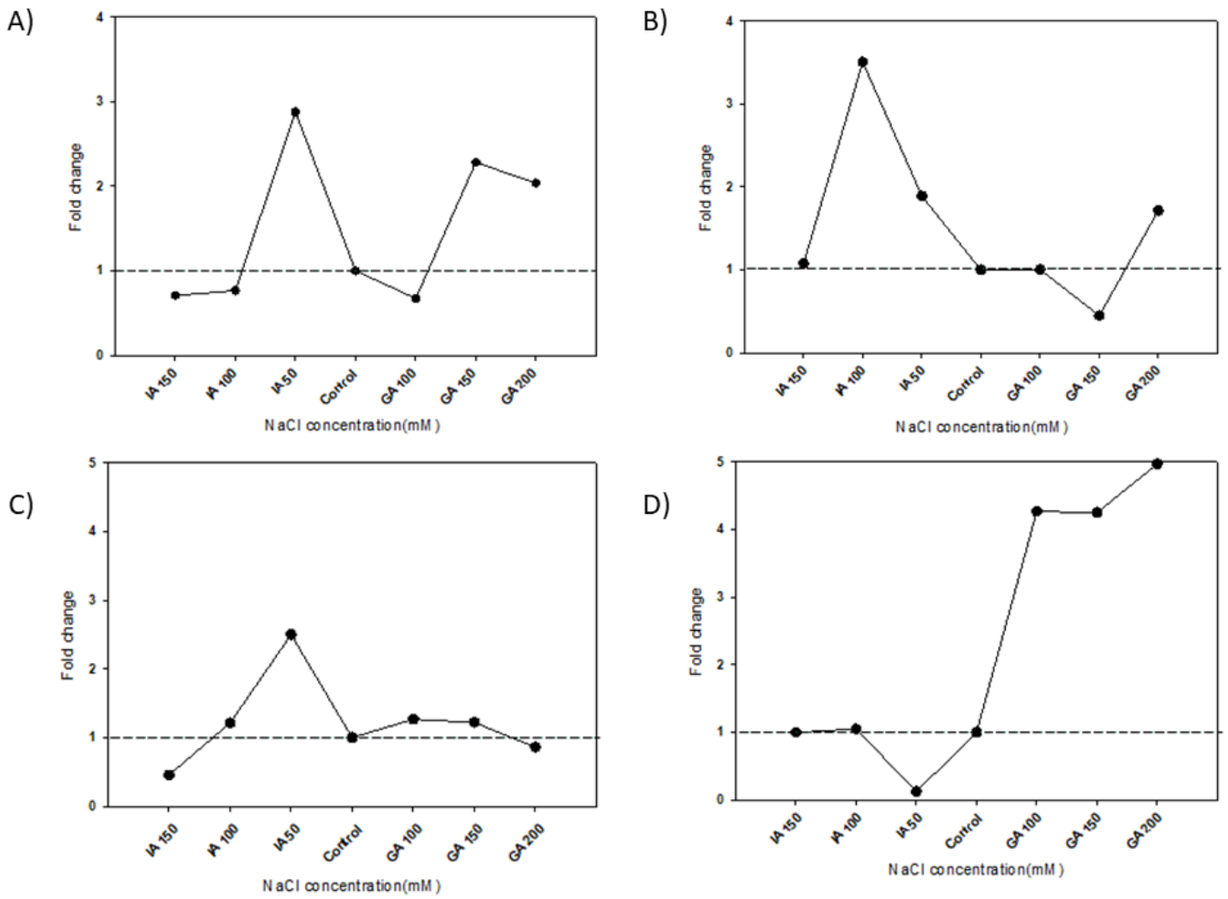
Διάγραμμα 17. Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της γλυκίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Τα επίπεδα της γλυκίνης 2-πλασιαζονται και 3-πλασιαζονται στις φύλλα και τις ρίζες του οικοτύπου SD αντίστοιχα.



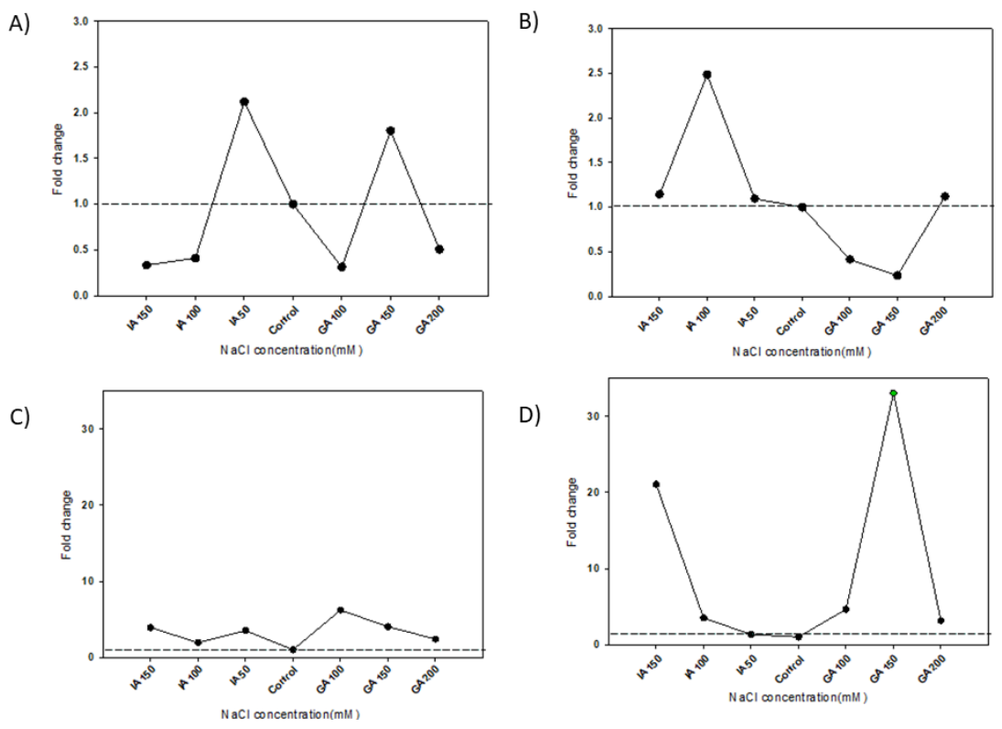
Διάγραμμα 18: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της θρεονίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Η θρεονίνη συσσωρεύεται στις ακραίες εφαρμογές αλατότητας και στους 2 τύπους ιστού των οικοτύπων και τα επίπεδα της προσδιορίζονται υψηλότερα στον οικότυπο DB συγκριτικά με τον SD.



Διάγραμμα 19: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της ομοσερίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

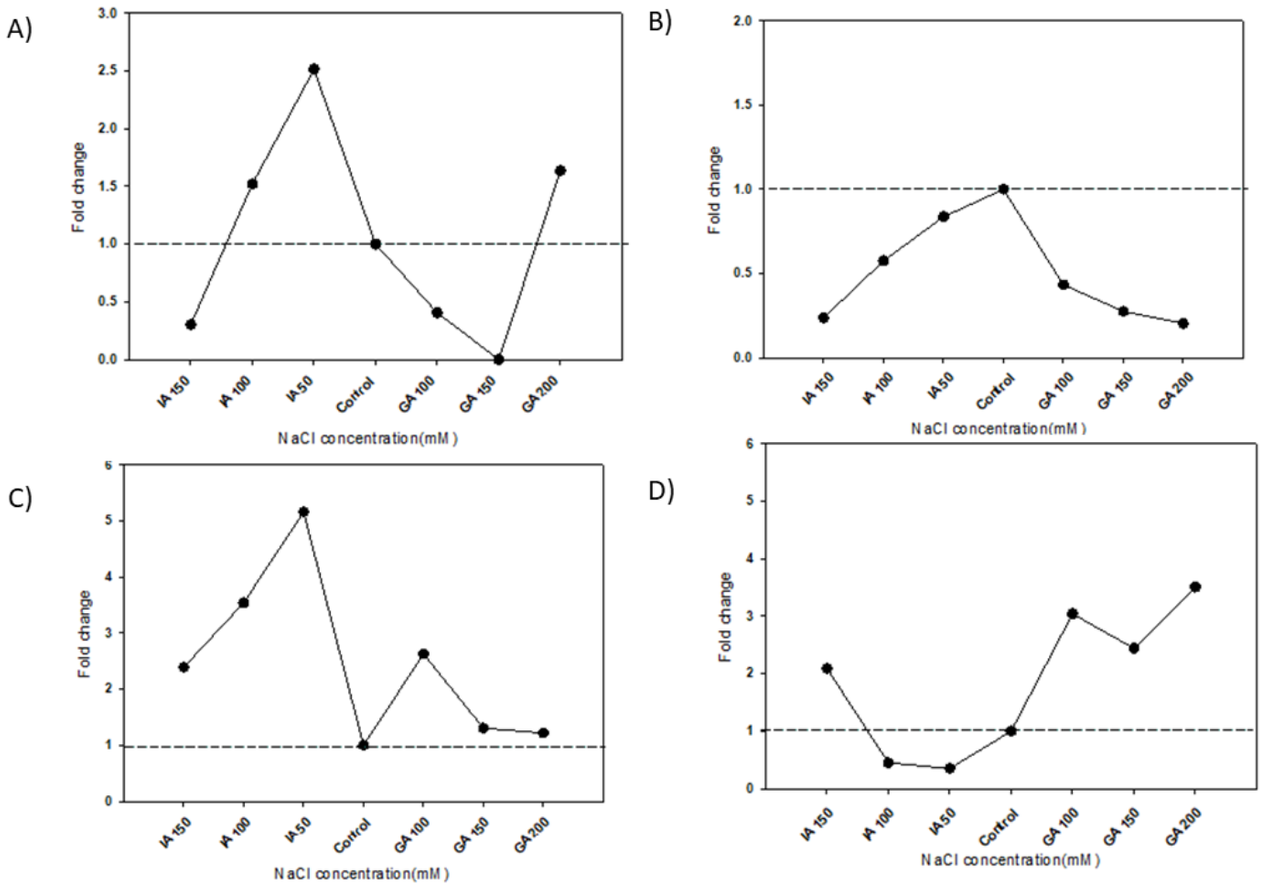
Η ομοσερίνη συσσωρεύεται στα φύλλα και τις ρίζες των 2 οικοτύπων, με την υψηλότερη μεταβολή στα επίπεδα της να παρουσιάζεται στις ρίζες του οικοτύπου SD.



Διάγραμμα 20: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της τρυπτοφάνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

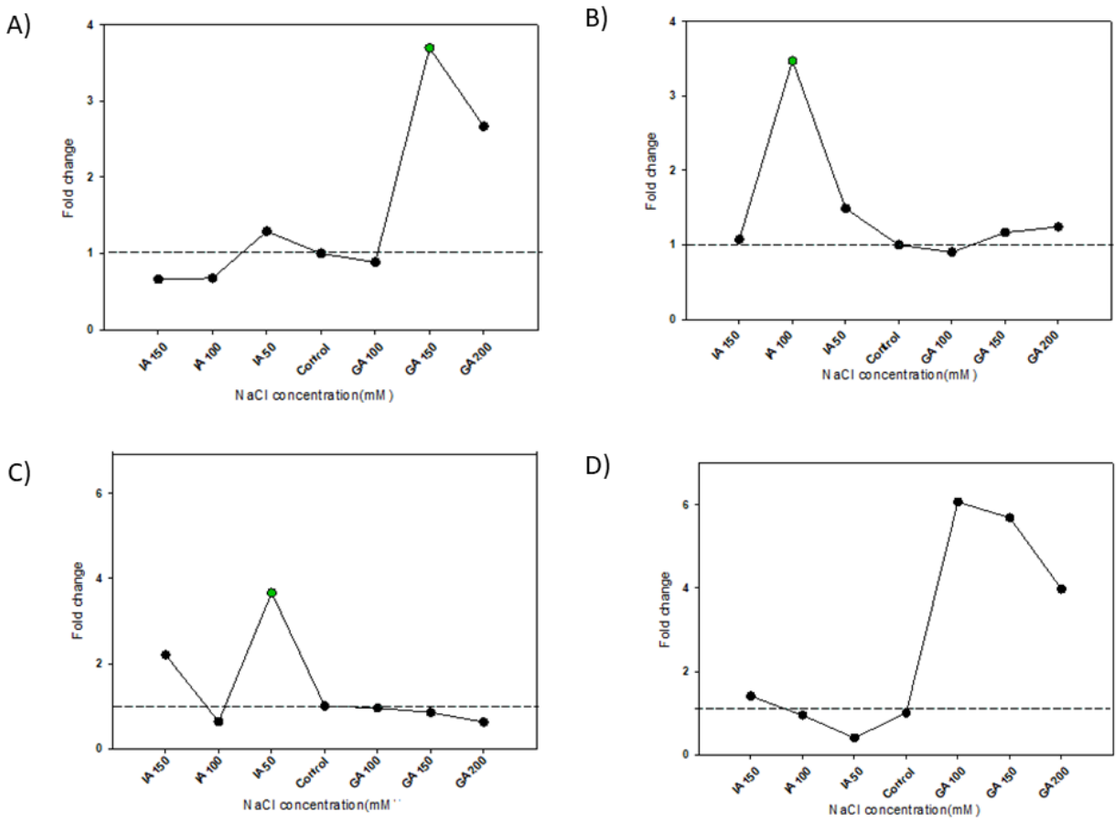
Η τρυπτοφάνη συσσωρεύεται σε σημαντικότερα επίπεδα στις ρίζες του οικοτύπου SD από ότι στου DB, ενώ στα φύλλα και των 2 οικοτύπων παρουσιάζει ένα ανομοιογενές πρότυπο συσσώρευσης και κατανάλωσης ανάλογα με την εφαρμογή.

Μεταβολισμός γλουταμινικού, γλουταμίνης, ασπαραγινικού, ασπαραγίνης και β-αλανίνης



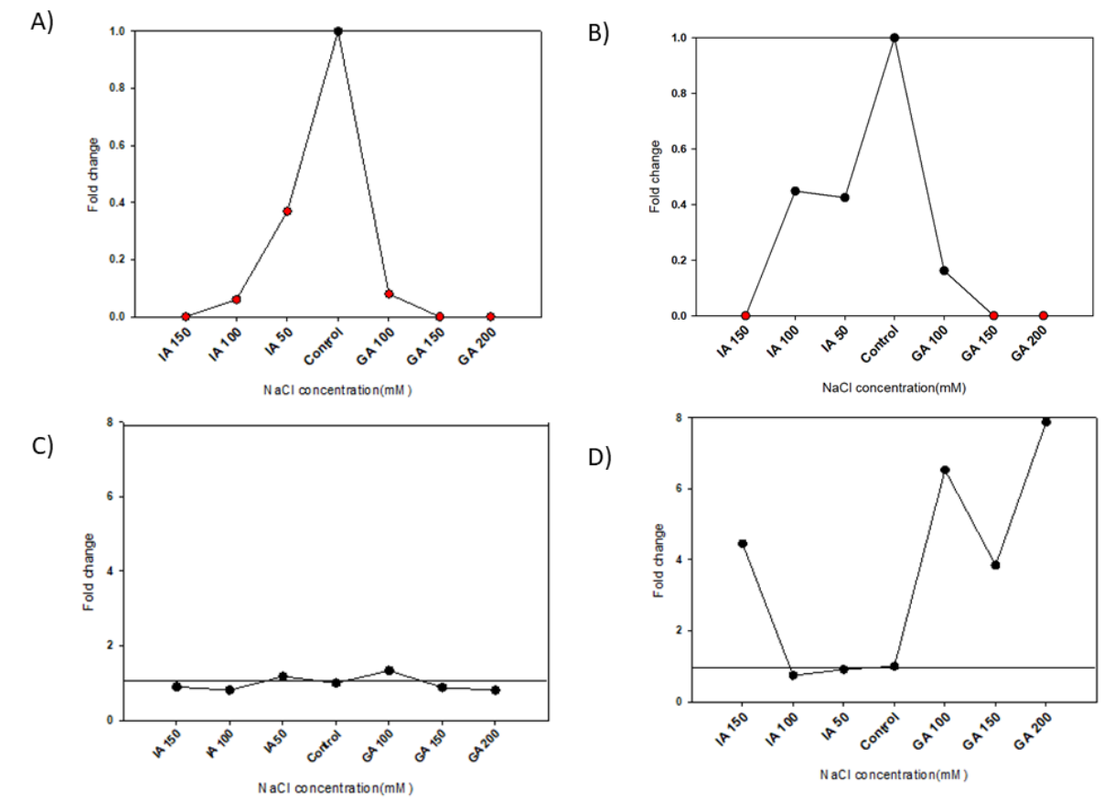
Διάγραμμα 21: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης του γλουταμινικού σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Τα επίπεδα του γλουταμινικού ελαττώνονται στα φύλλα του οικοτύπου SD ενώ στο DB παρουσιάζουν ένα ιδιάζον πρότυπο. Στις ρίζες παρουσιάζουν συσσώρευση και στους 2 οικοτύπους η οποία όμως είναι πιο έντονη στον οικότυπο DB καθώς παρατηρείται σε κάθε εφαρμογή.



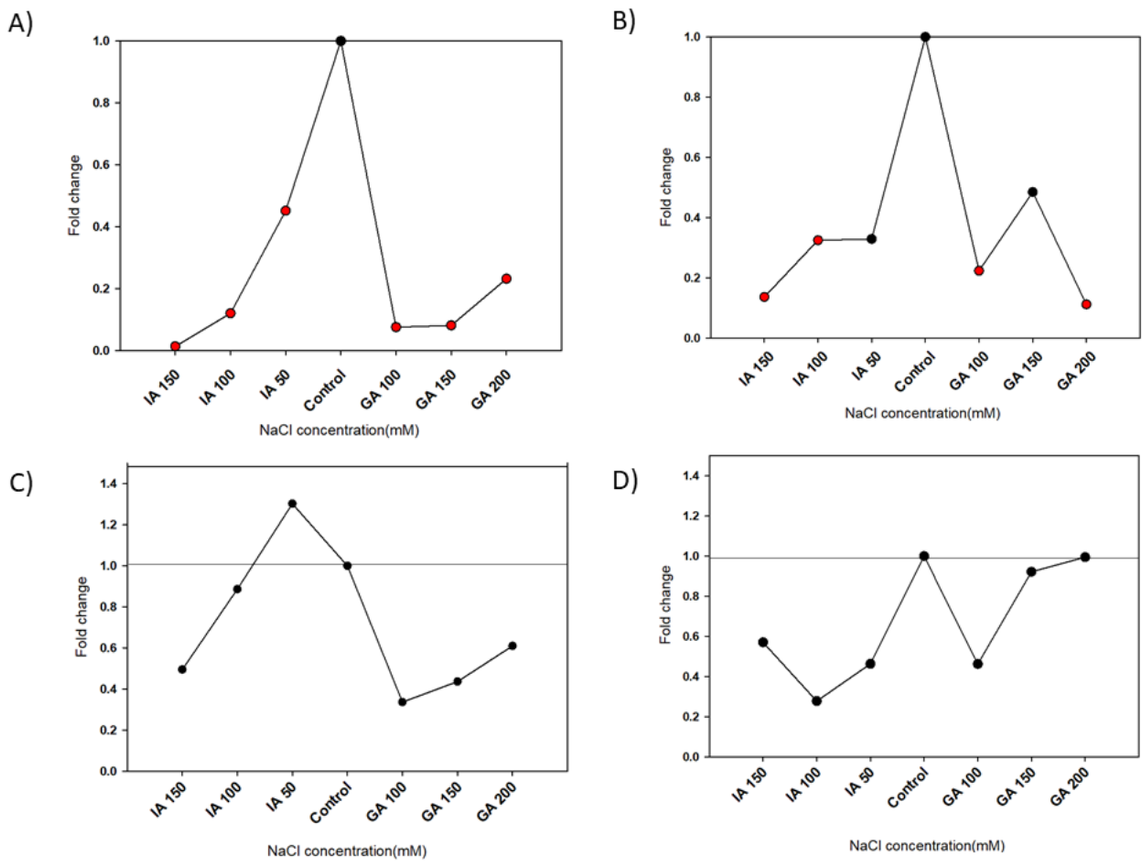
Διάγραμμα 22: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της γλουταμίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Τα επίπεδα της γλουταμίνης παρουσιάζουν συσσώρευση στα φύλλα και των 2 οικοτύπων αλλά στις ρίζες υπάρχει διαφορά, καθώς αν και τα επίπεδα συσσώρευσης στον SD είναι υψηλότερα, η στατιστική σημασία της συσσώρευσης στον DB είναι υψηλότερη.



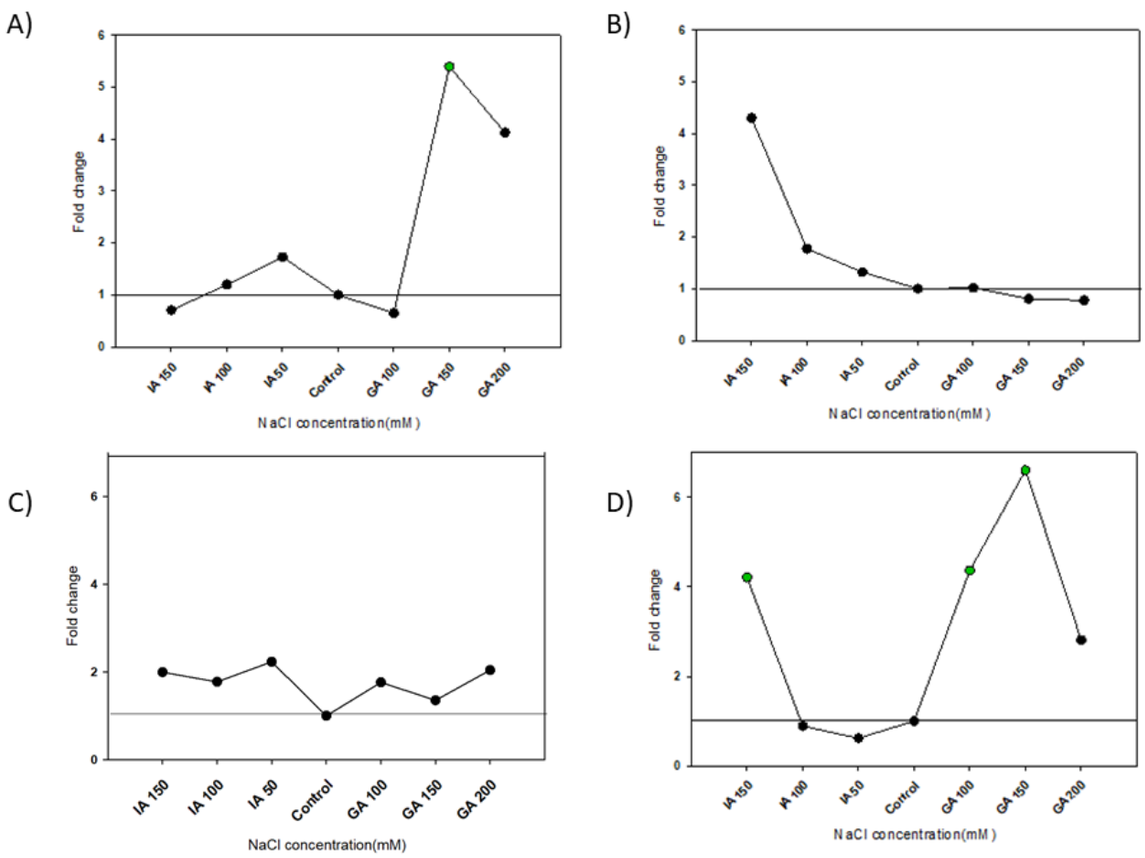
Διάγραμμα 23: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης του ασπαρτικού σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Το ασπαρτικό οξύ ελαττώνεται στα φύλλα των 2 οικοτύπων και σε μεγαλύτερο βαθμό στον DB, ενώ στις ρίζες ο SD παρουσιάζει συσσώρευση. Τα επίπεδα του αμινοξέως στις ρίζες του DB διατηρούνται σταθερά.



Διάγραμμα 24: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της ασπαραγίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

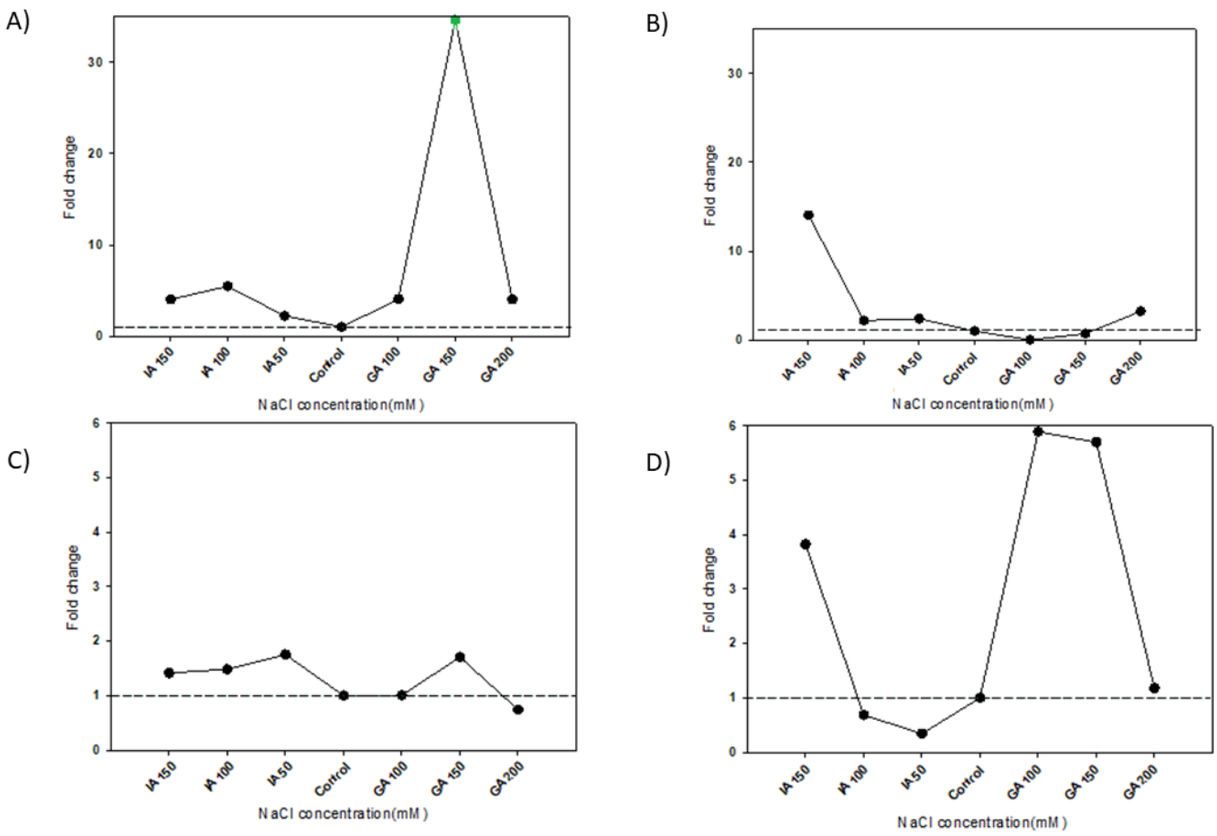
Τα επίπεδα της ασπαραγίνης μειώνονται στα φύλλα ενώ στις ρίζες φαίνεται ότι τα επίπεδα της είναι υψηλότερα στης ακραίες εφαρμογές του οικοτύπου SD, σε σχέση με τον DB.



Διάγραμμα 25: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της β-αλανίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

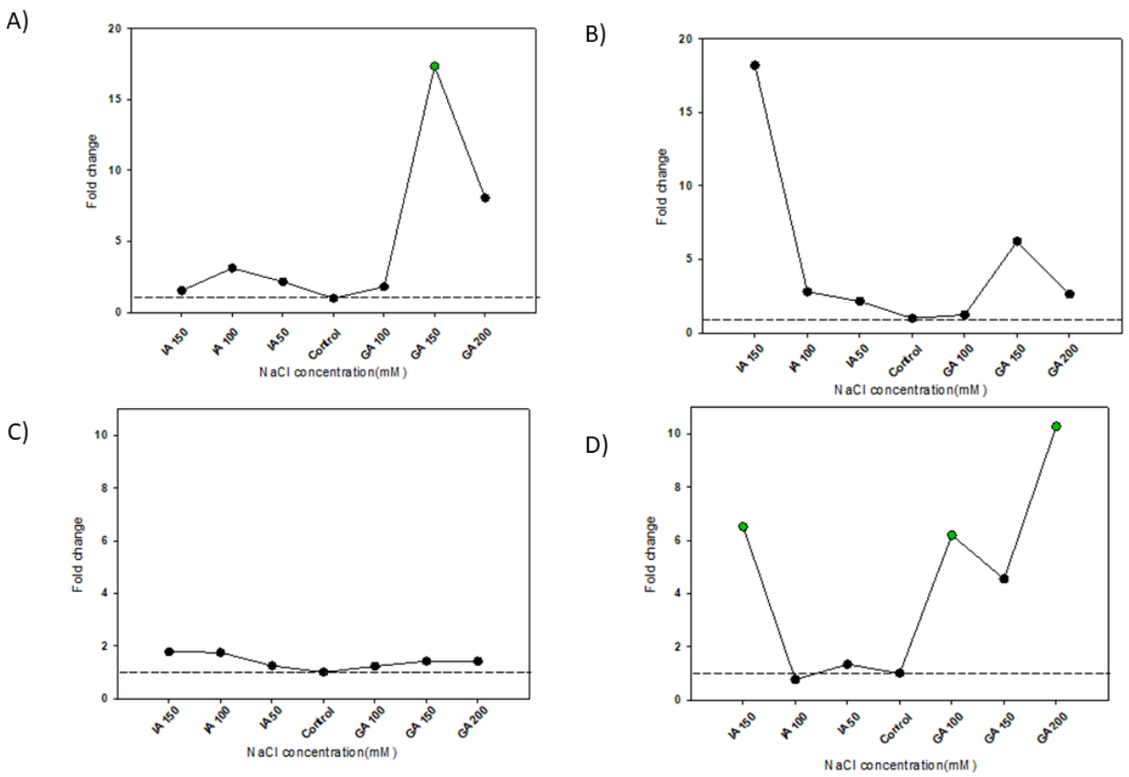
Η β-αλανίνη παρουσιάζει συσσώρευση και στους 2 ιστούς των οικοτύπων με τα επίπεδα της να είναι υψηλότερα στα φύλλα και τις ρίζες του DB και του SD αντίστοιχα.

