



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

Διδακτορική διατριβή

Επίδραση της αζωτούχου λίπανσης και της αλατότητας στην ανάπτυξη, τη διατροφική αξία και τον πρωτογενή μεταβολισμό δύο διαφορετικών οικότυπων σταμναγκαθίου (*Cichorium spinosum* L.) καλλιεργούμενου υδροπονικά

Μαρτίνα Ι. Χατζηγιάννη

Επιβλέπων Καθηγητής:

Δημήτριος Σάββας, Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Δημήτριος Σάββας, Καθηγητής ΓΠΑ

Ιωάννης Καραπάνος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Γεωργία Ντάτση, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2020**



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Διδακτορική διατριβή

Επίδραση της αζωτούχου λίπανσης και της αλατότητας στην ανάπτυξη, τη διατροφική αξία και τον πρωτογενή μεταβολισμό δύο διαφορετικών οικότυπων σταμναγκαθίου (*Cichorium spinosum* L.) καλλιεργούμενου υδροπονικά

Impact of nitrogen and salinity on stamnagathi growth, nutritional value and primary metabolism of two different ecotypes of stamnagathi (*Cichorium spinosum* L.) grown hydroponically

Μαρτίνα Ι. Χατζηγιάννη

Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Δημήτριος Σάββας, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ιωάννης Καραπάνος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Γεωργία Ντάτση, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Κωνσταντίνος Σαϊτάνης, Καθηγητής ΓΠΑ

Αναστάσιος Σιώμος, Καθηγητής Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σπυρίδων Πετρόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βασίλειος Φωτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστήμιο Κύπρου

Περίληψη

ΓΕΝΙΚΑ: Η υδροπονική καλλιέργεια του πολυετούς άγριου ραδικιού *Cichorium spinosum* L. που στην Ελλάδα και ιδιαίτερα στην Κρήτη παραδοσιακά ήταν ένα άγριο λαχανεύομενο είδος, γνωστό με το κοινό όνομα σταμναγκάθι, έχει αρχίσει τα τελευταία χρόνια να καλλιεργείται ως μονοετές φυτό. Στην παρούσα μελέτη, δύο εντελώς διαφορετικοί οικότυποι προερχόμενοι είτε από ορεινή (Οροπέδιο Ταύρης, Σφακιά – ορεινός οικότυπος) είτε από παραθαλάσσια περιοχή (Σταυρός Ακρωτηρίου, Χανιά – παραθαλάσσιος οικότυπος) της Κρήτης, καλλιεργήθηκαν υδροπονικά με θρεπτικό διάλυμα το οποίο περιείχε 4 ή 16 mM ολικού αζώτου σε συνδυασμό με τρεις διαφορετικές αναλογίες NH_4^+ -N/ολικό-N (0.05, 0.25 ή 0.50) κατά τη χρονική περίοδο 2012-2014, καθώς επίσης και με τρία διαφορετικά επίπεδα αλατότητας (0.3, 20, ή 40 mM NaCl), κατά το 2015. Σκοπός των πειραμάτων ήταν να μελετηθούν τυχόν γονοτυπικές διαφορές ως προς τα αγρονομικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά, αλλά και κατά κύριο λόγο τη μεταβολομική τους ανταπόκριση στις προαναφερόμενες πειραματικές επεμβάσεις.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Όταν τα φυτά έφτασαν στο εμπορικό στάδιο συγκομιδής τους, το ξηρό βάρος αυτών που προέρχονταν από τα ορεινά ήταν σε υψηλότερο επίπεδο από αυτό που παρατηρήθηκε για τον παραθαλάσσιο οικότυπο. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των θρεπτικών στοιχείων στα φύλλα τους, αυτές ήταν γενικά υψηλότερες στην περίπτωση των παραθαλάσσιων φυτών συγκριτικά με αυτές των ορεινών και για τις δύο συγκομιδές που πραγματοποιήθηκαν. Από την άλλη πλευρά, οι συγκεντρώσεις των νιτρικών στα φύλλα σταμναγκαθίου φάνηκε να επηρεάζονται τόσο από τα επίπεδα παροχής αζώτου όσο και από τις διαφορετικές αναλογίες NH_4^+ -N/ολικό-N και για τις δύο συγκομιδές που πραγματοποιήθηκαν. Ωστόσο τα φυτά του παραθαλάσσιου οικότυπου ήταν αυτά στα οποία παρατηρήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις νιτρικών στα φύλλα συγκρινόμενες με αυτές του ορεινού οικότυπου σε όλες τις μελετώμενες μεταχειρίσεις του πειράματος. Επιπλέον, στην περίπτωση της καταπόνησης με αλατότητα, ο παραθαλάσσιος οικότυπος φάνηκε αρκετά πιο ανθεκτικός στην παραγωγή βιομάζας καθώς επίσης περιείχε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό νερού και μακρό- και ιχνοστοιχείων στα φύλλα ανά μονάδα ξηρού βάρους. Ωστόσο, η περιεκτικότητα του νατρίου (Na^+) στο ριζικό σύστημα ήταν αξιοσημείωτα χαμηλότερη στον παραθαλάσσιο έναντι του ορεινού οικότυπου. Από την άλλη πλευρά, οι συγκεντρώσεις Na^+ στα φύλλα ήταν παρόμοιες και στους δύο οικότυπους όταν η εξωτερική παροχή του NaCl ήταν πάνω από 20 mM, με τα επίπεδα όμως του ορεινού οικότυπου έναντι του παραθαλάσσιου να είναι σημαντικά υψηλότερα στη μεταχείριση με την υψηλότερη συγκέντρωση αλάτων (40 mM NaCl). Παρόλο αυτά, οι συγκεντρώσεις του Cl^- ήταν αρκετά υψηλότερες στον παραθαλάσσιο οικότυπο συγκριτικά με αυτές του ορεινού σε όλες τις μεταχειρίσεις με αλατότητα. Επίσης, ο παραθαλάσσιος οικότυπος παρουσίασε μικρότερες συγκεντρώσεις τόσο στα ολικά φαινολικά οξέα, καροτενοειδή, φλαβονοειδή όσο και στα επίπεδα χλωροφύλλης συγκρινόμενος με αυτές του ορεινού οικότυπου για όλες τις εξεταζόμενες επεμβάσεις. Μελετώντας όλα τα ευρήματα, φαίνεται ότι στο μεσαίο επίπεδο αλατότητας (20 mM), η μεγαλύτερη αντοχή του παραθαλάσσιου οικότυπου συνδέεται με μηχανισμούς που μετριάζουν την τοξικότητα που προκαλούν τα ιόντα Na^+ και Cl^- , όπως για παράδειγμα η αραίωση των συγκεντρώσεών τους στους φυτικούς ιστούς μέσω διατήρησης υψηλότερης περιεκτικότητας νερού στα φύλλα. Σε υψηλά επίπεδα εξωτερικών συγκεντρώσεων NaCl όμως, ο αποτελεσματικός αποκλεισμός του Na^+ από τους φυτικούς ιστούς των φύλλων αποτελεί έναν ακόμη μηχανισμό που προσδίδει στον παραθαλάσσιο οικότυπο του σταμναγκαθίου παραπάνω ανθεκτικότητα σε συνθήκες αλατότητας σε σύγκριση με τον ορεινό οικότυπο. Τόσο ο παραθαλάσσιος όσο και ο ορεινός οικότυπος έδειξαν να χαρακτηρίζονται από αυξημένη αποτελεσματικότητα χρήσης του N, καθώς η βιομάζα τους δεν φάνηκε να εμφανίζει κάποιο σημαντικό περιορισμό (μείωση) όταν η παροχή του αζώτου στο θρεπτικό διάλυμα μειώθηκε από 16 σε 4 mM. Το ποσοστό του ολικού αζώτου στα φύλλα επίσης δεν επηρεάστηκε από τις συνθήκες αλατότητας,

ενώ η αλληλεπίδραση μεταξύ οικότυπου $\times$ επιπέδου ολικού-N ήταν μη σημαντική, αποδεικνύοντας έτσι ότι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντοχή των φυτών στην αλατότητα διαφέρουν μεταξύ των δύο οικότυπων και δεν συνδέονται με την απορρόφηση ή την αφομοίωση του N μέσα στο φυτό. Όσον αφορά το μεταβολικό προφίλ του σταμναγκαθιού, περισσότεροι από 180 πρωτογενείς μεταβολίτες καταγράφηκαν με τους απόλυτα ή πειραματικά αναγνωρισμένους μεταβολίτες να αντιστοιχούν ποσοτικά σε περισσότερο από το 80% του μεταβολικού προφίλ. Αρκετοί από αυτούς έχουν έναν ρόλο-κλειδί στη φυσιολογία των φυτών (π.χ. τρεχαλόζη, α-λινολενικό οξύ) και είναι επίσης σημαντικοί λόγω της θρεπτικής τους αξίας (π.χ. υδατάνθρακες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα). Τα διαφορετικά επίπεδα τόσο της παροχής αζώτου όσο και των αναλογιών NH_4^+ -N/ολικό-N δείχνουν μια ξεκάθαρη επίδραση στον μεταβολισμό των φυτών με αρκετούς από τους πρωτογενείς μεταβολίτες όπου συμμετέχουν σε περισσότερα του ενός μεταβολικά μονοπάτια, να συντίθεται σε υψηλότερα ή χαμηλότερα επίπεδα ανάλογα και με τις επεμβάσεις. Ωστόσο, και οι δύο οικότυποι παρουσίασαν σαφείς διακρίσεις στις επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν. Παρόλα αυτά, ο ορεινός οικότυπος φάνηκε να παρουσιάζει χαμηλότερα επίπεδα στην κατηγορία των υδατανθράκων (μονοσακχαρίτες) και υψηλότερα στον δισακχαρίτη τρεχαλόζη συγκριτικά με αυτά που αναπτύχθηκαν σε παράκτιες περιοχές (Σταυρός Ακρωτηρίου) όταν και οι δύο εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα παροχής αζώτου. Από την άλλη πλευρά, οι διαφορές που παρουσιάστηκαν μεταξύ των δύο οικότυπων κάτω από συνθήκες αλατότητας εστιάζονται κυρίως στους μεταβολίτες από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (μηλικό, φουμαρικό και ηλεκτρικό οξύ). Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι στον παραθαλάσσιο οικότυπο οι μεταβολίτες από τον κύκλο του κιτρικού οξέος επηρεάζονται πολύ λιγότερο από την αλατότητα συγκριτικά με τον ορεινό, δείχνοντας έτσι ότι τα πιο ανεκτικά στην αλατότητα φυτά είναι ικανά να εξοικονομούν ενέργεια για τις μετέπειτα φυσιολογικές τους διεργασίες. Αρκετοί γνωστοί ωσμωλύτες από την κατηγορία των αμινοξέων με πιο χαρακτηριστική την περίπτωση της προλίνης και του GABA παρουσίασαν διαφορετική ανταπόκριση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες παροχής αζώτου συνδυαζόμενη με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων. Πιο αναλυτικά, ο ορεινός οικότυπος φάνηκε να ακολουθεί πτωτική τάση στα επίπεδα των παραπάνω δύο μεταβολιτών, ενώ αντιθέτως ο παραθαλάσσιος οικότυπος ακολούθησε μια αυξητική πορεία στα επίπεδα τόσο στην περίπτωση της προλίνης όσο και του GABA. Από την άλλη πλευρά, σε χαμηλή παροχή αζώτου με υψηλή παρεχόμενη συγκέντρωση αλάτων και οι δύο οικότυποι ακολούθησαν μια ελαφρά αύξηση των επιπέδων αλλά μόνο στην περίπτωση της προλίνης. Όσον αφορά την κατηγορία των υδατανθράκων χαρακτηριστικότερα παραδείγματα όταν τα φυτά εκτίθενται σε καταπόνηση με υψηλά επίπεδα σε άλατα στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα αποτελούν η φρουκτόζη, γλυκόζη, τρεχαλόζη, μαννιτόλη και ινοσιτόλη. Πιο συγκεκριμένα, κάποιοι από αυτούς παρουσίασαν υπερέκφραση (up-regulation) με σκοπό την παραγωγή ενέργειας, όπως στην περίπτωση του παραθαλάσσιου οικότυπου αναπτυσσόμενος κάτω από διπλή αβιοτική καταπόνηση (χαμηλό άζωτο και αλατότητα) ή ακόμη στο να βοηθήσουν στην σύνθεση άλλων μεταβολιτών όπως στην περίπτωση της προλίνης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Οι δύο μελετώμενοι οικότυποι σταμναγκαθιού διέφεραν σημαντικά ως προς την ανταπόκριση τους στα διαφορετικά επίπεδα θρέψης καθώς και στην περιεκτικότητα των φύλλων σε νιτρικά. Ο ορεινός οικότυπος υπερετερούσε ως προς την ανάπτυξη, την (μικρότερη) περιεκτικότητα των φύλλων σε νιτρικά και στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα, με τον παραθαλάσσιο από την άλλη να παρουσιάζει περισσότερα θρεπτικά στοιχεία στα φύλλα και αυξημένη ανοχή στην αλατότητα. Μια χαμηλή παροχή αζώτου στο θρεπτικό διάλυμα (4 mmol L^{-1}) σε συνδυασμό με την υψηλή αναλογία NH_4^+ -N/ολικό-N (0,25 και πάνω) μπορεί να ελαχιστοποιήσει τις συγκεντρώσεις των νιτρικών στους φυτικούς ιστούς χωρίς να προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στις αποδόσεις του φυτού. Τέλος, όσον αφορά τη μελέτη του πρωτογενούς μεταβολισμού των δύο διαφορετικών άγριων οικότυπων σε συνθήκες ανάπτυξης με υψηλές συγκεντρώσεις σε άλατα, αυτή αποδεικνύει τη σαφή υπεροχή του παραθαλάσσιου οικότυπου έναντι του ορεινού οικότυπου, έχοντας ο πρώτος αναπτύξει (ή υιοθετήσει) μηχανισμούς πιο άμεσης ανταπόκρισης σε τέτοιου είδους αβιοτικές καταπονήσεις (GABA, προλίνη και καρβοξυλικά οξέα από τον TCA κύκλο).

Επιστημονική περιοχή: Υδροπονική καλλιέργεια σταμναγκαθιού

Λέξεις κλειδιά: Σταμναγκάθι, αζωτούχος λίπανση, αλατότητα, πρωτογενής μεταβολισμός

Abstract

BACKGROUND: The hydroponic cultivation of spiny chicory (*Cichorium spinosum* L.), also known as stamnagathi, allows the development of year-round production. In the current study, two contrasting stamnagathi ecotypes originating from a montane and a coastal-marine habitat were supplied with nutrient solution containing 4 or 16 mM total-N in combination with three different N source (NH_4^+ -N/total-N: 0.05, 0.25 or 0.50) during the years of 2012-2014, as well as with 0.3, 20, or 40 mM NaCl at 2015. The aim was to search for genotypic differences in nitrogen nutrition and salinity stress conditions.

RESULTS: At commercial maturity, the dry weight of mountainous plants was higher than that of seaside plants. The shoot mineral concentrations were higher in seaside plants than in mountainous plants in both harvests. The leaf nitrate concentration was influenced by the levels of both total-N and NH_4^+ -N/total-N at both harvests, whereas plants with a seaside origin exhibited higher nitrate concentrations than those originating from a mountainous site in all total-N and NH_4^+ -N/total-N treatments. Additionally, in the case of salinity stress, the coastal-marine ecotype was more salt tolerant in terms of fresh shoot biomass production and contained significantly more water and macro- and micro-nutrients in the shoot per dry weight unit. The root Na^+ concentration was markedly lower in the coastal-marine compared to the montane ecotype. The leaf Na^+ concentration was similar in both ecotypes at external NaCl concentrations up to 20 mM, but significantly higher in the montane compared to the coastal-marine ecotype at 40 mM NaCl. However, the leaf Cl^- concentration was consistently higher in the coastal-marine than in the montane ecotype within each salinity level. The marine ecotype also contained significantly less total phenols, carotenoids, flavonoids, and chlorophyll compared to the montane ecotype across all treatments. Integrating all findings, it appears that at moderate salinity levels (20 mM), the higher salt tolerance of the coastal-marine ecotype is associated with mechanisms mitigating Na^+ and Cl^- toxicity within the leaf tissues, such as salt dilution imposed through increased leaf succulence. Nevertheless, at high external NaCl levels, Na^+ exclusion may also contribute to enhanced salt tolerance of stamnagathi. Both ecotypes exhibited a high N-use efficiency, as their shoot biomass was not restricted when the total-N supply varied from 16 to 4 mM. The leaf organic-N was not influenced by salinity, while the interaction ecotype $\times$ N-supply-level was insignificant, indicating that the mechanisms involved in the salt tolerance difference between the two ecotypes was not linked with N-acquisition or -assimilation within the plant. With respect to the metabolic composition of stamnagathi, more than 180 metabolic features were recorded with the absolutely or tentatively identified metabolites to correspond quantitatively to more than 80% of the metabolite profiles. Many of the identified metabolites play key roles in plant physiology (e.g., trehalose, α -linolenate) and are also important for their nutritional value (e.g., carbohydrates, amino acids, fatty acids). Differences in both total-N and NH_4 -N/total-N levels imposed clear effects on the plant metabolism with various metabolites belonging to several biosynthetic pathways being synthesized in higher or lower levels depending on the treatments. Both ecotypes exhibited distinct responses to the treatments. Thus the montane ecotype (Sfakia) exhibiting, among others, substantially lower carbohydrate levels (monosaccharides) and higher disaccharide and α - α -trehalose levels compared to that originating from a coastal zone (Akrotiri) when both were treated with high N levels. On the other hand, the metabolic differences between the two ecotypes, which were commensurate with their different responses to salt stress, were mainly focused on the intermediates from the TCA cycle (malate, fumarate and succinate). More specifically, these metabolites were much more affected by salinity in the montane ecotype compared to that originating from a coastal-marine habitat, pointing out that salt tolerant plants are capable of saving energy for their further physiological processes. Some of the most common osmolytes from amino acids category, and especially in the case of proline and GABA, they have showed a completely

different respond under high total-N supply combined with high salinity levels among the two contrasting ecotypes. In particular, the montane one has followed a declined trend for both metabolites above, while in contrast the seaside ecotype increased its levels, for both proline and GABA. On the other hand, at low total-N and high salinity levels both ecotypes increased the levels of proline. In the group of carbohydrates, fructose, glucose, α,α -trehalose, mannitol and myo-inositol are playing a key-role in plant's protection under osmotic stress phenomena. In particular, some of them showed an overexpression (up-regulation), just in the case of the seaside ecotype growing under double stress conditions (low N supply combined with high salinity) in order to produce energy or to help the composition of other metabolites just like in the case of proline.

CONCLUSION: The two stamnagathi ecotypes differed considerably in their responses to nitrogen nutrition and tissue nitrate content. The mountainous ecotype was superior in terms of growth, tissue nitrate concentration and antioxidant capacity, whereas the seaside ecotype accumulated more nutrient microcations in leaves. A low total-N concentration (up to 4 mmol L⁻¹) combined with a high NH₄⁺-N/total-N ratio (up to 0.05) could minimize tissue NO₃⁻ concentrations without compromising yield.

Finally, in the case of the analysis of the primary metabolism among the two contrasting ecotypes growing under different salinity conditions indicates a completely different respond, showing that the mechanisms that have been adopted by the seaside ecotype are providing a higher tolerance under those abiotic stress conditions compared to the montane one (GABA, proline and carboxylic acids from the TCA cycle).

Scientific area: Hydroponic culture of stamnagathi

Keywords: Stamnagathi, nitrogen, salinity, primary metabolism

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την παρούσα διδακτορική διατριβή ολοκληρώνονται οι σπουδές μου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο τμήμα της Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής και στο Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών. Για την υλοποίηση των στόχων καθοριστική ήταν η συμβολή των καθηγητών μου πάνω στο γνωστικό αντικείμενο όπου διαπραγματεύεται η παρούσα διδακτορική μελέτη, και στους οποίους οφείλω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες για την ολοκλήρωση των σπουδών μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας μελέτης καθώς επίσης και Διευθυντή του Εργαστηρίου των Κηπευτικών Καλλιεργειών κύριο Δημήτριο Σάββα για τις χρήσιμες συμβουλές του και την επιστημονική καθοδήγησή του σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας. Οφείλω όμως να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου και στην Επίκουρο καθηγήτρια κυρία Γεωργία Ντάτση για την καθοριστική βοήθειά της σε ένα μεγάλο μέρος του διδακτορικού μου και τη συμβολή της στην υλοποίηση σημαντικών αναλύσεων για την έκβαση της παρούσας μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον λέκτορα του Γ.Π.Α κύριο Κωνσταντίνο Αλιφέρη για την πολύτιμη βοήθειά του στη διεξαγωγή των μεταβολομικών αναλύσεων.

Ευχαριστώ το προσωπικό του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων για την καθοριστική βοήθειά του στην πραγματοποίηση του πειραματικού σκέλους της διατριβής μου καθώς επίσης και το Ίδρυμα Μποδοσάκη όπου για τρία συνεχόμενα έτη υπήρξα υπότροφός τους. Ένα θερμό ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Ιωάννη Καραβίδα και την υποψήφια διδάκτορα Θεοδώρα Ντάναση για την υποστήριξη και συμπαράστασή τους δίνοντας μου έτσι ένα ακόμη παραπάνω κίνητρο να υλοποιήσω τους στόχους μου.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στην αδερφική μου φίλη και υποψήφια διδάκτωρ του Ε.Κ.Π.Α, Γεωργία Νάση, που αν και μακριά μου όλα αυτά τα χρόνια στάθηκαν δίπλα μου σε όλες τις δυσκολίες που αντιμετώπιζα και με βοηθούσαν να τις ξεπερνάω με μεγαλύτερη ευκολία. Το μεγαλύτερο όμως ευχαριστώ το οφείλω στον παππού μου που αν κι έχει φύγει από τη ζωή με την καθοριστική καθοδήγησή του από μικρό παιδί κατάφερα να φτάσω στη σημερινή διδακτορική διατριβή.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α	1
ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	1
1.1. ΣΤΑΜΝΑΓΚΑΘΙ Η «ΚΙΧΩΡΙΟΝ ΤΟ ΑΚΑΝΘΩΔΕΣ» (CICHORIUM SPINOSUM L.)	1
1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	1
1.3. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	2
1.4. ΕΔΑΦΟΚΛΙΜΑΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	3
1.5. ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΣΤΑΜΝΑΓΚΑΘΙΟΥ	4
1.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (N) ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΤΟΥΣ	5
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΒΙΟΤΙΚΗΣ (ΘΡΕΠΤΙΚΗΣ) ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ	5
1.7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ (SALINITY) ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ	9
ΤΟΥΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΤΡΕΣ (ΑΒΙΟΤΙΚ ΣΤΡΕΣ)	9
1.8. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β	16
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ (ΓΕΝΙΚΑ)	16
2.1. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	16
2.2. ΟΛΙΚΟ ΑΖΩΤΟ	17
2.3. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΣΕ ΝΩΠΟ ΦΥΤΙΚΟ ΙΣΤΟ	17
2.4. ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ	19
2.4.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	19
2.4.2. ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	19
2.4.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	20
2.5. ΟΛΙΚΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	20
2.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DPPH· ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ	21
ΤΟΥ DPPH· ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ (60MM)	21
2.6.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ TROLOX ΣΑΝ STANDARD	21
2.6.2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	21
ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΜΕ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΝΩΠΟΥ ΚΑΙ ΞΗΡΟΥ ΒΑΡΟΥΣ	22
2.8. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗ	22
2.9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ NO ₃ ⁻ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΙΟΝΤΙΚΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ	22
2.10. ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	23
2.10.1. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	23
2.10.2. ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	23
2.10.3. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	23
2.11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DPPH·	24
2.11.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	24
2.11.2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	24
2.12. ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ	24
2.13. ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΣΤΑΜΝΑΓΚΑΘΙΟΥ	25
2.13.1. ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΕ	25
ΦΥΛΛΑ ΣΤΑΜΝΑΓΚΑΘΙΟΥ	25

2.13.2. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (ΕΚΧΥΛΙΣΗ) ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΕΡΙΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟ (GC/EI/MS).	25
2.13.3. GAS CHROMATOGRAPHY–ELECTRON IMPACT-MASS SPECTROMETRY (GC/EI/MS) ΚΑΙ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	26
2.14. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ	30
ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	30
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	30
3.1. Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΝΤΟΣ ΤΟΥ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟΥ - ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	30
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	32
3.2. ΠΡΩΤΗ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΧΡΟΝΙΑ	32
3.3. ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΩΝ	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ 1^{ΗΣ} ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ	37
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 1^{ΗΣ} ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ	54
ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	54
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	54
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
4.1. ΓΕΝΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ GC/EI/MS ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	54
4.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΠΑΡΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΗΓΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΟΥ Ν ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΣΤΑΜΝΑΓΚΑΘΙΟΥ	68
4.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΠΑΡΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΗΓΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΟΥ Ν ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΣΤΑΜΝΑΓΚΑΘΙΟΥ	68
4.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΠΑΡΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΗΓΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΟΥ Ν ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ, ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΣΤΑΜΝΑΓΚΑΘΙΟΥ	69
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε	80
ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	80
ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΜΕ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	80

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 3^{ΗΣ} ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ	83
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΤ	106
ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	106
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	106
6.1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ GC/EI/MS ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	106
6.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΠΑΡΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΣΤΑΜΝΑΓΚΑΘΙΟΥ	121
6.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΠΑΡΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΣΤΑΜΝΑΓΚΑΘΙΟΥ	121
6.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΠΑΡΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ, ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΣΤΑΜΝΑΓΚΑΘΙΟΥ	122
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	124
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	133
ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	134
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	135

Κεφάλαιο Α

Γενική Εισαγωγή - Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1.1. Σταμναγκάθι ή «κιχώριον το ακανθώδες» (*Cichorium spinosum* L.)

Το *Cichorium spinosum*, ή «κιχώριον το ακανθώδες», ευρέως γνωστό στην Ελλάδα ως *σταμναγκάθι*, αποτελεί ένα πολύ διαδεδομένο λαχανικό σε πολλά μέρη της Ελλάδος και ειδικότερα στην Κρήτη αλλά και σε άλλες χώρες της Μεσογείου όπως Ιταλία, Κύπρος, Ισπανία αλλά με λιγότερο γνωστές αναφορές για τη χρήση του ως εδώδιμου λαχανικού. Το συγκεκριμένο λαχανικό διατίθεται σε πολύ υψηλές τιμές στην αγορά διότι θεωρείται πλούσιο σε αντιοξειδωτικά, με υψηλή διατροφική αξία και γι αυτό την τελευταία δεκαετία καλλιεργείται σε εμπορική κλίμακα αποφέροντας υψηλά κέρδη για τον παραγωγό. Ήταν γνωστό και από αρχαιότατων χρόνων λόγω του ότι παρουσιάζει πολλές σημαντικές φαρμακευτικές ιδιότητες όπως διουρητικές, αντισηπτικές κι αντιρρευματικές. Σύγχρονες έρευνες έχουν δείξει ότι είναι πλούσιο σε βιταμίνες E και K1 (Zeghichi, et.al., 2003), ω-3 λιπαρά οξέα καθώς επίσης έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ανόργανα στοιχεία όπως το κάλιο, ο φώσφορος και ο σίδηρος (Petropoulos et.al., 2016). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η προέλευση του ονόματός του καθώς προέρχεται από το αγκάθι που σχηματίζει το φυτό κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και την παραδοσιακή χρήση του παλαιότερα ως προστατευτικό πώμα στις πήλινες στάμνες του νερού για την αποφυγή εισόδου εντόμων εντός των σταμνών (στάμνα + αγκάθι).

1.2. Ταξινόμηση

Βασίλειο: Φυτά (Plantae)

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα (Angiosperms)

Ομοταξία: Δικοτυλήδονα

Τάξη: Αστερώδη (Asterids)

Οικογένεια: Asteraceae

Υποοικογένεια: Cichorioideae

Φυλή: Cichorieae

Γένος: *Cichorium*

Είδος: *spinosum*

Κοινή ονομασία: «κιχώριον το ακανθώδες» ή σταμναγκάθι ή γιαλοράδικο ή αλιφώνι.

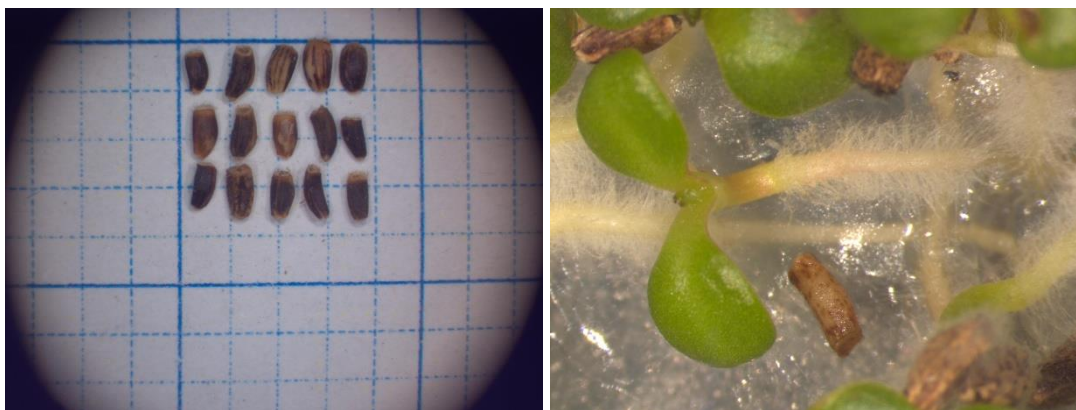


Εικόνα 1: Φυτά Σταμναγκαθιού που αναπτύσσονται σε παραλιακή περιοχή της Κρήτης (αριστερά) και φυτά που αναπτύσσονται σε υψόμετρο 1200 m (δεξιά)

1.3. Βοτανική περιγραφή

Το σταμναγκάθι αποτελεί ουσιαστικά έναν πολυετή θάμνο με ξυλώδες στέλεχος, το οποίο φυτρώνει κατά την περίοδο Σεπτεμβρίου – Οκτωβρίου και αναπτύσσεται βλαστικά όλο τον χειμώνα, ενώ η ανθοφορία του ξεκινά από τον Μάιο έως και τον Αύγουστο, σχηματίζοντας άνθη ιώδους χρωματισμού και σπανιότερα λευκού χρώματος (εικόνα 1). Επιπλέον, παρουσιάζει τα εξής στάδια ανάπτυξης: α) ξεκινά με τη βλάστηση των σπόρων και την εμφάνιση των 2 κοτυληδόνων (εικόνα 2), β) την ανάπτυξη κανονικών φύλλων με την μορφή ροζέτας (εικόνα 3) και γ) την ανάπτυξη του αρχικά πράσινου αγκαθιού στο κέντρο της ροζέτας που με το πέρασ του χρόνου καλύπτει τη φυλλική επιφάνεια κι από σκούρο πράσινο μετατρέπεται σε καφέ-μπεζ. Ακολουθεί η μετέπειτα ανάπτυξη των ανθέων πάνω στο αγκάθι και η δημιουργία καρπιδίων που αποτελούνται από περίπου 5 καρπούς στο σύνολο, με την εποχή ωρίμανσής τους να ποικίλλει ανάλογα την περιοχή προέλευσής τους (παραθαλάσσια ή ορεινά σταμναγκάθια) (εικόνα 1 και 2). Πιο συγκεκριμένα, η εποχή ωρίμανσης των σπόρων ξεκινάει τον μήνα Σεπτέμβριο, και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει μέχρι και τον μήνα Οκτώβριο.

Τα στελέχη εκτείνονται στα 3.5-18 cm κατά το αναπαραγωγικό τους στάδιο, με ακανθωτές διακλαδώσεις από τη βάση του φυτού, με τις ανώτερες διακλαδώσεις να είναι μη-ανθίζουσες, αλλά επίσης ακανθωτές. Τα φύλλα έχουν μέγεθος στα $2-9 \times 0.2-1.5$ cm, λοβωτά, πετρόβολα οδοντωτά, στρογγυλόκορφα ελαφρώς σαρκώδη και σκούρου πράσινου χρώματος, σχηματίζοντας έναν σφαιρικό ρόδακα. Τέλος, το ριζικό σύστημα του φυτού είναι πασσαλώδες, ενώ με την πάροδο του χρόνου σχηματίζει έναν κωνικό ριζοκόκδυλο που περιέχει γαλακτώδη χυμό (Παππά κ.α., 2016).



Εικόνα 2: Σπόροι σταμναγκαθιού και φυτά στο στάδιο των δύο κοτυληδόνων



Εικόνα 3: Ρόδακας (ή ροζέτα) σταμναγκαθιού (δεξιά) και το ανθικό στέλεχος στο κέντρο της ροζέτας (αριστερά)

1.4. Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις και καλλιεργητικές τεχνικές

Το *σταμναγκάθι* είναι ένα φυτό που αναπτύσσεται ιδανικά σε γόνιμα και καλά στραγγιζόμενα εδάφη. Ένα χαρακτηριστικό του είναι η μεγάλη του αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες ακόμη και κάτω των -10°C (έως και τους -18°C), ενώ αντιθέτως υποφέρει από τις ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες, πράγμα που το οδηγεί στην ταχύτερη ανάπτυξη του αγκαθιού και της ανθοφορίας. Τα εδάφη που προτιμά είναι τα ελαφρώς όξινα έως και ήπια αλκαλικά ($6.1 < \text{pH} < 7.8$) (Παππά, 2016). Το «άγριο ροδίκιο», όπως είναι και μια άλλη ονομασία του στην Κρήτη, απαντάται κυρίως τόσο στις αμώδεις όσο και στις απόκρημνες βραχώδεις περιοχές και μπορεί άνετα να προσαρμοστεί στις ειδικές οικολογικές συνθήκες που δημιουργούνται από τη θαλασσινή αλμύρα και υγρασία (Σταυριδάκης, 2006). Γι' αυτόν τον λόγο ένα από τα πολύ ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά του είναι η υψηλή αντοχή σε εδάφη με αλατότητα, αν και μπορεί να του προκαλέσουν μια μικρή μείωση στον αριθμό και το μέγεθος των φύλλων καθώς επίσης και στο νωπό του βάρος (Ακουμιανάκης, 2010 και Κλάδος, 2009). Τέλος, επειδή το *σταμναγκάθι* έχει την ικανότητα να απορροφά διάφορα χημικά στοιχεία, όπως για παράδειγμα βαρέα μέταλλα όπως το χρώμιο (Antoniadis et al., 2017), και άλλες ενώσεις που υπάρχουν στο έδαφος, θα ήταν καλύτερα να αποφεύγεται η συλλογή φυτών σταμναγκαθιού που αναπτύσσονται κοντά σε ρυπασμένα εδάφη όπως δρόμοι μεγάλης κυκλοφορίας ή σκουπιδότοποι (Αλιμπέρτης, 1994).

Όσον αφορά την καλλιέργειά, αυτή ξεκινάει με την σπορά των σπόρων το φθινόπωρο (Σεπτέμβριο-Οκτώβριο), ενώ λόγω της ικανότητάς του να αναβλαστάνει, η καλλιεργητική του περίοδος εκτείνεται στους 9 με 10 μήνες με εξαίρεση τους καλοκαιρινούς μήνες λόγω των υψηλών θερμοκρασιών. Αν και είναι πολυετές φυτό συχνά καλλιεργείται ως ετήσιο, με τη συγκομιδή της ροζέτας να πραγματοποιείται όταν έχει αποκτήσει το κατάλληλο μέγεθος και πριν την εμφάνιση του κεντρικού αγκαθιού (Τσαρούχας, 2011; Μενδώνη, 2015). Το κόστος εγκατάστασης ανέρχεται στα 200-250 € το στρέμμα με το ύψος της παραγωγής να φθάνει τα 1500-2000 κιλά ανά στρέμμα. Οι τιμές παραγωγού κυμαίνονται συνήθως από 2 έως και 4 € το κιλό, ενώ στην λιανική αγορά διατίθεται με 5-8 €/kg, με αποτέλεσμα να αποδίδει ένα καθαρό κέρδος από 2000 έως 2700 € το στρέμμα (www.bicofcrete.gr). Καθώς απολαμβάνει υψηλών

τιμών στην αγορά, η καλλιέργεια του σταμναγκαθιού έχει την ικανότητα να επεκταθεί τα επόμενα χρόνια. Συνήθως φύεται και αναπτύσσεται τυχαία στη φύση και συλλέγεται για προσωπική κατανάλωση από τα φυσικά οικοσυστήματα όπου και συναντάται. Αν και παραδοσιακά καταναλωνόταν ως αυτοφύες λαχανοφόμο φυτό που συλλεγόταν στα φυσικά του οικοσυστήματα, τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει εισαχθεί σε καλλιέργεια εμπορικής κλίμακας, και πιο συγκεκριμένα στην Κρήτη. Το φυτό μπορεί να καλλιεργηθεί είτε με απευθείας σπορά είτε μεταφυτεύοντας σπορόφυτα. Προς το παρόν δεν υπάρχουν διαθέσιμες ποικιλίες σταμναγκαθιού και το πολλαπλασιαστικό υλικό προέρχεται από σπόρους που συλλέγονται από άγριους πληθυσμούς και αναπαράγονται.

1.5. Διατροφική αξία του σταμναγκαθιού

Το συγκεκριμένο λαχανικό είναι λογικό να φτάνει σε αρκετά υψηλές τιμές στα σούπερ-μάρκετ και στις ανοιχτές αγορές επειδή θεωρείται ότι είναι πλούσιο σε αντιοξειδωτικά κι επομένως παρουσιάζει μια αρκετά υψηλή διατροφική αξία, ενώ επιπλέον συνδυάζει μια πληθώρα από φαρμακευτικές ιδιότητες όπως π.χ. διουρητικές, καθαρτικές, κ.α. Επιπλέον, αναφέρεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί κι ως φάρμακο για το συκώτι, είναι ευρέως γνωστό για τις αντισηπτικές και αντί-ρευματικές χρήσεις, ενώ παράλληλα είναι πλούσιο σε βιταμίνες E (α- and γ-tocopherols) και K1, και ιδιαίτερα πλούσιο σε αντιοξειδωτικές ουσίες οι οποίες είναι απαραίτητες για την ομαλή και φυσιολογική λειτουργία της καρδιάς (Zeghichi, et al., 2003), ω-3 λιπαρά οξέα, καθώς και σε μεταλλικά στοιχεία (Petropoulos et al., 2016). Για όλους τους παραπάνω λόγους, το σταμναγκάθι κατατάσσεται στην κατηγορία των υγιεινών τροφών. Από προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και αναφέρθηκαν παραπάνω, έχει αποδειχθεί ότι το σταμναγκάθι αποτελεί ένα φυτό με πλούσια αντιοξειδωτική δραστηριότητα, υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, πολυφαινόλες, ω-3 λιπαρά οξέα και άλλα πολλά θρεπτικά στοιχεία ωφέλιμα για την ανθρώπινη υγεία. Πιο συγκεκριμένα, μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κρήτη στα πλαίσια μεταπτυχιακής διατριβής έδειξε ότι τα επίπεδα του ασκορβικού οξέος κυμάνθηκαν από 17,58 έως 36,58 mg ανά 100 g νωπού φυτικού ιστού, για την α-τοκοφερόλη από 4,30 έως 9,78 mg 100 g, για το β-καροτένιο από 2,24 έως 2,66 mg 100 g και τέλος για τη γλουταθειόνη 8,22 έως 13,77 mg 100 g νωπού φυτικού ιστού (Zeghichi et.al., 2003). Επιπλέον, σε έρευνα των Vardavas et.al., (2006) που πραγματοποιήθηκε σε φυτά της κρητικής υπαίθρου συμπεριλαμβανομένου και του σταμναγκαθιού, αναφέρεται ότι τα ολικά φαινολικά οξέα μετρήθηκαν στα 132 mg ανά 100 g νωπού βάρους, η α-τοκοφερόλη και η γ-τοκοφερόλη στα 1,23 και 0,83 mg ανά 100 g νωπού βάρους, αντίστοιχα, η λουτεΐνη, το β-καροτένιο και η βιταμίνη K1 στα 1160, στα 595, και στα 240 μg ανά 100 g νωπού βάρους, αντίστοιχα, και τέλος η βιταμίνη C μετρήθηκε στα 27 mg ανά 100 g νωπού βάρους.

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε φυτά σταμναγκαθιού τα οποία συγκομίστηκαν σε 4 διαφορετικά στάδια ανάπτυξης μετρήθηκαν εκτός των άλλων το ασκορβικό οξύ, η α και η γ-

τοκοφερόλη, λιπαρά οξέα συμπεριλαμβανομένων των ω -3 λιπαρών οξέων καθώς επίσης και των θρεπτικών στοιχείων όπως το K, Ca, Mg, Fe σε νωπό φυτικό ιστό (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Διατροφική αξία του *Cichorium spinosum* σε mg ανά 100 g νωπού φυτικού ιστού σύμφωνα με τους [Petroopoulos et.al. \(2017\)](#).

	2 ^ο στάδιο ανάπτυξης (175 ΗΜΦ)	3 ^ο στάδιο ανάπτυξης (195 ΗΜΦ)	4 ^ο στάδιο ανάπτυξης (205 ΗΜΦ)
Ασκορβικό οξύ	0.030	0.090	0.020
α-τοκοφερόλη	0.302	0.563	0.717
γ-τοκοφερόλη	0.478	0.320	0.152
ω-3 λιπαρά οξέα	72.16	63.46	59.08
K	358.6	347.3	362.4
Ca	252.3	178	142.6
Mg	37.4	33.5	29.4
Fe	0.62	0.61	0.54

1.6. Επίδραση του αζώτου (N) στην ανάπτυξη των φυτών και στη μεταβολομική τους ανταπόκριση κάτω από συνθήκες αβιοτικής (θρεπτικής) καταπόνησης

Τα νιτρικά (NO_3^-) και τα αμμωνιακά (NH_4^+) αποτελούν τις δύο πιο σημαντικές πηγές απορρόφησης του αζώτου από τα φυτά ([Kusano et al., 2011](#)). Άλλες μορφές αζώτου, όπως τα νιτρώδη ιόντα (NO_2^-), τα οξειδία του αζώτου (N_2O_x), η υδροξυλαμίνη (NH_2OH) και η ουρία [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$], εμφανίζονται σε αρκετά πιο χαμηλά επίπεδα στο έδαφος και η αξιοποίησή τους από τα φυτά είναι αμελητέα. Επιπλέον, οι πιο επαρκείς πηγές αζώτου στα φυσικά περιβάλλοντα καθώς επίσης και στα γεωργικά συστήματα βρίσκονται με τη μορφή των ιόντων NO_3^- ([von Wiren et al., 2000](#)). Αρκετοί ερευνητές στο παρελθόν έχουν μελετήσει την πρόσληψη των NO_3^- και την απόκρισή τους στην ανάπτυξη των φυτών ενώ πιο πρόσφατες μελέτες προχωρούν ένα βήμα παρακάτω κι ασχολούνται με τον μεταβολισμό τους από τα διάφορα φυτικά είδη. Μια επαρκής παροχή αζώτου είναι απαραίτητη για μια φυσιολογική ανάπτυξη και για τις υψηλές αποδόσεις στις λαχανοκομικές καλλιέργειες. Παρόλο αυτά, αν η παροχή του αζώτου είναι πλεονάζουσα, πολλά από τα λαχανικά συσσωρεύουν τα νιτρικά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις κυρίως στα εδώδιμα μέρη τους, και ειδικότερα στα φύλλα. Γενικά, υψηλή συσσώρευση νιτρικών παρατηρείται κυρίως στα φύλλα και στους μαλακούς βλαστούς, ακολουθούμενα από τις ρίζες και τα υπόγεια βλαστικά όργανα, όπως οι ριζοκόνδυλοι ([Σάββας, 2016](#)). Η συγκέντρωση των νιτρικών στους εδώδιμους ιστούς είναι πολύ σημαντική όσον αφορά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά ενός λαχανικού.

Υψηλές ποσότητες νιτρικών στα λαχανικά είναι συχνά υπό συζήτηση λόγω της ευρείας απειλής τους ως προς την ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, τα νιτρώδη μπορούν να αντιδράσουν με τις αμίνες και τα αμίδια στον ανθρώπινο σώμα και με μετατραπούν σε νιτροζαμίνες και νιτροσαμίδια, τα οποία αποτελούν δύο

συστατικά γνωστά για την καρκινική τους δράση (Walker, 1990). Από την άλλη πλευρά όμως, τα NO_3^- , λόγω της κεφαλαιώδους σημασίας τους ως θρεπτικών συστατικών, δρουν σαν μόρια που διαμορφώνουν ένα μεγάλο εύρος από τις φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών, συμπεριλαμβανομένων της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος (Vidal and Gutierrez, 2008; Krouk et al., 2010a; Alvarez et al., 2012), των φύλλων (Rahayu et al., 2005), της περιόδου της ανθοφορίας (Marin et al., 2011) και του λήθαργου των σπόρων (Alboresi et al., 2005). Επιπρόσθετα, τα φυτά έχουν αναπτύξει διάφορους (κάποιες φορές αρκετά σύνθετους) μηχανισμούς ώστε να είναι ικανά να ανιχνεύουν την παρουσία των νιτρικών και να ρυθμίζουν την αφομοίωση τους με ενέργεια προερχόμενη απευθείας από την φωτοσύνθεση, μέσω της δράσης ειδικών ενζύμων όπως η ρεδουκτάση των νιτρικών, η ρεδουκτάση των νιτρωδών και οι συνθετάσες της γλουταμίνης και του γλουταμινικού οξέος (Bowsher et al., 1989, 1992). Αν τα νιτρικά που απορροφά το φυτό είναι περισσότερα από αυτά που μπορεί ή χρειάζεται το φυτό να μεταβολίσει, η περίσσεια συσσωρεύεται στα χυμοτόπια. Οι συγκεντρώσεις των νιτρικών που δεν μεταβολίζονται αλλά παραμένουν αποθηκευμένα στα χυμοτόπια εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων της εποχής του έτους, της έντασης του φωτός, των συνθηκών καλλιέργειας, της χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων και του φυτικού τμήματος στο οποίο γίνεται ο προσδιορισμός τους. Στην Βόρεια Ευρώπη υπάρχει η τάση τα λαχανικά να συσσωρεύουν περισσότερα νιτρικά σε σχέση με τις νοτιότερες περιοχές της Ευρώπης, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ως αποτέλεσμα της μικρότερης έντασης του φωτός και των λιγότερων ηλιόλουστων ωρών. Παρόλα αυτά, το άζωτο θεωρείται ως ένα από τα πιο απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξη των φυτών, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις εξωτερικού NH_4^+ είναι τοξικές για τα περισσότερα φυτικά είδη, και ο βαθμός ανθεκτικότητάς τους εξαρτάται από το είδος του φυτού, την καλλιέργεια και τις συνθήκες ανάπτυξης τους (Barker and Mills, 1980). Και οι δύο μορφές του παρεχόμενου αζώτου μπορούν να επηρεάσουν την περιεκτικότητα σε νιτρικά στα εδάφιμα μέρη των φυλλωδών λαχανικών. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα, είναι δύσκολο να βρεθούν πληροφορίες που αφορούν την επίδραση του επιπέδου και των παρεχόμενων μορφών αζώτου στην ποιότητα του καλλιεργούμενου σταμναγκαθιού.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το άζωτο είναι ένα από τα πιο σημαντικά μακροστοιχεία καθώς αποτελεί ένα απαραίτητο στοιχείο για τη σύνθεση χλωροφύλλης, αμινοξέων και κατ' επέκταση πρωτεϊνών, νουκλεικών οξέων, λιπιδίων καθώς επίσης και μιας πληθώρας από πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχουν το άζωτο ως στοιχείο στη δομή τους. Ουσιαστικά, εντός του φυτού, τα νιτρικά μετατρέπονται σε νιτρώδη (NO_2^-) μέσω του ενζύμου της νιτρικής ρεδουκτάσης (NR: Foyer and Ferrario, 1994; Foyer et al., 1998), και μετά σε αμμωνιακά μέσω της δράσης ενός άλλου ενζύμου, αυτού της ρεδουκτάσης των νιτρωδών (NiR: Bowsher et al., 1988; Hoff et al., 1994). Εν τέλει, τα αμμωνιακά κυρίως βοηθούν στη δημιουργία των αμινοξέων μέσω αντιδράσεων οι οποίες καταλύονται από τη συνθετάση της γλουταμίνης (GS) και τη συνθετάση του γλουταμινικού οξέος (GOGAT: Ferrario-Mery et al., 2002;

Lancien et al., 2002). Ως εκ τούτου, η σύνθεση οργανικών οξέων, και ειδικότερα του α-κετογλουταρικού οξέος, το οποίο δρα ως δέκτης των αμμωνιακών στο μονοπάτι της GOGAT, και του μηλικού οξέος που δρα ως αντί-ανιόν (counter-anion) και αντικαθιστά τα νιτρικά προς αποφυγήν αλκαλοποίησης, είναι απαραίτητη για την αφομοίωση των νιτρικών (Stitt, 1999).

Η ανάλυση των πρωτεϊνών (Proteomics) και η μεταβολομική ανάλυση (Metabolomics) αποτελούν τις δύο πιο σημαντικές “-omic” τεχνικές. Η πρώτη αφορά τη μελέτη πρωτεϊνών μεγάλης κλίμακας ενός οργανισμού οι οποίες κωδικοποιούνται από το γονιδιώμα του ενώ η μεταβολομική ανάλυση εστιάζει στο προφίλ μεταβολιτών που έχουν χαμηλό μοριακό βάρος (μέχρι 1000 Da) (Brosché et al., 2005). Με τον όρο «metabolomics» ορίζεται μια ολοκληρωμένη και ποιοτική ανάλυση όλων των μικρών μορίων σε ένα βιολογικό σύστημα και αποτελεί ένα δυνατό εργαλείο για την εκτενή μελέτη ως προς τον τρόπο όπου τα μεταβολικά δίκτυα ρυθμίζονται, όπως αυτά έχουν εφαρμοσθεί από αρκετούς ερευνητές τα τελευταία χρόνια. Επιπλέον, το φυτικό βασίλειο ενδέχεται να περιέχει από 200.000 έως 1.000.000 μεταβολίτες, ενώ για τα πιο απλά είδη όπως αυτό της *Arabidopsis* για παράδειγμα, ο αριθμός μπορεί να προσεγγίσει μερικές χιλιάδες (Obata and Fernie, 2012). Οι περισσότερες μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούνται από τους ερευνητές για την ανίχνευση των μεταβολιτών σε όλον τον κόσμο μπορούν να ανιχνεύσουν μόλις 1.000 με 2.000 μοριακά στοιχεία (Fernie et al., 2011). Η αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (Gas chromatography-mass spectrometry GC-MS), η υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (liquid chromatography LC-MS), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis CE-MS), το NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy) συγκαταλέγονται στις πιο διαδεδομένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση του μεταβολομικού προφίλ. Επιπλέον, τεχνικές όπως η Ion trap, time-of-flight (TOF), quadruple (q)-TOF, Orbitrap, και η Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς από αρκετούς ερευνητές, μεταξύ των οποίων η Orbitrap και η FTICR-MS και αποτελούν τις πλέον αξιόπιστες και αποτελεσματικές τεχνικές στο κεφάλαιο της Μεταβολομικής.

Η πιο διαδεδομένη τεχνική για τη μεταβολομική ανάλυση φυτών γίνεται με τη χρήση αέριου χρωματογράφου με φασματομετρία μάζας (GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry). Οι πολικοί μεταβολίτες υφίστανται παραγωγοποίηση, ώστε να καταστούν πτητικοί και μετέπειτα να διαχωρισθούν από το GC. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της τεχνολογίας είναι τα σταθερά και επαρκώς αναπτυγμένα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση και συντήρηση του μηχανήματος, την αξιολόγηση και ερμηνεία των χρωματογραφημάτων καθώς επίσης και το γεγονός ότι έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό για τις αναλύσεις των μεταβολιτών (Fernie et al., 2004; Halket et al., 2005; Lisec et al., 2006; Obata and Fernie, 2012). Κάποιες από τις πιο χρηστικές βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιούνται για την περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι η NIST (Kumari et al., 2011), FiehnLib (Kind et al., 2009) και η Golm metabolic (GMD, Kopka et al., 2005). Παρόλο αυτά, η τεχνική του GC-MS παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα καθώς υπάρχει ένας περιορισμός όσον αφορά την ανίχνευση θερμικά σταθερών

πτητικών ενώσεων, κάνοντας έτσι την ανάλυση των υψηλότερων όσον αφορά το μοριακό βάρος ενώσεων (μεγαλύτερες από 1 kDa), πιο δύσκολη. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι πρωτεΐνες, οι βιταμίνες, αρκετοί δευτερογενείς μεταβολίτες (π.χ. φλαβονοειδή) καθώς επίσης και άλλα μεγαλύτερα και περιπλοκότερα λιπίδια. Λόγω όμως των αρκετών θετικών του χαρακτηριστικών του, το GC-MS, επιτυγχάνει μια ολοκληρωμένη αναγνώριση και ισχυρή ποσοτικοποίηση μερικών χιλιάδων μεταβολιτών σε φυτικά δείγματα συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων (sugars και sugar alcohols), αμινοξέων, οργανικών οξέων και πολυαμινών, έχοντας ως αποτέλεσμα μια ικανοποιητική κάλυψη των κεντρικών (μεταβολικών) μονοπατιών του πρωτογενούς μεταβολισμού.

Το μεταβολικό προφίλ χρησιμοποιείται ευρέως για τη διαγνωστική και για την εξέταση των μηχανισμών που έχουν αναπτυχθεί και υιοθετηθεί από τα φυτά και τις ανταποκρίσεις τους σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών καταπονήσεων (στρες), συμπεριλαμβανομένου του θρεπτικού, της τοξικότητας από βαρέα μέταλλα, της θερμοκρασίας και του οξειδωτικού και ωσμωτικού στρες. Η περιορισμένη παροχή θρεπτικών στοιχείων επιδρά σε πολύ σημαντικό βαθμό στην ανάπτυξη των φυτών και στον μεταβολισμό τους, και ειδικά η έλλειψη σε μακροστοιχεία, όπως ο άνθρακας (C), το άζωτο (N), ο φώσφορος (P) και το θείο (S), τα οποία διαδραματίζουν ρόλο-κλειδί στον μεταβολισμό καθώς τα περισσότερα οργανικά μόρια αποτελούν έναν συνδυασμό από τα στοιχεία αυτά. Είτε λόγω των πολλαπλών ρόλων τους στην ανάπτυξη των φυτών και στις φυσιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν μέρος, είτε λόγω των βιοχημικών τους ρόλων, η έλλειψη των N, P, ή K μπορεί άμεσα ή έμμεσα να επιδράσει στα μεταβολικά μονοπάτια των φυτών και ως εκ τούτου στην ποσότητα των μεταβολιτών.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, μελέτες που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί από τους [Urbanczyk-Wochniak and Fernie \(2005\)](#) δείχνουν ότι η έλλειψη αζώτου μειώνει δραστικά τα επίπεδα των αμινοξέων, όπως ήταν αναμενόμενο. Επιπλέον, το επίπεδο του α-κετογλουταρικού οξέος, το οποίο αποτελεί έναν σημαντικό μεταβολίτη-κλειδί στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του άνθρακα και του αζώτου ([Fernie, 2003](#)), μειώθηκε κάτω από συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας αζώτου, καθώς επίσης το κιτρικό οξύ (citrate), το ισοκιτρικό οξύ (isocitrate), το ηλεκτρικό οξύ (succinate), το φουμαρικό οξύ (fumarate) και το μηλικό οξύ (malate), ενώσεις που ουσιαστικά αποτελούν ενδιάμεσες ουσίες του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCA cycle). Οι [Tschoep et al., \(2009\)](#), οι οποίοι ανέλυσαν την επίδραση της ήπιας αλλά σταθερής έλλειψης αζώτου σε φυτά *Arabidopsis* βρήκαν ότι τα επίπεδα του μηλικού και φουμαρικού οξέος ήταν σημαντικά μειωμένα σε συνθήκες χαμηλού-N όπως είχε βρεθεί και στα φυτά τομάτας ([Urbanczyk-Wochniak and Fernie, 2005](#)). Μία πιο πρόσφατη μελέτη από τους [Sung et al., \(2015\)](#), οι οποίοι μελέτησαν το μεταβολικό προφίλ της τομάτας (σε φύλλα και σε ρίζες) κάτω από συνθήκες θρεπτικής καταπόνησης (αζώτου, φωσφόρου και καλίου – NPK) και ειδικότερα τους πρωτογενείς μεταβολίτες, βρήκαν ότι οι περισσότεροι από αυτούς παρουσίασαν μια αξιοσημείωτη αλλαγή όσον αφορά την αφθονία τους στα φύλλα και τις ρίζες κατά τη διάρκεια της καταπόνησης. Επιπλέον, τα περισσότερα

αμινοξέα και οργανικά οξέα του κύκλου του κιτρικού οξέος μειώθηκαν σημαντικά και στους δύο ιστούς κατά την 5^η και τη 15^η μέρα διεξαγωγής των πειραματικών μεταχειρίσεων. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα των οργανικών οξέων όπως αυτά του κιτρικού, φουμαρικού, μηλικού και ηλεκτρικού οξέος, να μεν μειώθηκαν κατά την μεταχείριση της 5^{ης} μέρας αλλά ανάκαμψαν την 15^η μέρα των εξεταζόμενων μεταχειρίσεων. Από την άλλη μεριά, και πάλι για την περίπτωση της θρεπτικής καταπόνησης με αζωτούχο λίπανση, οι αλλαγές στα επίπεδα των υδατανθράκων συσχετίζονταν άμεσα με το είδος του εξεταζόμενου ιστού, καθώς στα μεν φύλλα παρουσιάστηκε μείωση της τάξεως του 25–50%, ενώ οι ρίζες από την άλλη εμφανίζονταν σε αρκετά πιο αυξημένα επίπεδα. Γενικότερα, στα δεχόμενα χαμηλή παροχή N φύλλα, οι όποιες αλλαγές στην αφθονία των υδατανθράκων εξαρτώνταν τόσο από τον φυτικό ιστό όσο και από το είδος του ανιχνευμένου υδατάνθρακα.

Εν κατακλείδι, παρουσιάστηκε μια αρκετά υψηλή αύξηση του α-κετογλουταρικού οξέος στις ρίζες κάτω από συνθήκες έλλειψης αζώτου, που άγγιζε το 22-πλάσιο και 14-πλάσιο σε σύγκριση με συνθήκες επάρκειας NPK κατά την 5^η και 15^η μέρα, αντίστοιχα. Στην περίπτωση των φυτών καλαμποκιού, τα αμινοξέα, τα οργανικά οξέα καθώς επίσης και τα λιπαρά οξέα παρουσίασαν μια αρκετά σημαντική μείωση στα επίπεδα τους κάτω από συνθήκες χαμηλού-N (Schlüter et al., 2012). Επίσης, σε φυτά καλαμποκιού, σε μελέτη από τους Amiour et al., (2012), μια μακροχρόνια έκθεση σε συνθήκες έλλειψης αζώτου οδηγεί σε μια σημαντική ελάττωση στα περισσότερα αμινοξέα καθώς επίσης και στις ενώσεις οι οποίες περιέχουν άζωτο στη δομή τους, όπως το GABA. Τα οργανικά οξέα από τον κύκλο του κιτρικού οξέος και οι υδατάνθρακες όπως η γλυκόζη και φρουκτόζη επίσης μειώθηκαν κάτω από συνθήκες θρεπτικής καταπόνησης, με μειωμένη παροχή αζώτου. Τέλος όσον αφορά την αλατούχο καταπόνηση, προηγούμενη μελέτη αναφέρει ότι στα φυτά του σταμναγκαθιού, κάτω από συνθήκες αλατότητας, παρατηρούνται διαφορές στα επίπεδα σημαντικών μεταβολιτών όπως το GABA, οι υδατάνθρακες με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη φρουκτόζη και τη γλυκόζη, αλλά και σε διάφορα αμινοξέα (L-leucine, L-isoleucine, L-valine) (Ntatsi, et al., 2017a).

1.7. Επίδραση της αλατότητας (salinity) στην ανάπτυξη των φυτών και στη μεταβολομική τους ανταπόκριση κάτω από συνθήκες στρες (abiotic stress)

Η ενημέρωση των καταναλωτών για την ικανότητα των φρέσκων λαχανικών να προστατεύουν την ανθρώπινη υγεία και να συμβάλλουν στη μακροζωία έχει αυξηθεί, ειδικά κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών (Kyriacou et al., 2016) με συνέπεια να έχουν αλλάξει σημαντικά και οι καταναλωτικές συμπεριφορές. Οι αλλαγές αυτές στη συμπεριφορά των καταναλωτών έχουν οδηγήσει σε μία επαναξιολόγηση της ποιότητας των φρέσκων φρούτων και λαχανικών τα οποία πλέον συνιστούν μέρος μιας πιο «εξατομικευμένης» διατροφής που ακολουθείται από αρκετούς τα τελευταία χρόνια (Kyriacou and Roupael, 2018). Σε ανταπόκριση σε αυτές τις νέες εξελίξεις, οι καλλιεργητές, οι διατροφολόγοι, καθώς επίσης και οι επιστήμονες επιδιώκουν να προσδιορίσουν καλλιέργειες λαχανικών

οι οποίες θα μπορούν να παραχθούν χωρίς επιπλέον κόστος για τις αγορές, και οι οποίες θα παρουσιάζουν υψηλές θρεπτικές φαρμακευτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες (Slavin and Llyod, 2012)

Σε αρκετές περιοχές της Μεσογείου, οι καλλιεργητές λαχανικών είναι υποχρεωμένοι να χρησιμοποιούν χαμηλής ποιότητας νερό (π.χ. υψηλής αλατότητας), και ειδικότερα σε παραθαλάσσιες περιοχές, οι οποίες αντιμετωπίζουν σοβαρά προβλήματα εναλάτωσης του υδροφόρου ορίζοντα. Υπερβολική συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (NaCl) στο νερό άρδευσης και/ή στο έδαφος είναι ικανή να δημιουργήσει ωσμωτική καθώς επίσης και ειδική τοξική καταπόνηση, με συνέπεια να εμφανίζονται σοβαρά προβλήματα στη μορφολογία, ανατομία, και φυσιολογία του φυτού αλλά και αλλαγές στη μεταβολομική τους συμπεριφορά (Munns, 2005; Colla et al., 2013a; Ntatsi et al., 2017a, Rouphael et al., 2017a,b, 2018a). Πιο συγκεκριμένα, η περίσσεια συγκέντρωση των Na^+ και Cl^- στο ριζικό σύστημα είναι επιβλαβής για τα περισσότερα από τα καλλιεργούμενα φυτά, καθώς σε αυτά προκαλούνται αποσύνθεση των χρωστικών τους ουσιών (χλωροφύλλη και καροτενοειδή) (Lucini et al., 2015), παρεμπόδιση της πρόσληψης των μακρο- και ιχνοστοιχείων, μετατόπιση και αφομοίωση (Grattan and Grieve, 1999), και περιορισμό ως προς την αφομοίωση του καθαρού CO_2 (Colla et al., 2013b). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, τα φυτά να παρουσιάζουν μειωμένη ανάπτυξη και οι αποδόσεις τους να μειώνονται θεαματικά (Lucini et al., 2016; Rouphael et al., 2017a). Αν και η αλατότητα γενικότερα μειώνει την παραγωγή, σε πολλές περιπτώσεις ένα ήπιο προς μέτριο στρες, επίσης γνωστό ως «*eustress*», μπορεί να επαυξήσει τη βιοσύνθεση και την συσσώρευση μερικών βιοενεργών δευτερογενών ουσιών (καροτενοειδή, φαινολικές ενώσεις, οργανοθειϊκές ενώσεις, πολυαμίνες κλπ.), όπως έχει αποδειχθεί για αρκετά είδη κηπευτικών τα οποία καλλιεργούνται κάτω από προστατευόμενες συνθήκες (Rouphael et al., 2012, 2017a, b, 2018b). Παρόλο αυτά, η συσσώρευση ή η αποδόμηση κάποιων συγκεκριμένων οργανικών μορίων και δευτερογενών μεταβολιτών εξαρτάται από πολλούς αλληλοεπιδρώμενους παράγοντες όπως το είδος του φυτού ή ο οικότυπος (ποικιλία), από την περίοδο και το μέγεθος της έκθεσής του στις συνθήκες αυτές, καθώς επίσης και από τους αγρονομικούς χειρισμούς (Rouphael and Kyriacou, 2018). Επιπλέον, οι καλλιέργειες φυλλωδών λαχανικών επικεντρώνονται στη μεγιστοποίηση των αποδόσεων μέσω της εντατικοποίησης της χρήσης λιπασμάτων, και ειδικότερα των νιτρικών λιπασμάτων, καθώς αυτά αποτελούν την πιο σημαντική πηγή αζώτου (N) για την ενίσχυση της παραγωγής (Borgognone et al., 2013). Η ελαχιστοποίηση της παροχής αζώτου, διατηρώντας ταυτόχρονα το ύψος και την ποιότητα των αποδόσεων, αποφεύγοντας έτσι τις επιπτώσεις στο περιβάλλον κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική για τους παραγωγούς αποτελώντας παράλληλα μια σημαντική πρόκληση για τη βιομηχανία των κηπευτικών (Colla et al., 2010, 2011; Borgognone et al., 2016). Παρόλα αυτά, αρκετοί συγγραφείς (Stefanelli et al., 2010; Becker et al., 2015; Borgognone et al., 2016) έχουν αποδείξει ότι η χαμηλή διαθεσιμότητα σε άζωτο μπορεί να αυξήσει τις συγκεντρώσεις των ωφέλιμων για την ανθρώπινη υγεία βιοενεργών ενώσεων π.χ. ολικά φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, όπως και φαίνεται σε διάφορες ποικιλίες φυλλωδών λαχανικών

όπου προορίζονται για νωπή (ή απευθείας) κατανάλωση καθώς επίσης και στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων.

Παρά την αυξανόμενη οικονομική σημασία του *σταμναγκαθίου* σαν ένα νεοεμφανιζόμενο στην αγορά προϊόν, υπάρχει έλλειψη πληροφοριών στην επιστημονική βιβλιογραφία σχετικά με την ανταπόκριση του στη καταπόνηση που προκαλεί η αλατότητα. Μια σχετικά πρόσφατη μελέτη από τους [Klados and Tzortzakis \(2014\)](#) αναφέρει ότι αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις του NaCl στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα στα 40 mmol L⁻¹ είναι ικανή να προκαλέσει μείωση στην παραγωγή βιομάζας αλλά να αυξήσει τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών οξέων, παρουσιάζοντας έτσι ένα νέο προφίλ γεύσεων (bitterness και sourness). Σε άλλη μελέτη οι [Petropoulos et al., \(2017\)](#) έδειξαν ότι η αύξηση της αγωγιμότητας στο ριζικό σύστημα του σταμναγκαθίου σε επίπεδα από 6 έως και 8 dS m⁻¹, αύξησε την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη εκφρασμένη σε νωπό βάρος, αλλά και την αντιοξειδωτική δραστηριότητα, παράλληλα όμως δεν φάνηκε να επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών οξέων. Εντούτοις, δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για το πως τα επίπεδα αυτών των φυτοχημικών ενώσεων διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο (ή δόση) της αζωτούχου λίπανσης, τις συγκεντρώσεις του NaCl ή την αλληλεπίδρασή τους.

Μερικές από τις σημαντικότερες αβιοτικές καταπονήσεις οι οποίες επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη των φυτών, την παραγωγή βιομάζας, τις αποδόσεις και την παραγωγή σπόρων σε ποσοστά που μπορούν να αγγίξουν ή ακόμη και να ξεπεράσουν το 70%, είναι αυτά της αλατότητας, της έλλειψης νερού, και των χαμηλών ή υψηλών θερμοκρασιών. Οι καταπονήσεις αυτές επηρεάζουν και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των φυτών προκαλώντας σημαντικές αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ. Επιπλέον, τα συμπτώματα που παρουσιάζουν τα φυτά όταν αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες αλατότητας εξαρτώνται κατά πολύ από τον γονότυπο του φυτού, το είδος, το στάδιο ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται καθώς επίσης και από τη διάρκεια και την ένταση της καταπόνησης ([Parihar et al., 2015; Borrelli et al., 2018](#)). Όταν τα φυτά εκτίθενται σε συνθήκες αλατότητας, τα υψηλά ποσοστά αλάτων παρεμποδίζουν τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης είτε επειδή τα στομάτια των φύλλων παραμένουν κλειστά, είτε λόγω της μείωσης της σπαργής των φύλλων, ή ακόμη και λόγω της παραγωγής διαφόρων ορμονών που περιορίζουν την αύξηση του φυτού τόσο στους βλαστούς όσο και στις ρίζες ([Chaves et al., 2009](#)). Παρόλο αυτά, ένας περαιτέρω περιορισμός της φωτοσύνθεσης σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να είναι και αποτέλεσμα της αύξησης των συγκεντρώσεων του Na⁺ στα φύλλα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναστολή αρκετών φωτοσυνθετικών ενζύμων, και κατά συνέπεια της μείωσης στην περιεκτικότητά τους σε χλωροφύλλη ([Munns et al., 2006](#)). Η αλατότητα θεωρείται υπεύθυνη για πολλές από τις αλλαγές που αφορούν την περιεκτικότητα σε ιόντα αλλά και αρκετών σημαντικών μεταβολιτών στα φυτά. Ωστόσο, μια μη ισορροπημένη ύπαρξη θρεπτικών στοιχείων μπορεί να οδηγήσει σε ανταγωνιστικά φαινόμενα μεταξύ του Na⁺ και του Cl⁻, τα οποία με τη σειρά τους είναι ικανά να προκαλέσουν μείωση στην απορρόφηση των κύριων για την ανάπτυξη των φυτών μεταλλικών στοιχείων όπως το K⁺, το Ca²⁺, το Mg²⁺, τα NH₄⁺ και τα NO₃⁻ ([Hu and Schmidhalter,](#)

2005), ενώ από την άλλη πλευρά μια έλλειψη στις συγκεντρώσεις των ιχνοστοιχείων φαίνεται να σχετίζεται με το υψηλό pH στο περιβάλλον των ριζών κάτω από συνθήκες αλατότητας (Zhu et al., 2004). Επιπλέον, η ύπαρξη αλατότητας στα εδάφη μπορεί να βλάψει τα φυτά μέσω δύο διαφορετικών φυσιολογικών μηχανισμών. Ο ένας μηχανισμός σχετίζεται με τη δραστική μείωση του ωσμωτικού δυναμικού το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα να περιορίζεται η απορρόφηση νερού από το ριζικό σύστημα με συνέπεια να περιορίζεται η αύξηση του φυτού τόσο λόγω κλεισίματος των στοματίων όσο και λόγω μείωσης της σπαργής των κυττάρων των φύλλων. Ο δεύτερος βλαπτικός μηχανισμός που επάγει η αλατότητα είναι η ειδική τοξική δράση που προκαλεί η περίσσεια των ιόντων νατρίου και χλωρίου μέσα στο κυτόπλασμα των κυττάρων των φύλλων (Hasegawa et al., 2000; Munns, 2002; Munns and Tester, 2008). Για να αμυνθούν ενάντια στις παραπάνω βλαπτικές επιδράσεις της αλατότητας, τα φυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να μπορούν να επιβιώνουν κάτω από συνθήκες υψηλής αλατούχου καταπόνησης, με τους πιο διαδεδομένους αρχικά να είναι η ανίχνευση του εκάστοτε αβιοτικού στρες καθώς επίσης και η δράση αρκετών γονιδίων και μεταβολιτών που σχετίζονται άμεσα με την καταπόνηση. Μέσα από τη μελέτη της συμπεριφοράς των φυτών κάτω από συνθήκες σημαντικών αβιοτικών στρες, οι ερευνητές μπορούν πια να κατανοήσουν ευκολότερα της υιοθετημένες από τα φυτά μεταβολικές αλλαγές, με τη γνώση αυτή να είναι χρήσιμη στην εισαγωγή και υιοθέτηση νέων στρατηγικών που θα συνεισφέρουν στη βελτιστοποίηση της αντοχής των φυτών στο στρες αντί της συνεχούς χρήσης ανθεκτικών ποικιλιών (Benjamin et al., 2019). Η ανθεκτικότητα ως προς την αλατότητα ουσιαστικά αποτελεί ένα πολυσύνθετο σύστημα όπου τα φυτά έχουν αναπτύξει διαφορετικές στρατηγικές ώστε να επιβιώνουν κάτω από τις συνθήκες αυτές. Κυρίως συμπεριλαμβάνουν τον αποκλεισμό των ιόντων Na^+ από τους βλαστούς, με στόχο την αποφυγή πιθανών βλαπτικών επιδράσεων στο φυτό λόγω επικείμενης αύξησης της συγκέντρωσης αυτού του ιόντος στα κύτταρα των μεταβολικά ενεργών φύλλων (Munns and Tester, 2008; Hasegawa, 2013). Επιπλέον, υπάρχουν ακόμα αρκετοί μηχανισμοί που συσχετίζονται με την αντοχή στην αλατότητα κάτω από υψηλά επίπεδα Na^+ , και είναι ευρέως γνωστοί ως αντοχή των ιστών (tissue tolerance). Αυτή η αντοχή βασίζεται στην ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση του Na^+ στα χυμοτόπια και στην κατακράτηση του K^+ στο κυτόπλασμα. Έτσι, τα ανόργανα άλατα συσσωρεύονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα χυμοτόπια, όπου δεν λαμβάνει χώρα δραστηριοποίηση ευαίσθητων στο Na^+ ενζύμων, ενώ αντίθετα στο κυτόπλασμα, όπου πραγματοποιούνται όλες οι μεταβολικές διεργασίες, την ωσμωτική εξισορρόπηση αναλαμβάνουν διάφορες διαλυτές και μη τοξικές για τα ένζυμα οργανικές ουσίες, όπως οργανικά οξέα, αμινοξέα, κ.λπ., τα οποία συχνά αναφέρονται ως ωσμωλύτες. Τέτοιου είδους μηχανισμοί είναι αποτελεσματικοί ακόμη και σε μεγάλες τιμές αλατότητας και χαρακτηρίζουν φυτά που έχουν υψηλού βαθμού ανεκτικότητα στην αλατότητα (αλόφυτα) (Σάββας, 2016, Munns et al., 2016, Shabala and Pottosin, 2014).