Μεταβολισμός ισολευκίνης και βαλίνης



Διάγραμμα 26: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της ισολευκίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Η ισολευκίνη παρουσιάζει συσσώρευση στους ιστούς των οικοτύπων που στα φύλλα είναι εντονότερη στον οικότυπο DB ενώ στις ρίζες στον SD, με τα φύλλα γενικώς να συσσωρεύουν μεγαλύτερες ποσότητες ισολευκίνης από τις ρίζες



Διάγραμμα 27: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της βαλίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

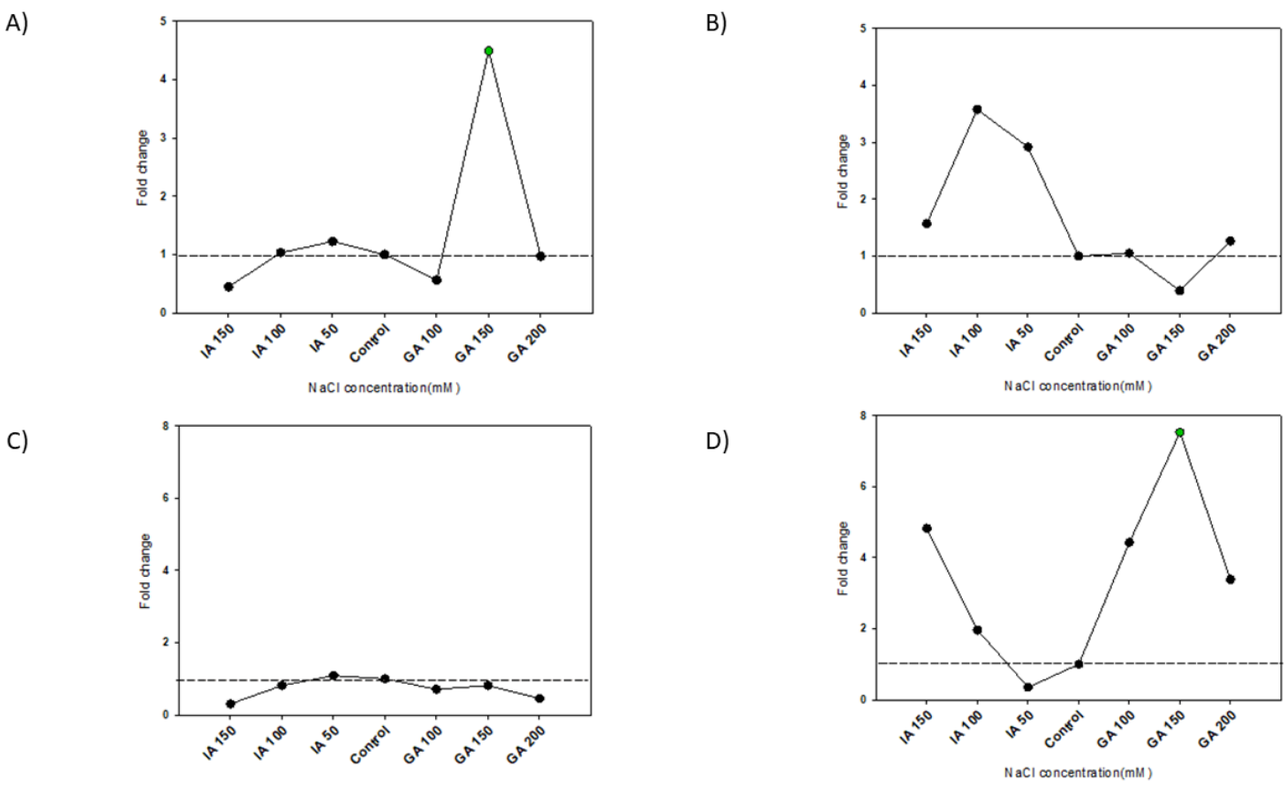
Τα επίπεδα της βαλίνης αυξάνονται στα φύλλα των δυο οικοτύπων, ενώ στις ρίζες παρατηρείται μια έντονη αύξηση στον οικότυπο SD, με τον DB να διατηρεί τα επίπεδα του αμινοξέως σταθερά.

Πολυόλες

Σχετικά με την περιεκτικότητα των οικοτύπων σε πολυόλες, παρουσιάζεται κοινό πρότυπο συσσώρευσης και κατανάλωσης, της αλλο-ινοσιτόλης και της μαννιτόλης αντίστοιχα, στα φύλλα. Η μαλτιτόλη, αν και συσσωρεύεται στον SD, στον DB καταναλώνεται, ενώ η D-θρεϊτόλη εμφανίζει αμετάβλητα επίπεδα στον SD, αλλά συσσωρεύεται στα φύλλα του DB (βλ. παράρτημα).

Στις ρίζες, ο οικότυπος SD συσσωρεύει αλλο-ινοσιτόλη και μαννιτόλη, ενώ ο DB διατηρεί σταθερά τα επίπεδα της 1ης και καταναλώνει την 2η. Η μαλτιτόλη συσσωρεύεται σε μεγαλύτερο βαθμό στον SD από ότι στον DB. Η γαλακτινόλη καταναλώνεται στον DB και συσσωρεύεται στον SD (βλ. παράρτημα).

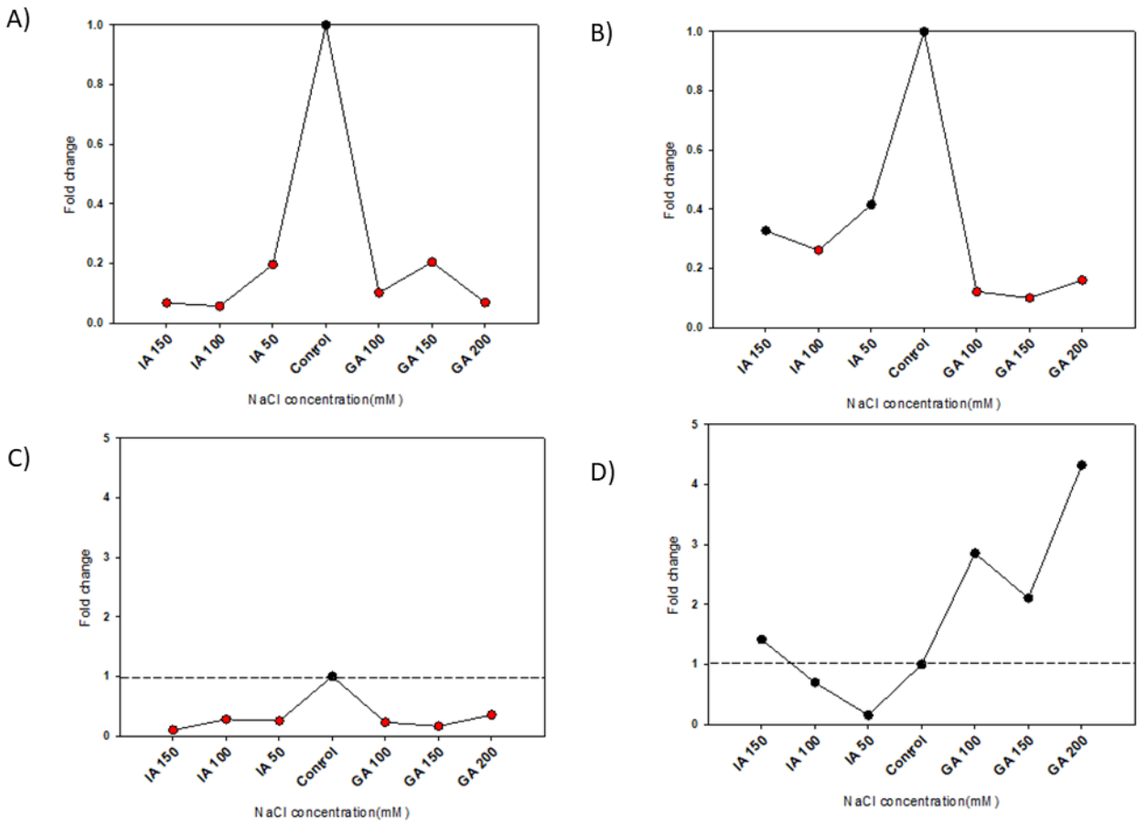
Αλλο-ινοσιτόλη



Διάγραμμα 28: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της αλλο-ινοσιτόλης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Η αλλο-ινοσιτόλη συσσωρεύεται στα φύλλα, ενώ στις ρίζες παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των οικοτύπων καθώς τα επίπεδα της στον DB ελαττώνονται ενώ στον SD αυξάνονται.

D-μαννιτόλη



Διάγραμμα 29: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της D-μαννιτόλης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

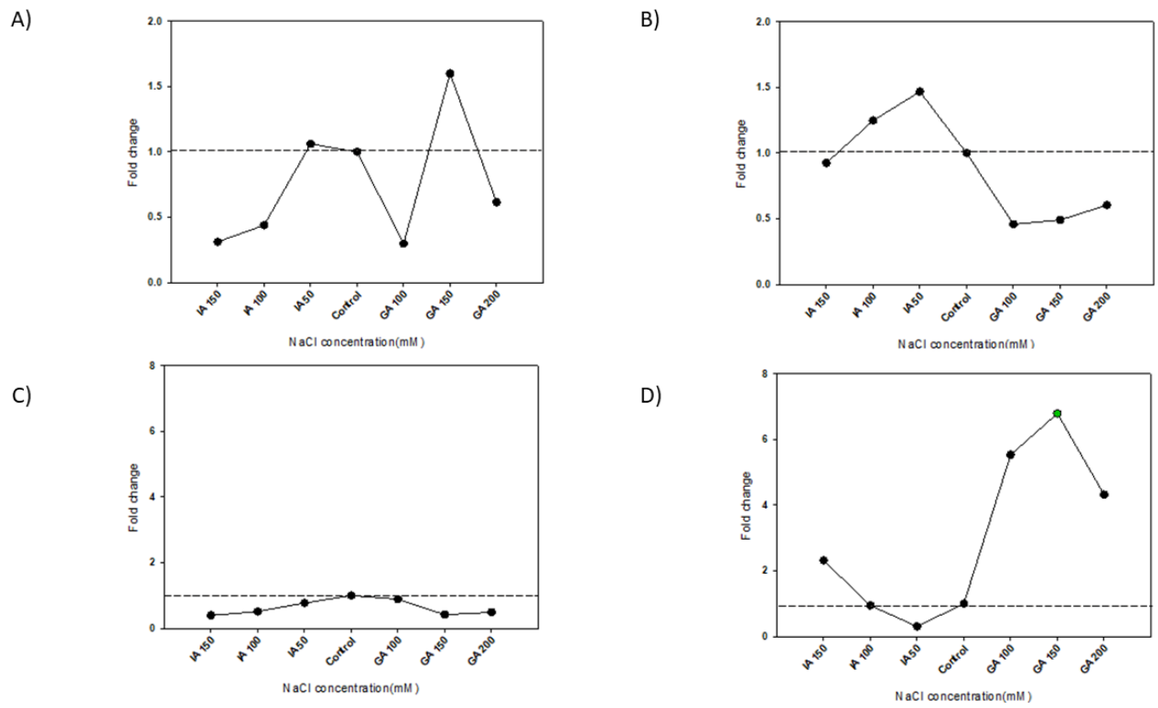
Τα επίπεδα της D-μαννιτόλης μειώνονται με στατιστική σημασία σε όλους τους χειρισμούς με εξαίρεση τις ρίζες του SD όπου παρουσιάζεται συσσώρευση.

Αζωτούχες ενώσεις

Από την κατηγορία των αζωτούχων ενώσεων παρατηρείται συσσώρευση στα φύλλα των οικοτύπων μεταβολιτών όπως η 2-αμινο-1-φαινυλαιθανολη, η νορλευκίνη, η ορνιθίνη, η νορβαλίνη και η αλλαντοϊνη. Όσον αφορά ορισμένους μεταβολίτες με υψηλή σημασία, κυρίως στο μεταβολισμό των πουρινών, παρουσιάζονται διαφορές μεταξύ των οικοτύπων, καθώς ο SD αν και δε συσσωρεύει με στατιστική σημαντικότητα πουτρεσκίνη, όπως ο DB, διατηρεί σχετικά σταθερά τα επίπεδα της αδενίνης, που καταναλώνεται από τον DB, και συσσωρεύει ουρία που ελαττώνεται ελαφρώς σε ορισμένες εφαρμογές στο DB (βλ. παράρτημα).

Ο SD στις ρίζες συσσωρεύει πουτρεσκίνη, ουρία και αδενίνη, ενώ ο DB συσσωρεύει την πουτρεσκίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος, διατηρεί σταθερά τα επίπεδα ουρίας και καταναλώνει την αδενίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η αλλαντοϊνη συσσωρεύεται στις υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και στους δύο οικότυπους, οι οποίοι παρουσιάζουν επίσης κοινά πρότυπα συσσώρευσης και κατανάλωσης, ορνιθίνης και μιμοσίνης αντίστοιχα (βλ. παράρτημα).

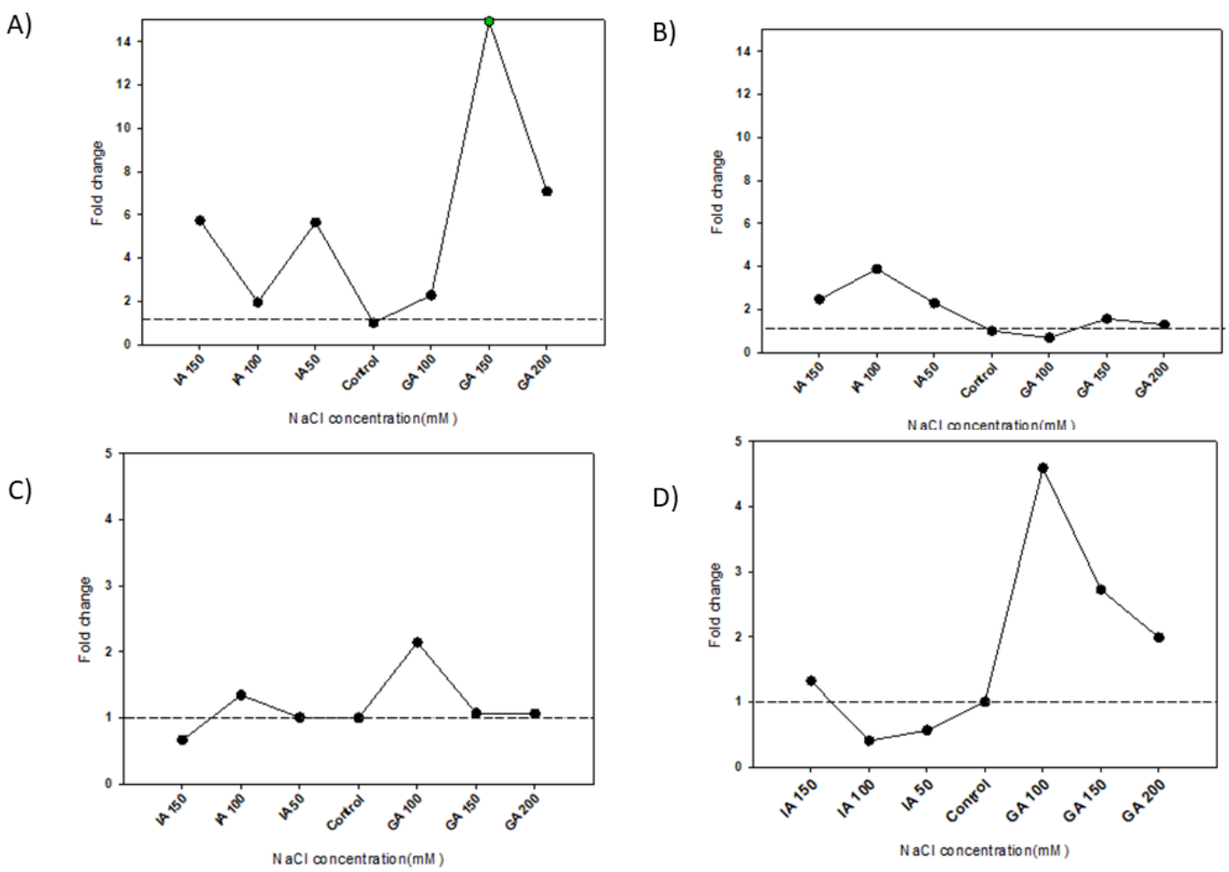
Αδενίνη



Διάγραμμα 30: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της αδενίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Η αδενίνη παρουσιάζει μια ξεκάθαρη συσσώρευση στις ρίζες του οικοτύπου SD όπου τα επίπεδα της 8-πλασιαζονται, ενώ αντιθέτως τα επίπεδα της μειώνονται στον DB.

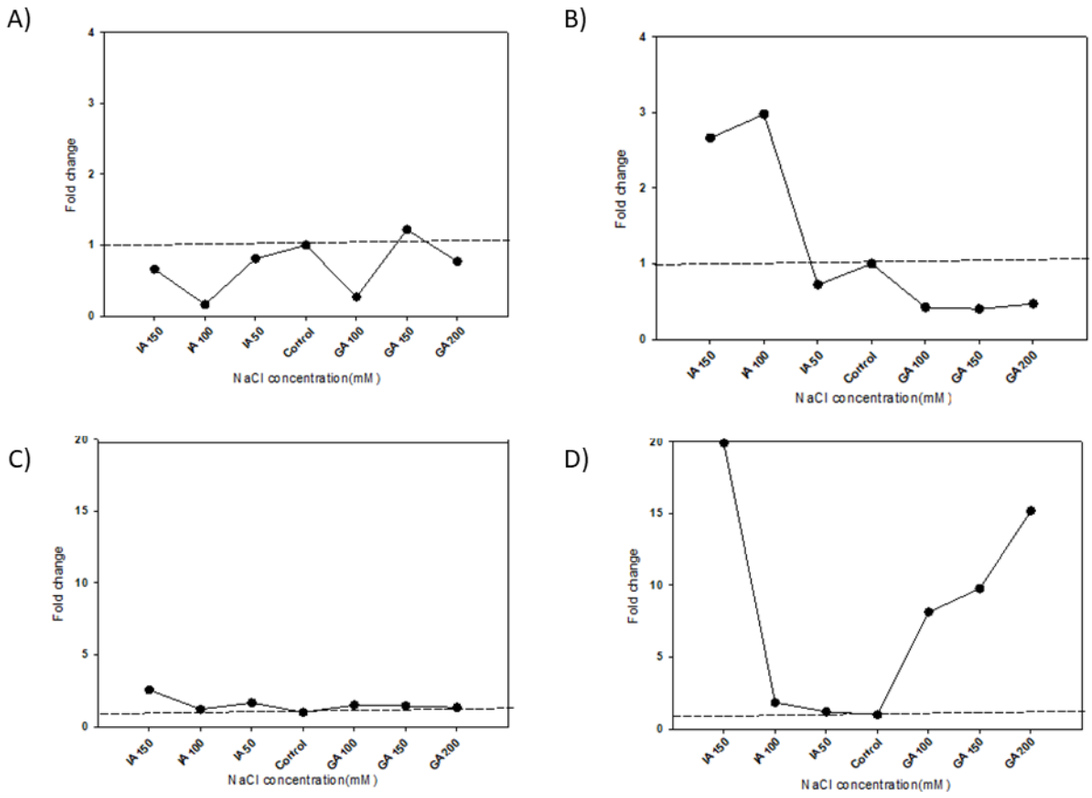
Πουτρεσκίνη



Διάγραμμα 31. Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της πουτρεσκίνης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD

Η πουτρεσκίνη παρουσιάζει συσσώρευση στα φύλλα, όπου στον οικότυπο DB 14-πλασιαζονται τα επίπεδα της, καθώς και στις ρίζες του οικοτύπου SD.

Ουρία

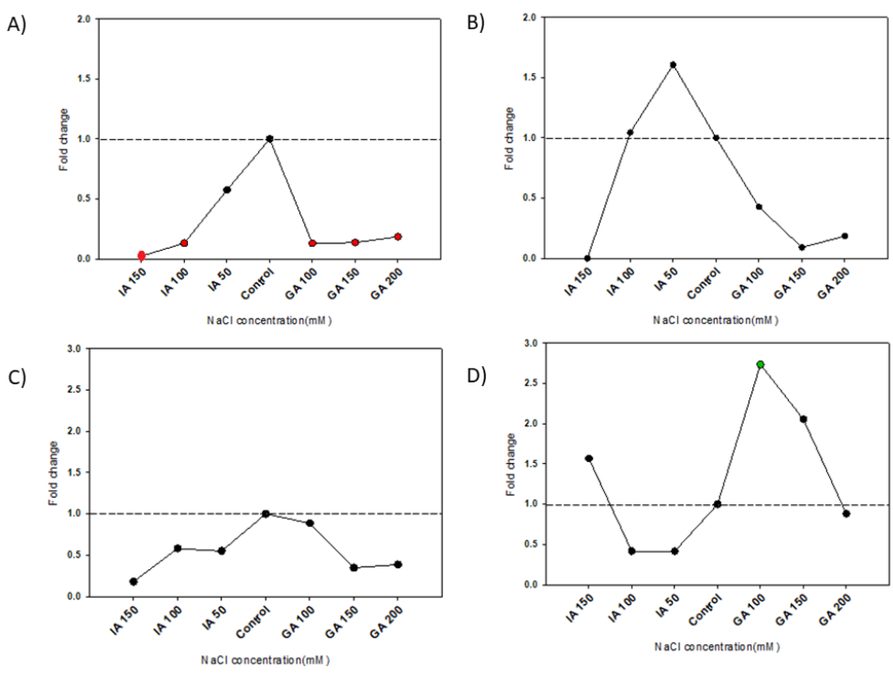


Διάγραμμα 32: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της ουρίας σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD Η ουρία παρουσιάζει συσσώρευση στον οικότυπο SD, με τα επίπεδα της να διατηρούνται σταθερά στις ρίζες του DB

Φωσφορικές ενώσεις

Το περιεχόμενο σε 6-φωσφορική-D-γλυκόζη στους δύο ιστούς των δύο οικοτύπων ελαττώνεται στις ακραίες εφαρμογές με εξαίρεση τις ρίζες του SD. Η 6-φωσφορική-D-γλυκόζη αποτελεί τον 1^{ο} ενδιάμεσο μεταβολίτη στην διαδικασία της γλυκόλυσης και προκύπτει από την φωσφορυλίωση της γλυκόζης με στόχο το σχηματισμό πυροσταφυλικού που αποτελεί 1^{η} ύλη για την παραγωγή ενέργειας. Το φωσφορικό οξύ είναι ένας μεταβολίτης που εμφανίζει στατιστικά σημαντική αύξηση στα φύλλα του DB και τις ρίζες του SD, αλλά και μη στατιστικά σημαντική συσσώρευση στα φύλλα του SD, ενώ στη ρίζα του DB τα επίπεδα παραμένουν αμετάβλητα. Η 1-φωσφορική γλυκερόλη δεν παρουσιάζει κάποια σημαντική μεταβολή.

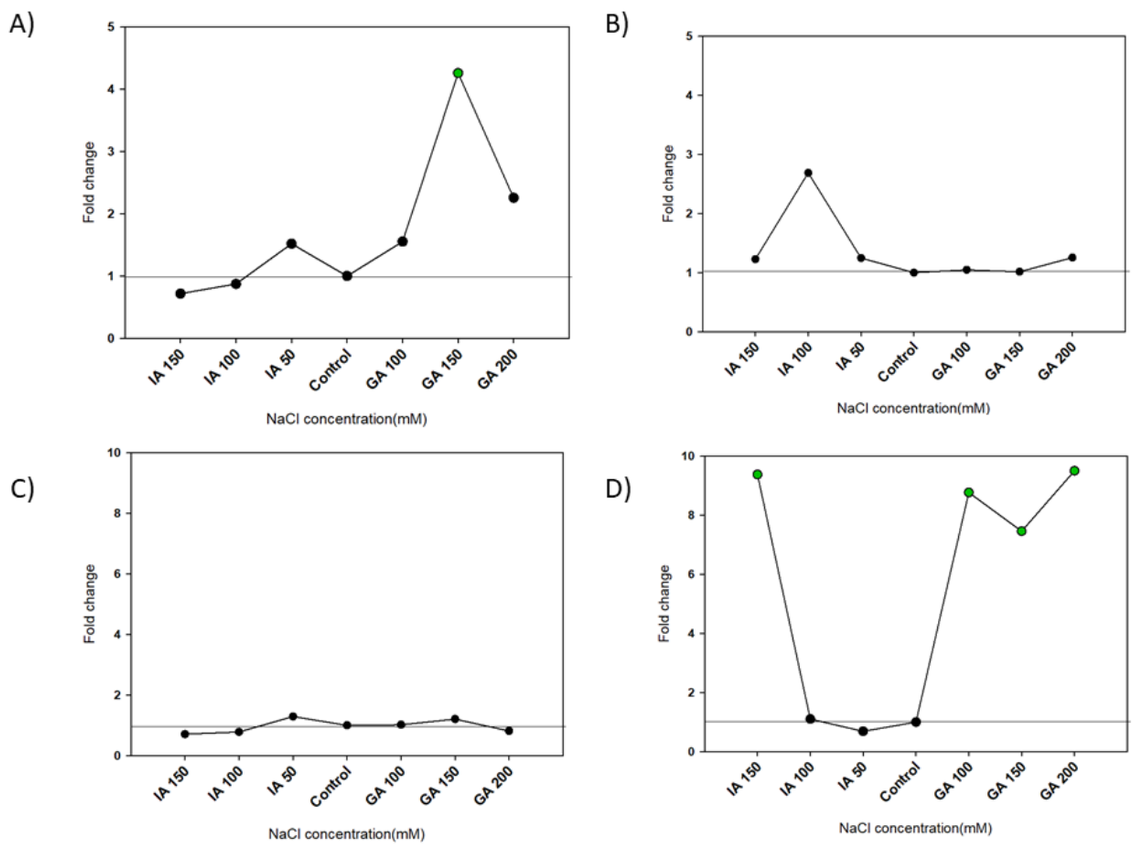
6-φωσφορική-D-γλυκόζη



Διάγραμμα 33: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης της 6-φωσφορικής-D-γλυκόζης σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: A) στα φύλλα του οικοτύπου DB, B) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD Η ουρία παρουσιάζει συσσώρευση στον οικότυπο SD, με τα επίπεδα της να διατηρούνται σταθερά στις ρίζες του DB

Η πτώση της 6-φωσφορικής-D-γλυκόζης είναι πιο έντονη στον οικότυπο DB, με τα φύλλα να παρουσιάζουν σημαντικότερη μείωση σε σχέση με τη ρίζα, που αποδεικνύεται και από τον στατιστικό έλεγχο Anova. Η μείωση αυτή αντανακλά πιθανώς στην εντονότερη αξιοποίηση της, από τον DB, για παραγωγή ενέργειας, σε σχέση με τον SD.