Η προλίνη είναι ένας τεραστίας σημασίας πρωτογενής μεταβολίτης λόγω της προστατευτικής της λειτουργίας (ιδιότητας) όταν τα φυτά εκτίθενται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Ουσιαστικά δεν αποτελεί απλά έναν μόνο συμβατό ωσμωλύτη (compatible osmolyte), αλλά συμβάλλει και στην προστασία της δράσης των ενζύμων, απομακρύνει τις βλαβερές ελεύθερες ρίζες, δρα ως ρυθμιστής της κυτταρικής οξειδοαναγωγής, ως ρυθμιστής του pH στο κυτοδιάλυμα αλλά επίσης και ως σταθεροποιητής των υποκυτταρικών δομών (Kishor et al., 2005; Verbruggen and Hermans, 2008). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι υψηλές συγκεντρώσεις προλίνης στους βλαστούς και τα φύλλα όταν τα φυτά αναπτύσσονται κάτω από υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, επάγονται είτε λόγω της έκφρασης γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα υπεύθυνα για τη σύνθεση της προλίνης είτε λόγω της μείωσης των ενζύμων που προκαλούν την οξείδωσή της (Amini and Ehsanpour, 2005). Επιπλέον, η προλίνη επίσης φάνηκε να παίζει σημαντικό ρόλο-κλειδί στην προστασία της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας σε φυτά του *Opuntia streptacantha* κάτω από συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα σύμφωνα με τους Silva-Ortega et al., 2008. Επιπλέον, η προλίνη έχει έναν κρίσιμο και συνάμα προστατευτικό ρόλο έναντι του NaCl-επαγόμενου θανάτου των κυττάρων, τον οποίο επιτελεί μέσω της εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, αλλά και λόγω της βελτίωσης της σταθερότητας των μεμβρανών που προκύπτει από την αύξηση των αντίστοιχων (αντιοξειδωτικών) γονιδίων.

Μια εξίσου σημαντική ομάδα για την αντοχή των φυτών στην αλατότητα (αν και δεν μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη) είναι και οι φυτορμόνες, οι οποίες έχουν έναν ρόλο ως ενδογενείς ρυθμιστές ανάπτυξης και μπορούν να ρυθμίζουν πολλές από τις φυσιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα εντός των φυτικών οργανισμών, όπως η βλάστηση, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός τους. Πιο συγκεκριμένα, οι αυξίνες, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Jung and Park, 2011) είναι γνωστές για τον ρόλο τους ως ρυθμιστές στην επίδραση του στρες αλατότητας στα φυτά. Οι γιββερελλίνες (Gibberellins-GA₃) έχουν τον έλεγχο στις περισσότερες από τις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών καθώς βοηθούν τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην προστασία από την εκάστοτε καταπόνηση. Για παράδειγμα, έχει διαπιστωθεί ότι το GA₃ βελτιώνει τις δυσμενείς συνέπειες που μπορεί να προκαλέσει η αλατότητα σε φυτά σόγιας (*Glycine max*), κι αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στη ρύθμιση των επιπέδων άλλων φυτορμονών (Hamayun et al., 2010), ενώ η εξωγενής εφαρμογή GA₃ σε συνδυασμό με άζωτο βελτιώνει κατά πολύ την απόκριση των *Brassica juncea* σε συνθήκες αλατότητας (Siddiqui et al., 2008). Από την άλλη μεριά, το αμπισικό οξύ (ABA) θεωρείται ως μια ορμόνη η οποία συσσωρεύεται κάτω από συνθήκες καταπόνησης (Szepesi et al., 2009). Για παράδειγμα, σε φυτά *Sorghum bicolor*, το ABA επιβράδυνε τη επιβλαβή επίδραση του NaCl, βελτιώνοντας την αντοχή στα παραγόμενα ιοντικά στρες (Amzallag et al., 1990). Επιπρόσθετα, οι κυτοκινίνες μπορεί να δρουν ανταγωνιστικά με το ABA στα φυτά αλλά θεωρούνται επίσης υπεύθυνες για την αύξηση της αντοχής των φυτών έναντι του στρες αλατότητας. Μια πιο πρόσφατη μελέτη από τους Wu et al. (2013), σε φυτά μελιτζάνας, έδειξαν ότι η παροχή εξωγενούς

κυτοκινίνης βελτίωσε αρκετά την αντίσταση του φυτού κάτω από συνθήκες αλατότητας, μια αντίσταση η οποία συσχετίζεται με την αύξηση των συγκεντρώσεων της προλίνης. Το αιθυλένιο με τη σειρά του αποτελεί μια σημαντική φυτορμόνη η οποία δρα κυρίως ως ουσία μετάδοσης σήματος για αρκετά αβιοτικά στρες συμπεριλαμβανομένου και αυτού της αλατότητας. Το σαλικυλικό οξύ προστατεύει την ανάπτυξη του φυτού αλλά και ενισχύει το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κάτω από συνθήκες στρες αλάτων (Nazar et al., 2011). Τέλος, το μονοξειδίο του αζώτου (νιτρικό οξείδιο-NO) είναι επίσης υπεύθυνο για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των φυτών στην αλατότητα με ενδεικτικά αποτελέσματα σε νεαρά σπορόφυτα ρυζιού (Uchida et al., 2002) αλλά και σπορόφυτα καλαμποκιού (*Zea mays*) (Zhang et al., 2004) τα οποία προστατεύτηκαν από το στρες μέσω της εφαρμογής με NO.

Προηγούμενες μελέτες πάνω στον μεταβολισμό των φυτών έχουν επισημάνει ότι κάτω από συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα οι μεταβολίτες των φυτών μπορεί να επηρεαστούν σε αρκετά μεγάλο βαθμό, και έχουν καταλήξει ότι αυτοί που επηρεάζονται περισσότερο είναι τα αμινοξέα, τα σάκχαρα, οι πολυόλες (polyols) και οι σχετιζόμενοι με τον κύκλο του Krebs μεταβολίτες (Saito and Matsuda, 2010). Όπως είναι ήδη γνωστό, τα φυτά που αναπτύσσονται κάτω από τις συνθήκες αυτές εμφανίζουν σοβαρά προβλήματα στην ανάπτυξη τους αλλά και στην επιβίωσή τους όχι μόνο λόγω της αφυδάτωσης και της τοξικότητας από τα ιόντα αλλά και λόγω της μεταβολικής και θρεπτικής ανισορροπίας, τα οποία μαζί αποτελούν ένα σύνθετο (περίπλοκο) φυσιολογικό σύνδρομο (Tester and Davenport 2003). Υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν ήδη διεξαχθεί πάνω στην επίδραση της αλατότητας στο μεταβολικό προφίλ διαφόρων φυτικών ειδών όπως για παράδειγμα στην τομάτα, την άμπελο, τη λεύκα, το λιμόνιο (*Limonium latifolium*) και το ρύζι. Επιπλέον, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε πάνω σε ένα ανθεκτικό είδος δένδρου ως προς την αλατότητα, το *Populus euphratica*, έδειξε μια αύξηση στα επίπεδα των αμινοξέων, κι ειδικότερα σε αυτά της προλίνης, βαλίνης και β-αλανίνης κάτω από συνθήκες αλατούχου καταπόνησης. Οι Gong et al. (2005) αναφέρουν ότι τα σάκχαρα, μεταξύ άλλων η σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, μαζί και με άλλους μεταβολίτες όπως η προλίνη, το κιτρικό οξύ, το μηλικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ, εμφάνισαν αρκετά υψηλότερα επίπεδα στο αλόφυτο *Thellungiella halophila* συγκριτικά με αυτά του κοντινού τους γλυκοφυτικού είδους, της *Arabidopsis thaliana*. Επιπλέον, οι μεταβολίτες από το μεταβολικό μονοπάτι της ραφινόζης, ραφινόζη, ινοσιτόλη (myo-inositol) και η γαλακτονόλη είχαν μεγαλύτερη συσσώρευση στο *T. halophila* σε σχέση με αυτή της *A. thaliana* κάτω από συνθήκες αλατότητας, ενώ αντιθέτως το μηλικό, το φουμαρικό, το ασπαρτικό και το φωσφορικό οξύ παρατηρήθηκαν σε πτωτική τάση στο συγκεκριμένο αλόφυτο.

1.8 Ερευνητικοί στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Τα φυτά σταμναγκαθιού προερχόμενα από δύο διαφορετικούς άγριους οικότυπους αναπτύχθηκαν σε ένα ανοιχτό υδροπονικό σύστημα κάτω από μεσογειακές κλιματικές συνθήκες. Πρωταρχικοί στόχοι της

παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν τόσο η εκτίμηση της επίδρασης των δύο διαφορετικών επιπέδων αζώτου, μιας χαμηλής και μιας υψηλής στα 4 και 16 mmol L⁻¹, αντίστοιχα, όσο και της μορφής παροχής τους (NH₄⁺/Ολικό-N) σε μερικά αγρονομικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά στα φυτά του σταμναγκαθιού, στο σύνολο των δύο συγκομιδών που πραγματοποιήθηκαν, και τις όποιες γονοτυπικές τους διαφορές (κυρίως όσον αφορά τον πρωτογενή μεταβολισμό) από ένα νέο και ταυτόχρονα πολλά υποσχόμενο για τους τοπικούς παραγωγούς φυτό. Ακολούθησε η αξιολόγηση δύο άγριων οικότυπων σταμναγκαθιού προερχόμενων από δύο διαφορετικά περιβάλλοντα ανάπτυξης ως προς την αντοχή τους στις συνδυαζόμενες επεμβάσεις με αζωτούχο λίπανση και αλατότητα έχοντας ως κριτήρια αξιολόγησης την απόδοσή τους σε βιομάζα και ορισμένα διατροφικά συστατικά τους, συμβάλλοντας έτσι στη διερεύνηση των δυνατοτήτων για την αναπαραγωγή ποικιλιών που θα είναι πιο ανθεκτικές στην αλατότητα και σε μια μη ομαλή θρέψη των φυτών, μέσω προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης. Τέλος, πέρα από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν, η μετέπειτα μεταβολομική ανάλυση των δύο διαφορετικών οικότυπων υποδεικνύει ότι και οι δύο οικότυποι παρουσιάζουν ενθαρρυντικές ενδείξεις ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μια αρκετά αξιοποιήσιμη γενετική πηγή σε περαιτέρω πειράματα με εφαρμογή ακόμα πιο έντονης αβιοτικής καταπόνησης (π.χ. υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων). Την επιβεβαίωση αυτή έρχεται να δώσει η ανάλυση του πρωτογενούς μεταβολισμού με τη χρήση GC/EI/MS όπου πραγματοποιήθηκε και στις δύο κατηγορίες αβιοτικής καταπόνησης (επεμβάσεων).

Κεφάλαιο Β

Υλικά και Μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός (Γενικά)

Το πειραματικό σκέλος της παρούσας διδακτορικής διατριβής έλαβε μέρος στις θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων (Μ.Α.Ι.Χ) με διάρκεια τριών χρόνων. Πιο συγκεκριμένα, κατά τα έτη 2012, 2013 και μέχρι τα μέσα του 2014 στο γυάλινο θερμοκήπιο του Μ.Α.Ι.Χ τοποθετήθηκε υδροπονική καλλιέργεια δύο άγριων οικότυπων σταμναγκαθίου δεχόμενα πειραματικές επεμβάσεις με δύο διαφορετικά επίπεδα αζωτούχου λίπανσης (4 mmol L^{-1} και 16 mmol L^{-1}) καθένα από τα οποία δέχθηκε τρεις διαφορετικές αναλογίες NH_4^+ -N/ολικό-N (0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα) (για περισσότερες πληροφορίες βλ. Κεφάλαιο Γ και Κεφάλαιο Δ). Κατά τα έτη 2014 και 2015 οι αναλογίες των NH_4^+ -N/ολικό-N αντικαταστήθηκαν με τρία διαφορετικά επίπεδα αλατότητας (βλ. Κεφάλαιο Ε και Κεφάλαιο ΣΤ). Οι άγριοι οικότυποι προέρχονταν από δύο εντελώς διαφορετικά περιβάλλοντα ανάπτυξης, με τον παραθαλάσσιο οικότυπο να αναπτύσσεται δίπλα στη θάλασσα και τον ορεινό οικότυπο σε υψόμετρο μεγαλύτερο των 1200 m στην περιοχή των Λευκών Ορέων της Κρήτης. Με το πέρας της εξαγωγής των σπόρων ακολούθησε η σπορά και η μετέπειτα εγκατάσταση των νεαρών φυταρίων σε σάκους που ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ο περλίτης.

2.1. Εργαστηριακές αναλύσεις

Φρέσκα φύλλα από τα φυτά σταμναγκαθίου από όλες τις πειραματικές μονάδες τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους 65°C για 72 ώρες. Τα αποξηραμένα φυτικά δείγματα αφού αλέσθηκαν από μύλο ειδικό για φυτικούς ιστούς ώστε να πάρουν τη μορφή πούδρας πέρασαν και από κόσκινο (40-mesh). Τα δείγματα αργότερα μεταφέρθηκαν σε πορσελάνινες κάψες οι οποίες τοποθετήθηκαν σε φούρνο για 6 ώρες στους 415°C μέχρι να αποκτήσουν τη μορφή στάχτης. Ο προσδιορισμός των μακροθρεπτικών στοιχείων και ιχνοστοιχείων όπως K^+ , P , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , και Zn^{2+} έγινε με τη μέθοδο της υγρής καύσης φυτικού ιστού προσθέτοντας 10 mL από 2 N υδροχλωρικό οξύ (HCl) στις κάψες που περιείχαν την στάχτη, οι οποίες και μεταφέρθηκαν σε πάνω σε καυτή πλάκα στους 80°C για λίγα λεπτά. Αργότερα, τα διαλύματα φιλτραρίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε φλάσκες των 100 mL, όπου και γεμίστηκαν με απεσταγμένο νερό. Ο προσδιορισμός από τα εκχυλίσματα έγινε με την χρήση του ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry, ICP-OES PSFO 2.0, Leeman Labs INC., USA). Τα χαρακτηριστικά του ICP-OES είναι τα ακόλουθα: ρυθμός ροής αερίου από τον εκνεφωτή (nebulizer gas flow rates): 0.5 L min^{-1} , βοηθητική ροή αερίου (auxiliary gas flow): 0.5 L min^{-1} , η ροή του πλάσματος ανερχόταν στα 15 L min^{-1} , ρυθμός της αντλίας: 45 rpm, και ICP RF ισχύς: 1100 W.

2.2. Ολικό Άζωτο

Το Ολικό Άζωτο (Total-N) στους φυτικούς ιστούς προσδιορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου Kjeldahl. Πιο συγκεκριμένα, για τη διαδικασία της χώνευσης, 0.25 g φυτικού ιστού ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε σωλήνα πέψης με το βάρος τους να καταγράφεται επακριβώς. Στον σωλήνα τοποθετήθηκαν 3 g καταλύτη (100 g K_2SO_4 + 16 g $CuSO_4$ + 1.5 g Se) ακολουθούμενα από 10 mL πυκνού θειικού οξέος (H_2SO_4). Στην συσκευή θέρμανσης τοποθετούνται οι σωλήνες με αρχικό ένα τυφλό δείγμα το οποίο περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από φυτικό δείγμα. Στο στάδιο της απόσταξης, για το κάθε δείγμα καθώς επίσης και για το τυφλό δείγμα προετοιμάζεται μια κωνική φιάλη των 250 mL η οποία περιέχει 30 mL 2% βορικό οξύ (H_3BO_3). Το πρόγραμμα της απόσταξης που γίνεται με τη βοήθεια του VaroDest 40 (Gerhardt) αποτελείται από 4 κύκλους αρχικά με την εισαγωγή 50 mL απιονισμένου H_2O και 60 mL από 40% NaOH ακολουθώντας απόσταξη για 5 λεπτά και εξαγωγή του διαλύματος από τον σωλήνα πέψης. Στο τελικό στάδιο της τιτλοδότησης, αρχικά προσδιορίζεται το pH του H_3BO_3 με την τιτλοδότηση να γίνεται με πρότυπο διάλυμα HCl 0,05 N με την οποία προσδιορίζεται ο όγκος του σε mL του οξέος που καταναλώθηκαν για την επαναφορά του δείγματος στην αρχική τιμή του διαλύματος H_3BO_3 2%. Ο υπολογισμός του ποσοστού του ολικού αζώτου γίνεται με εφαρμογή της εξής σχέσης:

$$N \% = \frac{mL \text{ πρότυπου οξέος } HCl * N \text{ του οξέος } * 1,4007}{\text{Βάρος των φυτικών ιστών σε g}}$$

2.3. Συγκέντρωση Νιτρικών σε νωπό φυτικό ιστό

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νιτρικών σε φυτικό ιστό σταμναγκαθιού πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του εκλεκτικού ιοντικού ηλεκτροδίου για φυλλώδη λαχανικά. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα: το διάλυμα ρύθμισης ιονικής ισχύος (ISA) αποτελούμενο από 0,02 M $Al_2(SO_4)_3$ ζυγίζοντας 13,328 g, 0,01 M Ag_2SO_4 στα 3,118 g, 0,02 M H_3BO_3 στα 1,237 g και 0,02 NH_2SO_3H ζυγίζοντας 1,942 g, με τις παραπάνω μάζες να αναφέρονται σε διάλυμα του 1 L. Η δημιουργία του συγκεκριμένου διαλύματος αποσκοπεί στην εξουδετέρωση των κυριότερων παρεμποδιστικών ιόντων όπως Cl^- , HCO_3^- , $RCOO^-$, NO_2^- τα οποία μπορούν να επιφέρουν σημαντικό σφάλμα στα πειραματικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα το θειικό αργίλιο [$Al_2(SO_4)_3$] διασπά τα ιόντα HCO_3^- και την οργανική ύλη, ο θειικός άργυρος (Ag_2SO_4) εξουδετερώνει τα ιόντα Cl^- , Br^- , I^- ενώ το σουλφαμικό οξύ (NH_2SO_3H) εξουδετερώνει τα ιόντα NO_2^- . Τέλος το βορικό οξύ (H_3BO_3) βοηθάει στη ρύθμιση του pH και μειώνει την παρεμπόδιση των CN^- , S^{2-} , HCO_3^- και των φωσφορικών. Το πρότυπο διάλυμα KNO_3 0,1 M παρασκευάζεται διαλύοντας 1,0100 g σε απιονισμένο νερό και ο τελικός όγκος ρυθμίζεται σε 100 mL σε ογκομετρική φιάλη. Πριν από κάθε ανάλυση το επιλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων βυθίζεται σε διάλυμα 0,01 M KNO_3 για μία ώρα κι ακολουθεί η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Για την καμπύλη χρησιμοποιείται ένα ποτήρι ζέσεως των 50 mL και τοποθετούνται με πιπέτα ακριβείας των 10 mL, 10 mL απιονισμένου

νερού και 10 mL από το διάλυμα ISA με τη βύθιση του αναφορικού ηλεκτροδίου και του επιλεκτικού ηλεκτροδίου να ακολουθεί. Το διάλυμα τίθεται σε ήπια ανάδευση (300 rpm) και στη συνέχεια πραγματοποιούνται 4 καθορισμένες προσθήκες από το πρότυπο διάλυμα KNO₃ (Πίνακας 2), με την καταγραφή του δυναμικού (mV) μετά από κάθε προσθήκη αφού σταθεροποιηθεί το σήμα (περίπου 1 min). Η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης αλλά και οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) και το επιλεκτικό ηλεκτρόδιο ξεπλενόταν τόσο πριν όσο και μετά την ανάλυση του κάθε δείγματος.

Πίνακας 2: Προσθήκες από το πρότυπο διάλυμα 0,1 M KNO₃ σε τελικό όγκο 20 mL.

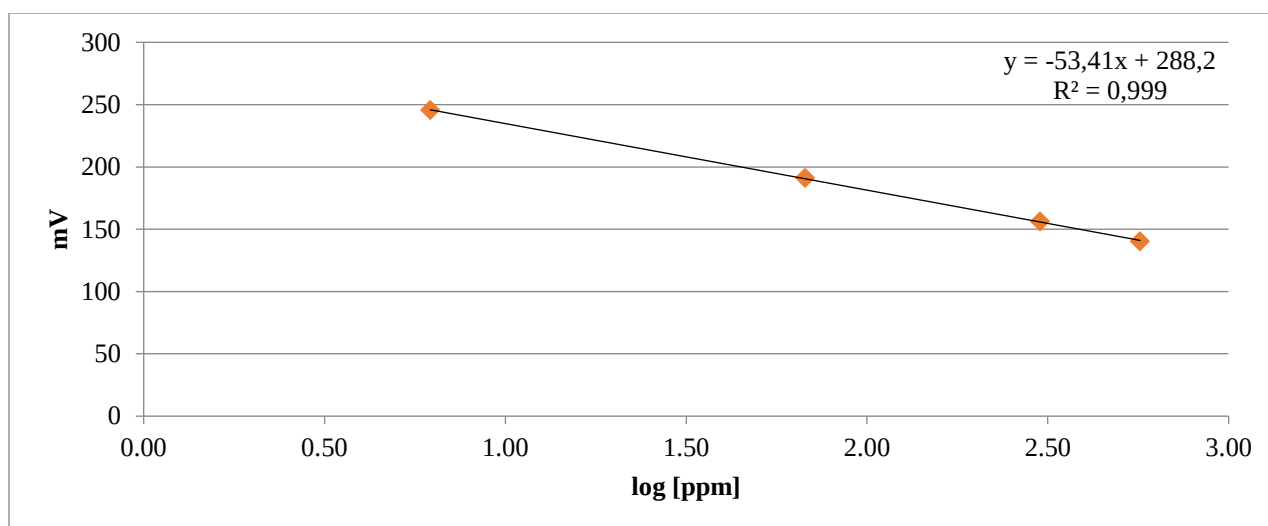
Προσθήκη όγκου (mL)	Τελική συγκέντρωση (M)	Τελική συγκέντρωση (ppm)
0,020	$1,00 \cdot 10^{-4}$	6,20
0,200	$1,09 \cdot 10^{-3}$	67,46
0,800	$4,85 \cdot 10^{-3}$	300,85
1,000	$9,17 \cdot 10^{-3}$	568,76

Τα δείγματα νωπού φυτικού ιστού, αφού πολτοποιήθηκαν σε μπλέντερ, στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία falcon στους 4 °C μέχρι την ανάλυσή τους, με τον χρόνο παραμονής στον θάλαμο συντήρησης να μην ξεπερνά τις 2 ημέρες. Πριν την ανάλυση ζυγίστηκαν 7 με 8 g ιστού στα οποία καταγράφηκε η ακριβής τους μάζα (Πίνακας 3) και στη συνέχεια συμπληρώθηκε μέχρι τα 50 g με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε ανάδευση για 1 ώρα που αποτελεί και το ασφαλές χρονικό όριο εκχύλισης των νιτρικών. Με το πέρας της μιας ώρας το δείγμα τοποθετήθηκε σε μπλέντερ στο οποίο προστέθηκαν 50 mL διαλύματος ρύθμισης ιονικής ισχύος (ISA) και το μείγμα πολτοποιήθηκε για 2 περίπου λεπτά με σκοπό την απευθείας ανάλυσή του από το επιλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων. Η καμπύλη βαθμονόμησης είναι η γραφική παράσταση του μετρούμενου δυναμικού ως προς το λογάριθμο της συγκέντρωσης νιτρικών (Διάγραμμα 1). Η σχέση του μετρούμενου δυναμικού (Y) με το λογάριθμο της συγκέντρωσης νιτρικών (X) είναι η γραμμική και υπολογίζεται η κλίση (B) και η τομή της ευθείας με τον άξονα των Y (A).

$$Y = A + BX$$

Πίνακας 3: Καταγραφή δεδομένων για την ανάλυση των νιτρικών σε φυτικό ιστό (παράδειγμα).

Κωδικός δείγματος	g Φυτικού ιστού	Φυτικός ιστός με νερό	MV
1.1 Seaside	7,580	50,042	300,1
1.1 Mountainous	7,597	50,269	309,5
3.4 Seaside	7,761	50,004	115,5
3.4 Mountainous	7,774	50,000	128,8
6.3 Seaside	7,957	50,009	108,6
6.3 Mountainous	7,922	50,003	107,5 etc.



Διάγραμμα 1: Γραφική παράσταση του μετρούμενου δυναμικού ως προς το λογάριθμο της συγκέντρωσης νιτρικών.

Τέλος, από την καμπύλη βαθμονόμησης, που κατασκευάζεται, υπολογίστηκε αρχικά ο λογάριθμος της άγνωστης συγκέντρωσης νιτρικών στα δελιγμάτα (X) και απολογαριθμώντας, λαμβάνεται η συγκέντρωση νιτρικών στο διάλυμα $C_{\delta/\tau\omicron\varsigma}$. Η η συγκέντρωση όμως των νιτρικών σε δείγμα λαχανικού $C_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma}$ σε mg kg^{-1} δίδεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$C_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} = C_{\delta/\tau\omicron\varsigma} * V_{\delta/\tau\omicron\varsigma}$$

όπου $V_{\delta/\tau\omicron\varsigma} = 100 \text{ mL}$.

2.4. Ολικά Φαινολικά Οξέα

2.4.1. Εκχύλιση των δειγμάτων

Η εκχύλιση για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών οξέων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο [Velioglu et.al. \(1998\)](#), ενώ αυτά προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu ([Singleton and Rossi, 1965](#); [Velioglu et.al., 1998](#)). Πιο αναλυτικά, 1 g από νωπό φυτικό ιστό σταμναγκαθίου εκχυλίστηκε για 2 ώρες με 10 mL από 80% μεθανόλη που περιείχε 1% υδροχλωρικό οξύ, σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα στα 200 rpm. Αργότερα, τα δείγματα φυγοκεντρίστηκαν στα 10.000 g για 15 λεπτά με το υπερκείμενο να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών οξέων.

2.4.2. Καμπύλη Αναφοράς

Μία ποσότητα των 50 mg από (+)- Catechin ζυγίστηκε και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Η φλάσκα γεμίστηκε μέχρι τον τελικό της όγκο με μεθανόλη. Η συγκέντρωση του στοκ διαλύματος ήταν 1 mg/mL Catechin (Διάλυμα A). 1 mL από το διάλυμα A μεταφέρθηκε σε 25 mL ογκομετρική φιάλη όπου και συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό (Διάλυμα B: 40 $\mu\text{g/mL}$). Σε 7 άλλες

ογκομετρικές φιάλες των 25 mL, 10 mL από απιονισμένο νερό προστέθηκε, με την πρώτη να περιέχει μόνο απιονισμένο νερό. Στις υπόλοιπες 6 οι όγκοι των 0.5, 1, 2, 3, 4 και 5 mL προστέθηκαν από το διάλυμα B με τις τελικές συγκεντρώσεις να διαμορφώνονται ως εξής: 20, 40, 80, 120, 160, and 200 mg of (+)-Catechin αντίστοιχα. Αργότερα, σε κάθε φιάσκα, προστέθηκαν 0,5 mL από το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu. Ακολούθησε πολύ καλή ανάμιξη των δειγμάτων. Μετά από 3 λεπτά, προστέθηκε 1 mL από κορεσμένο ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3), αναμίχθηκαν πολύ καλά και συμπληρώθηκαν μέχρις του τελικού όγκου με απιονισμένο νερό.

2.4.3. Προετοιμασία δειγμάτων

Σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL, προστέθηκαν 10 mL από απιονισμένο νερό. 100 μL από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε στην ίδια φιάσκα και 0,5 mL από το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu επίσης προστέθηκαν. Μετά από 3 λεπτά, προστέθηκε 1 mL από το κορεσμένο ανθρακικό νάτριο και η ογκομετρική φιάλη συμπληρώθηκε μέχρι τα 25 mL με απιονισμένο νερό. Αφού αναμίχθηκαν καλά, παρέμειναν στο σκοτάδι για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και μετρήθηκαν στα 725 nm, χρησιμοποιώντας σαν τυφλό δείγμα (blank) αυτό της καμπύλης αναφοράς. Τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών οξέων υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της παρακάτω εξίσωσης που προέκυψε από την καμπύλη αναφοράς

$$Y = 0.004 X + 0.041 \quad R^2 = 0.999$$

και εκφράστηκαν σε mg ανά 100 g (+)- Catechin.

2.5. Ολικά Φλαβονοειδή

Ο προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών πραγματοποιήθηκε με την ζύγιση 1 g από νωπό φυτικό ιστό ο οποίος εκχυλίστηκε με 10 mL 80% αιθανόλης και παρέμεινε σε αναδευτήρα (200 rpm) για ένα ολόκληρο βράδυ.

Τα ολικά φλαβονοειδή μετρήθηκαν με την χρωματομετρική μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους [Zhishen, Mengcheng, and Jainming \(1999\)](#). 1 mL από πρότυπα διαλύματα κατεχίνης (20, 40, 60, 80 και 100 mg L^{-1}) προστέθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL όπου περιείχαν ήδη 4 mL από ddH₂O. Σε μηδέν χρόνο, 0.3 mL από 5% NaNO_2 προστέθηκαν στην φιάσκα. Μετά από 5 λεπτά, 0.3 mL από 10% χλωριούχο αργίλιο (AlCl_3) προστέθηκαν. Στο 6^ο λεπτό, 2 mL από 1 M καυστικό Νάτριο (NaOH) προστέθηκε κι αυτό στο ήδη υπάρχον μίγμα. Αμέσως, η ογκομετρική φιάλη συμπληρώθηκε μέχρι τον τελικό της όγκο με την προσθήκη 2.4 mL από ddH₂O και αναδεύθηκε καλά. Ο προσδιορισμός του δείγματος έγινε στα 510 nm χρησιμοποιώντας σαν τυφλό δείγμα (blank), νερό.

Η περιεκτικότητα των φυτικών ιστών σταμναγκαθίου σε ολικά φλαβονοειδή υπολογίστηκε με την παρακάτω γραμμική εξίσωση βασισμένη στην καμπύλη αναφοράς:

$$Y = 0.005X - 0.102$$

$$R^2 = 0.995$$

Τα ολικά φλαβονοειδή στα φύλλα εκφράστηκαν σε επίπεδο νωπού βάρους ως mg ανά 100 g catechin equivalents (CE).

2.6. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας με τη μέθοδο DPPH· Προετοιμασία του DPPH· διαλύματος (60μM)

2.36 mg DPPH· (M.B: 394.32, 90% καθαρότητα) ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν σε 100 mL από μεθανόλη (MeOH).

2.6.1. Προετοιμασία της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιώντας Trolox σαν standard

40.04 mg από Trolox (M.B: 250.29) διαλύθηκαν σε μεθανόλη (MeOH) χρησιμοποιώντας μια ογκομετρική φιάλη των 100 mL (Διάλυμα A: 1.6 mM). Τέσσερις αραιώσεις οι οποίες φτιάχτηκαν από το «μητρικό» διάλυμα χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά φλάσκες των 10 mL: (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, και 1:24) δημιουργήθηκαν. Έτσι, προέκυψαν οι τελικές ποσότητες οι οποίες ήταν: Διάλυμα B: 0.8 mM, Διάλυμα C: 0.4 mM, Διάλυμα D: 0.2 mM, Διάλυμα E: 0.1 mM και Διάλυμα F: 0.05 mM.

2.6.2. Διαδικασία

25 μL από το δείγμα από την εκχύλιση του φυτικού ιστού προστέθηκαν σε 975 μL DPPH· διαλύματος (60 μM σε MeOH), αναδεύθηκαν καλά και έμειναν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου (Specord 205 diode spectrophotometer) στα 515 nm, σε 10 mm πλαστική κυβέττα. Μεθανόλη, ως τυφλό δείγμα (blank), χρησιμοποιήθηκε για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου.

Σε $t = 0$ min, η απορρόφηση του DPPH· διαλύματος χωρίς να περιέχει δείγμα μετρήθηκε: $A_{515(t=0)}$

Σε $t = 30$ min, η απορρόφηση του DPPH· διαλύματος που περιείχε δείγμα προς ανάλυση επίσης μετρήθηκε: $A_{515(t=30)}$

Το AAR προσδιορίστηκε ακολούθως:

$$AAR (TRE) = \frac{(\% \Delta A_{515} - 3.885)}{65.91} \quad R^2 = 0.998$$

Όπως προσδιορίστηκε από τη παραπάνω εξίσωση, μετά την σχεδίαση % ΔA_{515} γνωστών διαλυμάτων Trolox έναντι συγκεντρώσεων (0,05-0,8 mM), χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος:

$$\% \Delta A_{515} = [(A_{515(t=0)} - A_{515(t=30)}) / A_{515(t=0)}] \times 100$$

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε Trolox ® equivalents (mM TRE).

Αβιοτική καταπόνηση με αλατότητα-Υλικά και Μέθοδοι

2.7. Προσδιορισμός του νωπού και ξηρού βάρους

Την ημέρα που πραγματοποιήθηκε η συγκομιδή, τα φυτά μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο ώστε να μετρηθεί το νωπό βάρος ανά ροζέτα εκφρασμένη σε γραμμάρια (g). Για τον προσδιορισμό της ξηράς ουσίας (DMC), περίπου 10 με 15 g από νωπό φυτικό ιστό ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα δοχεία σε φούρνο στους 65 °C για τρεις ημέρες. Με το πέρας των 3 ημερών ζυγίστηκαν ξανά και υπολογίστηκαν μέσω προγράμματος σε υπολογιστή. Η ξηρά ουσία εκφράστηκε ως ποσοστό του ολικού νωπού βάρους. Το ξηρό βάρος υπολογίστηκε μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$DW = \frac{FW * DMC}{100}$$

2.8. Περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη

Τα φύλλα σταμναγκαθιού ξεπλύθηκαν ελαφρώς προς αποφυγήν πρόσμιξης χρώματος στον φυτικό ιστό και στη συνέχεια 1 g από αυτά ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε σε γουδί με ακετόνη 80%. Τα ομογενοποιημένα δείγματα φιλτραρίστηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL, και συμπληρώθηκε με ακετόνη μέχρι τελικού όγκου. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε κάτω από συνθήκες σκότους. Αργότερα, τα δείγματα για την ανάλυση της χλωροφύλλης μετρήθηκαν με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου στα 645, 652 και 663 nm και η περιεκτικότητά τους σε chlorophyll a, chlorophyll b και total chlorophyll υπολογίστηκε από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\text{Chlorophyll a} = (12.7 * A_{663}) - (2.69 * A_{645})$$

$$\text{Chlorophyll b} = (22.9 * A_{645}) - (4.68 * A_{663})$$

$$\text{Total chlorophyll} = \frac{(A_{652} * 1000)}{34.5}$$

2.9. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των NO₃⁻ με τη χρήση ιοντικού χρωματογράφου

Αρχικά από κάθε μεταχείριση ζυγίστηκαν περίπου 2.5 – 3 g φυτικού ιστού και το βάρος καταγράφηκε επακριβώς. Ο φυτικός ιστός τοποθετήθηκε σε falcons tubes όπου και προστέθηκαν 25 mL από απιονισμένο νερό. Το μίγμα αναδεύθηκε για 1 ώρα στα 200 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της μιας ώρας, τα δείγματα φιλτραρίστηκαν με τη χρήση φίλτρων Whatman 4 και ήταν έτοιμα για ανάλυση. Ο προσδιορισμός των νιτρικών (NO₃⁻) έγινε με τη βοήθεια ιοντικού χρωματογράφου (αφού είχε προηγηθεί αραίωση των δειγμάτων (αραίωση δειγμάτων: 1 mL δείγματος + 9 mL απιονισμένου νερού).

2.10. Ανάλυση ολικών φαινολικών οξέων

2.10.1. Διαδικασία εκχύλισης

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών οξέων έγινε με τη βοήθεια της μεθόδου Folin-Ciocalteu με μια τροποποίηση από τη μέθοδο που εφαρμόστηκε κατά την πρώτη πειραματική χρονιά (Singleton, et al., 1999). 1 g από φυτικό ιστό σταμναγκαθιού ομογενοποιήθηκε με τη χρήση 50% κρύας μεθανόλης (μίγμα 1:1 οι όγκοι από τη μεθανόλη και το dH₂O) χρησιμοποιώντας γουδί με γουδοχέρι. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε falcon των 15 mL, όπου και συμπληρώθηκαν με μεθανόλη μέχρι τον όγκο των 10 mL. Τα δείγματα αργότερα μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων (SONOREX TK52H, Bandelin, Germany) για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 5000 rpm στους 4 °C (Biofuge Stratos, Kendro Laboratories Products, Germany) και πάλι για 15 λεπτά. Με το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καινούρια Falcon των 15 mL.

2.10.2. Καμπύλη αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς προετοιμάστηκε ένα στοκ διάλυμα γαλλικού οξέος (Gallic acid), όπου 0,1701 g ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν σε 1 L απιονισμένο νερό (1 M). Τα υπόλοιπα διαλύματα (standards solutions) που παρασκευάστηκαν βάση του «μητρικού» για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4: Όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών οξέων.

	μmol of GAE	Volume (μL) of GAE	Volume of dH ₂ O (μL)	Folin-Ciocalteu (μL)	Na ₂ CO ₃ (μL)
1	0	0	1625	125	1250
2	0.005	5	1620	125	1250
3	0.01	10	1615	125	1250
4	0.05	50	1575	125	1250
5	0.1	100	1525	125	1250
6	0.2	200	1425	125	1250
7	0.3	300	1325	125	1250

2.10.3. Διαδικασία ανάλυσης

125 μL από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια όπου προστέθηκαν 1.5 mL απιονισμένου νερού, 125 μL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu παραμένοντας σε ηρεμία για 5 λεπτά όπου και προστέθηκαν 1.25 mL από 7% (w/v) ανθρακικό νάτριο. Το τελικό μίγμα (3 mL) παρέμεινε για 90 λεπτά σε συνθήκες σκότους μέχρι την τελική του ανάλυση με τη χρήση φασματοφωτόμετρου στα 755 nm

(Specord 205, Analytik jena, Germany). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg Gallic Acid (GAE) ανά 100 g νωπού φυτικού ιστού χρησιμοποιώντας την εξίσωση που προέκυψε από την καμπύλη αναφοράς.

$$TP_{\mu\text{mol of GAE}} = \frac{A_{755\text{sample}} + 0.0624}{5.1203} \quad (1)$$

$$TP = \frac{TP_{\mu\text{mol of GAE}} * 170.12}{0.1} \quad (2)$$

2.11. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας με τη μέθοδο DPPH·

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας κατά την τρίτη πειραματική χρονιά πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο DPPH με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Choi, et.al., 2002). Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών οξέων, ήταν αυτά που χρησιμοποιήθηκαν και για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας.

2.11.1. Προετοιμασία των αντιδραστηρίων

12 mg DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν σε 100 mL μεθανόλη.

Standard: TROLOX ($\pm$)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid

Διαλύθηκαν 5 mg TROLOX σε 10 mL αιθανόλη ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) και προετοιμάστηκαν άλλες τουλάχιστον έξι αραιώσεις 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 25, 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σε αιθανόλη.

2.11.2. Διαδικασία ανάλυσης

Σε γυάλινα φιαλίδια προστέθηκαν 2 mL από τα δείγματα (εκχυλίσματα) με 1 mL από 0.3 mM διάλυμα DPPH σε μεθανόλη και αφού αναδεύτηκαν πολύ καλά παρέμειναν στο σκοτάδι για 30 λεπτά μέχρι να μετρηθεί η απορρόφησή τους από φασματοφωτόμετρο στα 517 nm. Επίσης, ένα δείγμα-μάρτυρας (control sample) αποτελούμενο από 2 mL μεθανόλη + 1 mL DPPH 0.3 mM και ένα τυφλό δείγμα (blank) αποτελούμενο 2 mL sample + 1 mL Methanol 100%, χρησιμοποιήθηκαν. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης που προέκυψε από την καμπύλη αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ως mg Trolox ανά 100 g νωπού βάρους.

$$AA = \frac{[(A_{515\text{sample}} - A_{515\text{blank}}) - 1.3001]}{(-0.0344)}$$

2.12. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή (β -carotene) προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Nagata & Yamashita (1992) ακολουθώντας μια μικρή τροποποίηση. Δείγματα από κάθε μεταχείριση και από κάθε επανάληψη των δύο οικότυπων χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των καροτενοειδών προκύπτοντας έτσι 48 δείγματα στο σύνολο. Πιο αναλυτικά, 1 g από νωπό φυτικό ιστό σταμναγαθιού

ομογενοποιήθηκε με τη χρήση ακετόνη:εξάνιο (acetone:hexane) 4:6 (v:v) και χρησιμοποιώντας γουδί. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε falcons των 50 mL, και συμπληρώθηκε με ακετόνη:εξάνιο μέχρι όγκου 16 mL. Τα δείγματα αφού αναδεύθηκαν ελαφρώς αποθηκεύτηκαν για ένα ολόκληρο βράδυ μέχρι να γίνει ο διαχωρισμός των δύο φάσεων και να μετρηθούν σε φασματοφωτόμετρο. Την επόμενη μέρα, πάρθηκε μια μικρή ποσότητα από την άνω φάση όπου και μετρήθηκε στα 663, 645, 505 και 453 nm, χρησιμοποιώντας σαν τυφλό δείγμα (blank) την αναλογία ακετόνη:εξάνιο (4:6). Η περιεκτικότητα σε β -carotene υπολογίστηκε σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\beta\text{-carotene} = 0.216 \cdot A_{663} - 1.22 \cdot A_{645} - 0.304 \cdot A_{505} + 0.452 \cdot A_{453}$$

και εκφράστηκε ως mg ανά 100 mL εκχυλίσματος.

2.13. Μεταβολομική δραστηριότητα σταμναγκαθίου

2.13.1. Χημικά και αντιδραστήρια για την εκχύλιση και τη διεξαγωγή μεταβολομικής ανάλυσης σε φύλλα σταμναγκαθίου

Για την εκχύλιση των φύλλων σταμναγκαθίου οργανικοί διαλύτες όπως οξικός αιθυλεστέρας (EtAc) και μεθανόλη (MeOH) (GC/MS grade, 99.9% καθαρότητα, Carlo Erba Reagents, val de Reuil, France) χρησιμοποιήθηκαν. Για την προετοιμασία των δειγμάτων για τη GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση, αντιδραστήρια όπως το methoxylamine hydrochloride (καθαρότητας 98%, w/w), πυριδίνη (pyridine, καθαρότητας 99.8%, v/v, Sigma-Aldrich Ltd, Steinheim, Germany), και το N-Trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide (MSTFA, Macherey and Nagel, Düren, Germany) χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την παραγωγή των δειγμάτων. Η ριβιτόλη (ribitol) χρησιμοποιήθηκε ως ένα εσωτερικό πρότυπο διάλυμα όπου και χρησιμοποιείται σε αναλύσεις για τον πρωτογενή μεταβολισμό των φυτών, προερχόμενο από την Sigma-Aldrich Ltd.

2.13.2. Φυτικό υλικό και διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων (εκχύλιση) προς μεταβολομική ανάλυση τους από τον αέριο χρωματογράφο (GC/EI/MS).

Φρέσκα φύλλα σταμναγκαθίου συλλέχθηκαν από όλες τις επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τον δεύτερο παραγωγικό κύκλο, και ήταν αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την περαιτέρω μεταβολική ανάλυση. Δέκα πλήρως αναπτυγμένα και υγιή φύλλα από τρία φυτά συλλέχθηκαν και ομοιογενοποιήθηκαν ώστε να προκύψει το τελικό προς ανάλυση δείγμα. Στο σύνολο, τέσσερα δείγματα πάρθηκαν για την κάθε εξεταζόμενη επέμβαση. Τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρησης (falcon) των 50 mL, στα οποία και τοποθετήθηκε απευθείας υγρό άζωτο ώστε να σταματήσουν οι όποιες φυσιολογικές τους διεργασίες. Αργότερα, τα φυτά λειοτριβίστηκαν με την χρήση υγρού αζώτου τοποθετήθηκαν σε Eppendorf φιαλίδια για την περαιτέρω ανάλυσή τους. Πιο συγκεκριμένα, 25 mg από

κάθε επέμβαση και για τις 4 επαναλήψεις, μεταφέρθηκαν σε άλλα φιαλίδια των 2 mL όπου προστέθηκαν 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης αποτελούμενο από ίσους όγκους οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης (50:50 v/v ethylacetate-methanol) και 20 μ L ριβιτόλης (0.2 mg ανά mL μεθανόλης). Ακολούθησαν 20 λεπτά σε λουτρό υπέρηχων (Branson 1210 Ultrasonic Cleaner, Marshall Scientific) και 2 ώρες ανάδευση στα 200 rpm (Daihan Labtech Co.Ltd). Σε επόμενο στάδιο τα δείγματα αφού φιλτραρίστηκαν με τη χρήση φίλτρου PTFE (25mm $\varnothing$ 0.2 μ m pores) (Macherey-159 Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Germany), τοποθετήθηκαν σε νέα φιαλίδια. Τα δείγματα υπέστησαν τη διαδικασία της εξάτμισης (Labconco, Kansas City, MO, USA) για να φτάσουν στο τελικό στάδιο της παραγωγοποίησης. Εκεί προστέθηκαν αρχικά 80 μ l από διάλυμα υδροχλωρικής μεθοξυλαμίνης (methoxylaminehydrochloride) συντ. MEOX (Sigma-Aldrich Ltd) ακολουθούμενο από υδατόλουτρο (Daihan Labtech co Ltd) στους 30 °C για 2 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκαν 80 μ l N-μεθυλ-N (τριμεθυλσιλυλ) τριφθοροακεταμίδιο [N-methyl-N (trimethylsilyl) trifluoroacetamide] συντ. MSTFA (Sigma-Aldrich Ltd) και τοποθετήθηκαν ξανά σε υδατόλουτρο (Daihan Labtech co Ltd) για 90 λεπτά στους 38,7 °C, εφαρμόζοντάς την τεχνική όπως αναφέρεται και σε προηγούμενες μελέτες μεταβολομικής ανάλυσης (Karamanou et al., 2019; Kostopoulou et al., 2020). Το τελικό προϊόν τοποθετήθηκε σε γυάλινα φιαλίδια (180 μ L) (micro inserters Machery Nagel 150 μ l, Fisher Scientific Company) προς ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο-φασματοόμετρο μάζας (GC-MS Agilent 19091S-433, Agilent Technologies Inc.).

2.13.3. Gas chromatography–electron impact-mass spectrometry (GC/EI/MS) και βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η ανάλυση του πρωτογενούς μεταβολισμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αέριου χρωματογράφου, GC/EI/MS, Agilent (Agilent 6890N, Agilent Technologies Inc), με ανιχνευτή μάζας inert mass selective detector 5973 (MSD) και αυτόματο δειγματολήπτη (7683 autosampler). Οι ρυθμίσεις έγιναν όπως ήδη έχουν αναφερθεί από προηγούμενες μελέτες (Karamanou et al., 2019; Kostopoulou et al., 2020) με μερικές μικρές τροποποιήσεις. Ο ιονισμός των ηλεκτρονίων ήταν θετικός (70eV) και τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν σε ένα εύρος 50–800 Da με ρυθμό 4 σαρώσεις το δευτερόλεπτο (scans s^{-1}) με μια αρχική καθυστέρηση 10 λεπτών. Τα παραγωγοποιημένα δείγματα (1 μ L) εγχύθηκαν σε στήλη HP-5MS (30 m, i.d. 0.25 mm, and film thickness 0.25 μ m - Agilent Technologies Inc) με αναλογία έγχυσης 5:1. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 230 °C και το φέρον αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ήλιο (He) με ροή 1 mL min^{-1} . Η αρχική θερμοκρασία του κλιβάνου ήταν στους 70 °C, σταθερή για 5 λεπτά, ακολουθούμενο από μια αύξηση της τάξεως των 5 °C το λεπτό μέχρι τους 295 °C. Η θερμοκρασία για την πηγή MS ήταν ρυθμισμένη στους 230° C ενώ για το τετράπολο στους 150 °C.

Για την ανάλυση όλων των πειραματικών δεδομένων, έγινε χρήση του λογισμικού MSD Chemstation (Agilent). Για την ανάλυση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AMDIS v.2.66

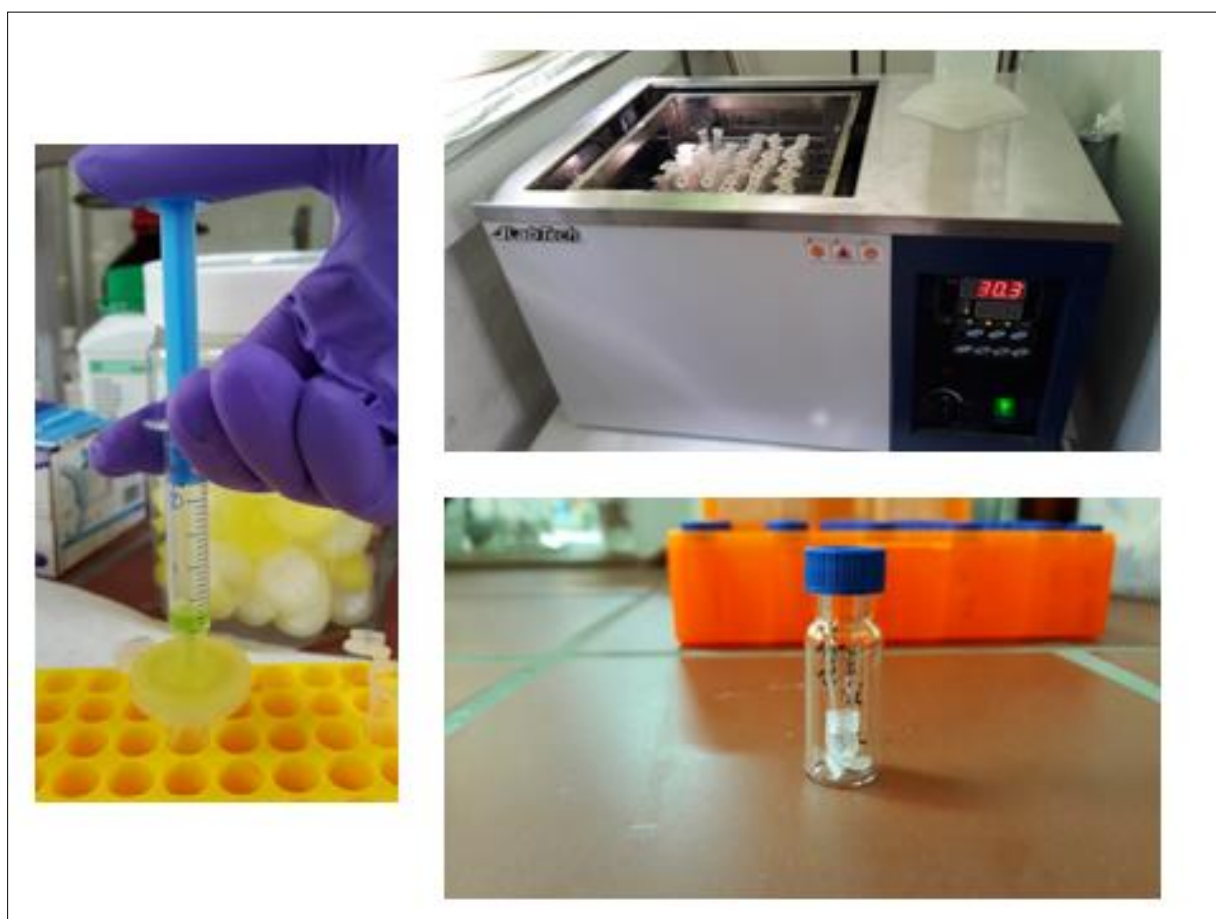
(NIST; Gaithersburg, MD, USA) καθώς επίσης και η MS βάση δεδομένων του NIST, NIST '08 (National Institute of Standards and Technology-NIST; Gaithersburg, MD, USA). Η επεξεργασία (επεξήγηση) των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MS-Dial v.3.70 (Tsugawa et al., 2015), στη συνέχεια η μήτρα εξήχθη στο λογισμικό SIMCA-P v.13.0.3 (Umetrics, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umeå, Sweden) για την ανακάλυψη των τάσεων ανάμεσα στα δεδομένα και των αντίστοιχων μεταβολιτών με την εφαρμογή της πολυπαραγοντικής ανάλυσης όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Karamanou et al., 2019; Kostopoulou et al., 2020). Τέλος, επειδή οι περισσότεροι από τους πιο σημαντικούς πρωτογενείς μεταβολίτες εμπλέκονται σε περισσότερα του ενός μεταβολικά μονοπάτια, η δημιουργία των μεταβολικών χαρτών διεξήχθη με τη βοήθεια της KEGG βάσης δεδομένων [(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)], και πάντα σύμφωνα με τις λειτουργίες και τα μεταβολικά μονοπάτια που συμμετέχουν.



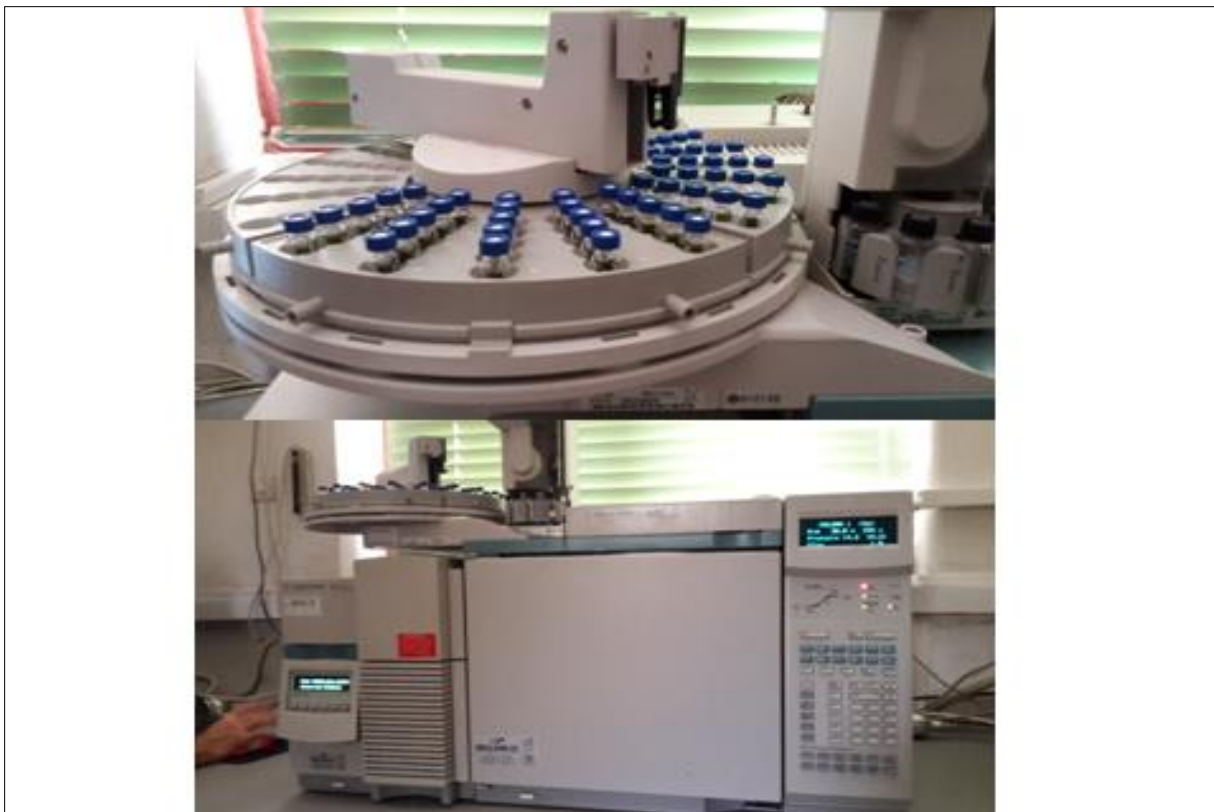
Εικόνα 4: Λειοτρίβιση φυτικού ιστού σταμναγκαθιού με υγρό άζωτο



Εικόνα 5: Φιαλίδια erppendorf μετά τη διαδικασία της εξάτμισης



Εικόνα 6: Φιλτράρισμα, υδατόλουτρο και microinserters



Εικόνα 7: Αυτόματος δειγματολήπτης και το GC/EI/MS

2.14. Στατιστική ανάλυση

Σε όλα τα πειράματα εφαρμόσθηκε το πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο με τρεις παράγοντες ($2 \times 2 \times 3$) και τέσσερις επαναλήψεις ανά μεταχείριση. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την εφαρμογή three-way ANOVA για την εκτίμηση των κυριότερων επιδράσεων [προέλευση σπόρου (SO), ολικού-N (Total-N) και $\text{NH}_4\text{-N}/\text{Total-N}$ ή αλατότητας], τριών αλληλεπιδράσεων πρώτης τάξης ($\text{SO} \times \text{Total-N}$, $\text{SO} \times \text{NH}_4^+\text{-N}/\text{Total-N}$ ή αλατότητας, $\text{Total-N} \times \text{NH}_4^+\text{-N}/\text{Total-N}$ ή αλατότητας) και μίας αλληλεπίδρασης δευτέρας τάξης ($\text{SO} \times \text{Total-N} \times \text{NH}_4^+\text{-N}/\text{Total-N}$ ή αλατότητας). Όπου η ανάλυση της διασποράς έδειξε στατιστική σημαντικότητα των διαφορών, διεξήχθησαν πολλαπλές συγκρίσεις μέσω της εφαρμογής της δοκιμασίας Duncan ($P < 0,05$). Τα δεδομένα αναλύθηκαν στατιστικά χρησιμοποιώντας το πακέτο λογισμικού STATISTICA (STATISTICA for Windows 8.0, Tulsa, OK, USA).

Κεφάλαιο Γ

Επίδραση της πηγής αζώτου και των διαφορετικών επιπέδων του στην ανάπτυξη, τις αποδόσεις και τον ποιοτικό χαρακτηρισμό δύο διαφορετικών οικοτύπων σταμναγκαθιού (*Cichorium spinosum* L.) καλλιεργούμενων υδροπονικά

Σκοπός πειράματος

Τόσο η μορφή παροχής όσο και το επίπεδο του αζώτου (N) μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη, πολλές από τις φυσιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν μέρος εντός του φυτού καθώς επίσης και την περιεκτικότητα σε νιτρικά, ειδικότερα στην περίπτωση των πράσινων φυλλωδών λαχανικών. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες σχετικά με τον αντίκτυπο που έχουν τα διαφορετικά επίπεδα και μορφές του παρεχόμενου N στην ποιότητα του καλλιεργημένου σταμναγκαθιού. Στην παρούσα μελέτη, τα φυτά σταμναγκαθιού μεγάλωσαν σε ένα ανοιχτό υδροπονικό σύστημα κάτω από μεσογειακές κλιματικές συνθήκες με στόχους: α) την εκτίμηση της επίδρασης δύο διαφορετικών επιπέδων αζώτου και τη μορφή παροχής τους σε μερικά αγρονομικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά στα φυτά του σταμναγκαθιού ανά χρόνο συγκομιδής τους, β) τη συμβολή στη βελτίωση της ποιότητας και της ασφαλούς κατανάλωσης από ένα νέο και πολλά υποσχόμενο για τους τοπικούς παραγωγούς φυτό, και γ) την αξιολόγηση δύο άγριων οικοτύπων σταμναγκαθιού προερχόμενων από δύο διαφορετικά περιβάλλοντα ανάπτυξης ως προς την ανταπόκρισή τους στην αζωτούχο λίπανση και την αλατότητα με κριτήρια αξιολόγησης την απόδοσή τους σε βιομάζα και ορισμένα διατροφικά συστατικά τους. Η συγκριτική αξιολόγηση των δύο διαφορετικών οικοτύπων είχε ως σκοπό την διερεύνηση των δυνατοτήτων χρησιμοποίησής τους σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης, ώστε να δημιουργηθούν καλλιεργητικές ποικιλίες.

Πειραματικές επεμβάσεις

3.1. Η καλλιέργεια εντός του θερμοκηπίου - Φυτικό υλικό

Η συγκομιδή των σπόρων (*Cichorium spinosum*) πραγματοποιήθηκε από σταμναγκάθια που φύονται και αναπτύσσονται σε δύο εντελώς διαφορετικές περιοχές της Κρήτης με σκοπό τη δημιουργία νέων φυτών για τη διεξαγωγή πειράματος στις θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων (Μ.Α.Ι.Χ), στην Κρήτη. Πιο αναλυτικά, η πρώτη πειραματική χρονιά ξεκίνησε από τον Ιούλιο του 2012, με τη συγκομιδή των σπόρων, και διήρκεσε μέχρι την άνοιξη του 2013, ενώ η δεύτερη από το Σεπτέμβριο του 2013 μέχρι τον Μάιο του επόμενου έτους. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε γυάλινο μη θερμαινόμενο θερμοκήπιο του Μ.Α.Ι.Χ (Εικόνα 8) το οποίο είναι εγκατεστημένο με κατεύθυνση Βορρά-Νότου, και με συντεταγμένες στα 35° 29' 40.32 N γεωγραφικό πλάτος και 24° 02' 57.51 E γεωγραφικό μήκος.



Εικόνα 8: Θερμοκήπιο στο Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων (ΜΑΙΧ).

Όλες οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο εδαφολογίας και φυλλοδιαγνωστικής του Μ.Α.Ι.Χ. Αρχικά συλλέχθηκαν οι σπόροι από άγριους οικότυπους σταμιναγκαθίου που αναπτύσσονται ελεύθερα στην κρητική ύπαιθρο κατά την περίοδο του φθινοπώρου του 2012. Πιο συγκεκριμένα, οι σπόροι συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικές τοποθεσίες και ειδικότερα από τον Σταυρό Ακρωτηρίου, ο οποίος βρίσκεται στα βορειοανατολικά του Νομού Χανίων (παραθαλάσσιος οικότυπος), καθώς και από το οροπέδιο της Ταύρης στα Λευκά Όρη, σε υψόμετρο 1200 m (ορεινός οικότυπος). Σπόροι των δύο αυτών οικότυπων συλλέχθηκαν από τις ίδιες αυτές τοποθεσίες και κατά τον Σεπτέμβριο του 2013 για τις ανάγκες του πειράματος που έλαβε χώρα την καλλιεργητική περίοδο 2013-2014 (Εικόνα 9). Οι σπόροι φυλάχθηκαν στην Τράπεζα σπόρων του Μ.Α.Ι.Χ σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ημερομηνία σποράς τους, αφού πρώτα είχε πραγματοποιηθεί η εξαγωγή τους. Με το πέρας της εξαγωγής τους, έλαβε χώρα η σπορά σε δίσκους με διαστάσεις 50×30×10 cm (μήκος×πλάτος×ύψος) χρησιμοποιώντας μίγμα τύρφης και περλίτη (3:1) ως υπόστρωμα. Το φύτευμα των σπόρων έλαβε χώρα σε θερμοκρασία που κυμαίνονταν από 22 έως 27 °C εντός του θερμοκηπίου και τα φυτά μετά το φύτευμά τους και μέχρι την μεταφύτευση αναπτύχθηκαν σε συνθήκες θερμοκηπίου, όπου ποτίζονταν ως απαιτούνταν. Το πείραμα διεξήχθη σε θερμοκήπιο σε μία έκταση που κάλυπτε 163 m² (Εικόνα 8).



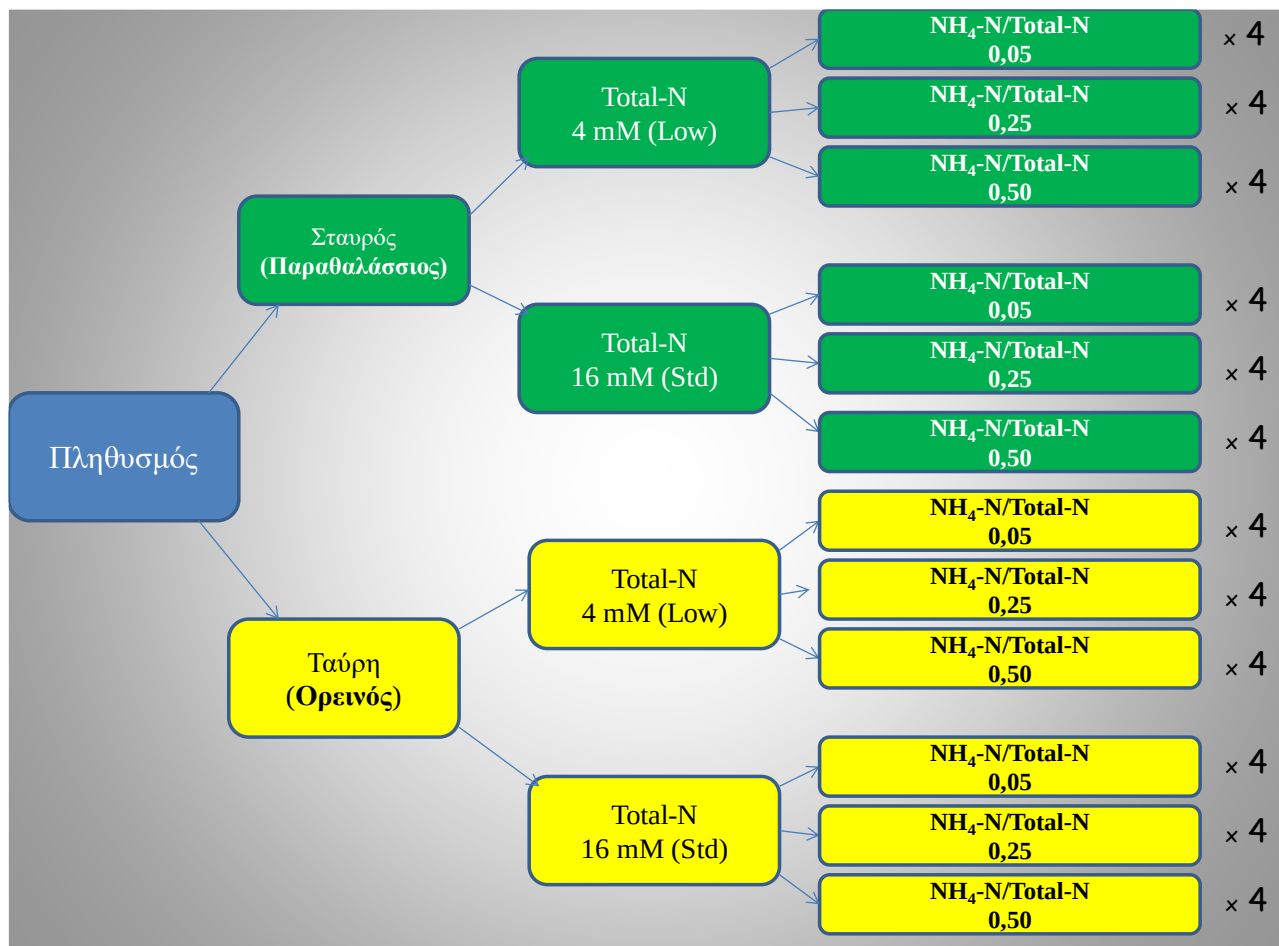
Εικόνα 9: Απεικόνιση των σημείων συγκομιδής των σπόρων.

Το θερμοκήπιο αποτελούνταν από 10 κανάλια φύτευσης τα οποία περιλαμβάνονταν στο πειραματικό σχέδιο, συν μια επιπλέον γραμμή φύτευσης σε κάθε άκρο του θερμοκηπίου που συνιστούσε τα φυτά περιθωρίου. Το μήκος και το πλάτος του κάθε καναλιού ήταν 10 και 0,2 m, αντίστοιχα. Τα φυτά σταμναγκαθιού καλλιεργήθηκαν σε ανοιχτό υδροπονικό σύστημα χρησιμοποιώντας περλίτη ως υπόστρωμα συσκευασμένο σε ειδικούς σάκους. Κάθε σάκος είχε μήκος 1 m, περιείχε 33 L περλίτη (Perloflor Hydro 1) και αποτελούνταν από 4 φυτά. Εφαρμόστηκε ένα εντελώς τυχαίο πειραματικό σχέδιο με 12 μεταχειρίσεις και 4 επαναλήψεις ανά μεταχείριση ($12 \times 4 = 48$ πειραματικές μονάδες). Τα φυτά αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες φυσικού φωτισμού. Μέσα στο γυάλινο θερμοκήπιο η ημερήσια θερμοκρασία αέρα κυμαίνονταν ανάμεσα στους 18-27 °C ενώ κατά τη διάρκεια της νύχτας η θερμοκρασία ήταν πάντα άνω των 12 °C.

Πειραματικός σχεδιασμός

3.2. Πρώτη και δεύτερη πειραματική χρονιά

Τα φυτά κάθε οικοτύπου υποβλήθηκαν σε έξι διαφορετικές μεταχειρίσεις όσον αφορά την σύνθεση του παρεχόμενου θρεπτικού διαλύματος οι οποίες προέκυψαν από τον συνδυασμό δύο διαφορετικών επιπέδων αζώτου (4 mM N ή 16 mM N) με τρία επίπεδα αναλογίας $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ /Ολικό-N (0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα). Οι ίδιες μεταχειρίσεις όσον αφορά την σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος και τους οικοτύπους εφαρμόστηκαν και κατά τα πρώτα δύο έτη διεξαγωγής των πειραμάτων (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Απεικόνιση των πειραματικών μεταχειρίσεων εντός του θερμοκηπίου κατά τα έτη 2012-2014.

Οι συγκεντρώσεις του φωσφόρου και των ιχνοστοιχείων παρέμειναν σταθερές και ίδιες σε όλες τις μεταχειρίσεις και σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και στα δύο πειραματικά έτη και είχαν ως ακολούθως: 1.2 mM P, 15 μM Fe^{2+} , 8 μM Mn^{2+} , 6 μM Zn^{2+} , 0,7 μM Cu^{2+} , 30 μM B, 0,5 μM Mo. Για να επιτευχθεί η ιδανική Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (EC) σε όλες τις μεταχειρίσεις, οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των NH_4^+ -N εξισορροπήθηκαν (αντισταθμίστηκαν) με τη μεταβολή των συγκεντρώσεων των K^+ , Ca^{2+} και Mg^{2+} , αλλά κρατώντας σταθερή την αναλογία τους $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (8:5.25:1.5 σε μοριακό επίπεδο). Αντίστοιχα, οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των NO_3^- στις διαφορετικές μεταχειρίσεις εξισορροπήθηκαν ηλεκτροχημικά μεταβάλλοντας τις συγκεντρώσεις των SO_4^{2-} και Cl^- σε αναλογία 1:1. Οι υπολογισμοί της σύνθεσης των έξι διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους Savvas and Adamidis (1999). Οι συγκεντρώσεις των NO_3^- -N, NH_4^+ -N, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} και Cl^- στις έξι διαφορετικές μεταχειρίσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Το pH και η EC σε όλα τα πειραματικά θρεπτικά διαλύματα ήταν 5,6 και 2,3 dS m^{-1} , αντίστοιχα, και διατηρήθηκαν σε αυτά τα επίπεδα μέχρι το τέλος του πειράματος. Η μεταφορά του θρεπτικού διαλύματος στα φυτά γίνονταν μέσω συστήματος άρδευσης χρησιμοποιώντας αντλίες οι οποίες ήταν συνδεδεμένες με χρονοδιακόπτη. Η παροχή σε κάθε φυτό πραγματοποιούνταν από ατομικό σταλάκτη με ρυθμό ροής 2 L h^{-1} .

Πίνακας 5: Ηλεκτρική αγωγιμότητα, pH και οι συγκεντρώσεις των K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , NO_3^- , $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-} στις διάφορες μεταχειρίσεις των δύο πρώτων πειραμάτων.

NH_4^+-N /Ολικό-N	0,05	0,25	0,50	0,05	0,25	0,50
Παροχή Αζώτου (Total-N level)	4 mmol L ⁻¹			16 mmol L ⁻¹		
EC (dSm ⁻¹)	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30
pH	5,60	5,60	5,60	5,60	5,60	5,60
K^+ (mmol L ⁻¹)	8,22	7,93	7,56	8,00	6,81	5,33
Ca^{2+} (mmol L ⁻¹)	5,39	5,20	4,96	5,25	4,47	3,49
Mg^{2+} (mmol L ⁻¹)	1,54	1,48	1,42	1,50	1,27	1,00
NH_4^+ (mmol L ⁻¹)	0,20	1,00	2,00	0,80	4,00	8,00
NO_3^- (mmol L ⁻¹)	3,80	3,00	2,00	15,20	12,00	8,00
H_2PO_4 (mmol L ⁻¹)	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
SO_4^{2-} (mmol L ⁻¹)	4,75	4,55	5,28	1,89	3,49	3,75

Στις 23 Ιανουαρίου κατά τον πρώτο χρόνο διεξαγωγής του πειράματος και στις 11 Ιανουαρίου τον δεύτερο, περίπου δύο μήνες μετά την σπορά, τα σπορόφυτα μεταφύτεύθηκαν στους σάκους περλίτη. Τα φυτά ήταν διαφορετικού μεγέθους και αριθμού φύλλων (8 με 10 φύλλα ανά φυτό) λόγω της ετερογένειας στη βλαστικότητα τους. Τέσσερα φυτά ανά σάκο τοποθετήθηκαν σε απόσταση 0,20 m το κάθε φυτό από το επόμενο. Για να επιτρέπεται η απομάκρυνση του πλεονάζοντος θρεπτικού διαλύματος από το περιβάλλον των ριζών των φυτών, δημιουργήθηκαν δύο τρύπες στην κάτω πλευρά κάθε σάκου (πάτος) δύο μέρες μετά τη μεταφύτευση. Η συχνότητα και η διάρκεια των ποτισμάτων ρυθμιζόνταν σύμφωνα με τις εκάστοτε κλιματικές συνθήκες και με σκοπό το διάλυμα απορροής να μην υπερβαίνει το 30%. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να γίνονται 2 με 4 ποτίσματα ανά πειραματική μονάδα κάθε μέρα. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δύο συγκομιδές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Για το πείραμα της πρώτης χρονιάς η πρώτη κοπή έλαβε μέρος στις 13/03/2013, 48 μέρες μετά τη μεταφύτευση, και η δεύτερη στις 28/04/2013, στις 96 μέρες μετά την μεταφύτευση. Επιπλέον, κατά τη δεύτερη χρονιά, οι συγκομιδές πραγματοποιήθηκαν στις 13/03/2014 και 13/05/2014, δηλαδή 62 και 123 μέρες μετά τη μεταφύτευση, αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια και των δύο κοπών, όλα τα φυτά συγκομίστηκαν κόβοντας το κύριο στέλεχος τους κάτω από την κύρια ροζέτα (στην κορυφή του στελέχους) χρησιμοποιώντας κοφτερά μαχαίρια, όταν το μέγεθος της ροζέτας είχε φτάσει στο εμπορικό του στάδιο. Κατά την πρώτη κοπή, κάθε φυτό αποτελούνταν από μία και μόνο ροζέτα ενώ κατά τη δεύτερη ο αριθμός τους ήταν κατά μέσον όρο 15 ροζέτες ανά φυτό, εξαρτώμενος πάντα από την έκπτυξη των οφθαλμών από το κύριο στέλεχος μετά την πρώτη κοπή. Οι ροζέτες, αμέσως μετά τη συγκομιδή τους τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες εντός του θερμοκηπίου και μεταφέρθηκαν άμεσα στο εργαστήριο όπου αποθηκεύτηκαν στους -18 °C μέχρι να έρθει η ώρα διεξαγωγής των χημικών

αναλύσεων που περιεγράφηκαν στο Κεφάλαιο Β. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης δεν χρειάστηκε ο ψεκασμός για παθογόνα και δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο σύστημα θέρμανσης.

Πίνακας 6: Ημερομηνίες διεξαγωγής του πειράματος κατά τη χρονική περίοδο 2012-2013.

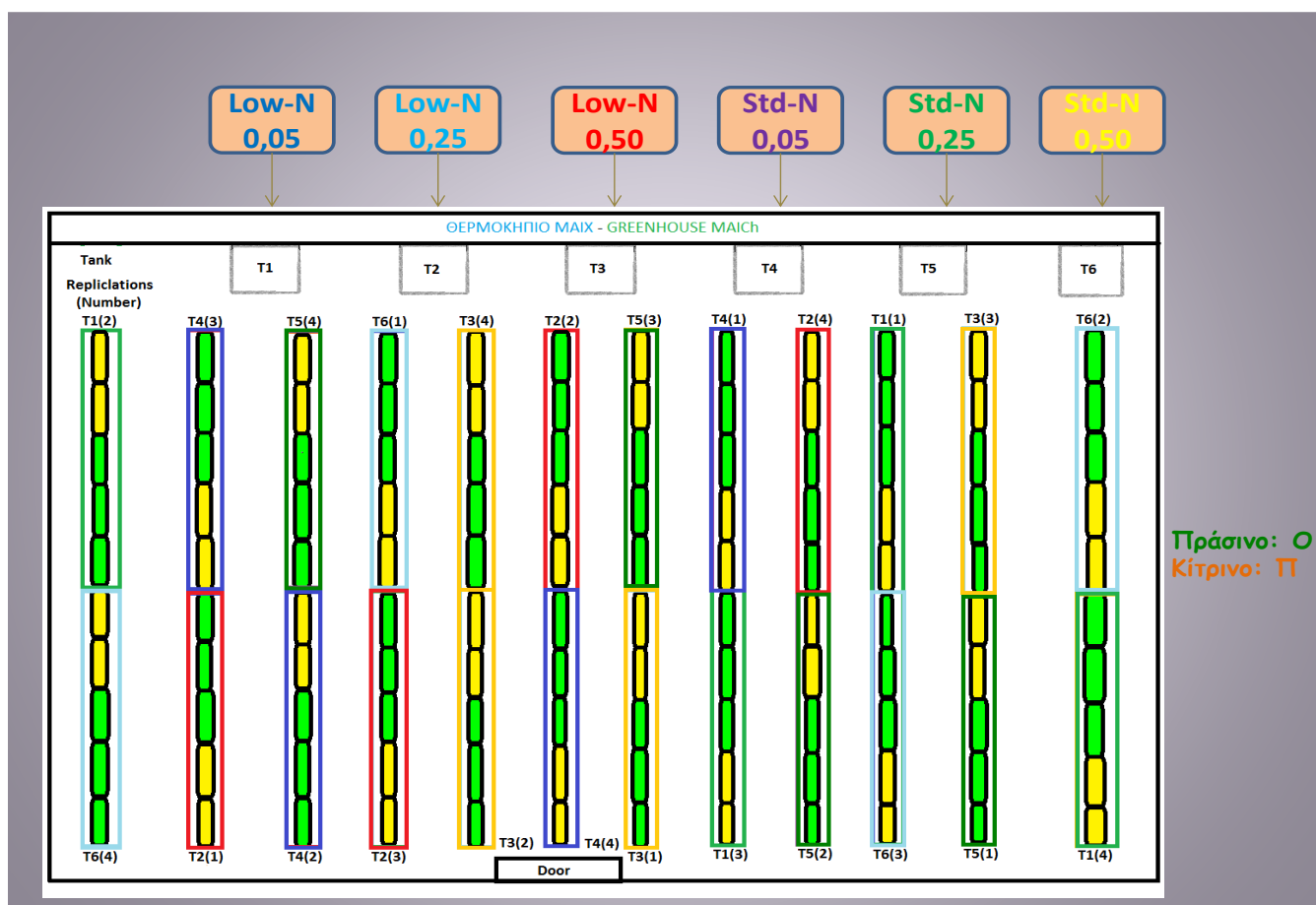
ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ
Συγκομιδή Παραθαλάσσιου οικότυπου (Π)	26/07/2012
Συγκομιδή Ορεινού οικότυπου (Ο)	09/10/2012
Έναρξη τεστ βλαστικότητας	22/10/2012
Λήξη τεστ βλαστικότητας	22/11/2012
Σπορά	27/11/2012
Μεταφύτευση	23/01/2013
1^η Συγκομιδή	12/03/2013
2^η Συγκομιδή	29/04/2013

Πίνακας 7: Ημερομηνίες διεξαγωγής του πειράματος κατά τη χρονική περίοδο 2013-2014.

ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ
Συγκομιδή Παραθαλάσσιου οικότυπου (Π)	27/09/2013
Συγκομιδή Ορεινού οικότυπου (Ο)	09/10/2013
Έναρξη τεστ βλαστικότητας	22/10/2013
Λήξη τεστ βλαστικότητας	26/11/2013
Σπορά	29/10/2013
Μεταφύτευση	11/01/2014
1^η Συγκομιδή	13/03/2014
2^η Συγκομιδή	13/05/2014

3.3. Σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων

Οι μεταχειρίσεις που έλαβαν χώρα κατά τη διάρκεια των πειραματικών χρόνων τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου σε μια εντελώς τυχαioποιημένη διάταξη (Εικόνα 8). Στο σύνολο το θερμοκήπιο περιλάμβανε 480 φυτά (288 φυτά για τον ορεινό οικότυπο και 192 φυτά για τον παραθαλάσσιο). Επιπλέον, λόγω της μικρής βλαστικής ικανότητας που παρουσιάζουν οι σπόροι του σταμναγκαθιού, ο παραθαλάσσιος οικότυπος (κίτρινο χρώμα) σε κάθε μεταχείριση κάλυψε δύο σάκους ανά επανάληψη, ενώ ο ορεινός τρεις.



Εικόνα 8: Απεικόνιση των μεταχειρίσεων εντός του θερμοκηπίου κατά το 2013-2014. Το T1, T2, T3, T4, T5 και T6 αφορά τον αριθμό της δεξαμενής που αντιστοιχεί σε μία μεταχείριση που δέχθηκαν τα φυτά σταμναγκαθίου εντός του θερμοκηπίου, ενώ ο αριθμός εντός των παρενθέσεων αντιστοιχεί στον αριθμό της επανάληψης για την κάθε μεταχείριση. Στο σύνολο κάθε μεταχείριση αποτελούνταν από 4 επαναλήψεις.

Αποτελέσματα της 1^{ης} πειραματικής χρονιάς

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα στο διάλυμα απορροής για τις έξι διαφορετικές μεταχειρίσεις αυξήθηκε σταδιακά από 2,3 σε 3,2 dS m⁻¹ (Γράφημα 1α). Η αναλογία NH₄⁺-N/ολικό-N δεν παρουσίασε σημαντική επίδραση στην ηλεκτρική αγωγιμότητα του διαλύματος παρόλο που η χαμηλή συγκέντρωση ολικού αζώτου (4 mmol L⁻¹) έδωσε σημαντικά υψηλότερες τιμές στον 2^ο παραγωγικό κύκλο (μετά από την πρώτη συγκομιδή). Το pH του διαλύματος απορροής κυμάνθηκε από 4,58 μέχρι και 7,08 για τις έξι μεταχειρίσεις του πειράματος (Γράφημα 1β). Η υψηλότερη αναλογία NH₄⁺-N/ολικό-N (Nr =0,50) προκάλεσε μια έντονη μείωση του pH κατά τη διάρκεια του 2^{ου} παραγωγικού κύκλου με τιμές κάτω από 5, την ώρα που η χαμηλότερη αναλογία NH₄⁺-N/ολικό-N (Nr =0,05) έδωσε πολύ υψηλότερα επίπεδα pH, ανεξαρτήτως της επίδρασης της παροχής του ολικού αζώτου. Στην ενδιάμεση αναλογία NH₄⁺-N/ολικό-N (Nr=0,25) επίσης παρουσιάστηκε μείωση των τιμών του pH συγκριτικά με τη χαμηλότερη αναλογία αλλά η μείωση αυτή ήταν αισθητά εντονότερη στο υψηλό ολικό άζωτο (16 mmol L⁻¹). Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε επίσης στα μετέπειτα στάδια του 1^{ου} παραγωγικού κύκλου, αλλά οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ήταν λιγότερο έντονες, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Όσον αφορά το νωπό βάρος των φυτών σταμναγκαθίου (Fresh weight - FW), αυτό δεν επηρεάστηκε ούτε από την προέλευση των σπόρων, ούτε από την παροχή του ολικού αζώτου καθώς επίσης ούτε από τις αναλογίες NH₄⁺-N/ολικό-N (0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα) στο θρεπτικό διάλυμα που παρέχονταν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (Πίνακας 8), με το αποτέλεσμα αυτό να εμφανίζεται και στους δύο παραγωγικούς κύκλους. Παρόλο αυτά, η προέλευση του σπόρου έδειξε να έχει μια ξεκάθαρη επίδραση στο ξηρό βάρος (Dry weight – DW), το οποίο ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στα φυτά που προέρχονταν από τα ορεινά και στις δύο συγκομιδές που πραγματοποιήθηκαν (Πίνακας 9). Ούτε το ολικό άζωτο αλλά ούτε και οι αναλογίες αμμωνιακού προς ολικό N φάνηκε να επηρεάζουν το ξηρό βάρος, ξεχωριστά ως μεταχειρίσεις. Εντούτοις, κατά τη διάρκεια του 2^{ου} παραγωγικού κύκλου, παρουσιάστηκε μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των ολικό-N × NH₄⁺-N/ολικό-N, η οποία έδειξε ότι οι δύο υψηλότερες αναλογίες NH₄⁺-N/ολικό-N (0,25 και 0,50) μείωσαν σε σημαντικό βαθμό το ξηρό βάρος του σταμναγκαθίου όταν εφαρμόστηκαν στο υψηλό επίπεδο παροχής αζώτου.

Η υψηλή συγκέντρωση αζώτου στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα (16 mmol L⁻¹) αύξησε τη συγκέντρωση του ολικού αζώτου στα φύλλα του σταμναγκαθίου όταν η αναλογία NH₄⁺-N/ολικό-N ήταν 0,25 και 0,50 (Γράφημα 2α και 2β), με τη διαφορά αυτή να είναι πιο εμφανής στο υψηλότερο NH₄⁺-N/ολικό-N (0,50). Αντιθέτως, όταν η αναλογία NH₄⁺-N/ολικό-N βρίσκονταν στο χαμηλότερο επίπεδό της (0,05), οι δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα δεν φάνηκε να παρουσιάζουν κάποια σημαντική επίδραση στο ποσοστό του ολικού αζώτου στα φύλλα. Επιπλέον, στα 16 mmol L⁻¹, αυξάνοντας την αναλογία NH₄⁺-N/ολικό-N από 0,05 στο 0,50 αυξήθηκε και το ποσοστό ολικού αζώτου στα φύλλα, ενώ, στο χαμηλότερο επίπεδο, οι αναλογίες των αμμωνιακών δεν φάνηκαν να

έχουν κάποια επίδραση στην συγκέντρωση ολικού N στα φύλλα. Τέλος, ούτε η προέλευση του σπόρου φάνηκε να παρουσιάζει κάποια σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα των φυτικών ιστών σε N.

Το υψηλό επίπεδο ολικού αζώτου στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθεί η συγκέντρωση των νιτρικών στα φύλλα του σταμναγκαθιού. Από την άλλη πλευρά, αυξάνοντας την αναλογία του NH_4^+ -N/ολικό-N διαφαίνεται μια ξεκάθαρη μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών στα φύλλα (Γράφημα 2γ και 2δ). Όταν το ολικό άζωτο στο θρεπτικό διάλυμα ήταν υψηλό, τα φυτά που προέρχονταν από την παραθαλάσσια περιοχή παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις νιτρικών στα φύλλα συγκριτικά με τα φυτά που προέρχονταν από την ορεινή περιοχή. Παρόλο αυτά, όταν το επίπεδο του παρεχόμενου αζώτου ήταν χαμηλό, τα επίπεδα των νιτρικών στα φύλλα δεν φάνηκε να επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από την προέλευση των σπόρων. Αναφορικά με τις αναλογίες των NH_4^+ -N/ολικό-N, κατά τη διάρκεια και των δύο παραγωγικών κύκλων, ο παραθαλάσσιος οικότυπος έδειξε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις νιτρικών στα φύλλα σε σύγκριση με αυτές του ορεινού οικότυπου, με τις διαφορές να είναι πιο αξιοσημείωτες στο υψηλό επίπεδο αζώτου (16 mM).

Η αύξηση της αναλογίας του NH_4^+ -N/ολικό-N από 0,05 στο 0,25 στο θρεπτικό διάλυμα ενίσχυσε τη συγκέντρωση του φωσφόρου στα φύλλα για τον ορεινό οικότυπο σταμναγκαθιού αλλά δεν φάνηκε να έχει κάποια επίδραση στον παραθαλάσσιο (Γράφημα 3α και 3β). Παρόλο αυτά, και στις δύο υψηλότερες αναλογίες NH_4^+ -N/ολικό-N (0,25 και 0,50), ο ορεινός οικότυπος ήταν αυτός που παρουσίασε υψηλότερες συγκεντρώσεις φωσφόρου στα φύλλα. Το διαφορετικό επίπεδο παροχής αζώτου (4 mM ή 16 mM) μέσω του θρεπτικού διαλύματος δεν παρουσίασε κάποια σημαντική επίδραση στα επίπεδα του φωσφόρου. Τα αποτελέσματα των διαφορετικών επεμβάσεων ήταν παρόμοια και για τις δύο συγκομιδές, με τις συγκεντρώσεις του φωσφόρου στα φύλλα να κυμαίνονται σε γενικά χαμηλότερα επίπεδα για τη δεύτερη συγκομιδή. Οι συγκεντρώσεις των άλλων μακροστοιχείων, όπως το Mg^{2+} , Ca^{2+} και το K^+ στα φύλλα σταμναγκαθιού, ήταν σημαντικά υψηλότερες για τον παραθαλάσσιο οικότυπο κατά τη διάρκεια και των δύο παραγωγικών κύκλων, με τις διαφορές να είναι πιο εμφανείς για την πρώτη συγκομιδή (Γράφημα 3γ–η). Η αύξηση των αναλογιών NH_4^+ -N/ολικό-N είχε την τάση να ενισχύσει τη συγκέντρωση του Mg^{2+} στα φύλλα ενώ την ίδια ώρα να προκαλεί τη μείωση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} , παρόλο αυτά οι διαφορές αυτές για το Mg^{2+} ήταν ασήμαντες για τα φυτά του πρώτου παραγωγικού κύκλου. Η συγκέντρωση του K^+ στα φύλλα δεν φάνηκε να επηρεάζεται από τις εξεταζόμενες αναλογίες των αμμωνιακών (NH_4^+ -N/ολικό-N). Επιπλέον, μειώνοντας την παροχή του αζώτου στο διάλυμα από 16 στο 4 mmol L⁻¹ δεν φάνηκε να παρουσιάζει κάποια αξιοσημείωτη επίδραση στις συγκεντρώσεις των Ca^{2+} και Mg^{2+} στα φύλλα, προκαλώντας όμως παράλληλα αύξηση σε σημαντικό βαθμό στη συγκέντρωση του K^+ κι ειδικότερα στο υψηλότερο επίπεδο αμμωνιακών (0,50).

Το επίπεδο του ολικού αζώτου, ο τύπος παροχής του αζώτου και η προέλευση του σπόρου δεν άσκησαν κάποια σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση του Fe^{2+} στα φύλλα. Όσον αφορά τις

συγκεντρώσεις των Zn^{2+} , Cu^{2+} και Mn^{2+} , μια υψηλής σημαντικότητας αλληλεπίδραση μεταξύ του επιπέδου του ολικού αζώτου και των αναλογιών των NH_4^+-N /ολικό-N παρατηρήθηκε (Γράφημα 4). Πιο συγκεκριμένα, στο χαμηλό επίπεδο παροχής αζώτου (4 mM), οι συγκεντρώσεις των Zn^{2+} , Cu^{2+} και Mn^{2+} στα φύλλα αυξήθηκαν καθώς αυξάνονταν οι αναλογίες των NH_4^+-N /ολικό-N στο θρεπτικό διάλυμα από 0,05 στο 0,50. Αντιθέτως, στο υψηλό επίπεδο ολικού αζώτου, η συγκέντρωση του Mn^{2+} δεν άλλαξε, ενώ αυτές των Zn^{2+} και Cu^{2+} μειώθηκαν καθώς αυξάνονταν η αναλογία NH_4^+-N /ολικό-N. Επιπλέον, ο παραθαλάσσιος οικότυπος αποθήκευσε περισσότερο Mn^{2+} και Cu^{2+} στα φύλλα σε σχέση με τον ορεινό οικότυπο.

Ο ορεινός οικότυπος περιείχε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών οξέων στα φύλλα συγκριτικά με τον παραθαλάσσιο οικότυπο, ανεξάρτητα από την παροχή ολικού αζώτου και τις αναλογίες των NH_4^+-N /ολικό-N στο θρεπτικό διάλυμα κατά τη διάρκεια και των δύο παραγωγικών κύκλων (Γράφημα 5α και 5β). Αυξάνοντας το επίπεδο του ολικού αζώτου ή την αναλογία των NH_4^+-N /ολικό-N στο διάλυμα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων ολικών φαινολικών οξέων στα φύλλα σταμναγκαθιού κατά τη διάρκεια του 1^{ου} παραγωγικού κύκλου, με τις διαφορές να είναι πιο αξιοσημείωτες για τον ορεινό οικότυπο. Επιπλέον, ο ορεινός οικότυπος, στο υψηλό επίπεδο ολικού αζώτου, και όταν η αναλογία των NH_4^+-N /ολικό-N αυξάνονταν στο θρεπτικό διάλυμα, έδειξε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ολικών φαινολικών οξέων σε σχέση με αυτά του παραθαλάσσιου οικότυπου. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια του 2^{ου} παραγωγικού κύκλου, η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών οξέων δεν φάνηκε να επηρεάζεται ούτε από το επίπεδο παροχής αζώτου αλλά ούτε και από τις αναλογίες των NH_4^+-N /ολικό-N στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα.

Όπως και στα ολικά φαινολικά οξέα, έτσι και στην περίπτωση των φλαβονοειδών, ο ορεινός οικότυπος παρουσίασε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις στα φύλλα συγκριτικά με τον παραθαλάσσιο οικότυπο, ανεξάρτητα από το επίπεδο του ολικού αζώτου και τις αναλογίες NH_4^+-N /ολικό-N στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα κατά τη διάρκεια του 1^{ου} παραγωγικού κύκλου (Γράφημα 5γ). Μια αλληλεπίδραση μεταξύ των οικότυπων και των επιπέδων του παρεχόμενου αζώτου κατά τη διάρκεια του 1^{ου} παραγωγικού κύκλου, έδειξε ότι, στο χαμηλό άζωτο, παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές φλαβονοειδών, αλλά οι διαφορές ήταν πιο εμφανείς στον ορεινό οικότυπο. Αντιθέτως, ο οικότυπος δεν φάνηκε να ασκεί κάποια σημαντική επίδραση στις συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών κατά τη διάρκεια του 2^{ου} παραγωγικού κύκλου (Γράφημα 5δ). Τέλος, τόσο το επίπεδο του αζώτου όσο και οι αναλογίες των NH_4^+-N /ολικό-N στο διάλυμα δεν είχαν κάποια αξιόλογη επίδραση στις συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών στα φύλλα και για τους δύο παραγωγικούς κύκλους.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δραστηριότητα, τα φυτά που προέρχονταν από την ορεινή περιοχή παρουσίασαν υψηλότερη δραστηριότητα έναντι αυτών με παραθαλάσσια προέλευση και για τις δύο συγκομιδές που πραγματοποιήθηκαν (Γράφημα 5ε και 5στ). Κατά τη διάρκεια του 1^{ου} παραγωγικού

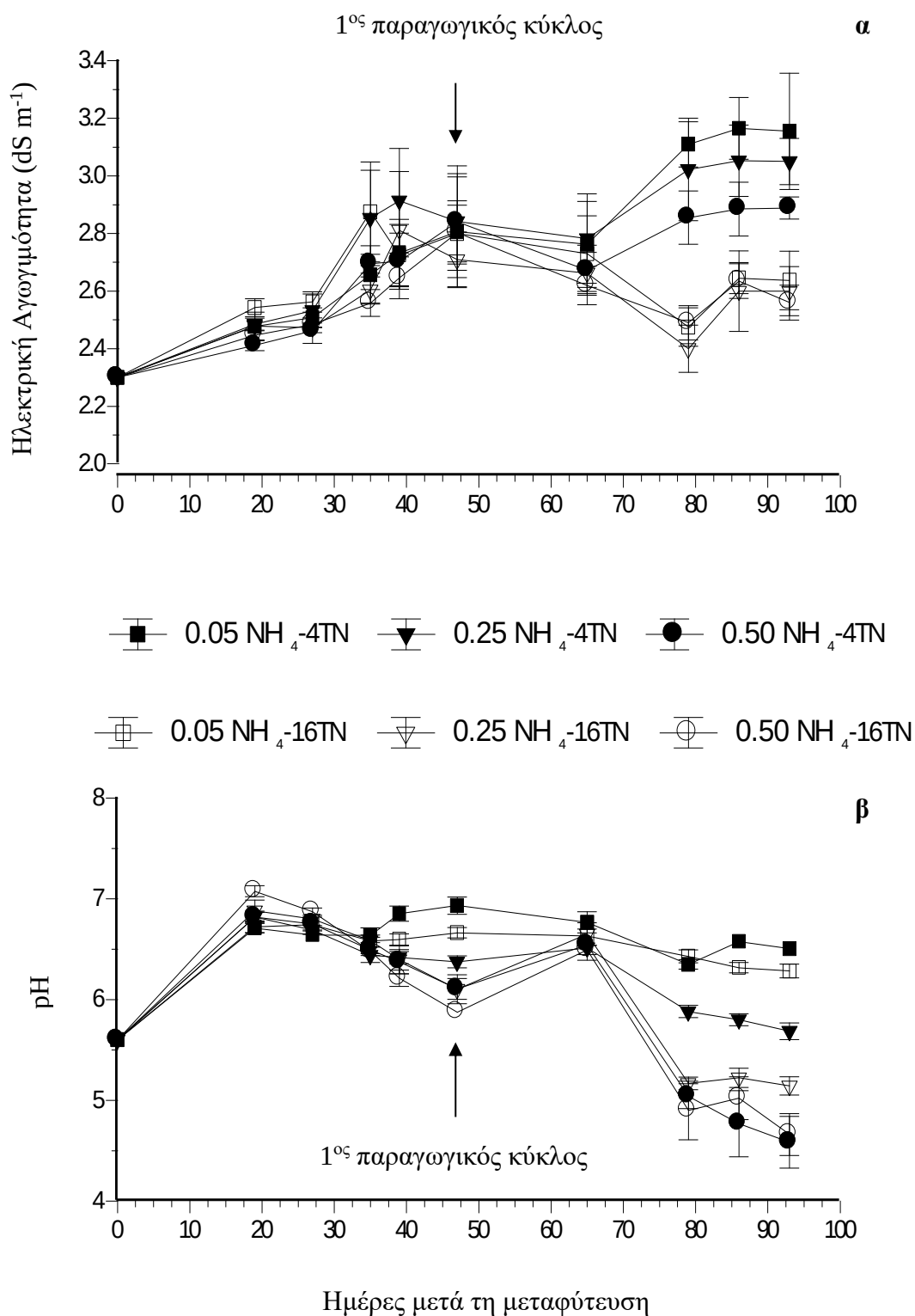
κύκλου, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα ενισχύθηκε από την αύξηση του επιπέδου του αζώτου από 4 σε 16 mmol L⁻¹ στο θρεπτικό διάλυμα για τον παραθαλάσσιο οικότυπο, ενώ από την άλλη δεν φάνηκε να επηρεάζεται ο ορεινός οικότυπος από την παραπάνω αλλαγή. Τέλος, το επίπεδο του ολικού αζώτου δεν εμφάνισε επίσης κάποια αξιοσημείωτη αλλαγή στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια του 2^{ου} παραγωγικού κύκλου, ενώ και οι αναλογίες των NH₄⁺-N/ολικό-N στο θρεπτικό διάλυμα με τη σειρά τους δεν φάνηκαν ούτε αυτές να επηρεάζουν την αντιοξειδωτική δραστηριότητα των φυτών και στους δύο οικότυπους και για τις δύο συγκομιδές.

Πίνακας 8: Επίδραση της προέλευσης του σπόρου (ορεινός ή παραθαλάσσιος), της παροχής ολικού αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, που δηλώνεται και ως 4TN και 16TN, αντίστοιχα) και των αναλογιών NH₄/ολικό-N (0.05, 0.25 και 0.50, αντίστοιχα) στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα του υδροπονικά αναπτυγμένου σε σάκους περλίτη σταμιναγκαθιού στο νωπό βάρος (g φυτό⁻¹) κατά τον πρώτο και δεύτερο παραγωγικό κύκλο. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή πειραματικών φυτών προέρχονταν από αυτοφυείς (άγριους) πληθυσμούς που αναπτύσσονταν είτε σε υψόμετρο κοντά στα 1200 m (Ο) ή δίπλα στη θάλασσα (Π).

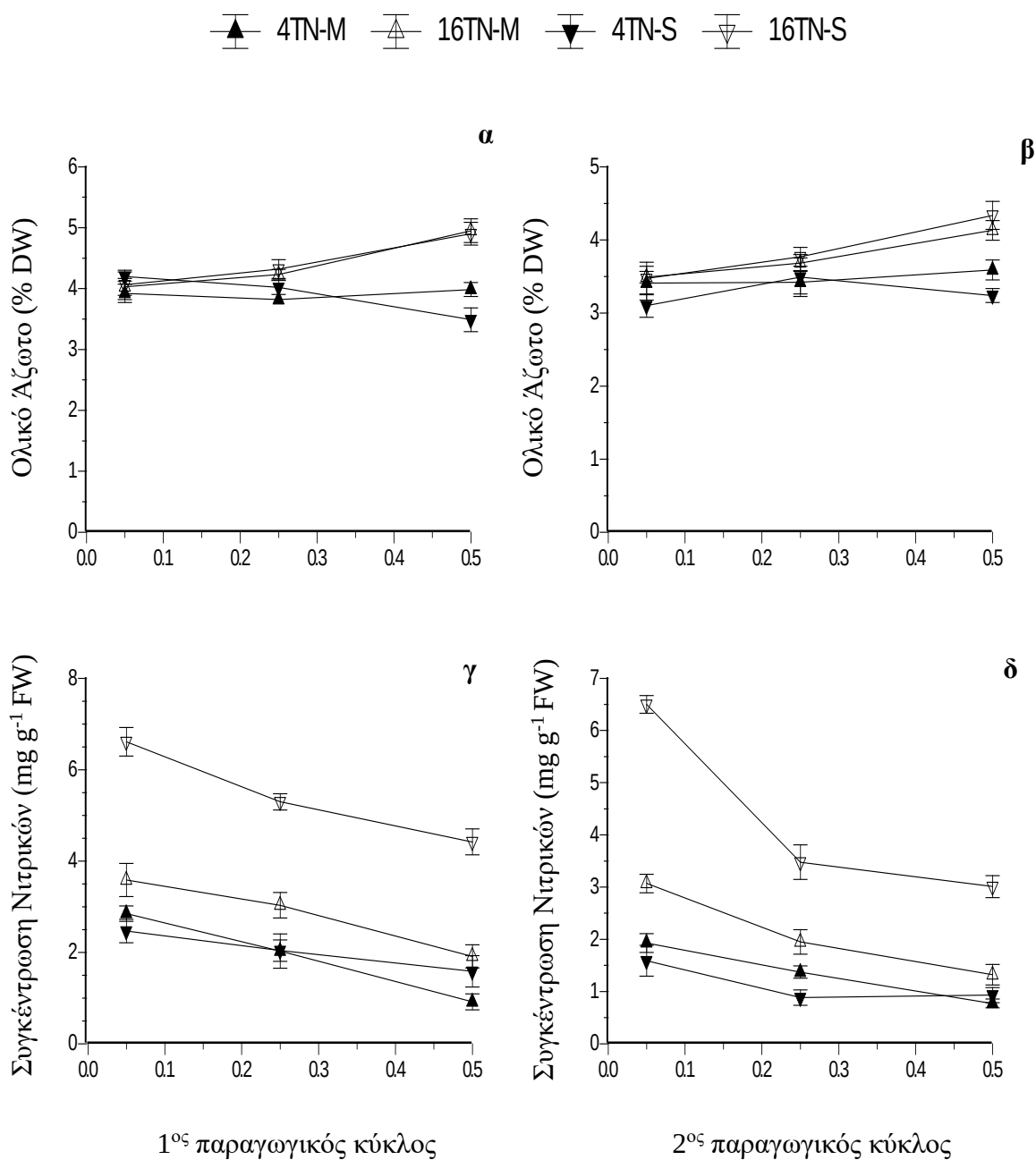
Επεμβάσεις		NH ₄ -N/ολικό-N (1 ^η συγκομιδή)				NH ₄ -N/ολικό-N (2 ^η συγκομιδή)			
		0.05	0.25	0.50	Μέσοι	0.05	0.25	0.50	Μέσοι
Ορεινός	Χαμηλό ολικό-N	17.17	15.68	18.93	17.26	28.95	37.24	29.28	31.82
	Υψηλό ολικό-N	17.49	22.42	17.66	19.19	33.63	31.25	31.09	31.99
	Μέσοι	17.33	19.05	18.30	18.23	31.29	34.25	30.19	31.91
Παραθαλάσσιος	Χαμηλό ολικό-N	20.47	21.02	18.15	19.88	24.86	37.49	37.05	33.13
	Υψηλό ολικό-N	17.33	20.48	19.83	19.21	24.06	26.17	28.56	26.26
	Μέσοι	18.90	20.75	18.99	19.55	24.46	31.83	32.81	29.70
Ολικό	Χαμηλό ολικό-N	18.82	18.35	18.54	18.57	26.91	37.37	33.17	32.48
	Υψηλό ολικό-N	17.41	21.45	18.75	19.20	28.85	28.71	29.83	29.13
Μέσοι		18.12	19.90	18.65	18.89	27.88	33.04	31.50	30.81
Στατιστική σημαντικότητα									
Προέλευση σπόρου (SO)				ΜΣ			ΜΣ		
Ολικό-N				ΜΣ			ΜΣ		
NH₄/Ολικό-N				ΜΣ			ΜΣ		
Προέλευση σπόρου × ολικό-N				ΜΣ			ΜΣ		
Προέλευση σπόρου × NH₄-N/Ολικό-N				ΜΣ			ΜΣ		
Ολικό-N × NH₄/Ολικό-N				ΜΣ			ΜΣ		
Προέλευση σπόρου × ολικό-N × NH₄/Ολικό-N				ΜΣ			ΜΣ		

Πίνακας 9: Επίδραση της προέλευσης του σπόρου (ορεινός ή παραθαλάσσιος), της παροχής ολικού αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, που δηλώνεται και ως 4TN και 16TN, αντίστοιχα) και των αναλογιών NH₄/ολικό-N (0.05, 0.25 και 0.50, αντίστοιχα) στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα του υδροπονικά αναπτυγμένου σε σάκους περλίτη σταμναγκαθιού στο ξηρό βάρος (g φυτό⁻¹) κατά τον πρώτο και δεύτερο παραγωγικό κύκλο. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή πειραματικών φυτών προέρχονταν από αυτοφυείς (άγριους) πληθυσμούς που αναπτύσσονταν είτε σε υψόμετρο κοντά στα 1200 m (Ο) ή δίπλα στη θάλασσα (Π).

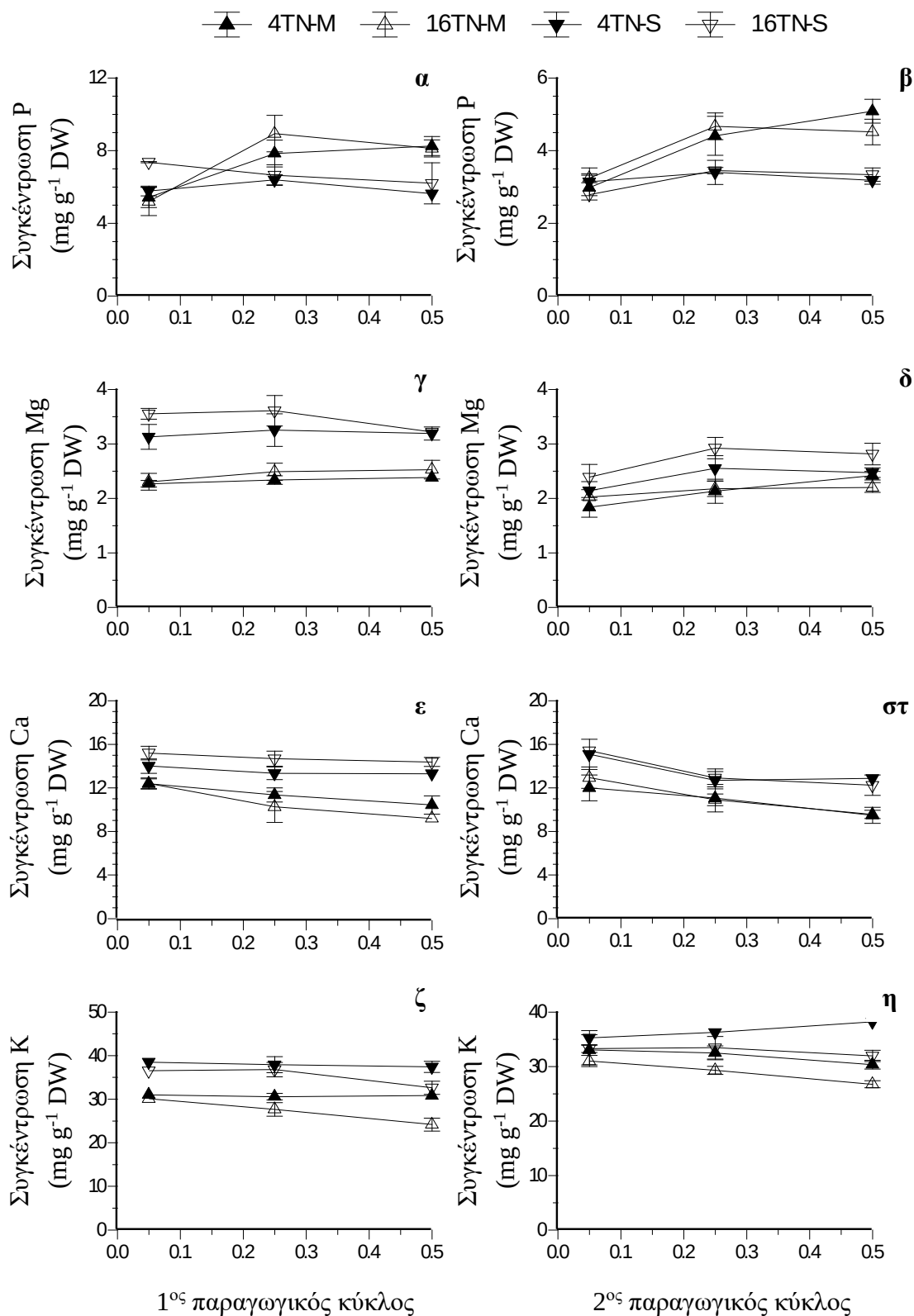
Επεμβάσεις		NH ₄ -N/ολικό-N (1 ^η συγκομιδή)				NH ₄ -N/ολικό-N (2 ^η συγκομιδή)			
		0.05	0.25	0.50	Μέσοι	0.05	0.25	0.50	Μέσοι
Ορεινός	Χαμηλό ολικό-N	2.47	2.32	2.56	2.45	4.18	7.28	5.95	5.80
	Υψηλό ολικό-N	2.71	3.25	2.45	2.80	5.97	4.95	4.23	5.05
	Μέσοι	2.59	2.78	2.50	2.62	5.07	6.11	5.09	5.42
Παραθαλάσσιος	Χαμηλό ολικό-N	2.33	2.12	2.06	2.17	3.08	4.66	5.92	4.55
	Υψηλό ολικό-N	2.16	2.64	2.26	2.35	3.63	3.80	3.78	3.74
	Μέσοι	2.25	2.38	2.11	2.25	3.36	4.23	4.85	4.15
Ολικό	Χαμηλό ολικό-N	2.39	2.22	2.34	2.32	3.63 c	6.16 a	5.94 ab	5.24
	Υψηλό ολικό-N	2.48	2.90	2.36	2.58	4.63 abc	4.37 bc	4.04 c	4.35
Μέσοι		2.42	2.56	2.35	2.44	4.13	5.26	4.99	4.79
Στατιστική σημαντικότητα									
Προέλευση σπόρου (SO)				*			**		
Ολικό N				ΜΣ			ΜΣ		
NH₄/Ολικό-N				ΜΣ			ΜΣ		
Προέλευση σπόρου × ολικό-N				ΜΣ			ΜΣ		
Προέλευση σπόρου × NH₄-N/Ολικό-N				ΜΣ			ΜΣ		
Ολικό-N × NH₄/Ολικό-N				ΜΣ			**		
Προέλευση σπόρου × ολικό-N × NH₄/Ολικό-N				ΜΣ			ΜΣ		



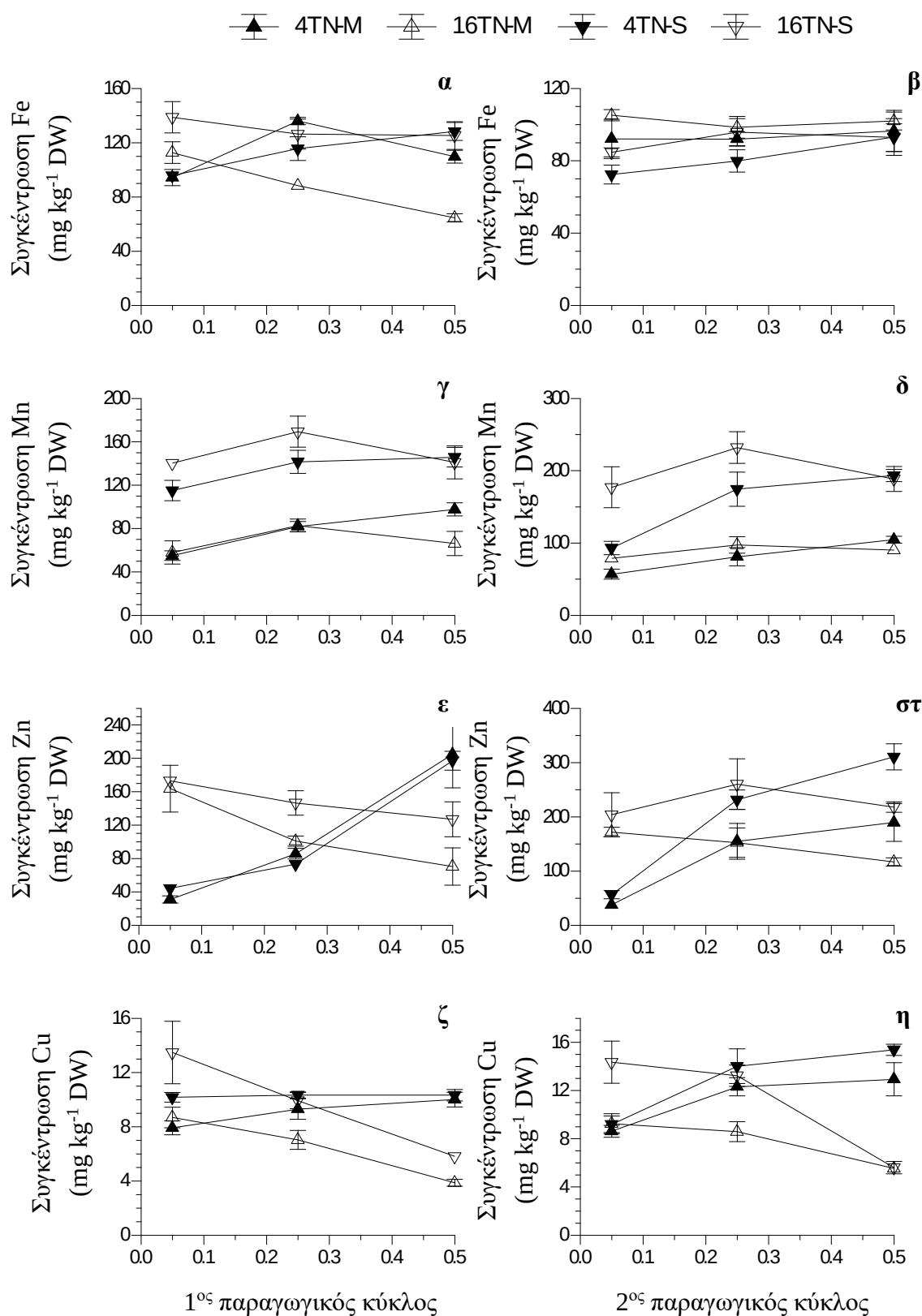
Γράφημα 1: Η εξέλιξη της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (α) και του pH (β) στο διάλυμα απορρόης, όπως επηρεάστηκε από τη συγκέντρωση του ολικού αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, που συμβολίζεται ως 4TN and 16TN, αντίστοιχα) και της αναλογίας NH₄⁺-N/ολικό-N (0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα) από θρεπτικό διάλυμα παρεχόμενο σε φυτά σταμναγκαθίου που αναπτύσσονταν σε σάκους περλίτη.



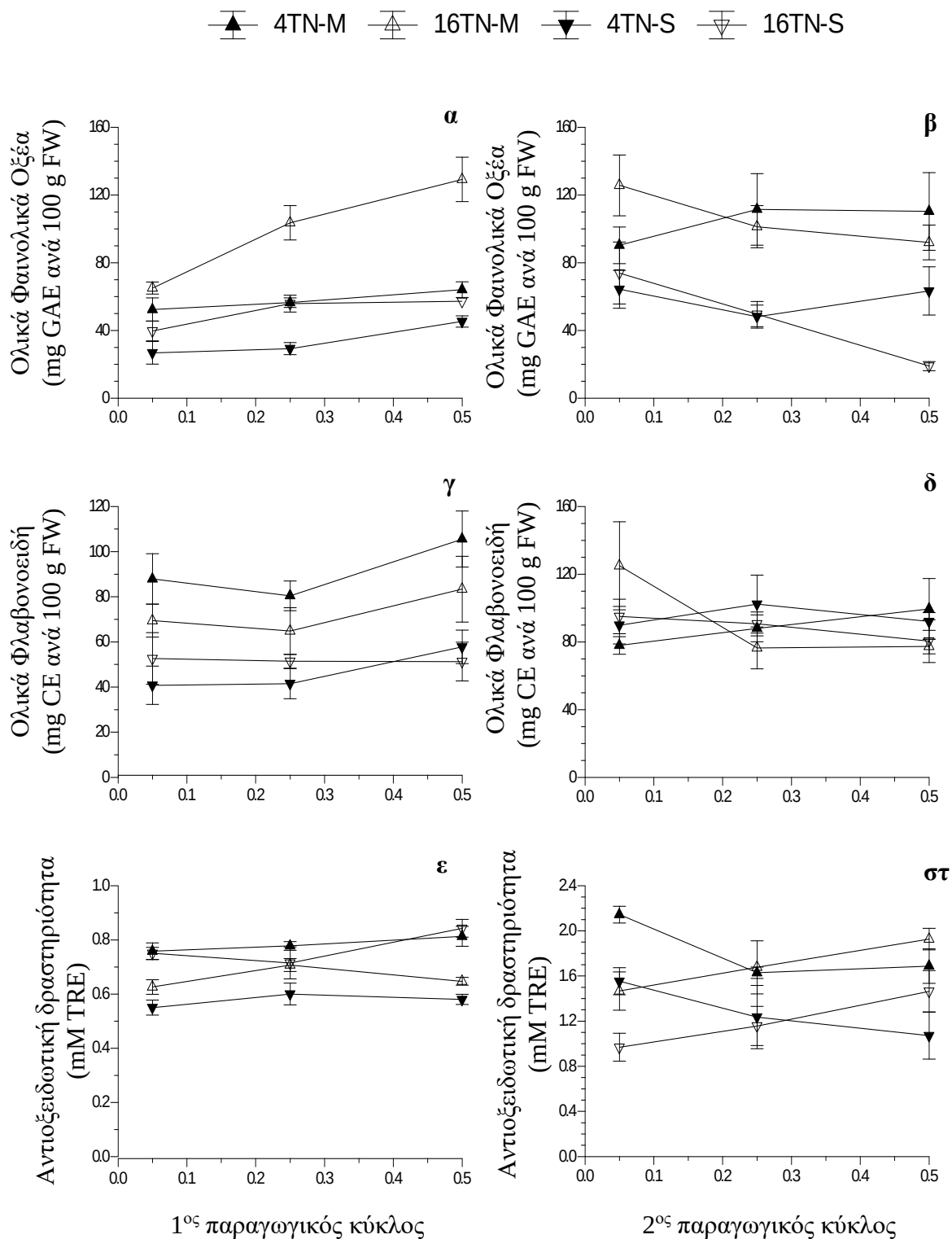
Γράφημα 2: Η επίδραση της προέλευσης του σπόρου (S ή M), της συγκέντρωσης του ολικού αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, που συμβολίζεται ως 4TN and 16TN, αντίστοιχα) και της αναλογίας NH₄⁺-N/ολικό-N (0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα) σε θρεπτικό διάλυμα παρεχόμενο σε φυτά σταμναγκαθίου που αναπτύσσονται πάνω σάκους περλίτη, στη συγκέντρωση του ολικού αζώτου στα φύλλα (α, β) και τη συγκέντρωση των νιτρικών στα φύλλα (γ, δ) και στους δύο παραγωγικούς κύκλους. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από άγριους οικότυπους που αναπτύσσονται είτε σε υψόμετρο στα 1200 m περίπου (M) είτε δίπλα στη θάλασσα (S).



Γράφημα 3: Η επίδραση της προέλευσης του σπόρου (Ο ή Π), της συγκέντρωσης του ολικού αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, που συμβολίζεται ως 4TN and 16TN, αντίστοιχα) και της αναλογίας NH₄⁺-N/ολικό-N (0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα) σε θρεπτικό διάλυμα παρεχόμενο σε φυτά σταμναγκαθίου που αναπτύσσονται πάνω σάκους περλίτη, στη συγκέντρωση του P, Mg, Ca και K στα φύλλα (α-η) και στους δύο παραγωγικούς κύκλους. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από άγριους οικότυπους που αναπτύσσονται είτε σε υψόμετρο στα 1200 m περίπου (M) είτε δίπλα στη θάλασσα (S).



Γράφημα 4: Η επίδραση της προέλευσης του σπόρου (Ο ή Π), της συγκέντρωσης του ολικού αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, που συμβολίζεται ως 4TN and 16TN, αντίστοιχα) και της αναλογίας NH₄⁺-N/ολικό-N (0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα) σε θρεπτικό διάλυμα παρεχόμενο σε φυτά σταμναγκαθίου που αναπτύσσονταν πάνω σάκους περλίτη, στη συγκέντρωση του Fe, Mn, Zn και Cu στα φύλλα (α-η) και στους δύο παραγωγικούς κύκλους. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από άγριους οικότυπους που αναπτύσσονται είτε σε υψόμετρο στα 1200 m περίπου (M) είτε δίπλα στη θάλασσα (S).



Γράφημα 5: Η επίδραση της προέλευσης του σπόρου (Ο ή Π), της συγκέντρωσης του ολικού αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, που συμβολίζεται ως 4TN and 16TN, αντίστοιχα) και της αναλογίας NH₄⁺-N/ολικό-N (0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα) σε θρεπτικό διάλυμα παρεχόμενο σε φυτά σταμναγκαθίου που αναπτύσσονταν πάνω σάκους περλίτη, στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών οξέων (α, β), ολικών φλαβονοειδών (γ, δ) και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (ε, στ) στα φύλλα και στους δύο παραγωγικούς κύκλους. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από άγριους οικότυπους που αναπτύσσονται είτε σε υψόμετρο στα 1200 m περίπου (M) είτε δίπλα στη θάλασσα (S).

Συζήτηση αποτελεσμάτων 1^{ης} πειραματικής χρονιάς

Η ανάπτυξη του σταμναγκαθίου (*C. spinosum*) δεν παρουσίασε κάποια αξιοσημείωτη μείωση όταν η συγκέντρωση του ολικού αζώτου στο θρεπτικό διάλυμα ήταν στα 4 mmol L⁻¹ συγκριτικά με τα φυτά που λάμβαναν θρεπτικό διάλυμα με 16 mmol L⁻¹ ολικό N. Η έλλειψη ανταπόκρισης σε χαμηλό επίπεδο παροχής αζώτου στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου φυτού είναι αρκετά σημαντική δεδομένου ότι το προτεινόμενο εύρος των συγκεντρώσεων του αζώτου στα θρεπτικά διαλύματα τα οποία χρησιμοποιούνται για την υδροπονική καλλιέργεια άλλων λαχανικών είναι αρκετά υψηλότερη, και κυμαίνονται από 10 έως 16 mmol L⁻¹ (De Kreij et al., 1999; Sonneveld and Voogt, 2009; Savvas et al., 2013). Μια εξήγηση για την ικανοποιητική ανταπόκριση του σταμναγκαθίου στα διάφορα επίπεδα παροχής αζώτου είναι ότι οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας προέρχονται από φυτά που είχαν αναπτυχθεί στο φυσικό τους περιβάλλον (άγριοι οικότυποι) οι οποίοι δεν έχουν εισαχθεί ακόμη σε κάποιο πρόγραμμα αναπαραγωγής ούτε έχουν επιλεγθεί για υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης (αναπαραγωγής) που προϋποθέτουν υψηλά επίπεδα παροχής αζώτου. Αντί αυτού, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους στο φυσικό τους περιβάλλον, τα φυτά είχαν προσαρμοστεί στις ξερικές συνθήκες των Μεσογειακών εδαφών τα οποία χαρακτηρίζονται από φτωχή βλάστηση και χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανική ύλη, και κατά συνέπεια από χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου (N) στο έδαφος.

Άλλο ένα επίσης ενδιαφέρον χαρακτηριστικό που παρουσιάζεται στα αποτελέσματα που συνθέτουν τη μελέτη αυτή είναι η ανταπόκριση του σταμναγκαθίου σε διάφορες αναλογίες των αμμωνιακών προς το ολικό άζωτο στο θρεπτικό διάλυμα. Αρκετοί ερευνητές έχουν δείξει ότι η αύξηση των αμμωνιακών επιπέδων στο θρεπτικό διάλυμα επηρεάζει την ανάπτυξη των φυτών και περιορίζει τις αποδόσεις σε πολλά φυτικά είδη όταν αυτά αναπτύσσονται υδροπονικά (Kotsiras et al., 2005; Guo et al., 2007; Nicola et al., 2015). Από την άλλη μεριά, όταν ένα σχετικά χαμηλό ποσοστό του ολικού αζώτου που περιέχεται σε ένα θρεπτικό διάλυμα παρέχεται με τη μορφή NH₄⁺-N, τα φυτά μεγαλώνουν καλύτερα και παρουσιάζουν υψηλότερες αποδόσεις συγκριτικά με τα φυτά που μεγαλώνουν κάτω από συνθήκες πλήρους απουσίας αμμωνιακών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μαρούλι όπου η παροχή ολικού αζώτου με τη μορφή NH₄⁺ σε ποσοστό 30% (NH₄⁺-N/ολικό-N = 0,3) αύξησε σε σημαντικό βαθμό τόσο το νωπό όσο και το ξηρό βάρος του σε πείραμα στην αρχή της άνοιξης (Savvas et al., 2006). Ωστόσο, η ανάπτυξη πολλών φυτικών ειδών μπορεί να περιοριστεί και με αναλογίες NH₄⁺-N/ολικό-N σημαντικά χαμηλότερες από 0,3. Μια αύξηση των NH₄⁺-N στο θρεπτικό διάλυμα από 1,0 σε 4,0 mmol L⁻¹ περιορίσε τόσο τη βλαστική ανάπτυξη όσο και την απόδοση των καρπών σε φυτά μελιτζάνας (Savvas et al., 2010). Σε μια άλλη μελέτη, η αύξηση στο επίπεδο παροχής των NH₄⁺-N μέσω του θρεπτικού διαλύματος σε καλλιέργεια αγγουριάς μείωσε σημαντικά την

παραγωγή βιομάζας των καρπών (Soltani et al., 2007). Παρόλο αυτά, στο συγκεκριμένο πείραμα, η αναλογία των NH_4^+ /ολικό-N δεν παρουσίασε κάποια σημαντική επίδραση στο νωπό και ξηρό βάρος των φύλλων σταμναγκαθίου, με τα παραπάνω αποτελέσματα να υποδεικνύουν ότι το σταμναγκάθι εμφανίζει ανθεκτικότητα ακόμη και όταν η παροχή αζώτου στο θρεπτικό διάλυμα με τη μορφή των αμμωνιακών φτάνει έως και το 50%. Το επίπεδο αυτό είναι αρκετά υψηλότερο από αυτό που προτείνεται για άλλα φυτικά είδη που καλλιεργούνται υδροπονικά, και το οποίο δεν θα πρέπει κανονικά να ξεπερνά το 15% (Sonneveld and Voogt, 2009).

Πολλοί ερευνητές αποδίδουν τουλάχιστον ένα μέρος από τις δυσμενείς επιδράσεις που ασκούν τα υψηλά επίπεδα NH_4^+ στο θρεπτικό διάλυμα στη συνακόλουθη μείωση του pH στο περιβάλλον των ριζών σε τιμές χαμηλότερες του 5 (Chaillou et al., 1991; Dickson et al., 2016). Στην παρούσα μελέτη, το pH στο διάλυμα απορροής, το οποίο αποτελεί κι έναν δείκτη του pH στο ριζικό σύστημα, μειώθηκε σε επίπεδα χαμηλότερα από το 5 αλλά μόνο στην περίπτωση της υψηλότερης αναλογίας NH_4^+ /ολικό-N (0,50) στον 2^ο παραγωγικό κύκλο. Η μείωση του pH ήταν πιο αξιοσημείωτη όταν η υψηλή αναλογία των NH_4^+ /ολικό-N συνδυάζονταν με το υψηλό επίπεδο παροχής αζώτου, 16 mmol L^{-1} , πιθανώς επειδή αυτός ο συνδυασμός προσδίδει μια υψηλότερη συγκέντρωση αμμωνιακών στο θρεπτικό διάλυμα. Εντούτοις, όταν εξετάζεται η σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος από κάθε μεταχείριση (επέμβαση) και οι αντίστοιχες τιμές του pH στο διάλυμα απορροής (Γράφημα 1), γίνεται φανερό ότι η μείωση του pH στο ριζικό σύστημα κυρίως επηρεάζεται από τις αναλογίες των NH_4^+ /ολικό-N και λιγότερο από την απόλυτη συγκέντρωση των NH_4^+ στο θρεπτικό διάλυμα. Η σχετιζόμενη με την συγκέντρωση NH_4^+ -μείωση του pH στο ριζικό σύστημα των φυτών μπορεί να είναι αποτέλεσμα τόσο της προτίμησης ως προς την πρόσληψη αμμωνιακών από τις ρίζες τους (Mota et al., 2011; Dickson et al., 2016) όσο και από τη νιτροποίηση (Lang and Elliott, 1991). Η προτίμηση αυτή των NH_4^+ -N έναντι των NO_3^- -N από τα φυτά μειώνει το pH στο ριζικό σύστημα επειδή αυτό, καθώς αυξάνει την απορρόφηση N σε μορφή κατιόντος με αντίστοιχη μείωση της απορρόφησης σε μορφή ανιόντος, αυξάνει την συνολική πρόσληψη κατιόντων η οποία εξισορροπείται ηλεκτροχημικά με ταυτόχρονη απελευθέρωση H^+ από τα κύτταρα των ριζών για την διατήρηση της ηλεκτροχημικής ισορροπίας στο κυτοδιάλυμα (Dickson et al., 2016; Sarasketa et al., 2016). Επιπλέον, αυξημένες συγκεντρώσεις NH_4 -N αυξάνουν την νιτροποίηση με αποτέλεσμα την απελευθέρωση H^+ όταν το NH_4^+ οξειδώνεται σε NO_2^- (Heil et al., 2016). Ωστόσο, εάν η νιτροποίηση αποτελούσε κυρίαρχο παράγοντα για τη μείωση του pH στο ριζικό σύστημα, τότε η απόλυτη συγκέντρωση των NH_4^+ στις ρίζες θα ήταν ο μοναδικός σημαντικός παράγοντας για την εκτεταμένη μείωση του pH. Σε αντίθεση με τη νιτροποίηση, η ισορροπία (ή το ισοζύγιο) πρόσληψης μεταξύ των NH_4^+ -N και NO_3^- -N και, συγχρόνως (ή ταυτόχρονα), η αναλογία πρόσληψης των ανιόντων προς τα κατιόντα, επηρεάζεται σε πολύ υψηλό βαθμό από την αναλογία των NH_4^+ /ολικό-N στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα. Συνεπώς, τα

αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι τα αμμωνιακά μειώνουν το pH κυρίως επειδή απορροφώνται κατά προτίμηση από τα φυτά με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η αναλογία πρόσληψης των ανιόντων προς τα κατιόντα σε τιμές άνω του 1, και λιγότερο λόγω της νιτροποίησης.

Η αύξηση της αναλογίας $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{ολικό-N}$ στο θρεπτικό διάλυμα που δόθηκε σε φυτά σταμναγκαθίου ενίσχυσε το ποσοστό του ολικού αζώτου στα φύλλα, ειδικά όταν αυτό συνδυάζεται με το υψηλότερο επίπεδο παροχής αζώτου (16 mmol L^{-1}). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης πάνω σε φυτά κανόλας (ελαιοκράμβης), στα οποία οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικού αζώτου στους φυτικούς ιστούς παρατηρήθηκαν όταν η παροχή των NH_4^+ μεγιστοποιούνταν (Bybordi et al., 2009). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν στο αγγούρι (Heuer, 1991), την πιπεριά (Bar-tal et al., 2001) και τη μελιτζάνα (Savvas et al., 2010). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αντίδι, η συσσώρευση του ολικού αζώτου στα φύλλα των φυτών αυξήθηκε όταν ένα μέρος του αζώτου στο θρεπτικό διάλυμα δόθηκε με τη μορφή των $\text{NH}_4^+\text{-N}$, και μειώθηκε με την παροχή 100% $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (Santamaria and Elia, 1997). Στο χαμηλό επίπεδο παροχής N (4 mmol L^{-1}) στο θρεπτικό διάλυμα, η επίδραση της αναλογίας των $\text{NH}_4^+/\text{ολικό-N}$ στο ποσοστό του ολικού αζώτου στα φύλλα σταμναγκαθίου ήταν μικρότερης σημασίας και όχι σταθερή, εξαρτώμενη και από το γονότυπο του φυτού. Το αποτέλεσμα αυτό προκύπτει πιθανώς επειδή, στο χαμηλό επίπεδο παροχής αζώτου, η αύξηση της συγκέντρωσης των $\text{NH}_4^+\text{-N}$ στο θρεπτικό διάλυμα ως αύξηση της αναλογίας $\text{NH}_4^+/\text{ολικό-N}$ πραγματοποιήθηκε αλλά δεν ήταν επαρκής ώστε να επιφέρει σημαντική αύξηση των επιπέδων του οργανικά-δεσμευμένου αζώτου στα φύλλα των φυτών. Επιπλέον στην αλληλεπίδραση που εμφανίστηκε μεταξύ του οικότυπου και της μορφής παροχής N ($\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{ολικό-N}$) στο θρεπτικό διάλυμα έδειξε ότι το χαμηλό επίπεδο αζώτου (4 mmol L^{-1}) συνδυαζόμενο με την υψηλότερη αναλογία $\text{NH}_4^+/\text{ολικό-N}$ (0,50) οικότυπος προερχόμενος από τα ορεινά της Κρήτης ήταν αυτός που παρουσίασε υψηλότερη συσσώρευση ολικού αζώτου στα φύλλα του.

Η αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών στα φύλλα με την αύξηση των συγκεντρώσεων τόσο της παροχής αζώτου όσο και των NO_3^- (μειώνοντας την αναλογία των $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{ολικό-N}$) στο θρεπτικό διάλυμα είναι μια πλήρως αναμενόμενη ανταπόκριση, που έρχεται σε συμφωνία και με αρκετές άλλες προηγούμενες επιστημονικές μελέτες (Pill and Lambeth, 1977; Santamaria et al., 1997; Kotsiras et al., 2002; Gent, 2003). Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με την υψηλή αντοχή του σταμναγκαθίου στο $\text{NH}_4^+\text{-N}$, υποδηλώνουν ότι τα χαμηλά επίπεδα νιτρικών στο εμπορικά παραγόμενο σταμναγκάθι, μπορούν να επιτευχθούν με την παροχή χαμηλών επιπέδων ολικού αζώτου σε συνδυασμό με μια υψηλή ποσότητα των $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{ολικό-N}$ στη λίπανση των καλλιεργειών χωρίς να προκαλούνται σημαντικές μειώσεις στις αποδόσεις του. Περαιτέρω μειώσεις στις συγκεντρώσεις των νιτρικών στα φύλλα σταμναγκαθίου μπορούν να επιτευχθούν διαλέγοντας τους κατάλληλους οικότυπους όπως αποδεικνύεται από την τεράστια διαφορά που βρέθηκε μεταξύ των δύο οικότυπων που

αξιολογήθηκαν, και πιο συγκεκριμένα στο υψηλό επίπεδο παροχής ολικού αζώτου. Τα αρκετά πιο χαμηλά επίπεδα των NO_3^- στον ορεινό οικότυπο συγκριτικά με αυτά που προέρχονται από την παραθαλάσσια περιοχή, στο υψηλότερο επίπεδο παροχής αζώτου, δείχνουν ότι ο τελευταίος είναι πιο επιρρεπής στη συσσώρευση NO_3^- στα χυμοτόπια όταν οι εξωτερικές συγκεντρώσεις των NO_3^- είναι υπερβολικά υψηλές.

Πολλές μελέτες στο παρελθόν έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις των νιτρικών στα φύλλα ποικίλλουν αρκετά μεταξύ των φυτικών ειδών, μεταξύ ποικιλιών από τα ίδια είδη, ακόμα και από γονοτύπους που διαφέρουν ως προς την πλοειδία τους (Blom-Zandstra, 1989; Grzebelus and Baranski, 2001; Harada et al., 2003; Anjana et al., 2007). Η διαφοροποίηση των επιπέδων των νιτρικών μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών έχει μελετηθεί εκτενώς στο μαρούλι. Όπως έχει ήδη αναφερθεί από τους Santamaria (2006), οι μη κεφαλωτές (loose-leaf) ποικιλίες μαρουλιού είχαν γενικά υψηλότερες συγκεντρώσεις νιτρικών σε σχέση με τις κεφαλωτές (tight-headed) ποικιλίες, όπως για παράδειγμα των κατσαρών-κεφαλωτών ποικιλιών (iceberg). Η περιεκτικότητα των φυτών σε νιτρικά είναι γενετικά ελεγχόμενη και πιθανώς να ελέγχεται από διάφορα γονίδια (Harrison et al., 2004). Τα γενετικά ελεγχόμενα χαρακτηριστικά μπορεί να συσχετίζονται με τις μεταβολές των συγκεντρώσεων των νιτρικών στους ιστούς μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων που συμπεριλαμβάνουν τη δραστηριότητα κάποιων ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι του αζώτου και ειδικότερα η νιτρική ρεδουκτάση (NR) και η νιτρώδης ρεδουκτάση (NiR) (Santamaria, 2006).

Μια μικρότερης σημαντικότητας επίδραση από τις αναλογίες των NH_4^+ /ολικό-N στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα στις συγκεντρώσεις των K^+ , Ca^{2+} και Mg^{2+} είναι εύλογη διότι τα μακροκατιόντα αυτά σχηματίζουν ισχυρές βάσεις οι οποίες διαχωρίζονται πλήρως στα υδατικά διαλύματα και έτσι η δραστηριότητά τους δεν επηρεάζεται από το pH (De Rijck and Schrevens, 1998). Η ελάχιστη μείωση των συγκεντρώσεων του K^+ και του Ca^{2+} με την αύξηση της αναλογίας των NH_4^+ /ολικό-N, η οποία δεν ήταν σταθερή σε όλες τις μεταχειρίσεις, αποδίδεται στον ευρέως γνωστό ανταγωνισμό των κατιόντων αυτών με τα NH_4^+ (Heuer, 1991; Marschner, 2012). Φαίνεται ότι ο ανταγωνισμός μεταξύ των NH_4^+ / Ca^{2+} είναι ισχυρότερος σε σχέση μεταξύ αυτών του NH_4^+ Mg^{2+} και έτσι η μείωση των επιπέδων του Ca^{2+} στα φύλλα είχε σαν αποτέλεσμα μια μικρή αύξηση στη συγκέντρωση του Mg^{2+} , δεδομένου ότι το Ca^{2+} και το Mg^{2+} παρουσιάζουν και μεταξύ τους ανταγωνιστική συμπεριφορά ως προς την πρόσληψη και μεταφορά τους. Εντούτοις, οι αλλαγές που επιβλήθηκαν από το NH_4^+ στις συγκεντρώσεις των μακροκατιόντων στα φύλλα ήταν μικρότερες και επομένως δεν είχαν σημαντική επίδραση στην παραγωγή βιομάζας από τα φυτά. Αντίθετα από τα μακροκατιόντα, ο φώσφορος είχε την τάση να αυξάνεται στα φύλλα με την αύξηση της αναλογίας των NH_4^+ /ολικό-N, και ειδικότερα στην περίπτωση του ορεινού οικότυπου. Αυτό πιθανώς να συσχετίζεται με τα χαμηλά επίπεδα του pH στο ριζικό σύστημα των φυτών όταν αυτά αναπτύσσονται σε συνθήκες αυξημένης αναλογίας των

NH_4^+ /ολικό-N. Η μείωση της πρόσληψης του P σε υψηλά επίπεδα pH στο ριζικό σύστημα είναι μια πολύ γνωστή ανταπόκριση του, η οποία συσχετίζεται με την προοδευτική μετατροπή των H_2PO_4^- σε μια μορφή μικρότερης διαθεσιμότητας από τα φυτά (HPO_4^-) καθώς το pH αυξάνεται στο ριζικό σύστημα (Schachtman et al., 1998). Εντούτοις, τα πιο σημαντικά ευρήματα παρουσιάζονται στο Γράφημα 3 και είναι η ισχυρή επίδραση του οικότυπου στη συγκέντρωση των K^+ , Ca^{2+} και Mg^{2+} στα φύλλα, τα οποία ήταν σημαντικά υψηλότερα, και του P, ο οποίος ήταν σημαντικά χαμηλότερος στον παραθαλάσσιο οικότυπο. Όπως αναφέρεται και στο εδάφιο των Αποτελεσμάτων, η νωπή βιομάζα των φυτών ήταν σε παρόμοια επίπεδα και για τους δύο οικότυπους, ενώ η ξηρή βιομάζα ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο παραθαλάσσιο οικότυπο, πράγμα το οποίο υποδεικνύει ότι ο τελευταίος περιείχε μεγαλύτερες ποσότητες νερού στους ιστούς του. Έτσι, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μακροκατιόντων στους ιστούς του παραθαλάσσιου οικότυπου πιθανώς να συσχετίζονται με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις διαλυτών ουσιών στα κύτταρα των φύλλων, και κατά συνέπεια με ένα υψηλότερο υδατικό δυναμικό στα φύλλα το οποίο είναι ικανό να συγκρατεί περισσότερο νερό στα φύλλα.