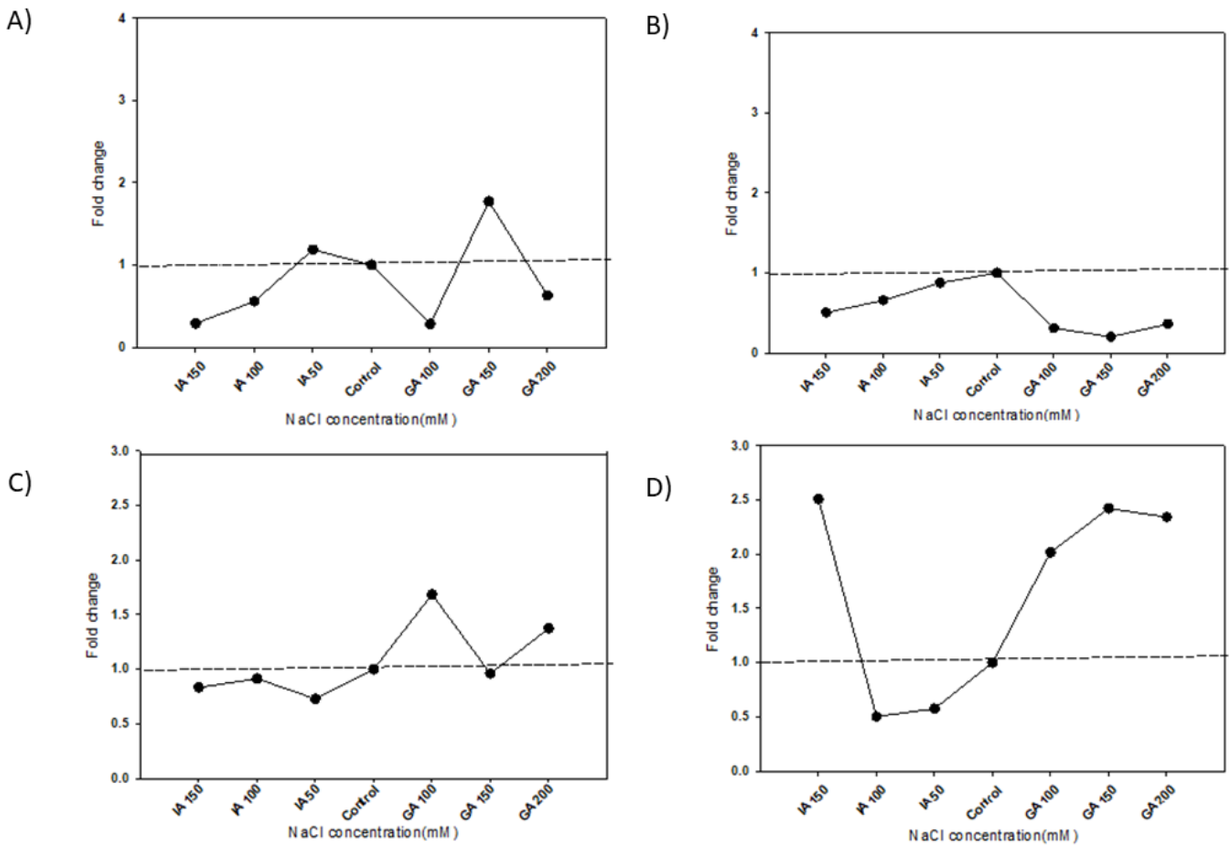
Φωσφορικό οξύ



Διάγραμμα 34: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης του φωσφορικού οξέος σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: A) στα φύλλα του οικοτύπου DB, B) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD Η ουρία παρουσιάζει συσσώρευση στον οικότυπο SD, με τα επίπεδα της να διατηρούνται σταθερά στις ρίζες του DB

Το φωσφορικό οξύ παρουσιάζει έντονη 10-πλασια συσσώρευση στις ρίζες του SD, σε σχέση με τον DB, ενώ στα φύλλα η συσσώρευση είναι πιο μικρή και ο DB φαίνεται ότι συσσωρεύει περισσότερο από τον SD.

1-φωσφορική-γλυκερόλη



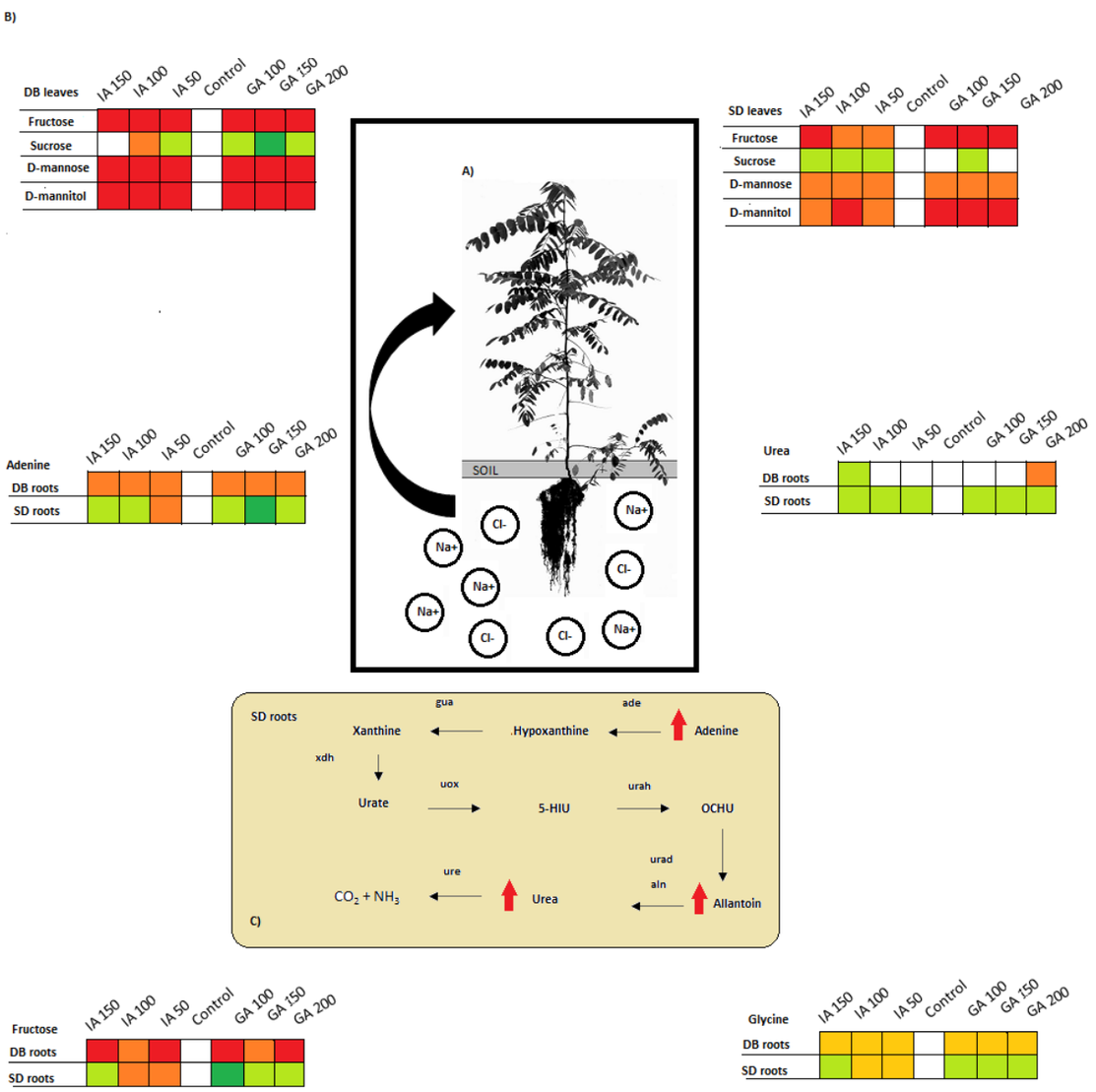
Διάγραμμα 35: Μεταβολή της σχετικής απόκρισης του φωσφορικού οξέος σε σχέση με το μάρτυρα σε κάθε εφαρμογή αλατότητας: Α) στα φύλλα του οικοτύπου DB, Β) στα φύλλα του οικοτύπου SD, C) στις ρίζες του οικοτύπου DB και D) στις ρίζες του οικοτύπου SD Η ουρία παρουσιάζει συσσώρευση στον οικότυπο SD, με τα επίπεδα της να διατηρούνται σταθερά στις ρίζες του DB

Η 1-φωσφορική-γλυκερόλη δε μεταβάλλεται σε σημαντικό βαθμό και παρουσιάζει πτώση στα φύλλα των οικοτύπων και συσσώρευση στις ρίζες, που αποδεικνύεται πιο έντονη στις ρίζες του SD, καθώς υπερδιπλασιάζονται τα επίπεδα της στις ακραίες τιμές αλατότητας, κάτι που δεν παρατηρείται στον DB.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται οι αποκρίσεις, ιστών φύλλων και ρίζας, των οικοτύπων DB και SD του ψυχανθούς *Robinia pseudoacacia* σε 6 διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας, άμεσους και σταδιακούς, σε σχέση με το Control. Οι αποκρίσεις αυτές αφορούν τη μεταβολή βιομετρικών παραμέτρων όπως το βάρος και το ύψος των φυτών καθώς και των επιπέδων μεταβολιτών διαφόρων κατηγοριών που προέκυψαν από την χρωματογραφική ανάλυση GC-MS. Ανιχνεύτηκαν 85 και 49 μεταβολίτες, στα φύλλα και τις ρίζες του οικοτύπου DB αντίστοιχα. Από την άλλη στον οικότυπο SD, 70 και 81 μεταβολίτες αντίστοιχα. Από το σύνολο των μεταβολιτών, με βάση γνωστή βιβλιογραφία καθώς και τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, επιλέχθηκαν ορισμένοι για περαιτέρω ανάλυση του προτύπου μεταβολής τους.

Η παραλλακτικότητα που παρουσιάζεται εντός των γλυκόφυτων, όσον αφορά την απόκριση στην αλατότητα είναι ως γνωστόν υψηλή. Υψηλό ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει και η ενδοειδική παραλλακτικότητα που εντοπίζεται μεταξύ των ποικιλιών ή των οικοτύπων ενός είδους. Οι φυσιολογικές, γονιδιακές, πρωτεϊνικές και βιοχημικές διαφοροποιήσεις, που αποτελούν την παραπάνω παραλλακτικότητα, μπορούν πλέον να αναλυθούν σε τέτοιο βαθμό ώστε να είναι δυνατή η βέλτιστη σύγκριση μεταξύ των καλλιεργειών. Πιο αναλυτικά, η δυνατότητα χαρακτηρισμού των επιπέδων καταπόνησης καθενός τμήματος του φυτικού οργανισμού, όπως οι ρίζες, οι βλαστοί και τα φύλλα κ.α., καθιστούν δυνατή, και με υψηλή λεπτομέρεια, την παραπάνω σύγκριση.



Διάγραμμα 36: Α) Σχηματική απεικόνιση της απορρόφησης και μεταφοράς των ιόντων χλωρίου και νατρίου από τις ρίζες προς το βλαστό Β) Γραφικές απεικονίσεις της μεταβολής διαφορετικών μεταβολιτών σε ιστούς φύλλων και ρίζας των 2 οικοτύπων C) Μέρος του μονοπατιού του καταβολισμού των πουρινών στις ρίζες του οικοτύπου SD και μεταβολές της περιεκτικότητας σε ορισμένους μεταβολίτες με αύξηση της αλατότητας

Η φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών παρεμποδίζεται όταν παρουσιαστούν συνθήκες υψηλής εδαφικής αλατότητας. Η αύξηση του υπέργειου τμήματος περιορίζεται ενώ το υπόγειο τμήμα του φυτού συνεχίζει την ανάπτυξη του αναζητώντας περιοχές του εδάφους όπου η αλατότητα είναι περιορισμένη. Οι παραπάνω μεταβολές είναι εμφανείς τόσο σε σχέση με το μέγεθος των φυτικών οργάνων όσο και σε σχέση με τα βάρη τους. Πρότερες μελέτες σε φυτά *Phaseolus vulgaris* (Taibi et al., 2016) και *Lotus japonicus* (Rubio et al., 2008) παρουσίασαν σημαντική ελάττωση του βάρους της ρίζας και του βλαστού καθώς και σημαντική ελάττωση του βάρους της ρίζας αντίστοιχα. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε πτώση του βάρους των φυταρίων και στις 2 ποικιλίες με διαφορές όμως στο πρότυπο ελάττωσης, ενώ και τα μεγέθη του βλαστού και της ρίζας περιορίστηκαν στις περισσότερες εφαρμογές αλατότητας.

Η καταπόνηση με χλωριούχο νάτριο προκαλεί ποικίλα προβλήματα στα φυτά όπως αφυδάτωση, αναστολής ενζυμικής δραστικότητας και βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες. Ένας μηχανισμός ανεκτικότητας στην αλατότητα είναι η συσσώρευση υδατοδιαλυτών σακχάρων, τα οποία επιδρούν θετικά μειώνοντας το ωσμωτικό δυναμικό (Munns, 2005) και προστατεύοντας παράλληλα τα ένζυμα και τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες αλληλοεπιδρώντας μαζί τους (Unno et. Maeda, 2008). Αρκετές μελέτες έχουν παρουσιάσει την μεταβολή της περιεκτικότητας διαφόρων φυτών σε σάκχαρα, ως απόκριση στην καταπόνηση αλατότητας. Πιο συγκεκριμένα, σε φυτά *Lens culinaris* παρατηρήθηκε μια συσσώρευση της φρουκτόζης στα φύλλα, ενώ στις ρίζες ο παραπάνω μεταβολίτης καταναλώνεται και συσσωρεύονται D-τρεχαλόζη και μαλτόζη (Skliros et al., 2018). Από την άλλη, στις ρίζες φυτών *Medicago* sativa, που αναπτύσσονται σε συνθήκες αλατότητας, παρουσιάστηκε συσσώρευση σακχαρόζης, μαλτόζης και D-τρεχαλόζης (Fougere et al., 1991). Σε βλαστούς φυτών *Lotus japonicus* η περιεκτικότητα σε σάκχαρα αυξήθηκε κατά την ανάπτυξη τους σε ακραίες τιμές αλατότητας, με σημαντικότερα παραδείγματα την γλυκόζη, τη φρουκτόζη και τη μαλτόζη (Sanchez et al., 2008). Όσον αφορά τα σάκχαρα, παρατηρείται κοινό πρότυπο συσσώρευσης και κατανάλωσης στα φύλλα των 2 οικοτύπων. Πιο συγκεκριμένα, η φρουκτόζη και η μαννόζη καταναλώνονται, πιθανώς για διατήρηση των ενεργειακών αποθεμάτων, ενώ η σουκρόζη και ραφινόζη συσσωρεύονται με στόχο τη διατήρηση του ωσμωτικού δυναμικού και την προστασία των μεμβρανών ούτως ώστε να περιοριστεί η χλώρωση και να βελτιωθεί η ανθεκτικότητα. Η μαννόζη επιπλέον σχετίζεται και με τη βιοσύνθεση του ασκορβικού οξέος. Εμφανίζονται όμως διαφορές στα επίπεδα μεταβολής όπου ο οικότυπος DB σε κάθε περίπτωση μεταβάλλει σε μεγαλύτερο βαθμό τα επίπεδα των παραπάνω μεταβολιτών. Από την άλλη, στις ρίζες, με εξαίρεση τη σουκρόζη που συσσωρεύεται και στους 2 οικοτύπους, ευνοώντας πιθανώς τον περιορισμό της πρόσληψης αλατούχου νερού, αποκαλύπτοντας πιθανώς ένα κοινό μηχανισμό διατήρησης της λειτουργικότητας της ρίζας σε συνθήκες καταπόνησης, παρατηρούνται διαφορετικά πρότυπα μεταξύ των οικοτύπων. Η φρουκτόζη και η μαννόζη, παρότι καταναλώνονται στον DB, εμφανίζουν συσσώρευση στον SD, με τη ραφινόζη να παραμένει σταθερή στον DB, αλλά να συσσωρεύεται στον SD. Οι σακχαρούχες αλκοόλες, ή αλλιώς πολυόλες, έχει προταθεί ότι μέσω των υδροξυλομάδων τους μπορούν να μιμηθούν τη δομή του νερού διατηρώντας έτσι μια τεχνητή περιοχή ενυδάτωσης γύρω από τα μακρομόρια. Επίσης, έχουν τη δυνατότητα να λειτουργούν ως συλλέκτες δραστικών ειδών οξυγόνου, αποτρέποντας την υπεροξειδίωση των λιπιδίων και την επακόλουθη βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών κατά την καταπόνηση (Johan et al., 1996). Σε προηγούμενες μελέτες σε φυτά *Lens culinaris*, παρατηρήθηκε ότι η μαννιτόλη στις ρίζες παρουσίασε συσσώρευση ενώ στα φύλλα η περιεκτικότητα της ελαττώθηκε (Skliros et al., 2018). Σχετικά με τις πολυόλες, η μαννιτόλη, που σχετίζεται με τη βιοσύνθεση της μαννόζης, ακολουθεί παρόμοιο πρότυπο με την τελευταία, και η αλλο-ινοσιτόλη συσσωρεύεται στα φύλλα και των 2 οικοτύπων, καθώς επίσης και στις ρίζες του SD, με τα επίπεδα της στον DB να διατηρούνται σταθερά. Η άλλο-ινοσιτόλη αποτελεί στερεο-ισομερές της ινοσιτόλης που αξιοποιείται από το φυτό για τη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων καθώς και ως ωσμωπροστατευτικό μόριο. Επιπλέον, η γαλακτινόλη, που αποτελεί πρόδρομο μόριο βιοσύνθεσης σακχάρων απόκρισης στην καταπόνηση, καταναλώνεται στα φύλλα και παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο στις ρίζες όπου συσσωρεύεται στον SD και καταναλώνεται στον DB.

Η πλειονότητα προηγούμενων μελετών, σχετικά με την καταπόνηση αλατότητας, παρουσιάζει μια ελάττωση της περιεκτικότητας των φυτικών ιστών σε οργανικά οξέα. Το παραπάνω φαινόμενο πιθανώς ανακλά αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις που ικανοποιούνται από μια πιο έντονη αναπνοή, μετατόπιση των αποθεμάτων άνθρακα προς σχηματισμό αμινοξέων και σακχάρων καθώς και μεταφορά από τους βλαστούς στις ρίζες για παροχή πηγών άνθρακα. Η παραπάνω παρατήρηση περιεγράφηκε τόσο σε βλαστούς φυτών *Lotus japonicus* (Sanchez et al., 2008), όσο και σε ρίζες φυτών *Medicago sativa* (Fougere et al., 1991). Όσον αφορά τη *Robinia pseudoacacia*, τα οργανικά οξέα παρουσιάζουν μια ελάττωση της περιεκτικότητας τους στα φύλλα, με ελάχιστες εξαιρέσεις και το παραπάνω πρότυπο ακολουθούν το μηλικό, το κιτρικό, το μαλονικό και το μουκικό οξύ, το οποίο σχετίζεται με την ωσμωπροστασία του κυττάρου. Σε

όλες τις περιπτώσεις η μεταβολή που παρατηρείται στον DB είναι εντονότερη από ότι στο SD. Το γλυκερικό οξύ, που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της γλυκερόλης, συσσωρεύεται στο SD και καταναλώνεται στο DB. Συσσώρευση παρουσιάζουν στα φύλλα το πυροσταφυλικό και το γουανιδινοβουτυρικό οξύ. Στις ρίζες, το σύνολο των παραπάνω οξέων συσσωρεύεται στον SD, ενώ στον DB ελαττώνονται όλα εκτός του κιτρικού που παραμένει σταθερό και του μαλονικού που συσσωρεύεται.

Η συσσώρευση αμινοξέων και αζωτούχων ενώσεων αποτελεί ένα ιδιαίτερο βιοχημικό χαρακτηριστικό της απόκρισης, σχεδόν όλων, των φυτών που έχει παρατηρηθεί στις καταπονήσεις. Η παραπάνω μεταβολή στον μεταβολισμό του αζώτου έχει ερμηνευτεί ως συσσώρευση υδατοσυμβατών ουσιών, δημιουργία αποθεμάτων άνθρακα και αζώτου για μελλοντικές ανάγκες και ως μια μέθοδος αποτοξίνωσης από περίσσεια αζώτου (Gilbert et al., 1998). Στην παρούσα μελέτη, τα αμινοξέα παρατηρείται ότι συσσωρεύονται στις περισσότερες περιπτώσεις. Η προλίνη, που σχετίζεται με την ωσμωπροστασία και τη συλλογή ελευθέρων ριζών, αποτελεί ένα αμινοξύ που έχει μελετηθεί εκτενώς ως μεταβολίτης απόκρισης στην καταπόνηση, με τα επίπεδα του να συσσωρεύονται στα περισσότερα φυτά (Verbruggen and Hermans, 2008). Η περιεκτικότητα των φύλλων σε προλίνη προσδιορίστηκε ότι αυξάνεται με μεγαλύτερη συσσώρευση να παρατηρείται στον SD. Τα αμινοξέα που σχετίζονται με την αφομοίωση αζώτου, δηλαδή η γλουταμίνη και το γλουταμινικό συσσωρεύονται, με εξαίρεση τα φύλλα του SD, υποδεικνύοντας μια βελτιωμένη ικανότητα αφομοίωσης της αμμωνίας μέσω του GS-GOGAT μονοπατιού, στο οποίο παίζουν κεντρικό ρόλο (Forde and Lea, 2007). Η παρατήρηση αυτή έχει προκύψει και σε μελέτες φυτών μηδικής (Fougere et al., 1991) και φακής (Skliros et al., 2018), ενώ αντίθετα αποτελέσματα προέκυψαν σε μελέτες φυτών *Lotus japonicus* (Sanchez et al., 2008). Η άυξηση των επιπέδων της γλουταμίνης είναι παρόμοια μεταξύ των οικοτύπων στα φύλλα, ενώ στις ρίζες, ο οικότυπος DB συσσωρεύει περισσότερο το γλουταμινικό σε σχέση με τον SD. Από την άλλη, οι ρίζες του SD συσσωρεύουν πιο έντονα γλουταμίνη. Σχετικά με τον μεταβολισμό της σερίνης, της γλυκίνης και της θρεονίνης, τα αμινοξέα αυτά έχει παρατηρηθεί ότι συσσωρεύονται κατά την καταπόνηση αλατότητας σε πληθώρα φυτών (Sanchez et al., 2008, Fougere et al., 1991). Η θρεονίνη, που σχετίζεται με τη βιοσύνθεση μεταβολιτών καταπολέμησης της καταπόνησης, παρατηρείται ότι συσσωρεύεται σε μεγαλύτερο βαθμό στον DB, ενώ η γλυκίνη, από την οποία συντίθεται η γλυκίνη-βεταϊνη, καταναλώνεται στον DB και συσσωρεύεται στον SD. Η σερίνη συσσωρεύεται στον ίδιο βαθμό στους 2 οικοτύπους στα φύλλα, αλλά στις ρίζες η συσσώρευση είναι μεγαλύτερη στον SD. Αναφορικά με τις αζωτούχες ενώσεις, η ουρία και η αδενίνη, που εμπλέκονται στο καταβολισμό των πουρινών (Polacco and Holland, 1993), μια βιοχημική διαδικασία με πιθανή σημασία ως απόκριση στην καταπόνηση διότι επιτρέπει την ανακύκλωση του αζώτου με στόχο τον σχηματισμό προστατευτικών ουσιών (Skliros et al., 2018), παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα, με την πρώτη να μένει σταθερή στον DB και να συσσωρεύεται στον SD, και την δεύτερη να ελαττώνεται στον DB και να συσσωρεύεται μόνο στις ρίζες του SD.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη δίνεται έμφαση στο γεγονός ότι οι παρατηρούμενες μεταβολικές αποκρίσεις της ψευδοακακίας (*Robinia pseudoacacia*) εξαρτώνται από τον οικότυπο, τον ιστό και την εκάστοτε εφαρμογή που διερευνήθηκε. Μελετώντας τη μεταβολική απόκριση του συγκεκριμένου ψυχανθούς δένδρου σε μακρόχρονες συνθήκες, άμεσης και σταδιακής, αλατότητας, και συγκρίνοντας τους 2 διαθέσιμους οικοτύπους ήταν εφικτή η παρατήρηση των διαφορών που παρουσιάζουν οι τελευταίοι στην αξιοποίηση βιοχημικών μηχανισμών ανθεκτικότητας στην αλατότητα. Μια σημαντική παρατήρηση που προέκυψε κατά την εκτέλεση του πειράματος ήταν ότι τα φυτά του οικοτύπου DB παρουσίασαν συμπτώματα χλώρωσης στα φύλλα τους μια εβδομάδα αργότερα από τα αντίστοιχα του οικοτύπου SD. Η υψηλότερη καταπόνηση των φυτών του οικοτύπου SD ίσως μπορεί να δικαιολογηθεί και από την αυξημένη συσσώρευση μεταβολιτών απόκρισης, στην αλατότητα, στις ρίζες σε σχέση με τον οικότυπο DB. Προηγούμενες μελέτες έχουν συνδυάσει μεταβολομικές και μεταγραφομικές μεθοδολογίες αναλύοντας με υψηλή ακρίβεια τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στην αλατότητα. Στην περίπτωση της ψευδοακακίας, με την ολοκλήρωση της αλληλούχισης του γονιδιώματος της, θα μπορούσε σε επόμενο στάδιο να μελετηθεί σε μεταγραφομικό επίπεδο η απόκριση της σε συνθήκες αλατότητας παρόμοιες με του παρόντος πειράματος καθώς και να δημιουργηθούν ορισμένα μεταλλάγματα σε γονίδια απόκρισης στην καταπόνηση και να διερευνηθεί η αποδοτικότητα τους.

Βιβλιογραφία

1. R. Ahmad, C. J. Lim, S.-Y. Kwon (2013), Glycine betaine: a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses, Plant Biotechnology Reports, vol. 7, pp. 49–57
2. R. Alcazar, F. Marco, J. C. Cuevas (2006), Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress, Biotechnology Letters, vol. 28, no. 23, pp. 1867–1876
3. A. I. Alet, D. H. Sanchez, J. C. Cuevas (2012), New insights into the role of spermine in Arabidopsis thaliana under long-term salt stress, Plant Science, vol. 182, no. 1, pp. 94–100
4. J.M. Alonso, J.R. Ecker (2006), Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in Arabidopsis, Nature Reviews, July, Volume 7
5. P. An, S. Inanaga, Y. Cohen, U. Kafkafi, Y. Sugimoto (2002), Salt tolerance in two soybean cultivars., J. Plant Nutr. 25: 407–423
6. M. Ashraf (2004), Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. Flora 199, 361–376
7. M. Ashraf andM. R. Foolad (2007), Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, Environmental and Experimental Botany, vol. 59, no. 2, pp. 206–216
8. A. Bano, M. Fatima (2009), Salt tolerance in Zea mays (L.) following inoculation with Rhizobium and Pseudomonas, Biol. Fertility Soils 45, 405–413
9. T. Bazhenova, A. Shilov (1995), Nitrogen fixation in solution, Coord. Chem. Rev. 144 69–145
10. C. Ben Ahmed, B. Ben Rouina, S. Sensoy, M. Boukhriss, F. Ben Abdullah (2010), “Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree,” Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 58, no. 7, pp. 4216–4222
11. M. L. Binzel, F. D. Hess, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa (1988), Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells, Plant Physiology, vol. 86, pp. 607–614
12. A.D Blaylock (1994), Soil salinity, salt tolerance and growth potential of horticultural and landscape plants. Co-operative Extension Service, University of Wyoming, Department of Plant, Soil and Insect Sciences, College of Agriculture, Laramie, Wyoming
13. H. J. Bohnert, D. E. Nelson, R. G. Jensen (1995), Adaptations to environmental stresses, Plant Cell, vol. 7, no. 7, pp. 1099–1111
14. R.H. Burris, G.P. Roberts (1993), Biological nitrogen fixation, Annu. Rev. Nutr. 13 317–335
15. B. Seckin, A.H. Sekmen, I. Turkan (2009), An enhancing effect of exogenous mannitol on the antioxidant enzyme activities in roots of wheat under salt stress. J. Plant Growth Regul. 28, 12–20
16. D. Castro, J. Urzúa, M.R. Malebran et al. (2017), Woody leguminous trees: New uses for
17. sustainable development of drylands, Journal of Sustainable Forestry
18. C.S. Chang, B. Bongarten, J. Hamrick (1998) Genetic structure of natural populations of black locust (Robinia pseudoacacia L.) at Coweeta, North Carolina. Journal of Plant Research, 111, 17–24
19. J.M. Cheeseman (1982), Pump-leak sodium fluxes in low salt corn roots, J. Membr. Biol. 70:157–64
20. V. Chinnusamy, J. Zhu, J.K. Zhu (2006), Gene regulation during cold acclimation in plants. Physiol. Plant. 126, 52–61
21. A. Cierjacks & al. (2013), Biological Flora of the British Isles: Robinia pseudoacacia, Journal of Ecology, 101, 1623–1640
22. C.R. Cramer (2002), Response of abscisic acid mutants of *Arabidopsis* to salinity, Funct. Plant Biol. 29:561–67
23. G.R. Cramer, D.C. Bowman (1991). Kinetics of maize leaf elongation. Increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity, J. Exp. Bot. 42:1417–26
24. V. Demidchik, R.J. Davenport, M. Tester (2002), Nonselective cation channels, Annu. Rev. Plant Biol. 53:67–107
25. A.M. De Ron, M. Santalla (2001), Phaseolus vulgaris (Beans), Brenner’s Encyclopedia of Genetics, 2nd edition, Volume 5
26. J. Duan, J. Li, S. Guo, Y. Kang (2008), Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed Cucumis sativus roots and enhances short-term salinity tolerance, Journal of Plant Physiology, vol. 165, no. 15, pp. 1620–1635
27. O. Dunisch, H.G. Richter, G. Koch (2010), Wood properties of juvenile and mature heartwood in Robinia pseudoacacia L. Wood Science and Technology, 44, 301–313
28. F. El-Shintinawy and M. N. El-Shourbagy (2201), Alleviation of changes in protein metabolism in NaCl-stressed wheat seedlings by thiamine, Biologia Plantarum, vol. 44, no. 4, pp. 541–545
29. D. Ewald, K. Ulrich, G. Naujoks, M.B. Schroder (2009), Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids in vitro, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 99, 353–357
30. S.-Y. Song, Y. Chen, J. Chen, X.-Y. Dai, W.-H. Zhang (2011), Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress, Planta, vol. 234, no. 2, pp. 331–345