Η αύξηση των συγκεντρώσεων των Zn^{2+} , Cu^{2+} και Mn^{2+} στα φύλλα, όταν η παροχή με χαμηλό άζωτο συνδυάζεται με μια αύξηση της αναλογίας των NH_4^+ -N/ολικό-N στο θρεπτικό διάλυμα, αποδίδεται στην επίδραση της αναλογίας αυτής στο pH του ριζικού συστήματος. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, παρέχοντας μέρος του N ως NH_4^+ -N μπορεί συμβάλλει στη διατήρηση χαμηλότερων επιπέδων pH στο ριζικό σύστημα, κυρίως επειδή παρουσιάζεται μια μεγαλύτερη προτίμηση από τα φυτά στην πρόσληψη των NH_4^+ , η οποία αντισταθμίζεται ηλεκτροχημικά με την απελευθέρωση H^+ από τα κύτταρα των ριζών. Είναι επίσης ήδη γνωστό ότι τα ιχνοστοιχεία (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , και Mn^{2+}) εν μέρει υδrolύονται σε υδατικά διαλύματα καθιστώντας τα έτσι σε μορφές μη διαθέσιμες από τα φυτά και, συνεπώς, και η πρόσληψή τους μειώνεται με την αύξηση του pH (De Rijck and Schrevens, 1998). Ο συνδυασμός ενός χαμηλού επιπέδου αζώτου (4 mmol L^{-1}) με τη χαμηλή αναλογία των NH_4^+ -N/ολικό-N συσχετίστηκε με αρκετά χαμηλά επίπεδα παροχής NH_4^+ -N, και αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα υψηλά επίπεδα pH στο ριζικό σύστημα, τα οποία περιόρισαν την πρόσληψη των στοιχείων αυτών. Μια εξαίρεση αποτέλεσε ο σίδηρος του οποίου η παροχή έγινε με τη χηλική μορφή, η οποία είναι διαθέσιμη για τα φυτά ακόμα και σε υψηλότερα επίπεδα pH (Sonneveld and Voogt, 2009). Ωστόσο, όταν το επίπεδο αζώτου ήταν υψηλό (16 mmol L^{-1}), ακόμα και στη χαμηλότερη αναλογία των NH_4^+ -N/ολικό-N, η παροχή των NH_4^+ ήταν αρκετά υψηλή ώστε να αποτρέψει την αύξηση του pH πάνω από τα κρίσιμα επίπεδα πρόσληψης των Zn^{2+} , Cu^{2+} και Mn^{2+} .

Αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι η βιοσύνθεση και η συσσώρευση των φαινολικών ενώσεων στους ιστούς των φυτών επηρεάζεται έντονα από την έλλειψη αζώτου (Sanchez et al., 2000; Scheible et al., 2004; Salahas et al., 2011). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, οι μεταχειρίσεις με το χαμηλό ολικό άζωτο δεν οδήγησαν σε συνθήκες καταπόνησης από ανεπάρκεια αζώτου. Συνεπώς, το χαμηλό επίπεδο

αζώτου στο θρεπτικό διάλυμα δεν αύξησε τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών οξέων στα φύλλα του σταμναγκαθιού. Αντιθέτως, στον 1^ο παραγωγικό κύκλο, τα υψηλά επίπεδα αζώτου στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα αύξησαν την περιεκτικότητα των φυτών σε ολικά φαινολικά οξέα.

Η υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα είναι ένα έντονα επιθυμητό χαρακτηριστικό το οποίο προσδίδει μεγαλύτερη διατροφική αξία στα λαχανικά (Trichopoulou et al., 2000). Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών οξέων, των φλαβονοειδών, καθώς επίσης και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, ήταν υψηλότερες για τον ορεινό οικότυπο συγκριτικά με αυτές του παραθαλάσσιου. Για αυτόν τον λόγο, ο ορεινός οικότυπος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια γενετική πηγή χρήσιμη στην αναπαραγωγή ποικιλιών *C. spinosum* με υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ουσίες και κατά συνέπεια υψηλότερης διατροφικής αξίας.

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών στον ορεινό πληθυσμό συσχετίζονται με μια υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της περιεκτικότητας των φαινολικών και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, ενώ κάποιες άλλες όχι. Για παράδειγμα, μία μελέτη πάνω σε επιλεγμένους καρπούς, λαχανικά και προϊόντα σιτηρών έδειξε μια ισχυρή σχέση ανάμεσα στα ολικά φαινολικά οξέα και στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα (Velioglu et al., 1998), ενώ σε μια άλλη μελέτη σε εδώδιμα και μη εδώδιμα φυτικά υλικά (μούρα, καρποί, λαχανικά, κτλ.) δεν φάνηκε κάποια μεταξύ τους αλληλεπίδραση (Kähkönen et al., 1999). Εντούτοις, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα δεν είναι αποτέλεσμα μόνο της παρουσίας φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών αλλά επίσης και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών όπως αυτής των καροτενοειδών και διαφόρων βιταμινών. Αναλόγως, μια συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των ολικών φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών αλλά και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας στους φυτικούς ιστούς υποδεικνύει μια υψηλή κατανομή των φαινολών και των φλαβονοειδών στην ολική αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Στην παρούσα μελέτη, οι διαφορές στα ολικά φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή μεταξύ του ορεινού και του παραθαλάσσιου οικότυπου ήταν μεγαλύτερες σε σύγκριση με τις διαφορές στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει ότι οι συγκεντρώσεις άλλων σημαντικών αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως το ασκορβικό οξύ, μπορεί να βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στο σταμναγκάθι, κάτι που έχει ήδη αναφερθεί σε άλλη σχετική μελέτη (Petropoulos et al., 2016), αν και μπορεί να είναι παρόμοια στους δύο οικότυπους που μελετήθηκαν.

Κεφάλαιο Δ

Επίδραση της πηγής αζώτου και των διαφορετικών επιπέδων του στον πρωτογενή μεταβολισμό δύο διαφορετικών οικότυπων σταμναγκαθίου (*Cichorium spinosum* L.) καλλιεργούμενων υδροπονικά

Σκοπός πειράματος

Στην παρούσα μελέτη, δύο διαφορετικοί οικότυποι σταμναγκαθίου (άγριο ραδίκι) δέχθηκαν την παροχή δύο διαφορετικών επιπέδων αζώτου, μια χαμηλή στα 4 mM και μια κανονική στα 16 mM, σε συνδυασμό με τρία διαφορετικά επίπεδα NH_4^+ /ολικό-N (0.05 mM, 0.25 και 0.50 αντίστοιχα), με σκοπό την καλύτερη κατανόηση των επιδράσεων που ασκούν το συνολικό επίπεδο παροχής ολικού αζώτου καθώς και η μορφή του αζώτου στον πρωτογενή μεταβολισμό των φυτών. Σύμφωνα με τα μέχρι στιγμής δεδομένα από την βιβλιογραφία, η επίδραση της μορφής και της συνολικής ποσότητας του παρεχόμενου αζώτου στο μεταβολικό προφίλ του σταμναγκαθίου δεν φαίνεται να έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα. Τα δεδομένα της επίδρασης των παραπάνω δύο παραγόντων καθώς και του οικότυπου στο μεταβολικό προφίλ του σταμναγκαθίου μπορούν να αξιοποιηθούν για τον καλύτερο σχεδιασμό προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης με στόχο την δημιουργία καθαρών σειρώ και υβριδίων σταμναγκαθίου. Στην παρούσα εργασία, η μελέτη του μεταβολικού προφίλ σε φύλλα σταμναγκαθίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση GC/EI/MS.

Υλικά και Μέθοδοι

Βλ. Κεφάλαιο Γ

Αποτελέσματα

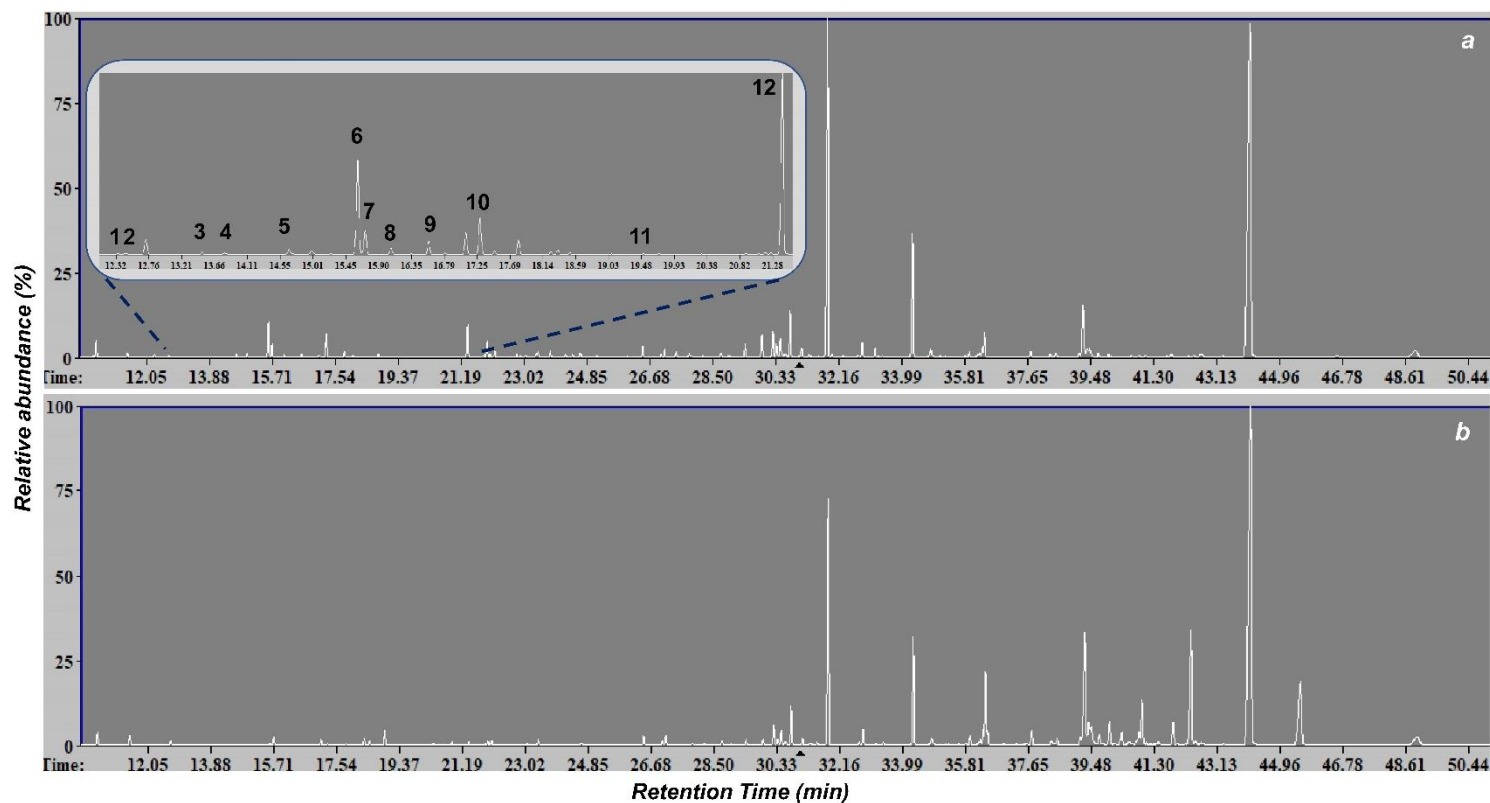
4.1. Γενική αναφορά στα αποτελέσματα της GC/EI/MS μεταβολικής ανάλυσης

Η επεξεργασία των δεδομένων είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση συνολικά 156 μεταβολικών χαρακτήρων. Αρκετά αμινοξέα, οργανικά οξέα, καρβοξυλικά οξέα και λιπαρά οξέα αποτέλεσαν το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Επιπρόσθετα, οι πληροφορίες για τους ανιχνευμένους μεταβολίτες αντλήθηκαν μέσω κατάλληλων βάσεων δεδομένων όπως οι ακόλουθες: KEGG, Golm Metabolome Database, και PubChem, αποκωδικοποιώντας τα βιοσυνθετικά μονοπάτια στα οποία οι μεταβολίτες λαμβάνουν μέρος, και παρέχονται μαζί με τις κατηγορίες (chemical groups) όπου ανήκουν στα ληφθέντα δεδομένα (data set). Επίσης, υπήρξε ένας αριθμός μεταβολιτών οι οποίοι δεν ταυτοποιήθηκαν.

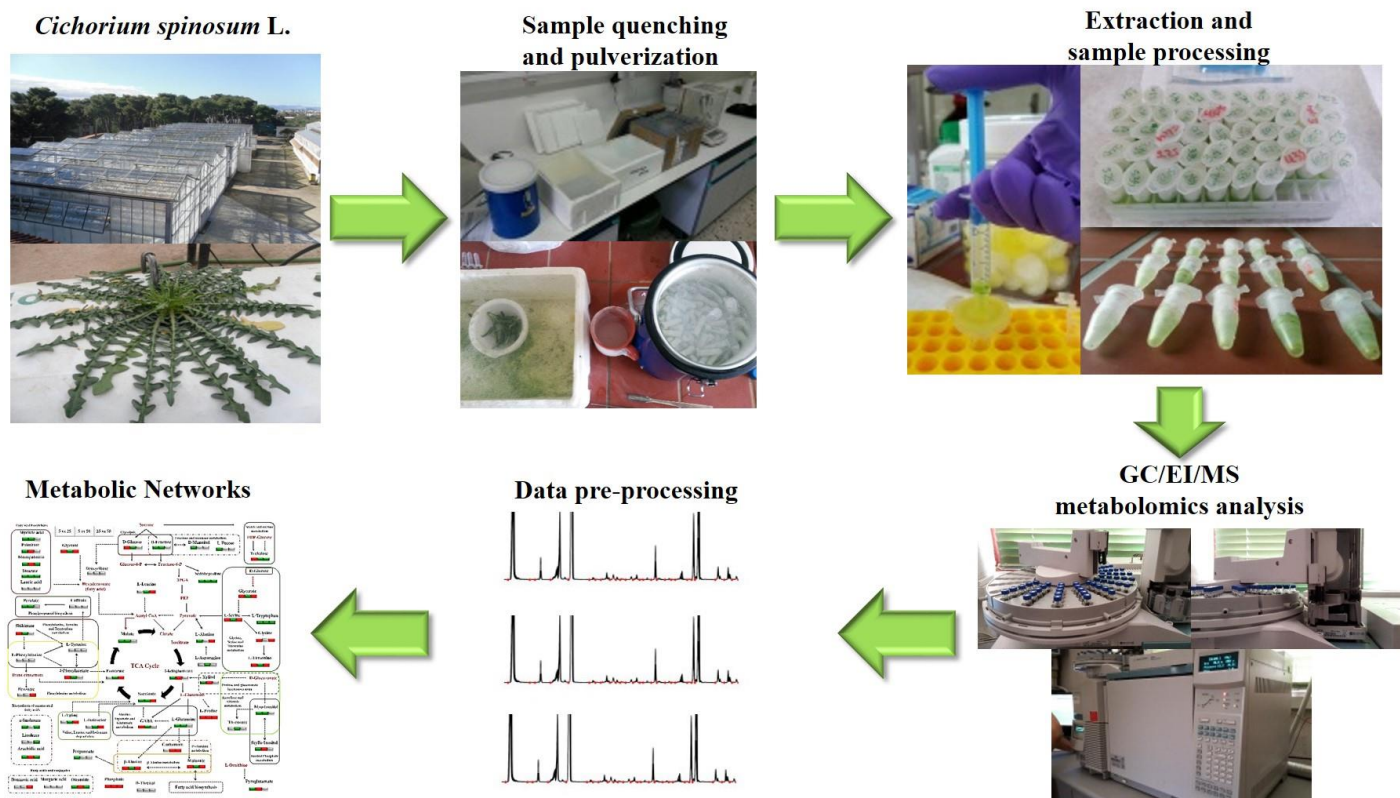
Η ανθεκτικότητα και η υψηλή ποιότητα των πειραματικών επεμβάσεων και βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων (Διάγραμμα 4) επαληθεύεται από την ποιότητα των ληφθέντων χρωματογραμμάτων (Διάγραμμα 3) αλλά και από τα PLS-DA score plots (Διάγραμμα 5). Επίσης, τα PLS-DA score plots,

δημιουργήθηκαν για τις πέντε στο σύνολο εξεταζόμενες συγκρίσεις (ζευγάρια) οι οποίες προέκυψαν από τις πειραματικές επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν στα φυτά σταμναγκαθίου (Διάγραμμα 5). Επιπλέον, για την επισκόπηση των αποτελεσμάτων από τη μεταβολική ανάλυση πραγματοποιήθηκε και η πολυπαραγοντική ανάλυση PCA, τα αποτελέσματα της οποίας απέδειξαν ότι δεν υπήρχαν outliers (τα δεδομένα δεν συμπεριλαμβάνονται).

Figure S1

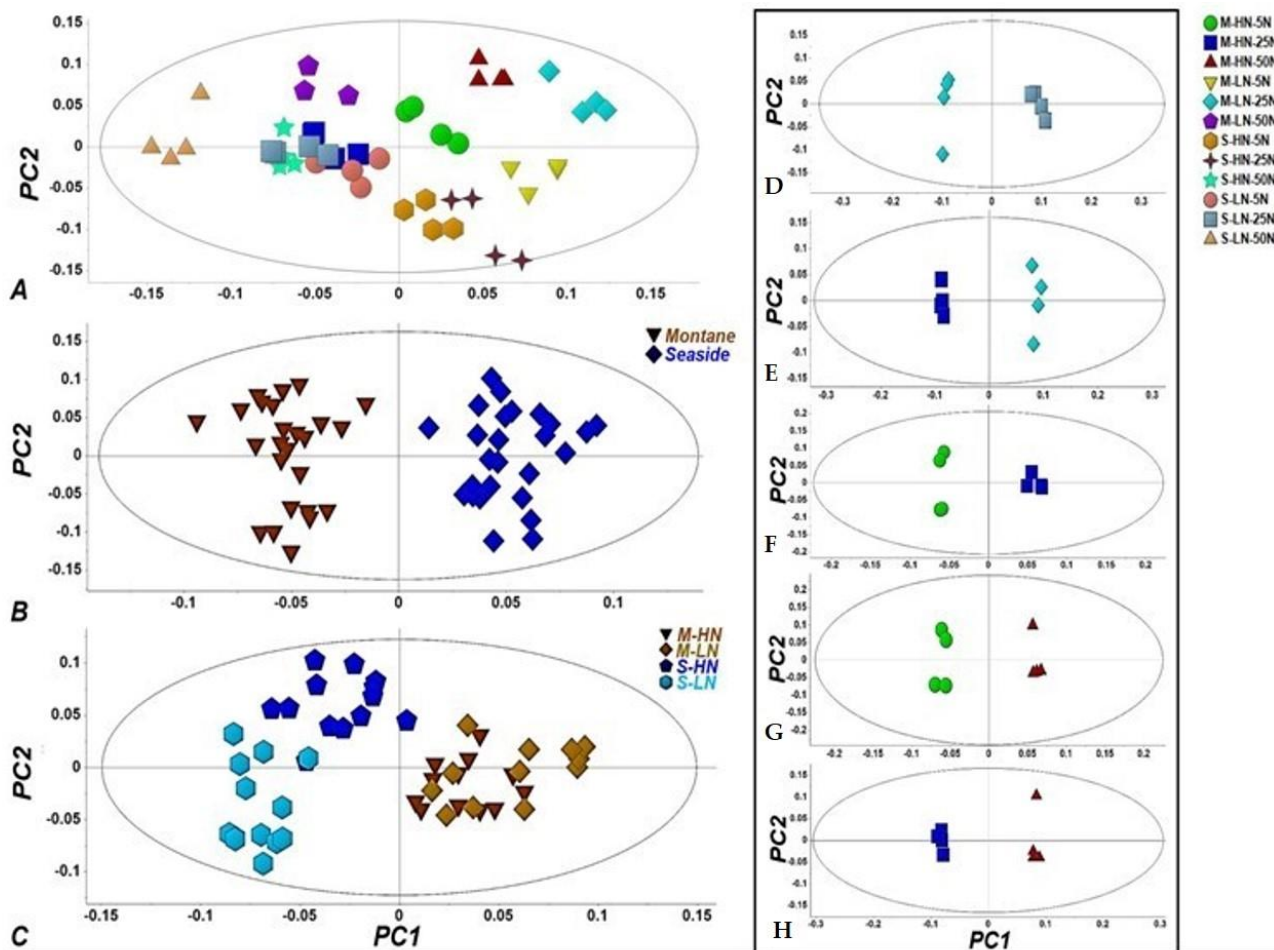


Διάγραμμα 3: Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα χρωματογραμμάτος GC/EI/MS του μεταβολικού προφίλ φυτών σταμναγκαθίου (*Chicorium spinosum* L.) των δύο διαφορετικών εξεταζόμενων οικοτύπων, του ορεινού (a) και του παραθαλάσσιου (b) αναπτυγμένοι κάτω από συνθήκες χαμηλής παροχής N και υψηλής αναλογίας 0,50 NH_4^+ προς ολικό-N (1. L-proline, 2. L-Isoleucine, 3. Malonate, 4. L-Valine, 5. β -Alanine, 6. Phosphate, 7. Glycerol, 8. L-Threonine, 9. Succinate, 11. Aspartate, 12. Malate)



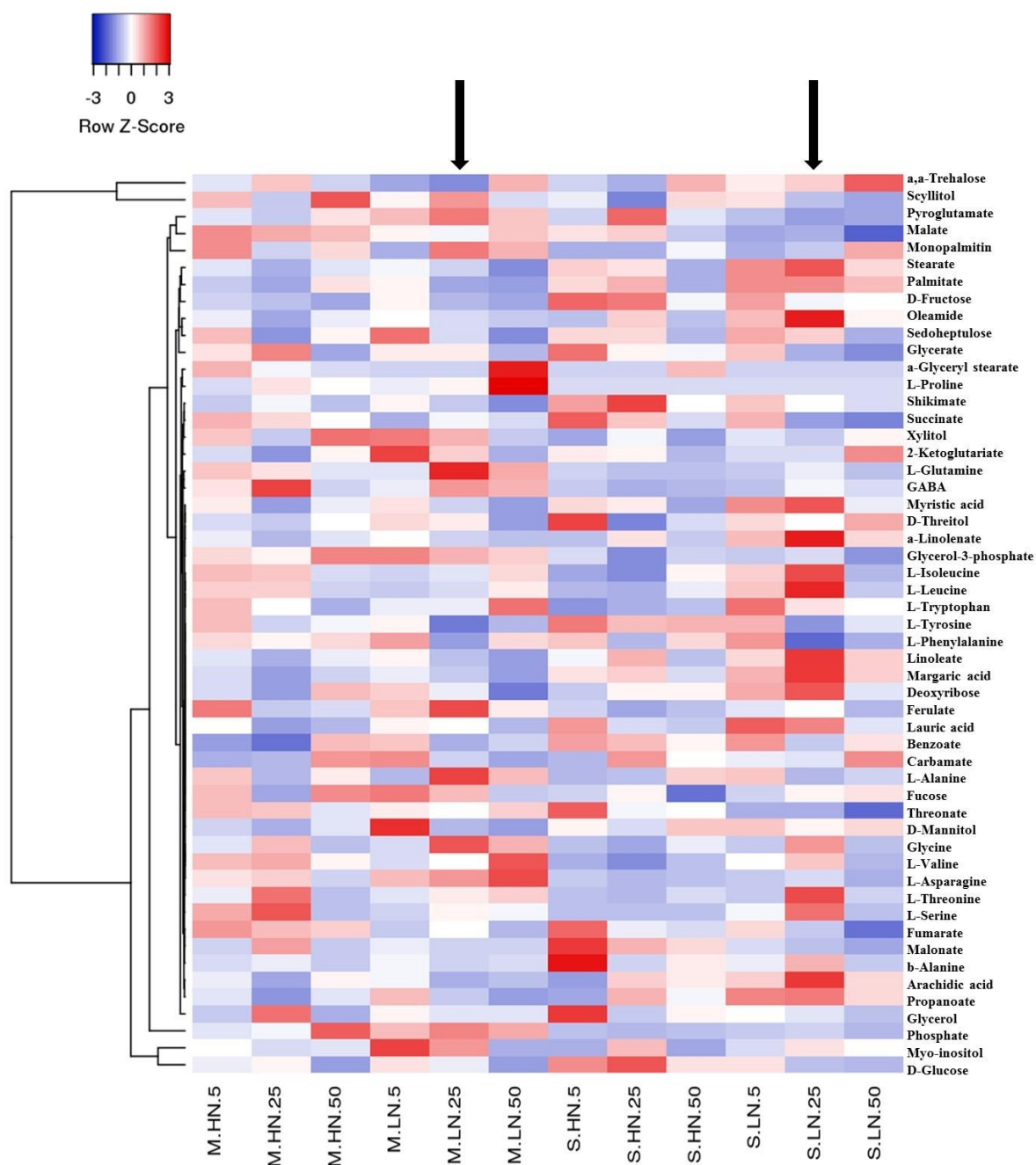
Διάγραμμα 4: Σχεδιάγραμμα για την πορεία των αναλύσεων της μεταβολομικής για τη μελέτη του αντίκτυπου δύο διαφορετικών επιπέδων παροχής N, ένα χαμηλό στα 4 mmol L^{-1} και ένα υψηλό στα 16 mmol L^{-1} , συνδυαζόμενα με τρεις διαφορετικές αναλογίες $\text{NH}_4/\text{ολικό-N}$ (0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα) στον πρωτογενή μεταβολισμό φυτών του *Cichorium spinosum* L., με τη χρήση μεταβολομικής ανάλυσης με χρήση GC/EI/MS. Το πείραμα διεξήχθη σε μη θερμαινόμενο θερμοκήπιο σε σάκους με περλίτη ως υπόστρωμα. Στο σύνολο, δώδεκα επαναλήψεις, για τον κάθε οικότυπο, πραγματοποιήθηκαν ανά επέμβαση. Κάθε τρία (δείγματα) ομογενοποιούνταν ώστε να προκύψει το τελικό δείγμα ανάλυσης. Τέσσερα συγκεντρωτικά δείγματα και ένα δείγμα μάρτυρας (quality control sample-QC) αναλύθηκαν ανά επέμβαση. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κατά τη δεύτερη συγκομιδή μετά το πέρας των επεμβάσεων.

Τα αποτελέσματα των OPLS-DA (Διάγραμμα 5A-H) αποδεικνύουν την εμφανή διάκριση μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων στους δύο εξεταζόμενους οικότυπους σταμναγκαθιού (ορεινός και παραθαλάσσιος) οι οποίοι αναπτύχθηκαν σε ανοιχτό υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας κάτω από δύο διαφορετικά επίπεδα αζώτου, ένα χαμηλό στα 4 mmol L⁻¹ και ένα υψηλότερο στα 16 mmol L⁻¹, συνδυαζόμενα με τρεις διαφορετικές αναλογίες NH₄/ολικό-N (0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 5A). Επιπλέον, η OPLS-DA ανά ζεύγη ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τη λήψη μιας πιο λεπτομερούς συλλογής πληροφοριών που αφορούν τη μεταβολική διαφοροποίηση των δυο οικότυπων σταμναγκαθιού που αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες ελλιπούς παροχής ολικού N (Διάγραμμα Β). Επίπρόσθετα, εξετάστηκαν μόνο για την περίπτωση του ορεινού οικότυπου η επίδραση είτε της χαμηλής είτε της υψηλής παροχής N, δηλαδή 4 ή 16 mmol L⁻¹, αναφερόμενη ως Low-N και High-N, αντίστοιχα (Διάγραμμα 5C και 5E). Τέλος, κάτω από συνθήκες φυσιολογικής παροχής N, πραγματοποιήθηκαν και συγκρίσεις μεταξύ των αναλογιών, 0,05 με 0,25 NH₄/ολικό-N, 0,05 με 0,50 NH₄/ολικό-N και 0,25 με 0,50 NH₄/ολικό-N (Διάγραμμα 5F-H), και πάλι μόνο για τον ορεινό οικότυπο. Τα αποτελέσματα από τα OPLS-DA score plots υποδεικνύουν έναν σαφή διαχωρισμό των επεμβάσεων μεταξύ των δύο οικότυπων, των δύο διαφορετικών επιπέδων N και των τριών διαφορετικών αναλογιών NH₄/ολικό-N (0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 5B-H). Τέλος, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 5B υπήρξε σαφής διάκριση μεταξύ των δύο εξεταζόμενων οικότυπων. Παρόλο αυτά, σε κάθε οικότυπο ξεχωριστά και ειδικότερα στην περίπτωση του παραθαλάσσιου παρατηρήθηκε διαχωρισμός μεταξύ του χαμηλού και υψηλού επιπέδου N, δείχνοντας έτσι την διαφορετική ανταπόκριση του παραθαλάσσιου κάτω από διαφορετικές συνθήκες παροχής N στο θρεπτικό διάλυμα συγκριτικά με αυτή που ακολούθησε ο ορεινός οικότυπος (Διάγραμμα 5C).



Διάγραμμα 5: OPLS-DA score plot (Orthogonal partial least squares-discriminant analysis) για τα καταγεγραμμένα από το GC/EI/MS μεταβολικά προφίλ του *Cichorium spinosum* (σταμναγκάθι) σε φύλλα a) για όλες τις εξεταζόμενες επεμβάσεις b) συγκρίσεις ανά ζεύγη μεταξύ του ορεινού (Montane ecotype) και παραθαλάσσιου (seaside ecotype) μεγαλωμένα σε συνθήκες χαμηλής παροχής N, c) φυτά σταμναγκαθίου από τον ορεινό οικότυπο τα οποία δέχθηκαν επεμβάσεις με είτε χαμηλό (Low-N) είτε υψηλό (High-N) ολικό N, 4 ή 16 mmol L⁻¹, αντίστοιχα, d) S vs M κάτω από χαμηλή παροχή ολικού N στη μεσαία αναλογία NH₄/ολικό-N (0,25), e) High-N vs Low-N στον ορεινό οικότυπο στη μεσαία αναλογία NH₄/ολικό-N (0,25), f) 0,05 vs 0,25 NH₄/ολικό-N αναλογία κάτω από υψηλή παροχή N για τον ορεινό οικότυπο, g) 0,05 vs 0,50 NH₄/ολικό-N αναλογία κάτω από υψηλή παροχή ολικού N στον ορεινό οικότυπο, και h) 0,25 vs 0,50 NH₄/ολικό-N αναλογία κάτω από υψηλή παροχή ολικού N στον ορεινό οικότυπο. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T² σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Στο σύνολο, δώδεκα βιολογικές επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν ανά επέμβαση, όπου κάθε τρεις ομογενοποιούνταν ώστε να προκύψει το τελικό δείγμα ανάλυσης. Τέσσερα συγκεντρωτικά δείγματα και ένα δείγμα μάρτυρας (quality control sample-QC) αναλύθηκαν ανά επέμβαση (PC; principal component).

Επιπρόσθετα, η επίδραση των πειραματικών επεμβάσεων σε σημαντικούς πρωτογενείς μεταβολίτες στα φύλλα αποτυπώνεται στο παρακάτω heat map (Διάγραμμα 6). Στο σύνολο, 53 μεταβολίτες (αμινοξέα, υδατάνθρακες, καρβοξυλικά οξέα και λιπαρά οξέα), οι οποίοι επηρεάστηκαν με διαφορετικό τρόπο από τις επεμβάσεις ολικού N και $\text{NH}_4\text{-N}$ /ολικό-N, συμπεριλαμβάνονται στο συγκεκριμένο heat map.

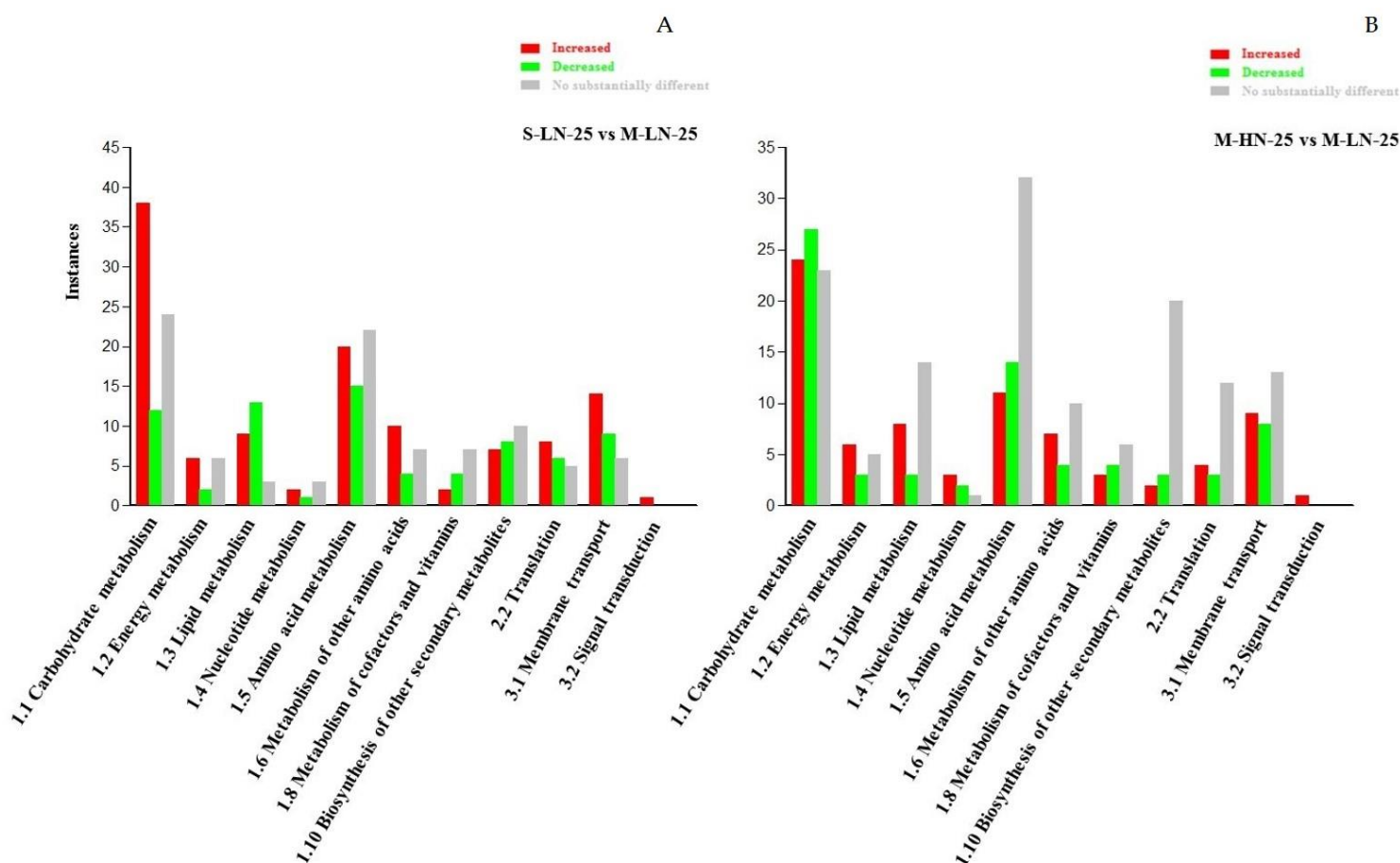


Διάγραμμα 6: Heat map για την επισκόπηση των διακυμάνσεων στους καταγεγραμμένους από την GC/EI/MS μεταβολική ανάλυση σε φυτά *Cichorium spinosum* L. Δώδεκα επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο και για τους δύο οικότυπους, με δύο διαφορετικά επίπεδα παροχής ολικού N στο θρεπτικό διάλυμα, ένα χαμηλό στα 4 mM και ένα υψηλό στα 16 mM, συνδυαζόμενα με τρεις διαφορετικές αναλογίες NH_4^+ /ολικό-N, 0,05, 0,25 και 0,50, αντίστοιχα. Τα κόκκινα τετράγωνα αντιστοιχούν στους μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα, ενώ τα μπλε τετράγωνα σε αυτούς που ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα από τις εξεταζόμενες επεμβάσεις. Το Heatmapper software (Babicki et al., 2016) χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του heat map. Κάθε τετράγωνο στο Heatmap αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο των 4 επαναλήψεων.

Στην περίπτωση της μορφής παροχής του N, είναι ενδεικτικό το στοιχείο ότι τα υψηλότερα ποσοστά NH_4^+ /ολικό-N (0,25 και 0,50, αντίστοιχα) παρουσίασαν μια ισχυρότερη διαφοροποίηση στους περισσότερους πρωτογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν συγκριτικά με το χαμηλότερο NH_4^+ /ολικό-N (0,05). Επιπλέον, όπως ήδη περιγράφεται παραπάνω, τα αποτελέσματα βασίζονται στις διακυμάνσεις που παρατηρούνται στους μεταβολίτες οι οποίοι συμμετέχουν σε σημαντικές μεταβολικές λειτουργίες (Aliferis et al., 2014; Kostopoulou et al., 2020) (Διάγραμμα 7 και 8). Επιπλέον, η όποια προσέγγιση έχει ως σκοπό να παρέχει μια υψίστης σημασίας βιολογική ερμηνεία των φυτών και της επικείμενης ανταπόκρισής τους στις διάφορες επεμβάσεις, καθώς επίσης να δώσει και μια πιο σφαιρική εικόνα του αντίκτυπου των επεμβάσεων στις διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού. Παρομοίως, η επίδραση των επεμβάσεων στον μεταβολισμό του σταμναγκαθίου βασίστηκε επίσης στις διακυμάνσεις που αφορούσαν τους πρωτογενείς μεταβολίτες οι οποίοι είχαν ομαδοποιηθεί ανά κατηγορία (chemical groups) (Διάγραμμα 9 και 10). Τα δεδομένα από τις αναλύσεις του σταμναγκαθίου “*Cichorium spinosum* L. (PMG-03-20)” παρατίθενται σε “*.cdf” μορφή, και η πρόσβασή είναι εφικτή από τα δεδομένα του εργαστήριου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (<https://www.aua.gr/pesticide-metabolomicsgroup/Resources/default.html>).

Τα αποτελέσματα του μεταβολισμού που πραγματοποιήθηκε σε φυτά σταμναγκαθίου αναπτυσσόμενα κάτω από διαφορετικές συνθήκες θρεπτικής ανάπτυξης, έδειξαν ότι αρκετοί πρωτογενείς μεταβολίτες που εμπλέκονται σε σημαντικές μεταβολικές διεργασίες εντός του φυτού ακολούθησαν και μια διαφορετική απόκριση. Αρχικά, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 7, στη σύγκριση μεταξύ των δύο διαφορετικών οικότυπων, αύξηση παρατηρήθηκε στις κατηγορίες του μεταβολισμού των υδατανθράκων, ενέργειας, αμινοξέων καθώς και στην κατηγορία των άλλων αμινοξέων. Επίπρόσθετα, μείωση ακολούθησε κυρίως η κατηγορία του μεταβολισμού των λιπιδίων καθώς επίσης η βιοσύνθεση άλλων δευτερογενών μεταβολιτών αλλά και ένας μεγάλος αριθμός από την κατηγορία του μεταβολισμού των αμινοξέων. Τέλος, σταθερός (ή αμετάβλητος) παρέμεινε ένας αρκετά μεγάλος αριθμός από τον μεταβολισμό των αμινοξέων, υδατανθράκων αλλά και της ενέργειας. Από την άλλη πλευρά, στη σύγκριση που πραγματοποιήθηκε μόνο για τον ορεινό οικότυπο μεταξύ της χαμηλής και υψηλής παροχής N (Διάγραμμα 7), οι περισσότερες κατηγορίες εμφάνισαν σταθερότητα των επιπέδων τους (μεταβολισμός υδατανθράκων, ενέργειας, λιπιδίων, αμινοξέων, μεταβολισμός άλλων αμινοξέων, βιοσύνθεση άλλων δευτερογενών μεταβολιτών κλπ). Όσον αφορά τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών αναλογιών NH_4^+ /ολικό-N, στη σύγκριση μεταξύ της μεσαίας και της χαμηλότερης αναλογίας, αύξηση παρατηρήθηκε σε έναν αριθμό μεταβολιτών από τις κατηγορίες του μεταβολισμού των υδατανθράκων, ενέργειας και των αμινοξέων (Διάγραμμα 8), μείωση ακολούθησαν οι περισσότεροι υδατάνθρακες, ο μεταβολισμός των λιπιδίων και σε μικρότερο βαθμό ο μεταβολισμός

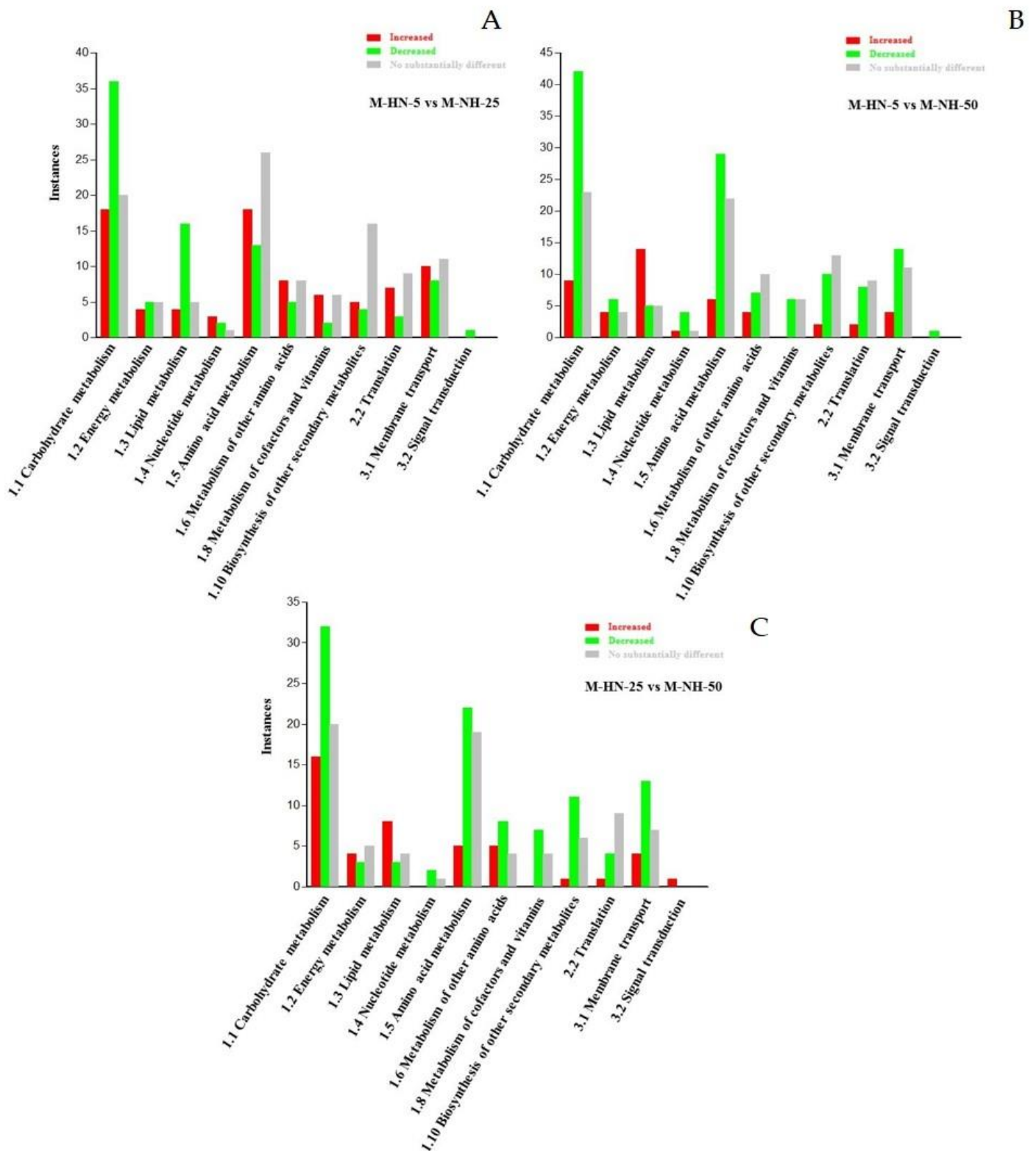
των αμινοξέων ο οποίος κατά κύριο λόγο παρέμεινε σταθερός. Τέλος, η υψηλότερη αναλογία ήταν αυτή που επηρέασε σε μεγαλύτερο βαθμό τους μεταβολίτες, καθώς οι περισσότερες κατηγορίες εμφάνισαν πτωτική τάση με μοναδική εξαίρεση τον μεταβολισμό των λιπιδίων, αλλά και τον μεταβολισμό των υδατανθράκων στη σύγκριση μεταξύ της υψηλότερης με τη μεσαία αναλογία NH_4^+ /ολικό-N, όπου αρκετοί από αυτούς παρουσίασαν αύξηση.



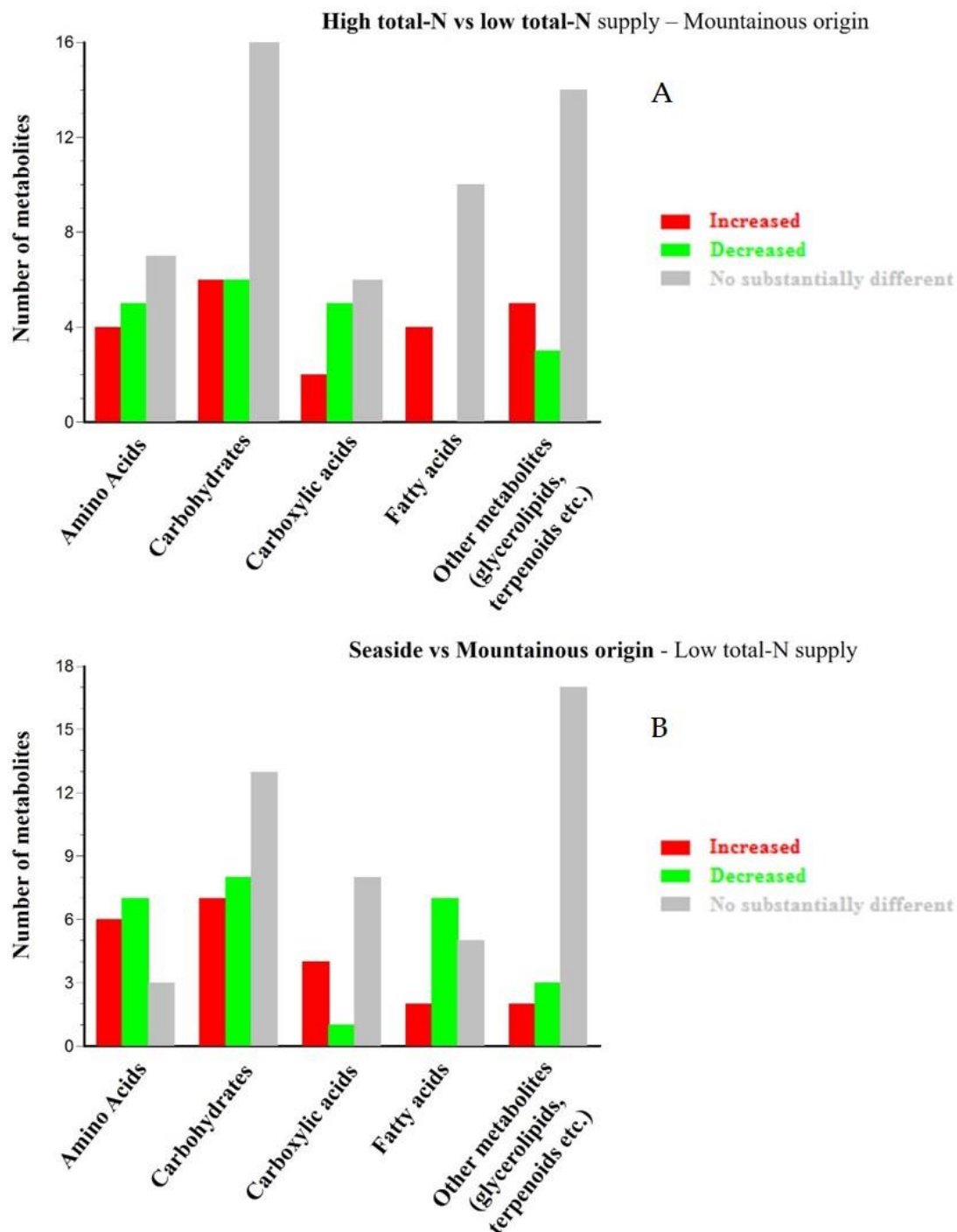
Διάγραμμα 7: Διακυμάνσεις των μεταβολικών λειτουργιών του σταμναγκαθίου ύστερα από επεμβάσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις ολικού N (4 ή 16 mmol L⁻¹), εκφρασμένα ως χαμηλό (Low-N) και υψηλό (High-N) N, αντίστοιχα) μεταξύ δύο διαφορετικών οικότυπων σταμναγκαθίου (Παραθαλάσσιος vs Ορεινός) οι οποίο αναπτύσσονταν κάτω από συνθήκες χαμηλού ολικού N στα 4 mmol L⁻¹ (A) και στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα στην περίπτωση του ορεινού οικότυπου σε φυτά μεγαλωμένα σε σάκους περλίτη (B). Ο άξονας του Y αντιστοιχεί στα instances, καθώς κάθε μεταβολίτης μπορεί να εμπλέκεται σε περισσότερα του ενός μεταβολικά μονοπάτια. Η πρώτη μπάρα (κόκκινο χρώμα) αντιστοιχεί στους μεταβολίτες στους οποίους οι συγκεντρώσεις αυξήθηκαν ανταποκρινόμενοι στις επεμβάσεις, η δεύτερη μπάρα (πράσινο χρώμα) σε αυτούς που σημείωσαν μείωση, και η τρίτη μπάρα (γκρι χρώμα) όσοι δεν ακολούθησαν κάποια αξιολογη μεταβολή. Ακολουθήθηκε το σύστημα κωδικοποίησης των κατηγοριών της KEGG.

Τα επίπεδα των περισσότερων μεταβολιτών που ανήκουν στην κατηγορία των λιπαρών οξέων ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στον ορεινό οικότυπο συγκριτικά με τα φυτά που προέρχονται από την παραθαλάσσια τοποθεσία (Διάγραμμα 9). Από την άλλη μεριά, το επίπεδο του παρεχόμενου N δεν επηρέασε σε ουσιαστικό βαθμό τη σύνθεση των υδατανθράκων, καρβοξυλικών οξέων και λιπαρών οξέων, καθώς οι υψηλής σημαντικότητας μεταβολίτες που ανήκουν σε αυτές τις κατηγορίες δεν επηρεάστηκαν (Διάγραμμα 9). Ένα ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι στον ορεινό οικότυπο κανένα από τα λιπαρά οξέα δεν μειώθηκε όταν τα φυτά δέχονταν την υψηλή παροχή N συγκριτικά με την χαμηλότερη στα 4 mM (Διάγραμμα 9). Επιπλέον, κατά τη σύγκριση των τριών αναλογιών NH_4^+ -N/ολικό-N, παρουσιάστηκαν σαφείς διαφορές στα επίπεδα τόσο των αμινοξέων και υδατανθράκων, όσο και των καρβοξυλικών και λιπαρών οξέων (Διάγραμμα 10).

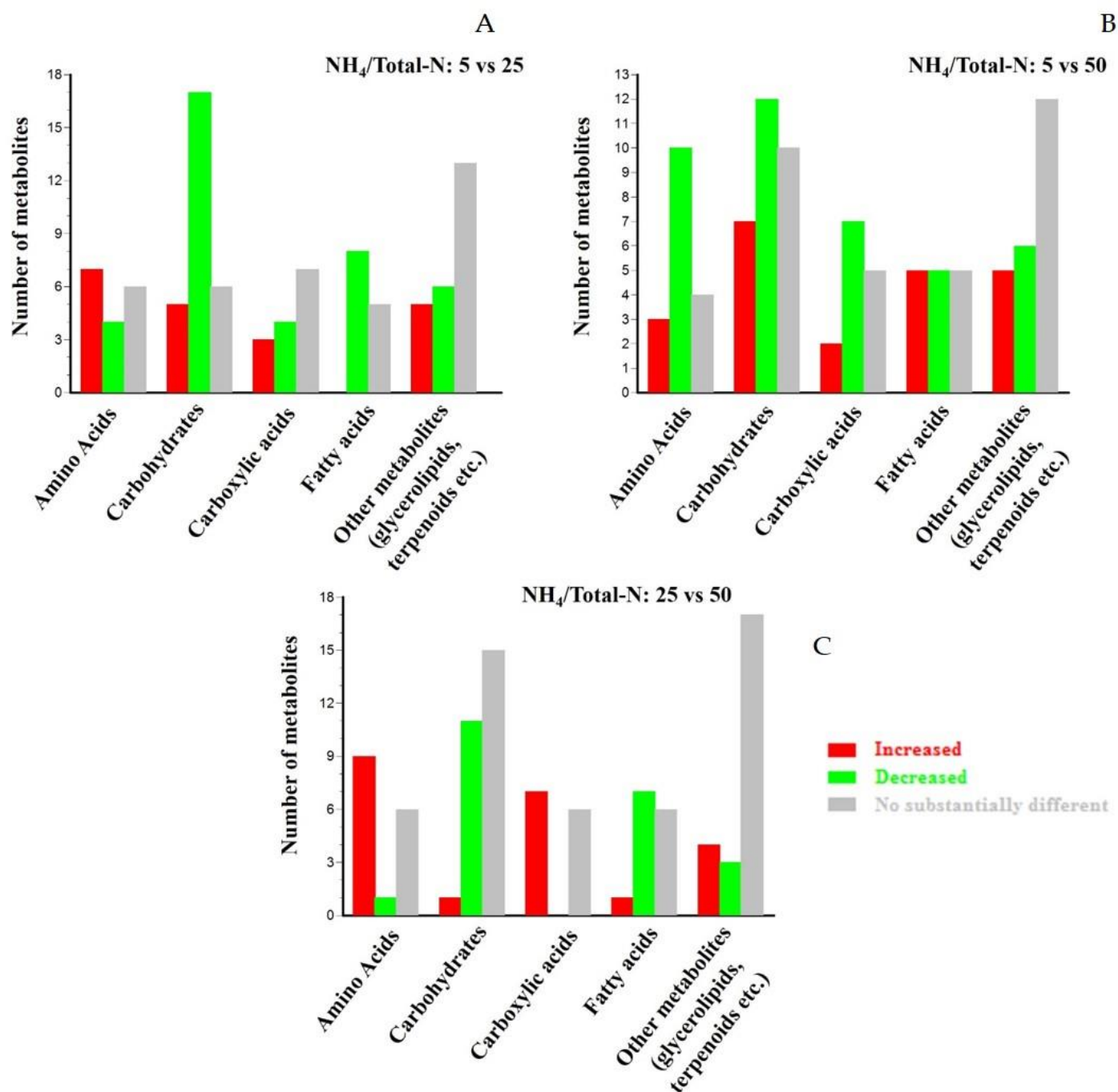
Ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών του εξεταζόμενου σταμναγκαθίου που ανιχνεύθηκαν από την ανάλυση με GC/EI/MS, συμμετέχουν σε περισσότερα του ενός μεταβολικά μονοπάτια. Η συντριπτική πλειοψηφία των μεταβολιτών αυτών ανήκει στην κατηγορία των αμινοξέων, υδατανθράκων, καρβοξυλικών οξέων και λιπαρών οξέων (Διάγραμμα 7-10). Για τη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων, και με απώτερο σκοπό να αποκτηθούν γνώσεις πάνω στη ρύθμιση του μεταβολισμού των φυτών όταν αυτά δέχονται μια πληθώρα από πειραματικές επεμβάσεις, *de novo* μεταβολικά δίκτυα δημιουργήθηκαν για τους επιλεγμένους μεταβολίτες αποκτώντας (ή αντλώντας) πληροφορίες από βάσεις δεδομένων όπως αυτή της KEGG (<https://www.kegg.jp/>). Οι διαφορετικές επεμβάσεις στα φυτά σταμναγκαθίου έδωσαν μια διαφορετική απόκριση όσον αφορά τον μεταβολισμό τους, έτσι αρκετοί μεταβολίτες που ανήκουν στις κατηγορίες των αμινοξέων και υδατανθράκων ανιχνεύθηκαν είτε σε υψηλότερα είτε σε χαμηλότερα επίπεδα στα φυτά σταμναγκαθίου που προέρχονται από την παραθαλάσσια περιοχή της Κρήτης συγκριτικά με αυτά από τον ορεινό οικότυπο.



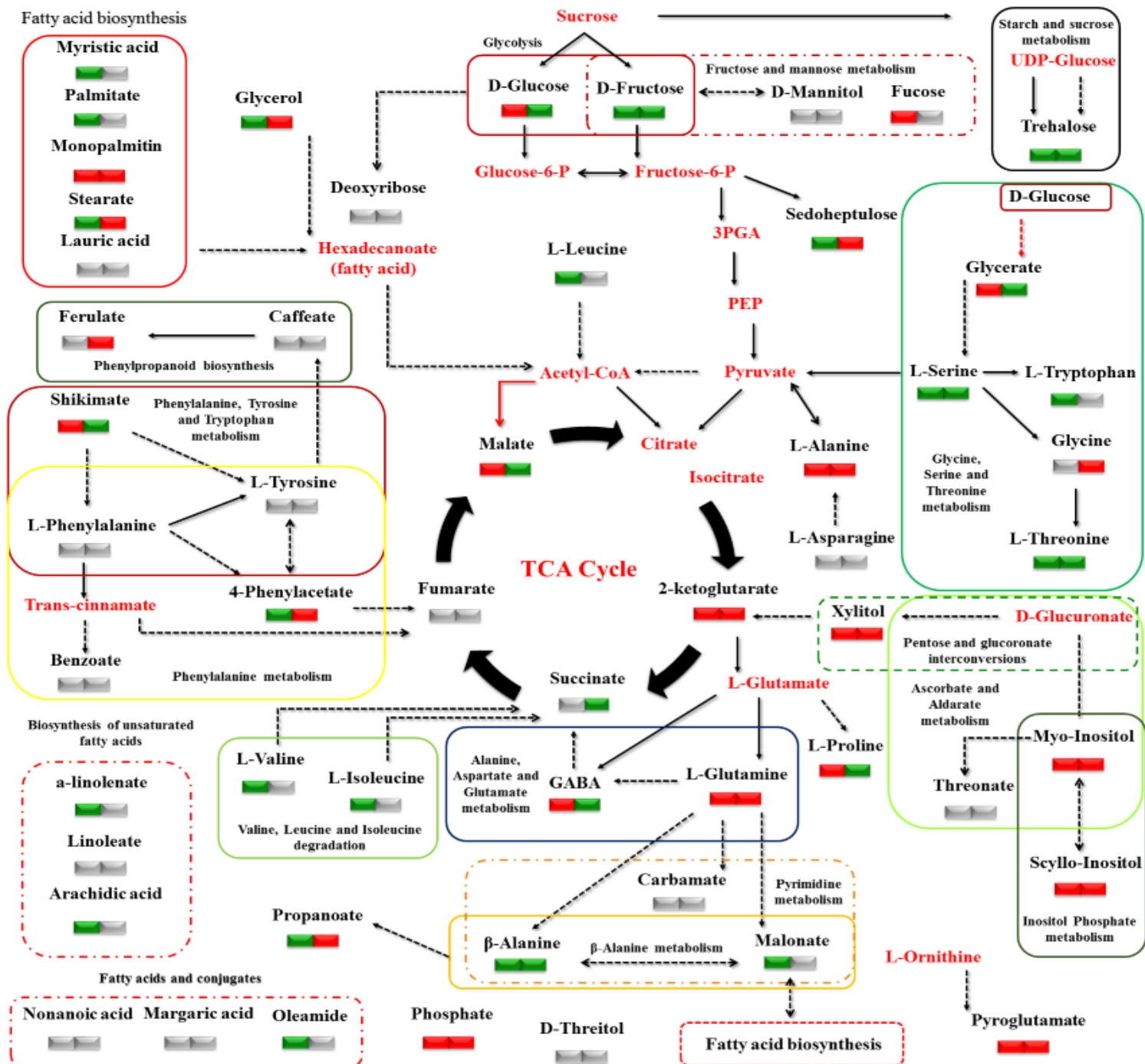
Διάγραμμα 8: Διακυμάνσεις των μεταβολικών λειτουργιών του σταμναγκαθίου ύστερα από επεμβάσεις με διαφορετικές αναλογίες $\text{NH}_4/\text{ολικό-N}$ (0,05 vs 0,25 (A), 0,05 vs 0,50 (B) και 0,25 vs 0,50 (C)) στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα σε φυτά σταμναγκαθίου του ορεινού οικότυπου μεγαλωμένα σε σάκους περλίτη κάτω από συνθήκες υψηλής παροχής ολικού N. Ο άξονας του Y αντιστοιχεί στα instances, καθώς κάθε μεταβολίτης μπορεί να εμπλέκεται σε περισσότερα του ενός μεταβολικά μονοπάτια. Η πρώτη στήλη (κόκκινο χρώμα) αντιστοιχεί στους μεταβολίτες στους οποίους οι συγκεντρώσεις αυξήθηκαν ανταποκρινόμενοι στις επεμβάσεις, η δεύτερη στήλη (πράσινο χρώμα) σε αυτούς που σημείωσαν μείωση, και η τρίτη στήλη (γκρι χρώμα) σε αυτούς που δεν παρουσίασαν κάποια αξιολογή μεταβολή. Ακολουθήθηκε το σύστημα κωδικοποίησης των κατηγοριών της KEGG.



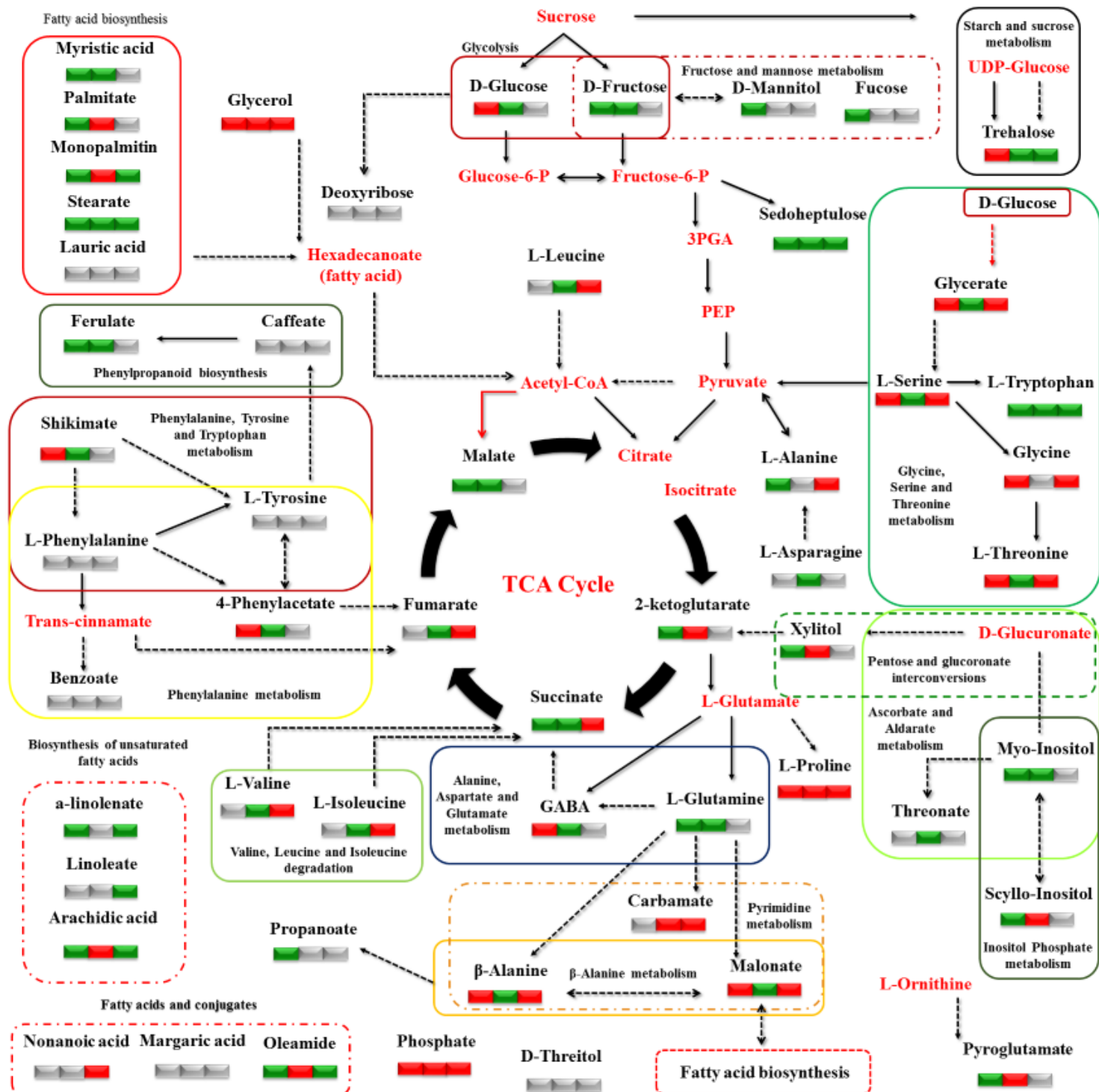
Διάγραμμα 9: Διακυμάνσεις στη μεταβολική σύνθεση φυτών σταμναγκαθίου (chemical groups) ύστερα από επεμβάσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις ολικού N (4 ή 16 mmol L⁻¹, εκφρασμένα ως χαμηλό (Low-N) και υψηλό (High-N) N, αντίστοιχα) στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα στον ορεινό οικότυπο φυτών σταμναγκαθίου μεγαλωμένα σε σάκους περλίτη (A) και σε φυτά προερχόμενα από διαφορετικό σπόρο προέλευσης (Παραθαλάσσιος vs Ορεινός) σταμναγκαθίου μεγαλωμένου κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ολικού N στα 4 mmol L⁻¹. Ο άξονας του Y αντιστοιχεί στον συνολικό αριθμό των μεταβολιτών. Η πρώτη μπάρα (κόκκινο χρώμα) αντιστοιχεί στους μεταβολίτες στους οποίους οι συγκεντρώσεις αυξήθηκαν ανταποκρινόμενοι στις επεμβάσεις, η δεύτερη μπάρα (πράσινο χρώμα) σε αυτούς που σημείωσαν μείωση, και η τρίτη μπάρα (γκρι χρώμα) όσοι δεν ακολούθησαν κάποια αξιολογή μεταβολή. Ακολουθήθηκε το σύστημα κωδικοποίησης των κατηγοριών της KEGG.



Διάγραμμα 10: Διακυμάνσεις στη μεταβολική σύνθεση φυτών σταμναγκαθίου (chemical groups) ύστερα από επεμβάσεις με διαφορετικές αναλογίες $\text{NH}_4/\text{ολικό-N}$ (0,05 vs 0,25 (A), 0,05 vs 0,50 (B) και 0,25 vs 0,50) στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα στον ορεινό οικότυπο φυτών σταμναγκαθίου μεγαλωμένα σε σάκους περλίτη κάτω από κανονικές συνθήκες παροχής ολικού N στα 16 mmol L^{-1} . Ο άξονας του Y αντιστοιχεί στον συνολικό αριθμό των μεταβολιτών. Η πρώτη μπάρα (κόκκινο χρώμα) αντιστοιχεί στους μεταβολίτες στους οποίους οι συγκεντρώσεις αυξήθηκαν ανταποκρινόμενοι στις επεμβάσεις, η δεύτερη μπάρα (πράσινο χρώμα) σε αυτούς που σημείωσαν μείωση, και η τρίτη μπάρα (γκρι χρώμα) όσοι δεν ακολούθησαν κάποια αξιόλογη μεταβολή. Ακολούθησε το σύστημα κωδικοποίησης των κατηγοριών της KEGG.



Διάγραμμα 11: Διακύμανση των επιπέδων των μεταβολιτών του *Cichorium spinosum* μεταξύ του παραθαλάσσιου και ορεινού οικότυπου (, seaside (S) και montane (, (M) (πρώτο κουτί κάτω από το όνομα του μεταβολίτη)) οι οποίοι αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες χαμηλής παροχής N και στη μεσαία αναλογία NH_4^+ /ολικό-N (0.25) καλλιεργούμενα σε σάκους περλίτη. Επίσης, εξετάστηκε ο αντίκτυπος των δύο διαφορετικών επιπέδων παροχής N στον ορεινό οικότυπο στη μεσαία αναλογία NH_4^+ /ολικό-N ως προς τη μεταβολική του ανταπόκριση (δεξί κουτάκι κάτω από τους μεταβολίτες). Οι μεταβολίτες με τα έντονα κόκκινα γράμματα δεν ανιχνεύθηκαν στα φυτά σταμναγκαθίου. Τα κουτάκια κόκκινου χρώματος αναφέρονται στους μεταβολίτες οι οποίοι παρουσίασαν αύξηση της σύνθεσής τους στον είτε ορεινό οικότυπο (S vs M) είτε στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ελλειπούς παροχής N (HN vs LN), ενώ με πράσινο χρώμα είναι όσοι παρουσίασαν μείωση. Με γκρι χρώμα αντιστοιχούν όσοι μεταβολίτες δεν παρουσίασαν κάποια αξιολογή μεταβολή. Η ανάλυση των δεδομένων βασίστηκε από τη βάση δεδομένων της KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg>). Τα σταθερά βέλη αναφέρονται στην απευθείας σύνδεση των μεταβολιτών στα βιοσυνθετικά μονοπάτια, ενώ τα διακοπτόμενα βέλη τη μεσολάβηση περισσότερων του ενός μεταβολιτών.



Διάγραμμα 12: Διακύμανση των επιπέδων των μεταβολιτών του *Cichorium spinosum* στον ορεινό οικότυπο ο οποίος δέχθηκε επεμβάσεις με τρεις διαφορετικές αναλογίες NH_4^+ /ολικό-N. Το πρώτο κουτάκι (από αριστερά προς τα δεξιά) κάτω από το όνομα των μεταβολιτών αντιστοιχεί στη σύγκριση που πραγματοποιήθηκε μεταξύ της χαμηλότερης και της μεσαίας αναλογίας NH_4^+ /ολικό-N (0,05 vs 0,25), το μεσαίο κουτάκι στη σύγκριση μεταξύ της χαμηλότερης και υψηλότερης αναλογίας NH_4^+ /ολικό-N (0,05 vs 0,50), ενώ το τρίτο κουτάκι στη σύγκριση μεταξύ της μεσαίας και υψηλής αναλογίας NH_4^+ /ολικό-N (0,25 vs 0,50). Τα κουτάκια κόκκινου χρώματος αναφέρονται στους μεταβολίτες οι οποίοι παρουσίασαν αύξηση της σύνθεσής τους στον ορεινό οικότυπο στις εξεταζόμενες αναλογίες NH_4^+ /ολικό-N (0,05, 0,25 και 0,50, αντιστοίχα) σε φυσιολογική παροχή ολικού N, ενώ με πράσινο χρώμα είναι όσοι παρουσίασαν μείωση. Με γκρι χρώμα αντιστοιχούν όσοι μεταβολίτες δεν παρουσίασαν κάποια αξιόλογη μεταβολή. Η ανάλυση των δεδομένων βασίστηκε από τη βάση δεδομένων της KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg>). Τα σταθερά βέλη αναφέρονται στην απευθείας σύνδεση των μεταβολιτών στα βιοσυνθετικά μονοπάτια, ενώ τα διακοπτόμενα βέλη τη μεσολάβηση περισσότερων του ενός μεταβολιτών.

4.2. Επίδραση του επιπέδου παροχής και της πηγής προέλευσης του N στον μεταβολισμό των αμινοξέων σε φυτά σταμναγκαθιού

Τόσο το επίπεδο του N όσο και η διαφορετική πηγή παροχής του (NH_4^+ /ολικό-N) που εξετάστηκαν είχαν μια σαφή επίδραση στη βιοσύνθεση των αμινοξέων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η L-proline (Pro) που παρατηρήθηκε σε υψηλότερα επίπεδα στον ορεινό οικότυπο συγκριτικά με αυτά του παραθαλάσσιου (Διάγραμμα 11) καθώς επίσης και στις δύο υψηλότερες παροχές NH_4^+ /ολικό-N (0,25 και 0,50, αντίστοιχα) συγκριτικά με τη χαμηλότερη αναλογία (0,05) (Διάγραμμα 12). Από την άλλη πλευρά, μια αύξηση στην παροχή του ολικού N έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της Pro (Διάγραμμα 11). Σε αντίθεση με την Pro, τα επίπεδα της φαινυλαλανίνης (Phe) και τυροσίνης (Tyr) παρουσίασαν μια απόκριση η οποία διέφερε ανάλογα με τις επεμβάσεις που δέχτηκαν ως προς την παροχή και την πηγή του N. Επιπλέον, τα αμινοξέα ασπαραγίνη (Asn), λευκίνη (Leu), τρυπτοφάνη (Trp), βαλίνη (Val) και ισολευκίνη (Ile) δεν επηρεάστηκαν σε κάποιο ουσιαστικό βαθμό από τα εξεταζόμενα επίπεδα N (Διάγραμμα 11). Επιπρόσθετα, η αλανίνη (Ala), η Asn, και γλουταμίνη (Gln) ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στον ορεινό οικότυπο σε σχέση με αυτά του παραθαλάσσιου. Οι διαφορετικές αναλογίες NH_4^+ /ολικό-N στο θρεπτικό διάλυμα είχαν ως αποτέλεσμα να αυξήσουν τα αμινοξέα από την οικογένεια του πυροσταφυλικού (pyruvate family) στη σύγκριση μεταξύ της υψηλότερης αναλογίας (0,50) με τη μεσαία (0,25), ενώ το αντίθετο παρουσιάστηκε όταν αυτή συγκρίνονταν με τη χαμηλότερη (0,05). Παρόλο αυτά, η πηγή προέλευσης του N δεν φάνηκε να έχει κάποιον σημαντικό αντίκτυπο στα επίπεδα των μεταβολιτών που ανήκουν στην κατηγορία των αρωματικών αμινοξέων (φαινυλαλανίνη και τυροσίνη). Το μη-πρωτεϊνικό αμινοξύ, γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) αυξήθηκε στα φυτά που προέρχονται από την ορεινή τοποθεσία όταν το επίπεδο παροχής του N ήταν χαμηλό συγκριτικά με αυτά της παραθαλάσσιας προέλευσης. Παρόλο αυτά, στο χαμηλό επίπεδο N, τα επίπεδα του GABA μειώθηκαν συγκριτικά με αυτά της υψηλής παροχής N (Διάγραμμα 11). Τέλος, η αύξηση των αναλογιών NH_4^+ /ολικό-N στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα από 0,05 σε 0,25 ενίσχυσε τη βιοσύνθεση του GABA, ενώ μια περαιτέρω αύξηση στα 0,50 δεν επέφερε κάποια παραπάνω επίδραση στα επίπεδα του GABA (Διάγραμμα 12).

4.3. Επίδραση του επιπέδου παροχής και της πηγής προέλευσης του N στον μεταβολισμό των υδατανθράκων σε φυτά σταμναγκαθιού

Τα επίπεδα των υδατανθράκων όπως αυτά της γλυκόζης (Glu) και της φρουκτόζης (Fru), τα οποία έχουν έναν ρόλο-κλειδί στην παροχή ενέργειας στους φυτικούς οργανισμούς, καταγράφηκαν σε χαμηλά επίπεδα όταν η παροχή του N στο θρεπτικό διάλυμα έπεφτε από τα 16 mM στα 4 mM (Διάγραμμα 11). Η Fru στα φύλλα του σταμναγκαθιού ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα στον ορεινό

οικότυπο συγκριτικά με αυτά του παραθαλάσσιου, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε στην περίπτωση της Glu. Η μείωση της αναλογίας των NH_4^+ /ολικό-N από 0,50 στο 0,05 είχε ως αποτέλεσμα να μειωθούν τα επίπεδα τόσο της Fru όσο και της Glu (Διάγραμμα 12). Τα επίπεδα των σακχαροαλκοολών θρεϊτόλη (D-threitol) και μαννιτόλη (D-mannitol) δεν παρουσίασαν κάποια αξιολογή μεταβολή από τις διάφορες εξεταζόμενες επεμβάσεις με N, ενώ η σεδοεπτουλόζη (sedoheptulose) αυξήθηκε στο χαμηλό επίπεδο N, ενώ αυτά της γλυκερόλης (glycerol) μειώθηκαν. Επίπρόσθετα, η τρεχαλόζη (α - α -trehalose), ένας από τους πιο σημαντικούς δισακχαρίτες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και βοηθούν στην ανταπόκριση των φυτών όταν αυτά εκτίθενται σε συνθήκες καταπόνησης, ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα φυτά που έλαβαν χαμηλή παροχή N σχετικά με αυτά που δέχθηκαν υψηλή παροχή σε N. Παρόμοια τάση έδειξε η σύγκριση μεταξύ του ορεινού οικότυπου και του οικότυπου που προέρχεται από την παραθαλάσσια ζώνη της Κρήτης (Διάγραμμα 11). Όσον αφορά τις εξεταζόμενες αναλογίες NH_4^+ /ολικό-N στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα, μια αύξηση τους από 0,05 σε 0,25 επίσης αύξησε τα επίπεδα της τρεχαλόζης. Από την άλλη πλευρά, μια αύξηση από 0,05 ή 0,25 σε 0,50 είχε ως αποτέλεσμα να μειωθούν σημαντικά τα επίπεδα του συγκεκριμένου δισακχαρίτη (Διάγραμμα 12).

4.4. Επίδραση του επιπέδου παροχής και της πηγής προέλευσης του N στον μεταβολισμό των καρβοξυλικών οξέων, λιπαρών οξέων και επιλεγμένων μεταβολιτών σε φυτά σταμναγκαθιού

Τα καρβοξυλικά οξέα, κάποια από τα οποία αποτελούν ενδιάμεσους μεταβολίτες στον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA cycle), παρουσίασαν μια αρκετά σημαντική επίδραση στα επίπεδα τους τόσο από την παροχή του N όσο και από τη μορφή παροχής του. Η μεγαλύτερη επίδραση από τα διαφορετικά επίπεδα παροχής N παρατηρήθηκε στην περίπτωση του γλυκερικού (glycerate) και του μηλικού οξέος (malate). Επιπλέον, η αύξηση της αναλογίας NH_4^+ /ολικό-N από 0,05 σε 0,50 μείωσε τα επίπεδα και των δύο προαναφερθέντων μεταβολιτών. Επίπρόσθετα, τα επίπεδα του μηλικού, του σιμικικού και του ηλεκτρικού οξέος μειώθηκαν στον ορεινό οικότυπο όταν το επίπεδο N στο διάλυμα παροχής ήταν χαμηλό σε σύγκριση με το υψηλό (Διάγραμμα 11). Σε αντίθεση με το μηλικό και το ηλεκτρικό οξύ, το 2-κετογλουταρικό οξύ (2-ketoglutarate) αυξήθηκε όταν τα φυτά αναπτύσσονταν σε θρεπτικό διάλυμα με συγκέντρωση 4 mM εν συγκρίσει με τα 16 mM. Άλλα καρβοξυλικά οξέα όπως το φουμαρικό οξύ (fumarate), θρεονικό οξύ (threonate), καρβαμικό οξύ (carbamate) δεν επηρεάστηκαν από τα εξεταζόμενα επίπεδα N ούτε από τον οικότυπο (Διάγραμμα 11). Τα λιπαρά οξέα όπως για παράδειγμα το λινολεϊκό οξύ (LA), που είναι γνωστά για τα οφέλη που προσφέρουν στον ανθρώπινη υγεία, δεν επηρεάστηκαν σε σημαντικό βαθμό ούτε από τον οικότυπο ούτε από τα επίπεδα του N (Διάγραμμα 11). Από την άλλη πλευρά, η βιοσύνθεση του στεατικού οξέος εμφάνισε μείωση στον ορεινό οικότυπο συγκριτικά με τον παραθαλάσσιο, ενώ αυξήθηκε όταν η παροχή N στο θρεπτικό

διάλυμα μειώθηκε από τα 16 mM στα 4 mM. Επιπρόσθετα, σε όλες τις συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των αναλογιών NH_4^+ /ολικό-N υποδεικνύουν ότι η αύξηση των NH_4^+ στο διάλυμα μείωσε τις συγκεντρώσεις του λιπαρού αυτού οξέος (Διάγραμμα 12). Το καφεϊκό οξύ (caffeate) από την κατηγορία των phenylpropanoids δεν επηρεάστηκε ούτε από τον οικότυπο αλλά ούτε από την παροχή N ή τις εξεταζόμενες αναλογίες NH_4^+ /ολικό-N. Τέλος, το φωσφορικό οξύ (phosphate) από την κατηγορία των phosphoric acid derivatives ήταν σημαντικά υψηλότερο στον ορεινό οικότυπο σε σχέση με τον παραθαλάσσιο, στη χαμηλή παροχή N συγκριτικά με την υψηλότερη (High-N vs Low-N) αλλά και καθώς αυξανόταν η αναλογία NH_4^+ /ολικό-N στο θρεπτικό διάλυμα.

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη, η μεταβολομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με GC/EI/MS είχε σαν στόχο την ανάδειξη των επιδράσεων της θρέψης του N (επίπεδο και μορφή παροχής) στον πρωτογενή μεταβολισμό του υδροπονικά καλλιεργούμενου σταμναγκαθιού. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση στο προφίλ των καταγεγραμμένων μεταβολιτών σύμφωνα με τα OPLS-DA score plots αποδεικνύουν μια σαφή επίδραση της γονοτυπικής προέλευσης αλλά και των επεμβάσεων N πάνω στο μεταβολισμό των φυτών.

Το άζωτο (N) αποτελεί ένα ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των φυτών στοιχείο, καθώς συμμετέχει σε μια πληθώρα από φυσιολογικές διεργασίες των φυτών, μεταξύ άλλων στη σύνθεση της χλωροφύλλης, των νουκλεϊκών οξέων και αμινοξέων, στους δευτερογενείς μεταβολίτες, στις πρωτεΐνες, και στα φωσφολιπίδια. Τα αμινοξέα, πέρα από τον ρόλο τους ως δομικοί λίθοι στη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών και άλλων μεταβολιτών, εμπλέκονται και σε αρκετές άλλες διεργασίες εντός του φυτού που συσχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξή τους αλλά και με μια πληθώρα από ενδοκυτταρικές λειτουργίες (Hildebrandt et al., 2015). Επιπρόσθετως, έχουν συμμετοχή στην ενδοκυτταρική ρύθμιση του pH, στη δημιουργία μεταβολικής ενέργειας ή οξειδωαναγωγικής ισχύος, ενώ μερικά από τα αμινοξέα έχουν έναν κρίσιμο ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, στη μετάδοση σήματος και τους μηχανισμούς άμυνας, με σκοπό την καλύτερη ανταπόκριση σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (Hildebrandt et al., 2015). Κατά συνέπεια, έλλειψη N έχει καθοριστική επίδραση στον μεταβολισμό των φυτών. Σε φυτά τομάτας και λάχανου, μη επαρκής παροχή N μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων των αμινοξέων αλλά και στην υπό-έκφραση αρκετών συσχετιζόμενων γονιδίων (Sung et al., 2015; 2018), ενώ μια ανατροφοδότηση με N, σε φυτά κριθαριού, επάγουν την επανενεργοποίηση αυτών των γονιδίων (Fataftah et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη, μερικά από τα αμινοξέα αυτά βρέθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε μειωμένη παροχή N (4 mM) συγκριτικά με αυτά σε φυσιολογικές συνθήκες (control-16 mM). Το GABA και η σερίνη (L-serine) παρουσίασαν μια μείωση, η οποία έρχεται σε συμφωνία με

προηγούμενη μελέτη σχετικά με την επίδραση της μη επαρκούς παροχής N σε φυτά λάχανου (Sung et al., 2018). Από την άλλη πλευρά όμως, τα επίπεδα ορισμένων αμινοξέων και ειδικότερα των Asn, Val, Ile, και Leu δεν παρουσίασαν κάποια αξιολογή μεταβολή κάτω από συνθήκες διαφορετικών επιπέδων ολικού N και $\text{NH}_4\text{-N}$ /ολικό N, σε αντίθεση με αυτά της Gln και Ala.

Τα NO_3^- μετατρέπονται σε νιτρώδη μέσα στο κυτοδιάλυμα με τη βοήθεια της νιτρικής ρεδουκτάσης. Τα νιτρώδη λόγω του ότι είναι αρκετά τοξικά για το φυτό μετατρέπονται αμέσως σε NH_4^+ στα πλαστίδια μέσω της δράσης της ρεδουκτάσης των νιτρώδων. Μετέπειτα, η μετατροπή των NH_4^+ σε Gln γίνεται μέσω της συνθάσης της γλουταμίνης (glutamine synthase-GS) και της GOGAT (glutamine:oxoglutarate aminotransferase). Χαμηλή παροχή ανόργανου N τυπικά οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα της Gln, καθώς εμποδίζει τη διαθεσιμότητα σε NH_4^+ και κατ'επέκταση της αναλογίας Gln/Glu (Stitt and Krapp, 1999; Urbanczyk-Wochniak and Fernie, 2005). Η παρατηρούμενη μείωση της Gln κάτω από συνθήκες ελλιπούς παροχής N στην παρούσα μελέτη, έρχονται σε συμφωνία με τις ήδη υπάρχουσες μελέτες προηγούμενων ετών (Tschoep et al., 2009; Amtmann, and Armengaud, 2009). Επιπλέον, ανεπαρκές N έχει ήδη αναφερθεί ότι προωθεί τη συσσώρευση αμύλου και μειώνει τις συγκεντρώσεις σε αμινοξέα, πρωτεΐνες, ενώσεις που περιέχουν N στη δομή τους, καθώς επίσης και τη βιομάζα τους (Scheible et al., 1997a; 1997b; 2004; Wang et al., 2003).

Παρόλο αυτά, προηγούμενη μελέτη πάνω στο σταμναγκάθι δείχνει ότι το φυτό αυτό έχει υψηλή ανθεκτικότητα σε χαμηλά επίπεδα N, καθώς μια συγκέντρωση στα 4 mM στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα δεν φάνηκε να επηρεάζει τη βιομάζα του συγκριτικά με την υψηλότερη παροχή στα 16 mM (Chatzigianni et al., 2018). Αυτοί οι δύο εντελώς διαφορετικοί οικότυποι σταμναγκαθιού, προερχόμενοι είτε από τα την ορεινή είτε από την παραθαλάσσια ζώνη της Κρήτης χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματικό σχεδιασμό με σκοπό να μελετηθούν τυχόν διαφορές τους στον πρωτογενή μεταβολισμό σε συνθήκες μη επαρκούς τροφοδοσίας με N, δεδομένου ότι αναπτύσσονται σε τελείως διαφορετικά περιβάλλοντα. Γενικότερα, σύμφωνα και με την προηγούμενη σχετική μελέτη στα συγκεκριμένα φυτά (Chatzigianni et al., 2018), ο ορεινός οικότυπος φάνηκε να υπερέχει ως προς την ανάπτυξη, τη συγκέντρωση νιτρικών στα φύλλα (χαμηλότερες συγκριτικά με αυτές του παραθαλάσσιου οικότυπου), και στη αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα, ενώ ο παραθαλάσσιος συσσωρεύσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε θρεπτικά στοιχεία. Έτσι, ο ορεινός οικότυπος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια πιο καλή και αξιοποιήσιμη γενετική πηγή σε προγράμματα πολλαπλασιασμού για τις ποικιλίες του *C. spinosum* λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικά δεδομένης της μεγαλύτερης θρεπτικής του αξίας. Παρόλο αυτά, μια επικείμενη μείωση στα επίπεδα της Gln λόγω του περιορισμένου N δεν φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή βιομάζας. Όλες αυτές η μικρής σημασίας επιδράσεις που προκλήθηκαν από τις διαφορετικές επεμβάσεις με N είναι σε συμφωνία με την παρατήρηση αυτή. Το γλουταμικό και το

ασπαρτικό οξύ, και σε μερικές περιπτώσεις, η Gln δρουν και ως δωρητές αμινοξέων για τη βιοσύνθεση άλλων εξίσου σημαντικών αμινοξέων. Υπάρχουν αποδείξεις ότι τα NO_3^- -N ενισχύουν την έκφραση του *Gln 1*, το οποίο κωδικοποιεί τη δραστηριότητα της GS στο κυτοδιάλυμα (GS1), *Gln 2* (γονίδιο που κωδικοποιεί τη δραστηριότητα της GS στα πλαστίδια-GS2) και τη Gln σε ρίζες καλαμποκιού και καπνού καθώς επίσης και στα φύλλα καπνού (Stitt and Krapp, 1999). Στο σταμναγκάθι, τα επίπεδα της Gln φάνηκε να επηρεάζονται αρνητικά από την παρουσία NH_4^+ . Είναι αρκετά σαφές το γεγονός ότι τα υψηλά επίπεδα N σε φυτά σπανακιού είχαν σαν αποτέλεσμα τα υψηλότερα επίπεδα αμινοξέων (Okazaki et al., 2008), ενώ μια ανεπάρκεια στην παροχή του N οδηγεί σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις αμινοξέων (Fataftah et al., 2018). Παρόλο αυτά, μια ανατροφοδοσία με άζωτο σε ήδη N-καταπονημένα από έλλειψη αζώτου φυτά συνέβαλε στην ανάκαμψη του επιπέδου των αμινοξέων.

Η τοξικότητα από τα NH_4^+ προκαλεί μια σειρά από σοβαρά συμπτώματα ειδικά όταν τα φυτά εκτίθενται σε περίσσειες (ή υπερβολικά υψηλές) συγκεντρώσεις NH_4^+ στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα. Μεταξύ άλλων, προκαλεί χλωρώσεις στα φύλλα, ιοντική ανισορροπία, ορμονική απορρύθμιση, προβλήματα στη ρύθμιση του pH, δυσλειτουργία της καθαρής φωτοσύνθεσης αλλά κυρίως ουσιώδεις διακυμάνσεις στα επίπεδα των πρωτογενών μεταβολιτών (π.χ. αμινοξέα, οργανικά οξέα και υδατάνθρακες). Ως εκ τούτου, η μορφή παροχής του N (NH_4 -N/ολικό-N) στα φυτά σταμναγκαθιού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 0,25, καθώς υψηλότερη αναλογία είναι ικανή να μειώσει το pH στη περιοχή του ριζικού συστήματος σε τιμές χαμηλότερες του 5. Αρκετές μελέτες στο παρελθόν έχουν ήδη αποδείξει τις επιπτώσεις (ή δυσμενείς επιδράσεις) της παροχής υψηλών αναλογιών NH_4 -N/ολικό-N στον μεταβολισμό των φυτών. Στις υψηλότερες αναλογίες NH_4 -N/ολικό-N, το pH παρουσίασε μια αξιοσημείωτη πτώση στο ριζικό σύστημα όπως αναμενόταν από τη μέτρηση στο διάλυμα απορροής, κάτι που παρατηρήθηκε ειδικότερα στην υψηλότερη αναλογία (0,50). Η μείωση αυτή ήταν περισσότερο έντονη όταν η αναλογία των 0,50 συνδυάζονταν με την υψηλή παροχή ολικού N στο θρεπτικό διάλυμα (16 mM), καθώς ο συνδυασμός αυτός συνεπάγεται και μεγαλύτερη (ή υψηλότερη) παροχή NH_4^+ στα φυτά. Η NH_4^+ -σχετιζόμενη μείωση του pH στο ριζικό σύστημα των φυτών μπορεί να είναι αποτέλεσμα τόσο της κατά προτίμηση πρόσληψης NH_4^+ από τις ρίζες των φυτών όσο και λόγω της νιτροποίησης (Chatzigianni et al., 2018). Επιπρόσθετα, τα φυτά που τροφοδοτούνται με υψηλές συγκεντρώσεις N παρουσιάζουν μια αύξηση στην περιεκτικότητα των αμινοξέων τους, με εκείνα που τροφοδοτήθηκαν με περισσότερο NH_4^+ (NH_4 -supplied) να έχουν και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις αμινοξέων συγκριτικά με τα φυτά που τροφοδοτήθηκαν κυρίως με την NO_3^- μορφή αζώτου (Neuberg et al., 2010). Επιπλέον, τα επίπεδα της σερίνης, Gln και Asn ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε φυτά σόγιας όπου αναπτύσσονταν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις NO_3^- , σε σχέση με εκείνα που δέχονταν περισσότερα NH_4^+ , ενώ το γλουταμικό οξύ δεν φάνηκε να επηρεάζεται (Barneix and Causin, 1996).

Τα διαφορά φυτικά είδη έχουν αναπτύξει διαφορετική προτίμηση ως προς την πηγή του αζώτου που απαιτείται για την ανάπτυξή τους, η οποία δεν εξαρτάται αποκλειστικά μόνο από το γενετικό τους υπόβαθρο, αλλά και από ένα ευρύτερο φάσμα εξωτερικών (ή περιβαλλοντικών) παραγόντων όπως το pH του εδάφους, η θερμοκρασία κλπ. Επομένως, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια σαφής κατηγοριοποίηση των φυτικών ειδών ως προς την προτίμηση τους σε είδη που προτιμούν τα NO_3^- -N και σε είδη που δείχνουν μεγαλύτερη προτίμηση ως προς τα NH_4^+ -N (Sarasketa et al., 2014). Παρόλο αυτά, τα περισσότερα φυτά δείχνουν μια τάση να θέλουν να προσλαμβάνουν περισσότερο την NH_4^+ μορφή καθώς η ενέργεια που απαιτείται για την απορρόφηση του N είναι χαμηλότερη (ή μικρότερη) όταν το N εισέρχεται στα κύτταρα με την μορφή των NH_4^+ . Από την άλλη πλευρά, τα περισσότερα φυτά δεν έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για αποτελεσματικότερη αποφυγή τοξικότητας από τα NH_4^+ και των παραγώγων του (NH_3) εντός των φυτικών κυττάρων, καθώς προέρχονται από περιβάλλοντα με χαμηλά επίπεδα NH_4 -N (Raab and Terry, 1994). Ως εκ τούτου, η τοξικότητα από τα NH_4^+ μπορεί επίσης να εμφανιστεί ακόμα και σε φυτά που θεωρούνται ανθεκτικά στα NH_4^+ . Στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα της Pro φάνηκε να αυξάνονται από την υψηλή παροχή NH_4^+ , ανεξάρτητα από τα διάφορα επίπεδα των εξεταζόμενων αναλογιών (0,25 και 0,50, αντίστοιχα). Από την άλλη μεριά, τα επίπεδα της σερίνης, θρεονίνης, γλυκίνης και β -αλανίνης αυξήθηκαν όταν η αναλογία στο διάλυμα ήταν 0,25 και μειώθηκαν όταν αυτή αυξήθηκε στα 0,50. Υψηλότερη παροχή N συσχετίζεται άμεσα με την αύξηση των επιπέδων των αμινοξέων στα φύλλα. Η όποια φυσιολογική αύξηση που συνδέεται με υψηλότερες συγκεντρώσεις N, και έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης των πρωτεϊνών και της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, οδηγώντας έτσι και σε αύξηση της περιεκτικότητας τους σε ξηρή ουσία. Επιπλέον, η συγκέντρωση του ολικού N (%) στα φύλλα δεν θεωρείται ως ιδανικός δείκτης καταπόνησης, καθώς οι συγκεντρώσεις των ενώσεων που περιέχουν N στη δομή τους, π.χ. αμινοξέα μπορούν να αυξηθούν κάτω από συνθήκες καταπόνησης χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα του N (de Oliveira Ferreira et al., 2016). Η περιεκτικότητα των φύλλων σταμναγκαθίου σε οργανικό N παρουσίασε αύξηση είτε με την αύξηση της συγκέντρωσης του N στο θρεπτικό διάλυμα από 4 σε 16 mM είτε από τις διαφορετικές αναλογίες NH_4 -N/ολικό-N. Σε συμφωνία με την παραπάνω παρατήρηση, το ξηρό βάρος των φύλλων σταμναγκαθίου στα φυτά που δέχθηκαν τις επεμβάσεις με χαμηλό N (4 mM) ήταν υψηλότερο όταν και η αναλογία του NH_4 -N/ολικό-N αυξήθηκε από 0,05 σε 0,25 και 0,50 στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα (Chatzigianni et al., 2018).

Επιπλέον, τα επίπεδα των αμινοξέων στους φυτικούς ιστούς έχουν προταθεί ως ο πιο ευαίσθητος δείκτης της κατάστασης του N σε σχέση με τις συγκεντρώσεις του ολικού N. Όπως ήδη έχει αναφερθεί παραπάνω, όταν τα φυτά εκτίθενται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις NH_4^+ , ενδέχεται να εμφανιστούν συμπτώματα όπως για παράδειγμα χλώρωση, ιοντική ανισορροπία, μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, καθώς επίσης αλλαγές και στις συγκεντρώσεις σε ορισμένα αμινοξέα, οργανικά οξέα

και υδατάνθρακες. Επιπρόσθετα, υψηλότερες συγκεντρώσεις NH_4^+ (NH_4 -fed φυτά) οδηγούν σε μεγαλύτερη (ή υψηλότερη) συσσώρευση αμινοξέων που περιέχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε N (Gln και Asn) στη δομή τους, και αυτή πιθανόν να αποτελεί και την κρίσιμη ανταπόκριση των φυτών στην τοξικότητα από τα NH_4^+ . Επίσης, υπάρχουν αναφορές που υποδεικνύουν ότι τα φυτά που έχουν προτίμηση ως προς τα NH_4^+ συνδέονται ισχυρά με την απορρόφηση (ή ενίσχυση) μεταβολικών ενώσεων όπως τα αμινοξέα, τα οποία δρουν και σαν μόρια μετάδοσης σήματος σε περίπτωση αβιοτικής καταπόνησης, ενεργοποιώντας μεταβολικά μονοπάτια τα οποία συνδέονται με τη συσσώρευση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) (Miranda et al., 2016). Εδώ, τα αμινοξέα στα φυτά που δέχθηκαν τις επεμβάσεις με υψηλά NH_4^+ παρουσίασαν μείωση των επιπέδων τους. Σε αντίθεση με την υψηλή αναλογία NH_4 -N/ολικό-N (0,50), στη μεσαία (0,25), τα επίπεδα των αμινοξέων είτε αυξήθηκαν είτε παρέμειναν ανεπηρέαστα, υποδεικνύοντας ότι μια φυσιολογική παροχή N (όχι περίσσεια) με τη μορφή των NH_4^+ είναι ικανή να ενισχύσει τα επίπεδά τους.

Τα επίπεδα της Asn επίσης μειώθηκαν, όταν η αναλογία των NH_4 -N/ολικό-N ήταν στα 0,50. Η Asn, η οποία απομονώθηκε πρώτα στο σπαράγγι, είναι ένα αμινοξύ το οποίο παίζει έναν ρόλο-κλειδί όχι μόνο στη σύνθεση πρωτεϊνών, αλλά επίσης και στη μεταφορά και αποθήκευση του N εντός των φυτικών ιστών. Αυτό αποδίδεται στην υψηλότερη αναλογία N/C συγκριτικά με τα υπόλοιπα αμινοξέα, σε συνδυασμό και με την σχετικά υψηλή σταθερότητα στη δομή τους. Η Asn αποτελεί ένα υψίστης σημασίας μεταβολίτη, ο οποίος εμπλέκεται στη μεταφορά του N στα φυτά (είτε ψυχανθή είτε μη ψυχανθή) (Lam et al., 1996). Συντίθεται από την Gln και το ασπαρτικό οξύ, καθώς η Gln δρα ως δότης αμινοξέων, και με τη συνθετάση της ασπαραγίνης (asparagine synthetase-AS) να καταλύει την αντίδραση αυτή. Τα NH_4 μπορούν εξίσου να χρησιμεύσουν και σαν υπόστρωμα για την AS όπως ειδικότερα αναφέρεται στην περίπτωση των φυτών καλαμποκιού (Sivasankar and Oaks, 1996), και στην παραγωγή της Asn ως προϊόν για την αποφυγή τοξικότητας, όταν τα φυτά δέχονται επεμβάσεις με υψηλές συγκεντρώσεις NH_4^+ -N. Τα αυξανόμενα επίπεδα των υδατανθράκων και του φωτός διεγείρουν τη σύνθεση των GS και Fd-GOGAT, και καταστέλλουν τη δραστηριότητα της AS. Ως αποτέλεσμα του παραπάνω είναι να προωθείται η αφομοίωση του N σε Gln και Glu (ενώσεις πλούσιες σε C). Από την άλλη πλευρά, χαμηλότερη ένταση ενέργειας και φωτός ενισχύουν τη δραστηριότητα της AS και ευνοούν την αφομοίωση του N προς σχηματισμό της Asn (ένωση πλούσια σε N), η οποία είναι ικανή να συμμετάσχει στη μεταφορά του N ή ακόμη και στη μακροχρόνια αποθήκευσή του.

Οι υδατάνθρακες θεωρούνται απαραίτητοι για τα φυτά, καθώς επίσης και για άλλους έμβιους οργανισμούς όπως τα ζώα και ο άνθρωπος ρυθμίζοντας τον μεταβολισμό τους και ενισχύοντας έτσι την αντίστασή τους έναντι της εκάστοτε καταπόνησης (Zhang et al., 2018). Στους φωτοσυνθετικά ενεργούς ιστούς, το ανόργανο N θεωρείται ως ζωτικής σημασίας στοιχείο καθώς επιτρέπει στους υδατάνθρακες να συμβάλλουν στην ανάπτυξή τους αλλά και στη φωτοσύνθεση. Επίσης στους ιστούς

αυτούς, το N είναι απαραίτητο κατά τη διάρκεια αποδόμησης των υδατανθράκων, το οποίο παρέχει αναγωγικά ισοδύναμα, ATP και C-σκελετούς για την ενίσχυση της αφομοίωσης του N προς τη βιοσύνθεση μεταβολιτών που περιέχουν N στη δομή τους (π.χ. αμινοξέα και νουκλεοτίδια). Όταν η παροχή C ή N μεταβάλλεται, ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών οι οποίοι συμμετέχουν στον μεταβολισμό του N υπόκεινται σε αλλαγές, ενώ σε συνθήκες ελλιπούς φωτισμού, η φωτοσύνθεση αναστέλλεται έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων των υδατανθράκων (Fritz et al., 2006b). Η αφομοίωση του N επίσης επηρεάζει και την περιεκτικότητα των αμινοξέων τα οποία και μειώνονται όταν υπάρχει ανεπαρκής διαθεσιμότητα οργανικού N (Fritz et al., 2006b). Επιπλέον, τα φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες ελλιπούς παροχής N, είναι ικανά να συσσωρεύουν τους περισσότερους υδατάνθρακες με τη μορφή του αμύλου, ενώ τα σάκχαρα και τα αμινοξέα μειώνονται (Fritz et al., 2006b). Προηγούμενη μελέτη σε φυτά τομάτας τα οποία αναπτύσσονταν σε συνθήκες χαμηλού N (Sung et al., 2015) έδειξε ότι τα σάκχαρα είχαν την τάση να μειώνουν τα επίπεδά τους, ενώ αντιθέτως άλλη μελέτη των Sung et al., 2018, σε φυτά λάχανου αυτή τη φορά, μια επικείμενη μείωση της παροχής N φάνηκε να αυξάνει την περιεκτικότητα των σακχάρων. Στην παρούσα μελέτη, όσον αφορά την παροχή του ολικού N, σάκχαρα όπως η *a,a*-trehalose, φρουκτόζη (Fru), γλυκόζη (Glu), εμφάνισαν μια μείωση στο χαμηλό N, ενώ τα επίπεδα των σακχαροαλκοολών όπως η ινοσιτόλη (myo-inositol) είχαν την τάση να αυξάνονται. Επίσης, στο κριθάρι, τα φυτά που τροφοδοτήθηκαν με κανονικά επίπεδα αζώτου δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική μεταβολή στην περιεκτικότητα των υδατανθράκων τους, σε αντίθεση με τα φυτά με χαμηλό N, στα οποία η συγκέντρωση της Fru αυξήθηκε (Fataftah et al., 2018).

Υπάρχει μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των NO_3^- στους φυτικούς ιστούς και το επίπεδο υδατανθράκων. Μελέτες έχουν αποδείξει τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του αμύλου, των σακχάρων και των αμινοξέων όταν η παροχή του N μεταβάλλεται (Scheible et al., 1997a). Στα καταπονημένα από την ελλιπή παροχή N φυτά, μια ανατροφοδότηση με NO_3^- μπορεί να προκαλέσει τη μεταβολή ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων (Stitt, 1999; Scheible et al., 2004), καθώς αυτά εμπλέκονται στην αφομοίωση των NO_3^- , και γονίδια τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του κυτταρικού τοιχώματος. Η έλλειψη των σακχάρων έχει έναν πολύ σοβαρό αντίκτυπο στην ανάπτυξη των φυτών, καθώς καταστέλλει την αφομοίωση των NO_3^- και οδηγεί στην αποδόμηση της NIA (nitrate reductase (NIA) transcript), τη μετα-μεταφραστική απενεργοποίηση της NIA και των πρωτεϊνών της (Matt et al., 1998; Klein et al., 2000). Ανατροφοδότηση των φυτών με σάκχαρα έχει ως αποτέλεσμα την ανάκαμψη τους σε ένα τεράστιο αριθμό από γονίδια που εμπλέκονται σε σημαντικές μεταβολικές λειτουργίες (π.χ. αφομοίωση του N, βιοσύνθεση των οργανικών οξέων, και την κυτοδιαλυματική GS). Στην τρέχουσα μελέτη, Fru, Glu και *a,a*-trehalose παρουσίασαν υπό-έκφραση στα φυτά που δέχθηκαν τις επεμβάσεις με υψηλά

επίπεδα NH_4^+ και ειδικότερα αυτά που ήταν στην υψηλότερη αναλογία των $\text{NH}_4\text{-N/ολικό-N}$ (0,50). Στην υδροπονικά καλλιεργούμενη τομάτα, καταγράφηκε αύξηση στην περιεκτικότητα των φυτών σε υδατάνθρακες σε αυτά που είχαν ελλιπή παροχή N (Urbanczyk-Wochniak et al., 2005). Εν αντιθέσει με την τομάτα, τα φυτά καλαμποκιού, δεν φάνηκε να επηρεάζεται η συγκέντρωση της σακχαρόζης τους (sucrose) λόγω ελλιπούς παροχής N, ενώ η Glu και η Fru μειώθηκαν σημαντικά (Schlüter et al., 2012). Τέλος, η περιεκτικότητα σε σεδοεπτουλόζη (sedoheptulose) αυξήθηκε κάτω από συνθήκες έλλειψης N, ενώ μειώθηκε κάτω από υψηλά επίπεδα NH_4^+ .

Η μείωση της βιομάζας σε αρκετά φυτικά είδη έχει συνδεθεί άμεσα με τη μείωση των επιπέδων των υδατανθράκων. Ένας από τους κύριους λόγους είναι η αφομοίωση των NH_4^+ από τα φυτά, μια διαδικασία η οποία απαιτεί μια αρκετά υψηλή κατανάλωση σακχάρων που προκαλεί ενεργειακή σπατάλη λόγω της όχι και τόσο χρήσιμης διαμεμβρανικής ανακύκλωσης των $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ στα κύτταρα του ριζικού συστήματος (Sarasketa et al., 2016). Υπάρχουν ελάχιστα είδη που έχουν αναπτύξει την ικανότητα να αποθηκεύουν NH_4^+ στα χυμοτόπια τους και/ή να βελτιώνουν την αφομοίωσή του χωρίς να εμφανίζονται ορατά συμπτώματα λόγω της τοξικότητας από τα NH_4^+ . Επίσης, μερικά φυτά φαίνεται να ευνοούνται από τη θρέψη με NH_4^+ , επειδή εξοικονομούν την ενέργεια που χρειάζεται για να μετατρέψουν τα NO_3^- σε NO_2^- κι έπειτα τα NO_2^- σε NH_4^+ (Miranda et al., 2016). Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη των Ibrahim et al., 2010, η συσσώρευση των υδατανθράκων στα φυτά στα οποία υπήρχε ανεπαρκής παροχή N πιθανόν να συνδέεται με το είδος του φυτού, και τη μετατόπιση των υδατανθράκων σε άλλα φυτικά όργανα. Επιπλέον, όταν η διαδικασία της φωτοσύνθεσης καταστέλλεται λόγω της χαμηλής παροχής N, τα φυτά πιθανόν να ανακυκλώνουν το ενζυμικό N που απαιτείται για τους δευτερογενείς μεταβολίτες, κι ως εκ τούτου να αυξάνονται οι συγκεντρώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών (ολικά φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή). Στη μελέτη του σταμναγκαθιού, οι αλλαγές στα επίπεδα των ολικών φαινολικών καθώς επίσης και των φλαβονοειδών δεν έδειξαν κάποια αξιολογή μεταβολή ως αποτέλεσμα των διαφορετικών επιπέδων παροχής αζώτου και των διαφορετικών αναλογιών $\text{NH}_4\text{-N/ολικό-N}$ (Chatzigianni et al., 2018).

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος λαμβάνει μέρος στα μιτοχόνδρια και αποτελεί το δεύτερο στάδιο της αερόβιας αναπνοής στα φυτά. Το πυροσταφυλικό (pyruvate), το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης (glycolysis), μεταφέρεται από το κυτοδιάλυμα στα μιτοχόνδρια, και μέσω του ενζύμου πυροσταφυλική αφυδραγwonάση (pyruvate dehydrogenase) ξεκινάει τον κύκλο. Το μηλικό οξύ, στα φυτικά κύτταρα συγκριτικά με αυτά των ζωικών κυττάρων, αποτελεί ένα ακόμα τελικό προϊόν της γλυκόλυσης, εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (ενδιάμεση ένωση) αλλά η συγκέντρωσή του εξαρτάται από άλλους μεταβολίτες. Για παράδειγμα, η χρήση του 2-κετογλουταρικού οξέος για την αφομοίωση του N στους χλωροπλάστες οδηγεί σε ανεπάρκεια του μηλικού οξέος. Επιπλέον, το μηλικό οξύ μπορεί επίσης να συντεθεί από την PEP καρβοξυλάση (PEP carboxylase) στο κυτοδιάλυμα μέσω

του οξαλοξικού (oxaloacetate) και της μηλικής αφυδρογανάσης (malate dehydrogenase), με τη δραστηριότητά του να εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες φωτισμού, ενώ ενισχύεται από την παροχή N. Έλλειψη N έχει αναφερθεί ότι μειώνει τα επίπεδα του μηλικού, ηλεκτρικού και φουμαρικού οξέος (Obata and Fernie, 2012). Αναλύσεις που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί, έχουν αποδείξει ότι το χαμηλό N μειώνει τα επίπεδα του μηλικού και ηλεκτρικού οξέος, τα οποία συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος, ενώ δεν παρουσιάζει κάποιο ιδιαίτερο αντίκτυπο στα επίπεδα του φουμαρικού οξέος, και αυξάνει εκείνα του 2-κετογλουταρικού οξέος, συγκριτικά πάντα με τα φυτά που έχουν δεχθεί επεμβάσεις με κανονική παροχή N. Μια προηγούμενη μελέτη από τους Sung et al., 2015, υποδεικνύει ότι τα οργανικά οξέα από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (κιτρικό, ηλεκτρικό, φουμαρικό, μηλικό οξύ) σε φυτά τομάτας παρουσίασαν μείωση κάτω από συνθήκες ελλειπούς N, πιθανότατα είτε λόγω αυξημένης αποσύνθεσης των Gln και Glu ή λόγω αυξημένης αφομοίωσης του 2-κετογλουταρικού οξέος στις ρίζες. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι σε φυτά λάχανου τα επίπεδα των οργανικών οξέων διέφεραν ως προς την ανταπόκρισή τους κάτω από μια επικείμενη αβιοτική καταπόνηση, με τα επίπεδά τους να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του οργανικού οξέος (Sung et al., 2018). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής είναι σε συμφωνία με άλλη προηγούμενη μελέτη των Schlüter et al., 2012, οι οποίοι αναφέρουν μείωση της σύνθεσης οργανικών οξέων σε φυτά καλαμποκιού κάτω από χαμηλό N.

Το GABA είναι ένα αμινοξύ το οποίο συσσωρεύεται κάτω από βιοτική και αβιοτική καταπόνηση, συντίθεται από το 2-κετογλουταρικό οξύ και μετατρέπεται σε ηλεκτρικό οξύ μέσω μιας αντίδρασης που παρακάμπτει τον κύκλο του κιτρικού οξέος (GABA shunt ή παρέκκλιση του GABA). Η παρέκκλιση του GABA συσχετίζεται με αρκετές φυσιολογικές αποκρίσεις των φυτών, όπως η ρύθμιση του pH στο κυτοδιάλυμα, οι εκροές C στον κύκλο του κιτρικού οξέος, και ο μεταβολισμός του N. επίσης, το GABA δρα ως ωσμωρυθμιστής που παρέχει προστασία σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης και αποτελεί μόριο μετάδοσης σήματος (Bouché and Fromm, 2004). Επιπλέον, το 2-κετογλουταρικό οξύ είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του γλουταμικού οξέος. Επιπρόσθετα, για τη σύνθεση άλλων αμινοξέων (π.χ. αρωματικά αμινοξέα, διακλαδισμένα ή μη αλειφατικά αμινοξέα όπως η λυσίνη, η ιστιδίνη, η αργινίνη, η κυστεΐνη, η μεθειονίνη, και η προλίνη) χρησιμοποιούνται αρκετές από τις πρόδρομες ουσίες του C οι οποίες και χρησιμεύουν ως αμινο-δότες, συμπεριλαμβανομένων του γλουταμικού οξέος, του ασπαρτικού οξέος, και σε μερικές περιπτώσεις, η Gln (Stitt and Krapp, 1999). Έτσι, υπάρχει μια σύνδεση μεταξύ των οργανικών οξέων και των αμινοξέων για τον λόγο ότι η NH₂-ομάδα μεταφέρεται από τα πρώτα στα δεύτερα, αρχικά μέσω αφομοίωσης της NH₃ μέσω της ενζυμικής δράσης των GS και GOGAT και στη συνέχεια μέσω τρανσαμινώσεων για τις οποίες ο ανθρακικός σκελετός προέρχεται από το φωσφοροενολοπυροσταφυλικό οξύ, το πυροσταφυλικό, το οξαλοξικό, καθώς και το 2-κετογλουταρικό οξύ. Στην παρούσα εργασία, όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν

σε συνθήκες χαμηλού N, παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα 2-κετογλουταρικού οξέος συγκριτικά με τα φυτά που είχαν αναπτυχθεί κάτω από φυσιολογικές συνθήκες παροχής N. Αυτό πιθανώς, σύμφωνα και με προηγούμενη μελέτη (Sung et al., 2015), να οφείλεται στο γεγονός ότι μερικά από τα αμινοξέα που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσίασαν επίσης μείωση, με εξαίρεση το άμεσα σχετιζόμενο αμινοξύ με τη σύνθεση του 2-κετογλουταρικού οξέος, τη γλουταμίνη (το οποίο όπως αναμένονταν αυξήθηκε), κάτω από συνθήκες ανάπτυξης με μειωμένη παροχή N. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στη μειωμένη διαθεσιμότητα του N κυρίως για τις ενώσεις που περιέχουν N στη δομή, είτε στη συσσώρευση άλλων ενδιάμεσων ενώσεων όπως τα διαλυτά σάκχαρα (μόνο η γλυκόζη στην προκειμένη περίπτωση) και φυσικά του 2-κετογλουταρικού οξέος.

Επιπλέον, η βιοσύνθεση των οργανικών οξέων που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος μειώθηκαν κάτω από υψηλή αναλογία $\text{NH}_4\text{-N/ολικό-N}$ στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, το μηλικό και ηλεκτρικό οξύ ακολούθησαν πτωτική τάση τόσο στη μεσαία όσο και στην υψηλότερη αναλογία $\text{NH}_4\text{-N/ολικό-N}$, σε σχέση με το 2-κετογλουταρικό οξύ, το οποίο και παρουσίασε αύξηση αλλά μόνο για την αναλογία των 0,50. Υψηλά επίπεδα NO_3^- είναι υπεύθυνα για τη αύξηση των συγκεντρώσεων των οργανικών οξέων μέσω της έκφρασης της καρβοξυλάσης του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού οξέος (Scheible et al., 2004; Okazaki et al., 2008). Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη των Tschoep et al., 2009, η συγκέντρωση του μηλικού και φουμαρικού οξέος συνδέεται ισχυρά με την αφομοίωση των NO_3^- . Λόγω του ότι το μηλικό οξύ δρα ως ανιόν (counter-anion), η αφομοίωση των NO_3^- κυρίως οδηγεί στη συσσώρευση μηλικού οξέος. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα μηλικού και φουμαρικού οξέος μειώθηκαν σημαντικά κάτω από συνθήκες ελλιπούς παροχής N, και κυρίως όταν οι συγκεντρώσεις των NO_3^- ήταν σε αρκετά χαμηλότερο επίπεδο, ενώ υπήρχε συσσώρευση αμινοξέων. Γενικότερα, χαμηλότερα επίπεδα του μηλικού και φουμαρικού οξέος σε συνθήκες χαμηλού N είναι άμεσα συνδεδεμένα με ένα χαμηλότερο ποσοστό αφομοίωσης των NO_3^- . Το μηλικό και το φουμαρικό οξύ, και σε μικρότερο βαθμό το 2-κετογλουταρικό οξύ, μειώθηκαν κάτω από τις διαφορετικές συνθήκες παροχής N, που αφορούσαν τις συγκρίσεις μεταξύ της μικρότερης, με την μεσαία και κυρίως με τη μεγαλύτερη αναλογία $\text{NH}_4\text{-N/ολικό-N}$, αποτελέσματα τα οποία έρχονται σε συμφωνία με την απόκριση των φυτών σταμναγκαθίου όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των NO_3^- στα φύλλα. Όντως, μια μεσαία και μια υψηλή περιεκτικότητα του θρεπτικού διαλύματος σε NH_4^+ μειώνει τη συγκέντρωση των NO_3^- σε φύλλα σταμναγκαθίου, ειδικότερα όταν τα φυτά δέχονται τις επεμβάσεις με μια αναλογία $\text{NH}_4\text{-N/ολικό-N}$ στο 0,50 (Chatzigianni et al., 2018).

Τέλος, όσον αφορά τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, μερικά από τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα όπως για παράδειγμα το α -λινολενικό οξύ (ALA), το λινολεϊκό οξύ (LA), και το μυριστικό οξύ, δεν φάνηκε να επηρεάζονται από την μείωση της παροχής N στο σταμναγκάθι. Από την άλλη πλευρά, το

στεατικό οξύ και η μονοπαλμιτίνη αυξήθηκαν κάτω από χαμηλά επίπεδα παροχής N. Σε φυτά καλαμποκιού, βρέθηκε ότι τα επίπεδα των λιπαρών οξέων μειώθηκαν σε συνθήκες ελλειπούς N, ειδικότερα σε αυτά της μεσαίας προς μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα (π.χ. λαυρικό οξύ, στεατικό οξύ, μυριστικό οξύ και παλμιτικό οξύ), ενώ τα μακράς αλυσίδα φάνηκε να ακολουθούν αυξητική τάση ([Schlüter et al., 2012](#)).

Κεφάλαιο Ε

Ποιοτικός χαρακτηρισμός, περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία, και παραγωγή βιομάζας σε υδροπονικά καλλιεργούμενο σταμναγκάθι (Cichorium spinosum L.) εξαρτώμενα από τον οικότυπο, την αλατότητα και την παροχή αζώτου.

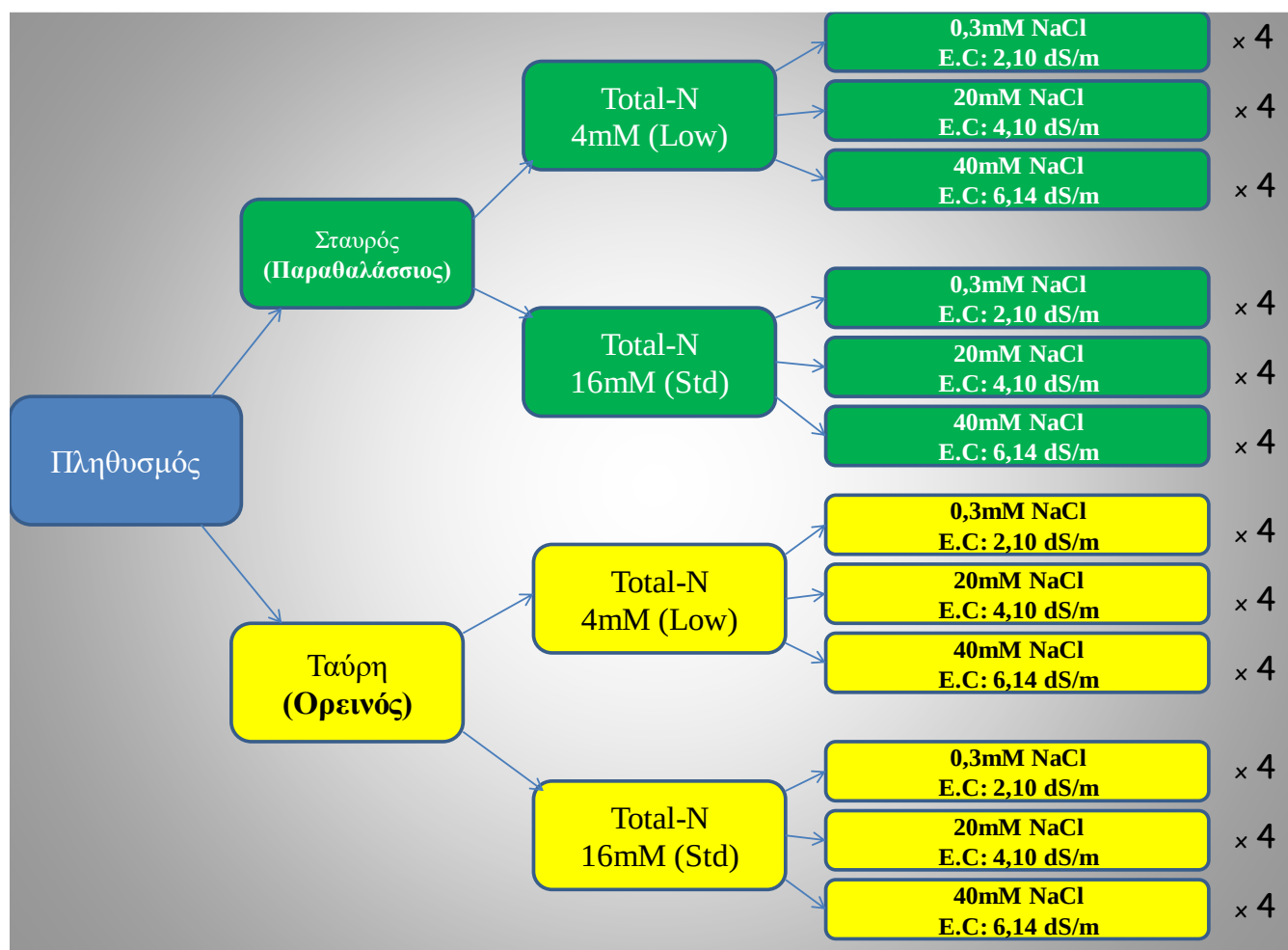
Σκοπός του πειράματος

Το σταμναγκάθι λόγω των ιδιοτήτων του μπορεί εύκολα να αναπτύσσεται τόσο σε παραθαλάσσια μέρη όσο και σε ορεινούς όγκους (Petropoulos et al., 2017), αποδεικνύοντας έτσι την ανθεκτικότητά του κάτω από συνθήκες έντονης καταπόνησης (αλατότητα), ενώ παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανό, όταν δέχεται και άλλου είδους σημαντικές αβιοτικές καταπονήσεις (θρεπτικό στρες, υδατικό στρες κλπ.), να αναπτύσσει μηχανισμούς για την περαιτέρω ανάπτυξη και επιβίωσή του. Λαμβάνοντας υπόψιν το παραπάνω υπόβαθρο, ένα τριπαραγοντικό πείραμα σχεδιάστηκε ώστε να μελετηθούν οι επιδράσεις του NaCl τόσο σε υψηλό όσο και σε χαμηλό επίπεδο παροχής N όσον αφορά τις αποδόσεις και την θρεπτική τους αξία καθώς και ως προς τις λειτουργικές ιδιότητές του (πολυφαινόλες, καροτενοειδή, αντιοξειδωτική δραστηριότητα, φλαβονοειδή και νιτρικά), από φυτά προερχόμενα από δύο εντελώς διαφορετικούς οικότυπους σταμναγκαθιού εκφυόμενα είτε σε παραθαλάσσιες είτε σε ορεινές περιοχές της Κρήτης. Ο πρωταρχικός στόχος της παρούσας μελέτης είναι εκτιμηθεί η σχετική ικανότητα των δύο διαφορετικών οικοτύπων ως προς διατήρηση των αποδόσεων και της ποιότητας των αποδόσεων τους ανταποκρινόμενα πάντα κάτω από διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα αλατότητας και παροχής αζώτου. Οι όποιες διαφορές που εντοπίστηκαν, έχουν ως μελλοντικό στόχο την εφαρμογή προγραμμάτων αναπαραγωγής τα οποία θα οδηγήσουν στη δημιουργία νέων ποικιλιών οι οποίες θα διατηρούν μια καλύτερη ισορροπία μεταξύ της απόδοσης και της ποιότητας των αποδόσεων παρά το γεγονός ότι θα αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες αλατότητας και μειωμένης παροχής αζώτου.

Αβιοτική καταπόνηση με αλατότητα - Υλικά και Μέθοδοι

Η συγκομιδή των σπόρων πραγματοποιήθηκε τον Σεπτέμβριο και για τους δύο οικότυπους (Πίνακας 10). Στις 4 Δεκεμβρίου, οι σπόροι από τους δύο οικότυπους τοποθετήθηκαν σε δίσκους σποράς (84 θέσεων), γεμισμένους με μίγμα τύρφη/περλίτη 3:1. Τα σπορόφυτα ποτίζονταν τακτικά όπως απαιτούνταν από τις κλιματικές συνθήκες. Στις 30 Ιανουαρίου, δύο μήνες μετά τη σπορά, τα σπορόφυτα μεταφυτεύθηκαν σε θερμοκήπιο με ανοιχτό υδροπονικό σύστημα, με τις συγκομιδές να υλοποιούνται 60 και 108 μέρες η πρώτη και η δεύτερη, αντίστοιχα. Την 3^η χρονιά αντικαταστάθηκαν οι αναλογίες $\text{NH}_4^+ - \text{N} / \text{Total-N}$ με 3 διαφορετικά επίπεδα αλατότητας (Γράφημα 6). Πιο αναλυτικά, προέκυψε ένα τριπαραγοντικό πείραμα αποτελούμενο από έξι διαφορετικές μεταχειρίσεις το οποίο προέκυψε από τον συνδυασμό δύο διαφορετικών επιπέδων ολικού αζώτου (4 mM N ή 16 mM N) με τρία επίπεδα αλατότητας (0,3 mM, 20 mM και 40 mM, αντίστοιχα) στο θρεπτικό διάλυμα. Οι μεταχειρίσεις

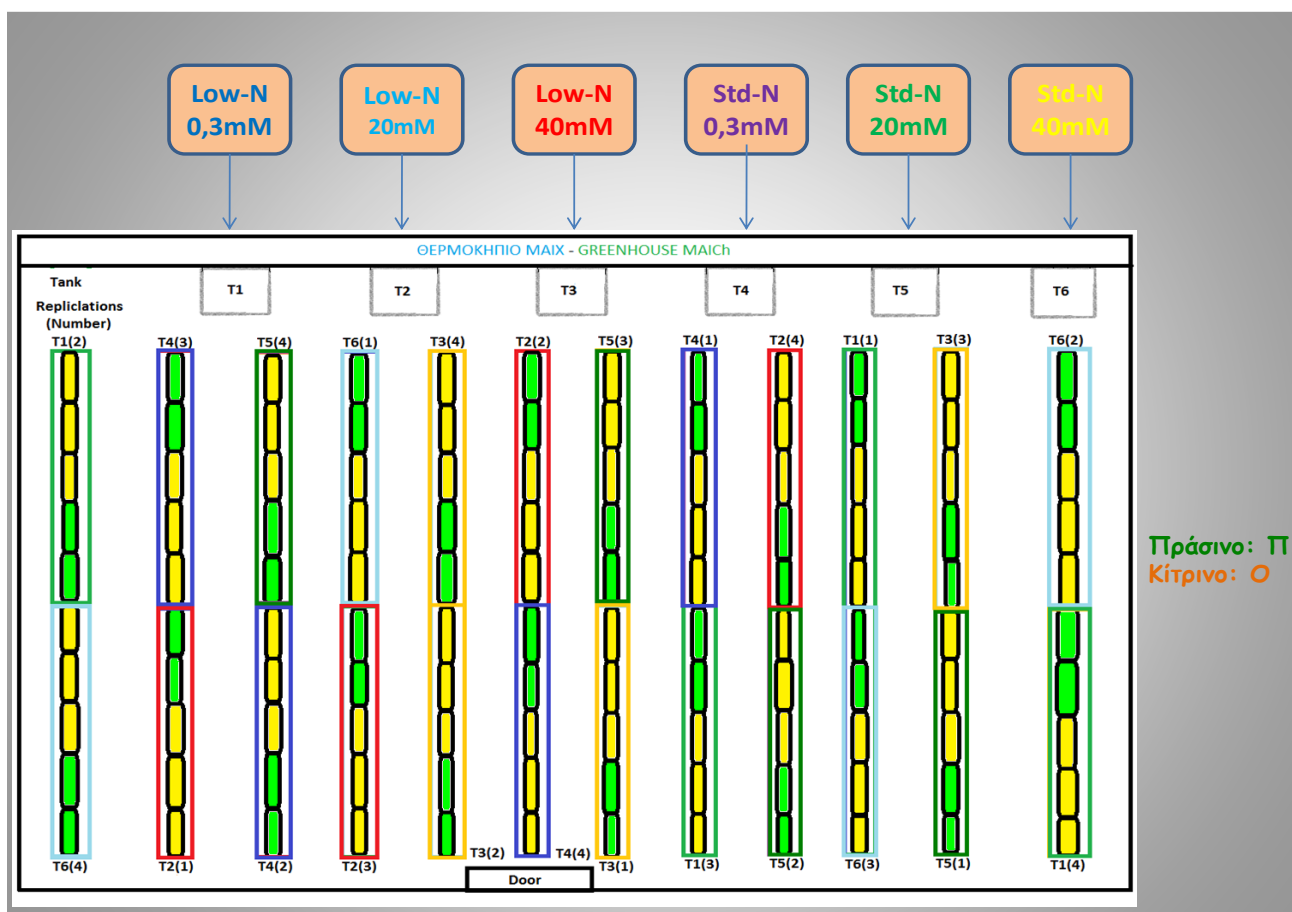
τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου με μια εντελώς τυχαιοποιημένη κατάταξη αποτελούμενη συνολικά από 48 πειραματικές μονάδες (Εικόνα 9). Οι επεμβάσεις με την αλατότητα ξεκίνησαν αμέσως μετά τη μεταφύτευση των φυτών.



Γράφημα 6: Απεικόνιση των μεταχειρίσεων εντός του θερμοκηπίου κατά το 2014-2015.

Πίνακας 10: Ημερομηνίες διεξαγωγής του πειράματος κατά τη χρονική περίοδο 2014-2015.

ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ
Συγκομιδή Παραθαλάσσιου οικότυπου (Π)	25/09/2014
Συγκομιδή Ορεινού οικότυπου (Ο)	23/09/2014
Έναρξη τεστ βλαστικότητας	Δεν πραγματοποιήθηκε
Λήξη τεστ βλαστικότητας	Δεν πραγματοποιήθηκε
Σπορά	04/12/2014
Μεταφύτευση	30/01/2015
1 ^η Συγκομιδή	31/03/2015
2 ^η Συγκομιδή	18/05/2015



Εικόνα 9: Απεικόνιση των μεταχειρίσεων εντός του θερμοκηπίου κατά το 2014-2015. Με πράσινο απεικονίζεται ο παραθαλάσσιος (Π) και με κίτρινο ο ορεινός οικότυπος (Ο). Το T1, T2, T3, T4, T5 και T6 αφορά τον αριθμό της δεξαμενής που αντιστοιχεί σε μία μεταχείριση που δέχθηκαν τα φυτά σταμαναγκαθίου εντός του θερμοκηπίου, ενώ ο αριθμός εντός των παρενθέσεων αντιστοιχεί στον αριθμό της επανάληψης για την κάθε μεταχείριση. Στο σύνολο κάθε μεταχείριση αποτελούνταν από 4 επαναλήψεις.

Οι συγκεντρώσεις των μακροστοιχείων στις διαφορετικές επεμβάσεις του θρεπτικού διαλύματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 15, ενώ οι συγκεντρώσεις του φωσφόρου και των ιχνοστοιχείων, οι οποίες παρέμειναν σταθερές σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, είχαν ως ακολούθως: 1.2 mM P, 15 μM Fe^{2+} , 8 μM Mn^{2+} , 6 μM Zn^{2+} , 0.7 μM Cu^{2+} , 30 μM B, 0.5 μM Mo. Η μείωση του επιπέδου των $\text{NO}_3\text{-N}$ από 16 σε 4 mM στις επεμβάσεις χαμηλής παροχής $\text{NO}_3\text{-N}$ αντισταθμίστηκε με την ισοδύναμη αύξηση των συγκεντρώσεων του SO_4^{2-} και του Cl^- , διατηρώντας έτσι σταθερές τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων μακρο- και μικροστοιχείων σε όλα τα επίπεδα παροχής $\text{NO}_3\text{-N}$. Εντούτοις, μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων αλατότητας υπήρχαν διαφορές στην ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC) λόγω της προσθήκης NaCl. Το pH του παρεχόμενου θρεπτικού διαλύματος στα φυτά ήταν σταθερό στο 5.6 για όλες τις επεμβάσεις, ενώ η EC από 2.10 dS m^{-1} στις μεταχειρίσεις χωρίς προσθήκη NaCl, ανήλθε σε 4.10 dS m^{-1} και σε 6.14 dS m^{-1} μετά από προσθήκη 20 mM, ή 40 mM NaCl, αντίστοιχα. Στις μεταχειρίσεις με EC 2.10 dS/m , η φυσική συγκέντρωση NaCl δεν ήταν μηδενική αλλά ανερχόταν σε 0.3 mM, λόγω

της φυσικής παρουσίας του στο νερό άρδευσης. Η μεταφορά του θρεπτικού διαλύματος στα φυτά γίνονταν μέσω συστήματος άρδευσης με σταγόνα χρησιμοποιώντας αντλίες οι οποίες ήταν συνδεδεμένες με χρονοδιακόπτη. Η παροχή σε κάθε φυτό πραγματοποιούνταν από ατομικό σταλάχτη με ροή 2 L h^{-1} . Η συχνότητα και η διάρκεια των ποτισμάτων ρυθμίζονταν σύμφωνα με τις εκάστοτε κλιματικές συνθήκες με σκοπό το διάλυμα απορροής να μην υπερβαίνει το 30%, με αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται από δύο έως τέσσερα ποτίσματα την ημέρα ($140\text{--}280 \text{ mL}$ ανά φυτό) για κάθε πειραματική μονάδα. Επιπλέον, το pH και η EC του διαλύματος απορροής μετριούνταν και καταγράφονταν κατά τη διάρκεια των παραγωγικών κύκλων με τη συλλογή δειγμάτων (τρεις δειγματοληψίες ανά εβδομάδα). Κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης δεν χρειάστηκε ο ψεκασμός για παθογόνα και δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο σύστημα θέρμανσης.

Πίνακας 11: Ηλεκτρική αγωγιμότητα, pH και οι συγκεντρώσεις των K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , NO_3^- , H_2PO_4^- , SO_4^{2-} στις διάφορες μεταχειρίσεις κατά τη διάρκεια της τρίτης πειραματικής χρονιάς.

Αλατότητα (mM)	0,3	20	40	0,3	20	40
Παροχή Αζώτου (Total-N level)	4 mmol L ⁻¹			16 mmol L ⁻¹		
EC (dS m ⁻¹)	2.10	4.10	6.14	2.10	4.10	6.14
pH	5.60	5.60	5.60	5.60	5.60	5.60
K^+ (mmol L ⁻¹)	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50
Ca^{2+} (mmol L ⁻¹)	4.40	4.40	4.40	4.40	4.40	4.40
Mg^{2+} (mmol L ⁻¹)	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Na^+ (mmol L ⁻¹)	0.3	20.00	40.00	0.3	20.00	40.00
NO_3^- (mmol L ⁻¹)	3.00	3.00	3.00	15.00	15.00	15.00
H_2PO_4 (mmol L ⁻¹)	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
SO_4^{2-} (mmol L ⁻¹)	4.81	4.81	4.81	1.84	1.84	1.84

Αποτελέσματα 3^{ης} πειραματικής χρονιάς

Το νωπό βάρος (FW) και των δύο εξεταζόμενων οικότυπων σταμναγκαθίου δεν επηρεάστηκε από τα διαφορετικά επίπεδα ολικού-N στο χορηγούμενο θρεπτικό διάλυμα, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων Οικότυπος x ολικό-N, ολικό-N x Αλατότητα, και Οικότυπος x ολικό-N x Αλατότητα). Παρόλο αυτά, παρουσιάστηκε μια αλληλεπίδραση μεταξύ του οικότυπου και της αλατότητας. Πιο συγκεκριμένα, το νωπό βάρος των φυτικών ιστών ήταν παρόμοιο και για τους δύο οικότυπους σε συνθήκες απουσίας αλατότητας (0,3 mM NaCl), ενώ στο μεσαίο (20 mM) και στο υψηλό (40 mM) επίπεδο αλατότητας ήταν σημαντικά υψηλότερο στον παραθαλάσσιο οικότυπο συγκριτικά με τον ορεινό. Επιπλέον, το ξηρό βάρος (DW) και η περιεκτικότητα των φυτικών ιστών σε ξηρά ουσία (DMC) ήταν σημαντικά υψηλότερες στον ορεινό οικότυπο σε σύγκριση με τον παραθαλάσσιο (Πίνακας 12). Και στους δύο οικότυπους, το ξηρό βάρος των φύλλων περιορίστηκε με την αύξηση της αλατότητας από 0,3 mM στα 40 mM, ενώ στα 20 mM η μείωση αυτή του ξηρού βάρους ήταν αμελητέα. Παρόλο αυτά, το επίπεδο του ολικού-N στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα δεν είχε κάποια σημαντική επίπτωση στο ξηρό βάρος (Πίνακας 12). Αλατότητα και επίπεδο παροχής N επίσης δεν επηρέασαν την περιεκτικότητα των φυτικών ιστών του σταμναγκαθίου σε ξηρή ουσία.

Αν και παρόλο που σημαντικές αλληλεπιδράσεις παρατηρήθηκαν, τα φύλλα του ορεινού οικότυπου παρουσίασαν υψηλότερες συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α, β και ολικής χλωροφύλλης συγκριτικά με τον παραθαλάσσιο οικότυπο (Πίνακας 12). Μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του οικότυπου και της αλατότητας παρατηρήθηκε για την χλωροφύλλη α και την ολική χλωροφύλλη. Στο ορεινό οικότυπο οι παραπάνω παράμετροι αυξήθηκαν κάτω από συνθήκες μεσαίας και υψηλής αλατότητας (20 mM και 40 mM), ενώ καμία αξιοσημείωτη διαφορά δεν παρατηρήθηκε για τον παραθαλάσσιο οικότυπο. Ανεξάρτητα από τον οικότυπο, στα υψηλά επίπεδα αλατότητας οι συγκεντρώσεις των φύλλων σε χλωροφύλλη α και ολική χλωροφύλλη ήταν σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν κάτω από υψηλή παροχή ολικού-N, συγκρινόμενες με τις μεταχειρίσεις της χαμηλής παροχής ολικού-N. Στο μεσαίο και υψηλό επίπεδο αλατότητας (20 mM και 40 mM), η συγκέντρωση της χλωροφύλλης β στα φύλλα του ορεινού οικότυπου ήταν σημαντικά πιο αυξημένη στο υψηλό επίπεδο παροχής ολικού-N, συγκριτικά με τις άλλες μεταχειρίσεις.

Η αύξηση της εξωτερικής συγκέντρωσης NaCl σε 20 mM είχε ως αποτέλεσμα την άνοδο της συγκέντρωσης του Cl⁻ στα φύλλα σταμναγκαθίου και για τους δύο οικότυπους, ενώ η περαιτέρω αύξηση στα 40 mM αύξησε τις συγκεντρώσεις του Cl⁻ μόνο στον ορεινό οικότυπο (Πίνακας 13). Παρόλο αυτά, αυξάνοντας τη συγκέντρωση του N στο θρεπτικό διάλυμα από 4 στα 16 mM μείωσε σημαντικά τις συγκεντρώσεις του Cl⁻ στα φύλλα και των δύο οικότυπων. Επιπλέον, η συγκέντρωση του Cl⁻ στα φύλλα του παραθαλάσσιου οικότυπου ήταν πάντα σημαντικά υψηλότερη από αυτή του

ορεινού σε κάθε επίπεδο NaCl και ολικού-N. Η συγκέντρωση του Na^+ στα φύλλα σταμναγκαθιού (Πίνακας 13) αυξήθηκε καθώς η συγκέντρωση του NaCl στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα ανέβηκε από το 0.3 mM στα 40 mM και στους δύο οικότυπους. Παρόλο αυτά, στο υψηλότερο επίπεδο αλατότητας (40 mM), η συγκέντρωση του Na^+ στα φύλλα κυμάνθηκε σε υψηλότερα επίπεδα στον ορεινό οικότυπο σε σχέση με τον παραθαλάσσιο οικότυπο.

Η συγκέντρωση K^+ στα φύλλα ήταν σημαντικά υψηλότερη για τον παραθαλάσσιο οικότυπο σε σχέση με τον ορεινό, σε κάθε συνδυασμό υψηλής αλατότητας με χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις ολικού-N που μελετήθηκαν, όπως δείχνει η υψηλής σημαντικότητας τριπλή αλληλεπίδραση που παρουσιάστηκε (οικότυπος $\times$ ολικό-N $\times$ αλατότητα). Παρόλο αυτά, το επίπεδο της αλατότητας το οποίο ευθύνεται για τη μείωση των συγκεντρώσεων του K^+ στα φύλλα εξαρτάται τόσο από τον οικότυπο όσο και από την παροχή ολικού-N, όπως υποδηλώνει το γεγονός ότι καμία σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε όμως μεταξύ των οικοτύπων κάτω από συνθήκες χαμηλού ολικού-N και χαμηλής αλατότητας). Πιο συγκεκριμένα, στα φυτά του ορεινού οικότυπου που εκτίθενται σε χαμηλό ολικό-N, το K^+ στα φύλλα ήταν σημαντικά πιο μειωμένο στο μεσαίο επίπεδο αλατότητας (20 mM), ενώ η έκθεσή τους στο υψηλότερο επίπεδο αλατότητας (40 mM) δεν προκάλεσε κάποια περαιτέρω μείωση στις συγκεντρώσεις του K^+ . Από την άλλη πλευρά, κάτω από υψηλό ολικό-N, καμία σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε και για τους δύο οικότυπους όταν εκτίθενται στα 20 mM NaCl, ενώ μείωση των συγκεντρώσεων του K^+ παρατηρήθηκε στα 40 mM NaCl (Πίνακας 13).