31. T.J. Flowers, D. Dalmond (1992), Protein synthesis in halophytes: the influence of potassium, sodium and magnesium in vitro. Plant Soil. 146:153–61
32. T.J. Flowers, M.A. Hajibagheri, N.J.W. Clipson (1986), Halophytes. Q. Rev. Biol. 61:313–37
33. T.J. Flowers, P.F. Troke, A.R. Yeo (1977), The mechanism of salt tolerance in halophytes, Annu. Rev. Plant Physiol. 28:89–121
34. B. G. Forde, P. J. Lea (2007), Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling, J. Exp. Bot. 58, 2339–2358
35. F. Fougere, D. Le Rudulier, J. Streeter (1991), Effects of Salt Stress on Amino Acid, Organic Acid, and Carbohydrate Composition of Roots, Bacteroids, and Cytosol of Alfalfa (Medicago sativa L.), Plant Physiol. 96, 1228-1236
36. R. Freyre, P.W. Skroch, V. Geffroy (1998), Towards an integrated linkage map of common bean. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. Theoretical and Applied Genetics 97: 847–856
37. W. Fricke, G. Akhiyarova, D. Veselov, G. Kudoyarova (200), Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate response to salinity in barley leaves, J. Exp. Bot. 55:1115–23
38. W. Fricke, W.S. Peters (2002), The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level, Plant Physiol. 129:374–88
39. P. Gepts (2001), Phaseolus vulgaris (beans), In: Brenner S and Miller JH (eds.) Encyclopedia of Genetics, 1st edn., pp. 1444–1445. New York: Academic Press
40. Gilbert, G.A., Gadush, M.V., Wilson, C. and Madore, M.A. (1998), Amino acid accumulation in sink and source tissues of Coleus blumei Benth. during salinity stress, J. Exp. Bot. 49, 107–114
41. H. Greenway, R. Munns (1980), Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes, Annu. Rev. Plant Physiol. 31:149–90
42. V. Gruber, S. Blanchet, A. Diet. et al. (2009), Identification of transcription factors involved in root apex responses to salt stress in Medicago truncatula, Mol. Genet. Genomics 281: 55–66
43. M. Guo, W. Song, J. Buhain (2014), Bioenergyand biofuels: Histroy, status, and perspective, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 42, 712-725
44. K. Gupta, A. Dey, B. Gupta (2013), Plant polyamines in abiotic stress responses, Acta Physiologiae Plantarum, vol. 35, no. 7, pp. 2015–2036
45. B. Gupta, B. Huang (2014), Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization, International Journal of Genomics, Volume 2014
46. R. Haro, M.A. Banuelos, M.A.E. Senn, J. Barrero-Gil, A. Rodriguez-Navarro (2005), HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast, Plant Physiol. 139:1495–506
47. P. M. Hasegawa, R. A. Bressan, J.-K. Zhu, H. J. Bohnert (2000), Plant cellular andmolecular responses to high salinity, Annual Review of Plant Biology, vol. 51, pp. 463–499
48. B.M. Hoffman, D. Lukoyanov, D.R. Dean, L.C. Seefeldt (2013), Nitrogenase: a draft mechanism, Acc. Chem. Res. 46 587–595
49. J. C. Huntley, Robinia pseudoacacia L. Black Locust Leguminosae
50. E.K. James (2017), Nitrogen Fixation, Encyclopedia of Applied Plant Sciences, 2nd edition, Volume 1
51. R.A. James, A.R. Rivelli, R. Munns, S. von Caemmerer (2002), Factors affecting CO2 assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat, Funct. Plant Biol. 29:1393–403
52. S. Jansson, C.J. Douglas (2007), *Populus*: A Model System for Plant Biology, Annu. Rev. Plant Biol. 58:435-458
53. J. M. H. Stoop, J. D. Williamson, D. M. Pharr (1996), Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress, Trends in plant science reviews
54. R. R. Johnson, R. L. Wagner, S. D. Verhey, M.K. Walker- Simmons (2002), The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences, Plant Physiology, vol. 130, no. 2, pp. 837–846
55. B. Joseph, D. Jini (2010), Proteomic analysis of salinity salt-responsive proteins in plants, Asian Journal of Plant Sciences
56. S. Kawasaki, C. Borchert, M. Deyholos (2001), Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice, Plant Cell, vol. 13, no. 4, pp. 889–905
57. K. Taïbi, F. Taïbi et al. (2016), Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in Phaseolus vulgaris L., South African Journal of Botany 105
58. D.W. Kim, J. Shibato, G.K. Agrawal, H. Iwahashi, D.H. Kim, I.S. Shim, R. Rakwal (2007), Functional categorization of salt stress-responsive genes of rice leaf using DNA microarray, Research Notes
59. M. Koornneef, C. Alonso-Blanco, A.J. Peeters, J. Soppe (1998), Genetic control of flowering time in Arabidopsis, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:345–70
60. T. Kusano, K. Yamaguchi, T. Berberich, Y. Takahashi (2007), Advances in polyamine research in 2007, Journal of Plant Research, vol. 120, no. 3, pp. 345–350
61. E. Little (1971), Atlas of United States trees, vol. 1, Conifers and important hardwoods, U.S. Department of Agriculture

62. C. Liu, C.M. Ha, R.A. Dixon (2017), Functional Genomics in the Study of Metabolic Pathways in *Medicago truncatula*: An Overview, Methods in Molecular Biology, vol. 1822
63. B.A. Logan (2005), Reactive oxygen species and photosynthesis. In Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, ed. N Smirnoff, pp. 250–67. Oxford: Blackwell
64. M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker (2015), Βιολογία των μικροοργανισμών, Π.Ε.Κ.
65. L.C. Maisenhelder, (1969), Identifying juvenile seedlings in southern hardwood forests, USDA Forest Service, Research Paper SO-47
66. P. Mao et al. (2016), Effects of salt stress on eco-physiological characteristics in Robinia pseudoacacia based on salt-soil rhizosphere, Science of the Total Environment 568, 118–123
67. J. Matysik, A. Alia, B. Bhalu, and P. Mohanty (2002), Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants, Current Science, vol. 82, no. 5, pp. 525–532
68. M. Melchiorre, G.E. Quero, R. Parola et al. (2003), A kruppel-like transcription factor gene involved in salt responses in Medicago spp., Plant Soil 257: 1–9
69. J.Mizoi, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki (2012), AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses, Biochimica et Biophysica Acta—Gene Regulatory Mechanisms, vol. 1819, no. 2, pp. 86–96
70. K. Morreel, G. Goeminne, V. Storme, L. Sterck, J. Ralph (2006) Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in Populus: a case study. *Plant J.* 47:224–37
71. P. N. Moschou, K. A. Paschalidis, K. A. Roubelakis-Angelakis (2008), Plant polyamine catabolism: the state of the art, Plant Signaling and Behavior, vol. 3, no. 12, pp. 1061–1066
72. K. Mukherjee, A. R. Choudhury, B. Gupta (2006), An ABRE binding factor, OSBZ8, is highly expressed in salt tolerant cultivars than in salt sensitive cultivars of indica rice, BMC Plant Biology, vol. 6, article 18, no. 1
73. R. Munns (2002), Comparative physiology of salt and water stress, Plant Cell Environ. 25:239–50
74. R. Munns (2005), Genes and salt tolerance: bringing them together, New Phytol. 167:645–63
75. R. Munns, R.A. James, A. Lauchli (2006), Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals, J. Exp. Bot. 57:1025–43
76. R. Munns, D.P. Schachtman, A.G. Condon (1995), The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley, Aust. J. Plant Physiol. 22:561–69
77. R. Munns, M. Tester (2008), Mechanisms of Salinity Tolerance, Annu. Rev. Plant Biol., 59:651–81
78. K. Nahar, M. Hasanuzzaman, M. Fujita (2016), Roles of Osmolytes in Plant Adaptation to Drought and Salinity, Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies
79. K. Nakashima, L.-S. P. Tran, D. Van Nguyen (2007), Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice, Plant Journal, vol. 51, no. 4, pp. 617–630
80. D.F. Olson (1974), Robinia L., locust. In Seeds of woody plants in the United States, p. 728-731
81. A. K. Parida, A. B. Das, P.Mohanty (2004), Investigations on the antioxidative defence responses to NaCl stress in a mangrove, Bruguiera parviflora: differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes, Plant Growth Regulation, vol. 42, no. 3, pp. 213–226
82. B.B. Patel, B. Bharat, R.S. Dave (2011), Studies on infiltration of saline–alkali soils of several parts of Mehsana and Patan districts of north Gujarat, J. Appl. Technol. Environ. Sanitation, 87–92
83. T.H. Phang, G. Shao, H.M. Lam (2008), Salt tolerance in soybean, J. Integrat. Plant Biol. 50: 1196–1212
84. N. Rascio and N. La Rocca (2008), Biological Nitrogen Fixation, Ecological Processes
85. S. Radutoiu, L.H. Madsen, E.B. Madsen (2003), Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases, Nature 425, 559–585
86. M.S.S. Reddy, F. Chen, G. Shadle, L. Jackson, H. Aljoe, R.A. Dixon (2005), Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.), Prod. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102:16573–16578
87. B.A. Roach (1965), Black locust (Robinia pseudoacacia L.). Silvics of forest trees of the United States. p. 642-648
88. M.C. Rubio, P. Bustos-Sanmamed, M.R. Clemente, M. Becana (2009), Effects of salt stress on the expression of antioxidant genes and proteins in the model legume Lotus japonicus, New Phytol. 181: 851–859
89. D.H. Sanchez, F. Lippold, H. Redestig, M.A. Hannah, A. Erban, U. Kamer, J. Kopka, M.K. Udvardi (2008), Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume Lotus japonicus, Plant J. 53: 973–987
90. Sanchez, D. H., Pieckenstain, F. L., Szymanski, J., Erban, A., Bromke,M., Hannah,
91. Sanchez et al. (2011), Comparative Functional Genomics of Salt Stress in related model and cultivated plants identifies and overcomes limitations to translational genomics, PLoS ONE 6: e17094
92. J.O. Sawyer, A.A. Lindsey (1964), The Holdridge bioclimatic formations of eastern and central United States, Proceedings Indiana Academy of Science 72:105-112

93. R. Schmidt, D. Mieulet, H.-M. Hubberten (2013), SALTRESPONSIVE ERF1 regulates reactive oxygen speciesdependent signaling during the initial response to salt stress in rice The Plant Cell, vol. 25, no. 6, pp. 2115–2131
94. H.Z. Shi, F.J. Quintero, J.M. Pardo, J.K Zhu (2002), The putative plasma membrane Na+/ antiporter SOS1 controls long-distance Na+ transport in plants, Plant Cell 14:465–77
95. D. Skliros. C. Kalloniati, G. Karalias, G. Skaracis, H. Rennenberg, E. Flemetakis (2018), Global metabolomics analysis reveals distinctive tolerance mechanisms in different plant organs of lentil (Lens culinaris) upon salinity stress, Plant Soil 429:451–468
96. J. Stougaard (2017), Lotus japonicus: A Model Plant for the Legume Family, Reference Module in Life Sciences
97. D. Szymanski (2013), Arabidopsis thaliana: The Premier Model Plant, Brenner's Encyclopedia of Genetics, 2nd Edition, Volume 1
98. M. Tadege, J. Wen, J. He, H. Tu, Y. Kwak, A. Eschstruth, A. Cayrel, G. Endre, P.X. Zhao, M. Chabaud, P. Ratet, K.S. Mysore (2008), Large-scale insertional mutagenesis using the *Tnt1* retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*, Plant J. 54:335–347
99. K. Taïbi, F. Taïbi, L. Ait Abderrahima, A. Ennajahb, M. Belkhodja, J. M. Mulet (2016), Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in Phaseolus vulgaris L., South African Journal of Botany 105, 306–312
100. T. Takahashi, J.-I. Kakehi (2010), Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses, Annals of Botany, vol. 105, no. 1, pp. 1–6
101. J. Tassin, H. Rangan, C. Kull (2012), Hybrid improved tree fallows: Harnessing invasive woody legumes for agroforestry. Agroforestry Systems, 84, 417-428
102. M. Tester, R.J. Davenport (2003), Na+ transport and Na+ tolerance in higher plants, Ann. Bot. 91:503–27
103. A. Tisi, R. Angelini, A. Cona (2008), Wound healing in plants: cooperation of copper amine oxidase and flavin-containing polyamine oxidase, Plant Signaling and Behavior, vol. 3, no. 3, pp. 204–206
104. F.E. Tracy, M. Gilliham, A.N. Dodd, A.A.R. Webb, M. Tester (2008), Cytosolic free Ca2+ in Arabidopsis thaliana are heterogeneous and modified by external ionic composition, Plant Cell Environl.
105. H. Unno and Y. Maeda (2008), Effect of exogenous application of sugars on the salt tolerance of perennial ryegrass protoplasts, Biologia 63/2: 204—206
106. D.F. Urbanski, A. Małolepszy, J. Stougaard, S.U. Andersen (2012), Genome-wide LORE1 retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in Lotus japonicus, Plant Journal 69, 731–741
107. U.S. Department of Commerce, Environmental Science Services Administrations (1968), Climatic atlas of the United States. Washington, DC. 80 p.
108. N.C. Veitch, P.C. Elliott, G.C. Kite, G.P. Lewis (2010), Flavonoid glycolsides of the black locust tree, Robinia pseudoacacia (Leguminosae), Phytochemistry, 71, 479–486
109. Z. Wang et al. (2013), Physiological and Proteomic Responses of Diploid and Tetraploid Black Locust (Robinia pseudoacacia L.) subjected to Salt Stress, Int. J. Mol. Sci., 14, 20299-20325
110. Zahaf, O., Blanchet, S., de Z´elicourt, A., Alunni, B., Plet et al. (2012), Comparative transcriptomic analysis of salt adaptation in roots of contrasting *Medicago truncatula* genotypes. *Mol. Plant* 5: 1068–1081
111. R. Zhou, L. Jackson, G. Shadle, J. Nakashima, S.Temple, F. Chen, R.A. Dixon (2010), Distinct cinnamoyl CoA reductases involved in parallel routes to lignin in *Medicago truncatula*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:17803–17808

Παράρτημα

Παρακάτω παρατίθενται οι κατηγοριοποιημένοι πίνακες με τα ονόματα των μεταβολιτών, τα στοιχεία ταυτοποίησης όπως τους χρόνους κατακράτησης και τη μοριακή μάζα καθώς και τη στατιστική ανάλυση που έγινε με τη μέθοδο One-way Anova και το πρόγραμμα SPSS για κάθε ιστό και οικότυπο 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 επισήμανση στην στήλη *P.*

Πίνακες μεταβολιτών: Παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις μέσες τιμές των μεταβολιτών. Πίνακας 1: Μεταβολίτες φύλλων DB, Πίνακας 2: Μεταβολίτες φύλλων SD, Πίνακας 3: Μεταβολίτες ρίζες DB, Πίνακας 4: Μεταβολίτες ρίζες SD. MZ= metal ion m/z, P= P Anova

Πίνακας 1: Μεταβολίτες φύλλων DB σε άμεσες εφαρμογές

Ετικέτες γραμμής	RT	mz	P	Control	SE	DB L 50 AVG	SE	DB L 100 AVG	SE	DB L 150 AVG	SE
Aminoacids											
[12647] L-homoserine 1 [11.141]	14.01305	146	**0,013**	0.0299	0.0044	0.0560	0.0414	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[12647] L-homoserine 2 [12.359]	16.4965	218	**0,015**	0.7485	0.0686	2.1550	0.7124	0.5724	0.0678	0.5308	0.1100
[145742] L-proline 1 [8.567]	9.1742	70	**0,000**	0.1175	0.0296	0.1528	0.0803	0.1273	0.0587	0.0522	0.0131
[145742] L-proline 2 [10.321]	12.4549	142	0,077	0.9776	0.2476	1.7586	0.6748	1.7087	0.4955	0.7966	0.3423
[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	20.5182	246	**0,001**	1.4878	0.6939	3.7420	0.8328	2.2646	0.7416	0.4510	0.1561
[33032] L-glutamic acid 3 (dehydrated) [13.232]	18.0799	156	**0,006**	0.7230	0.1214	1.6431	0.5332	0.7904	0.2409	0.9268	0.2758
[189] acetyl-L-serine 2 [11.574]	15.0537	174	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[738] L-glutamine 1 [13.431]	16.9713	155	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0996	0.0436	0.0000	0.0000	0.1019	0.0333
[738] L-glutamine 2 [14.083]	19.8576	344	0,616	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.2865	1.2698	0.0000	0.0000
[738] L-glutamine 3 [16.092]	23.8582	156	**0,002**	3.2199	1.1026	4.1554	1.6128	2.1741	0.9147	2.1300	0.7250
[750] glycine [10.456]	12.7233	174	**0,006**	0.4837	0.1472	0.7276	0.3286	0.1805	0.0524	0.2333	0.0509
[236] L-asparagine 1 [14.496]	20.8705	188	**0,000**	7.0217	1.5539	3.8502	0.8080	0.7083	0.2583	0.2938	0.0950
[236] L-asparagine 2 [14.984]	21.7108	231	**0,000**	46.7163	8.4907	21.0914	4.5600	5.6051	2.8555	0.6108	0.1926
[239] Beta- alanine 1 [12.044]	15.7885	248	**0,000**	0.4860	0.0853	0.8394	0.2950	0.5822	0.2209	0.3418	0.1284
[594] L-cysteine 2 [13.582]	18.9919	220	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5950] L-alanine 1 [7.495]	7.5434	116	**0,000**	0.7546	0.1463	1.4467	0.4783	0.6474	0.2628	0.8848	0.3542
[5950] L-alanine 2 [11.182]	14.0574	147	**0,008**	0.0176	0.0079	0.0072	0.0033	0.0102	0.0050	0.0000	0.0000
[5951] L-serine 1 [9.706]	11.4524	132	**0,000**	2.8318	0.6059	3.2952	1.6817	1.6448	0.7223	1.7663	0.1921
[5951] L-serine 2 [11.174]	14.2882	204	**0,004**	10.7393	3.1360	11.4676	3.5294	3.7284	0.8232	4.1522	1.0305
[5960] aspartic acid 1 [12.002]	15.6622	160	**0,000**	0.2083	0.0601	0.0493	0.0189	0.0112	0.0037	0.0000	0.0000
[5960] aspartic acid 2 [13.207]	18.2366	232	**0,000**	2.3506	0.3988	0.8675	0.2303	0.1414	0.0719	0.0000	0.0000
[5962] L-lysine 2 [17.643]	26.85745	317	0,400	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	5.4042	5.2778	0.2898	0.2068
[439742] beta-cyano-L-alanine [11.288]	14.4481	141	**0,005**	0.1784	0.0337	0.1489	0.0441	0.0404	0.0176	0.0252	0.0112
[6057] L-tyrosine 2 [17.856]	27.1728	218	**0,000**	0.1336	0.0245	0.0000	0.0000	0.3122	0.1430	0.2040	0.0826
[6057] tyrosine 2 [17.871]	27.17255	218	**0,019**	0.0000	0.0000	0.1458	0.0744	0.1361	0.0563	0.0000	0.0000
[6106] L-leucine 1 [8.298]	8.751	86	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0483	0.0175	0.0000	0.0000
[6106] L-leucine 2 [9.945]	11.8827	158	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6137] L-methionine 2 [13.188]	18.0373	176	**0,003**	0.1388	0.0360	0.5581	0.2567	0.1544	0.0647	0.1131	0.0228
[614] L-proline 1 [8.58]	9.1768	70		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[614] L-proline 2 [10.341]	12.4573	142		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6274] L-histidine 3 [17.658]	26.83425	154	**0,002**	0.0000	0.0000	0.8142	0.3811	0.3124	0.1448	0.0921	0.0320
[6287] L-valine 1 [7.296]	7.06905	72		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6287] L-valine 2 [9.151]	10.3975	144	**0,000**	0.1611	0.0438	0.3464	0.1051	0.5009	0.1954	0.2459	0.0997
[6288] L-threonine 1 [10.224]	12.43175	147	**0,000**	0.1037	0.0247	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6288] L-threonine 2 [11.464]	14.9655	218	**0,000**	0.4111	0.0872	0.6373	0.2444	0.7428	0.2619	0.3522	0.1752
[6305] L-tryptophan 2 [20.466]	32.2614	202	**0,023**	0.7208	0.2241	1.5280	0.6302	0.2951	0.1043	0.2402	0.0641
[791] DL-isoleucine 1 [8.576]	9.27	86	**0,000**	0.0516	0.0170	0.1142	0.0822	0.2817	0.2611	0.2078	0.1068
[791] DL-isoleucine 2 [10.225]	12.4461	158	**0,000**	0.0000	0.0000	0.1513	0.0499	0.7781	0.0612	0.2643	0.1189
[994] Phenylalanine 1 [13.545]	18.4794	120	**0,000**	0.0071	0.0010	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Organic acids											
[1060] pyruvic acid [6.714]	6.3535	174	**0,000**	0.0136	0.0023	0.0143	0.0061	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[16219560] lactobionic acid 1 [24.583]	82.7787	434	**0,003**	0.8466	0.1184	0.6978	0.2914	0.2936	0.0172	0.3064	0.0830
[36] 2-isopropylmalic acid [13.836]	19.533	147	**0,001**	0.2551	0.0424	0.1509	0.0487	0.0608	0.0211	0.0000	0.0000
[439194] glyceric acid [10.735]	13.5226	189	**0,000**	0.3666	0.0280	0.3736	0.1115	0.2594	0.1010	0.0876	0.0246
[439227] pipecolic acid 1 [9.868]	11.47635	84		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439227] pipecolic acid 2 [11.22]	14.1376	156	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0052	0.0017	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[3037582] mucic acid [18.907]	29.0092	33	**0,000**	11.8812	3.0820	9.7150	2.7952	1.9137	0.4245	1.3451	0.2395
[311] citric acid [16.615]	25.0219	347	**0,000**	15.8985	5.5857	1.9983	0.4352	0.1039	0.0250	0.0688	0.0153
[487] methylmalonic acid [9.088]	10.1019	147	**0,000**	1.9698	0.4833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0200	0.0112
[500] 4-guanidinobutyric acid 2 [13.348]	18.3212	174	**0,000**	11.8272	2.3766	4.5225	1.6801	9.1436	4.2933	3.4927	0.4764
[439766] citramalic acid [12.63]	17.0414	147	**0,019**	0.0000	0.0000	0.0206	0.0147	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444266] maleic acid [10.323]	12.6709	147	**0,000**	0.0043	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444305] tartaric acid [14.588]	20.3092	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444972] fumaric acid [10.94]	13.7177	245	**0,001**	0.0299	0.0044	0.0155	0.0070	0.0071	0.0007	0.0072	0.0025
[445858] ferulic acid [19.312]	29.8702	338	**0,002**	0.0329	0.0041	0.0317	0.0100	0.0100	0.0017	0.0000	0.0000
[867] malonic acid 1 [8.919]	10.0914	147	**0,028**	2.4834	1.4104	0.6807	0.0897	0.0767	0.0323	0.0185	0.0056
[867] malonic acid 2 [11.938]	15.9564	305	**0,000**	0.0683	0.0099	0.0446	0.0233	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[8742] shikimic acid [16.433]	24.812	204	**0,002**	1.1227	0.2081	0.3639	0.1485	0.2903	0.1833	0.0000	0.0000
[604] gluconic acid 2 [18.297]	28.711	333	0,093	0.1815	0.0576	0.1534	0.0212	0.0980	0.0249	0.0404	0.0141
[637542] 4-hydroxycinnamic acid [17.854]	26.9663	293	**0,016**	0.2336	0.0318	0.3900	0.1562	0.0651	0.0145	0.0913	0.0239
[71] gluconic acid 1 [17.693]	26.4085	333	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[92824] D-malic acid [12.794]	17.5005	147	**0,000**	2.7320	0.4360	0.7692	0.2310	0.2052	0.0591	0.0000	0.0000
Sugars and polyols											
[18950] D-mannose 1 [17.287]	26.67145	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[18950] D-mannose 2 [17.435]	27.1303	205	**0,000**	3.0199	0.4552	0.8554	0.2624	0.4439	0.1545	0.3218	0.0505
[10712] cellobiose 1 [24.444]	41.0738	361	**0,000**	0.0000	0.0000	0.1388	0.0499	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[10712] cellobiose 2 [24.7]	37.5639	204	**0,019**	0.1667	0.0263	0.1443	0.0483	0.0909	0.0296	0.0000	0.0000
[24749] D-glucose 1 [17.426]	26.6715	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[24749] D-glucose 2 [17.625]	27.1281	205	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5984] fructose 1 [17.18]	26.2963	307	**0,000**	32.1453	2.4493	8.1962	2.0323	4.5735	1.6897	1.7647	0.4054
[5988] Sucrose [23.988]	39.5979	361	**0,000**	41.6339	6.1289	81.3405	27.6529	27.9509	5.2314	38.6143	8.6013
[165577] leucrose [24.975]	41.0883	361	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0323	0.0184	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 1 [17.011]	26.2963	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 2 [17.212]	26.5108	217	**0,037**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[448388] D-allose 1 [17.278]	26.653	319	**0,000**	0.6088	0.1024	0.7645	0.2293	0.6614	0.0892	0.4904	0.0410
[448388] D-allose 2 [17.521]	31.3523	319	**0,001**	0.0529	0.0116	0.0907	0.0243	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[441032] D (+)altrose 2 [17.46]	31.3528	205	**0,000**	0.2229	0.0973	0.0000	0.0000	0.0306	0.0125	0.0000	0.0000
[439240] D-lyxose 1 [14.762]	22.1335	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439240] D-lyxose 2 [14.889]	22.17505	307	**0,000**	1.1935	0.1499	2.2589	0.7186	0.7649	0.1874	0.0000	0.0000
[439242] Raffinose [29.282]	49.5901	87	**0,000**	0.0641	0.0148	0.1453	0.0516	0.0721	0.0238	0.1688	0.0803
[6255] maltose 2 [24.915]	40.6357	361	**0,000**	0.0357	0.0073	0.0310	0.0077	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6255] maltose 1 [24.702]	41.0916	361	**0,000**	0.2124	0.0589	0.1650	0.0497	0.1042	0.0312	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 1 [14.741]	22.1302	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 2 [14.869]	22.1745	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[656894] isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside [19.097]	35.7341	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[993] ribose [15.113]	21.48565	217	0,797	0.0388	0.0276	0.0140	0.0070	0.0051	0.0010	0.0000	0.0000
[94214] methyl-beta-D-galactopyranoside [16.935]	35.4479	204	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2371	0.0911	0.4146	0.0634
[92817] melezitose [29.884]	50.5921	361	**0,000**	0.0090	0.0014	0.0000	0.0000	0.0080	0.0028	0.0000	0.0000
[751] DL-glyceraldehyde 2 [9.186]	10.5996	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[16217663] maltitol [25.37]	41.5329	361	**0,000**	0.0526	0.0058	0.0380	0.0106	0.0322	0.0081	0.0164	0.0047
[169019] D-threitol [12.954]	18.05245	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439451] galactinol 2 [26.479]	44.4352	204	**0,000**	0.0271	0.0063	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6251] D-mannitol [17.81]	26.8009	319	**0,000**	36.4372	8.0173	7.1237	2.2491	2.0568	0.3361	2.4498	0.2694
[892] allo-inositol [17.245]	30.3384	318	**0,000**	31.5591	3.1391	38.6371	20.8188	32.5277	7.8897	14.0553	1.3365
[6508] quinic acid [17.076]	25.9933	345	0,273	18.6247	6.9828	7.4547	3.4391	9.1009	4.7020	1.2210	0.3228
[91528] DL-3,4-dihydroxyphenyl glycol [17.208]	34.2286	355	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[94154] arabitol [15.601]	22.53875	217	**0,005**	0.2800	0.0298	0.5259	0.1417	0.1945	0.0225	0.1346	0.0482
N-containing compounds											
[1000] 2-amino-1-phenylethanol [15.668]	11.6853	174	**0,011**	1.5578	0.2853	2.7805	1.1428	1.4434	0.6655	1.4419	0.2165
[1001] phenylethylamine [13.766]	18.9369	174	0,066	0.2864	0.0894	0.8999	0.3307	0.1672	0.0663	0.0502	0.0112
[1045] putrescine [15.709]	22.95575	174	**0,000**	0.1176	0.0272	0.6632	0.2099	0.2289	0.0613	0.6736	0.2400
[1102] spermidine 2 [20.811]	32.90305	174	**0,000**	0.0000	0.0000	0.2390	0.0611	0.1196	0.0400	0.3205	0.1410
[1176] urea [9.599]	11.4714	147	**0,048**	0.2320	0.0789	0.1875	0.0713	0.0375	0.0057	0.1532	0.0447
[190] adenine 1 [17.066]	25.58105	264	**0,001**	0.4061	0.0612	0.4311	0.1551	0.1780	0.0537	0.1263	0.0212
[204] allantoin 1 [17.293]	26.31605	331	**0,000**	0.0000	0.0000	0.3129	0.1034	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 1 [8.945]	8.75765	86	**0,000**	0.0258	0.0046	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 2 [10.607]	11.87685	158	**0,005**	0.0000	0.0000	0.1477	0.1051	0.2899	0.1480	0.0000	0.0000
[156807] D-lyxosylamine 2 [14.861]	22.17415	217	0,677	1.2665	0.1298	1.6261	0.7824	25.7559	25.4953	0.8082	0.1076
[6613] pantothenic acid 2 [18.371]	28.2791	291	**0,000**	0.0509	0.0099	0.1381	0.0437	0.0776	0.0200	0.0000	0.0000
[66868] porphine 1 [10.77]	13.38845	285	**0,008**	0.0084	0.0033	0.0133	0.0048	0.0058	0.0019	0.0285	0.0138
[8871] 2-hydroxypyridine [6.519]	5.98115	152	**0,000**	0.1084	0.0191	0.0529	0.0175	0.0000	0.0000	0.0686	0.0276
[938] nicotinic acid [10.27]	12.24305	180	**0,038**	0.0911	0.0151	0.1149	0.0437	0.0486	0.0090	0.0439	0.0253
[967] orotic acid [15.794]	23.3281	254	**0,000**	0.0069	0.0013	0.0101	0.0040	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[275] L-canavanine 1 [9.22]	10.5739	73	**0,023**	0.0589	0.0251	0.1379	0.0480	0.0298	0.0099	0.0391	0.0152
[275] L-canavanine 2 [18.325]	28.247	220	**0,041**	0.0762	0.0171	0.1521	0.0719	0.0623	0.0032	0.0000	0.0000
[440473] L-mimosine 1 [8.863]	9.8099	188	**0,000**	0.0086	0.0020	0.0122	0.0044	0.0081	0.0024	0.0000	0.0000
[6262] L-ornithine 1 [14.349]	20.378	142	**0,002**	0.0000	0.0000	2.1536	0.8931	1.0686	0.5498	0.0000	0.0000
[6262] L-ornithine 2 [16.632]	24.79375	174	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[65098] norvaline 1 [7.582]	7.1114	72	**0,000**	0.0151	0.0029	0.0308	0.0151	0.0364	0.0228	0.0595	0.0270
[65098] norvaline 2 [9.468]	10.39295	144		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[9750] citrulline 2 [16.691]	24.9166	157	0,468	0.2233	0.0677	0.3749	0.1679	1.5058	1.0977	0.2061	0.0905
P-containing compounds											
[1004] phosphoric acid [9.966]	11.972	299	**0,000**	43.2653	7.0354	65.6488	21.0357	37.7514	8.0493	31.0069	5.0409
[1015] O-phosphocolamine [16.232]	24.1432	299	**0,000**	0.0252	0.0034	0.0882	0.0388	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439958] D-glucose-6-phosphate 1 [21.394]	34.5711	387	**0,000**	1.7890	0.3851	1.0280	0.3867	0.2348	0.0541	0.0409	0.0224
[439958] D-glucose-6-phosphate 2 [21.558]	34.8419	387	**0,000**	0.1285	0.0176	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[754] glycerol 1-phosphate [16.056]	32.3257	357	**0,005**	0.7124	0.1683	0.8451	0.2850	0.3971	0.0698	0.2065	0.0651
Others											
[835] dehydroascorbic acid 2 [17.139]	25.5254	173	**0,007**	0.4427	0.1101	1.4646	0.3958	0.5134	0.1439	0.4981	0.1076
[835] dehydroascorbic acid 4 [17.739]	27.35575	244		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[9064] catechin [25.643]	42.6224	368	0,339	0.0762	0.0201	0.0998	0.0564	0.0258	0.0123	0.0000	0.0000