Μια σημαντική τριπλή αλληλεπίδραση (οικότυπος $\times$ ολικό-N $\times$ αλατότητα) παρατηρήθηκε για τη συγκέντρωση του Ca^{2+} στα φύλλα σταμναγκαθιού. Το Ca^{2+} παρουσίασε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις στον παραθαλάσσιο οικότυπο σε σχέση με τον ορεινό, όταν αυτός συγκρίνεται σε κάθε συνδυασμό της αλατότητας και του ολικού-N, με εξαίρεση την έκθεσή των φυτών σε συνθήκες υψηλής παροχής N και υψηλής αλατότητας (16N-40 NaCl), όπου οι συγκεντρώσεις Ca^{2+} ήταν παρόμοιες με αυτές του ορεινού οικότυπου όταν αυτός εκτίθεται σε υψηλό ολικό-N αλλά χαμηλής αλατότητας (16N-0.3 NaCl). Υψηλό ολικό-N (16 mM) μείωσε σημαντικά και στους δύο οικότυπους τη συγκέντρωση του Ca^{2+} στα φύλλα όταν αυτοί εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα αλατότητας (40 mM NaCl). Στο υψηλό επίπεδο ολικού-N, το Ca^{2+} παρουσίασε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του όταν τα φυτά εκτίθεται σε υψηλό επίπεδο αλατότητας, ενώ αντιθέτως στα 20 mM NaCl το ύψος του ολικού N δεν φάνηκε να επηρεάζει τις συγκεντρώσεις του Ca^{2+} . Στο χαμηλό επίπεδο ολικού-N, το Ca^{2+} στα φύλλα ήταν σημαντικά μειωμένο με την έκθεσή του φυτού σε μεσαία αλατότητα (20 mM NaCl) αλλά χωρίς να παρουσιάζει κάποια επιπλέον μείωση καθώς αυξάνεται περαιτέρω το επίπεδο της αλατότητας στα 40 mM στην περίπτωση του ορεινού οικότυπου, την ίδια στιγμή που η αλατότητα δεν φάνηκε να επηρεάζει τον παραθαλάσσιο οικότυπο (Πίνακας 13).

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις του Mg^{2+} στα φύλλα, αυτές ήταν σημαντικά υψηλότερες στον παραθαλάσσιο οικότυπο συγκριτικά με τον ορεινό, ανεξαρτήτως του επιπέδου της αλατότητας και της παροχής ολικού-N. Επιπλέον, το υψηλό επίπεδο ολικού-N αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση του Mg^{2+} στα φύλλα χωρίς να παρατηρείται κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ του οικότυπου και της αλατότητας. Η αύξηση της αλατότητας από 0.3 στα 20 mM NaCl στο θρεπτικό διάλυμα είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του Mg^{2+} στα φύλλα, ενώ η περαιτέρω αύξησή της στα 40 mM NaCl μείωσε σε ακόμα χαμηλότερα επίπεδα τη συγκέντρωση του Mg^{2+} στα φύλλα, χωρίς να υπάρχει αλληλεπίδραση του οικότυπου με την παροχή του ολικού-N (Πίνακας 13).

Η αύξηση του επιπέδου της αλατότητας από 0.3 στα 40 mM NaCl στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση του φωσφόρου (P), ανεξάρτητα από τον οικότυπο. Στο χαμηλό επίπεδο παροχής ολικού-N, η έκθεση του σταμναγκαθιού σε συνθήκες αλατότητας μείωσε επίσης τις συγκεντρώσεις των θειικών (SO_4^{2-}) ανεξαρτήτως του οικότυπου, ενώ στο υψηλό επίπεδο ολικού-N δεν φάνηκε να εμφανίζει κάποια αξιοσημείωτη διαφορά. Και στους δύο οικότυπους, αυξάνοντας την παροχή ολικού-N μειώνεται η συγκέντρωση του SO_4^{2-} . Κάτω από συνθήκες αλατότητας, η περιεκτικότητα του φυτικού ιστού σε οργανικό-N ήταν σημαντικά υψηλότερη στον ορεινό οικότυπο σε σύγκριση με αυτή που μετρήθηκε στον παραθαλάσσιο και από το φυτικό υλικό προερχόμενο και από τους δύο παραγωγικούς κύκλους του πειράματος, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο 0.3 mM NaCl (Πίνακας 13). Επίσης, σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του ολικού-N και της αλατότητας υποδεικνύει ότι κάτω από συνθήκες χαμηλής αλατότητας (0.3 mM) η παροχή με υψηλό ολικό-N (16 mM) είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερη συγκέντρωση οργανικού-N συγκριτικά με το χαμηλό επίπεδο ολικού-N (4 mM).

Τα φύλλα του ορεινού οικότυπου παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών οξέων (61%), καροτενοειδών (42%), και φλαβονοειδών (28%) συγκριτικά με αυτές του παραθαλάσσιου οικότυπου, ενώ παρατηρήθηκαν και υψηλής σημαντικότητας αλληλεπιδράσεις (Πίνακας 14). Επιπλέον, ο ορεινός οικότυπος παρουσίασε και υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε σχέση με τον παραθαλάσσιο κάτω από συνθήκες χαμηλής αλατότητας. Από την άλλη πλευρά, η αλατότητα αύξησε σημαντικά τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών οξέων και στους δύο οικότυπους, ανεξαρτήτως από το επίπεδο παροχής του ολικού-N (Πίνακας 14). Παρόλο αυτά, στον παραθαλάσσιο οικότυπο, η αύξηση του ολικού-N στο θρεπτικό διάλυμα δεν φάνηκε να επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών οξέων, την ίδια στιγμή που στον ορεινό προκαλούσε μείωση της περιεκτικότητας του φυτικού ιστού σε ολικά φαινολικά οξέα. Στη περίπτωση των φλαβονοειδών, στον ορεινό οικότυπο οι συγκεντρώσεις τους παρουσίασαν μείωση καθώς αυξάνονταν το επίπεδο της αλατότητας από 0.3 στα 40 mM NaCl και για τα δύο επίπεδα ολικού-N, ενώ παράλληλα τα φλαβονοειδή του παραθαλάσσιου έδειξαν μείωση μόνο κάτω από συνθήκες

χαμηλού ολικού-N. Τέλος, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του ορεινού οικότυπου δεν φάνηκε να επηρεάζεται είτε από το επίπεδο της αλατότητας είτε από το επίπεδο του ολικού-N, ενώ από την άλλη πλευρά, τα υψηλότερα επίπεδα αλατότητας αύξησαν την αντιοξειδωτική δραστηριότητα του παραθαλάσσιου οικότυπου και στα δύο εξεταζόμενα επίπεδα ολικού-N.

Στο ριζικό σύστημα η συγκέντρωση του Na^+ αυξήθηκε καθώς αυξάνονταν η συγκέντρωση του NaCl στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα από 0.3 mM στο 40 mM, με την αύξηση αυτή να είναι άμεσα εξαρτώμενη (ή συνδεδεμένη) τόσο από τον οικότυπο όσο και από το επίπεδο ολικού-N όπως διαφαίνεται από τη σημαντική τριπλή αλληλεπίδραση (οικότυπος $\times$ ολικό-N $\times$ αλατότητα), που εμφανίστηκε. Επίσης, η συγκέντρωση του Na^+ στις ρίζες του ορεινού οικότυπου ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με αυτή του παραθαλάσσιου σε όλα τα εξεταζόμενα επίπεδα αλατότητας αλλά οι διαφορές ήταν μεγαλύτερες για το μεσαίο (20 mM) και το υψηλό (40 mM) επίπεδο (Πίνακας 15). Οι συγκεντρώσεις των K^+ και Ca^{2+} στο ριζικό σύστημα του φυτού ήταν σημαντικά υψηλότερες στην περίπτωση του ορεινού οικότυπου συγκριτικά με αυτές που μετρήθηκαν στον παραθαλάσσιο, ανεξαρτήτως των επιπέδων της αλατότητας και του ολικού-N (Πίνακας 15). Το επίπεδο του ολικού-N δεν φάνηκε να επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των K^+ και Ca^{2+} στις ρίζες, ενώ αυξάνοντας το επίπεδο της αλατότητας από 0.3 στα 20 ή 40 mM NaCl στο θρεπτικό διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα να μειώνονται οι συγκεντρώσεις των K^+ και Ca^{2+} στο ριζικό σύστημα του φυτού. Η συγκέντρωση του Mg^{2+} στο ριζικό σύστημα του σταμναγκαθίου δεν επηρεάστηκε από τις μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη. Όσον αφορά τον P, αυτός ήταν σημαντικά υψηλότερος στον ορεινό οικότυπο σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις του οικότυπου που προέρχεται από την παράκτια περιοχή. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις του οργανικού-N ήταν αρκετά υψηλότερες στις ρίζες του ορεινού οικότυπου σε σχέση με τις συγκεντρώσεις που βρέθηκαν στον παραθαλάσσιο κάτω από συνθήκες χαμηλής αλατότητας, αλλά η διαφορά αυτή δεν υπήρχε όταν και οι δύο οικότυποι είχαν αναπτυχθεί σε συνθήκες μεσαίας και υψηλής αλατότητας (20 ή 40 mM NaCl). Το επίπεδο του ολικού-N και η αλατότητα ξεχωριστά δεν φάνηκε να επηρεάζουν σε κάποιο σημαντικό βαθμό τη συγκέντρωση του οργανικού-N στις ρίζες του σταμναγκαθίου (Πίνακας 15).

Οι συγκεντρώσεις του Fe και του Mn στα φύλλα του παραθαλάσσιου οικότυπου ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με αυτές του ορεινού, αν και ισχυρές αλληλεπιδράσεις παρατηρήθηκαν στην περίπτωση του Mn (Πίνακας 16). Αλατότητα και επίπεδο N αύξησαν, ανεξάρτητα από τον οικότυπο, τη συγκέντρωση του Fe στα φύλλα. Όσον αφορά τη συγκέντρωση του Mn στα φύλλα σταμναγκαθίου του ορεινού οικότυπου ήταν υψηλότερες όταν το επίπεδο του ολικού-N αυξήθηκε από 4 mM στα 16 mM. Η υψηλότερη συγκέντρωση του Mn παρατηρήθηκε όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες χαμηλής αλατότητας συνδυαζόμενη με το υψηλό ολικό-N, συγκριτικά με τις άλλες μεταχειρίσεις. Παρόμοια, μια αύξηση στο επίπεδο του ολικού-N από 4 mM σε 16 mM αύξησε τη

συγκέντρωση του Zn στα φύλλα του ορεινού οικότυπου, ενώ το αντίθετο παρουσιάστηκε στην περίπτωση του παραθαλάσσιου. Οι συγκεντρώσεις των Mn και Zn στον παραθαλάσσιο οικότυπο μειώθηκαν κάτω από συνθήκες μεσαίας και υψηλής αλατότητας, ενώ αντίστοιχη διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση του ορεινού οικότυπου. Παρόλο αυτά, η αλατότητα μείωσε τις συγκεντρώσεις του Zn σε χαμηλό ολικό-N, ενώ σε υψηλό ολικό-N, η συγκέντρωση του αυξήθηκε στο μεσαίο επίπεδο αλατότητας (20 mM NaCl) και μειώθηκε στο υψηλό (40 mM NaCl). Η αλατότητα αύξησε επίσης τη συγκέντρωση του Cu στα φύλλα του σταμναγκαθιού για τον παραθαλάσσιο οικότυπο και στα δύο επίπεδα ολικού-N, ενώ στον ορεινό δε φάνηκε να έχει κάποια επίδραση στις συγκεντρώσεις του. Από την άλλη πλευρά, οι συγκεντρώσεις των Fe, Zn και Cu στις ρίζες του ορεινού οικότυπου κάτω από υψηλές συνθήκες αλατότητας παρουσίασαν μείωση ανεξάρτητα από το επίπεδο παροχής του ολικού-N. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των Fe, Mn, Zn και Cu του παραθαλάσσιου οικότυπου έδειξαν μια αύξηση όταν το επίπεδο της αλατότητας αυξήθηκε από 0.3 στα 40 mM NaCl κάτω από συνθήκες χαμηλού ολικού-N, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε στο υψηλό ολικό-N με εξαίρεση βέβαια την περίπτωση του Mn. Το Mn στις ρίζες του ορεινού οικότυπου δεν επηρεάστηκε από τα διαφορετικά επίπεδα της αλατότητας όταν το ολικό-N στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα ήταν χαμηλό (Πίνακας 16).

Πίνακας 12: Επίδραση της προέλευσης του σπόρου (ορεινός ή παραθαλάσσιος οικότυπος), του επιπέδου παροχής αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, αναφερόμενο ως 4-N και 16-N, αντίστοιχα) και της αλατότητας (0.3 mM, 20 mM και 40 mM, αντίστοιχα) στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα φυτών σταμναγκαθίου που αναπτύχθηκαν υδροπονικά, ως προς το νωπό βάρος (FW), το ξηρό βάρος (DW), την περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία (DMC), χλωροφύλλη a (Chl a), b (Chl b) και ολική χλωροφύλλη (Tot chl) κατά τον πρώτο παραγωγικό κύκλο.

	1 ^{ος} παραγωγικός κύκλος	Νωπό Βάρος FW (g/φυτό)	Ξηρό Βάρος (g/φυτό)	Περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία (%)	Chl a (mg g ⁻¹ NΠ)	Chl b (mg g ⁻¹ NΠ)	Ολική chl (mg g ⁻¹ NΠ)
Οικότυπος (Ecotype-E)	Ορεινός	24.7	3.03	12.00	1.26	0.45	1.78
	Παραθαλάσσιος	29.9	2.65	8.28	0.90	0.30	1.26
Παροχή αζώτου (Total-N)	4 mM	27.7	2.71	10.15	1.03	0.35	1.45
	16 mM	26.8	2.97	10.14	1.12	0.40	1.59
Αλατότητα (Salinity-S)	0.3 mM	27.4	3.14 ^a	10.22	1.04 ^{b'}	0.36	1.45 ^{b'}
	20 mM	27.9	2.81 ^{ab}	10.11	1.10 ^{a'}	0.38	1.56 ^a
	40 mM	26.7	2.57 ^b	10.11	1.09 ^{ab'}	0.38	1.56 ^{a'}
Αλληλεπιδράσεις							
E x N	Ορεινός 4-N	25.4	2.88	11.84	1.22	0.43	1.71
	Ορεινός 16-N	23.9	3.18	12.16	1.30	0.47	1.85
	Παραθαλάσσιος 4-N	30.0	2.55	8.45	0.85	0.28	1.19
	Παραθαλάσσιος 16-N	29.7	2.75	8.11	0.94	0.32	1.32
E x S	Ορεινός 0.3 NaCl	26.8 ^{bc}	3.57	12.08	1.16 ^b	0.42	1.63 ^b
	Ορεινός 20 NaCl	24.2 ^{cd}	2.90	12.02	1.34 ^a	0.47	1.89 ^a
	Ορεινός 40 NaCl	23.1 ^d	2.63	11.91	1.28 ^a	0.47	1.83 ^a
	Παραθαλάσσιος 0.3 NaCl	27.9 ^b	2.71	8.34	0.91 ^c	0.31	1.26 ^c
	Παραθαλάσσιος 20 NaCl	31.5 ^a	2.72	8.20	0.97 ^c	0.29	1.23 ^c
	Παραθαλάσσιος 40 NaCl	30.2 ^{ab}	2.52	8.30	0.90 ^c	0.30	1.28 ^c
N x S	4 N – 0.3 NaCl	28.9	2.87	10.24	1.03 ^C	0.36	1.44 ^B
	4 N – 20 NaCl	27.0	2.82	10.10	1.07 ^{BC}	0.35	1.49 ^B
	4 N – 40 NaCl	27.3	2.44	10.10	0.99 ^C	0.35	1.42 ^B
	16 N – 0.3 NaCl	25.8	3.41	10.19	1.04 ^C	0.36	1.45 ^B
	16 N – 20 NaCl	28.7	2.81	10.12	1.13 ^{AB}	0.41	1.63 ^A
	16 N – 40 NaCl	26.0	2.69	10.11	1.19 ^A	0.42	1.69 ^A
	Ορεινός 4 N – 0.3 NaCl	28.7	3.18	11.80	1.18	0.43 ^b	1.66
	Ορεινός 4 N – 20 NaCl	24.2	2.90	11.97	1.30	0.42 ^b	1.81
	Ορεινός 4 N – 40 NaCl	23.4	2.57	11.74	1.17	0.43 ^b	1.66

E x N x S	Ορεινός 16 N – 0.3 NaCl	24.8	3.96	12.36	1.13	0.40 ^b	1.60
	Ορεινός 16 N – 20 NaCl	24.2	2.91	12.06	1.37	0.51 ^a	1.96
	Ορεινός 16 N – 40 NaCl	22.8	2.68	12.07	1.40	0.52 ^a	2.00
	Παραθαλάσσιος 4 N – 0.3 NaCl	29.0	2.56	8.67	0.88	0.29 ^{cd}	1.22
	Παραθαλάσσιος 4 N – 20 NaCl	29.8	2.74	8.23	0.84	0.27 ^d	1.16
	Παραθαλάσσιος 4 N – 40 NaCl	31.2	2.35	8.46	0.82	0.27 ^d	1.18
	Παραθαλάσσιος 16 N – 0.3 NaCl	26.7	2.85	8.01	0.94	0.33 ^c	1.29
	Παραθαλάσσιος 16 N – 20 NaCl	33.2	2.70	8.17	0.90	0.31 ^{cd}	1.30
	Παραθαλάσσιος 16 N – 40 NaCl	29.1	2.69	8.14	0.99	0.33 ^c	1.37
P values	Οικότυπος	0.0004	0.0295	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	Επίπεδο αζώτου	0.6941	0.1501	0.5817	0.0004	0.0000	0.0001
	Αλατότητα	0.2090	0.0426	0.7572	0.0452	0.1825	0.0084
	E x N	0.5904	0.7559	0.6176	0.6812	0.8195	0.9026
	E x S	0.0186	0.1628	0.9861	0.0017	0.0074	0.0031
	N x S	0.3366	0.4204	0.6457	0.0042	0.0105	0.0071
	E x N x S	0.6789	0.6992	0.6510	0.3677	0.0433	0.2385

Πίνακας 13: Επίδραση της προέλευσης του σπόρου (ορεινός ή παραθαλάσσιος οικότυπος), του επιπέδου παροχής αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, αναφερόμενο ως 4-N και 16-N, αντίστοιχα) και της αλατότητας (0.3 mM, 20 mM και 40 mM, αντίστοιχα) στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα φυτών σταμναγκαθίου που αναπτύχθηκαν υδροπονικά, ως προς το χλώριο (Cl), νάτριο (Na), κάλιο (K), ασβέστιο (Ca), μαγνήσιο (Mg), φώσφορο (P), ολικό άζωτο (organically-bound nitrogen) και τα θειικά στα φύλλα κατά τον πρώτο παραγωγικό κύκλο.

	1 ^{ος} παραγωγικός κύκλος (φύλλα) (mg g ⁻¹ ΞB)	Cl	Na	K	Ca	Mg	P	Ολικό N	SO ₄ ²⁻
Οικότυπος (Ecotype-E)	Ορεινός	25.6	12.6	38.4	9.2	1.70	8.07	38.3	3.00
	Παραθαλάσσιος	38.4	11.6	52.8	15.3	2.48	7.87	34.2	3.17
Παροχή αζώτου (Total-N)	4 mM	40.5	12.1	43.8	11.2	2.00	7.88	35.6	4.62
	16 mM	24.5	12.1	47.6	13.3	2.18	8.05	36.9	1.55
Αλατότητα (Salinity-S)	0.3 mM	16.2	3.2 ^C	53.0	13.7	2.38 ^a	7.28 ^b	36.8	3.34 ^A
	20 mM	35.0	14.5 ^B	46.2	12.7	2.08 ^b	7.67 ^b	35.5	2.91 ^B
	40 mM	46.3	18.6 ^A	37.8	10.3	1.82 ^c	8.94 ^a	36.5	3.01 ^{AB}
Αλληλεπιδράσεις									
E x N	Ορεινός 4-N	31.3 ^B	13.2	38.2	8.5	1.63	8.07	37.9	4.42
	Ορεινός 16-N	20.0 ^C	13.5	38.5	9.8	1.76	8.06	38.8	1.57
	Παραθαλάσσιος 4-N	47.8 ^A	11.9	49.2	13.9	2.37	7.69	33.3	4.81
	Παραθαλάσσιος 16-N	29.0 ^B	11.7	52.4	16.7	2.57	8.04	35.1	1.53
E x S	Ορεινός 0.3 NaCl	11.9 ^e	2.9 ^d	47.3	10.6	1.95	7.30	37.3 ^a	3.18
	Ορεινός 20 NaCl	26.1 ^c	15.5 ^c	37.2	9.3	1.64	7.72	38.7 ^a	2.89
	Ορεινός 40 NaCl	38.8 ^b	21.5 ^a	30.5	7.6	1.51	9.19	39.0 ^a	2.92
	Παραθαλάσσιος 0.3 NaCl	20.5 ^d	2.9 ^d	58.4	16.9	2.81	7.25	36.3 ^{ab}	3.49
	Παραθαλάσσιος 20 NaCl	43.8 ^a	14.8 ^c	49.1	16.1	2.47	7.66	32.3 ^c	2.93
	Παραθαλάσσιος 40 NaCl	50.9 ^a	17.7 ^b	44.9	13.1	2.12	8.69	33.9 ^{bc}	3.09
N x S	4 N – 0.3 NaCl	23.1	2.9	51.1	12.2	2.37	7.25	34.5 ^B	5.15 ^a
	4 N – 20 NaCl	40.5	15.2	43.0	11.0	1.86	7.99	34.7 ^B	4.28 ^c
	4 N – 40 NaCl	57.8	19.6	37.0	10.5	1.78	8.40	37.5 ^{AB}	4.42 ^b
	16 N – 0.3 NaCl	9.3	3.0	54.6	15.3	2.39	7.30	39.1 ^A	1.52 ^d
	16 N – 20 NaCl	29.4	15.1	43.3	14.4	2.25	7.38	36.3 ^{AB}	1.54 ^d
	16 N – 40 NaCl	34.8	19.6	38.4	10.1	1.85	9.48	35.4 ^B	1.59 ^d
	Ορεινός 4 N – 0.3 NaCl	18.0	2.8	48.7 ^{bc}	9.9 ^e	1.97	7.79	34.2	4.79
	Ορεινός 4 N – 20 NaCl	28.2	15.3	33.8 ^e	8.0 ^f	1.48	7.86	37.6	4.22

E x N x S	Ορεινός 4 N – 40 NaCl	47.2	21.5	32.1 ^e	7.6 ^f	1.46	8.57	41.8	4.25
	Ορεινός 16 N – 0.3 NaCl	5.7	3.1	45.9 ^{cd}	11.2 ^{de}	1.94	6.81	40.4	1.56
	Ορεινός 16 N – 20 NaCl	24.0	15.6	40.6 ^d	10.6 ^e	1.81	7.57	39.8	1.56
	Ορεινός 16 N – 40 NaCl	30.3	21.6	28.9 ^e	7.6 ^f	1.55	9.80	36.2	1.59
	Παραθαλάσσιος 4 N – 0.3 NaCl	28.1	3.1	53.4 ^b	14.4 ^b	2.77	6.71	34.8	5.50
	Παραθαλάσσιος 4 N – 20 NaCl	52.8	15.1	52.3 ^b	14.0 ^{bc}	2.25	8.12	31.8	4.34
	Παραθαλάσσιος 4 N – 40 NaCl	62.4	17.8	41.9 ^d	13.6 ^{bc}	2.09	8.23	33.2	4.59
	Παραθαλάσσιος 16 N – 0.3 NaCl	12.9	2.9	63.4 ^a	19.4 ^a	2.85	7.78	37.8	1.48
	Παραθαλάσσιος 16 N – 20 NaCl	34.7	14.5	58.0 ^a	18.2 ^a	2.70	7.19	32.8	1.51
	Παραθαλάσσιος 16 N – 40 NaCl	39.3	17.6	48.0 ^{bc}	12.6 ^{cd}	2.16	9.15	34.6	1.59
P values	Οικότυπος	0.0027	0.0386	0.0000	0.0000	0.0000	0.2927	0.0000	0.0788
	Επίπεδο αζώτου	0.0000	0.9155	0.1121	0.0000	0.0290	0.3519	0.1241	0.0000
	Αλατότητα	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0029	0.4254	0.0456
	E x N	0.0168	0.3158	0.1810	0.0187	0.6192	0.1497	0.6397	0.0506
	E x S	0.0157	0.0090	0.4106	0.2178	0.3288	0.7593	0.0391	0.7172
	N x S	0.1316	0.9514	0.4676	0.0000	0.1050	0.8327	0.0128	0.0403
	E x N x S	0.4351	0.9794	0.0000	0.0092	0.9127	0.3192	0.0512	0.6479

Πίνακας 14: Επίδραση της προέλευσης του σπόρου (ορεινός ή παραθαλάσσιος οικότυπος), του επιπέδου παροχής αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, αναφερόμενο ως 4-N και 16-N, αντίστοιχα) και της αλατότητας (0.3 mM, 20 mM και 40 mM, αντίστοιχα) στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα φυτών σταμναγκαθίου που αναπτύχθηκαν υδροπονικά, ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά (ολικά φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, καροτενοειδή και αντιοξειδωτική δραστηριότητα) κατά τον πρώτο παραγωγικό κύκλο.

	1 ^{ος} παραγωγικός κύκλος	Ολικά Φαινολικά Οξέα (mg GAE 100 g ⁻¹ NΠ)	Φλαβονοειδή (mg catechin 100 g ⁻¹ NΠ)	Καροτενοειδή (mg 100 mL ⁻¹ εκχυλίσματος)	Αντιοξειδωτική δραστηριότητα (mg Trolox 100 g ⁻¹ NΠ)
Οικότυπος (Ecotype-E)	Ορεινός	164.4	67.1	1.28	35.1
	Παραθαλάσσιος	104.1	52.3	0.88	31.4
Παροχή αζώτου (Total-N)	4 mM	136.8	58.7	1.09	33.2
	16 mM	131.7	60.7	1.07	33.4
Αλατότητα (Salinity-S)	0.3 mM	114.9 ^B	63.8	1.10 ^{ab}	30.7
	20 mM	136.9 ^A	57.9	1.17 ^a	34.6
	40 mM	150.9 ^A	57.4	0.98 ^b	34.5
Αλληλεπιδράσεις					
E x N	Ορεινός 4-N	173.0 ^a	64.8	1.28	34.7
	Ορεινός 16-N	155.7 ^b	69.3	1.27	35.5
	Παραθαλάσσιος 4-N	100.6 ^c	52.6	0.90	31.6
	Παραθαλάσσιος 16-N	107.6 ^c	52.0	0.86	31.2
E x S	Ορεινός 0.3 NaCl	135.8	72.8	1.30	34.7
	Ορεινός 20 NaCl	170.5	64.6	1.42	35.2
	Ορεινός 40 NaCl	186.7	63.9	1.12	35.4
	Παραθαλάσσιος 0.3 NaCl	94.0	54.8	0.89	26.7
	Παραθαλάσσιος 20 NaCl	103.3	51.2	0.91	33.9
	Παραθαλάσσιος 40 NaCl	115.1	50.9	0.85	33.7
N x S	4 N – 0.3 NaCl	112.1	60.9	1.12	31.6
	4 N – 20 NaCl	139.3	59.3	1.20	33.9
	4 N – 40 NaCl	159.1	56.0	0.96	34.0
	16 N – 0.3 NaCl	117.8	66.8	1.07	29.8
	16 N – 20 NaCl	134.5	56.5	1.13	35.2
	16 N – 40 NaCl	142.7	58.8	1.00	35.0
	Ορεινός 4 N – 0.3 NaCl	143.3	65.6 ^{bc}	1.37	34.4 ^{abc}
	Ορεινός 4 N – 20 NaCl	183.6	67.0 ^b	1.42	34.5 ^{abc}
	Ορεινός 4 N – 40 NaCl	192.0	61.9 ^{de}	1.05	35.2 ^{ab}

E x N x S	Ορεινός 16 N – 0.3 NaCl	128.3	80.0 ^a	1.22	35.0 ^{abc}
	Ορεινός 16 N – 20 NaCl	157.4	62.1 ^{cd}	1.42	36.0 ^a
	Ορεινός 16 N – 40 NaCl	181.5	65.8 ^{bc}	1.18	35.6 ^a
	Παραθαλάσσιος 4 N – 0.3 NaCl	80.8	56.1 ^{ef}	0.86	28.7 ^d
	Παραθαλάσσιος 4 N – 20 NaCl	94.9	51.6 ^{fg}	0.98	33.3 ^{bc}
	Παραθαλάσσιος 4 N – 40 NaCl	126.2	50.0 ^g	0.87	32.9 ^c
	Παραθαλάσσιος 16 N – 0.3 NaCl	107.3	53.5 ^{fg}	0.92	24.7 ^e
	Παραθαλάσσιος 16 N – 20 NaCl	111.6	50.8 ^g	0.83	34.4 ^{abc}
	Παραθαλάσσιος 16 N – 40 NaCl	104.0	51.7 ^{fg}	0.82	34.4 ^{abc}
P values	Οικότυπος	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	Επίπεδο αζώτου	0.3657	0.0126	0.4206	0.6054
	Αλατότητα	0.0000	0.0000	0.0343	0.0000
	E x N	0.0377	0.0024	0.8617	0.0927
	E x S	0.0869	0.0640	0.3194	0.0000
	N x S	0.3080	0.0007	0.5275	0.0052
	E x N x S	0.0975	0.0001	0.4595	0.0132

Πίνακας 15: Επίδραση της προέλευσης του σπόρου (ορεινός ή παραθαλάσσιος οικότυπος), του επιπέδου παροχής αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, αναφερόμενο ως 4-N και 16-N, αντίστοιχα) και της αλατότητας (0.3 mM, 20 mM και 40 mM, αντίστοιχα) στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα φυτών σταμναγκαθίου που αναπτύχθηκαν υδροπονικά, ως προς το νάτριο (Na), κάλιο (K), ασβέστιο (Ca), μαγνήσιο (Mg), φώσφορο (P), ολικό άζωτο (organically-bound nitrogen) στο ριζικό σύστημα κατά το δεύτερο παραγωγικό κύκλο.

	2 ^{ος} παραγωγικός κύκλος (ρίζες) (mg g ⁻¹ ΞB)	Na	K	Ca	Mg	P	Ολικό άζωτο
Οικότυπος (Ecotype-E)	Ορεινός	7.76	22.6	3.78	1.10	5.85	2.13
	Παραθαλάσσιος	4.04	19.2	3.00	1.08	4.99	1.88
Παροχή αζώτου (Total-N)	4 mM	6.28	21.0	3.50	1.11	5.62	2.01
	16 mM	5.42	20.6	3.28	1.07	5.22	2.00
Αλατότητα (Salinity-S)	0.3 mM	2.90	24.8 ^a	3.84 ^a	1.11	5.41	1.87
	20 mM	6.52	20.0 ^b	3.30 ^b	1.05	5.46	2.11
	40 mM	8.14	17.8 ^b	3.04 ^b	1.11	5.39	2.05
Αλληλεπιδράσεις							
E x N	Ορεινός 4-N	8.33	22.8	3.99	1.15	6.17	2.16
	Ορεινός 16-N	7.20	22.2	3.58	1.05	5.53	2.10
	Παραθαλάσσιος 4-N	4.24	19.1	3.00	1.07	5.06	1.85
	Παραθαλάσσιος 16-N	3.64	19.1	2.98	1.09	4.92	1.90
E x S	Ορεινός 0.3 NaCl	3.64	28.0	4.41	1.09	5.95	2.23 ^a
	Ορεινός 20 NaCl	9.39	21.6	3.66	1.12	5.78	2.11 ^a
	Ορεινός 40 NaCl	10.27	18.0	3.28	1.09	5.82	2.06 ^a
	Παραθαλάσσιος 0.3 NaCl	2.15	21.6	3.25	1.04	4.87	1.50 ^b
	Παραθαλάσσιος 20 NaCl	3.65	18.4	2.94	1.10	5.15	2.10 ^a
	Παραθαλάσσιος 40 NaCl	6.01	17.4	2.78	1.10	4.96	2.03 ^a
N x S	4 N – 0.3 NaCl	2.93	24.2	4.02	1.12	5.57	1.89 ^{BC}
	4 N – 20 NaCl	7.08	20.2	3.40	1.10	5.70	1.94 ^{BC}
	4 N – 40 NaCl	8.84	18.6	3.06	1.11	5.58	2.19 ^{AB}
	16 N – 0.3 NaCl	2.86	25.5	3.64	1.00	5.25	1.84 ^C
	16 N – 20 NaCl	5.97	19.8	3.20	1.12	5.22	2.27 ^A
	16 N – 40 NaCl	7.44	16.8	3.00	1.09	5.20	1.90 ^{BC}
	Ορεινός 4 N – 0.3 NaCl	3.56 ^f	26.1	4.68	1.15	6.10	2.26
	Ορεινός 4 N – 20 NaCl	10.58 ^a	23.1	3.94	1.17	6.46	2.09
	Ορεινός 4 N – 40 NaCl	10.83 ^a	19.3	3.32	1.13	5.94	2.14

E x N x S	Ορεινός 16 N – 0.3 NaCl	3.71 ^f	29.9	4.14	1.03	5.80	2.20
	Ορεινός 16 N – 20 NaCl	8.20 ^c	20.1	3.35	1.06	5.09	2.13
	Ορεινός 16 N – 40 NaCl	9.70 ^b	16.7	3.24	1.06	5.69	1.98
	Παραθαλάσσιος 4 N – 0.3 NaCl	2.29 ^g	22.2	3.37	1.10	5.03	1.52
	Παραθαλάσσιος 4 N – 20 NaCl	3.58 ^f	17.2	2.85	1.02	4.94	1.79
	Παραθαλάσσιος 4 N – 40 NaCl	6.84 ^d	18.0	2.79	1.09	5.21	2.24
	Παραθαλάσσιος 16 N – 0.3 NaCl	2.00 ^g	21.1	3.14	0.98	4.70	1.48
	Παραθαλάσσιος 16 N – 20 NaCl	3.73 ^f	19.5	3.04	1.18	5.35	2.40
	Παραθαλάσσιος 16 N – 40 NaCl	5.18 ^e	16.8	2.76	1.12	4.70	1.82
P values	Οικότυπος	0.0000	0.0015	0.0000	0.6022	0.0015	0.0021
	Επίπεδο αζώτου	0.0000	0.7541	0.1425	0.3651	0.1310	0.8848
	Αλατότητα	0.0000	0.0000	0.0002	0.6371	0.9848	0.0613
	E x N	0.1349	0.7610	0.1853	0.1470	0.3466	0.5321
	E x S	0.0000	0.0700	0.1865	0.8263	0.6842	0.0010
	N x S	0.0077	0.4332	0.6585	0.3467	0.9831	0.0165
	E x N x S	0.0008	0.1106	0.5702	0.4108	0.2252	0.1303

Πίνακας 16: Επίδραση της προέλευσης του σπόρου (ορεινός ή παραθαλάσσιος οικότυπος), του επιπέδου παροχής αζώτου (4 ή 16 mmol L⁻¹, αναφερόμενο ως 4-N και 16-N, αντίστοιχα) και της αλατότητας (0.3 mM, 20 mM και 40 mM, αντίστοιχα) στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα φυτών σταμναγκαθίου που αναπτύχθηκαν υδροπονικά, ως προς το σίδηρο (Fe), μαγγάνιο (Mn), ψευδάργυρο (Zn), και χαλκό (Cu) στα φύλλα και το ριζικό σύστημα κατά το δεύτερο παραγωγικό κύκλο.

	2 ^{ος} παραγωγικός κύκλος (φύλλα και ρίζες) (mg kg ⁻¹ ΞΒ)	Fe	Mn	Zn	Cu	Fe	Mn	Zn	Cu
Οικότυπος (Ecotype-E)	Ορεινός	66.21	29.4	68.0	5.57	29.1	18.6	69.9	10.5
	Παραθαλάσσιος	97.75	58.1	94.0	9.48	28.9	16.2	80.3	11.5
Παροχή αζώτου (Total-N)	4 mM	77.45	41.9	83.4	7.79	30.8	18.8	80.4	10.9
	16 mM	86.52	45.6	78.5	7.26	27.2	15.9	69.7	11.2
Αλατότητα (Salinity-S)	0.3 mM	73.38 _b	50.2	87.9	5.90	31.6	16.7	85.7	13.1
	20 mM	80.02 _a	41.8	83.2	8.17	29.3	18.4	67.9	10.0
	40 mM	92.55 _a	39.4	71.7	8.50	26.2	17.2	71.6	10.1
Αλληλεπιδράσεις									
E x N	Ορεινός 4-N	59.02	24.3 ^C	61.5 ^C	6.29	31.0	19.8	68.3	10.5
	Ορεινός 16-N	73.40	34.5 ^B	74.4 ^B	4.84	27.1	17.3	71.4	10.5
	Παραθαλάσσιος 4-N	95.87	59.5 ^A	105.3 ^A	9.28	30.5	17.8	92.5	11.2
	Παραθαλάσσιος 16-N	99.64	56.6 ^A	82.6 ^B	9.67	27.2	14.5	68.0	11.8
E x S	Ορεινός 0.3 NaCl	53.34	28.1 ^c	61.9 ^c	5.36	35.0	19.3	87.5	13.6
	Ορεινός 20 NaCl	67.97	28.6 ^c	72.2 ^c	5.29	28.1	18.9	68.7	9.0
	Ορεινός 40 NaCl	77.33	31.6 ^c	69.8 ^c	6.06	24.3	17.5	53.4	8.9
	Παραθαλάσσιος 0.3 NaCl	87.80	72.2 ^a	113.9 ^a	6.44	28.2	13.9	83.9	12.5
	Παραθαλάσσιος 20 NaCl	99.72	55.0 ^b	94.3 ^b	11.05	30.4	17.8	67.1	10.9
	Παραθαλάσσιος 40 NaCl	105.73	47.1 ^b	73.6 ^c	10.94	28.0	16.8	89.8	11.2
N x S	4 N – 0.3 NaCl	66.68	46.3 ^{b'}	91.8 ^{a'}	6.15	32.8	17.6	77.9	11.7
	4 N – 20 NaCl	80.08	37.3 ^{b'}	75.7 ^{b'}	8.32	30.1	19.1	73.9	10.0
	4 N – 40 NaCl	85.57	42.1 ^{b'}	82.7 ^{b'}	8.89	29.5	19.8	89.4	11.0
	16 N – 0.3 NaCl	74.46	54.0 ^{a'}	84.0 ^{b'}	5.65	30.4	15.7	93.4	14.4
	16 N – 20 NaCl	87.61	46.2 ^{b'}	90.8 ^{a'}	8.02	28.4	17.6	61.9	9.9
	16 N – 40 NaCl	97.49	36.6 ^{b'}	60.7 ^{c'}	8.11	22.8	14.5	53.8	9.2

E x N x S	Ορεινός 4 N – 0.3 NaCl	47.1	18.9	53.2	6.52 ^{bc}	38.3 ^a	19.3 ^{ab}	86.0 ^c	13.1 ^{ab}
	Ορεινός 4 N – 20 NaCl	60.8	23.8	58.0	5.74 ^{bcd}	29.2 ^{bcd}	20.7 ^a	65.6 ^d	9.7 ^{cd}
	Ορεινός 4 N – 40 NaCl	69.1	30.2	73.2	6.61 ^{bc}	25.6 ^{de}	19.4 ^{ab}	53.2 ^e	8.7 ^e
	Ορεινός 16 N – 0.3 NaCl	59.8	37.2	70.5	4.19 ^e	31.6 ^{bc}	19.3 ^{ab}	88.9 ^c	14.0 ^a
	Ορεινός 16 N – 20 NaCl	75.1	33.3	86.4	4.83 ^{de}	26.9 ^{cde}	17.0 ^{abc}	71.7 ^d	8.3 ^e
	Ορεινός 16 N – 40 NaCl	85.2	33.0	66.3	5.51 ^{cde}	22.9 ^e	15.6 ^{cd}	53.5 ^e	9.1 ^{cd}
	Παραθαλάσσιος 4 N – 0.3 NaCl	86.3	73.7	130.3	5.77 ^{bcd}	27.2 ^{cde}	15.8 ^{bcd}	69.8 ^d	10.2 ^{cd}
	Παραθαλάσσιος 4 N – 20 NaCl	99.3	50.8	93.4	10.90 ^a	30.9 ^{bcd}	17.4 ^{abc}	82.1 ^c	10.2 ^{cd}
	Παραθαλάσσιος 4 N – 40 NaCl	102.0	54.0	92.1	11.17 ^a	33.3 ^b	20.1 ^a	125.6 ^a	13.2 ^{ab}
	Παραθαλάσσιος 16 N – 0.3 NaCl	89.3	70.7	97.5	7.11 ^b	29.1 ^{bcd}	12.0 ^e	97.9 ^b	14.8 ^a
	Παραθαλάσσιος 16 N – 20 NaCl	100.1	59.1	95.1	11.20 ^a	29.9 ^{bcd}	18.2 ^{abc}	52.0 ^e	11.5 ^{bc}
	Παραθαλάσσιος 16 N – 40 NaCl	109.5	40.1	55.1	10.71 ^a	22.6 ^e	13.4 ^{de}	54.0 ^e	9.2 ^{cd}
P values	Οικότυπος	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.8068	0.0006	0.0000	0.0320
	Επίπεδο αζώτου	0.0402	0.1194	0.2304	0.0423	0.0006	0.0000	0.0000	0.0310
	Αλατότητα	0.0014	0.0277	0.0075	0.0000	0.0001	0.0945	0.0000	0.0000
	E x N	0.02313	0.0075	0.0001	0.3460	0.7059	0.5752	0.0000	0.4623
	E x S	0.8851	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001	0.0088	0.0000	0.0112
	N x S	0.7759	0.0222	0.0027	0.0007	0.0679	0.0404	0.0000	0.0011
	E x N x S	0.9109	0.2001	0.4471	0.0000	0.0037	0.0256	0.0000	0.0022

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη αναδεικνύεται η ικανότητα του σταμναγκαθιού να αναπτύσσεται χωρίς πρόβλημα κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας κι επομένως μπορεί να θεωρείται ως ένα από τα ανθεκτικά φυτά στην αλατότητα. Οι δύο διαφορετικοί οικότυποι όμως διέφεραν σημαντικά ως προς την ανθεκτικότητά τους στην καταπόνηση από αλατότητα, γεγονός το οποίο πιθανώς να οφείλεται στο φυσικό περιβάλλον από το οποίο προέρχονται. Πιθανότατα η συνεχής έκθεση των φυσικών πληθυσμών του παραθαλάσσιου οικότυπου σε αυξημένη αλατότητα οδήγησε μέσω φυσικής επιλογής και εξέλιξης σε αυξημένη ανοχή στην αλατότητα η οποία του προσέφερε καλύτερη προσαρμοστικότητα στο φυσικό του περιβάλλον. Όντως, επίπεδα NaCl υψηλότερα από 40 mM δεν φάνηκε να προκαλούν μείωση στο νωπό βάρος (FW) των φυτών του παραθαλάσσιου οικότυπου, ενώ το νωπό βάρος του ορεινού οικότυπου μειώθηκε σημαντικά στο υψηλότερο επίπεδο αλατότητας (40 mM NaCl). Οι [Klados και Tzortzakis \(2014\)](#), [Ntatsi et al. \(2017a\)](#) και [Petropoulos et al. \(2017\)](#) επίσης διαπίστωσαν στις μελέτες τους υψηλή ανθεκτικότητα του σταμναγκαθιού σε συνθήκες αλατότητας. Πιο συγκεκριμένα, οι [Ntatsi et al. \(2017a\)](#) έδειξαν ότι ο ορεινός οικότυπος του σταμναγκαθιού ήταν ανθεκτικός σε επίπεδα 40 και 80 mmol L⁻¹ NaCl ή σε άλλα ισοσμωτικά διαλύματα όπως CaCl₂, Na₂SO₄ και KCl. Χρησιμοποιώντας τη μεταβολομική ανάλυση, οι [Ntatsi et al. \(2017a\)](#) έδειξαν επίσης ότι ο κύριος μηχανισμός που προσδίδει στο φυτό του σταμναγκαθιού υψηλή ανθεκτικότητα στην αλατότητα είναι η αποτελεσματική προστασία του φυτού από το οσμωτικό στρες, η οποία επιτυγχάνεται κυρίως μέσω αυξημένων επιπέδων των γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), γλουταμικού οξέος, πυρογλουταμικού οξέος, προλίνης και σακχαρόζης. Επιπλέον, η μελέτη των [Ntatsi et al. \(2017a\)](#) έδειξε ότι η ανθεκτικότητα του σταμναγκαθιού στην αλατότητα δεν συνδέεται με μειωμένη μεταφορά ιόντων Na⁺ και Cl⁻ στα φωτοσυνθετικά ενεργά φύλλα. Συνδυάζοντας τα παραπάνω ευρήματα με τη μεταβολομική ανάλυση, οι παραπάνω ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η προστασία από την οσμωτική καταπόνηση και η αποτελεσματικότερη διαμερισματοποίηση των τοξικών ιόντων Na⁺ και Cl⁻ στα χυμοτόπια αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς με τους οποίους οι ανθεκτικοί στην αλατότητα γονότυποι αντιμετωπίζουν τις συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Ελεγχόμενη εισροή των ιόντων αυτών σε συνδυασμό με την αποτελεσματική ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση τους στα χυμοτόπια αποτελεί την πιο λειτουργική στρατηγική που έχει αναπτυχθεί από τα ανθεκτικά ως προς την αλατότητα φυτά ώστε να διατηρείται ο ρυθμός ανάπτυξής τους και κάτω από αλατούχες συνθήκες διαβίωσης ([Shabala and Cuin, 2007](#); [Munns and Gilliam, 2015](#); [Liang et al., 2018](#)). Κατά κανόνα, τα φυτά που για την αντιμετώπιση της αλατότητας βασίζονται στον αποκλεισμό των αλατούχων ιόντων, είναι αυτά που διατηρούν περισσότερο Na⁺ στο ριζικό τους σύστημα ενώ μεταφέρουν λιγότερο Na⁺ και/ή Cl⁻ στα φωτοσυνθετικά ενεργά φύλλα, με

αποτέλεσμα να είναι ευάλωτα σε συνθήκες αλατούχου καταπόνησης πάνω από κάποιο όριο στο οποίο η ικανότητα της ρίζας να συγκρατεί και αποθηκεύει τα τοξικά ιόντα Na^+ και/ή Cl^- τείνει να κορεσθεί (Shabala and Cuin, 2007; Wu, 2018).

Στην παρούσα μελέτη, ο παραθαλάσσιος οικότυπος ο οποίος ανέπτυξε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αλατότητα συγκριτικά με τον ορεινό, περιείχε περισσότερο Cl^- (33% κατά μέσο όρο στα φύλλα) σε σχέση με τον ορεινό οικότυπο σε όλα τα επίπεδα NaCl , το οποίο δείχνει ότι η ανθεκτικότητα του σταμναγκαθίου στην αλατότητα δεν σχετίζεται με τον αποκλεισμό των ιόντων αυτών. Παρόλο αυτά, συγκριτικά με τον ορεινό οικότυπο, ο παραθαλάσσιος επίσης περιείχε μικρότερες συγκεντρώσεις Na^+ στις ρίζες (48% κατά μέσο όρο) σε όλες τις μεταχειρίσεις της αλατότητας και λιγότερο Na^+ στα φύλλα (8% κατά μέσο όρο) στο υψηλότερο επίπεδο αλατότητας (40 mM NaCl). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός αποτελεσματικού μηχανισμού αποκλεισμού των ιόντων Na^+ στον πιο ανεκτικό στην αλατότητα οικότυπο ο οποίος πιθανώς λειτουργεί συμπληρωματικά με τους μηχανισμούς αποτελεσματικότερης ωσμωτικής προσαρμογής σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας.

Κάτω από συνθήκες αλατότητας, τα είδη που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην αλατότητα μπορεί να μειώσουν το υδατικό δυναμικό των φύλλων μέσω της διαμερισματοποίησης των τοξικών αλάτων Na^+ και Cl^- στα χυμοτόπια και σύνθεσης συμβατών ωσμωλυτών στο κυτοδιάλυμα για την αποφυγή μιας επειλούμενης αφυδάτωσης του κυττάρου (Shabala, 2013; Bassil and Blumwald, 2014). Ως αποτέλεσμα, μπορεί να διατηρηθεί μία ικανοποιητική διαφορά υδατικού δυναμικού μεταξύ των κυττάρων του φύλλου και του εξωτερικού διαλύματος που επιτρέπει στα κύτταρα να διατηρούν την σπαργή τους, παρότι η αυξημένη αλατότητα προκαλεί μείωση στο εξωτερικό υδατικό δυναμικό (Shabala, 2013; Mansour and Ali, 2017). Αρκετοί από τους συμβατούς ωσμωλύτες που συμβάλλουν στην ωσμωτική ρύθμιση μεταξύ του κυτοδιαλύματος και του χυμοτοπίου φέρουν αρνητικά φορτισμένες θέσεις, όπως για παράδειγμα καρβοξυλικά ανιόντα, τα οποία εξισορροπούνται ηλεκτροχημικά με ιόντα K^+ (Munns and Gilliham, 2015). Επιπλέον, τα Mg-ATP και Mg-PPi παρέχουν ενέργεια στις αντλίες πρωτονίων οι οποίες μεταφέρουν H^+ μέσα στα χυμοτόπια, τα οποία με τη σειρά τα εκκρίνουν πίσω στο κυτοδιάλυμα μέσω των ανταλλακτικών αντλιών Na^+/H^+ (Na^+/H^+ antiporters), διευκολύνοντας έτσι την απορρόφηση του Na^+ στα χυμοτόπια (Roy et al., 2014). Σε αρμονία με αυτή τη θεωρία, οι συγκεντρώσεις των K^+ και Mg^{2+} στα φύλλα του παραθαλάσσιου οικότυπου, ο οποίος παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αλατότητα, ήταν σημαντικά υψηλότερες (27% και 31%, αντίστοιχα) συγκριτικά με αυτές στα φύλλα του ορεινού σε όλα τα επίπεδα αλατότητας και παροχής ολικού-N. Το ασβέστιο συμβάλει κυρίως στην σταθερότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων και των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ οι συγκεντρώσεις του στο κυτοδιάλυμα είναι χαμηλές (Cabañero et al., 2006; Kader and Lindberg, 2010). Παρόλο αυτά, το ασβέστιο σχετίζεται με την προστασία της κυτταρικής μεμβράνης έναντι της διάρρηξης της λόγω υψηλών εξωτερικών

επιπέδων NaCl αλατότητας (Rengel, 1992; Tuna et al., 2007). Επιπλέον, το Ca^{2+} όπως και άλλα δισθενή κατιόντα (Mg^{2+} , Zn^{2+}), φαίνεται να έχουν την ικανότητα να συγκρατούν τα ιόντα K^+ από τυχόν διαρροή τους που μπορεί να προκληθεί εξαιτίας της αλατότητας, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση μιας υψηλής K^+/Na^+ αναλογίας στο κυτταρόπλασμα, και συγχρόνως στην υψηλότερη αντοχή στην αλατότητα (Shabala and Cuin, 2007). Κατά συνέπεια, η υψηλότερη συγκέντρωση Ca^{2+} στα φύλλα του παραθαλάσσιου οικότυπου σε όλα τα επίπεδα παροχής ολικού-N και αλατότητας συνδέεται άμεσα με την υψηλότερη ανθεκτικότητά του στην αλατότητα καθώς αυξάνει την σταθερότητα και τη λειτουργικότητα των κυτταρικών μεμβρανών σε σύγκριση με αυτή που παρουσιάζει ο ορεινός οικότυπος.

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του οργανικού-N στα φύλλα του ορεινού οικότυπου όταν τα φυτά εκτίθενται σε συνθήκες αλατότητας, πιθανώς να σχετίζονται με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις Cl^- στα φύλλα του συγκεκριμένου οικότυπου. Όντως, τα ιόντα Cl^- δρουν ανταγωνιστικά με την πρόσληψη των NO_3^- και τα φυτά που εκτίθενται σε NaCl-αλατότητα παρουσιάζουν γενικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις NO_3^- στα φύλλα (Munns and Termaat, 1986; Knight et al. 1992; Grattan and Grieve, 1999). Μια υψηλότερη διαθεσιμότητα των NO_3^- στα φύλλα του ορεινού οικότυπου λόγω χαμηλότερων επιπέδων Cl^- στα φύλλα έχει ως αποτέλεσμα πιθανώς υψηλότερο ρυθμό αφομοίωσης των NO_3^- σε οργανικά N (ή αζωτούχες) ενώσεις.

Σε διάφορες ερευνητικές εργασίες διαπιστώθηκε ότι η αλατότητα είτε αυξάνει, είτε παρεμποδίζει, ή δεν έχει κάποια επίπτωση στις συγκεντρώσεις του φωσφόρου στα φύλλα. Στις μεταχειρίσεις με αλατότητα έχουν παρατηρηθεί αυξήσεις στις συγκεντρώσεις του P κυρίως σε πειράματα με φυτά που αναπτύσσονται σε υδροπονικές καλλιέργειες (Grattan and Grieve, 1999). Οι συγκεντρώσεις του P στο θρεπτικό διάλυμα που παρέχεται υδροπονικά στις καλλιέργειες είναι σημαντικά υψηλότερες από αυτές που υφίστανται στο εδαφικό διάλυμα. Όπως προτείνεται από τους Nieman and Clark (1976), οι υψηλές συγκεντρώσεις P κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας πιθανώς να προκαλούν υψηλότερη πρόσληψη P έχοντας ως αποτέλεσμα ακόμα και την εμφάνιση τοξικότητας P στους ιστούς σε καλλιέργειες που αναπτύσσονται υδροπονικά κάτω από συνθήκες αλατότητας. Στην παρούσα μελέτη όμως, η αύξηση του P στους φυτικούς ιστούς του σταμναγκαθιού στο υψηλό επίπεδο αλατότητας των 40 mM NaCl δεν φάνηκε να προκαλεί κάποια ορατά συμπτώματα τοξικότητας στα φυτά.

Τα αποτελέσματα κατά τον τρίτο χρόνο διεξαγωγής του πειράματος όσον αφορά την παραγωγή βιομάζας σε όλα τα επίπεδα παροχής ολικού-N, βρίσκονται σε συμφωνία με τα ευρήματα των προηγούμενων πειραμάτων (Chatzigianni et al., 2018). Σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιπέδων παροχής ολικού-N και των μεταχειρίσεων με αλατότητα, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι η αλατότητα (NaCl) δεν είχε κάποια σοβαρή επίδραση στις συγκεντρώσεις των θεικών (SO_4^{2-}) στα φύλλα όταν η παροχή του ολικού-N ήταν στα 16 mM, αλλά μειώθηκε η πρόσληψη

τους όταν το επίπεδο ολικού-N βρίσκονταν στο χαμηλότερο επίπεδο αυτό των 4 mM. Είναι πολύ γνωστό ότι τα θειικά (SO_4^{2-}) παρουσιάζουν έναν ανταγωνισμό τόσο με τα νιτρικά όσο και με τα ιόντα χλωρίου σε συγκεκριμένες θέσεις πρόσληψης τους (Kinjo and Pratt, 1971; Marschner, 2012). Έτσι, φαίνεται ότι, στην παρούσα μελέτη, τα υψηλά NO_3^- καταστέλλουν οποιοδήποτε ανταγωνιστικό φαινόμενο από το Cl^- ως προς την πρόσληψη των SO_4^{2-} , ενώ στην χαμηλή παροχή ολικού-N, το οποίο συνεπάγεται και χαμηλά επίπεδα NO_3^- στο ριζικό σύστημα, αυξάνει τα επίπεδα του Cl^- περιορίζοντας αυτά των SO_4^{2-} . Μια άλλη αλληλεπίδραση μεταξύ της αλατότητας $\times$ ολικό-N ήταν ότι το υψηλό επίπεδο παροχής N είχε ως αποτέλεσμα τα υψηλότερα επίπεδα οργανικού-N αλλά μόνο απουσία αλατότητας. Πιθανώς αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι κάτω από συνθήκες αλατότητας ο περιορισμός της πρόσληψης νιτρικών που προκαλούν τα ιόντα Cl^- (Grattan and Grieve, 1999) αντισταθμίστηκε με την ενισχυμένη NO_3^- -παροχή στη μεταχείριση των 16 mM (υψηλό ολικό-N).

Σε αντίθεση με το Ca^{2+} στα φύλλα, οι συγκεντρώσεις του Ca^{2+} στις ρίζες ήταν σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στον ορεινό οικότυπο συγκριτικά με αυτές του παραθαλάσσιου οικότυπου. Μια πιθανή εξήγηση για το παραπάνω εύρημα είναι ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση του Ca^{2+} στις ρίζες συνδέεται με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις Na^+ στις ρίζες, στην περίπτωση του ορεινού οικότυπου. Είναι γνωστό ότι το Ca^{2+} ενισχύει την επιλεκτικότητα της μεμβράνης στην πρόσληψη και μεταφορά των ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης και του τονοπλάστη (Hepler, 2005). Έτσι, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του Na^+ στις ρίζες του ορεινού οικότυπου μπορεί να διεγείρουν την αφομοίωση του Ca^{2+} στα κύτταρα της ρίζας με σκοπό την αποτελεσματικότερη διαμερισματοποίηση του Na^+ στα χυμοτόπια από το ξυλώδες παρέγχυμα.

Από τα τέσσερα ιχνοστοιχεία, μόνο ο Fe παρουσίασε μια σταθερή τάση να αυξάνει τις συγκεντρώσεις του στους ιστούς των φύλλων με την αύξηση της αλατότητας, ανεξαρτήτως από τον οικότυπο του σταμναγκαθιού και το επίπεδο παροχής του ολικού-N. Αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Fe στους ιστούς με την αύξηση της αλατότητας έχουν επίσης αναφερθεί κι από προγενέστερους ερευνητές και σε σημαντικά φυτικά είδη, συμπεριλαμβανομένων της τομάτας, της σόγιας και της κολοκύθας (Mass et al., 1972), της φράουλας (Turhan and Eris, 2005) και του κολοκυθιού (Villora et al., 2000). Παρόλο αυτά, σε άλλες μελέτες όπου εξετάστηκαν διαφορετικά φυτικά είδη, η αλατότητα δεν φάνηκε να έχει κάποια επίδραση στα επίπεδα του Fe στο μαρούλι (Lazof and Bernstein, 1999) ενώ προκάλεσε μείωση στα φυτά του ηλιάνθου (Sanchez-Raya and Delgado, 1996).

Η επίδραση της αλατότητας στις συγκεντρώσεις των υπολοίπων μεταλλικών ιχνοστοιχείων ήταν εξαρτημένη τόσο από το επίπεδο παροχής του ολικού-N όσο κι από τον εξεταζόμενο οικότυπο. Οι Mass et al. (1972), Tunçturk et al. (2008), Villora et al. (2000), και Weisany et al. (2014) βρήκαν ότι η επίδραση της αλατότητας στις συγκεντρώσεις των Mn και Zn στα φύλλα και τις ρίζες της τομάτας, της σόγιας και της κολοκύθας επίσης ήταν επίσης εξαρτημένες από το φυτικό είδος και την ποικιλία.

Επιπλέον, όσον αφορά την περίπτωση του Cu, στην παρούσα μελέτη περιεχόταν σε αρκετά υψηλότερα επίπεδα στα φύλλα του παραθαλάσσιου οικότυπου, ο οποίος είναι πιο ανθεκτικός στην αλατότητα, και ανεξαρτήτως του επιπέδου παροχής N (4 mM ή 16 mM) παρουσίασε αύξηση των επιπέδων του Cu με την αύξηση της αλατότητας στο θρεπτικό διάλυμα. Αντίθετα, στον ορεινό οικότυπο η αλατότητα δεν φάνηκε να επιδρά στα επίπεδα του Cu στα φύλλα όταν η παροχή του ολικού-N ήταν στο χαμηλότερο επίπεδο των 4 mM, καθώς επίσης διατηρήθηκε ανεπηρέαστος και στο υψηλότερο επίπεδο αυτό των 16 mM. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν επίσης ότι τα επίπεδα του Cu στα φύλλα επηρεάζονται πρωτίστως από τον οικότυπο και όχι τόσο από την παροχή του N στο θρεπτικό διάλυμα όταν τα φυτά σταμναγκαθιού αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες αλατότητας, ακολουθώντας την ίδια τάση όπως και στις προαναφερθείσες μελέτες. Όλα τα μεταλλικά στοιχεία αποτελούν συστατικά αντιοξειδωτικών ενζύμων και/ή άλλων μεταβολιτών (Marschner, 2012). Έτσι, οι μεγάλες διαφορές στις συγκεντρώσεις των Fe, Mn, Zn, και Cu στα φύλλα μεταξύ του παραθαλάσσιου και ορεινού οικότυπου μπορεί να σχετίζεται με αντίστοιχες διαφορές στις μεταβολικές διεργασίες που σχετίζονται με προστασία από την οξειδωτική καταπόνηση που προκαλεί η αλατότητα. Οι εξεταζόμενοι παράμετροι που μετρήθηκαν σε αυτή την έρευνα δεν επιτρέπουν μια ξεκάθαρη κατανόηση των διαφορετικών μηχανισμών που αναπτύχθηκαν, και οι οποίοι να εμφανίζουν τη διάκριση τους ως προς τις μεταβολικές λειτουργίες μεταξύ των δύο εξεταζόμενων οικότυπων. Χρειάζεται μια περαιτέρω μελέτη ώστε να διευκρινιστούν τα μεταβολικά προφίλ των δύο οικότυπων, που θα μπορούσε να τα συνδέσει κανείς με τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται εδώ.

Οι καλλιέργειες εκτός εδάφους είναι γνωστό ότι διευκολύνουν την εφαρμογή του «eustress», δηλαδή μία ήπια ως μέτριας έντασης καταπόνηση αλατότητας ή θρεπτικής καταπόνησης (όπως για παράδειγμα αυτής του αζώτου), μέσω μιας ακριβούς διαχείρισης των συγκεντρώσεων στο θρεπτικό διάλυμα προκαλώντας έτσι τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών (φαινόλες, φλαβονοειδή, καροτενοειδή) όπου είναι απαραίτητα για την προσαρμογή σε υπό-βέλτιστα περιβάλλοντα (Rouphael and Kyriacou, 2018; Rouphael et al., 2018c). Αυτά τα αντιοξειδωτικά μόρια είναι υψηλής σημασίας για την ανθρώπινη υγεία και μακροζωία, κι έτσι προσδίδουν με έμμεσο τρόπο μια επιπλέον αξία (συγκριτικά με τα προϊόντα από φυτά που δεν έχουν υποστεί κάποιου είδους καταπόνηση) στα βασικά θρεπτικά χαρακτηριστικά των φυλλωδών και καρποδετικών φρούτων και λαχανικών (Orsini et al., 2016).

Οι φαινολικές ενώσεις δρουν ως συν-υποστρώματα αποσύνθεσης του H₂O₂ μέσω της οξείδωσης της υπεροξειδάσης, συμβάλλοντας έτσι στην απομάκρυνση των ROS και συνεπώς στην ενίσχυση της αντοχής τους στο οξειδωτικό στρες (Sudhakar, et al., 2001). Η μικρή αύξηση των ολικών φαινολικών οξέων καθώς το επίπεδο της αλατότητας αυξάνονταν υποδεικνύει ότι αυτή η μεγάλη ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών περιέχει αντιοξειδωτικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να συμβάλλουν σε

ικανοποιητικό βαθμό στην ανθεκτικότητα του σταμναγκαθιού στην αλατότητα. Οι [Lim et al. \(2012\)](#) βρήκαν ότι η έκθεση ενός είδους σίκαλης (*Fagopyrum esculentum* M.) σε συνθήκες αλατότητας ενίσχυσε την περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά οξέα, κυρίως λόγω της αύξησης των συγκεντρώσεων τεσσάρων φαινολικών ενώσεων και πιο συγκεκριμένα της ισοριεντίνης (isoorientin), της οριεντίνης (orientin), της ρουτίνης (rutin), και της βιτεξίνης (vitexin). Σε αντίθεση με τα ολικά φαινολικά οξέα, τα καροτενοειδή και τα φλαβονοειδή (μια υπό-ομάδα στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων) δεν αυξήθηκαν όταν τα φυτά σταμναγκαθιού εκτίθενται σε συνθήκες αλατότητας. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι αυτές οι αντιοξειδωτικές ενώσεις δεν συνδέονται με τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στην αλατότητα στο φυτό του σταμναγκαθιού. Σε αντίθεση με το σταμναγκάθι, άλλα φυτικά είδη παρουσίασαν αύξηση στις συγκεντρώσεις των καροτενοειδών και φλαβονοειδών κάτω από συνθήκες καταπόνησης ([Lim et al., 2012; Wang et al., 2018a](#)). Υπήρξαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών οξέων, καροτενοειδών και φλαβονοειδών στον ορεινό οικότυπο συγκρινόμενες με αυτές του παραθαλάσσιου οικότυπου, ανεξάρτητα από το επίπεδο αλατότητας και παροχής του ολικού-N. Παρόλο αυτά, ο παραθαλάσσιος οικότυπος, φάνηκε να υπερτερεί σε ότι αναφορά την αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε σχέση με τον ορεινό οικότυπο όταν τα φυτά ήταν αντιμέτωπα με συνθήκες αλατότητας, και αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο παραθαλάσσιος οικότυπος έχει αναπτύξει μηχανισμούς ανοχής στην αλατότητα βασισμένους στην ύπαρξη μίας αυξημένης αντιοξειδωτικής ασπίδας. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που παρουσίασε ο ορεινός οικότυπος ως προς τα ολικά φαινολικά οξέα, τα καροτενοειδή και τα φλαβονοειδή μπορεί να σχετίζονται με την αρκετά μεγάλη ικανότητα του να αντιμετωπίζει άλλα στρες πέρα από αυτό της αλατότητας (π.χ. χαμηλές θερμοκρασίες). Όντως, τα μέχρι τώρα δημοσιοποιημένα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι ο βαθμός ανοχής των ποικιλιών σταφυλιού σε χαμηλές θερμοκρασίες ήταν θετικά σχετιζόμενος με την περιεκτικότητά τους σε ολικά φαινολικά οξέα ([Król et al., 2015](#)).

Στην παρούσα μελέτη, η περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη επηρεάστηκε περισσότερο από τον οικότυπο παρά από την αλατότητα ή το επίπεδο παροχής ολικού-N. Οι [Petropoulos et al. \(2016\)](#) επίσης έχει αναφέρει διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωροφύλλης μεταξύ των διαφορετικών οικότυπων του *C. spinosum*. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις χλωροφύλλης στα φύλλα στον λιγότερο ανθεκτικό ως προς την αλατότητα ορεινό οικότυπο, και οι παρόμοιες συγκεντρώσεις χλωροφύλλης στα φύλλα του παραθαλάσσιου οικότυπου, δείχνουν ότι η συγκεκριμένη χρωστική δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα του σταμναγκαθιού στην αλατότητα αλλά ενδεχομένως εμπλέκεται σε μηχανισμούς προσαρμοστικότητας σε κάποιες άλλες συνθήκες περιβάλλοντος. Δηλαδή, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις χλωροφύλλης στον ορεινό οικότυπο μπορεί να σχετίζονται με υψηλότερη ανθεκτικότητά του σε άλλου είδους αβιοτικές καταπονήσεις σε σύγκριση με τον παραθαλάσσιο οικότυπο. Δεδομένου ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ο ορεινός οικότυπος

έρχεται αντιμέτωπος με αρκετά χαμηλότερες θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του χειμώνα σε σχέση με τον παραθαλάσσιο, η υψηλότερη συγκέντρωση χλωροφυλλών στον ορεινό οικότυπο μπορεί να οφείλεται στην προσπάθεια του να ενισχύσει την αντοχή του στο κρύο. Όντως, όπως έχει αναφερθεί από τους [Sanghera et al. \(2011\)](#) και [Li et al. \(2018\)](#), υψηλότερες συγκεντρώσεις χλωροφύλλης στα φυτά συνδέονται με μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο κρύο.

Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία στον ορεινό οικότυπο μπορεί επίσης να σχετίζεται με την υψηλότερη αντοχή του στο κρύο συγκριτικά με τον οικότυπο που προέρχεται από παραθαλάσσια τοποθεσία. Όντως, η μεγαλύτερη αντοχή των φυτών σε λιγότερο ευνοϊκές για την ανάπτυξη το φυτού θερμοκρασίες συνδέονται με υψηλότερα ποσοστά της ξηράς ουσίας προερχόμενα κυρίως από την αύξηση της αφομοίωσης περισσότερου αμύλου ([Venema et al., 1999](#); [Król et al., 2015](#); [Ntatsi et al., 2017b](#)). Από την άλλη μεριά, μικρότερη περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία στα φύλλα μπορεί να είναι συνέπεια της αυξημένης συγκέντρωσης νερού στα φύλλα η οποία τα καθιστά παχύτερα (succulent) και αποτελεί ένα είδος προσαρμογής των φυτών στην αλατότητα ([Greenway and Munns, 1980](#); [Shabala, 2013](#)). Έτσι, μια επιπλέον εξήγηση για τη μικρότερη περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία στον παραθαλάσσιο οικότυπο είναι ότι τα φυτά αυτά τείνουν να αναπτύξουν φύλλα τα οποία είναι πιο σαρκώδη με στόχο την καλύτερη προσαρμογή τους σε συνθήκες αλατότητας.

Κεφάλαιο ΣΤ

Επίδραση της παροχής αζώτου και της αβιοτικής καταπόνησης με αλατότητα στον πρωτογενή μεταβολισμό δύο διαφορετικών οικοτύπων σταμναγκαθίου (Cichorium spinosum L.) καλλιεργούμενων υδροπονικά

Σκοπός πειράματος

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση του συνδυασμού τριών επιπέδων NaCl (0,3, 20 ή 40 mM) με δύο διαφορετικά επίπεδα αζώτου (4 ή 16 mM ολικό N) στο μεταβολομικό προφίλ δύο διαφορετικών οικοτύπων σταμναγκαθίου κατά τον χρόνο συγκομιδής τους. Η μεταβολομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα φύλλων φυτών της 3^{ης} πειραματικής χρονιάς είχε ως βασικό στόχο την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών ανοχής στην αλατότητα μέσω σύνδεσής τους με μεταβολές σε συγκεκριμένες μεταβολομικές διεργασίες. Ένας επιπλέον στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να αναδείξει τις αλλαγές στο μεταβολομικό προφίλ που προκαλεί η αλατότητα σε συνθήκες υψηλής και χαμηλής τροφοδότησης των φυτών με άζωτο και σχετίζονται την ποιότητα και την ασφαλή κατανάλωση ενός νέου και πολλά υποσχόμενου φυτού για τους τοπικούς παραγωγούς. Πιο συγκεκριμένα, μεταβολομική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε φυτά που καλλιεργήθηκαν κάτω από ένα χαμηλό επίπεδο αλατότητας (0,3 mM NaCl: επίπεδο-μάρτυρας) συγκριτικά με ένα μεσαίο (20 mM) ή με ένα υψηλότερο (40 mM) σε κάθε εξεταζόμενο οικοτύπο ξεχωριστά, καθώς επίσης και στη μεταξύ των δύο οικοτύπων σύγκριση.