Πίνακας 2: Μεταβολίτες φύλλων DB σε σταδιακές εφαρμογές

Ετικέτες γραμμής	RT	mz	P	Control	SE	DB L 100Acc AVG	SE	DB L 150Acc AVG	SE	DB L 200Acc AVG	SE
Aminoacids											
[12647] L-homoserine 1 [11.141]	14.01305	146	**0,013**	0.0299	0.0044	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[12647] L-homoserine 2 [12.359]	16.4965	218	**0,015**	0.7485	0.0686	0.5044	0.1093	1.7090	0.2339	1.5268	0.5803
[145742] L-proline 1 [8.567]	9.1742	70	**0,000**	0.1175	0.0296	0.1418	0.0569	2.0283	0.2137	0.4825	0.1337
[145742] L-proline 2 [10.321]	12.4549	142	0,077	0.9776	0.2476	1.6528	0.6192	3.9836	0.6482	2.4089	1.4505
[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	20.5182	246	**0,001**	1.4878	0.6939	0.6042	0.1877	0.0000	0.0000	2.4333	0.2804
[33032] L-glutamic acid 3 (dehydrated) [13.232]	18.0799	156	**0,006**	0.7230	0.1214	1.1609	0.2824	3.4259	0.7457	2.3048	0.8531
[189] acetyl-L-serine 2 [11.574]	15.0537	174	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2019	0.0733	0.0000	0.0000
[738] L-glutamine 1 [13.431]	16.9713	155	**0,002**	0.0000	0.0000	0.1789	0.1145	0.3186	0.0547	0.2288	0.0696
[738] L-glutamine 2 [14.083]	19.8576	344	0,616	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1234	0.0409
[738] L-glutamine 3 [16.092]	23.8582	156	**0,002**	3.2199	1.1026	2.8474	0.8426	11.9077	1.6803	8.5916	3.2756
[750] glycine [10.456]	12.7233	174	**0,006**	0.4837	0.1472	0.1472	0.0306	0.7881	0.1029	0.2777	0.0672
[236] L-asparagine 1 [14.496]	20.8705	188	**0,000**	7.0217	1.5539	1.7712	0.5775	0.7567	0.2059	0.8759	0.3207
[236] L-asparagine 2 [14.984]	21.7108	231	**0,000**	46.7163	8.4907	3.5159	1.2542	3.7897	0.8404	10.8169	5.8623
[239] Beta- alanine 1 [12.044]	15.7885	248	**0,000**	0.4860	0.0853	0.3146	0.1566	2.6225	0.7142	2.0047	0.3827
[594] L-cysteine 2 [13.582]	18.9919	220	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2217	0.0687
[5950] L-alanine 1 [7.495]	7.5434	116	**0,000**	0.7546	0.1463	0.8539	0.4656	11.6740	2.6936	1.6021	0.3846
[5950] L-alanine 2 [11.182]	14.0574	147	**0,008**	0.0176	0.0079	0.0714	0.0338	0.0496	0.0094	0.0547	0.0154
[5951] L-serine 1 [9.706]	11.4524	132	**0,000**	2.8318	0.6059	3.9577	1.3562	10.9039	1.3016	2.7288	0.7907
[5951] L-serine 2 [11.174]	14.2882	204	**0,004**	10.7393	3.1360	5.5911	2.0911	20.4592	3.9832	10.3350	2.7900
[5960] aspartic acid 1 [12.002]	15.6622	160	**0,000**	0.2083	0.0601	0.0202	0.0145	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5960] aspartic acid 2 [13.207]	18.2366	232	**0,000**	2.3506	0.3988	0.1880	0.0635	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5962] L-lysine 2 [17.643]	26.85745	317	0,400	0.0000	0.0000	0.3497	0.2902	3.1532	0.4795	0.6872	0.1821
[439742] beta-cyano-L-alanine [11.288]	14.4481	141	**0,005**	0.1784	0.0337	0.0363	0.0191	0.0409	0.0102	0.1068	0.0467
[6057] L-tyrosine 2 [17.856]	27.1728	218	**0,000**	0.1336	0.0245	0.1020	0.0245	2.2149	0.3769	0.4899	0.1211
[6057] tyrosine 2 [17.871]	27.17255	218	**0,019**	0.0000	0.0000	0.0814	0.0242	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6106] L-leucine 1 [8.298]	8.751	86	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.6374	0.3478	0.2637	0.0583
[6106] L-leucine 2 [9.945]	11.8827	158	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.6831	0.3237	0.4981	0.1919
[6137] L-methionine 2 [13.188]	18.0373	176	**0,003**	0.1388	0.0360	0.0999	0.0311	0.8586	0.1663	0.4298	0.1156
[614] L-proline 1 [8.58]	9.1768	70		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[614] L-proline 2 [10.341]	12.4573	142		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6274] L-histidine 3 [17.658]	26.83425	154	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.1263	0.1918	0.6594	0.2020
[6287] L-valine 1 [7.296]	7.06905	72		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6287] L-valine 2 [9.151]	10.3975	144	**0,000**	0.1611	0.0438	0.2897	0.1149	2.7954	0.4865	1.2991	0.5289
[6288] L-threonine 1 [10.224]	12.43175	147	**0,000**	0.1037	0.0247	0.2685	0.1470	1.7074	0.2895	0.0000	0.0000
[6288] L-threonine 2 [11.464]	14.9655	218	**0,000**	0.4111	0.0872	0.2018	0.0644	3.3163	0.6693	1.2163	0.4175
[6305] L-tryptophan 2 [20.466]	32.2614	202	**0,023**	0.7208	0.2241	0.2247	0.0348	1.3005	0.2129	0.3649	0.1153
[791] DL-isoleucine 1 [8.576]	9.27	86	**0,000**	0.0516	0.0170	0.2088	0.1317	1.7883	0.1963	0.2079	0.0408
[791] DL-isoleucine 2 [10.225]	12.4461	158	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.2448	0.1727	0.7802	0.2769
[994] Phenylalanine 1 [13.545]	18.4794	120	**0,000**	0.0071	0.0010	0.0000	0.0000	0.2037	0.0149	0.0215	0.0086
Organic acids											
[1060] pyruvic acid [6.714]	6.3535	174	**0,000**	0.0136	0.0023	0.0085	0.0020	0.0377	0.0070	0.0000	0.0000
[16219560] lactobionic acid 1 [24.583]	82.7787	434	**0,003**	0.8466	0.1184	0.1967	0.0577	1.5426	0.4530	0.3469	0.1318
[36] 2-isopropylmalic acid [13.836]	19.533	147	**0,001**	0.2551	0.0424	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3103	0.1285
[439194] glyceric acid [10.735]	13.5226	189	**0,000**	0.3666	0.0280	0.0693	0.0183	0.6170	0.1246	0.2178	0.0629
[439227] pipecolic acid 1 [9.868]	11.47635	84		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439227] pipecolic acid 2 [11.22]	14.1376	156	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[3037582] mucic acid [18.907]	29.0092	33	**0,000**	11.8812	3.0820	2.1007	0.4550	4.8102	0.2410	2.6516	0.7342
[311] citric acid [16.615]	25.0219	347	**0,000**	15.8985	5.5857	0.4312	0.1621	0.5134	0.2151	0.2184	0.0745
[487] methylmalonic acid [9.088]	10.1019	147	**0,000**	1.9698	0.4833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[500] 4-guanidinobutyric acid 2 [13.348]	18.3212	174	**0,000**	11.8272	2.3766	3.4854	0.8410	72.3299	19.8280	27.1863	9.1084
[439766] citramalic acid [12.63]	17.0414	147	**0,019**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444266] maleic acid [10.323]	12.6709	147	**0,000**	0.0043	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444305] tartaric acid [14.588]	20.3092	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.6629	0.1373	0.0000	0.0000
[444972] fumaric acid [10.94]	13.7177	245	**0,001**	0.0299	0.0044	0.0137	0.0060	0.0000	0.0000	0.0114	0.0031
[445858] ferulic acid [19.312]	29.8702	338	**0,002**	0.0329	0.0041	0.0083	0.0032	0.0424	0.0086	0.0181	0.0044
[867] malonic acid 1 [8.919]	10.0914	147	**0,028**	2.4834	1.4104	0.1001	0.0222	0.1027	0.0347	0.1180	0.0318
[867] malonic acid 2 [11.938]	15.9564	305	**0,000**	0.0683	0.0099	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[8742] shikimic acid [16.433]	24.812	204	**0,002**	1.1227	0.2081	0.1348	0.0140	1.6246	0.7803	0.0000	0.0000
[604] gluconic acid 2 [18.297]	28.711	333	0,093	0.1815	0.0576	0.0644	0.0185	0.1804	0.0661	0.2050	0.0509
[637542] 4-hydroxycinnamic acid [17.854]	26.9663	293	**0,016**	0.2336	0.0318	0.0507	0.0107	0.1442	0.0392	0.1126	0.0406
[71] gluconic acid 1 [17.693]	26.4085	333	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4929	0.0800	0.0000	0.0000
[92824] D-malic acid [12.794]	17.5005	147	**0,000**	2.7320	0.4360	0.1411	0.0465	0.2184	0.0663	0.1806	0.0564
Sugars and polyols											
[18950] D-mannose 1 [17.287]	26.67145	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0014	0.1720	0.0000	0.0000
[18950] D-mannose 2 [17.435]	27.1303	205	**0,000**	3.0199	0.4552	0.6187	0.1707	1.0096	0.1404	0.5056	0.1840
[10712] cellobiose 1 [24.444]	41.0738	361	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0371	0.0111	0.2145	0.0766	0.1486	0.0159
[10712] cellobiose 2 [24.7]	37.5639	204	**0,019**	0.1667	0.0263	0.0000	0.0000	0.3269	0.1970	0.3124	0.0781
[24749] D-glucose 1 [17.426]	26.6715	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.8936	0.1103	0.0000	0.0000
[24749] D-glucose 2 [17.625]	27.1281	205	**0,000**	0.0000	0.0000	0.2385	0.1415	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5984] fructose 1 [17.18]	26.2963	307	**0,000**	32.1453	2.4493	6.4221	1.9538	11.2423	1.9133	2.1226	0.6800
[5988] Sucrose [23.988]	39.5979	361	**0,000**	41.6339	6.1289	55.7316	10.2502	183.9438	29.6296	84.7306	17.2761
[165577] leucrose [24.975]	41.0883	361	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 1 [17.011]	26.2963	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 2 [17.212]	26.5108	217	**0,037**	0.0000	0.0000	1.4194	0.7551	0.0000	0.0000	0.4695	0.2237
[448388] D-allose 1 [17.278]	26.653	319	**0,000**	0.6088	0.1024	0.0697	0.0320	2.4735	0.2797	0.6478	0.2944
[448388] D-allose 2 [17.521]	31.3523	319	**0,001**	0.0529	0.0116	0.0000	0.0000	0.4707	0.1843	0.0000	0.0000
[441032] D (+)altrose 2 [17.46]	31.3528	205	**0,000**	0.2229	0.0973	0.0000	0.0000	0.1620	0.0256	0.0000	0.0000
[439240] D-lyxose 1 [14.762]	22.1335	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439240] D-lyxose 2 [14.889]	22.17505	307	**0,000**	1.1935	0.1499	0.7432	0.1455	4.6021	1.1608	1.0536	0.6619
[439242] Raffinose [29.282]	49.5901	87	**0,000**	0.0641	0.0148	0.1466	0.0756	0.6565	0.0640	0.2474	0.1093
[6255] maltose 2 [24.915]	40.6357	361	**0,000**	0.0357	0.0073	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6255] maltose 1 [24.702]	41.0916	361	**0,000**	0.2124	0.0589	0.0461	0.0111	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 1 [14.741]	22.1302	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 2 [14.869]	22.1745	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[656894] isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside [19.097]	35.7341	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[993] ribose [15.113]	21.48565	217	0,797	0.0388	0.0276	0.0095	0.0010	0.9407	0.9017	0.1030	0.0517
[94214] methyl-beta-D-galactopyranoside [16.935]	35.4479	204	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.1043	0.4401	0.5846	0.1331
[92817] melezitose [29.884]	50.5921	361	**0,000**	0.0090	0.0014	0.0000	0.0000	0.0567	0.0085	0.0188	0.0098
[751] DL-glyceraldehyde 2 [9.186]	10.5996	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0705	0.0214	0.0000	0.0000
[16217663] maltitol [25.37]	41.5329	361	**0,000**	0.0526	0.0058	0.0120	0.0014	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[169019] D-threitol [12.954]	18.05245	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1439	0.0354	0.0000	0.0000
[439451] galactinol 2 [26.479]	44.4352	204	**0,000**	0.0271	0.0063	0.0000	0.0000	0.0968	0.0266	0.0000	0.0000
[6251] D-mannitol [17.81]	26.8009	319	**0,000**	36.4372	8.0173	3.6943	0.9942	7.4335	0.7025	2.4921	1.0729
[892] allo-inositol [17.245]	30.3384	318	**0,000**	31.5591	3.1391	17.6332	5.3841	141.7099	21.1757	30.5922	8.9814
[6508] quinic acid [17.076]	25.9933	345	0,273	18.6247	6.9828	9.1410	4.4587	15.6560	5.9341	10.8109	4.1923
[91528] DL-3,4-dihydroxyphenyl glycol [17.208]	34.2286	355	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0085	0.0021	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[94154] arabitol [15.601]	22.53875	217	**0,005**	0.2800	0.0298	0.1705	0.0441	0.6227	0.1393	0.2643	0.0834
N-containing compounds											
[1000] 2-amino-1-phenylethanol [15.668]	11.6853	174	**0,011**	1.5578	0.2853	0.9141	0.1685	4.2721	0.8298	1.2776	0.4296
[1001] phenylethylamine [13.766]	18.9369	174	0,066	0.2864	0.0894	0.2610	0.0648	0.3855	0.0726	0.8030	0.3768
[1045] putrescine [15.709]	22.95575	174	**0,000**	0.1176	0.0272	0.2677	0.0251	1.7559	0.2043	0.8323	0.2564
[1102] spermidine 2 [20.811]	32.90305	174	**0,000**	0.0000	0.0000	0.2911	0.1073	0.9139	0.0883	0.4378	0.1282
[1176] urea [9.599]	11.4714	147	**0,048**	0.2320	0.0789	0.0621	0.0207	0.2827	0.0370	0.1784	0.0183
[190] adenine 1 [17.066]	25.58105	264	**0,001**	0.4061	0.0612	0.1208	0.0310	0.6499	0.0741	0.2494	0.0847
[204] allantoin 1 [17.293]	26.31605	331	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 1 [8.945]	8.75765	86	**0,000**	0.0258	0.0046	0.1454	0.0751	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 2 [10.607]	11.87685	158	**0,005**	0.0000	0.0000	0.1549	0.0672	0.9575	0.2107	0.8496	0.4512
[156807] D-lyxosylamine 2 [14.861]	22.17415	217	0,677	1.2665	0.1298	0.6517	0.2064	3.6957	0.3596	1.2991	0.5504
[6613] pantothenic acid 2 [18.371]	28.2791	291	**0,000**	0.0509	0.0099	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1388	0.0533
[66868] porphine 1 [10.77]	13.38845	285	**0,008**	0.0084	0.0033	0.0133	0.0046	0.0552	0.0159	0.0231	0.0064
[8871] 2-hydroxypyridine [6.519]	5.98115	152	**0,000**	0.1084	0.0191	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[938] nicotinic acid [10.27]	12.24305	180	**0,038**	0.0911	0.0151	0.0289	0.0069	0.0000	0.0000	0.1023	0.0237
[967] orotic acid [15.794]	23.3281	254	**0,000**	0.0069	0.0013	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0161	0.0042
[275] L-canavanine 1 [9.22]	10.5739	73	**0,023**	0.0589	0.0251	0.0000	0.0000	0.1138	0.0157	0.0686	0.0187
[275] L-canavanine 2 [18.325]	28.247	220	**0,041**	0.0762	0.0171	0.0822	0.0285	0.0000	0.0000	0.1282	0.0461
[440473] L-mimosine 1 [8.863]	9.8099	188	**0,000**	0.0086	0.0020	0.0089	0.0029	0.0431	0.0058	0.0211	0.0030
[6262] L-ornithine 1 [14.349]	20.378	142	**0,002**	0.0000	0.0000	0.6425	0.2583	4.3648	0.9839	4.5547	1.3574
[6262] L-ornithine 2 [16.632]	24.79375	174	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.7030	0.0460	0.7420	0.2202
[65098] norvaline 1 [7.582]	7.1114	72	**0,000**	0.0151	0.0029	0.0191	0.0068	0.6031	0.0646	0.0842	0.0194
[65098] norvaline 2 [9.468]	10.39295	144		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[9750] citrulline 2 [16.691]	24.9166	157	0,468	0.2233	0.0677	0.2174	0.1134	1.5782	0.5756	0.7758	0.2216
P-containing compounds											
[1004] phosphoric acid [9.966]	11.972	299	**0,000**	43.2653	7.0354	67.1266	29.8596	184.2589	24.4082	97.6229	20.2422
[1015] O-phosphocolamine [16.232]	24.1432	299	**0,000**	0.0252	0.0034	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439958] D-glucose-6-phosphate 1 [21.394]	34.5711	387	**0,000**	1.7890	0.3851	0.2312	0.0567	0.2450	0.0622	0.3303	0.1182
[439958] D-glucose-6-phosphate 2 [21.558]	34.8419	387	**0,000**	0.1285	0.0176	0.0000	0.0000	0.1615	0.0420	0.1405	0.0899
[754] glycerol 1-phosphate [16.056]	32.3257	357	**0,005**	0.7124	0.1683	0.2010	0.0725	1.2634	0.2192	0.4474	0.1946
Others											
[835] dehydroascorbic acid 2 [17.139]	25.5254	173	**0,007**	0.4427	0.1101	0.3962	0.0940	1.7436	0.4955	0.7392	0.2199
[835] dehydroascorbic acid 4 [17.739]	27.35575	244		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[9064] catechin [25.643]	42.6224	368	0,339	0.0762	0.0201	0.1541	0.0388	0.1329	0.0922	0.0631	0.0000