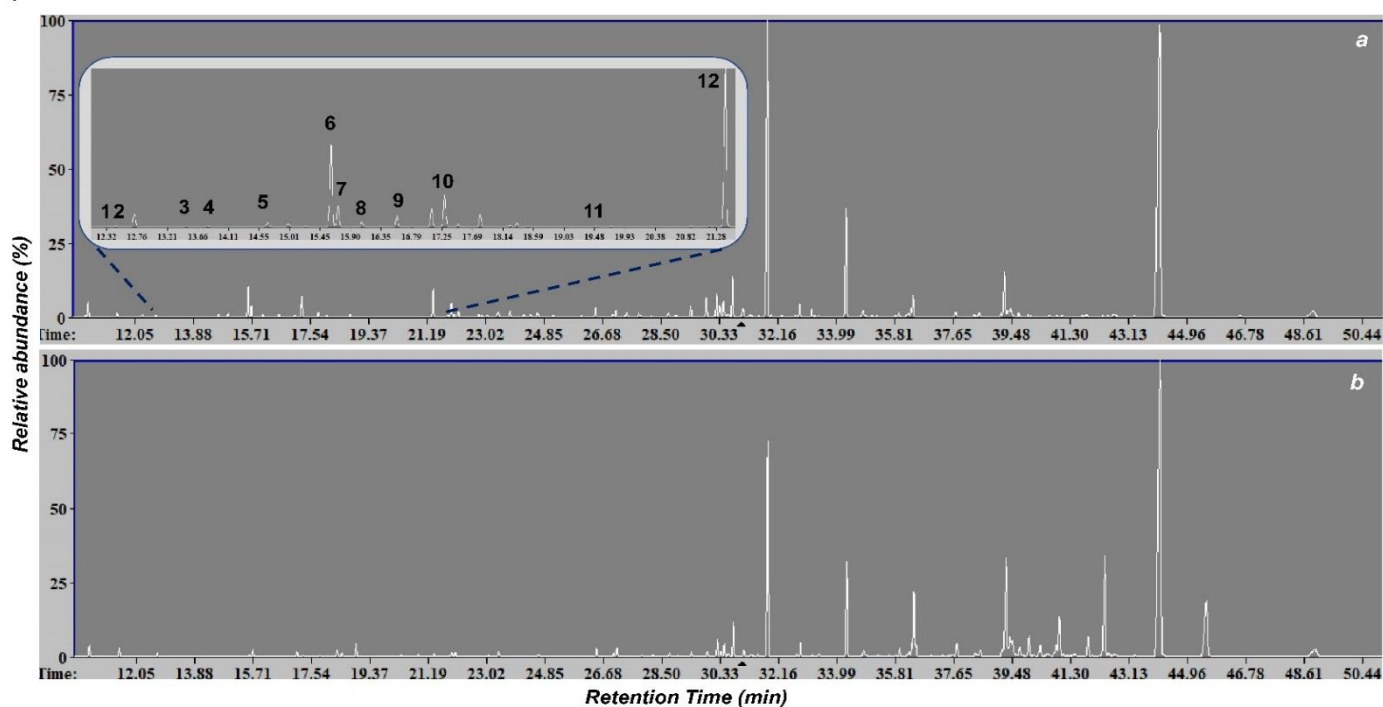
Αποτελέσματα

6.1. Γενική επισκόπηση της GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης

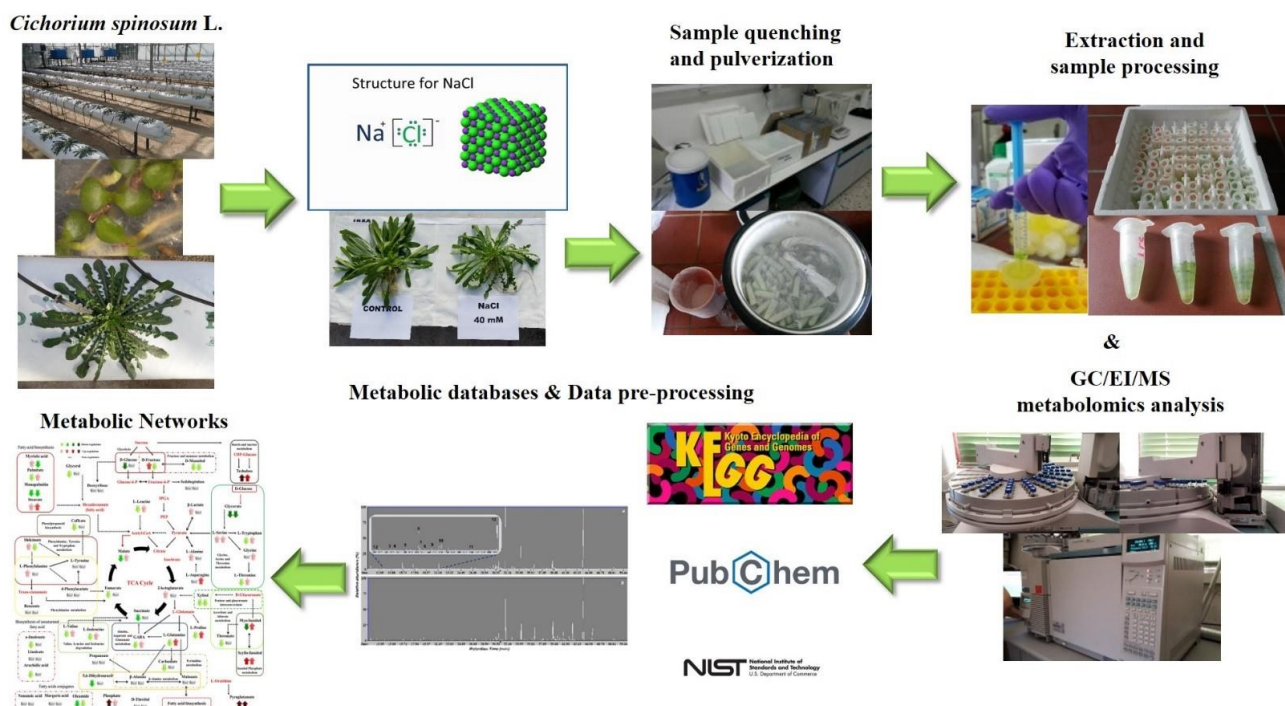
Η επεξεργασία των δεδομένων είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση συνολικά 180 μεταβολικών χαρακτήρων. Αρκετά αμινοξέα, οργανικά οξέα, καρβοξυλικά οξέα και λιπαρά οξέα αποτέλεσαν το αντικείμενο της μελέτης. Επιπρόσθετα, πληροφορίες για τους ανιχνευθέντες μεταβολίτες, αντλήθηκαν μέσω κατάλληλων βάσεων δεδομένων όπως οι ακόλουθες: KEGG, Golm Metabolome Database, και PubChem, αποκωδικοποιώντας τα βιοσυνθετικά μονοπάτια στα όποια οι μεταβολίτες λαμβάνουν μέρος, τα οποία παρέχονται μαζί με τις κατηγορίες στις οποίες ανήκουν τα δεδομένα (data set). Υπήρξε όμως κι ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών οι οποίοι δεν ταυτοποιήθηκαν.

Η ανθεκτικότητα και η υψηλή ποιότητα των πειραματικών επεμβάσεων και των βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων (Διάγραμμα 14) επαληθεύεται από την ποιότητα των ληφθέντων χρωματογραμμάτων (Διάγραμμα 13) αλλά και από τα PLS-DA score plots (Διάγραμμα 15). Επιπλέον, PLS-DA score plots δημιουργήθηκαν για τις οκτώ εξεταζόμενες συγκρίσεις (ζευγάρια) των πειραματικών επεμβάσεων που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά σταμναγκαθίου (Διάγραμμα 15). Επιπρόσθετα, για την επισκόπηση των

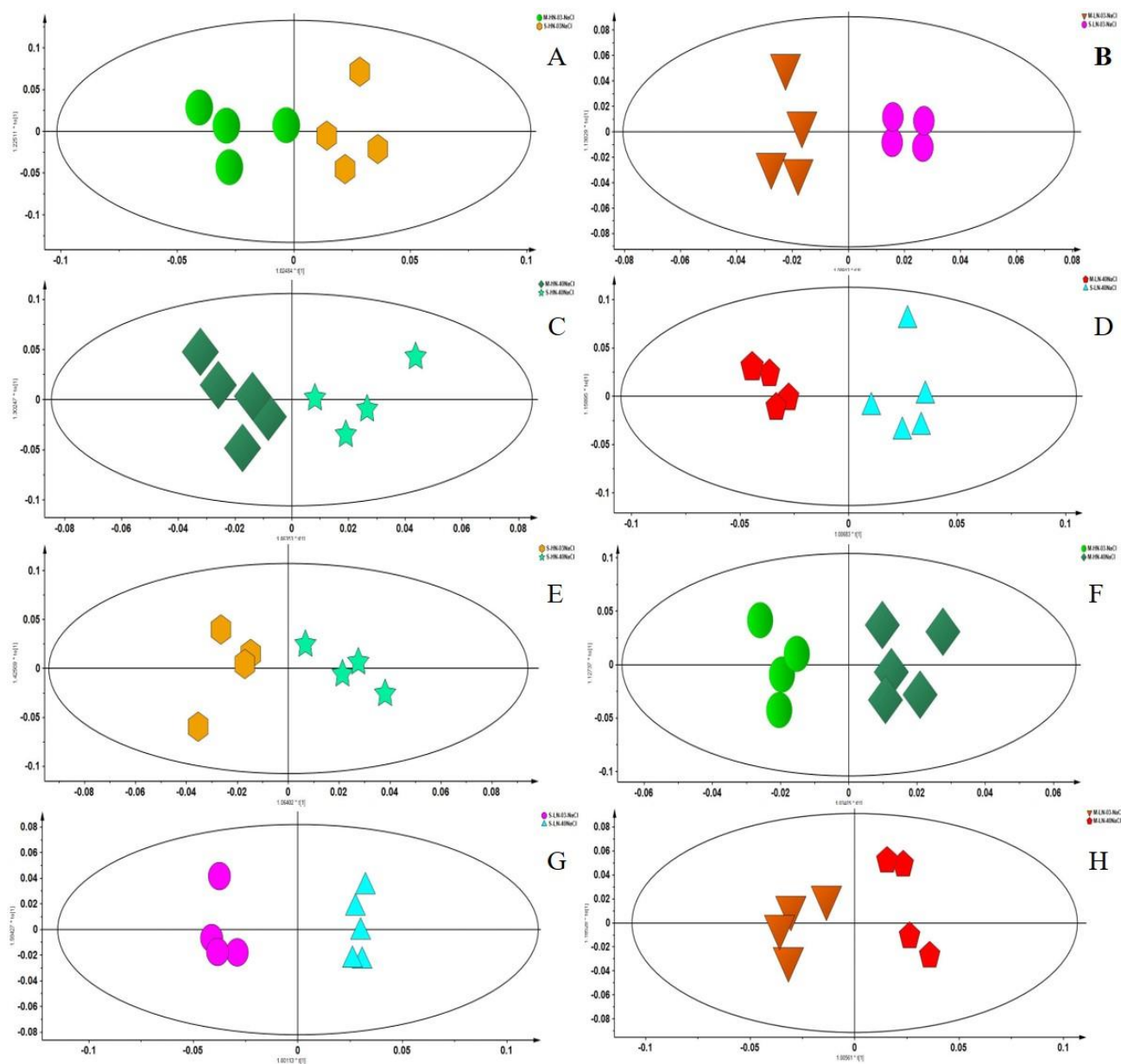
αποτελεσμάτων από τη μεταβολική ανάλυση πραγματοποιήθηκε και η πολυπαραγοντική ανάλυση (PCA) από την οποία διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν outliers (τα δεδομένα δεν συμπεριλαμβάνονται). Τα αποτελέσματα των OPLS-DA αποδεικνύουν την εμφανή διάκριση μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων στους δύο εξεταζόμενους οικότυπους σταμναγκαθίου οι οποίοι αναπτύχθηκαν σε ανοιχτό υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας κάτω από δύο διαφορετικά επίπεδα αζώτου, ένα χαμηλό στα 4 mmol L⁻¹ και ένα υψηλότερο στα 16 mmol L⁻¹, συνδυαζόμενα με τρία διαφορετικά επίπεδα αλατότητας 0,3, 20 και 40 mM αντίστοιχα (Διάγραμμα 15 A-H). Επιπρόσθετα, εξετάστηκαν σε σύγκριση μεταξύ των δύο οικότυπων (S vs M), η επίδραση είτε της χαμηλής ή υψηλής παροχής N στα 4 ή 16 mmol L⁻¹, αναφερόμενη ως Low-N και High-N, αντίστοιχα, κάτω από συνθήκες χαμηλής στα 0,3 mM αλατότητας και υψηλής στα 40 mM (Διάγραμμα 15 A-D). Τέλος, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μεταξύ των δύο διαφορετικών επιπέδων αλατότητας (0,3 vs 40) κάτω από συνθήκες φυσιολογικής παροχής N (16 mmol L⁻¹), και στους δύο οικότυπους ξεχωριστά, καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε η σύγκριση μεταξύ 0,3 vs 40 και σε συνθήκες περιορισμένης παροχής N (Low-N) για τον κάθε οικότυπο ξεχωριστά (Διάγραμμα 15 E-H). Τα αποτελέσματα από τα OPLS-DA υποδεικνύουν τον σαφή διαχωρισμό των επεμβάσεων μεταξύ των δύο οικότυπων, των δύο διαφορετικών επιπέδων N και των δύο συγκρινόμενων διαφορετικών επιπέδων αλατότητας (0,3 και 40 mM αντίστοιχα) (Διάγραμμα 15 A-H).



Διάγραμμα 13: Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα χρωματογραμμάτος GC/EI/MS του μεταβολικού προφίλ φυτών σταμναγκαθίου (*Chicorium spinosum* L.) δύο διαφορετικών οικότυπων, του ορεινού (a) και του παραθαλάσσιου (b) σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, το οποίο δείχνει σε ποιους μεταβολίτες και σε ποιο βαθμό υπερρυθμίζεται η σύνθεσή τους κάτω από συνθήκες χαμηλής παροχής N σε σύγκριση με υψηλή παροχή N (1. L-proline, 2. L-Isoleucine, 3. Malonate, 4. L-Valine, 5. β-Alanine, 6. Phosphate, 7. Glycerol, 8. L-Threonine, 9. Succinate, 11. Aspartate, 12. Malate)

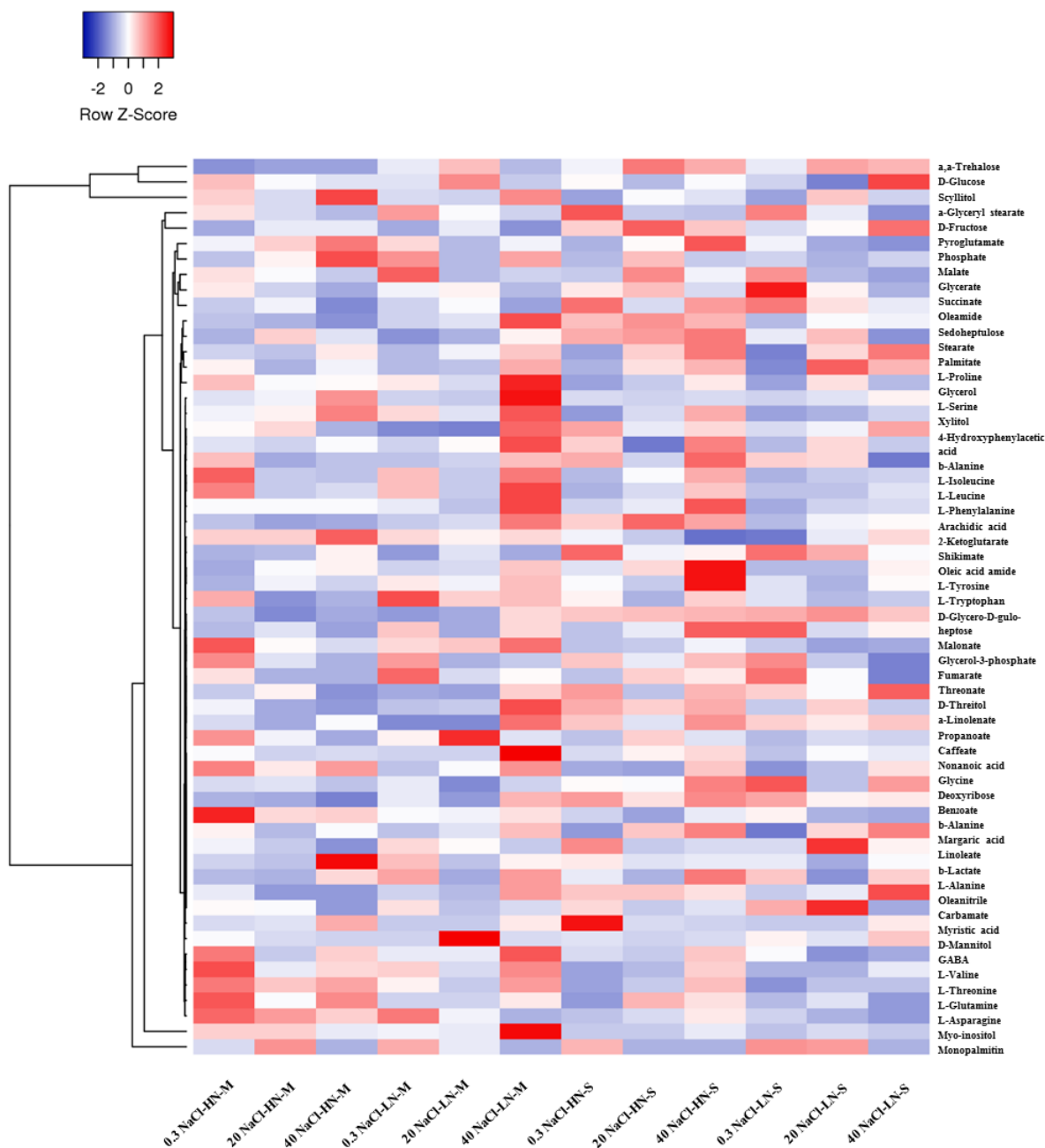


Διάγραμμα 14: Σχεδιάγραμμα για την πορεία των αναλύσεων της μεταβολομικής για τη μελέτη του αντίκτυπου δύο διαφορετικών επιπέδων παροχής N (ένα χαμηλό στα 4 mmol L^{-1} και ένα υψηλό στα 16 mmol L^{-1}) συνδυαζόμενα με τρία διαφορετικά επίπεδα αλατότητας (0,3, 20 και 40 mM αντίστοιχα) στον πρωτογενή μεταβολισμό φυτών του *Cichorium spinosum* L., με τη χρήση GC/EI/MS μεταβολομικής. Το πείραμα διεξήχθη σε μη θερμαινόμενο θερμοκήπιο σε σάκους με περλίτη ως υπόστρωμα. Στο σύνολο, υπήρχαν δώδεκα επαναλήψεις, για τον κάθε οικότυπο, ανά επέμβαση, ενώ κάθε τρεις ομογενοποιούνταν ώστε να προκύψει το τελικό δείγμα ανάλυσης. Τέσσερα συγκεντρωτικά δείγματα και ένα δείγμα μάρτυρας (quality control sample-QC) αναλύθηκαν ανά επέμβαση. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κατά τη δεύτερη συγκομιδή με το πέρας των επεμβάσεων.



Διάγραμμα 15: OPLS-DA score plot (Orthogonal partial least squares-discriminant analysis) για το καταγεγραμμένο από το GC/EI/MS μεταβολικά προφίλ του *Cichorium spinosum* (σταμναγκάθι) σε φύλλα A) σε υψηλή παροχή ολικού N στο επίπεδο μάρτυρα (0,3 mM) B) σε χαμηλή παροχή ολικού N στο επίπεδο μάρτυρα (0,3 mM), C) υψηλή παροχή ολικού N σε συνδυασμό με υψηλή αλατότητα (40 mM), D) χαμηλή παροχή ολικού N σε συνδυασμό με υψηλή αλατότητα (40 mM), E) σε υψηλή παροχή ολικού N για τα δύο εξεταζόμενα επίπεδα αλατότητας στον παραθαλάσσιο οικότυπο, F) σε υψηλή παροχή ολικού N για τα δύο εξεταζόμενα επίπεδα αλατότητας στον ορεινό οικότυπο, G) σε χαμηλή παροχή ολικού N στα δύο εξεταζόμενα επίπεδα αλατότητας στον παραθαλάσσιο οικότυπο, και H) σε χαμηλή παροχή ολικού N στα δύο εξεταζόμενα επίπεδα αλατότητας στον ορεινό οικότυπο. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T² σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Στο σύνολο, δώδεκα βιολογικές επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν ανά επέμβαση, όπου κάθε τρεις ομογενοποιούνταν ώστε να προκύψει το τελικό δείγμα ανάλυσης. Τέσσερα συγκεντρωτικά δείγματα και ένα δείγμα μάρτυρας (quality control sample-QC) αναλύθηκαν ανά επέμβαση (PC; Κύριες Συνιστώσες, principal component).

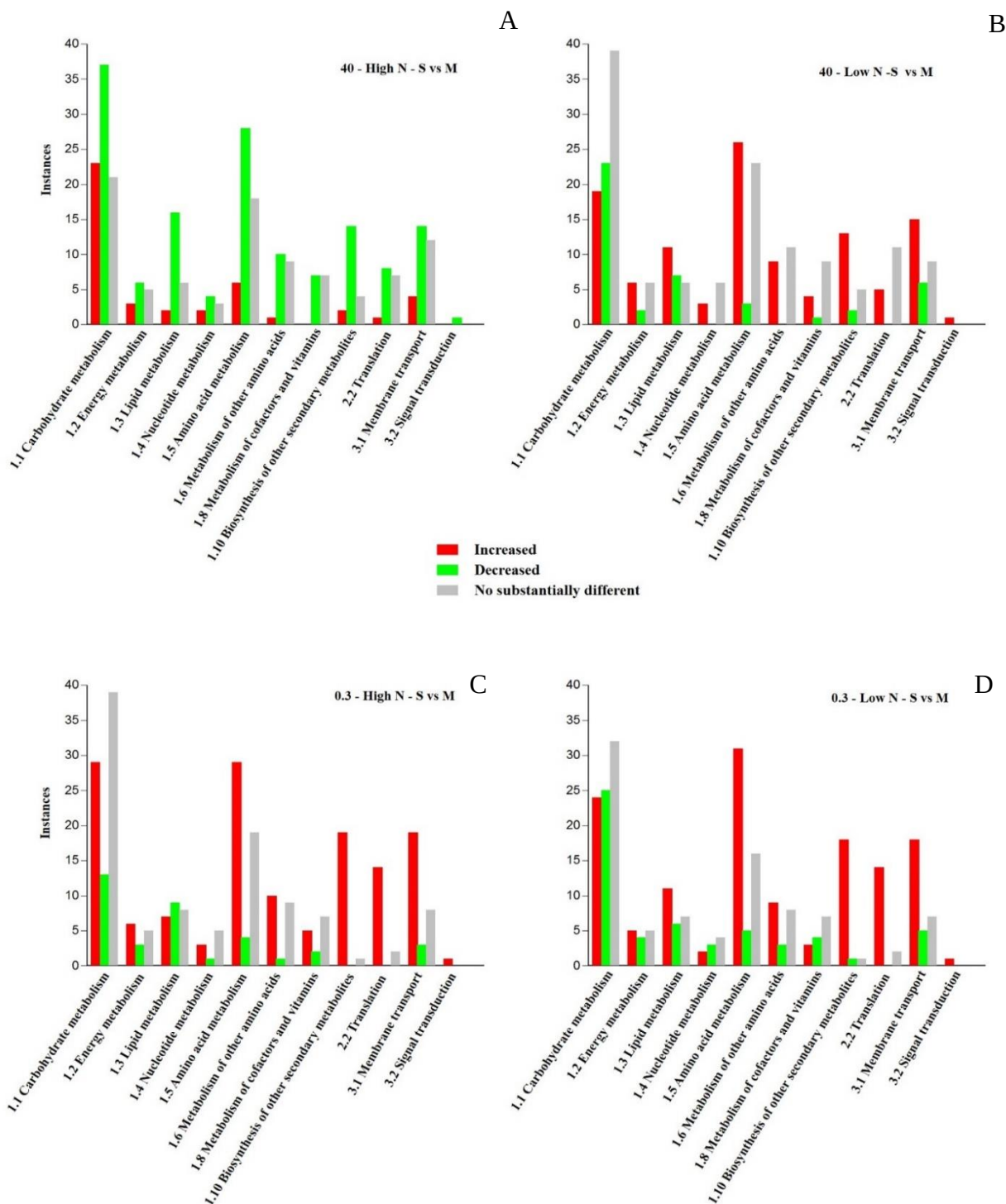
Επιπρόσθετα, η επιδράσεις των πειραματικών επεμβάσεων σε σημαντικούς πρωτογενείς μεταβολίτες στα φύλλα φυτών σταμναγκαθιού αποτυπώνονται στο παρακάτω heat map (Διάγραμμα 16). Στο σύνολο, βρέθηκαν 59 μεταβολίτες (αμινοξέα, υδατάνθρακες, καρβοξυλικά οξέα και λιπαρά οξέα), οι οποίοι επηρεάστηκαν με διαφορετικό τρόπο από τις εξεταζόμενες επεμβάσεις και συμπεριλαμβάνονται στο παρακάτω heat map.



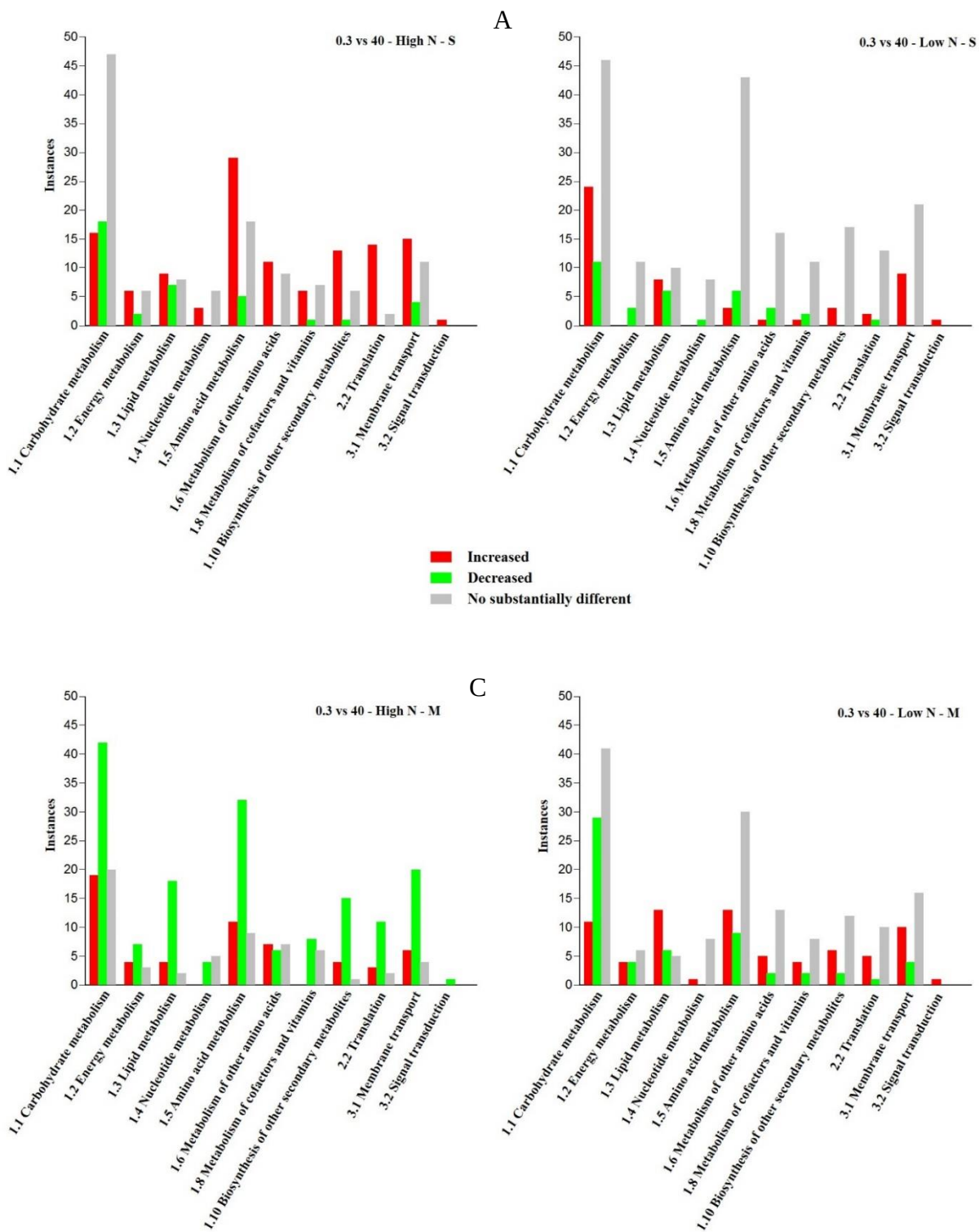
Διάγραμμα 16: Heat map για την επισκόπηση των διακυμάνσεων στους καταγεγραμμένους από την GC/EI/MS μεταβολική ανάλυση σε φυτά *Cichorium spinosum* L. Δώδεκα επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο και για τους δύο οικότυπους, με δύο διαφορετικά επίπεδα παροχής ολικού N στο θρεπτικό διάλυμα, ένα χαμηλό στα 4 mM και ένα υψηλό στα 16 mM, συνδυαζόμενα με τρία διαφορετικά επίπεδα αλατότητας, 0,3, 20 και 40 mM, αντίστοιχα. Τα κόκκινα τετράγωνα αντιστοιχούν στους μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα, ενώ τα μπλε τετράγωνα σε αυτούς που ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα από τις εξεταζόμενες επεμβάσεις. Το Heatmapper software (Babicki et al., 2016) χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του heat map. Κάθε τετράγωνο στο Heatmap αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο των 4 επαναλήψεων.

Από τη μία η πολυπαραγοντική ανάλυση, και από την άλλη το heatmap το οποίο δημιουργήθηκε δείχνουν τις παρατηρούμενες διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν στους εξεταζόμενους οικότυπους όσον αφορά τις επεμβάσεις που δέχθηκαν. Όπως φαίνεται και στο θερμικό χάρτη, η χαμηλή παροχή αζώτου (4 mM) συνδυαζόμενη με υψηλή αλατότητα (40 mM) είχε σαν αποτέλεσμα έναν ισχυρό διαχωρισμό μεταξύ των σημαντικών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στην περίπτωση του ορεινού οικότυπου, ενώ για τον παραθαλάσσιο οικότυπο, αυτό παρατηρήθηκε στα φυτά που τροφοδοτούνταν με μια φυσιολογική παροχή N (16 mmol L⁻¹). Στην περίπτωση των διαφορετικών επιπέδων αλατότητας, είναι ενδεικτικό το στοιχείο ότι τα χαμηλότερα επίπεδα (0,3 και 20 mM NaCl) παρουσίασαν μια μικρότερης ισχύος διαφοροποίηση στους περισσότερους πρωτογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν συγκριτικά με το υψηλότερο επίπεδο (40 mM NaCl). Επιπλέον, όπως ήδη περιγράφεται παραπάνω τα αποτελέσματα βασίζονται στις διακυμάνσεις που παρατηρούνται στους μεταβολίτες οι οποίοι συμμετέχουν σε σημαντικές μεταβολικές λειτουργίες (Aliferis et al., 2014; Kostopoulou et al., 2020) (Διάγραμμα 17 και 18). Παράλληλα, η συγκεκριμένη προσέγγιση έχει ως σκοπό να παρέχει μια υψίστης σημασίας βιολογική ερμηνεία της επικείμενης ανταπόκρισής των φυτών στις διάφορες επεμβάσεις καθώς επίσης να δώσει και μια πιο σφαιρική εικόνα του αντίκτυπου των επεμβάσεων στις φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού. Η επίδραση των επεμβάσεων στον μεταβολισμό του σταμναγκαθίου βασίστηκε επίσης στις διακυμάνσεις που αφορούσαν τους πρωτογενείς μεταβολίτες οι οποίοι ομαδοποιήθηκαν ανά κατηγορία (chemical groups) (Διάγραμμα 19 και 20).

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 17, τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι ο μεταβολισμός στα φυτά που προέρχονται από τον ορεινό οικότυπο, κάτω από συνθήκες υψηλής παροχής N και υψηλής αλατότητας, παρουσίασαν μια ευρύτερη διαφοροποίηση, καθώς καταγράφηκε σημαντική μείωση των επιπέδων σε μεταβολίτες που εμπλέκονται σε φυσιολογικές λειτουργίες και ανήκουν στις κατηγορίες των υδατανθράκων, της ενέργειας και του μεταβολισμού των λιπιδίων, ενώ παρουσίασαν μια εντελώς διαφορετική ανταπόκριση κάτω από συνθήκες ελλειπούς N. Τα αποτελέσματα εξίσου αποδεικνύουν ότι ο ορεινός οικότυπος κάτω από συνθήκες φυσιολογικής παροχής N και υψηλού επιπέδου αλατότητας (40 mM), παρουσίασε μια γενικότερη μείωση των επιπέδων των μεταβολιτών σε σύγκριση με τον παραθαλάσσιο οικότυπο. Από την άλλη πλευρά, ένας μεγάλος αριθμός πρωτογενών μεταβολιτών οι οποίοι εμπλέκονται σε αρκετές μεταβολικές διεργασίες ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα ή ακόμα δεν παρουσίασαν κάποια αξιολογη μεταβολή των επιπέδων τους στα παραθαλάσσιου οικότυπου σταμναγκάθια (Διάγραμμα 18).



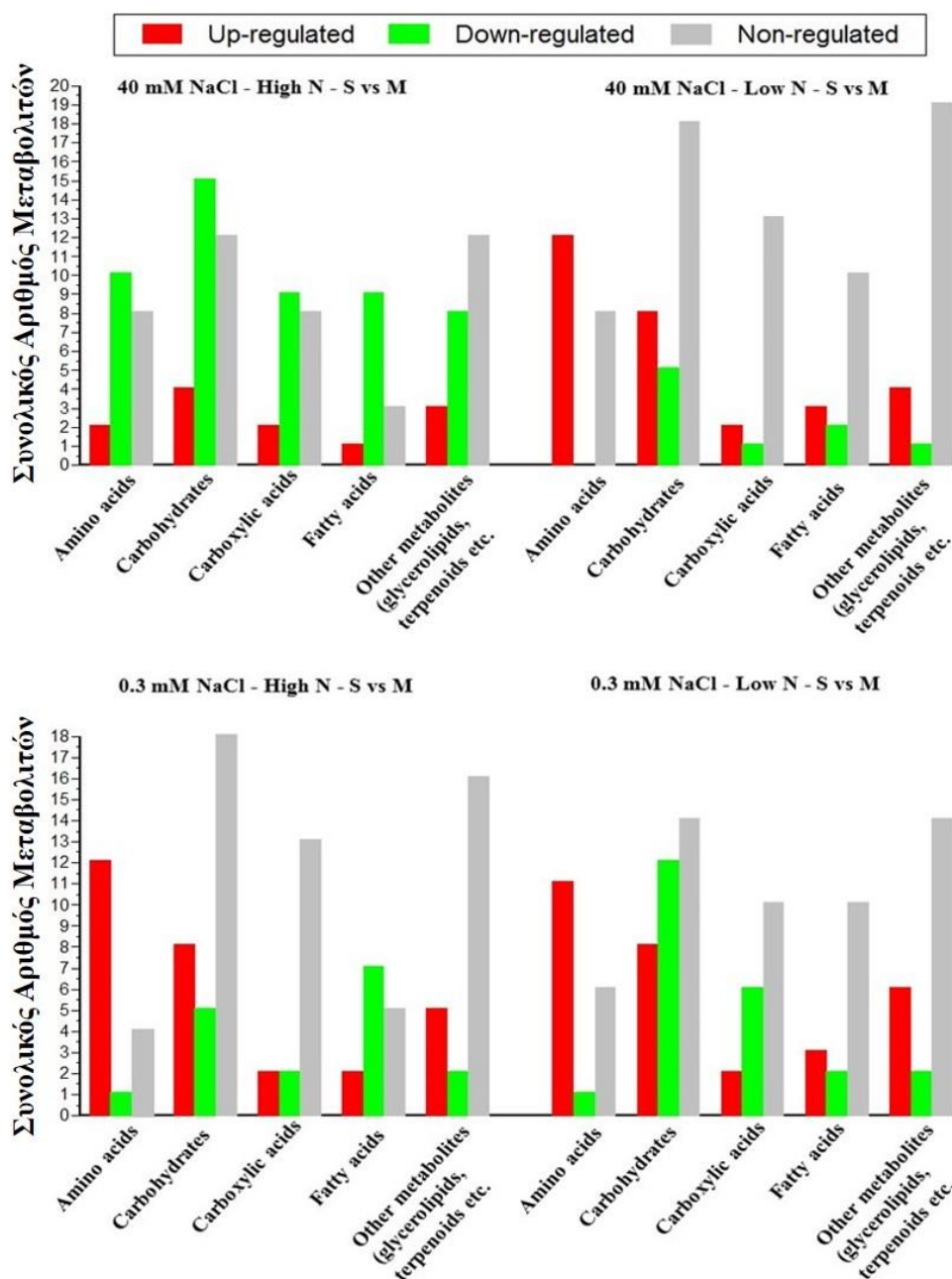
Διάγραμμα 17: Διακυμάνσεις των μεταβολικών λειτουργιών του σταμναγκαθίου ύστερα από επεμβάσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις ολικού N (4 ή 16 mmol L⁻¹), εκφρασμένα ως χαμηλό (Low-N) και υψηλό (High-N) N, αντίστοιχα) μεταξύ δύο διαφορετικών οικότυπων σταμναγκαθίου (Παραθαλάσσιος vs Ορεινός) οι οποίο αναπτύσσονταν κάτω από συνθήκες χαμηλού ολικού N στα 4 mmol L⁻¹ και υψηλής αλατότητας στα 40 mM (A & B) και στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα στο επίπεδο-μάρτυρα (0,3-non saline) (C & D). Ο άξονας του Y αντιστοιχεί στα instances, καθώς κάθε μεταβολίτης μπορεί να εμπλέκεται σε περισσότερα του ενός μεταβολικά μονοπάτια. Η πρώτη μπάρα (κόκκινο χρώμα) αντιστοιχεί στους μεταβολίτες στους οποίους οι συγκεντρώσεις αυξήθηκαν ανταποκρινόμενοι στις επεμβάσεις, η δεύτερη μπάρα (πράσινο χρώμα) σε αυτούς που σημείωσαν μείωση, και η τρίτη μπάρα (γκρι χρώμα) όσοι δεν ακολούθησαν κάποια αξιόλογη μεταβολή. Ακολουθήθηκε το σύστημα κωδικοποίησης των κατηγοριών της KEGG. 112



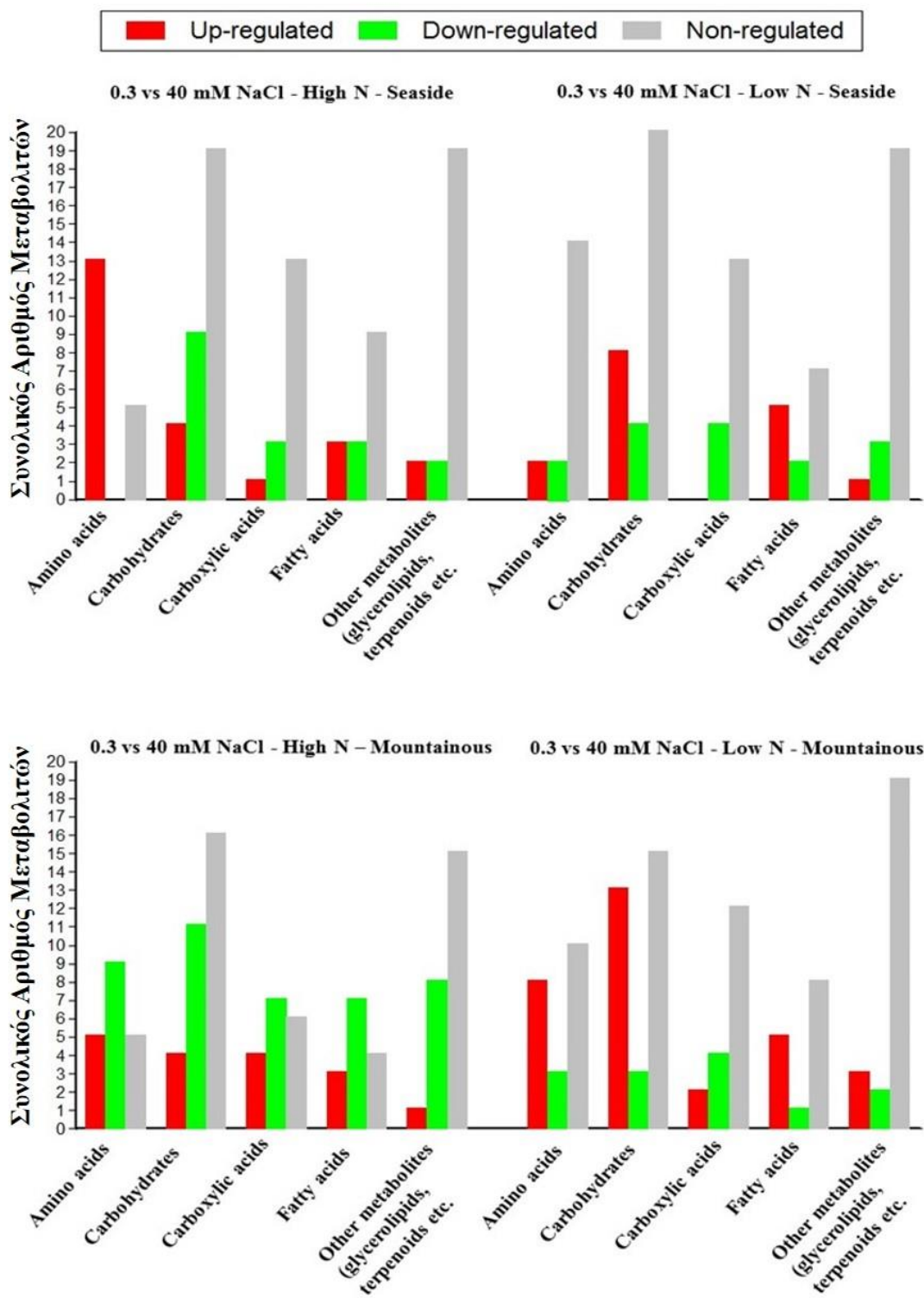
Διάγραμμα 18: Διακυμάνσεις των μεταβολικών λειτουργιών του σταμιναγκαθίου ύστερα από επεμβάσεις με δύο διαφορετικά επίπεδα αλατότητα (0,3 vs 40), σε κάθε οικοτύπο ξεχωριστά, στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα σε φυτά σταμιναγκαθίου μεγαλωμένα σε σάκους περλίτη, σε υψηλό N στον παραθαλάσσιο οικοτύπο (A), σε χαμηλό N στον παραθαλάσσιο οικοτύπο (B), σε υψηλό N στον ορεινό οικοτύπο (C) και σε χαμηλό N στον ορεινό οικοτύπο (D). Ο άξονας του Y αντιστοιχεί στα instances, καθώς κάθε μεταβολίτης μπορεί να εμπλέκεται σε περισσότερα του ενός μεταβολικά μονοπάτια. Η πρώτη μπάρα (κόκκινο χρώμα) αντιστοιχεί στους μεταβολίτες στους οποίους οι συγκεντρώσεις αυξήθηκαν ανταποκρινόμενοι στις επεμβάσεις, η δεύτερη μπάρα (πράσινο χρώμα) σε αυτούς που σημείωσαν μείωση, και η τρίτη μπάρα (γκρι χρώμα) όσοι δεν ακολούθησαν κάποια αξιολογη μεταβολή. Ακολουθήθηκε το σύστημα κωδικοποίησης των κατηγοριών της KEGG.

Τα επίπεδα των περισσότερων μεταβολιτών που ανήκουν στην κατηγορία των αμινοξέων, υδατανθράκων, καρβοξυλικών οξέων καθώς επίσης και των λιπαρών οξέων ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα στον ορεινό οικότυπο συγκριτικά με τα φυτά που προέρχονται από την παραθαλάσσια τοποθεσία (Διάγραμμα 19). Από την άλλη πλευρά, το επίπεδο του χαμηλού παρεχόμενου N, δεν επηρέασε σε ουσιαστικό βαθμό τη βιοσύνθεση των υδατανθράκων, καρβοξυλικών οξέων, λιπαρών οξέων, και σε μικρότερο βαθμό τα επίπεδα των αμινοξέων, καθώς οι υψηλής σημαντικότητας μεταβολίτες που ανήκουν σε αυτές τις κατηγορίες δεν επηρεάστηκαν (Διάγραμμα 19). Επιπλέον, στην υψηλή συγκέντρωση αλάτων, ο ορεινός οικότυπος συγκρινόμενος με τον παραθαλάσσιο, έδειξε ότι στην περίπτωση της υψηλής παροχής N στο θρεπτικό διάλυμα όλες οι κατηγορίες (αμινοξέα, υδατάνθρακες, καρβοξυλικά οξέα και λιπαρά οξέα) εμφάνισαν υπό-έκφραση (down-regulation) στα επίπεδά τους, εν αντιθέσει με την χαμηλή παροχή όπου παρέμειναν σταθερές (non-regulation) με μοναδική εξαίρεση αυτή των αμινοξέων όπου και παρουσίασαν αύξηση (Διάγραμμα 19). Ένα επίσης ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι στις σύγκρισεις που πραγματοποιήθηκαν για τον κάθε οικότυπο ξεχωριστά μεταξύ της χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, στον παραθαλάσσιο οικότυπο όλες οι κατηγορίες παρέμειναν σταθερές, με εξαίρεση πάλι αυτή των αμινοξέων στην υψηλή παροχή N, ενώ αυτές του ορεινού οικότυπου ακολούθησαν μείωση με αρκετούς όμως μεταβολίτες της κατηγορίας των υδατανθράκων να μένουν αμετάβλητοι (Διάγραμμα 20). Τέλος, στη χαμηλή παροχή N, τόσο ο παραθαλάσσιος όσο και ο ορεινός οικότυπος διατήρησαν σταθερά τα επίπεδά τους σε όλες τις εξεταζόμενες κατηγορίες (αμινοξέα, υδατάνθρακες, καρβοξυλικά οξέα, λιπαρά οξέα και λοιποί μεταβολίτες) με τον ορεινό οικότυπο να παρουσιάζει αύξηση μόνο στην κατηγορία των αμινοξέων (Διαγραμμα 20).

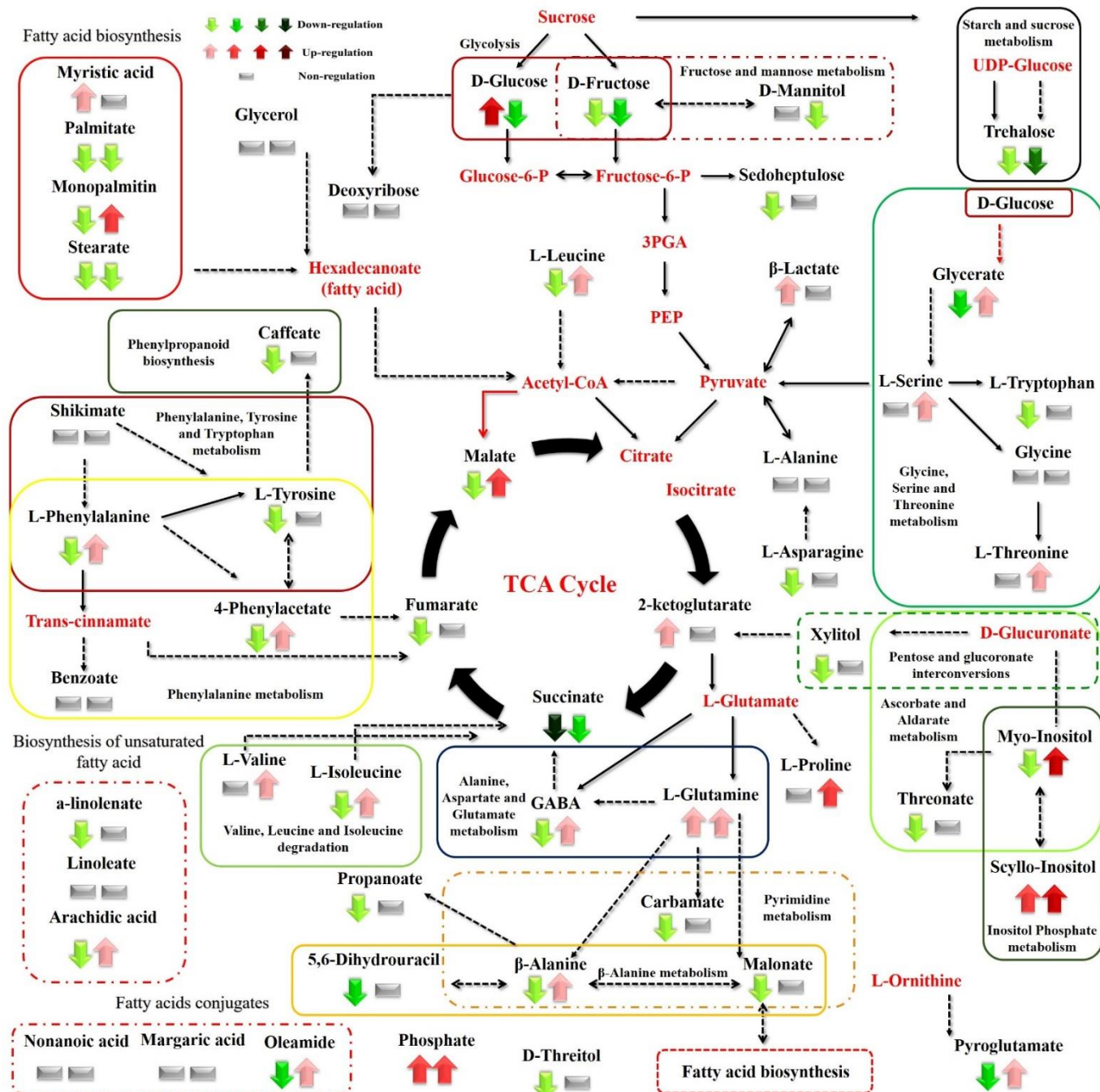
Ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών στο φυτό του σταμναγκαθιού που ανιχνεύθηκαν από την ανάλυση με GC/EI/MS, συμμετέχουν σε περισσότερα του ενός μεταβολικά μονοπάτια. Η συντριπτική πλειοψηφία των μεταβολιτών αυτών ανήκει στην κατηγορία των αμινοξέων, υδατανθράκων, καρβοξυλικών οξέων και λιπαρών οξέων (Διάγραμμα 17-20). Για τη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων, και με απώτερο σκοπό να αποκτηθούν γνώσεις πάνω στη ρύθμιση του μεταβολισμού των φυτών όταν αυτά δέχονται μια πληθώρα από πειραματικές επεμβάσεις, *de novo* μεταβολικά δίκτυα δημιουργήθηκαν για τους επιλεγμένους μεταβολίτες αποκτώντας (ή αντλώντας) πληροφορίες από βάσεις δεδομένων όπως αυτή της KEGG (<https://www.kegg.jp/>). Τα φυτά όπου δέχθηκαν τις επεμβάσεις παρουσίασαν μια γενικότερη επιρροή (ή διαταραχή) στον μεταβολισμό τους, καθώς αρκετοί μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν στις κατηγορίες των αμινοξέων, υδατανθράκων λιπαρών οξέων αλλά ειδικότερα αυτοί που ανήκουν στα καρβοξυλικά οξέα ανιχνεύθηκαν είτε σε υψηλότερα είτε δεν παρουσίασαν κάποια αξιόλογη μεταβολή στα επίπεδά τους στα φυτά σταμναγκαθιού του παραθαλάσσιου οικότυπου συγκριτικά με αυτά με προέλευση από τα ορεινά της Κρήτης.



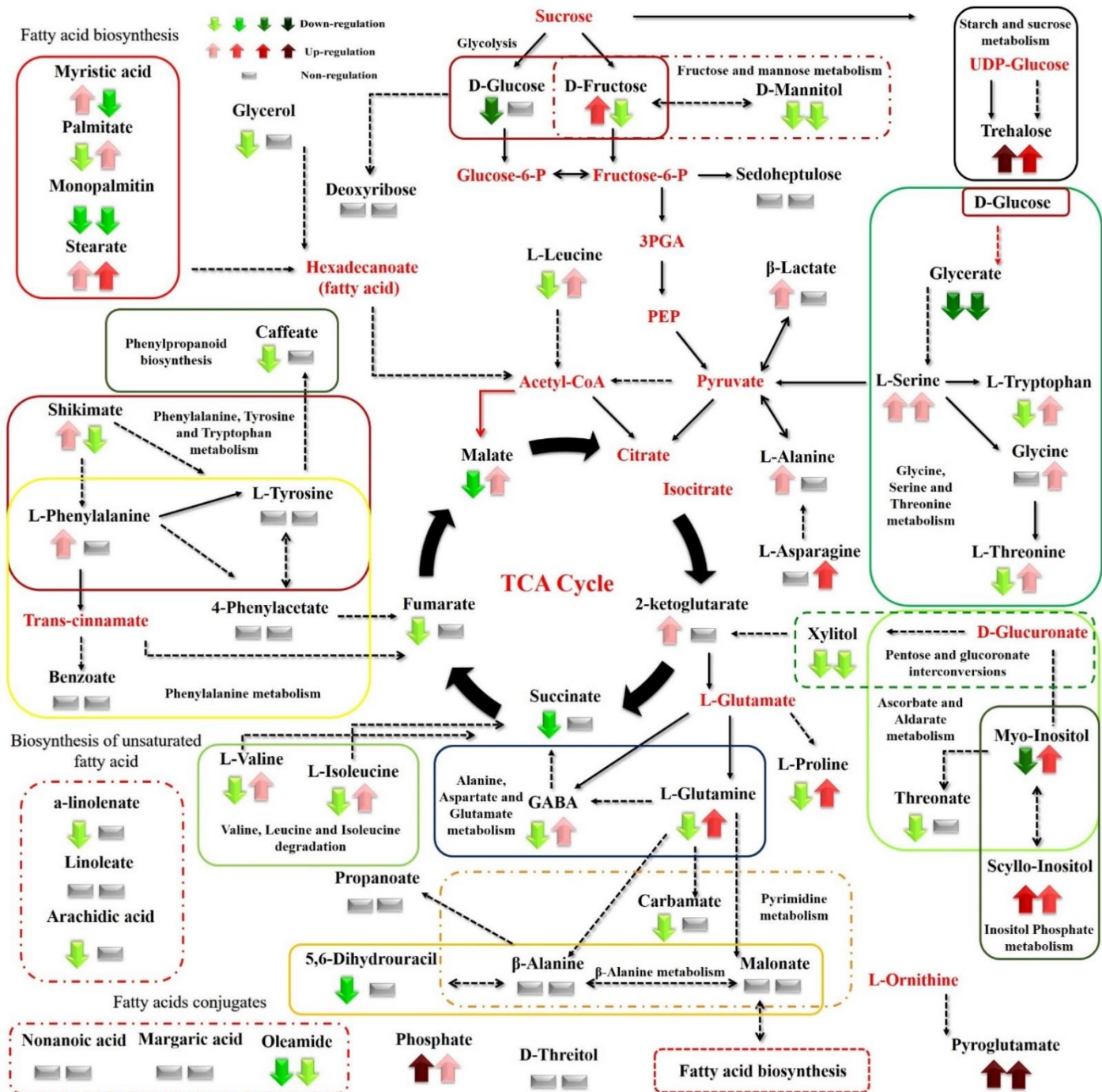
Διάγραμμα 19: Διακυμάνσεις στη μεταβολική σύνθεση (chemical groups) φυτών σταμναγκαθίου ύστερα από επεμβάσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις ολικού N (4 ή 16 mmol L⁻¹), εκφρασμένα ως χαμηλό (Low-N) και υψηλό (High-N) N, αντίστοιχα) μεταξύ δύο διαφορετικών οικότυπων σταμναγκαθίου (Παραθαλάσσιος vs Ορεινός) οι οποίο αναπτύσσονταν κάτω από συνθήκες χαμηλού ολικού N στα 4 mmol L⁻¹ και υψηλής αλατότητας στα 40 mM (A & B) και στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα στο επίπεδο-μάρτυρα (0,3-non saline) (C & D). Ο άξονας του Y αντιστοιχεί στον συνολικό αριθμό των μεταβολιτών. Η πρώτη μπάρα (κόκκινο χρώμα) αντιστοιχεί στους μεταβολίτες στους οποίους οι συγκεντρώσεις αυξήθηκαν ανταποκρινόμενοι στις επεμβάσεις, η δεύτερη μπάρα (πράσινο χρώμα) σε αυτούς που σημείωσαν μείωση, και η τρίτη μπάρα (γκρι χρώμα) όσοι δεν ακολούθησαν κάποια αξιόλογη μεταβολή. Ακολουθήθηκε το σύστημα κωδικοποίησης των κατηγοριών της KEGG.



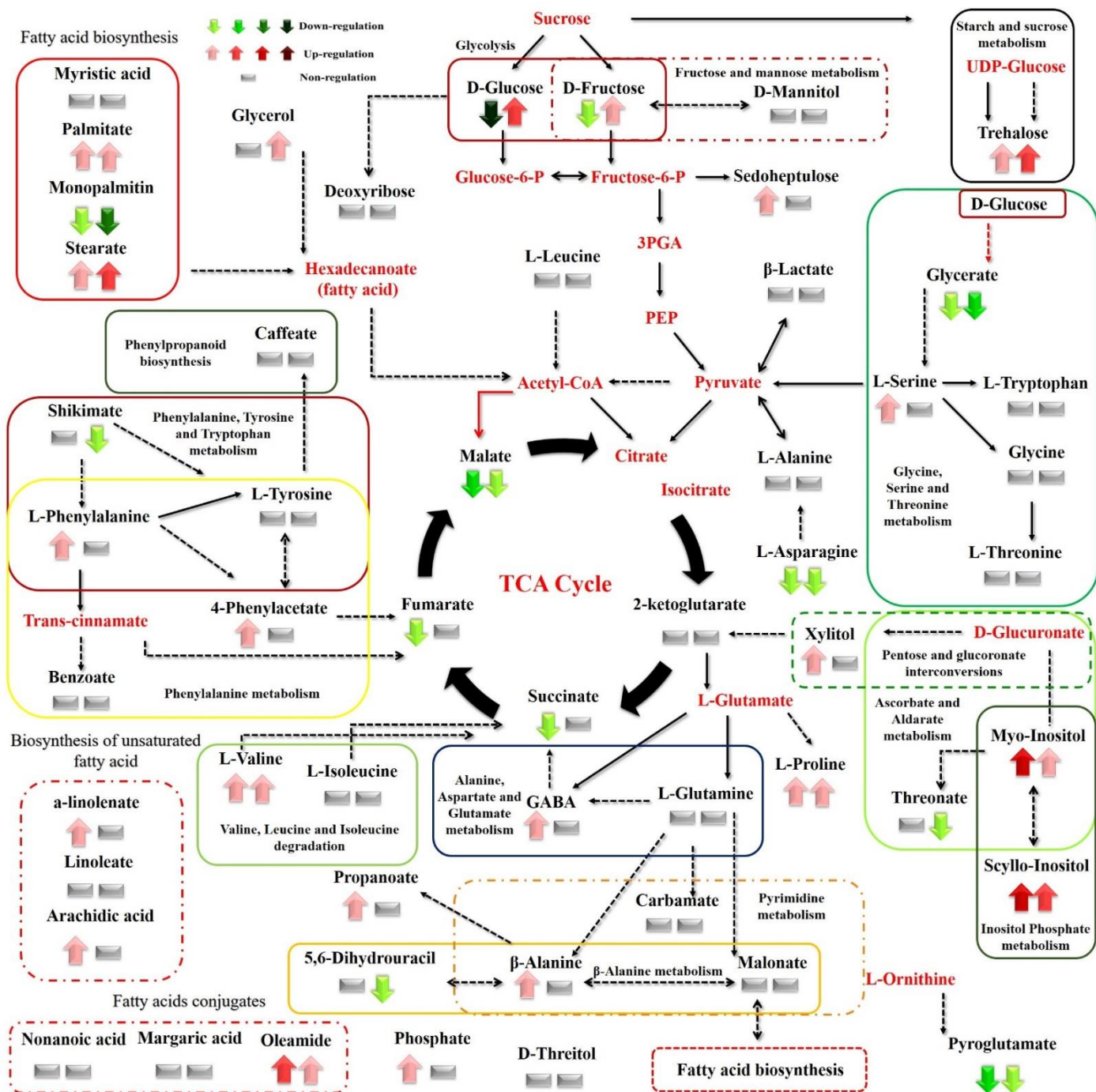
Διάγραμμα 20: Διακυμάνσεις στη μεταβολική σύνθεση φυτών σταμναγκαθίου (chemical groups) ύστερα από επεμβάσεις με δύο διαφορετικά επίπεδα αλατότητα (0,3 vs 40), σε κάθε οικότυπο ξεχωριστά, στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα σε φυτά σταμναγκαθίου μεγαλωμένα σε σάκους περλίτη, σε υψηλό N στον παραθαλάσσιο οικότυπο (A), σε χαμηλό N στον παραθαλάσσιο οικότυπο (B), σε υψηλό N στον ορεινό οικότυπο (C) και σε χαμηλό N στον ορεινό οικότυπο (D). Ο άξονας του Y αντιστοιχεί στον συνολικό αριθμό των μεταβολιτών. Η πρώτη μπάρα (κόκκινο χρώμα) αντιστοιχεί στους μεταβολίτες στους οποίους οι συγκεντρώσεις αυξήθηκαν ανταποκρινόμενοι στις επεμβάσεις, η δεύτερη μπάρα (πράσινο χρώμα) σε αυτούς που σημείωσαν μείωση, και η τρίτη μπάρα (γκρι χρώμα) όσοι δεν ακολούθησαν κάποια αξιόλογη μεταβολή. Ακολουθήθηκε το σύστημα κωδικοποίησης των κατηγοριών της KEGG.



Διάγραμμα 22: Διακύμανση των επιπέδων των μεταβολιτών του *Cichorium spinosum* μεταξύ του παραθαλάσσιου και ορεινού οικότυπου (, seaside (S) και montane (, (M) (πρώτο βελάκι κάτω από το όνομα του μεταβολίτη)) οι οποίοι αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες φυσιολογικής παροχής N και στο υψηλό επίπεδο αλατότητας (40 mM), καλλιεργούμενα σε σάκους περλίτη. Επίσης, εξετάστηκε αντίκτυπος της ελλιπούς παροχής ολικού N στη σύγκριση μεταξύ των δύο διαφορετικών οικότυπων (Παραθαλάσσιος vs Ορεινός) στο υψηλό επίπεδο αλατότητας (40 mM), ως προς τη μεταβολική του ανταπόκριση (δεξί βελάκι κάτω από τους μεταβολίτες). Οι μεταβολίτες με τα έντονα κόκκινα γράμματα δεν ανιχνευθήκαν στα φυτά σταμναγκαθίου. Τα βελάκια κόκκινου χρώματος, η διακύμανση χρώματος ανάλογα με το coefficient (data στο excel), αναφέρονται στους μεταβολίτες οι οποίοι παρουσίασαν αύξηση της σύνθεσής τους στον ορεινό οικότυπο (S vs M) σε φυτά που αναπτύχθηκαν είτε σε φυσιολογικές συνθήκες παροχής N είτε σε συνθήκες ελλιπούς παροχής N και υψηλής αλατότητας, ενώ με πράσινο χρώμα είναι όσοι παρουσίασαν μείωση. Με γκρι χρώμα αντιστοιχούν όσοι μεταβολίτες δεν παρουσίασαν κάποια αξιόλογη μεταβολή. Η ανάλυση των δεδομένων βασίστηκε από τη βάση δεδομένων της KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg>). Τα σταθερά βέλη αναφέρονται στην απευθείας σύνδεση των μεταβολιτών στα βιοσυνθετικά μονοπάτια, ενώ τα διακοπτόμενα βέλη τη μεσολάβηση περισσότερων του ενός μεταβολιτών.



Διάγραμμα 23: Διακύμανση των επιπέδων των μεταβολιτών του *Cichorium spinosum* μεταξύ των δύο διαφορετικών επιπέδων αλατότητας (0,3 vs 40) σε κάθε εξεταζόμενο οικότυπο ξεχωριστά (πρώτο βελάκι κάτω από το όνομα του μεταβολίτη) οι οποίοι αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες φυσιολογικής παροχής N σε φυτά καλλιεργούμενα σε σάκουσ περλίτη. Απεικονίζεται ο αντίκτυπος της αλατότητας στον ορεινό οικότυπο (αριστερά βελάκι κάτω από τους μεταβολίτες) ως προς τη μεταβολική του ανταπόκριση καθώς επίσης και του παραθαλάσσιου οικότυπου (δεξί βελάκι κάτω από τους μεταβολίτες). Οι μεταβολίτες με τα έντονα κόκκινα γράμματα δεν ανιχνεύθηκαν στα φυτά σταμναγκαθιού. Τα βελάκια κόκκινου χρώματος, η διακύμανση χρώματος ανάλογα με το coefficient (data στο excel), αναφέρονται στους μεταβολίτες οι οποίοι παρουσίασαν αύξηση της σύνθεσής τους στον ορεινό οικότυπο (S vs M) σε φυτά που αναπτύχθηκαν είτε σε φυσιολογικές συνθήκες παροχής N είτε σε συνθήκες ελλιπούς παροχής N, ενώ με πράσινο χρώμα είναι όσοι παρουσίασαν μείωση. Με γκρι χρώμα αντιστοιχούν όσοι μεταβολίτες δεν παρουσίασαν κάποια αξιόλογη μεταβολή. Η ανάλυση των δεδομένων βασίστηκε από τη βάση δεδομένων της KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg>). Τα σταθερά βέλη αναφέρονται στην απευθείας σύνδεση των μεταβολιτών στα βιοσυνθετικά μονοπάτια, ενώ τα διακοπτόμενα βέλη τη μεσολάβηση περισσότερων του ενός μεταβολιτών.



Διάγραμμα 24: Διακύμανση των επιπέδων των μεταβολιτών του *Cichorium spinosum* μεταξύ των δύο διαφορετικών επιπέδων αλατότητας (0,3 vs 40) σε κάθε εξεταζόμενο οικότυπο ξεχωριστά (πρώτο βελάκι κάτω από το όνομα του μεταβολίτη) οι οποίοι αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες ελλιπούς παροχής N σε φυτά καλλιεργούμενα σε σάκους περλίτη. Απεικονίζεται ο αντίκτυπος της αλατότητας στον ορεινό οικότυπο (αριστερά βελάκι κάτω από τους μεταβολίτες) ως προς τη μεταβολική του ανταπόκριση καθώς επίσης και του παραθαλάσσιου οικότυπου (δεξιά βελάκι κάτω από τους μεταβολίτες). Οι μεταβολίτες με τα έντονα κόκκινα γράμματα δεν ανιχνεύθηκαν στα φυτά σταμναγκαθιού. Τα βελάκια κόκκινου χρώματος, η διακύμανση χρώματος ανάλογα με το coefficient (data στο excel), αναφέρονται στους μεταβολίτες οι οποίοι παρουσίασαν αύξηση της σύνθεσής τους στον ορεινό οικότυπο (S vs M) σε φυτά που αναπτύχθηκαν είτε σε φυσιολογικές συνθήκες παροχής N είτε σε συνθήκες ελλιπούς παροχής N, ενώ με πράσινο χρώμα είναι όσοι παρουσίασαν μείωση. Με γκρι χρώμα αντιστοιχούν όσοι μεταβολίτες δεν παρουσίασαν κάποια αξιόλογη μεταβολή. Η ανάλυση των δεδομένων βασίστηκε από τη βάση δεδομένων της KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg>). Τα σταθερά βέλη αναφέρονται στην απευθείας σύνδεση των μεταβολιτών στα βιοσυνθετικά μονοπάτια, ενώ τα διακοπτόμενα βέλη τη μεσολάβηση περισσότερων του ενός μεταβολιτών.

6.2. Επίδραση του επιπέδου παροχής και των διαφορετικών επιπέδων αλατότητας στον μεταβολισμό των αμινοξέων σε φυτά σταμναγκαθιού

Τόσο το επίπεδο ολικού N όσο και τα διαφορετικά επίπεδα αλατότητας τα οποία εξετάστηκαν είχαν σημαντικό αντίκτυπο στη βιοσύνθεση των αμινοξέων. Πιο συγκεκριμένα, η προλίνη (Pro), ένας από τους πιο σημαντικούς ωσμωλύτες παρατηρήθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα στον ορεινό οικότυπο κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας συγκριτικά με την επέμβαση-μάρτυρα (non saline-0,3 mM). Από την άλλη πλευρά, αύξηση του επιπέδου της αλατότητας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της Pro στον παραθαλάσσιο οικότυπο (Διάγραμμα 23). Επιπλέον, στη χαμηλή παροχή N συνδυαζόμενη με την υψηλή αλατότητα, η Pro παρουσίασε μια μικρή αύξηση, και στους δύο εξεταζόμενους οικότυπους (Διάγραμμα 24). Παρόλο αυτά, και στις δύο συγκρίσεις μεταξύ των οικότυπων, με μοναδική εξαίρεση την επέμβαση με φυσιολογική παροχή N στα 16 mM συνδυαζόμενο με υψηλή αλατότητα (40 mM), η Pro ακολούθησε αυξητική τάση και μάλιστα σε σημαντικό βαθμό (Διάγραμμα 21 και 22). Αντίθετα, με την Pro, τα επίπεδα των αμινοξέων όπως η φαινυλαλανίνη (Phe), τυροσίνη (Tyr), λευκίνη (Leu), τρυπτοφάνη (Trp), βαλίνη (Val), ισολευκίνη (Ile), θρεονίνη (Thr), γλουταμίνη (Gln), γλυκίνη (Gly) και αλανίνη (Ala), είτε δεν παρουσίασαν κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή από την εφαρμογή της διπλής καταπόνησης είτε επηρεάστηκαν αλλά σε μικρότερο βαθμό (Διάγραμμα 23). Επιπρόσθετα, τα περισσότερα από τα ανιχνευθέντα αμινοξέα εμφάνισαν μια σημαντική διαφοροποίηση σε συνθήκες καταπόνησης σε σύγκριση με μη καταπόνηση (Διαγράμματα 21, 22 και 23). Το μη πρωτεϊνικό αμινοξύ, γ-αμινοβουτυρικό οξύ (γ-aminobutyric acid ή GABA), αυξήθηκε στα φυτά τα οποία προέρχονται από παραθαλάσσια περιοχή της Κρήτης, ενώ το αντίθετο συνέβη στην περίπτωση του ορεινού οικότυπου κάτω από συνθήκες υψηλού ολικού N και υψηλής αλατότητας (Διάγραμμα 23). Παρόλα αυτά, στη συνδυασμένη καταπόνηση (χαμηλό N και υψηλή αλατότητα), τα επίπεδα του GABA αυξήθηκαν ελαφρώς για τον ορεινό οικότυπο ενώ δεν παρουσίασαν κάποια αξιόλογη μεταβολή στον παραθαλάσσιο οικότυπο (Διάγραμμα 24). Η αύξηση της αλατότητας στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα είχε ως αποτέλεσμα την υπέρ-έκφραση (up-regulation) του ορεινού οικότυπου έναντι του παραθαλάσσιου οικότυπου στη βιοσύνθεση του GABA όταν τα φυτά εκτίθενται σε χαμηλή παροχή N και την υπό-έκφραση (down-regulation) όταν αυτά εκτίθενται σε υψηλή παροχή N (Διάγραμμα 22).