Πίνακας 3: Μεταβολίτες φύλλων SD σε άμεσες εφαρμογές

Ετικέτες γραμμής	RT	mz	P	Control	SE	50 L SD AVG	SE	100 L SD AVG	SE	150 L SD AVG	SE
Aminoacids											
[6274] L-histidine 3 [17.658]	26.83425	154	0,386	0.0000	0.0000	0.3269	0.0601	0.3714	0.2959	0.0000	0.0000
[6287] L-valine 1 [7.296]	7.06905	72	**0,000**	0.0218	0.0038	0.0340	0.0212	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6287] L-valine 2 [9.151]	10.3975	144	**0,001**	0.1230	0.0233	0.2641	0.0837	0.3438	0.1001	2.2397	0.8368
[6288] L-threonine 1 [10.224]	12.43175	147	**0,000**	0.1100	0.0434	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5887	0.2899
[6288] L-threonine 2 [11.464]	14.9655	218	**0,011**	0.3598	0.1478	0.3568	0.1254	0.3193	0.0648	1.5249	0.5905
[6305] L-tryptophan 2 [20.466]	32.2614	202	0,268	0.4657	0.1222	0.5095	0.1240	1.1578	0.5814	0.5327	0.1926
[738] L-glutamine 1 [13.431]	16.9713	155	**0,001**	0.0000	0.0000	0.0852	0.0289	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[738] L-glutamine 2 [14.083]	19.8576	344	0,094	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0472	0.0300
[738] L-glutamine 3 [16.092]	23.8582	156	**0,023**	3.0576	0.9821	4.5511	1.4269	10.6211	3.0323	3.2799	1.3913
[750] glycine [10.456]	12.7233	174	0,306	0.1731	0.0392	0.2281	0.0716	0.3426	0.1250	0.3367	0.1024
[791] DL-isoleucine 1 [8.576]	9.27	86	**0,006**	0.0462	0.0118	0.1096	0.0405	0.1004	0.0251	0.6488	0.2431
[791] DL-isoleucine 2 [10.225]	12.4461	158	**0,000**	0.1173	0.0312	0.1240	0.0576	0.0000	0.0000	2.1573	0.4970
[994] Phenylalanine 1 [13.545]	18.4794	120	0,053	0.0068	0.0042	0.0071	0.0040	0.0000	0.0000	0.1443	0.0731
[6057] L-tyrosine 2 [17.856]	27.1728	218	**0,005**	0.1882	0.0458	0.2368	0.0777	0.0000	0.0000	1.3086	0.4830
[6057] tyrosine 2 [17.871]	27.17255	218	**0,004**	0.1468	0.0365	0.1189	0.0276	0.1451	0.0411	1.0304	0.5928
[6106] L-leucine 1 [8.298]	8.751	86	**0,001**	0.0414	0.0159	0.0556	0.0206	0.0000	0.0000	0.8689	0.3964
[6106] L-leucine 2 [9.945]	11.8827	158		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6137] L-methionine 2 [13.188]	18.0373	176	**0,048**	0.2330	0.0561	0.2269	0.0600	0.1825	0.0687	0.2537	0.0769
[614] L-proline 1 [8.58]	9.1768	70		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[614] L-proline 2 [10.341]	12.4573	142	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	20.5182	246	0,239	3.7149	1.5176	3.1088	1.6458	2.1387	1.1399	0.8778	0.5110
[33032] L-glutamic acid 3 (dehydrated) [13.232]	18.0799	156	0,196	1.0873	0.3413	1.9757	0.7156	2.7454	0.9282	1.9622	0.8777
[236] L-asparagine 1 [14.496]	20.8705	188	**0,000**	20.2755	3.0982	4.5679	1.6587	2.9589	1.0215	0.8302	0.2918
[236] L-asparagine 2 [14.984]	21.7108	231	**0,003**	50.1796	15.8293	16.4989	6.8585	16.2906	4.5717	6.8328	2.6104
[239] Beta- alanine 1 [12.044]	15.7885	248	**0,024**	0.2480	0.1124	0.3276	0.1301	0.4398	0.1378	1.0668	0.4115
[12647] L-homoserine 1 [11.141]	14.01305	146	**0,018**	0.0330	0.0084	0.0000	0.0000	0.1246	0.0548	0.0448	0.0205
[12647] L-homoserine 2 [12.359]	16.4965	218	0,125	0.6634	0.2139	1.2552	0.5295	2.3273	0.9616	0.7157	0.1944
[145742] L-proline 1 [8.567]	9.1742	70	0,054	0.0654	0.0239	0.2834	0.1024	0.5863	0.2165	0.1951	0.0431
[145742] L-proline 2 [10.321]	12.4549	142	0,102	0.5141	0.1807	1.2961	0.3649	2.7767	1.0764	1.5878	0.3904
[189] acetyl-L-serine 2 [11.574]	15.0537	174	**0,031**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2861	0.1542
[439742] beta-cyano-L-alanine [11.288]	14.4481	141	**0,009**	0.1114	0.0278	0.1240	0.0448	0.0537	0.0201	0.0459	0.0188
[5950] L-alanine 1 [7.495]	7.5434	116	0,156	0.9675	0.3148	1.3601	0.4776	1.7607	0.5340	2.4479	0.9437
[5950] L-alanine 2 [11.182]	14.0574	147	0,083	0.0018	0.0006	0.0035	0.0017	0.1224	0.0672	0.0567	0.0140
[5951] L-serine 1 [9.706]	11.4524	132	**0,001**	1.9217	0.4794	4.8840	1.9825	10.5025	2.2908	3.4616	1.2846
[5951] L-serine 2 [11.174]	14.2882	204	0,187	12.6938	4.3293	19.0164	2.2818	20.8836	5.9250	7.9157	3.8196
[5960] aspartic acid 1 [12.002]	15.6622	160	**0,000**	0.1044	0.0263	0.0484	0.0230	0.0611	0.0208	0.0000	0.0000
[5960] aspartic acid 2 [13.207]	18.2366	232	**0,007**	2.4881	0.9457	1.0574	0.4300	1.1163	0.4755	0.0000	0.0000
[5962] L-lysine 2 [17.643]	26.85745	317	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.5407	0.5417
Organic acids											
[1060] pyruvic acid [6.714]	6.3535	174	**0,002**	0.0076	0.0021	0.0094	0.0051	0.0269	0.0065	0.0114	0.0037
[938] nicotinic acid [10.27]	12.24305	180	**0,048**	0.0764	0.0170	0.1125	0.0340	0.1837	0.0622	0.1462	0.0448
[16219560] lactobionic acid 1 [24.583]	82.7787	434	**0,002**	0.3030	0.1093	0.6686	0.2305	0.6390	0.1249	1.1365	0.3360
[3037582] mucic acid [18.907]	29.0092	33	**0,002**	3.9129	0.9443	7.5659	2.7885	7.2944	1.9484	1.1716	0.3740
[311] citric acid [16.615]	25.0219	347	**0,004**	7.9740	3.1951	2.0972	0.9033	1.5598	0.6299	0.3739	0.1471
[36] 2-isopropylmalic acid [13.836]	19.533	147	**0,003**	0.2520	0.0747	0.2760	0.1133	0.6933	0.2304	0.0000	0.0000
[439194] glyceric acid [10.735]	13.5226	189	0,323	0.2810	0.0691	0.3711	0.1459	0.3877	0.1198	0.3351	0.1048
[439227] pipecolic acid 1 [9.868]	11.47635	84	**0,000**	0.0087	0.0032	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439227] pipecolic acid 2 [11.22]	14.1376	156	**0,000**	0.0035	0.0012	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439766] citramalic acid [12.63]	17.0414	147	**0,001**	0.0228	0.0061	0.0408	0.0169	0.0392	0.0130	0.0000	0.0000
[444266] maleic acid [10.323]	12.6709	147	**0,001**	0.0034	0.0009	0.0098	0.0043	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444305] tartaric acid [14.588]	20.3092	147	0,051	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444972] fumaric acid [10.94]	13.7177	245	**0,011**	0.0647	0.0204	0.0349	0.0170	0.0236	0.0070	0.0000	0.0000
[445858] ferulic acid [19.312]	29.8702	338	0,098	0.0227	0.0056	0.0185	0.0064	0.0204	0.0059	0.0093	0.0020
[500] 4-guanidinobutyric acid 2 [13.348]	18.3212	174	**0,000**	3.7024	1.1020	5.8390	1.5077	10.2103	3.0958	48.3574	8.8041
[5460673] D-saccharic acid [18.614]	29.5897	333	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1060	0.0673
[604] gluconic acid 2 [18.297]	28.711	333	0,146	0.1991	0.0510	0.2664	0.1027	0.3889	0.1228	0.3462	0.2129
[637542] 4-hydroxycinnamic acid [17.854]	26.9663	293	**0,001**	0.1614	0.0438	0.4517	0.1565	0.2830	0.1023	0.0650	0.0164
[71] gluconic acid 1 [17.693]	26.4085	333	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3058	0.1475
[867] malonic acid 1 [8.919]	10.0914	147	0,358	3.5576	2.8463	1.8890	0.7808	3.8846	2.0862	1.0427	0.4503
[867] malonic acid 2 [11.938]	15.9564	305	**0,013**	0.1482	0.0645	0.0261	0.0121	0.0915	0.0691	0.0000	0.0000
[8742] shikimic acid [16.433]	24.812	204	**0,000**	0.2599	0.0382	0.5474	0.1545	0.3049	0.1107	0.0000	0.0000
[92824] D-malic acid [12.794]	17.5005	147	**0,000**	2.1244	0.5030	0.8586	0.3175	0.3164	0.1247	0.2588	0.1176
Sugars and polyols											
[10712] cellobiose 1 [24.444]	41.0738	361	**0,001**	0.0494	0.0159	0.0441	0.0131	0.0000	0.0000	0.0544	0.0359
[10712] cellobiose 2 [24.7]	37.5639	204	0,154	0.1388	0.0362	0.2073	0.0871	0.2439	0.1080	0.1396	0.0671
[165577] leucrose [24.975]	41.0883	361	**0,001**	0.1456	0.0417	0.2804	0.0906	0.0408	0.0152	0.0000	0.0000
[18950] D-mannose 1 [17.287]	26.67145	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[18950] D-mannose 2 [17.435]	27.1303	205	0,263	2.1396	0.5473	1.8139	0.7968	1.1850	0.4548	1.9474	0.9739
[24749] D-glucose 1 [17.426]	26.6715	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[24749] D-glucose 2 [17.625]	27.1281	205		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 1 [17.011]	26.2963	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 2 [17.212]	26.5108	217	0,083	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2914	0.2573
[439240] D-lyxose 1 [14.762]	22.1335	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439240] D-lyxose 2 [14.889]	22.17505	307	**0,016**	1.0923	0.2325	1.8264	0.7239	1.9596	0.9849	0.0000	0.0000
[439242] Raffinose [29.282]	49.5901	87	0,141	0.1773	0.0632	0.3567	0.1334	0.1531	0.0496	0.1353	0.0850
[441032] D (+)altrose 2 [17.46]	31.3528	205	0,178	0.0916	0.0285	0.1358	0.0588	0.0620	0.0164	0.2922	0.1715
[448388] D-allose 1 [17.278]	26.653	319	0,143	0.8201	0.2043	1.7346	0.6957	2.0260	0.7771	1.5572	0.6392
[448388] D-allose 2 [17.521]	31.3523	319	**0,012**	0.0000	0.0000	0.1085	0.0640	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5984] fructose 1 [17.18]	26.2963	307	**0,004**	32.8634	8.3416	19.2254	6.1962	17.0548	7.5319	3.8615	2.0022
[5988] Sucrose [23.988]	39.5979	361	0,229	45.1265	9.1216	81.9197	28.5384	101.5783	31.8336	92.3139	29.1305
[6255] maltose 2 [24.915]	40.6357	361	**0,005**	0.0000	0.0000	0.0508	0.0326	0.0510	0.0203	0.0000	0.0000
[6255] maltose 1 [24.702]	41.0916	361	**0,008**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2937	0.1186	0.0482	0.0436
[65550] D-lyxose 1 [14.741]	22.1302	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 2 [14.869]	22.1745	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[656894] isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside [19.097]	35.7341	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0597	0.0364	0.0000	0.0000
[92817] melezitose [29.884]	50.5921	361	**0,028**	0.0000	0.0000	0.0153	0.0042	0.0226	0.0154	0.0477	0.0169
[94214] methyl-beta-D-galactopyranoside [16.935]	35.4479	204	**0,042**	0.8057	0.3552	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.8961	0.4805
[993] ribose [15.113]	21.48565	217	0,147	0.0604	0.0238	0.0451	0.0191	0.0000	0.0000	0.0885	0.0516
[16217663] maltitol [25.37]	41.5329	361	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1209	0.0425	0.0253	0.0139
[169019] D-threitol [12.954]	18.05245	217	0,063	0.0492	0.0173	0.0388	0.0177	0.0284	0.0032	0.0884	0.0427
[439451] galactinol 2 [26.479]	44.4352	204	**0,001**	0.0384	0.0127	0.0482	0.0190	0.0833	0.0401	0.0000	0.0000
[6251] D-mannitol [17.81]	26.8009	319	**0,001**	35.4324	9.7787	14.6921	4.3928	9.2340	4.3037	11.5823	6.7621
[6508] quinic acid [17.076]	25.9933	345	**0,000**	22.6088	4.9573	12.0220	3.5650	12.0847	1.8280	5.0227	2.2881
[892] allo-inositol [17.245]	30.3384	318	**0,015**	25.4286	5.0434	74.1798	26.3364	90.9480	32.1456	39.8168	6.9662
[91528] DL-3,4-dihydroxyphenyl glycol [17.208]	34.2286	355	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[94154] arabitol [15.601]	22.53875	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.2000	0.0825	0.8646	0.1965	0.4364	0.1434
N-containing compounds											
[1000] 2-amino-1-phenylethanol [15.668]	11.6853	174	**0,039**	1.1878	0.2934	2.2771	0.6335	3.4772	0.9359	2.0152	0.7158
[1001] phenylethylamine [13.766]	18.9369	174	0,097	0.2323	0.0633	0.3570	0.1036	0.3647	0.1150	0.2678	0.1056
[1045] putrescine [15.709]	22.95575	174	0,099	0.1606	0.0641	0.3673	0.1341	0.6217	0.2644	0.3953	0.1346
[1102] spermidine 2 [20.811]	32.90305	174	0,136	0.0000	0.0000	0.3006	0.2103	0.1466	0.0129	0.3309	0.1128
[1175] uric acid 1 [19.331]	30.48635	441	**0,006**	0.0219	0.0136	0.0000	0.0000	0.0065	0.0022	0.0065	0.0029
[1176] urea [9.599]	11.4714	147	**0,015**	0.1320	0.0469	0.0951	0.0323	0.3930	0.1439	0.3516	0.1724
[156807] D-lyxosylamine 2 [14.861]	22.17415	217	0,065	0.7872	0.3851	1.4555	0.5530	3.6413	1.7566	1.2894	0.5617
[190] adenine 1 [17.066]	25.58105	264	0,169	0.3362	0.0650	0.4936	0.1498	0.4197	0.1505	0.3111	0.1440
[204] allantoin 1 [17.293]	26.31605	331	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.6666	0.4056	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 1 [8.945]	8.75765	86	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0806	0.0302	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 2 [10.607]	11.87685	158	**0,000**	0.0462	0.0105	0.0687	0.0177	0.0522	0.0095	0.5470	0.0278
[5610] tyramine [17.562]	26.50725	174	**0,000**	0.0668	0.0333	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6613] pantothenic acid 2 [18.371]	28.2791	291	**0,001**	0.0555	0.0158	0.1070	0.0377	0.0000	0.0000	0.2353	0.0874
[66868] porphine 1 [10.77]	13.38845	285	**0,001**	0.1032	0.0266	0.0883	0.0336	0.0314	0.0083	0.0148	0.0074
[8871] 2-hydroxypyridine [6.519]	5.98115	152	**0,001**	0.0552	0.0084	0.0308	0.0226	0.0379	0.0257	0.0000	0.0000
[967] orotic acid [15.794]	23.3281	254	**0,004**	0.0053	0.0012	0.0066	0.0030	0.0184	0.0066	0.0000	0.0000
[6262] L-ornithine 1 [14.349]	20.378	142	**0,042**	0.9805	0.2468	1.6641	0.9485	0.0000	0.0000	2.4315	1.1637
[6262] L-ornithine 2 [16.632]	24.79375	174	**0,013**	0.1393	0.0452	0.0000	0.0000	0.5335	0.3229	0.6249	0.2166
[65098] norvaline 1 [7.582]	7.1114	72	**0,010**	0.0259	0.0116	0.0361	0.0168	0.0277	0.0091	0.1933	0.0729
[9750] citrulline 2 [16.691]	24.9166	157	0,283	0.4147	0.0542	0.3688	0.0882	0.6915	0.4536	0.3702	0.1933
[275] L-canavanine 1 [9.22]	10.5739	73	**0,028**	0.0572	0.0160	0.1093	0.0326	0.0431	0.0113	0.0324	0.0123
[275] L-canavanine 2 [18.325]	28.247	220	**0,014**	0.0893	0.0312	0.1452	0.0555	0.4127	0.1350	0.1175	0.0223
[440473] L-mimosine 1 [8.863]	9.8099	188	**0,000**	0.0038	0.0013	0.0116	0.0045	0.0168	0.0047	0.0312	0.0085
P-containing compounds											
[1004] phosphoric acid [9.966]	11.972	299	0,064	38.4263	6.2415	47.8704	16.8259	103.3157	27.2855	47.1435	15.3562
[439958] D-glucose-6-phosphate 1 [21.394]	34.5711	387	**0,003**	1.0179	0.2369	1.6370	0.5968	1.0638	0.3545	0.0000	0.0000
[439958] D-glucose-6-phosphate 2 [21.558]	34.8419	387	**0,000**	0.0829	0.0184	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[754] glycerol 1-phosphate [16.056]	32.3257	357	**0,027**	0.9872	0.2537	0.8653	0.2679	0.6479	0.1346	0.4988	0.1400
Others											
[5785] L-ascorbic acid [17.939]	27.5839	332	0,413	1.2362	0.7765	2.1809	1.9905	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[835] dehydroascorbic acid 2 [17.139]	25.5254	173	0,085	2.0809	1.1198	3.1801	1.2142	1.0423	0.4013	0.3219	0.1228
[835] dehydroascorbic acid 4 [17.739]	27.35575	244	**0,024**	0.0000	0.0000	0.2054	0.0581	0.2215	0.0970	0.0000	0.0000
[9064] catechin [25.643]	42.6224	368		0.1131	0.0347	0.0515	0.0119	0.0359	0.0169	0.0000	0.0000

Πίνακας 3: Μεταβολίτες φύλλων SD σε σταδιακές εφαρμογές

Ετικέτες γραμμής	RT	mz	P	Control	SE	100 acc L SD AVG	SE	150 acc L SD AVG	SE	200 acc L SD AVG	SE
Aminoacids											
[6274] L-histidine 3 [17.658]	26.83425	154	0,386	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3952	0.1010	0.2419	0.0601
[6287] L-valine 1 [7.296]	7.06905	72	**0,000**	0.0218	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6287] L-valine 2 [9.151]	10.3975	144	**0,001**	0.1230	0.0233	0.1511	0.0494	0.7655	0.2913	0.3236	0.0565
[6288] L-threonine 1 [10.224]	12.43175	147	**0,000**	0.1100	0.0434	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2224	0.0614
[6288] L-threonine 2 [11.464]	14.9655	218	**0,011**	0.3598	0.1478	0.1438	0.0412	0.3638	0.0963	0.6286	0.1107
[6305] L-tryptophan 2 [20.466]	32.2614	202	0,268	0.4657	0.1222	0.1929	0.0307	0.1087	0.0294	0.5214	0.1839
[738] L-glutamine 1 [13.431]	16.9713	155	**0,001**	0.0000	0.0000	0.0518	0.0161	0.0749	0.0096	0.0533	0.0075
[738] L-glutamine 2 [14.083]	19.8576	344	0,094	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0368	0.0080	0.2327	0.2167
[738] L-glutamine 3 [16.092]	23.8582	156	**0,023**	3.0576	0.9821	2.7579	0.2455	3.5673	0.6667	3.7990	1.2482
[750] glycine [10.456]	12.7233	174	0,306	0.1731	0.0392	0.1234	0.0313	0.2002	0.0322	0.1925	0.0588
[791] DL-isoleucine 1 [8.576]	9.27	86	**0,006**	0.0462	0.0118	0.0000	0.0000	0.0320	0.0118	0.1484	0.0698
[791] DL-isoleucine 2 [10.225]	12.4461	158	**0,000**	0.1173	0.0312	0.0000	0.0000	0.5949	0.2791	0.2102	0.0615
[994] Phenylalanine 1 [13.545]	18.4794	120	0,053	0.0068	0.0042	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0054	0.0011
[6057] L-tyrosine 2 [17.856]	27.1728	218	**0,005**	0.1882	0.0458	0.0000	0.0000	0.2366	0.0662	0.1705	0.0198
[6057] tyrosine 2 [17.871]	27.17255	218	**0,004**	0.1468	0.0365	0.0428	0.0107	0.1493	0.0639	0.1013	0.0042
[6106] L-leucine 1 [8.298]	8.751	86	**0,001**	0.0414	0.0159	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1649	0.1330
[6106] L-leucine 2 [9.945]	11.8827	158		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6137] L-methionine 2 [13.188]	18.0373	176	**0,048**	0.2330	0.0561	0.0545	0.0068	0.0550	0.0089	0.1365	0.0356
[614] L-proline 1 [8.58]	9.1768	70		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[614] L-proline 2 [10.341]	12.4573	142	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.6675	0.9541	0.0000	0.0000
[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	20.5182	246	0,239	3.7149	1.5176	1.6077	0.1832	1.0238	0.3455	0.7560	0.0430
[33032] L-glutamic acid 3 (dehydrated) [13.232]	18.0799	156	0,196	1.0873	0.3413	0.8536	0.1651	1.1054	0.2957	0.8620	0.1216
[236] L-asparagine 1 [14.496]	20.8705	188	**0,000**	20.2755	3.0982	1.6936	0.3983	3.5115	0.7453	0.8658	0.2601
[236] L-asparagine 2 [14.984]	21.7108	231	**0,003**	50.1796	15.8293	11.2022	3.0386	24.3426	6.2391	5.5920	1.8292
[239] Beta- alanine 1 [12.044]	15.7885	248	**0,024**	0.2480	0.1124	0.2524	0.0464	0.1995	0.0781	0.1925	0.0210
[12647] L-homoserine 1 [11.141]	14.01305	146	**0,018**	0.0330	0.0084	0.0184	0.0048	0.0000	0.0000	0.0547	0.0316
[12647] L-homoserine 2 [12.359]	16.4965	218	0,125	0.6634	0.2139	0.6661	0.0881	0.2977	0.0609	1.1381	0.4305
[145742] L-proline 1 [8.567]	9.1742	70	0,054	0.0654	0.0239	0.1447	0.0528	0.2263	0.0952	0.3155	0.0778
[145742] L-proline 2 [10.321]	12.4549	142	0,102	0.5141	0.1807	3.3957	1.5063	4.0319	1.0368	1.8411	0.4761
[189] acetyl-L-serine 2 [11.574]	15.0537	174	**0,031**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0083	0.0012
[439742] beta-cyano-L-alanine [11.288]	14.4481	141	**0,009**	0.1114	0.0278	0.0330	0.0047	0.1590	0.0302	0.0398	0.0034
[5950] L-alanine 1 [7.495]	7.5434	116	0,156	0.9675	0.3148	0.4543	0.1294	1.3333	0.2598	1.1480	0.2352
[5950] L-alanine 2 [11.182]	14.0574	147	0,083	0.0018	0.0006	0.0051	0.0013	0.0151	0.0057	0.0148	0.0039
[5951] L-serine 1 [9.706]	11.4524	132	**0,001**	1.9217	0.4794	1.8222	0.2828	0.9202	0.3125	3.0702	0.9848
[5951] L-serine 2 [11.174]	14.2882	204	0,187	12.6938	4.3293	9.1752	3.2073	13.2866	2.3030	9.6482	3.2765
[5960] aspartic acid 1 [12.002]	15.6622	160	**0,000**	0.1044	0.0263	0.0148	0.0041	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5960] aspartic acid 2 [13.207]	18.2366	232	**0,007**	2.4881	0.9457	0.4030	0.1417	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5962] L-lysine 2 [17.643]	26.85745	317	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Organic acids											
[1060] pyruvic acid [6.714]	6.3535	174	**0,002**	0.0076	0.0021	0.0085	0.0029	0.0000	0.0000	0.0133	0.0020
[938] nicotinic acid [10.27]	12.24305	180	**0,048**	0.0764	0.0170	0.0472	0.0057	0.0424	0.0108	0.0669	0.0179
[16219560] lactobionic acid 1 [24.583]	82.7787	434	**0,002**	0.3030	0.1093	0.2340	0.0496	0.1374	0.0334	0.3077	0.0472
[3037582] mucic acid [18.907]	29.0092	33	**0,002**	3.9129	0.9443	2.2157	0.4534	1.5047	0.4258	1.0914	0.0885
[311] citric acid [16.615]	25.0219	347	**0,004**	7.9740	3.1951	0.3408	0.1160	0.3410	0.1443	0.3582	0.1225
[36] 2-isopropylmalic acid [13.836]	19.533	147	**0,003**	0.2520	0.0747	0.1400	0.0218	0.0000	0.0000	0.1046	0.0184
[439194] glyceric acid [10.735]	13.5226	189	0,323	0.2810	0.0691	0.1660	0.0423	0.4572	0.0897	0.2033	0.0237
[439227] pipecolic acid 1 [9.868]	11.47635	84	**0,000**	0.0087	0.0032	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439227] pipecolic acid 2 [11.22]	14.1376	156	**0,000**	0.0035	0.0012	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439766] citramalic acid [12.63]	17.0414	147	**0,001**	0.0228	0.0061	0.0056	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444266] maleic acid [10.323]	12.6709	147	**0,001**	0.0034	0.0009	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444305] tartaric acid [14.588]	20.3092	147	0,051	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444972] fumaric acid [10.94]	13.7177	245	**0,011**	0.0647	0.0204	0.0175	0.0051	0.0061	0.0014	0.0068	0.0017
[445858] ferulic acid [19.312]	29.8702	338	0,098	0.0227	0.0056	0.0054	0.0015	0.0100	0.0025	0.0150	0.0008
[500] 4-guanidinobutyric acid 2 [13.348]	18.3212	174	**0,000**	3.7024	1.1020	2.6979	0.8169	6.5861	1.9129	19.4890	3.3740
[5460673] D-saccharic acid [18.614]	29.5897	333	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[604] gluconic acid 2 [18.297]	28.711	333	0,146	0.1991	0.0510	0.1011	0.0125	0.1008	0.0392	0.1340	0.0197
[637542] 4-hydroxycinnamic acid [17.854]	26.9663	293	**0,001**	0.1614	0.0438	0.0251	0.0064	0.0284	0.0061	0.0514	0.0062
[71] gluconic acid 1 [17.693]	26.4085	333	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[867] malonic acid 1 [8.919]	10.0914	147	0,358	3.5576	2.8463	0.5835	0.2959	0.1740	0.0528	0.2752	0.1163
[867] malonic acid 2 [11.938]	15.9564	305	**0,013**	0.1482	0.0645	0.0388	0.0223	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[8742] shikimic acid [16.433]	24.812	204	**0,000**	0.2599	0.0382	0.1163	0.0142	0.0000	0.0000	0.0498	0.0190
[92824] D-malic acid [12.794]	17.5005	147	**0,000**	2.1244	0.5030	0.2727	0.1030	0.1543	0.0706	0.1703	0.0463
Sugars and polyols											
[10712] cellobiose 1 [24.444]	41.0738	361	**0,001**	0.0494	0.0159	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[10712] cellobiose 2 [24.7]	37.5639	204	0,154	0.1388	0.0362	0.0433	0.0177	0.0227	0.0154	0.0980	0.0285
[165577] leucrose [24.975]	41.0883	361	**0,001**	0.1456	0.0417	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0256	0.0163
[18950] D-mannose 1 [17.287]	26.67145	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1222	0.0069
[18950] D-mannose 2 [17.435]	27.1303	205	0,263	2.1396	0.5473	0.3561	0.0938	0.4840	0.1797	1.0453	0.5696
[24749] D-glucose 1 [17.426]	26.6715	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1242	0.0351	0.0000	0.0000
[24749] D-glucose 2 [17.625]	27.1281	205		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 1 [17.011]	26.2963	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 2 [17.212]	26.5108	217	0,083	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.9460	0.6031
[439240] D-lyxose 1 [14.762]	22.1335	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439240] D-lyxose 2 [14.889]	22.17505	307	**0,016**	1.0923	0.2325	0.4802	0.1251	0.7939	0.2183	0.0000	0.0000
[439242] Raffinose [29.282]	49.5901	87	0,141	0.1773	0.0632	0.0526	0.0040	0.0396	0.0066	0.1459	0.0954
[441032] D (+)altrose 2 [17.46]	31.3528	205	0,178	0.0916	0.0285	0.0000	0.0000	0.0554	0.0290	0.0000	0.0000
[448388] D-allose 1 [17.278]	26.653	319	0,143	0.8201	0.2043	0.4965	0.1520	0.7767	0.2488	0.5351	0.1214
[448388] D-allose 2 [17.521]	31.3523	319	**0,012**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0390	0.0173	0.0301	0.0093
[5984] fructose 1 [17.18]	26.2963	307	**0,004**	32.8634	8.3416	6.0003	1.9041	4.1085	0.7172	4.1252	1.6397
[5988] Sucrose [23.988]	39.5979	361	0,229	45.1265	9.1216	42.0528	8.7123	60.5060	15.0211	42.1286	6.6709
[6255] maltose 2 [24.915]	40.6357	361	**0,005**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6255] maltose 1 [24.702]	41.0916	361	**0,008**	0.0000	0.0000	0.0843	0.0146	0.0975	0.0304	0.0869	0.0226
[65550] D-lyxose 1 [14.741]	22.1302	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 2 [14.869]	22.1745	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[656894] isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside [19.097]	35.7341	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[92817] melezitose [29.884]	50.5921	361	**0,028**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0154	0.0071	0.0186	0.0045
[94214] methyl-beta-D-galactopyranoside [16.935]	35.4479	204	**0,042**	0.8057	0.3552	0.2273	0.0493	0.2755	0.0545	0.3159	0.0756
[993] ribose [15.113]	21.48565	217	0,147	0.0604	0.0238	0.0223	0.0158	0.0000	0.0000	0.0097	0.0034
[16217663] maltitol [25.37]	41.5329	361	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0301	0.0078	0.0264	0.0074	0.0335	0.0058
[169019] D-threitol [12.954]	18.05245	217	0,063	0.0492	0.0173	0.0230	0.0069	0.0000	0.0000	0.0314	0.0039
[439451] galactinol 2 [26.479]	44.4352	204	**0,001**	0.0384	0.0127	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6251] D-mannitol [17.81]	26.8009	319	**0,001**	35.4324	9.7787	4.2861	1.5235	3.5333	1.2296	5.6669	1.9460
[6508] quinic acid [17.076]	25.9933	345	**0,000**	22.6088	4.9573	7.8407	1.3452	0.4066	0.1411	0.9270	0.3018
[892] allo-inositol [17.245]	30.3384	318	**0,015**	25.4286	5.0434	26.6634	4.6080	9.9374	2.3525	32.0891	4.5464
[91528] DL-3,4-dihydroxyphenyl glycol [17.208]	34.2286	355	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0187	0.0088	0.0000	0.0000
[94154] arabitol [15.601]	22.53875	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.1748	0.0270	0.1469	0.0339	0.1936	0.0348
N-containing compounds											
[1000] 2-amino-1-phenylethanol [15.668]	11.6853	174	**0,039**	1.1878	0.2934	0.9259	0.2158	1.5156	0.4324	1.2645	0.1599
[1001] phenylethylamine [13.766]	18.9369	174	0,097	0.2323	0.0633	0.2081	0.0363	0.0087	0.0036	0.0394	0.0116
[1045] putrescine [15.709]	22.95575	174	0,099	0.1606	0.0641	0.1083	0.0194	0.2501	0.0590	0.2066	0.0748
[1102] spermidine 2 [20.811]	32.90305	174	0,136	0.0000	0.0000	0.1436	0.0321	0.2646	0.0653	0.1898	0.0254
[1175] uric acid 1 [19.331]	30.48635	441	**0,006**	0.0219	0.0136	0.0000	0.0000	0.0027	0.0011	0.0000	0.0000
[1176] urea [9.599]	11.4714	147	**0,015**	0.1320	0.0469	0.0558	0.0315	0.0530	0.0102	0.0620	0.0132
[156807] D-lyxosylamine 2 [14.861]	22.17415	217	0,065	0.7872	0.3851	0.7500	0.1089	0.8459	0.2479	1.6437	0.4969
[190] adenine 1 [17.066]	25.58105	264	0,169	0.3362	0.0650	0.1541	0.0279	0.1652	0.0418	0.2031	0.0252
[204] allantoin 1 [17.293]	26.31605	331	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 1 [8.945]	8.75765	86	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0367	0.0149	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 2 [10.607]	11.87685	158	**0,000**	0.0462	0.0105	0.0550	0.0298	0.3205	0.1126	0.1371	0.0352
[5610] tyramine [17.562]	26.50725	174	**0,000**	0.0668	0.0333	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6613] pantothenic acid 2 [18.371]	28.2791	291	**0,001**	0.0555	0.0158	0.0577	0.0152	0.0290	0.0074	0.0000	0.0000
[66868] porphine 1 [10.77]	13.38845	285	**0,001**	0.1032	0.0266	0.0000	0.0000	0.0030	0.0005	0.0043	0.0011
[8871] 2-hydroxypyridine [6.519]	5.98115	152	**0,001**	0.0552	0.0084	0.0275	0.0022	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[967] orotic acid [15.794]	23.3281	254	**0,004**	0.0053	0.0012	0.0032	0.0006	0.0000	0.0000	0.0060	0.0023
[6262] L-ornithine 1 [14.349]	20.378	142	**0,042**	0.9805	0.2468	0.4791	0.1031	4.0554	0.9075	1.5952	0.5252
[6262] L-ornithine 2 [16.632]	24.79375	174	**0,013**	0.1393	0.0452	0.0000	0.0000	0.3256	0.0485	0.2350	0.0541
[65098] norvaline 1 [7.582]	7.1114	72	**0,010**	0.0259	0.0116	0.0148	0.0055	0.0207	0.0094	0.0235	0.0076
[9750] citrulline 2 [16.691]	24.9166	157	0,283	0.4147	0.0542	0.1174	0.0330	0.5600	0.0754	0.2751	0.0471
[275] L-canavanine 1 [9.22]	10.5739	73	**0,028**	0.0572	0.0160	0.0296	0.0031	0.0109	0.0014	0.0520	0.0176
[275] L-canavanine 2 [18.325]	28.247	220	**0,014**	0.0893	0.0312	0.0782	0.0265	0.0000	0.0000	0.2397	0.1058
[440473] L-mimosine 1 [8.863]	9.8099	188	**0,000**	0.0038	0.0013	0.0034	0.0007	0.0000	0.0000	0.0077	0.0005
P-containing compounds											
[1004] phosphoric acid [9.966]	11.972	299	0,064	38.4263	6.2415	40.2127	10.3864	38.9269	12.0656	48.1475	9.7492
[439958] D-glucose-6-phosphate 1 [21.394]	34.5711	387	**0,003**	1.0179	0.2369	0.4337	0.0967	0.0921	0.0271	0.1883	0.0625
[439958] D-glucose-6-phosphate 2 [21.558]	34.8419	387	**0,000**	0.0829	0.0184	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[754] glycerol 1-phosphate [16.056]	32.3257	357	**0,027**	0.9872	0.2537	0.3054	0.0572	0.1987	0.0450	0.3568	0.0427
Others											
[5785] L-ascorbic acid [17.939]	27.5839	332	0,413	1.2362	0.7765	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[835] dehydroascorbic acid 2 [17.139]	25.5254	173	0,085	2.0809	1.1198	0.6803	0.1194	0.4831	0.0879	0.5825	0.0355
[835] dehydroascorbic acid 4 [17.739]	27.35575	244	**0,024**	0.0000	0.0000	0.0696	0.0025	0.0636	0.0271	0.0859	0.0331
[9064] catechin [25.643]	42.6224	368		0.1131	0.0347	0.0355	0.0040	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Πίνακας 5: Μεταβολίτες ρίζας DB σε άμεσες εφαρμογές

Ετικέτες γραμμής	RT	mz	P	Control	SE	DB R 50 AVG	SE	DB R 100 AVG	SE	DB R 150 AVG	SE
Aminoacids											
[236] L-asparagine 1 [14.496]	20.8668	188	0,126	1.3854	0.5004	0.7275	0.2327	1.0349	0.2939	0.7875	0.2481
[12647] L-homoserine 1 [11.141]	14.00875	146	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0125	0.0044	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[12647] L-homoserine 2 [12.359]	16.4937	218	0,126	0.1087	0.0337	0.2720	0.0610	0.1317	0.0378	0.0493	0.0117
[145742] L-proline 1 [8.567]	9.1656	70	0,987	0.0108	0.0053	0.0142	0.0054	0.0137	0.0083	0.0139	0.0110
[145742] L-proline 2 [10.321]	12.4721	142	**0,050**	0.5122	0.2106	0.8032	0.2252	0.7165	0.1865	0.6493	0.1945
[236] L-asparagine 2 [14.984]	21.6973	231	0,105	6.2209	2.5823	8.1035	2.5711	5.5156	1.6707	3.0782	0.6029
[239] Beta- alanine 1 [12.044]	15.786	248	0,415	0.1476	0.0418	0.3292	0.0941	0.2616	0.0129	0.2942	0.0662
[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	20.5151	246	**0,009**	0.1259	0.0437	0.6498	0.1995	0.4461	0.0797	0.3010	0.0573
[33032] L-glutamic acid 3 (dehydrated) [13.232]	18.0678	156	0,372	0.6675	0.3265	1.0240	0.2234	0.7442	0.2112	0.5339	0.1094
[5950] L-alanine 1 [7.495]	7.5473	116	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0362	0.0153
[5950] L-alanine 2 [11.182]	14.0467	147	**0,000**	0.0139	0.0031	0.0000	0.0000	0.0035	0.0010	0.0000	0.0000
[5951] L-serine 1 [9.706]	11.446	132	**0,002**	0.0312	0.0125	0.1671	0.0390	0.0562	0.0150	0.0510	0.0179
[5951] L-serine 2 [11.174]	14.2735	204	0,060	0.2627	0.0563	1.0031	0.2052	0.7180	0.1511	0.6333	0.1579
[5960] aspartic acid 1 [12.002]	15.6461	160	**0,009**	0.0242	0.0063	0.0380	0.0101	0.0184	0.0059	0.0076	0.0021
[5960] aspartic acid 2 [13.207]	18.2293	232	0,662	0.2335	0.0710	0.2748	0.0331	0.1885	0.0409	0.2097	0.0508
[5962] L-lysine 2 [17.643]	26.854	317		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6057] L-tyrosine 2 [17.856]	27.1632	218	**0,001**	0.0000	0.0000	0.0141	0.0034	0.0241	0.0036	0.0000	0.0000
[6057] tyrosine 2 [17.871]	27.1642	218	**0,022**	0.0127	0.0036	0.0109	0.0018	0.0196	0.0052	0.0188	0.0043
[6106] L-leucine 1 [8.298]	8.74145	86	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6137] L-methionine 2 [13.188]	18.0352	176	0,233	0.0379	0.0255	0.0278	0.0053	0.0212	0.0050	0.0000	0.0000
[6274] L-histidine 3 [17.658]	26.8298	154	0,067	0.5567	0.3594	0.3918	0.1083	0.1665	0.0664	0.1991	0.0842
[6287] L-valine 2 [9.151]	10.3978	144	0,700	0.1107	0.0343	0.1375	0.0465	0.1940	0.0484	0.1965	0.0456
[6288] L-threonine 1 [10.224]	12.4399	147	**0,006**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6288] L-threonine 2 [11.464]	14.96995	218	**0,021**	0.0232	0.0099	0.1211	0.0341	0.1149	0.0236	0.1802	0.0510
[6305] L-tryptophan 2 [20.466]	32.25275	202	0,139	0.0052	0.0010	0.0183	0.0063	0.0101	0.0013	0.0203	0.0101
[738] L-glutamine 1 [13.431]	18.2956	155	0,769	0.0455	0.0210	0.0381	0.0101	0.0393	0.0175	0.0389	0.0055
[738] L-glutamine 2 [14.083]	19.8529	344	0,171	0.1687	0.0978	0.0537	0.0104	0.0512	0.0222	0.0000	0.0000
[738] L-glutamine 3 [16.092]	23.8337	156	**0,004**	0.8146	0.2783	2.9854	0.7213	0.5135	0.0312	1.7953	0.6997
[750] glycine [10.456]	12.719	174	0,610	0.1247	0.0454	0.0660	0.0112	0.0657	0.0120	0.0750	0.0238
[791] DL-isoleucine 1 [8.576]	9.26085	86	0,776	0.0089	0.0049	0.0156	0.0032	0.0132	0.0033	0.0126	0.0081
[791] DL-isoleucine 2 [10.225]	12.43575	158	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0580	0.0211	0.1242	0.0382	0.2045	0.0437
[994] Phenylalanine 1 [13.545]	18.4635	120	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Organic acids											
[938] nicotinic acid [10.27]	12.2543	180	**0,000**	0.0083	0.0014	0.0089	0.0017	0.0043	0.0013	0.0025	0.0007
[1060] pyruvic acid [6.714]	6.3831	174	0,123	0.0161	0.0082	0.0047	0.0006	0.0055	0.0016	0.0000	0.0026
[11266] 2-hydroxybutyric acid [7.852]	8.1421	147	0,285	0.0031	0.0017	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[16219560] lactobionic acid 1 [24.583]	41.5485	217	**0,000**	0.0106	0.0010	0.0111	0.0029	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[3037582] mucic acid [18.907]	29.00955	333	0,317	0.0786	0.0270	0.0992	0.0278	0.0628	0.0132	0.0587	0.0146
[311] citric acid [16.615]	25.0081	347	0,216	0.0419	0.0089	0.0853	0.0326	0.0000	0.0000	0.0562	0.0185
[439194] glyceric acid [10.735]	13.51365	189	0,344	0.0192	0.0089	0.0123	0.0019	0.0100	0.0028	0.0246	0.0064
[439227] pipecolic acid 2 [11.22]	14.11505	156	**0,001**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0024	0.0005	0.0000	0.0000
[444266] maleic acid [10.323]	12.5619	147	**0,000**	0.0021	0.0011	0.0000	0.0000	0.0058	0.0024	0.0000	0.0000
[444972] fumaric acid [10.94]	13.7155	245	**0,032**	0.0030	0.0012	0.0017	0.0002	0.0000	0.0000	0.0004	0.0001
[487] methylmalonic acid [9.088]	10.0081	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0021	0.0011	0.0000	0.0000
[500] 4-guanidinobutyric acid 2 [13.348]	18.292	174	0,558	0.6872	0.2635	0.3714	0.0919	0.3480	0.0508	0.4298	0.1874
[604] gluconic acid 2 [18.297]	28.7051	333	0,244	0.0390	0.0049	0.0497	0.0075	0.0204	0.0022	0.0367	0.0057
[5460673] D-saccharic acid [18.614]	29.5854	333	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0040	0.0009	0.0000	0.0000
[6508] quinic acid [17.076]	25.9778	345	**0,000**	0.0044	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[867] malonic acid 1 [8.919]	10.10025	147	**0,040**	0.0054	0.0011	0.0050	0.0005	0.0022	0.0005	0.0042	0.0014
[92824] D-malic acid [12.794]	17.4903	147	0,075	0.2688	0.0650	0.2482	0.0815	0.1419	0.0132	0.1173	0.0250
Sugars and polyols											
[18950] D-mannose 2 [17.435]	27.124	205	**0,001**	0.6888	0.2096	0.1573	0.0500	0.1709	0.0337	0.0575	0.0184
[439242] Raffinose [29.282]	49.599	87	0,276	0.1766	0.0754	0.1974	0.0679	0.1097	0.0150	0.0911	0.0260
[441035] talose 1 [17.4]	26.6664	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5984] fructose 1 [17.18]	26.2847	307	**0,003**	6.9059	1.5754	2.0301	0.5880	3.2644	1.3526	0.2791	0.0683
[5988] Sucrose [23.988]	39.6122	361	**0,001**	10.4046	2.1922	21.8146	3.1914	11.9800	1.5212	7.8083	1.6038
[6255] maltose 2 [24.915]	40.639	361	**0,000**	0.0097	0.0048	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6255] maltose 1 [24.702]	41.0872	361	**0,000**	0.0611	0.0172	0.0000	0.0000	0.0105	0.0045	0.0000	0.0000
[94214] methyl-beta-D-galactopyranoside [16.935]	25.1884	204	0,192	0.0123	0.0073	0.0387	0.0169	0.0157	0.0065	0.0125	0.0047
[993] ribose [15.113]	22.1639	217	0,190	0.0363	0.0171	0.0575	0.0184	0.0521	0.0083	0.0309	0.0065
[7427] D-(+) trehalose [24.752]	41.0641	361	**0,001**	0.0215	0.0131	0.0259	0.0064	0.0060	0.0013	0.0119	0.0030
[206] D (+) galactose 1 [17.409]	26.8576	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[206] D (+) galactose 2 [17.662]	26.567	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 1 [17.011]	26.29645	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 2 [17.212]	26.5019	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1266	0.0523
[448388] D-allose 1 [17.278]	31.3464	319	**0,012**	0.0151	0.0065	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[448388] D-allose 2 [17.521]	31.34605	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 1 [14.741]	21.98315	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 2 [14.869]	22.1675	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[10712] cellobiose 1 [24.444]	41.0547	361	**0,000**	4.5043	5.2614	11.3183	12.0754	18.1323	18.8894	2.9749	0.7790
[10712] cellobiose 2 [24.7]	39.9997	204		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[1057] pyrogallol [13.456]	18.6372	239	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[16217663] maltitol [25.37]	41.5333	361	**0,001**	0.0020	0.0006	0.0050	0.0014	0.0040	0.0003	0.0031	0.0010
[439451] galactinol 2 [26.479]	44.4319	204	**0,025**	0.0203	0.0052	0.0239	0.0079	0.0128	0.0024	0.0000	0.0000
[5780] D-sorbitol [17.898]	26.817	319	0,263	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2584	0.2110
[6251] D-mannitol [17.81]	26.7883	319	**0,001**	6.1857	1.9521	1.5601	0.4483	1.7219	0.4158	0.6084	0.2085
[892] allo-inositol [17.245]	30.3133	318	0,111	1.3757	0.4661	1.4990	0.3431	1.1210	0.2799	0.4157	0.0823
[94154] arabitol [15.601]	22.53075	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
N-containing compounds											
[1000] 2-amino-1-phenylethanol [15.668]	11.67285	174	0,352	0.6139	0.1323	0.9538	0.3123	0.7686	0.1096	0.5037	0.1119
[1045] putrescine [15.709]	22.9538	174	0,058	0.6809	0.1959	0.6837	0.2241	0.9136	0.2507	0.4510	0.0883
[1176] urea [9.599]	11.86	147	0,236	0.0451	0.0111	0.0746	0.0272	0.0543	0.0217	0.1152	0.0299
[138] 5-aminovaleric acid 1 [14.458]	20.5272	174	0,483	0.0132	0.0038	0.0836	0.0593	0.0650	0.0342	0.0439	0.0061
[156807] D-lyxosylamine 2 [14.861]	22.1726	217	**0,000**	0.0516	0.0126	0.0678	0.0270	0.0378	0.0075	0.0000	0.0000
[190] adenine 1 [17.066]	25.56855	264	0,078	0.0532	0.0155	0.0412	0.0110	0.0273	0.0036	0.0211	0.0072
[204] allantoin 1 [17.293]	26.3081	331	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0441	0.0203
[439742] beta-cyano-L-alanine [11.288]	14.43705	141	0,268	0.0484	0.0295	0.0411	0.0126	0.0220	0.0039	0.0293	0.0058
[6613] pantothenic acid 2 [18.371]	28.2708	291	**0,013**	0.0000	0.0000	0.0182	0.0071	0.0182	0.0025	0.0000	0.0000
[7405] L-pyroglutamic acid [13.218]	17.886	156	**0,007**	0.4438	0.2565	0.3391	0.1877	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[275] L-canavanine 1 [9.22]	10.6288	73	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0049	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[275] L-canavanine 2 [18.325]	28.2389	220	0,122	0.0736	0.0521	0.0518	0.0292	0.0381	0.0307	0.0000	0.0000
[440473] L-mimosine 1 [8.863]	9.8049	188	**0,007**	0.0025	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0013	0.0005
[6262] L-ornithine 1 [14.349]	20.37305	142	**0,011**	0.0000	0.0000	0.1673	0.0868	0.3024	0.1750	0.3846	0.1856
[6262] L-ornithine 2 [16.632]	24.79105	174	0,071	0.0000	0.0000	0.1025	0.0369	0.2203	0.0964	0.1497	0.0727
[65098] norvaline 1 [7.582]	7.12225	72		0.0021	0.0006	0.0053	0.0018	0.0034	0.0006	0.0058	0.0024
[9750] citrulline 2 [16.691]	24.9119	157	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0412	0.0124	0.0353	0.0135	0.0684	0.0305
[21236] L-norleucine 1 [8.945]	8.7523	86		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 2 [10.607]	11.8712	158	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0555	0.0182	0.0896	0.0182
P-containing compounds											
[1004] phosphoric acid [9.966]	72.26395	299	0,143	27.4857	3.3135	35.4905	3.6616	21.4960	4.1994	19.4697	4.2584
[1015] O-phosphocolamine [16.232]	24.1432	299	**0,003**	0.0000	0.0000	0.0082	0.0016	0.0160	0.0023	0.0244	0.0069
[439958] D-glucose-6-phosphate 1 [21.394]	34.5566	387	0,133	0.3351	0.1417	0.1846	0.0836	0.1947	0.0311	0.0598	0.0223
[439958] D-glucose-6-phosphate 2 [21.558]	34.695	387	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0086	0.0012
[754] glycerol 1-phosphate [16.056]	23.8718	357	0,292	0.0722	0.0217	0.0526	0.0229	0.0660	0.0120	0.0601	0.0160

Πίνακας 6: Μεταβολίτες ρίζας DB σε σταδιακές εφαρμογές

Ετικέτες γραμμής	RT	mz	P	Control	SE	DB R 100 ACC AVG	SE	DB R 150 ACC AVG	SE	DB R 200 ACC AVG	SE
Aminoacids											
[236] L-asparagine 1 [14.496]	20.8668	188	0,126	1.3854	0.5004	0.7383	0.2934	0.1803	0.0829	1.0850	0.2534
[12647] L-homoserine 1 [11.141]	14.00875	146	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[12647] L-homoserine 2 [12.359]	16.4937	218	0,126	0.1087	0.0337	0.1376	0.0599	0.1327	0.0400	0.0934	0.0249
[145742] L-proline 1 [8.567]	9.1656	70	0,987	0.0108	0.0053	0.0139	0.0067	0.0203	0.0111	0.0133	0.0033
[145742] L-proline 2 [10.321]	12.4721	142	**0,050**	0.5122	0.2106	1.6309	0.4779	0.5279	0.0841	0.9046	0.2024
[236] L-asparagine 2 [14.984]	21.6973	231	0,105	6.2209	2.5823	2.0911	0.4390	2.7117	0.6544	3.7923	1.3676
[239] Beta- alanine 1 [12.044]	15.786	248	0,415	0.1476	0.0418	0.2598	0.0361	0.1997	0.0254	0.3012	0.0916
[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	20.5151	246	**0,009**	0.1259	0.0437	0.3312	0.0880	0.1646	0.0126	0.1535	0.0291
[33032] L-glutamic acid 3 (dehydrated) [13.232]	18.0678	156	0,372	0.6675	0.3265	0.6912	0.1198	0.4398	0.0741	0.7291	0.1309
[5950] L-alanine 1 [7.495]	7.5473	116	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0279	0.0102	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5950] L-alanine 2 [11.182]	14.0467	147	**0,000**	0.0139	0.0031	0.0081	0.0023	0.0067	0.0004	0.0081	0.0012
[5951] L-serine 1 [9.706]	11.446	132	**0,002**	0.0312	0.0125	0.0987	0.0279	0.0546	0.0139	0.0446	0.0116
[5951] L-serine 2 [11.174]	14.2735	204	0,060	0.2627	0.0563	0.8036	0.1066	0.8750	0.1951	0.7153	0.1040
[5960] aspartic acid 1 [12.002]	15.6461	160	**0,009**	0.0242	0.0063	0.0254	0.0059	0.0089	0.0018	0.0085	0.0015
[5960] aspartic acid 2 [13.207]	18.2293	232	0,662	0.2335	0.0710	0.3107	0.0862	0.2065	0.0538	0.1885	0.0266
[5962] L-lysine 2 [17.643]	26.854	317		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6057] L-tyrosine 2 [17.856]	27.1632	218	**0,001**	0.0000	0.0000	0.0337	0.0048	0.0652	0.0208	0.0325	0.0103
[6057] tyrosine 2 [17.871]	27.1642	218	**0,022**	0.0127	0.0036	0.0256	0.0043	0.0344	0.0032	0.0213	0.0055
[6106] L-leucine 1 [8.298]	8.74145	86	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0078	0.0022	0.0095	0.0023
[6137] L-methionine 2 [13.188]	18.0352	176	0,233	0.0379	0.0255	0.0256	0.0109	0.0248	0.0053	0.0316	0.0107
[6274] L-histidine 3 [17.658]	26.8298	154	0,067	0.5567	0.3594	0.2111	0.0273	0.1285	0.0303	0.0927	0.0238
[6287] L-valine 2 [9.151]	10.3978	144	0,700	0.1107	0.0343	0.1359	0.0242	0.1576	0.0351	0.1567	0.0302
[6288] L-threonine 1 [10.224]	12.4399	147	**0,006**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0300	0.0229	0.0000	0.0000
[6288] L-threonine 2 [11.464]	14.96995	218	**0,021**	0.0232	0.0099	0.1863	0.0313	0.2199	0.0399	0.1879	0.0485
[6305] L-tryptophan 2 [20.466]	32.25275	202	0,139	0.0052	0.0010	0.0324	0.0108	0.0210	0.0050	0.0125	0.0032
[738] L-glutamine 1 [13.431]	18.2956	155	0,769	0.0455	0.0210	0.0603	0.0374	0.0088	0.0032	0.0268	0.0092
[738] L-glutamine 2 [14.083]	19.8529	344	0,171	0.1687	0.0978	0.0658	0.0278	0.0079	0.0006	0.0657	0.0262
[738] L-glutamine 3 [16.092]	23.8337	156	**0,004**	0.8146	0.2783	0.7755	0.0858	0.6912	0.1609	0.5062	0.0486
[750] glycine [10.456]	12.719	174	0,610	0.1247	0.0454	0.0974	0.0425	0.0502	0.0032	0.0598	0.0197
[791] DL-isoleucine 1 [8.576]	9.26085	86	0,776	0.0089	0.0049	0.0090	0.0020	0.0152	0.0085	0.0066	0.0017
[791] DL-isoleucine 2 [10.225]	12.43575	158	**0,000**	0.0000	0.0000	0.1453	0.0576	0.1045	0.0188	0.0000	0.0000
[994] Phenylalanine 1 [13.545]	18.4635	120	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0024	0.0015	0.0000	0.0000
Organic acids											
[938] nicotinic acid [10.27]	12.2543	180	**0,000**	0.0083	0.0014	0.0045	0.0002	0.0000	0.0000	0.0036	0.0016
[1060] pyruvic acid [6.714]	6.3831	174	0,123	0.0161	0.0082	0.0050	0.0012	0.0023	0.0005	0.0042	0.0011
[11266] 2-hydroxybutyric acid [7.852]	8.1421	147	0,285	0.0031	0.0017	0.0094	0.0078	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[16219560] lactobionic acid 1 [24.583]	41.5485	217	**0,000**	0.0106	0.0010	0.0000	0.0000	0.0041	0.0008	0.0057	0.0013
[3037582] mucic acid [18.907]	29.00955	333	0,317	0.0786	0.0270	0.1189	0.0247	0.0761	0.0179	0.0599	0.0090
[311] citric acid [16.615]	25.0081	347	0,216	0.0419	0.0089	0.1609	0.0847	0.0709	0.0241	0.0703	0.0055
[439194] glyceric acid [10.735]	13.51365	189	0,344	0.0192	0.0089	0.0169	0.0040	0.0156	0.0058	0.0107	0.0015
[439227] pipecolic acid 2 [11.22]	14.11505	156	**0,001**	0.0000	0.0000	0.0011	0.0004	0.0012	0.0004	0.0023	0.0007
[444266] maleic acid [10.323]	12.5619	147	**0,000**	0.0021	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444972] fumaric acid [10.94]	13.7155	245	**0,032**	0.0030	0.0012	0.0000	0.0000	0.0013	0.0002	0.0014	0.0003
[487] methylmalonic acid [9.088]	10.0081	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[500] 4-guanidinobutyric acid 2 [13.348]	18.292	174	0,558	0.6872	0.2635	0.5158	0.1382	0.2858	0.0589	0.4519	0.0984
[604] gluconic acid 2 [18.297]	28.7051	333	0,244	0.0390	0.0049	0.0623	0.0221	0.0570	0.0202	0.0324	0.0030
[5460673] D-saccharic acid [18.614]	29.5854	333	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0053	0.0016	0.0031	0.0004
[6508] quinic acid [17.076]	25.9778	345	**0,000**	0.0044	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[867] malonic acid 1 [8.919]	10.10025	147	**0,040**	0.0054	0.0011	0.0115	0.0033	0.0070	0.0020	0.0092	0.0013
[92824] D-malic acid [12.794]	17.4903	147	0,075	0.2688	0.0650	0.2739	0.0702	0.1128	0.0122	0.1353	0.0203
Sugars and polyols											
[18950] D-mannose 2 [17.435]	27.124	205	**0,001**	0.6888	0.2096	0.1434	0.0293	0.1014	0.0168	0.2496	0.1133
[439242] Raffinose [29.282]	49.599	87	0,276	0.1766	0.0754	0.3289	0.1357	0.2241	0.0584	0.1832	0.0333
[441035] talose 1 [17.4]	26.6664	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0288	0.0098	0.0000	0.0000
[5984] fructose 1 [17.18]	26.2847	307	**0,003**	6.9059	1.5754	2.2308	0.6692	4.1212	1.0432	2.4704	0.6948
[5988] Sucrose [23.988]	39.6122	361	**0,001**	10.4046	2.1922	8.4442	1.9219	8.6027	1.5955	10.6968	2.7454
[6255] maltose 2 [24.915]	40.639	361	**0,000**	0.0097	0.0048	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6255] maltose 1 [24.702]	41.0872	361	**0,000**	0.0611	0.0172	0.0312	0.0155	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[94214] methyl-beta-D-galactopyranoside [16.935]	25.1884	204	0,192	0.0123	0.0073	0.0321	0.0116	0.0179	0.0029	0.0081	0.0012
[993] ribose [15.113]	22.1639	217	0,190	0.0363	0.0171	0.0126	0.0112	0.0350	0.0107	0.0436	0.0120
[7427] D-(+) trehalose [24.752]	41.0641	361	**0,001**	0.0215	0.0131	0.0183	0.0016	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[206] D (+) galactose 1 [17.409]	26.8576	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0068	0.0000	0.0000
[206] D (+) galactose 2 [17.662]	26.567	319	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0085	0.0047	0.0000	0.0000	0.0069	0.0019
[2724552] tagatose 1 [17.011]	26.29645	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 2 [17.212]	26.5019	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[448388] D-allose 1 [17.278]	31.3464	319	**0,012**	0.0151	0.0065	0.0046	0.0014	0.0000	0.0000	0.0112	0.0091
[448388] D-allose 2 [17.521]	31.34605	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 1 [14.741]	21.98315	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0198	0.0037	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 2 [14.869]	22.1675	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[10712] cellobiose 1 [24.444]	41.0547	361	**0,000**	4.5043	5.2614	3.1290	1.3226	0.0168	0.0044	0.0193	0.0062
[10712] cellobiose 2 [24.7]	39.9997	204		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[1057] pyrogallol [13.456]	18.6372	239	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0035	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[16217663] maltitol [25.37]	41.5333	361	**0,001**	0.0020	0.0006	0.0074	0.0025	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439451] galactinol 2 [26.479]	44.4319	204	**0,025**	0.0203	0.0052	0.0249	0.0079	0.0181	0.0089	0.0102	0.0015
[5780] D-sorbitol [17.898]	26.817	319	0,263	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6251] D-mannitol [17.81]	26.7883	319	**0,001**	6.1857	1.9521	1.4052	0.2808	1.0123	0.1849	2.1778	0.7249
[892] allo-inositol [17.245]	30.3133	318	0,111	1.3757	0.4661	0.9756	0.2491	1.1175	0.2336	0.6228	0.1419
[94154] arabitol [15.601]	22.53075	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0061	0.0006	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
N-containing compounds											
[1000] 2-amino-1-phenylethanol [15.668]	11.67285	174	0,352	0.6139	0.1323	0.9432	0.2004	0.6278	0.1100	0.5652	0.0655
[1045] putrescine [15.709]	22.9538	174	0,058	0.6809	0.1959	1.4579	0.3471	0.7279	0.1326	0.7232	0.0961
[1176] urea [9.599]	11.86	147	0,236	0.0451	0.0111	0.0676	0.0157	0.0651	0.0083	0.0600	0.0120
[138] 5-aminovaleric acid 1 [14.458]	20.5272	174	0,483	0.0132	0.0038	0.0506	0.0103	0.0684	0.0163	0.0294	0.0089
[156807] D-lyxosylamine 2 [14.861]	22.1726	217	**0,000**	0.0516	0.0126	0.0830	0.0249	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[190] adenine 1 [17.066]	25.56855	264	0,078	0.0532	0.0155	0.0472	0.0105	0.0223	0.0043	0.0261	0.0044
[204] allantoin 1 [17.293]	26.3081	331	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439742] beta-cyano-L-alanine [11.288]	14.43705	141	0,268	0.0484	0.0295	0.0205	0.0055	0.0180	0.0058	0.0224	0.0055
[6613] pantothenic acid 2 [18.371]	28.2708	291	**0,013**	0.0000	0.0000	0.0188	0.0047	0.0413	0.0167	0.0137	0.0049
[7405] L-pyroglutamic acid [13.218]	17.886	156	**0,007**	0.4438	0.2565	0.5369	0.1725	0.0000	0.0000	0.2166	0.0815
[275] L-canavanine 1 [9.22]	10.6288	73	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[275] L-canavanine 2 [18.325]	28.2389	220	0,122	0.0736	0.0521	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[440473] L-mimosine 1 [8.863]	9.8049	188	**0,007**	0.0025	0.0011	0.0014	0.0002	0.0000	0.0000	0.0011	0.0003
[6262] L-ornithine 1 [14.349]	20.37305	142	**0,011**	0.0000	0.0000	0.5850	0.2146	0.0782	0.0116	0.0000	0.0000
[6262] L-ornithine 2 [16.632]	24.79105	174	0,071	0.0000	0.0000	0.1298	0.0629	0.0748	0.0165	0.0649	0.0057
[65098] norvaline 1 [7.582]	7.12225	72		0.0021	0.0006	0.0039	0.0008	0.0057	0.0027	0.0040	0.0009
[9750] citrulline 2 [16.691]	24.9119	157	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0874	0.0267	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 1 [8.945]	8.7523	86		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 2 [10.607]	11.8712	158	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1042	0.0178	0.1183	0.0329
P-containing compounds											
[1004] phosphoric acid [9.966]	72.26395	299	0,143	27.4857	3.3135	27.9703	5.4163	33.1316	6.0390	22.3707	3.9408
[1015] O-phosphocolamine [16.232]	24.1432	299	**0,003**	0.0000	0.0000	0.0177	0.0028	0.0569	0.0121	0.0345	0.0144
[439958] D-glucose-6-phosphate 1 [21.394]	34.5566	387	0,133	0.3351	0.1417	0.2975	0.0960	0.1165	0.0318	0.1295	0.0314
[439958] D-glucose-6-phosphate 2 [21.558]	34.695	387	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0723	0.0356	0.0516	0.0079
[754] glycerol 1-phosphate [16.056]	23.8718	357	0,292	0.0722	0.0217	0.1217	0.0312	0.0693	0.0235	0.0993	0.0163

Πίνακας 7: Μεταβολίτες ρίζας SD σε άμεσες εφαρμογές

Ετικέτες γραμμής	RT	MZ	P(<0.05)	Control	SE	SD R 50 AVG	SE	SD R 100 AVG	SE	SD R 150 AVG	SE
Aminoacids											
[12647] L-homoserine 1 [11.141]	14.00875	146	**0,000**	0.0230	0.0116	0.0000	0.0000	0.0100	0.0021	0.0000	0.0000
[12647] L-homoserine 2 [12.359]	16.4937	218	**0,028**	0.2707	0.0860	0.0326	0.0107	0.2835	0.0876	0.2696	0.0899
[145742] L-proline 1 [8.567]	9.1656	70	0,097	0.0337	0.0126	0.0075	0.0016	0.0076	0.0020	0.0423	0.0069
[145742] L-proline 2 [10.321]	12.4721	142	**0,000**	0.1656	0.0461	0.0625	0.0321	0.0485	0.0187	0.7912	0.2707
[189] acetyl-L-serine 2 [11.574]	15.0574	174	**0,000**	0.0039	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[236] L-asparagine 1 [14.496]	20.8668	188	0,241	4.3445	1.7979	0.7553	0.3691	1.3074	0.2666	3.9004	0.9224
[236] L-asparagine 2 [14.984]	21.6973	231	0,079	23.7199	4.0609	10.9851	5.8191	6.5818	2.4073	13.5265	3.0097
[239] Beta- alanine 1 [12.044]	15.786	248	**0,000**	0.4818	0.0903	0.2959	0.0475	0.4274	0.1402	2.0287	0.2161
[5950] L-alanine 1 [7.495]	7.5473	116	**0,012**	0.1704	0.0268	0.0493	0.0237	0.0478	0.0122	0.0000	0.0000
[5950] L-alanine 2 [11.182]	14.0467	147	**0,000**	0.0015	0.0001	0.0027	0.0011	0.0000	0.0000	0.0211	0.0050
[5951] L-serine 1 [9.706]	11.446	132	**0,022**	0.3026	0.0732	0.1003	0.0285	0.2748	0.0664	1.2330	0.3732
[5951] L-serine 2 [11.174]	14.2735	204	**0,000**	0.4240	0.1133	0.2637	0.0833	0.4980	0.1292	3.2032	0.9687
[6106] L-leucine 1 [8.298]	8.74145	86	**0,001**	0.0244	0.0059	0.0115	0.0013	0.0257	0.0054	0.0445	0.0335
[6137] L-methionine 2 [13.188]	18.0352	176	0,092	0.0787	0.0136	0.0228	0.0106	0.0301	0.0059	0.3595	0.1183
[614] L-proline 1 [8.58]	9.14485	70		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[614] L-proline 2 [10.341]	12.42595	142		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6057] L-tyrosine 2 [17.856]	27.1632	218	**0,000**	0.0293	0.0072	0.0316	0.0182	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6057] tyrosine 2 [17.871]	27.1642	218	**0,014**	0.0172	0.0045	0.0228	0.0097	0.0184	0.0041	0.1165	0.0321
[5960] aspartic acid 1 [12.002]	15.6461	160	**0,001**	0.0351	0.0113	0.0202	0.0037	0.0330	0.0111	0.2655	0.0573
[5960] aspartic acid 2 [13.207]	18.2293	232	**0,002**	0.3494	0.0964	0.3179	0.1136	0.2591	0.0596	1.5563	0.3409
[5962] L-lysine 2 [17.643]	26.854	317	**0,000**	0.1010	0.0265	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6274] L-histidine 3 [17.658]	26.8298	154	0,140	0.4761	0.1131	0.3214	0.0879	0.4449	0.1752	0.0000	0.0000
[6287] L-valine 2 [9.151]	10.3978	144	**0,000**	0.0766	0.0225	0.1021	0.0793	0.0587	0.0099	0.4993	0.1180
[6288] L-threonine 1 [10.224]	12.4399	147	**0,005**	0.0336	0.0074	0.0000	0.0000	0.0457	0.0220	0.2642	0.1033
[6288] L-threonine 2 [11.464]	14.96995	218	**0,001**	0.0871	0.0145	0.0498	0.0157	0.1223	0.0338	0.4031	0.0698
[6305] L-tryptophan 2 [20.466]	32.25275	202	**0,003**	0.0097	0.0035	0.0129	0.0043	0.0340	0.0285	0.2051	0.0619
[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	20.5151	246	**0,018**	0.7229	0.1664	0.2539	0.0454	0.3260	0.0329	1.5114	0.2760
[33032] L-glutamic acid 3 (dehydrated) [13.232]	18.0678	156	**0,000**	1.6258	0.4193	0.4261	0.1695	0.9101	0.1796	3.0897	0.8545
[738] L-glutamine 1 [13.431]	18.2956	155	0,060	0.0758	0.0192	0.0443	0.0149	0.1239	0.0357	0.1796	0.0280
[738] L-glutamine 2 [14.083]	19.8529	344	**0,003**	0.0000	0.0000	0.0194	0.0165	0.0000	0.0000	0.1902	0.1235
[738] L-glutamine 3 [16.092]	23.8337	156	0,158	2.8381	0.6190	1.1315	0.4918	2.6743	0.6737	3.9822	0.6680
[750] glycine [10.456]	12.719	174	**0,011**	0.1459	0.0282	0.0696	0.0215	0.0809	0.0154	0.4451	0.1400
[791] DL-isoleucine 1 [8.576]	9.26085	86	**0,004**	0.0441	0.0132	0.0151	0.0056	0.0302	0.0068	0.1687	0.0475
[791] DL-isoleucine 2 [10.225]	12.43575	158	**0,028**	0.0580	0.0270	0.1260	0.1028	0.0211	0.0044	0.4422	0.1666
Organic acids											
[16219560] lactobionic acid 1 [24.583]	41.5485	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0102	0.0043	0.0199	0.0041
[1060] pyruvic acid [6.714]	6.3831	174	**0,008**	0.0118	0.0032	0.0038	0.0010	0.0111	0.0024	0.0576	0.0139
[11266] 2-hydroxybutyric acid [7.852]	8.1421	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[444972] fumaric acid [10.94]	13.7155	245	**0,016**	0.0077	0.0020	0.0000	0.0000	0.0035	0.0008	0.0134	0.0031
[196] adipic acid [12.996]	17.6563	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439194] glyceric acid [10.735]	13.51365	189	**0,000**	0.0083	0.0029	0.0040	0.0017	0.0076	0.0018	0.0643	0.0210
[439227] pipecolic acid 2 [11.22]	14.11505	156	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[3037582] mucic acid [18.907]	29.00955	333	**0,003**	0.0318	0.0059	0.0428	0.0176	0.0789	0.0141	0.4279	0.0650
[311] citric acid [16.615]	25.0081	347	**0,002**	0.1348	0.0408	0.0840	0.0181	0.1907	0.0234	0.6926	0.1662
[604] gluconic acid 2 [18.297]	28.7051	333	**0,000**	0.0749	0.0165	0.0537	0.0133	0.0894	0.0107	0.5149	0.0962
[500] 4-guanidinobutyric acid 2 [13.348]	18.292	174	**0,009**	0.7607	0.1525	0.4215	0.1317	0.4619	0.0834	2.6607	0.4089
[643798] citraconic acid 1 [11.003]	13.6503	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[92824] D-malic acid [12.794]	17.4903	147	**0,002**	0.4938	0.1315	0.1420	0.0367	0.6685	0.2230	1.9054	0.4156
[938] nicotinic acid [10.27]	12.2543	180	**0,001**	0.0068	0.0016	0.0032	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[867] malonic acid 1 [8.919]	10.10025	147	**0,001**	0.0098	0.0025	0.0039	0.0013	0.0038	0.0009	0.0422	0.0138
[71] gluconic acid 1 [17.693]	26.3986	333	**0,000**	0.0307	0.0062	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Sugars and polyols											
[441032] D (+)altrose 2 [17.46]	31.34345	205	**0,000**	0.0103	0.0063	0.0069	0.0047	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[441035] talose 1 [17.4]	26.6664	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439240] D-lyxose 2 [14.889]	22.1713	307	**0,005**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1658	0.0700	0.3748	0.2308
[439242] Raffinose [29.282]	49.599	87	**0,000**	0.2015	0.0565	0.2774	0.1201	0.1610	0.0352	0.5174	0.1083
[448388] D-allose 1 [17.278]	31.3464	319	**0,003**	0.0156	0.0101	0.0091	0.0033	0.0000	0.0000	0.1235	0.0635
[448388] D-allose 2 [17.521]	31.34605	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 1 [17.011]	26.29645	217	0,161	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5385	0.3808	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 2 [17.212]	26.5019	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[18950] D-mannose 2 [17.435]	27.124	205	**0,015**	0.2700	0.0850	0.0840	0.0379	0.2155	0.0463	0.7820	0.2808
[165577] leucrose [24.975]	41.5436	361	**0,000**	0.0088	0.0023	0.0055	0.0022	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[17106] L-(-)-fucose 2 [15.771]	23.3861	117	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[206] D (+) galactose 1 [17.409]	26.8576	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[206] D (+) galactose 2 [17.662]	26.567	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5984] fructose 1 [17.18]	26.2847	307	**0,000**	5.9420	1.6073	2.9722	1.4120	4.1048	0.7088	11.0350	1.9983
[5988] Sucrose [23.988]	39.6122	361	**0,008**	16.5867	2.5639	11.6509	4.0188	24.3769	2.0646	93.5286	23.2036
[6255] maltose 2 [24.915]	40.639	361		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6255] maltose 1 [24.702]	41.0872	361	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 1 [14.741]	21.98315	217	**0,000**	0.0234	0.0046	0.0000	0.0000	0.2483	0.0852	0.3034	0.1231
[65550] D-lyxose 2 [14.869]	22.1675	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[7427] D-(+) trehalose [24.752]	41.0641	361	0,671	0.0331	0.0098	0.0128	0.0033	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[94214] methyl-beta-D-galactopyranoside [16.935]	25.1884	204	**0,014**	0.1245	0.0669	0.0786	0.0509	0.0848	0.0340	0.1414	0.0638
[993] ribose [15.113]	22.1639	217	0,069	0.0320	0.0172	0.0158	0.0132	0.0000	0.0000	0.2730	0.1213
[10712] cellobiose 1 [24.444]	41.0547	361	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0386	0.0075	0.1476	0.0277
[10712] cellobiose 2 [24.7]	39.9997	204		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[16217663] maltitol [25.37]	41.5333	361	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439451] galactinol 2 [26.479]	44.4319	204	**0,004**	0.0306	0.0083	0.0193	0.0068	0.0348	0.0139	0.0000	0.0000
[5280961] 4',5,7-trihydroxyisoflavone [26.165]	45.6194	472	**0,000**	0.0229	0.0059	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0173	0.0031
[5281804] prunetin [25.888]	44.5017	413	**0,002**	0.1557	0.0730	0.0114	0.0041	0.0108	0.0016	0.0000	0.0000
[5780] D-sorbitol [17.898]	26.817	319	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[892] allo-inositol [17.245]	30.3133	318	**0,008**	1.4410	0.4060	0.5071	0.1320	2.8265	0.6670	6.9543	0.6901
[6251] D-mannitol [17.81]	26.7883	319	**0,028**	3.6743	1.4539	0.5613	0.1958	2.5520	0.5360	5.1921	1.1174
N-containing compounds											
[1000] 2-amino-1-phenylethanol [15.668]	11.67285	174	**0,003**	1.5672	0.2365	0.4869	0.0687	0.7203	0.1531	5.2388	1.4832
[1045] putrescine [15.709]	22.9538	174	**0,031**	1.1895	0.3077	0.6683	0.2469	0.4760	0.0702	1.5712	0.6934
[1176] urea [9.599]	11.86	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0360	0.0082	0.0553	0.0063	0.5966	0.1047
[138] 5-aminovaleric acid 1 [14.458]	20.5272	174	**0,001**	0.0306	0.0090	0.0155	0.0051	0.0315	0.0058	0.2104	0.0609
[156807] D-lyxosylamine 2 [14.861]	22.1726	217	**0,019**	0.2204	0.0552	0.1048	0.0234	0.3047	0.0492	0.8515	0.2108
[190] adenine 1 [17.066]	25.56855	264	**0,002**	0.0484	0.0138	0.0148	0.0029	0.0456	0.0076	0.1122	0.0360
[204] allantoin 1 [17.293]	26.3081	331	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4855	0.1108
[275] L-canavanine 1 [9.22]	10.6288	73	**0,000**	0.0053	0.0013	0.0000	0.0000	0.0287	0.0142	0.0000	0.0000
[275] L-canavanine 2 [18.325]	28.2389	220	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0535	0.0184	0.0000	0.0000
[2901] cycloleucine 2 [11.282]	14.1306	156	0,541	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439742] beta-cyano-L-alanine [11.288]	14.43705	141	**0,063**	0.1902	0.0376	0.0964	0.0469	0.0662	0.0199	0.1859	0.0402
[5280335] D-sphingosine 3 [22.527]	36.4437	204	**0,010**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0033	0.0008	0.0000	0.0000
[60961] adenosine [23.825]	39.0183	236	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0049	0.0016	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6262] L-ornithine 1 [14.349]	20.37305	142	**0,001**	0.5411	0.1700	0.0000	0.0000	0.6367	0.1869	1.4354	0.4170
[6262] L-ornithine 2 [16.632]	24.79105	174	**0,000**	0.1412	0.0448	0.0000	0.0000	0.1335	0.0427	0.0000	0.0000
[6613] pantothenic acid 2 [18.371]	28.2708	291	**0,034**	0.0141	0.0022	0.0096	0.0024	0.0000	0.0000	0.1943	0.0471
[66868] porphine 1 [10.77]	13.38905	285	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0011	0.0001	0.0018	0.0004	0.0000	0.0000
[6802] guanosine 2 [24.847]	41.171	324	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0025	0.0014	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[440473] L-mimosine 1 [8.863]	9.8049	188	**0,000**	0.0011	0.0002	0.0009	0.0003	0.0013	0.0002	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 1 [8.945]	8.7523	86		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 2 [10.607]	11.8712	158	**0,006**	0.0206	0.0033	0.0145	0.0041	0.0167	0.0062	0.0000	0.0000
[65098] norvaline 1 [7.582]	7.12225	72	**0,006**	0.0189	0.0062	0.0068	0.0034	0.0140	0.0037	0.0630	0.0162
[9750] citrulline 2 [16.691]	24.9119	157	0,104	0.1313	0.0688	0.0000	0.0000	0.0552	0.0161	0.0000	0.0000
[7405] L-pyroglutamic acid [13.218]	17.886	156	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
P-containing compounds											
[1004] phosphoric acid [9.966]	72.26395	299	**0,000**	27.0261	5.2818	18.6033	3.3648	29.7523	3.3551	253.4578	63.7579
[1015] O-phosphocolamine [16.232]	24.1432	299	**0,000**	0.0155	0.0050	0.0153	0.0030	0.0347	0.0069	0.1803	0.0637
[439183] 3-phosphoglycerate [16.495]	24.8314	357	**0,000**	0.0106	0.0019	0.0084	0.0040	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439958] D-glucose-6-phosphate 1 [21.394]	34.5566	387	**0,000**	0.4452	0.1079	0.1849	0.0666	0.1852	0.0372	0.6982	0.1189
[439958] D-glucose-6-phosphate 2 [21.558]	34.695	387	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0495	0.0104	0.3861	0.0853
[754] glycerol 1-phosphate [16.056]	23.8718	357	**0,039**	0.1398	0.0458	0.0803	0.0313	0.0703	0.0124	0.3507	0.1043
[439183] 3-phosphoglyceric acid [16.504]	24.8333	387	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0061	0.0033	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Others											
[835] dehydroascorbic acid 2 [17.139]	25.5038	173	**0,008**	0.0000	0.0000	0.0048	0.0014	0.0126	0.0031	0.0334	0.0140

Πίνακας 8: Μεταβολίτες ρίζας SD σε σταδιακές εφαρμογές

Ετικέτες γραμμής	RT	MZ	P(<0.05)	Control	SE	SD R 100Acc AVG	SE	SD R 150Acc AVG	SE	SD R 200Acc AVG	SE
Aminoacids											
[12647] L-homoserine 1 [11.141]	14.00875	146	**0,000**	0.0230	0.0116	0.0352	0.0076	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[12647] L-homoserine 2 [12.359]	16.4937	218	**0,028**	0.2707	0.0860	1.1557	0.4406	1.1510	0.5579	1.3453	0.4209
[145742] L-proline 1 [8.567]	9.1656	70	0,097	0.0337	0.0126	0.2404	0.1514	0.2070	0.0489	0.1698	0.0637
[145742] L-proline 2 [10.321]	12.4721	142	**0,000**	0.1656	0.0461	0.9965	0.3584	2.4919	1.2751	6.5799	1.3672
[189] acetyl-L-serine 2 [11.574]	15.0574	174	**0,000**	0.0039	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[236] L-asparagine 1 [14.496]	20.8668	188	0,241	4.3445	1.7979	10.3940	5.5034	3.3835	0.9322	4.4038	1.0791
[236] L-asparagine 2 [14.984]	21.6973	231	0,079	23.7199	4.0609	10.9591	2.5540	21.8725	4.1588	23.5952	7.4801
[239] Beta- alanine 1 [12.044]	15.786	248	**0,000**	0.4818	0.0903	2.1034	0.7226	3.1843	0.5339	1.3535	0.2549
[5950] L-alanine 1 [7.495]	7.5473	116	**0,012**	0.1704	0.0268	0.5251	0.1866	0.2943	0.1500	0.2363	0.0549
[5950] L-alanine 2 [11.182]	14.0467	147	**0,000**	0.0015	0.0001	0.0102	0.0022	0.0000	0.0000	0.0251	0.0040
[5951] L-serine 1 [9.706]	11.446	132	**0,022**	0.3026	0.0732	1.6321	0.6815	1.0252	0.3742	0.5479	0.1187
[5951] L-serine 2 [11.174]	14.2735	204	**0,000**	0.4240	0.1133	1.4338	0.3859	2.6883	0.6422	5.6541	1.2050
[6106] L-leucine 1 [8.298]	8.74145	86	**0,001**	0.0244	0.0059	0.2798	0.0483	0.0706	0.0518	0.0000	0.0000
[6137] L-methionine 2 [13.188]	18.0352	176	0,092	0.0787	0.0136	0.2491	0.1258	0.3112	0.1362	0.2208	0.1106
[614] L-proline 1 [8.58]	9.14485	70		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[614] L-proline 2 [10.341]	12.42595	142		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6057] L-tyrosine 2 [17.856]	27.1632	218	**0,000**	0.0293	0.0072	0.1646	0.0419	0.0000	0.0000	0.1032	0.0122
[6057] tyrosine 2 [17.871]	27.1642	218	**0,014**	0.0172	0.0045	0.1082	0.0277	0.1355	0.0443	0.0797	0.0185
[5960] aspartic acid 1 [12.002]	15.6461	160	**0,001**	0.0351	0.0113	0.2374	0.0829	0.1949	0.0705	0.1271	0.0319
[5960] aspartic acid 2 [13.207]	18.2293	232	**0,002**	0.3494	0.0964	2.2822	0.3035	1.3447	0.4066	2.7518	0.8774
[5962] L-lysine 2 [17.643]	26.854	317	**0,000**	0.1010	0.0265	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6274] L-histidine 3 [17.658]	26.8298	154	0,140	0.4761	0.1131	1.5167	0.8414	2.4574	1.0825	0.3449	0.0773
[6287] L-valine 2 [9.151]	10.3978	144	**0,000**	0.0766	0.0225	0.4748	0.1753	0.3485	0.0581	0.7881	0.0512
[6288] L-threonine 1 [10.224]	12.4399	147	**0,005**	0.0336	0.0074	0.1912	0.0614	0.3745	0.1773	0.0000	0.0000
[6288] L-threonine 2 [11.464]	14.96995	218	**0,001**	0.0871	0.0145	0.2735	0.0942	0.5819	0.1582	0.3505	0.0604
[6305] L-tryptophan 2 [20.466]	32.25275	202	**0,003**	0.0097	0.0035	0.0451	0.0068	0.3218	0.1348	0.0306	0.0035
[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	20.5151	246	**0,018**	0.7229	0.1664	2.1988	1.0125	1.7652	0.3036	2.5374	0.7836
[33032] L-glutamic acid 3 (dehydrated) [13.232]	18.0678	156	**0,000**	1.6258	0.4193	3.9156	1.5963	2.3586	1.0308	9.0914	1.4777
[738] L-glutamine 1 [13.431]	18.2956	155	0,060	0.0758	0.0192	0.5442	0.2439	0.5317	0.1977	0.0774	0.0148
[738] L-glutamine 2 [14.083]	19.8529	344	**0,003**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[738] L-glutamine 3 [16.092]	23.8337	156	0,158	2.8381	0.6190	17.2278	8.6087	16.1650	6.5574	11.2898	3.8016
[750] glycine [10.456]	12.719	174	**0,011**	0.1459	0.0282	0.4302	0.1533	0.3997	0.1252	0.4945	0.1019
[791] DL-isoleucine 1 [8.576]	9.26085	86	**0,004**	0.0441	0.0132	0.2599	0.1462	0.2514	0.0723	0.0520	0.0176
[791] DL-isoleucine 2 [10.225]	12.43575	158	**0,028**	0.0580	0.0270	0.1475	0.0650	0.4301	0.2008	0.0000	0.0000
Organic acids											
[16219560] lactobionic acid 1 [24.583]	41.5485	217	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[1060] pyruvic acid [6.714]	6.3831	174	**0,008**	0.0118	0.0032	0.0552	0.0148	0.0439	0.0327	0.0243	0.0047
[11266] 2-hydroxybutyric acid [7.852]	8.1421	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0160	0.0037
[444972] fumaric acid [10.94]	13.7155	245	**0,016**	0.0077	0.0020	0.0171	0.0100	0.0200	0.0055	0.0110	0.0035
[196] adipic acid [12.996]	17.6563	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1765	0.0174
[439194] glyceric acid [10.735]	13.51365	189	**0,000**	0.0083	0.0029	0.0533	0.0169	0.0442	0.0099	0.0862	0.0155
[439227] pipecolic acid 2 [11.22]	14.11505	156	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0083	0.0016
[3037582] mucic acid [18.907]	29.00955	333	**0,003**	0.0318	0.0059	0.5596	0.2294	0.1704	0.0421	0.6392	0.2323
[311] citric acid [16.615]	25.0081	347	**0,002**	0.1348	0.0408	0.5071	0.1397	0.3702	0.0747	0.2945	0.0398
[604] gluconic acid 2 [18.297]	28.7051	333	**0,000**	0.0749	0.0165	0.2905	0.0994	0.2488	0.0948	0.4813	0.0956
[500] 4-guanidinobutyric acid 2 [13.348]	18.292	174	**0,009**	0.7607	0.1525	4.1208	1.6028	1.8332	0.7410	2.9943	0.6857
[643798] citraconic acid 1 [11.003]	13.6503	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0260	0.0015
[92824] D-malic acid [12.794]	17.4903	147	**0,002**	0.4938	0.1315	2.2088	0.6709	1.5001	0.4491	0.7079	0.2093
[938] nicotinic acid [10.27]	12.2543	180	**0,001**	0.0068	0.0016	0.0549	0.0250	0.0578	0.0337	0.0740	0.0202
[867] malonic acid 1 [8.919]	10.10025	147	**0,001**	0.0098	0.0025	0.0588	0.0206	0.0515	0.0087	0.0332	0.0074
[71] gluconic acid 1 [17.693]	26.3986	333	**0,000**	0.0307	0.0062	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Sugars and polyols											
[441032] D (+)altrose 2 [17.46]	31.34345	205	**0,000**	0.0103	0.0063	0.0654	0.0180	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[441035] talose 1 [17.4]	26.6664	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439240] D-lyxose 2 [14.889]	22.1713	307	**0,005**	0.0000	0.0000	0.7568	0.1828	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439242] Raffinose [29.282]	49.599	87	**0,000**	0.2015	0.0565	2.4493	0.9738	3.6531	0.9781	1.0293	0.2529
[448388] D-allose 1 [17.278]	31.3464	319	**0,003**	0.0156	0.0101	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0867	0.0384
[448388] D-allose 2 [17.521]	31.34605	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 1 [17.011]	26.29645	217	0,161	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2724552] tagatose 2 [17.212]	26.5019	217		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[18950] D-mannose 2 [17.435]	27.124	205	**0,015**	0.2700	0.0850	1.2647	0.2790	1.1883	0.4425	1.5197	0.5349
[165577] leucrose [24.975]	41.5436	361	**0,000**	0.0088	0.0023	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[17106] L-(-)-fucose 2 [15.771]	23.3861	117	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0702	0.0199	0.0000	0.0000
[206] D (+) galactose 1 [17.409]	26.8576	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[206] D (+) galactose 2 [17.662]	26.567	319		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5984] fructose 1 [17.18]	26.2847	307	**0,000**	5.9420	1.6073	49.9883	15.6569	13.0511	4.7708	22.6543	6.6925
[5988] Sucrose [23.988]	39.6122	361	**0,008**	16.5867	2.5639	150.1410	63.5115	120.8715	36.3394	126.9169	22.8105
[6255] maltose 2 [24.915]	40.639	361		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6255] maltose 1 [24.702]	41.0872	361	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0474	0.0201	0.1378	0.0137	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 1 [14.741]	21.98315	217	**0,000**	0.0234	0.0046	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[65550] D-lyxose 2 [14.869]	22.1675	217	**0,000**	0.0000	0.0000	1.1496	0.1831	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[7427] D-(+) trehalose [24.752]	41.0641	361	0,671	0.0331	0.0098	0.0967	0.0604	0.1147	0.0708	4.2438	4.2186
[94214] methyl-beta-D-galactopyranoside [16.935]	25.1884	204	**0,014**	0.1245	0.0669	0.1344	0.0172	0.4992	0.2030	0.0824	0.0339
[993] ribose [15.113]	22.1639	217	0,069	0.0320	0.0172	0.1266	0.0520	0.2138	0.1201	0.2488	0.0354
[10712] cellobiose 1 [24.444]	41.0547	361	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[10712] cellobiose 2 [24.7]	39.9997	204		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[16217663] maltitol [25.37]	41.5333	361	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0180	0.0042	0.0290	0.0056	0.0338	0.0121
[439451] galactinol 2 [26.479]	44.4319	204	**0,004**	0.0306	0.0083	0.2749	0.1292	0.2720	0.1042	0.2003	0.0428
[5280961] 4',5,7-trihydroxyisoflavone [26.165]	45.6194	472	**0,000**	0.0229	0.0059	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5281804] prunetin [25.888]	44.5017	413	**0,002**	0.1557	0.0730	0.0147	0.0034	0.0234	0.0085	0.0000	0.0000
[5780] D-sorbitol [17.898]	26.817	319	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.5348	1.0411	0.0000	0.0000
[892] allo-inositol [17.245]	30.3133	318	**0,008**	1.4410	0.4060	6.3805	2.1491	10.8498	4.0607	4.8743	0.6915
[6251] D-mannitol [17.81]	26.7883	319	**0,028**	3.6743	1.4539	10.4749	3.0797	7.7301	2.9083	15.8751	6.2430
N-containing compounds											
[1000] 2-amino-1-phenylethanol [15.668]	11.67285	174	**0,003**	1.5672	0.2365	4.2612	1.3720	2.3502	0.5083	3.5866	0.5996
[1045] putrescine [15.709]	22.9538	174	**0,031**	1.1895	0.3077	5.4640	2.3842	3.2423	0.9861	2.3623	0.6009
[1176] urea [9.599]	11.86	147	**0,000**	0.0000	0.0000	0.2441	0.0752	0.2934	0.0748	0.4555	0.1014
[138] 5-aminovaleric acid 1 [14.458]	20.5272	174	**0,001**	0.0306	0.0090	0.1893	0.0431	0.2053	0.0233	0.2923	0.1270
[156807] D-lyxosylamine 2 [14.861]	22.1726	217	**0,019**	0.2204	0.0552	1.4792	0.7408	1.3027	0.5755	0.5253	0.0395
[190] adenine 1 [17.066]	25.56855	264	**0,002**	0.0484	0.0138	0.2678	0.1035	0.3287	0.0984	0.2091	0.0583
[204] allantoin 1 [17.293]	26.3081	331	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.3783	0.4747	0.0000	0.0000
[275] L-canavanine 1 [9.22]	10.6288	73	**0,000**	0.0053	0.0013	0.0000	0.0000	0.0824	0.0306	0.0000	0.0000
[275] L-canavanine 2 [18.325]	28.2389	220	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[2901] cycloleucine 2 [11.282]	14.1306	156	0,541	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439742] beta-cyano-L-alanine [11.288]	14.43705	141	**0,063**	0.1902	0.0376	0.4570	0.2180	0.6875	0.2884	0.1565	0.0232
[5280335] D-sphingosine 3 [22.527]	36.4437	204	**0,010**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[60961] adenosine [23.825]	39.0183	236	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[6262] L-ornithine 1 [14.349]	20.37305	142	**0,001**	0.5411	0.1700	0.0000	0.0000	2.9756	1.4228	0.0000	0.0000
[6262] L-ornithine 2 [16.632]	24.79105	174	**0,000**	0.1412	0.0448	0.0000	0.0000	0.5483	0.1769	0.3993	0.0326
[6613] pantothenic acid 2 [18.371]	28.2708	291	**0,034**	0.0141	0.0022	0.1482	0.0460	0.3743	0.2064	0.0935	0.0159
[66868] porphine 1 [10.77]	13.38905	285	**0,002**	0.0000	0.0000	0.0159	0.0041	0.0168	0.0112	0.0000	0.0000
[6802] guanosine 2 [24.847]	41.171	324	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[440473] L-mimosine 1 [8.863]	9.8049	188	**0,000**	0.0011	0.0002	0.0073	0.0028	0.0042	0.0012	0.0105	0.0033
[21236] L-norleucine 1 [8.945]	8.7523	86		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[21236] L-norleucine 2 [10.607]	11.8712	158	**0,006**	0.0206	0.0033	0.0822	0.0287	0.2494	0.1073	0.0000	0.0000
[65098] norvaline 1 [7.582]	7.12225	72	**0,006**	0.0189	0.0062	0.1147	0.0461	0.0546	0.0110	0.0199	0.0074
[9750] citrulline 2 [16.691]	24.9119	157	0,104	0.1313	0.0688	0.2306	0.1656	0.8156	0.4610	0.0000	0.0000
[7405] L-pyroglutamic acid [13.218]	17.886	156	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	7.3892	1.8805	3.2780	1.1618
P-containing compounds											
[1004] phosphoric acid [9.966]	72.26395	299	**0,000**	27.0261	5.2818	236.9986	50.6468	201.6880	41.2786	256.8954	55.8177
[1015] O-phosphocolamine [16.232]	24.1432	299	**0,000**	0.0155	0.0050	0.1267	0.0218	0.1483	0.0338	0.0550	0.0187
[439183] 3-phosphoglycerate [16.495]	24.8314	357	**0,000**	0.0106	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[439958] D-glucose-6-phosphate 1 [21.394]	34.5566	387	**0,000**	0.4452	0.1079	1.2178	0.1470	0.9150	0.2904	0.3923	0.1203
[439958] D-glucose-6-phosphate 2 [21.558]	34.695	387	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[754] glycerol 1-phosphate [16.056]	23.8718	357	**0,039**	0.1398	0.0458	0.2821	0.0869	0.3387	0.1051	0.3274	0.1124
[439183] 3-phosphoglyceric acid [16.504]	24.8333	387	**0,000**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Others											
[835] dehydroascorbic acid 2 [17.139]	25.5038	173	**0,008**	0.0000	0.0000	0.0730	0.0236	0.0477	0.0254	0.0000	0.0000