6.3. Επίδραση του επιπέδου παροχής και των διαφορετικών επιπέδων αλατότητας στον μεταβολισμό των υδατανθράκων σε φυτά σταμναγκαθιού

Τα επίπεδα των υδατανθράκων όπως αυτών της γλυκόζης (Glu) και της φρουκτόζης (Fru), μεταβολίτες οι οποίοι κατέχουν ρόλους-κλειδιά στους κύκλους ενέργειας των φυτών, ήταν χαμηλά

όταν το επίπεδο του ολικού N στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα ήταν στο χαμηλότερο εξεταζόμενο επίπεδο των 4 mM, συνδυαζόμενο με την επέμβαση υψηλής αλατότητας στα 40 mM, στη σύγκριση μεταξύ των δύο διαφορετικών οικότυπων (Παραθαλάσσιος vs Ορεινός). Τα επίπεδα της Glu στη φυσιολογική παροχή N, στα φύλλα σταμναγκαθίου ήταν υψηλότερα στα φυτά του ορεινού οικότυπου, ενώ το αντίστροφο παρατηρήθηκε για την Fru (Διάγραμμα 22). Η αύξηση των επιπέδων αλατότητας από 0,3 στα 40 mM στη χαμηλή παροχή N είχε ως αποτέλεσμα να μειωθούν τα επίπεδα τόσο της Glu όσο και της Fru στον ορεινό οικότυπο (Διάγραμμα 24). Τα επίπεδα του μονοσακχαρίτη σεδοεπτοουλόζη (sedoheptulose) καθώς και των σακχαροαλκοολών D-mannitol και D-threitol, είτε δεν εμφάνισαν κάποια αξιόλογη μεταβολή κάτω από συνθήκες αλατούχου καταπόνησης σε σύγκριση με απουσία καταπόνησης, είτε επηρεάστηκαν αλλά σε μικρότερο βαθμό (Διαγράμματα 21-24). Επιπρόσθετα, η α - α -trehalose, ένας εξίσου σημαντικός δισακχαρίτης ο οποίος εμπλέκεται άμεσα στην ανάπτυξη των φυτών αλλά και στην ανταπόκρισή του σε αβιοτική καταπόνηση όπως αυτή από την αλατότητα, εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα στα φυτά που λάμβαναν τις επεμβάσεις με χαμηλή ή υψηλή παροχή N συνδυαζόμενα με υψηλότερα επίπεδα αλατότητας, στη σύγκριση μεταξύ των οικότυπων (Διάγραμμα 22). Όσον αφορά, τα επίπεδα του παρεχόμενου N κάτω από συνθήκες αλατότητας, μια επικείμενη αύξησή της στο θρεπτικό διάλυμα από 0,3 στα 40 mM αύξησε επίσης τα επίπεδα της α - α -trehalose και στους δύο εξεταζόμενους οικότυπους. (Διαγράμματα 23 και 24). Παρόμοια τάση ακολούθησε και ο μονοσακχαρίτης ινοσιτόλη (myo-inositol), ο οποίος με την σειρά του αύξησε σημαντικά τα επίπεδα του στην περίπτωση του παραθαλάσσιου οικότυπου σε συνθήκες υψηλού ολικού N και υψηλής αλατότητας, ενώ μειώθηκε στον ορεινό οικότυπο (Διάγραμμα 23). Από την άλλη πλευρά, μια μείωση στην παροχή N από τα 16 mM στα 4 mM στο θρεπτικό διάλυμα σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των επιπέδων της μυοινοσιτόλης (Διάγραμμα 24).

6.4. Επίδραση του επιπέδου παροχής και των διαφορετικών επιπέδων αλατότητας στον μεταβολισμό των καρβοξυλικών οξέων, λιπαρών οξέων και επιλεγμένων μεταβολιτών σε φυτά σταμναγκαθίου

Τα καρβοξυλικά οξέα, μερικά από τα οποία αποτελούν ενδιάμεσες ουσίες στον κύκλο του κιτρικού οξέος, επηρεάστηκαν σημαντικά από τις διάφορες εξεταζόμενες επεμβάσεις. Η μεγαλύτερη επίδραση από τις επεμβάσεις με υψηλή ή χαμηλή παροχή N σε συνθήκες αλατότητας παρατηρήθηκε για το μηλικό, φουμαρικό και ηλεκτρικό οξύ στον ορεινό οικότυπο. Επιπλέον, η αύξηση της αλατότητας στο παρεχόμενο θρεπτικό διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα να μειώνονται τα επίπεδα των παραπάνω μεταβολιτών, ενώ αντιθέτως στην περίπτωση του παραθαλάσσιου οικότυπου να μην επηρεάζονται σε κάποιο ουσιαστικό βαθμό (Διάγραμμα 23). Από την άλλη πλευρά, το 2-κετογλουταρικό οξύ είτε

αυξήθηκε είτε δεν επηρεάστηκε σε σημαντικό βαθμό από τις εξεταζόμενες επεμβάσεις (Διαγράμματα 23 και 24). Επιπρόσθετα, παρόμοια ήταν η τάση στη σύγκριση μεταξύ των δύο διαφορετικών οικότυπων, στην υψηλή παροχή N (Διάγραμμα 22). Άλλα καρβοξυλικά οξέα, όπως το σιμικικό, θρεονικό, καρβαμικό και βενζοϊκό οξύ, είτε δεν εμφάνισαν κάποια αξιολογη μεταβολή είτε εμφάνισαν σε μικρότερο βαθμό όταν μεταβλήθηκε το επίπεδο αλατότητας (saline και non saline) (Διαγράμματα 21-24). Λιπαρά οξέα, με ήδη καταγεγραμμένες ωφέλιμες για την ανθρώπινη υγεία ιδιότητες, όπως το α-λινολενικό οξύ (ALA) και το λινολεϊκό οξύ (LA) παρουσίασαν μια ευρύτερη διαφοροποίηση στα επίπεδά τους από τις διάφορες μεταχειρίσεις όπου πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση του LA ούτε τα διαφορετικά επίπεδα παροχής N ούτε αυτά της αλατότητας φάνηκε να επηρεάζουν το παραπάνω λιπαρό οξύ, διατηρώντας το έτσι σε σταθερά επίπεδα σε όλες τις εξεταζόμενες συγκρίσεις (Διαγράμματα 21-24). Εν αντιθέσει με το LA, το ALA, παρουσίασε μείωση στον ορεινό οικότυπο στη σύγκριση του με τον παραθαλάσσιο όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε συνθήκες υψηλής παροχής N και υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (Διάγραμμα 22). Επιπλέον, στη σύγκριση που πραγματοποιήθηκε για κάθε οικότυπο ξεχωριστά ανάμεσα στα δύο διαφορετικά επίπεδα αλάτων, ο ορεινός οικότυπος στη μεν υψηλή παροχή N εμφάνισε επίσης μείωση των επιπέδων του, εν αντιθέσει με την ελαφριά αύξηση που παρατηρήθηκε στον ίδιο οικότυπο όταν αυτός αναπτύσσονταν σε χαμηλή παροχή N, την ίδια στιγμή που ο παραθαλάσσιος οικότυπος κατάφερε να διατηρεί ανεπηρέαστα τα επίπεδά του (Διάγραμμα 23 και 24). Από την άλλη πλευρά, όσον αφορά τη βιοσύνθεση του παλμιτικού και στεατικού οξέος κάτω από συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, αυτή παρουσίασε υπό-έκφραση (down-regulation) στη σύγκριση μεταξύ των δύο διαφορετικών οικότυπων όταν το επίπεδο παροχής N στο θρεπτικό διάλυμα ήταν υψηλό καθώς επίσης την ίδια ανταπόκριση φάνηκε να ακολουθούν τα δύο παραπάνω λιπαρά οξέα και στο χαμηλό επίπεδο παροχής N (Διάγραμμα 22). Επιπρόσθετα, και οι δύο οικότυποι ξεχωριστά στις συγκρίσεις μεταξύ των δύο επιπέδων αλατότητας (0,3 vs 40), αποδεικνύουν ότι η αύξηση του επιπέδου των αλάτων συνεπάγεται και αύξηση των δύο αυτών λιπαρών οξέων (Διάγραμμα 24). Το καφεϊκό οξύ από την κατηγορία των φενυλπροπανοειδών επίσης, είτε δεν επηρεάστηκε είτε επηρεάστηκε σε μικρότερο βαθμό από τον οικότυπο, τις επεμβάσεις με ολικό N ή τα επίπεδα αλατότητας. Τέλος, τα φωσφορικά από την κατηγορία των παραγώγων του φωσφορικού οξέος διαφοροποιήθηκαν σημαντικά σε όλες τις εξεταζόμενες συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν, παρουσιάζοντας αυξητική τάση, με μοναδική εξαίρεση αυτή στην παροχή με χαμηλό N (4 mM) συνδυαζόμενο με υψηλή αλατότητα στα 40 mM (Διαγράμματα 21-24).

Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η αλατότητα προκαλεί ωσμωτική καταπόνηση ή ιοντική τοξικότητα, με αρνητικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη των φυτών, κυρίως λόγω οξειδωτικής καταπόνησης και διαταραχών της θρέψης (Zhu, 2003). Επιπλέον, είναι υπεύθυνη για έναν μεγάλο αριθμό αρνητικών επιδράσεων (ή επιπτώσεων) στις φυσιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα εντός του φυτού καθώς επίσης και στη μεταβολική λειτουργία τους. Στην κατηγορία των ωσμωλυτών (συμβατοί διαλύτες) συμπεριλαμβάνονται ενώσεις οι οποίες περιέχουν άζωτο στη δομή τους, όπως για παράδειγμα αμινοξέα, αμίνες και βεταΐνες, οργανικά οξέα, σάκχαρα και πολυόλες (Mansour, 2000). Όταν τα φυτά έρχονται αντιμέτωπα με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, η υπέρ-έκφραση στη βιοσύνθεση των ωσμωλυτών αυτών παίζει ρόλο-κλειδί στην προστασία έναντι των ωσμωτικών φαινομένων καθώς δίνει τη δυνατότητα (ή ικανότητα) να σταθεροποιούνται οι μεμβράνες λιπιδίων, να προστατεύονται κρίσιμα (ή λειτουργικά) ένζυμα και πρωτεΐνες από μια επικείμενη αποδόμησή τους, ενώ επίσης έχουν και προστατευτικό ρόλο ενάντια στις δυσμενείς επιδράσεις των ελεύθερων ριζών (ROS) (Hasegawa and Bressan, 2000, Ashraf and Foolad, 2007). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι οι ωσμωλύτες, συμπεριλαμβανομένων της προλίνης, του GABA, των διαλυτών σακχάρων, καρβοξυλικών οξέων κλπ., είχαν ως αποτέλεσμα μια διαφορετική ανταπόκριση κάτω από συνθήκες ανάπτυξης με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων. Πιο συγκεκριμένα, ένας μεγάλος αριθμός ωσμωπροστατευτικών ουσιών είτε παρουσίασε υπέρ-έκφραση (up-regulation), είτε δεν είχε κάποια αξιοσημείωτη (ή αξιόλογη) αλλαγή στα επίπεδά τους στην περίπτωση του παραθαλάσσιου οικότυπου, προσδίδοντας του έτσι μια υψηλότερη αντοχή συγκριτικά με αυτή που έχει αναπτύξει ο ορεινός οικότυπος. Επιπρόσθετα, μια αυξανόμενη περιεκτικότητα της προλίνης όταν τα φυτά εκτίθενται σε υψηλότερες από το κανονικό συγκεντρώσεις αλάτων (στη χαμηλή παροχή N) έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Widodo et al., (2009) σε φυτά κριθαριού αλλά και με αυτά από τους Wu et al., (2013) οι οποίοι επίσης έδειξαν την αυξητική τάση που ακολούθησε η προλίνη κάτω από συνθήκες αλατότητας. Από την άλλη πλευρά, στην υψηλή παροχή N (16 mM), τα επίπεδα της προλίνης παρουσίασαν μείωση στην περίπτωση του ορεινού οικότυπου, ενώ αυξήθηκαν στον παραθαλάσσιο, σηματοδοτώντας έτσι την καλύτερη προσαρμοστικότητα του σε συνθήκες αλατότητας από έναν οικότυπο που φαίνεται να είναι ο πιο ανθεκτικός στις συνθήκες αυτές. Η συσσώρευση της προλίνης έχει επίσης αναφερθεί και στη μελέτη των Behr et al., 2017 σε συνθήκες διπλής καταπόνησης με αλατότητα και έλλειψη οξυγόνου (hypoxia), οι οποίοι και προτείνουν ότι η προλίνη πιθανώς να εμπλέκεται με έναν καθοριστικό ρόλο είτε στην απομάκρυνση των ROS είτε ως ρυθμιστής του pH και της οξειδωαναγωγικής κατάστασης των καταπονημένων φυτικών κυττάρων. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Cuin and Shabala, (2005), η προλίνη μπορεί επίσης να συνεισφέρει στην ομοιόσταση του K^+ προστατεύοντας από μια επικείμενη

απομάκρυνση του K^+ στα εκτεθειμένα από NaCl κύτταρα. Για όλους τους παραπάνω λόγους, η προλίνη στα εξεταζόμενα φυτά σταμναγκαθίου μπορεί να κατέχει έναν εξίσου εμπεριστατωμένο ρόλο ως προς τη διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας.

Οι [Kumari and Parida \(2018\)](#), οι οποίοι εξέτασαν τον μεταβολισμό του *S. persica* κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας, έδειξαν ότι σημαντικά αμινοξέα όπως η προλίνη και η φαινυλαλανίνη αυξήθηκαν στην περίπτωση των φυτών που είχαν δεχθεί την επέμβαση με NaCl συγκριτικά με τα φυτά-μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αρμονία με τα αντίστοιχα που παρατηρήθηκαν στα φυτά σταμναγκαθίου στην παρούσα εργασία. Η υψηλότερη συσσώρευση υποδεικνύει ξεκάθαρα τον καθοριστικό τους ρόλο στη διατήρηση της ωσμωτικής ομοιόστασης. Γενικότερα όμως, αν και υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν τη σημαντικότητα της προλίνης κάτω από συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης με κάποιες από τις οποίες να την προτείνουν σαν μια ένωση υψίστης σημασίας για την ενδοκυτταρική ωσμωτικής διατήρηση ([Silveira et al., 2003](#)), υπάρχουν όμως και ερευνητές που υποστηρίζουν ότι δρα κυρίως ως μόριο μετάδοσης σήματος σε καταστάσεις καταπόνησης των φυτών ([Rai et al., 2003](#)).

Σύμφωνα με τους [Zhang et al., 2016](#), οι οποίοι επίσης μελέτησαν την επίδραση της αλατότητας σε φυτά σόγιας (άγρια και καλλιεργούμενα) κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (επεμβάσεις χωρίς αλατότητα), σημαντικές διαφορές εμφανίστηκαν μεταξύ των γονοτύπων κι ειδικότερα ως προς τη μεταβολική τους συμπεριφορά. Για παράδειγμα, από την κατηγορία των αμινοξέων (GABA και προλίνη) παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συσσώρευση στον άγριο οικότυπο συγκριτικά με τον καλλιεργούμενο. Αντιθέτως, ο καλλιεργούμενος οικότυπος παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τον άγριο στα παρακάτω αμινοξέα: σερίνη, ισολευκίνη, αλανίνη, γλυκίνη, β -αλανίνη, φαινυλαλανίνη, βαλίνη, θρεονίνη και τυροσίνη, στα φύλλα. Στο σταμναγκαθί, στη σύγκριση μεταξύ των δύο διαφορετικών οικότυπων σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης (16 mM) και χωρίς τις επεμβάσεις με αλατότητα (non-saline), τα επίπεδα τόσο του GABA όσο και της προλίνης παρουσίασαν υπέρ-έκφραση στον ορεινό οικότυπο σε σύγκριση με τον παραθαλάσσιο, καθώς επίσης υψηλότερα ήταν και τα επίπεδα της σερίνης, ισολευκίνης, φαινυλαλανίνης, βαλίνης και θρεονίνης.

Μια πιο πρόσφατη μελέτη από τους [Hildebrandt et al., \(2015\)](#) αναφέρει ότι η οξειδωση των αμινοξέων όπως βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη μπορεί να οδηγήσει σε μια άμεση ενίσχυση ηλεκτρονίων στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, υποδεικνύοντας ξεκάθαρα των ρόλο τους στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό και την παραγωγή ATP. Στην παρούσα μελέτη, κάτω από συνθήκες ανάπτυξης με υψηλή συγκέντρωση αλάτων και σταθερή παροχή N (16 mM), η βαλίνη, η λευκίνη και ισολευκίνη ακολούθησαν πτωτική τάση στον ορεινό οικότυπο, ενώ αυξήθηκαν στην περίπτωση του παραθαλάσσιου οικότυπου. Εκτός από τη συμμετοχή τους στην παραγωγή ενέργειας από τους φυτικούς οργανισμούς, τα αμινοξέα μπορούν να δραστηριοποιηθούν και σαν μόρια

μετάδοσης σήματος σε συνθήκες καταπόνησης ή ως πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση άλλων δευτερογενών μεταβολιτών και φυτορμονών. Όσον αφορά τα αρωματικά αμινοξέα, την τυροσίνη και τη φαινυλαλανίνη, τα οποία προέρχονται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι του σιμικικού οξέος, έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν ως πρόδρομες ενώσεις των αλκαλοειδών και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών ή να συμβάλλουν στην απομάκρυνση των επιβλαβών ROS (Gill and Tuteja, 2010; Kiani-Pouya et al., 2017). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μια προηγούμενη μελέτη πάνω σε φυτά *S. persica* όπου η αυξητική τάση των αμινοξέων όταν τα φυτά εκτίθενται σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης NaCl πιθανώς να συσχετίζεται με την αύξηση της δραστηριότητας στους εμπλεκόμενους μεταβολίτες από το παραπάνω βιοσυνθετικό μονοπάτι, το οποίο τελικώς οδηγεί και στην αύξηση της φαινυλαλανίνης. Στην παρούσα μελέτη, στα φυτά ορεινής προέλευσης, η φαινυλαλανίνη παρουσίασε ελαφριά αύξηση των επιπέδων της όταν αυτά δέχθηκαν τις επεμβάσεις με υψηλή παροχή N (16 mM), με την ίδια ακριβώς ανταπόκριση (αύξηση) να ακολουθούν και στη χαμηλή παροχή (4 mM) αναπτυσσόμενα πάντα κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας (40 mM).

Τα σάκχαρα με τη σειρά τους έχουν κρίσιμους ρόλους-κλειδιά στις φυσιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν μέρος εντός ενός φυτικού οργανισμού, όπως αυτή της φωτοσύνθεσης (Koch, 1996; Sheen et al., 1999). Πιο συγκεκριμένα, υψηλή συγκέντρωση σακχάρων είναι ικανή να οδηγήσει σε καταστολή της φωτοσύνθεσης (Jang et al., 1997) με αποτέλεσμα την εμφάνιση νεκρωτικών φύλλων και μη φυσιολογικής ανάπτυξης τους (Sonnewald et al., 1991). Από την άλλη πλευρά, χαμηλότερες συγκεντρώσεις σακχάρων προάγουν τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, ενώ οι υψηλές προάγουν την ανάπτυξη και την αποθήκευση υδατανθράκων (Rolland et al., 2002; Sami et al., 2016). Επιπλέον, τυχόν συσσώρευση από διαλυτά σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, τρεχαλόζη κλπ.), μπορούν να ενισχύσουν τη συγκέντρωση της προλίνης κάτω από συνθήκες ανάπτυξης με υψηλή αλατότητα (Hellmann et al., 2000). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν την προλίνη ως έναν ωσμωλύτη ο οποίος βελτιώνει την ανθεκτικότητα, και επιπλέον ελαχιστοποιεί τις αρνητικές επιδράσεις που προκαλούν οι συνθήκες καταπόνησης στους φυτικούς οργανισμούς. Επιπρόσθετα, ο ρόλος της προλίνης μεταξύ άλλων, συμπεριλαμβάνει την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας συμβάλλοντας την ίδια στιγμή στην απομάκρυνση των επιβλαβών ROS, βοηθά στη σταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών και πρωτεϊνών (Hayat et al., 2012) καθώς επίσης έχει βοηθητικό ρόλο στη διατήρηση της σπαργής των φυτών (Bartels and Sunkar, 2005).

Είναι ήδη αρκετά τεκμηριωμένο το γεγονός ότι η καταπόνηση με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων είναι υπεύθυνη για μια πληθώρα από επιπτώσεις στη ζωή ενός φυτικού οργανισμού συμπεριλαμβανομένων μεταξύ άλλων τη μικρότερη φωτοσυνθετική λειτουργία, μικρότερη αφομοίωση του N, καταστολή της κυτταρικής διαίρεσης, φυσιολογικές διεργασίες οι οποίες μπορούν πολύ εύκολα να οδηγήσουν σε προβληματική ανάπτυξη των φυτών (Anjum et al., 2011). Επιπρόσθετα,

μια εξωγενής εφαρμογή με υψηλές συγκεντρώσεις αλατότητας μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη της φυλλικής επιφάνειας, διαταράσσει την ιοντική ισορροπία και προκαλεί μείωση της στοματικής αγωγιμότητας (Wani et al., 2013). Για όλους τους παραπάνω λόγους, τα σάκχαρα αποτελούν με τη σειρά τους σημαντικής σημασίας ωσμωλύτες με σκοπό τη βελτίωση των αρνητικών επιδράσεων από τις συνθήκες μιας επικείμενης αβιοτικής καταπόνησης (Almodares et al., 2008). Σημαντικά σάκχαρα, όπως για παράδειγμα η σακχαρόζη, η φρουκτόζη και η γλυκόζη, όταν παρουσιάζουν υπέρ-έκφραση στους φυτικούς οργανισμούς κάτω από συνθήκες αλατότητας, παρέχουν την απαραίτητη προστασία έναντι των ωσμωτικών φαινομένων, εμπλέκονται στην αποθήκευση του άνθρακα, ρυθμίζουν την ωσμωτική ομοιόσταση, και απομακρύνουν τα επιβλαβή ROS (Rosa et al., 2009). Σύμφωνα με τους Hu et al., 2012, μικρότερη εφαρμογή από γλυκόζη σε σπορόφυτα σιταριού προώθησε τη βλάστηση των σπόρων κάτω από συνθήκες με υψηλή αλατότητα. Από την άλλη πλευρά, υψηλότερες συγκεντρώσεις σακχάρων έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της βλάστησης των σπόρων (Gibson, 2005). Όπως έχει ήδη αναφερθεί και παραπάνω, τα διαλυτά σάκχαρα είναι υπεύθυνα για αρκετές φυσιολογικές διεργασίες του φυτού, και μια εξωγενής εφαρμογή τους μπορεί να οδηγήσει στην προστασία από μια επικείμενη καταστροφή της χλωροφύλλης, προωθώντας την αύξηση του ξηρού βάρους τους αλλά και τη συσσώρευση της προλίνης. Επιπλέον, αποτρέπει την αφυδάτωση των κυττάρων κι επίσης ενεργοποιεί ζωτικής σημασίας αντιοξειδωτικά ένζυμα (Hu et al., 2012). Σε ένα ευαίσθητο στην αλατότητα φυτό, όπως το ρύζι, τόσο η γλυκόζη όσο και η φρουκτόζη αποτελούν ωσμωπροστατευτικές ενώσεις που απομακρύνουν τις επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες (ROS) (Pattanagul and Thitisaksakul, 2008). Επιπλέον, ο ρόλος τους συνδέεται με τον αναβολισμό και καταβολισμό των ROS καθώς η απομάκρυνση των ROS εμπλέκεται στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφοροπεντόζης (oxidative pentose phosphate) (Cuoe et al., 2006). Τέλος, σε σπορόφυτα σιταριού, μια εξωγενής εφαρμογή με γλυκόζη σε φυτά που εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατότητας, προκαλεί τη μείωση στις συγκεντρώσεις του Na^+ την ίδια στιγμή που παρατηρείται υψηλότερη αφομοίωση του K^+ και διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα η ιοντική ομοιόσταση (Nemati et al., 2011). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, στην εξέταση κάθε οικότυπου ξεχωριστά, όταν τα φυτά με προέλευση από τα ορεινά εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα αλατότητας, έδειξαν ότι η γλυκόζη επηρεάστηκε σε σημαντικό βαθμό και ειδικότερα από τις επεμβάσεις με διπλή καταπόνηση (χαμηλό N και υψηλή αλατότητα), έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της. Παρόμοια τάση ακολούθησαν και τα φυτά τα οποία είχαν δεχθεί υψηλή παροχή N και στα οποία η γλυκόζη επίσης παρουσίασε αισθητή μείωση. Επιπρόσθετα, η τρεχαλόζη και στους δύο οικότυπους αλλά και η φρουκτόζη τόσο στην υψηλή όσο και στη χαμηλή παροχή αζώτου για το ορεινό και παραθαλάσσιο οικότυπο, αντίστοιχα, εμφάνισαν αυξητική τάση στα επίπεδά τους. Παρόλα αυτά, το επίπεδο των διαλυτών σακχάρων, π.χ. φρουκτόζη, γλυκόζη και τρεχαλόζη παρουσίασε υπό-έκφραση στον ορεινό οικότυπο, ο οποίος έδειξε να

συσσωρεύει λιγότερα σάκχαρα σε σύγκριση με τον παραθαλάσσιο οικότυπο. Σύμφωνα με τους [Hafiz Che-Othman et al., \(2020\)](#), σε φύλλα σιταριού που δέχθηκαν τις επεμβάσεις με υψηλή αλατότητα, όλα τα σάκχαρα με εξαίρεση αυτό της γλυκόζης ακολούθησαν ανοδική τάση. Επίσης, οι [Silva-Ortega et al., \(2008\)](#), έχουν ήδη αναφέρει την θεωρία ότι όταν τα φυτά εκτίθενται σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης συμπεριλαμβανομένης και της αλατότητας, παρατηρείται ενίσχυση των επιπέδων ουσιών ζωτικής σημασίας, όπως τα σάκχαρα. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τη μελέτη στο σταμναγκάθι, και υποδηλώνουν μία κοινή ανταπόκριση έναντι των επεμβάσεων με αλατότητα που ακολουθείται και από άλλα φυτικά είδη, είτε αυτά είναι καλλιεργούμενα είτε μη. Η θεωρία αυτή συνδέεται άμεσα με τη συσσώρευση ωσμωλυτών οι οποίοι προέρχονται από την κατηγορία των υδατανθράκων (σάκχαρα και σακχαροαλκοόλες). Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις στις οποίες η ανταπόκριση κάποιων από τους υδατάνθρακες τροποποιείται στα διαφορετικά φυτικά είδη κάτω από τις συνθήκες αυτές, συμπεριλαμβάνοντας μηχανισμούς αλλά και μεταβολική ρύθμιση τα οποία διαφέρουν από είδος σε είδος ([Llanes et al., 2016](#)).

Υπάρχει μια υπόθεση σύμφωνα με την οποία τα φυτά που συσσωρεύουν σάκχαρα και σακχαροαλκοόλες είναι ικανά να διατηρήσουν την κυτταρική ομοιόσταση, την ενέργεια προερχόμενη από τον μεταβολισμό και την απομάκρυνση των ROS ([Kumari et al., 2015](#); [Kiani-Pouya et al., 2017](#)). Παρόλο αυτά, μια συσσώρευση σακχάρων κάτω από υψηλή συγκέντρωση αλάτων χρησιμεύει ως μια ενδιάμεση πηγή ενέργειας στα φυτά με σκοπό να επιτύχουν τη επαναφορά στην ανάπτυξή τους σταθεροποιώντας τα μακρομόρια ([Yancey, 2005](#)). Οι ενώσεις αυτές επίσης εμπλέκονται στο λεγόμενο sugar-sensing system, ένα σύστημα που ρυθμίζει την έκφραση κρίσιμων γονιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για τη φωτοσύνθεση και αναπνοή των φυτών παρέχοντάς τους μεγαλύτερη ανοχή έναντι της αβιοτικής καταπόνησης ([Conde et al., 2011](#)). Ο κρίσιμος ρόλος της ινοσιτόλης (myo-inositol) έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες. Είναι ένας πρωτογενής μεταβολίτης ο οποίος παρέχει αντοχή σε συνθήκες καταπόνησης με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, συνδέεται με την προστασία των κυττάρων από τις επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες (ROS), ρυθμίζει την ωσμωτική ισορροπία, ενώ επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι έχει ρόλο στην αποθήκευση και μεταφορά των αυξινών ([Sengupta et al., 2012](#)). Στο σταμναγκάθι, κάτω από μια φυσιολογική παροχή N και επεμβάσεις με υψηλή αλατότητα, η ινοσιτόλη ενίσχυσε τα επίπεδά της στην περίπτωση του παραθαλάσσιου οικότυπου (up-regulation), ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε για τον ορεινό οικότυπο (down-regulation). Από τη άλλη πλευρά, στη χαμηλή παροχή N, η ινοσιτόλη φάνηκε να αυξάνεται και στους δύο εξεταζόμενους οικότυπους. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αρμονία με τη μελέτη στο φυτό *S. persica*, στην οποία επίσης παρατηρήθηκε αύξηση στην περιεκτικότητά της σε σάκχαρα και σακχαροαλκοόλες συμπεριλαμβανομένης και της ινοσιτόλης, καθώς επίσης φάνηκε να αυξάνει τα επίπεδα τόσο της γλυκόζης όσο και της γλυκερόλης ([Kumari and Parida, 2018](#)). Επίσης, είναι σε συμφωνία με τη μελέτη

των [Gong et al., \(2005\)](#), οι οποίοι έδειξαν μεγαλύτερα επίπεδα ινοσιτόλης στο αλόφυτο *Thellungiella halophila* σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας, καθώς επίσης και στο αλόφυτο *Chenopodium quinoa*.

Τα αλόφυτα αποτελούν μια κατηγορία φυτών τα οποία είναι ικανά να αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες αρκετά υψηλής EC (μπορεί να ξεπερνά και τα 150 mM), και έχουν υιοθετήσει μηχανισμούς για την καλύτερη ανταπόκριση τους στις συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης (αλατότητα). Μεταξύ άλλων συμπεριλαμβάνονται μικρότερη σπατάλη ενέργειας κατά τις συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα και περαιτέρω προστασία των φυσιολογικών διεργασιών, όπως αυτή της φωτοσύνθεσης. Επιπρόσθετα, οι μηχανισμοί συσχετίζονται και με την ενεργοποίηση κατάλληλων ενζύμων (stress-related enzymes) τα οποία παρέχουν προστασία από τις επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (H_2O_2 , O_2 και $OH^\cdot$) καθώς επίσης φαίνεται να τους προσδίδουν και υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Όσον αφορά τα επίπεδα αλατότητας, στον παραθαλάσσιο οικότυπο η περιεκτικότητα των καρβοξυλικών οξέων (φουμαρικό, ηλεκτρικό και 2-κετογλουταρικό οξύ) δεν φάνηκε να επηρεάζεται σε ουσιαστικό βαθμό από τις συνθήκες καταπόνησης όταν τα φυτά εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα αλατότητας (40 mM). Σε αντίθεση με τον παραθαλάσσιο οικότυπο, στον ορεινό οικότυπο είτε παρουσίασαν αύξηση (2-κετογλουταρικό οξύ) είτε κυρίως ακολούθησαν μια πτωτική τάση (μηλικό, φουμαρικό και ηλεκτρικό οξύ), υποδεικνύοντας έτσι ότι τα σταμναγκάθια που προέρχονται από παραθαλάσσιες περιοχές είναι ικανά να μην σπαταλούν ενέργεια (save energy), και πιθανώς να προστατεύουν τις φυσιολογικές τους διεργασίες, δίνοντας έτσι στα φυτά μια υψηλότερη ανθεκτικότητα (ή αντοχή) σε συνθήκες καταπόνησης. Σύμφωνα με τους [Borrelli et al., \(2018\)](#), οι μεταβολίτες από τον κύκλο του κιτρικού οξέος διέφεραν στις εξεταζόμενες ποικιλίες σιταριού παρουσιάζοντας εντελώς διαφορετικές ανταποκρίσεις, εξαρτώμενες πάντα από τον γονότυπο. Πιο συγκεκριμένα, αύξηση των επιπέδων αλατότητας, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των καρβοξυλικών οξέων ανεξάρτητα από τον γονότυπο, όταν τα φυτά εκτίθενται σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 50 mM NaCl. Από την άλλη πλευρά, ακόμα υψηλότερες συγκεντρώσεις NaCl έδειξαν ότι ο μόνος γονότυπος που κατάφερε πιο αποτελεσματικά να διατηρήσει ανεπηρέαστο τον TCA κύκλο ήταν η ποικιλία “Cappelli”. Για τον λόγο αυτό, οι μεταβολίτες αυτοί (ενδιάμεσες ενώσεις στον κύκλο του κιτρικού οξέος) μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως ανθρακικοί σκελετοί για τη σύνθεση άλλων επαγόμενων ως προς την αλατότητα ουσιών (μεταβολιτών). Λόγω αυτής της διαδικασίας, οι φυτικοί οργανισμοί δεν είναι σε θέση να παρέχουν αρκετή ενέργεια με τη μορφή του ATP και των παραγώγων του όπως NADH, $FADH_2$, ειδικότερα σε συνθήκες με υψηλή περιεκτικότητα σε άλατα. Αυτή η μη διαθέσιμη ενέργεια είναι ικανή να οδηγήσει σε σημαντικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των φυτών σε εξεταζόμενους γονότυπους είτε αυτοί είναι ευαίσθητοι είτε ακόμα κι αν είναι πιο ανθεκτικοί. Στην παρούσα μελέτη, ο ορεινός οικότυπος κι ειδικότερα στις επεμβάσεις με αλατότητα έδειξε να παρουσιάζει σημαντική μείωση των επιπέδων των μεταβολιτών που συμμετέχουν στον κύκλο του

κιτρικού οξέος με μοναδική εξαίρεση αυτή του 2-κετογλουταρικού οξέος. Από την άλλη πλευρά, ο παραθαλάσσιος οικότυπος, έδειξε μια καλύτερη ανταπόκριση στους μεταβολίτες του TCA κύκλου, γεγονός που αποδεικνύει τη μεγαλύτερη εξοικείωση του οικότυπου αυτού σε συνθήκες αλατότητας. Μια επικείμενη μείωση των μεταβολιτών όπως το μηλικό, το ηλεκτρικό και το 2-κετογλουταρικό οξύ στην αυξανόμενη αλατότητα είναι ήδη καταγεγραμμένο (Ricther et al., 2015). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μείωση των επιπέδων των μεταβολιτών του TCA κύκλου, παρέχει λιγότερη ενέργεια με τη μορφή των NADH, FADH₂, και ATP, τα οποία με τη σειρά τους έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών. Στην περίπτωση του υβριδίου καλαμποκιού με υψηλή ανθεκτικότητα στην αλατότητα φάνηκε να είναι ικανό να αναπτύσσεται και σε συνθήκες με χαμηλότερη ενέργεια συγκριτικά με το πιο ευαίσθητο υβρίδιο. Στα φυτά σταμναγκαθίου, ο παραθαλάσσιος οικότυπος φαίνεται να είναι ο οικότυπος με την αμεσότερη ανταπόκριση όπως και στην περίπτωση των φυτών καλαμποκιού λόγω της ιδανικότερης χρήσης της ενέργειάς τους.

Σύμφωνα με τους Wu et al., (2013), οι οποίοι εξέτασαν την επίδραση της αλατότητας σε διαφορετικές ποικιλίες κριθαριού (άγριες και καλλιεργούμενες), τα επίπεδα των μεταβολιτών που εμπλέκονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κιτρικό, 2-κετογλουταρικό, φουμαρικό, μηλικό και ηλεκτρικό οξύ) μειώθηκαν όταν τα φυτά αναπτυσσόταν κάτω από υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων. Αυτό το αποτέλεσμα σχετίζεται με την παραγωγή ενέργειας η οποία εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τα υψηλά επίπεδα της αλατότητας. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε φυτά σταμναγκαθίου έρχονται σε συμφωνία με τη μελέτη των Wu et al., (2013), αλλά μόνο στην περίπτωση του πιο ευαίσθητου στην αλατότητα οικότυπου (ορεινός). Αντιθέτως, οι Zhang et al., (2016), βρήκαν ότι κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας, το κιτρικό και 2-κετογλουταρικό οξύ αυξήθηκαν στην περίπτωση του άγριου γονότυπου σε φυτά σόγιας. Από την άλλη πλευρά, στον καλλιεργούμενο οικότυπο σόγιας, το κιτρικό και 2-κετογλουταρικό οξύ, μειώθηκαν. Σύμφωνα με τους Kiani-Pouya et al., (2017), η μείωση αυτή των οργανικών οξέων και ειδικότερα των μεταβολικών ουσιών που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος σε συνθήκες ανάπτυξης με υψηλή αλατότητα οδηγεί στη μειωμένη δραστηριότητα του κύκλου αυτού. Παρομοίως με τα αποτελέσματα στο σταμναγκάθι, οι υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων μπορούν να οδηγήσουν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνευμένων καρβοξυλικών οξέων, και σε άλλα φυτά όπως για παράδειγμα τα παρακάτω: *Thellungiella halophila*, *Suaeda salsa* και *Chenopodium quinoa* (Gong et al., 2005; Liu et al., 2013; Kiani-Pouya et al., 2017). Επιπροσθέτως, μια ακόμα πιο πρόσφατη μελέτη με φυτά σιταριού (Hafiz Che-Othman et al., 2020), δείχνει πτωτική τάση στη βιοσύνθεση των καρβοξυλικών οξέων του TCA κύκλου (κιτρικό, μηλικό και φουμαρικό οξύ) σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Μόνη εξαίρεση αποτέλεσαν τα επίπεδα του 2-κετογλουταρικού οξέος τα οποία μάλιστα αυξήθηκαν σε σημαντικό βαθμό στα φυτά που είχαν δεχθεί επεμβάσεις με αλατότητα. Σύμφωνα με τους Kumari and Parida (2018), η μείωση που παρατηρείται

σε αυτά τα καρβοξυλικά οξέα υψίστης σημασίας στους φυτικούς οργανισμούς μπορεί να οφείλεται στη μειωμένη ροή άνθρακα από το μονοπάτι της γλυκόλυσης μέχρι τον κύκλο του κιτρικού οξέος, με τη μειωμένη δραστηριότητα του TCA κύκλου να προκαλεί με τη σειρά της χαμηλότερη παραγωγή των NADH, FADH₂, και ATP (Widodo et al., 2009).

Η σημαντικότητα της κυτταρικής μεμβράνης στα φυτά βασίζεται στον κρίσιμο ρόλο της στη ρύθμιση της μεταφοράς μεγάλου αριθμού ιόντων καθώς επίσης και μεγαλύτερων μορίων. Στην αβιοτική καταπόνηση, τα φυτά έχουν αναπτύξει (ή υιοθετήσει) μηχανισμούς για την προστασία τους συμπεριλαμβανομένων μεταξύ άλλων την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως παραδείγματος χάριν της δισμουτάσης υπεροξειδίου (SOD) και της υπεροξειδάσης ασκορβικού (APX). Τα παραπάνω ένζυμα προστατεύουν τα φυτά από μια επικείμενη οξειδωτική καταπόνηση και παρέχουν άμυνα έναντι των ROS. Παρά το γεγονός ότι το τμήμα στο οποίο τα άλατα φτάνουν πρώτα είναι η πλασματική μεμβράνη, ο ρόλος της μεμβράνης των λιπιδίων και της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη διατήρηση της διαπερατότητας της πλασματικής μεμβράνης είναι κρίσιμος όταν τα φυτά εκτίθενται σε συνθήκες αλατότητας. Αυτή η ανταπόκριση αποτελεί μια από τις πρωταρχικές αντιδράσεις έναντι της καταπόνησης με αλατότητα (Cooke and Burden, 1990). Σε αρκετές περιπτώσεις, ο αντίκτυπος από τις συνθήκες αλατότητας στα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης όπως π.χ. στερόλες και λιπαρά οξέα μπορεί να είναι ο λόγος στην αλλαγή της ρευστότητας και διαπερατότητας, και ένας περαιτέρω μηχανισμός για την αντιμετώπιση της καταπόνησης από τα φυτά (Wu et al., 1998; Elkahoui et al., 2004). Σύμφωνα με τους Liu et al., (2017), η σύνθεση των λιπιδίων και των ακόρεστων λιπαρών οξέων μπορούν να επιδράσουν στη ρευστότητα της μεμβράνης και στη δομή της. Επιπλέον, η αντοχή των φυτών στην αλατότητα φαίνεται από τα αυξημένα επίπεδα των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Επιπρόσθετα, η αναστολή του PSII η οποία ενισχύεται από τις επεμβάσεις με αλατότητα στο αλόφυτο *Thellungiella halophila*, είναι σε θέση να μειωθεί με την αύξηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στα λιπίδια των μεμβρανών. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί σε φυτά καπνού, στα οποία μια αύξηση στα επίπεδα των 18:3 λιπαρών οξέων συνεπάγεται και την υψηλότερη αντοχή έναντι της αβιοτικής καταπόνησης. Γενικότερα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν έναν σημαντικό ρόλο στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, στη λειτουργία της και τη δομή της. Υπέρ-έκφραση των ω-3 λιπαρών οξέων, είναι ικανή να αυξήσει την αντοχή σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης και καταπόνησης με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων (Zhang et al. 2005). Ένα τυπικό παράδειγμα προέρχεται από την κατηγορία των λιπαρών οξέων, κι είναι η διαδικασία της β-οξείδωσης (β-oxidation) η οποία αποτελεί πρωταρχικό τρόπο της αποσύνθεσης των λιπαρών οξέων, λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και στην ουσία τροφοδοτεί το φυτό με τεράστιες ποσότητες ενέργειας, που είναι απαραίτητη για τις περαιτέρω δραστηριότητές του. Επιπρόσθετα, η β-οξείδωση έχει έναν κρίσιμο ρόλο στην επιβίωση των φυτών κάτω από συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης λόγω του ότι τα μόρια

των λιπαρών οξέων διασπώνται για τη δημιουργία ακέτυλο-συνένζυμου A (acetyl-CoA) με σκοπό να εισέλθει στον κύκλο του κιτρικού οξέος και την παραγωγή ενέργειας. Αυτές οι ποσότητες ενέργειας είναι ικανές να εμπλακούν σε μια πληθώρα από μεταβολικές δραστηριότητες (Zolman et al., 2001; Rinaldi et al., 2016). Στην περίπτωση του σταμναγκαθίου, το στεατικό, παλμιτικό οξύ και η μονοπαλμιτίνη παρουσίασαν υπό-έκφραση στη σύγκριση που πραγματοποιήθηκε μεταξύ των δύο διαφορετικών οικότυπων όταν αυτά δέχθηκαν επεμβάσεις με κανονική παροχή N (16 mmol L^{-1}) συνδυαζόμενη με υψηλή συγκέντρωση αλάτων (40 mM). Σύμφωνα με τους Zhang et al., (2016), το στεατικό και παλμιτικό οξύ εμφάνισαν μείωση σε συνθήκες αλατότητας σε σπορόφυτα σόγιας, το οποίο πιθανώς υποδεικνύει ότι η β-οξειδωση δεν αποτελεί το κύριο μεταβολικό μονοπάτι. Επιπρόσθετα, στη μελέτη σε φυτά *S. persica*, το επίπεδο του στεατικού οξέος μειώθηκε, ενώ του παλμιτικού αυξήθηκε στις επεμβάσεις με αλατότητα. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι τα φυτά *S. persica* αναπρογραμματίζουν τη σύνθεση των λιπαρών οξέων συμβάλλοντας έτσι στη μείωση του αρνητικού αντίτυπου της αλατότητας στα παραπάνω φυτά.

Γενικά Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, κατά τη διάρκεια της πρώτης και της δεύτερης πειραματικής χρονιάς, φάνηκε ότι οι δύο διαφορετικοί οικότυποι (ορεινός και παραθαλάσσιος) διέφεραν σημαντικά ως προς την αντιμετώπιση μιας αβιοτικής καταπόνησης όπως αυτής της θρέψης με άζωτο, δείχνοντας έτσι την υπεροχή του ορεινού οικότυπου εν συγκρίσει με τον παραθαλάσσιο, ειδικότερα στην περίπτωση της περιεκτικότητας σε νιτρικά στα φύλλα, αντιοξειδωτικές ουσίες (π.χ. φαινολικά, φλαβονοειδή) καθώς επίσης και της αντιοξειδωτικής του ικανότητας. Επιπλέον, ένα σημαντικό εύρημα είναι ότι σε χαμηλή παροχή αζώτου και σε αναλογίες των NH_4^+ -N/ολικό-N πάνω από 0.05 παρατηρείται μεν μια σαφή μείωση των συγκεντρώσεων των νιτρικών χωρίς όμως παράλληλα να επηρεάζονται οι αποδόσεις του φυτού. Για τους παραπάνω λόγους, μελετήθηκε η μεταβολομική ανταπόκριση των φυτών κάτω από το θρεπτικό αυτό στρες, υποδεικνύοντας ότι στις σημαντικές κατηγορίες (αμινοξέα, υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα και καρβοξυλικά οξέα) οι κρίσιμοι μεταβολίτες για την επιβίωση του φυτού είτε αύξησαν είτε μείωσαν τα επίπεδά τους ανάλογα με την καταπόνηση που δέχθηκαν κρατώντας όμως παράλληλα κάποιους σε σταθερά επίπεδα.

Όσον αφορά την τρίτη πειραματική χρονιά, με καταπόνηση αλατότητας, ως γενικό συμπέρασμα μπορούμε να πούμε ότι σε αυτή την περίπτωση ο παραθαλάσσιος οικότυπος έδειξε να υπερέχει έναντι του ορεινού, όντας ο πιο ανθεκτικός σε υψηλά επίπεδα αλατότητας, αποτελέσματα που μπορούν να φανούν χρήσιμα σε περαιτέρω προγράμματα αναπαραγωγής φυτών με σκοπό την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ποικιλίες (σταμναγκαθιού) που είναι πιο ευαίσθητες σε τέτοιου είδους καταπονήσεις. Από την άλλη πλευρά, ο ορεινός οικότυπος έδειξε μια υψηλότερη θρεπτική κατάσταση, και σχημάτισε ροζέτες (φύλλα) που περιέχουν σημαντικά υψηλότερη ξηρά ουσία, καθώς επίσης και περισσότερα ολικά φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και καροτενοειδή. Επιπρόσθετα, σε συνθήκες απουσίας αλατότητας, ο ορεινός οικότυπος έδειξε να έχει και υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό του ορεινού οικότυπου είναι ότι και στην περίπτωση της καταπόνησης με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό διάλυμα παρουσίασε υψηλότερη διατροφική αξία συγκρινόμενη με αυτή του παραθαλάσσιου οικότυπου, καθώς το εδάδιμο τμήμα του φυτού περιείχε χαμηλότερες συγκεντρώσεις νιτρικών ([Chatzigianni et al., 2018](#)), ιδιαίτερα όταν τα φυτά δέχονται χαμηλή παροχή αζώτου (4 mM). Παρόλο αυτά, στην παρούσα μελέτη, κι όσον αφορά τον πρωτογενή μεταβολισμό, μελετήθηκε μόνο η επίδραση της αλατότητας στις ροζέτες (φύλλα) του σταμναγκαθιού. Λόγω του γεγονότος ότι εμφανίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο διαφορετικών οικότυπων στη σύνθεση πολύ κρίσιμων ωσμωλυτών όπως τα σάκχαρα, η προλίνη, καθώς επίσης τα καρβοξυλικά οξέα που προέρχονται από τον κύκλο του κιτρικού οξέος, μπορεί να μας οδηγήσει εύλογα στο συμπέρασμα ότι ο παραθαλάσσιος οικότυπος έχει αναπτύξει εντελώς διαφορετικούς μηχανισμούς ως

προς την ανθεκτικότητα και αντοχή του κάτω από συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης όπως αυτή της αλατότητας συγκρινόμενος με τον ορεινό. Τέλος, τα αποτελέσματα με τη σειρά τους μπορούν να φανούν χρήσιμα στη βελτίωση της ανθεκτικότητας άλλων ποικιλιών (ή οικότυπων) που εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία όταν εκτίθενται σε ακραίες συνθήκες καταπόνησης.

Πρωτοτυπία της Διατριβής

Η πρωτοτυπία της παρούσας διατριβής έγκειται στο γεγονός ότι η μελέτη αυτή εστιάζει στις διαφορές που εμφάνισαν τόσο στα αγρονομικά χαρακτηριστικά (νωπό βάρος, ξηρό βάρος, αποδόσεις κλπ.) στη θρεπτική κατάσταση και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά όσο και στον πρωτογενή μεταβολισμό δύο οικότυποι σταμναγκαθίου προερχόμενοι από δύο εντελώς διαφορετικά φυσικά περιβάλλοντα, υδροπονικά καλλιεργούμενοι υπό από συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, και πιο συγκεκριμένα θρεπτικής (επίπεδο παροχής και μορφή παρεχόμενου N) αλλά και συνδυαζόμενης (υψηλή συγκέντρωση NaCl και N).

Βιβλιογραφία

- Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M.T., Bedu, M., Meyer, C., and Truong, H.N. (2005). Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 28, 500–512.
- Aliferis, K.A., Faubert, D., and Jabaji, S. A. (2014). metabolic profiling strategy for the dissection of plant defense against fungal pathogens. *PLoS ONE* 9:e111930.
- Almodares, A., Hadi, M., and Dosti, B. (2008). The effects of salt stress on growth parameters and carbohydrates contents in sweet sorghum. *Res. J. Environ. Sci.* 2, 298-304.
- Alvarez, J.M., Vidal, E.A., and Gutierrez, R.A. (2012). Integration of local and systemic signaling pathways for plant N responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 185–191.
- Amini, F., and Ehsanpour, A. (2005). Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na⁺/K⁺ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under in vitro salt stress. *Am J Biochem Biotech.* 1 ,204–208.
- Amiour, N., Imbaud, S., Clement, G., Agier, N., Zivy, M., Valot, B., Balliau, T., Armengaud, P., Quillere, I., Canas, R., et al. (2012). The use of metabolomics integrated with transcriptomic and proteomic studies for identifying key steps involved in the control of nitrogen metabolism in crops such as maize. *J. Exp. Bot.* 63, 5017-5033
- Amtmann, A., and Armengaud, P. (2009). Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12,275–283.
- Amzallag, G.N., Lerner, H.R., and Poljakoff-Mayber, A. (1990). Exogenous ABA as a modulator of response of sorghum to high salinity. *J. Exp. Bot.* 41, 1389-1394
- Anjana, S.U., Iqbal, M., and Abrol, Y.P. (2007). Are nitrate concentrations in leafy vegetables within safe limits? *Curr Sci.* 92, 355–360.
- Anjum, S., Xie, X., and Wang, L. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afr. J. Agric. Res.* 6, 2026-2032.
- Antoniadis, V., Polyzois, T., Golia, E. E., and Petropoulos, S. A. (2017). Hexavalent chromium availability and phytoremediation potential of *Cichorium spinosum* as affect by manure, zeolite and soil ageing. *Chemosphere* 171, 729-734.

- Ashraf, M., and Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Biol.* 59, 206–216.
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J.R., Maciejewski, A, and Wishart, D.S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* 44, W147–W153.
- Barneix, A.J., and Causin H.F. (1996) The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. *J Plant Physiol.* 149, 358–362
- Bar-Tal, A., Aloni, B., Karni, L., and Rosenberg, R. (2001). Nitrogen nutrition of greenhouse Pepper. II. Effects of nitrogen concentration and $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio on growth, transpiration, and nutrient uptake. *HortScience* 36, 1252–1259.
- Bartels, D., and Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24, 23–58.
- Bassil, E., and Blumwald, E. (2014). The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-typecation/ H^+ transporters. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22, 1–6.
- Becker, C., Urlic, B., JukicSpika, M., Kläring, P.H., Krumbein, A., Baldermann, S., et al. (2015). Nitrogen limited red and green leaf lettuce accumulate flavonoid glycosides, caffeic acid derivatives, and sucrose while losing chlorophylls, B-carotene and xanthophylls. *Plos One* 10(11): e0142867.
- Behr, J.H., Bouchereau, A., Berardocco, S., Seal, C.E., Flowers, T.J., and Zörb, C. (2017). Metabolic and physiological adjustment of *Suaeda maritima* to combined salinity and hypoxia. *Ann. Bot.* 119, 965–976.
- Benjamin, J.J., Lucini, L., Jothiramshekar, S., and Parida, A. (2019). Metabolomic insights into the mechanisms underlying tolerance to salinity in different halophytes. *Plant Physiol. Biochem.* 135, 528–545.
- Blom-Zandstra, M. (1989). Nitrate accumulation in vegetables and its relationship to quality. *Ann Appl Biol.* 115, 553–561.
- Borgognone, D., Colla, G., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Rea, E., and Schwarz, D. (2013). Effect of nitrogen form and nutrient solution pH on growth and mineral composition of self-grafted and grafted tomatoes. *Sci. Hortic.* 149, 61–69.

- Borgognone, D., Roupahel, Y., Cardarelli, M., Lucini, L., and Colla, G. (2016). Changes in biomass, mineral composition, and quality of cardoon in response to $\text{NO}_3^-:\text{Cl}^-$ ratio and nitrate deprivation from the nutrient solution. *Front. Plant Sci.* 7, 978.
- Borrelli, M.G., Fragasso, M., Nigro, F., Platani, C., Papa, R., Beleggia, R., and Trono, D. (2018). Analysis of metabolic and mineral changes in response to salt stress in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) genotypes, which differ in salinity tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 133, 57–70.
- Bouché, N., and Fromm, H. (2004). GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci.* 9, 110–115.
- Bowsher, C.G., Emes, M.J., Cammack, R., and Hucklesby, D.P. (1988). Purification and properties of nitrite reductase from roots of pea (*Pisum sativum* cv. Meteor). *Planta* 175, 334–340.
- Bowsher, C.G., Hucklesby, D.P., and Emes, M.J. (1989). Nitrate reduction and carbohydrate-metabolism in plastids purified from roots of *Pisum sativum* L. *Planta* 177, 359–366.
- Bowsher, C.G., Boulton, E.L., Rose, J., Nayagam, S., and Emes, M.J. (1992). Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose-phosphate pathway in non photosynthetic root plastids. *Plant J.* 2, 893–898.
- Brieudes, V., Angelis, A., Vougiotiannopoulou, K., Pratsinis, H., Kletas, D., Mitakou, S., et al.. (2016). Phytochemical analysis and antioxidant potential of the phytonutrient-rich decoction of *Cichorium spinosum* and *C. intybus*. *Planta Med.* 82, 1070-1078.
- Broschè, M., Vinocur, B., Alatalo, E.R., Lamminmäki, A., Teichmann, T., Ottow, E.A., Djilianov, D., Afif, D., Bogeat-Triboulot, M.B., Altman, A., Polle, A., Dreyer, E., Rudd, S., Paulin, L., Auvinen, P., and Kangasjärvi, J. (2005) Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. *Genome Biol.* 6:R101
- Bybordi, A., Tabatabaei, J., and Ahmadov, A. (2009). Effects of salinity and $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio on yield and quality in canola (*Brassica napus* L.). *Not Sci Biol.* 1, 67–72.
- Cabañero, F. J., Martínez-Ballesta, M. C., Teruel, J. A., and Carvajal, M. (2006). New evidence about the relationship between water channel activity and calcium in salinity-stressed pepper plants. *Plant Cell Physiol.* 47, 224–233.

- Chaillou, S., Vessey, J.K., Morot-Gaudry, J.F., Raper, C.D., Henry, L.T., and Boutin, J.P. (1991). Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. *J Exp Bot.* 42, 189–196.
- Chatzigianni, M., Alkhaled, B., Livieratos, I., Stamatakis, A., Ntatsi, G., and Savvas, D. (2018). Impact of nitrogen source and supply level on growth, yield and nutritional value of two contrasting ecotypes of *Cichorium spinosum* L. grown hydroponically. *J. Sci. Food Agric.* 98, 1615-1624
- Chaves, M.M., Flexas, J., and Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551–560.
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., et al.. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163, 1161–1168.
- Colla, G., Cardona Suárez, C. M., Cardarelli, M., and Rouphael Y. (2010). Improving nitrogen use efficiency in melon by grafting. *HortScience* 45, 559-565.
- Colla, G., Rouphael, Y., Jawad, R., Kumar, P., Rea, E., and Cardarelli, M. (2013a). The effectiveness of grafting to improve NaCl and CaCl₂ tolerance in cucumber. *Sci. Hortic.* 164, 380–391.
- Colla, G., Rouphael, Y., Mirabelli, C., and Cardarelli, M. (2011). Nitrogen-use efficiency traits of mini-watermelon in response to grafting and nitrogen-fertilization doses. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174, 933-941.
- Colla, G., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Svecova, E., Rea, E., and Lucini, L. (2013b). Effects of saline stress on mineral composition, phenolics acids and flavonoids in leaves of artichoke and cardoon genotypes grown in floating system. *J. Sci. Food Agric.* 93, 1119-1127.
- Conde, A., Chaves, M.M., and Gerós, H. (2011). Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. *Plant Cell Physiol.* 52, 1583–1602
- Cooke, D.T., and Burden, R.S. (1990) Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPases. *Physiol Plant* 78, 153–159.
- Cuin, T.A., and Shabala, S. (2005). Exogenously supplied compatible solutes rapidly ameliorate NaCl-induced potassium efflux from barley roots. *Plant Cell Physiol.* 46, 1924–1933.

- Cuoee, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., and Amrani, A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 57, 449-459.
- De Kreijl, C., Voogt, W., and Baas, R. (1999). Nutrient Solutions and Water Quality for Soilless Culture. Research Station for Floriculture and Glasshouse Vegetables, Naaldwijk, The Netherlands.
- de Oliveira Ferreira, E.V., Novais, R.F., Dubay, G.R., Pereira, G.L., Araujo, W.L., and Jackson, R.B. (2016). Nitrogen supply affects root and shoot amino acid composition in Eucalyptus clones. *Aust. J. Crop Sci.* 10, 280–290.
- De Rijck, G., and Schrevens, E. (1998). Cationic speciation in nutrient solutions as a function of pH. *J Plant Nutr.* 21, 861–870.
- Dickson, R.W., Fisher, P.R., Argo, W.R., Jacques, D.J., Sartain, J.B., Trenholm, L.E., et al., (2016). Solution ammonium: nitrate ratio and cation/anion uptake affect acidity or basicity with floriculture species in hydroponics. *Sci Hortic.* 200, 36–44.
- Elkahoui, S., Smaouri, A., Zarrouk, M., Ghrir, R., and Limam, F. (2004). Salt-induced lipid changes in *Catharanthus roseus* cultured cell suspensions *Phytochemistry*, 65, 1911-1917
- Fataftah, N., Mohr, C., Hajirezaei, M.R., von Wirén, N., and Humbeck, K. (2018). Changes in nitrogen availability lead to a reprogramming of pyruvate metabolism. *Plant* 18, 77
- Fernie, A.R. (2003). Metabolome characterization in plant system analysis. *Funct. Plant Biol.* 30, 111–120.
- Fernie, A.R., Trethewey, R.N., Krotzky, A.J., and Willmitzer, L. (2004) Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 763–769.
- Fernie, AR., Aharoni, A., Willmitzer, L., Stitt, M., Tohge, T., Kopka, J., Carroll, A.J., Saito, K, Fraser, P.D., and DeLuca, V. (2011). Recommendations for reporting metabolite data. *Plant Cell* 23, 2477–2482
- Ferrario-Mery, S., Hodges, M., Hirel, B., and Foyer, C.H. (2002). Photorespiration-dependent increases in phosphoenolpyruvate carboxylase, isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-dependent glutamine-alpha-ketoglutarate aminotransferase. *Planta* 214, 877–886.

- Foyer, C.H., and Ferrario, S. (1994). Modulation of carbon and nitrogen metabolism in transgenic plants with a view to biomass production. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 909–915.
- Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A., and Becker, T.W. (1998). Drought induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiol.* 117, 283–292.
- Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., and Stitt, M. (2006b). Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* 46, 533–548.
- Gent, M. (2003). Solution electrical conductivity and ratio of nitrate to other nutrients affect accumulation of nitrate in hydroponic lettuce. *HortScience* 38, 222–227.
- Gibson, S. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 93–102.
- Gill, S.S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Gong, Q., Li, P., Ma, S., Indu Rupassara, S., Bohnert, H.J. (2005). Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 44, 826–839.
- Grattan, S. R., and Grieve, C. M. (1998). Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Sci. Hortic.* 78, 127–157.
- Greenway, H., and Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 149–190.
- Grzebelus, D., and Baranski, R. (2001). Identification of accessions showing low nitrate accumulation in a germplasm collection of garden beet. *Acta Hortic.* 563, 253–255.
- Guo, S., Zhou, Y., Shen, Q., and Zhang, F. (2007). Effect of ammonium and nitrate nutrition on some physiological processes in higher plants growth, photosynthesis, photorespiration, and water relations. *Plant Biol.* 9, 21–29.

- Hafiz Che-Othman, M.H., Jacoby, R.P., Millar, A.H., and Taylor, N.L. (2020). Wheat mitochondrial respiration shifts from the tricarboxylic acid cycle to the GABA shunt under salt stress. *New Phytol.* 225, 1166–1180.
- Halket, J.M., Waterman, D., Przyborowska, A.M., Patel, R.K., Fraser, P.D., and Bramley, P.M. (2005). Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J Exp Bot.* 56, 219–243.
- Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L., Shin, J.H., Ahmad, B., Shin, D.H., and Lee, I.J. (2010). Exogenous gibberellic acid reprograms soybean to higher growth and salt stress tolerance. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7226-7232
- Harada, H., Yoshimura, Y., Sunaga, Y., Hatanaka, T., and Sugita, S. (2003). Breeding of Italian rye grass (*Lolium multiflorum* Lam.) for a low nitrate concentration by seedling test. *Euphytica* 129, 201–209.
- Harrison, J., Hirel, B., and Limani, A.M. (2004). Variation in nitrate uptake and assimilation between two ecotypes of *Lotus japonicas* and their recombinant in bred lines. *Physiol Plant* 120, 124–131.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 463–499.
- Hasegawa, P. M. (2013). Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environ. Exp. Bot.* 92, 19–31.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M., Wani, A., Pichtel, and Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments. *Plant Signal. Behav.* 11, 1456-1466.
- Heil, J., Vereecken, H., and Brüggemann, N. (2016). A review of chemical reactions of nitrification intermediates and their role in nitrogen cycling and nitrogen trace gas formation in soil. *Eur J Soil Sci.* 67, 23–39.
- Hellmann, H., Funck, D., Rentsch, D., and Frommer, W.B. (2000). Hypersensitivity of an Arabidopsis sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiol.* 122, 357–367.
- Hepler, P. K. (2005). Calcium: A Central Regulator of Plant Growth and Development. *Plant Cell* 17, 2142–2155.

- Heuer, B. (1991). Growth, photosynthesis and protein content in cucumber plants as affected by supplied nitrogen form. *J Plant Nutr.* 14, 363–373.
- Hildebrandt, T.M., Nesi, A.N., Araújo, W.L., and Braun, H.P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Mol. Plant* 8, 1563–1579.
- Hoff, T., Truong, H.N., and Caboche, M. (1994). The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant Cell Environ.* 17, 489–506.
- Hu, Y., and Schmidhalter, U. (2005). Drought and salinity: a comparison of their effects on the mineral nutrition of plants. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 168, 541–549
- Hu, M., Shi, Z., Zhang, Z., Zhang, Y., and Li, H. (2012). Effects of exogenous glucose on seed germination and antioxidant capacity in wheat seedlings under salt stress. *Plant Growth Regul.* 68, 177-188.
- Ibrahim, M.H., Jaafar, H.Z.E., Rahmat, A., and Rahman, Z.A. (2010). The relationship between phenolics and flavonoids production with total non structural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila* Benth. under high CO₂ and nitrogen fertilization. *Molecules* 16, 162–174.
- Jang, J., Leon, P., Zhou, L., and Sheen, J. (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9, 15-19.
- Jung, J., and Park, C. (2011). Auxin modulation of salt stress signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Signal. Behav.* 6, 1198-1200
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., et al., (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954–3962.
- Karamanou, D.A., and Aliferis, K.A. (2019). The yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) YCF1 vacuole transporter: Evidence on its implication into the yeast resistance to flusilazole as revealed by GC/ESI/MS metabolomics. *Pestic. Biochem. Physiol.* 165, 104475
- Kiani-Pouya, A., Roessner, U., Jayasinghe, N.S., Lutz, A., Rupasinghe, T., Bazihizina, N., Bohm, J., Alharbi, S., Hedrich, R., and Shabala, S. (2017). Epidermal bladder cells confer salinity stress tolerance in the halophyte quinoa and *Atriplex* species. *Plant. Cell Environ.* 40, 1900–1915

- Kind, T., Wohlgemuth, G., Lee do, Y., Lu, Y., Palazoglu, M., Shahbaz, and S., and Fiehn, O. (2009). FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-off light gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem.* 81, 10038–10048
- Kinjo, T., and Pratt, P. F. (1971). Nitrate Adsorption: II. In Competition with Chloride, Sulfate, and Phosphate. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 35, 725-728.
- Kishor, P.B.K., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C.A.A., and Verma, D.P.S. (1995). Over-expression of [δ]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108, 1387–1394.
- Klados, E., and Tzortzakis, N. (2014). Effects of substrate and salinity in hydroponically grown *Cichorium spinosum*. *Soil Sci. Plant Nutr.* 14, 211-222.
- Klein, D., Morcuende, R., Stitt, M. and Krapp, A. (2000). Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below a critical level. *Plant Cell Environ.* 23, 863–871.
- Knight, S. L., Rogers, R. B., Smith, M. A. L., and Sporaer, L. A. (1992). Effects of NaCl salinity on miniature dwarf tomato ‘Micro-Tom’: I. Growth analyses and nutrient composition. *J. Plant Nutr.* 15, 2315-2327.
- Koch, K.E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 509-540
- Kopka, J., Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., Bergmüller, E., Dörmann, P., Weckwerth, W., Gibon, Y., Stitt, M., Willmitzer, L., Fernie, A.R., and Steinhauser, D. (2005). GMD@ CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* 21, 1635–1638
- Kostopoulou, S., Ntatsi, G., Arapis, G., and Aliferis, K.A. (2020). Assessment of the effects of metribuzin, glyphosate, and their mixtures on the metabolism of the model plant *Lemna minor* L. applying metabolomics. *Chemosphere* 239, 124582.
- Kotsiras, A., Olympios, C.M., Drosopoulos, J., and Passam, H.C. (2002). Effects of nitrogen form and concentration on the distribution of ions within cucumber fruits. *Sci Hortic.* 95, 175–183.

- Kotsiras, A., Olympos, C.M., and Passam, H.C. (2005). Effects of nitrogen form and concentration on yield and quality of cucumbers grown on rockwool during spring and winter in southern Greece. *J Plant Nutr.* 28, 2027–2035
- Król, A., Amarowicz, R., and Weidner, S. (2015). The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *J. Plant Physiol.* 189, 97-104
- Krouk, G., Crawford, N.M., Coruzzi, G.M., and Tsay, Y.F. (2010). Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 266–273.
- Kumari, S., Stevens, D., Kind, T., Denkert, C., and Fiehn, O. (2011) Applying in silico retention index and mass spectra matching for identification of unknown metabolites in accurate mass GC-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 83, 5895–5902.
- Kumari, A., Das, P., Parida, A.K., and Agarwal, P.K. (2015). Proteomics, metabolomics and ionomics perspectives of salinity tolerance in halophytes. *Front. Plant Sci.* 6, 1–20.
- Kumari, A., and Parida, A.K. (2018). Metabolomics and network analysis reveal the potential metabolites and biological pathways involved in salinity tolerance of the halophyte *Salvadora persica*. *Environ. Exp. Bot.* 148, 85–99.
- Kusano, M., Fukushima, A., Redestig, H., and Saito, K. (2011). Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 1439–1453.
- Kyriacou, M.C., Rouphael, Y., Di Gioia, F., Kyrtzsis, A., Serio, F., Renna, M., et al. (2016). Micro-scale food production and the rise of microgreens. *Trends Food Sci Technol.* 57, 103-115.
- Kyriacou, M. C. and Rouphael, Y. (2018). Towards a new definition of quality for fresh vegetables and fruits - Review. *Sci. Hortic.* 234, 463-469.
- Lam, H.M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., MeloOliveira, R., and Coruzzi, G.M. (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47, 569–593.
- Lancien, M., Martin, M., Hsieh, M.H., Leustek, T., Goodman, H., and Coruzzi, G.M. (2002). Arabidopsis glt1-T mutant defines a role of NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *Plant J.* 29, 347–358.

- Lang, H.J., and Elliott, G.C. (1991). Influence of ammonium: nitrate ratio and nitrogen concentration on nitrification activity in soilless potting media. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 116, 642–645.
- Lazof, D. B. and Bernstein, N. (1999). Effects of salinization on nutrient transport to lettuce leaves: Consideration of leaf developmental stage. *New Phytol.* 144, 85-94.
- Li, Q., Yu, H.M., Meng, X.F., Lin, J.S., Li, Y.J., and Hou, B.K. (2018). Ectopic expression of glycosyltransferase UGT76E11 increases flavonoid accumulation and enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Biol.* 20, 10–19.
- Li, X., Marian Brestic, M., Tan, D. X., Zivcak, M., Zhu, X., Liu, S., et al.. (2018). Melatonin alleviates low PS I-limited carbon assimilation under elevated CO₂ and enhances the cold tolerance of offspring in chlorophyll b-deficient mutant wheat. *J. Pineal Res.* 6, 4:e12453.
- Liang, W., Ma, X., Wan, P., and Liu, L. (2018). Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 286-291.
- Lim, J. H., Park, K. J., Kim, B. K., Jeong, J. W., and Kim, H. J. (2012). Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout. *Food Chem.* 135, 1065-1070.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., and Fernie, A.R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc.* 1, 387–396.
- Liu, X., Wu, H., Ji, C., Wei, L., Zhao, J., and Yu, J. (2013). An integrated proteomic and metabolomic study on the chronic effects of mercury in *Suaeda salsa* under an environmentally relevant salinity. *PLoS One* 8, e64041.
- Liu, S.S., Wang, W.Q., Li, M., Wan, S.B., and Sui, N. (2017). Antioxidants and unsaturated fatty acids are involved in salt tolerance in peanut. *Acta Physiol. Plant.* 39, 207-216.
- Llanes, A., Arbona, V., Gomez-Cadenas, A., and Luna, V. (2016). Metabolomic profiling of the halophyte *Prosopis strombulifera* shows sodium salt- specific response. *Plant Physiol. Biochem.* 108, 145–157.
- Lucini, L., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., and Colla, G. (2015). The effect of a plant-derived protein hydrolysate on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Sci. Hortic.* 182,124-133.

- Lucini, L., Borgognone, D., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bernardi, J., and Colla, G. (2016). Mild potassium chloride stress alters the mineral composition, hormone network, and phenolic profile in artichoke leaves. *Front Plant Sci.* 7, 948.
- Mansour, M.M.F. (2000). Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.* 43, 491–500.
- Mansour, M. M. F., and Ali, E. F. (2017). Glycinebetaine in saline conditions: an assessment of the current state of knowledge. *Acta Physiol. Plant.* 39:56.
- Marin, I.C., Loef, I., Bartetzko, L., Searle, I., Coupland, G., Stitt, M., and Osuna, D. (2011). Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta* 233, 539–552.
- Marschner, P. (2012). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Elsevier, Amsterdam, p. 651.
- Mass, E. V., Ogata, G., and Garber, M. J. (1972). Influence of salinity on Fe, Mn, and Zn uptake by plants. *Agron. J.* 64, 793-795.
- Matt, P., Schurr, U., Krapp, A. and Stitt, M. (1998). Growth of tobacco in short day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes of the NIA transcript and low nitrate reductase activity, and an inhibition of amino acid synthesis. *Planta*, 207, 27–41.
- Miranda, R.S., Gomes-Filho, E., Prisco, J.T., and Alvarez-Pizarro, J.C. (2016). Ammonium improves tolerance to salinity stress in *Sorghum bicolor* plants. *Plant Growth Regul.* 78, 121–131.
- Mota, M., Neto, C.B. Monteiro AA and Oliveira CM, (2011). Preferential ammonium uptake during growth cycle and identification of ammonium transporter genes in young pear trees. *J Plant Nutr.* 34,798–814.
- Munns, R., and Termaat, A. (1986). Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 143-160.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress, *Plant Cell Environ.* 25, 239–250.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167, 645–663.
- Munns, R., Jwmes, R.A., and Lauchli, A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57, 1025- 1043.

- Munns, R., and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651–681.
- Munns, R., and Gilliham, M. (2015). Salinity tolerance of crops - what is the cost? *New Phytol.* 208, 668–673.
- Munns, R., James, R.A., Gilliham, M., Flowers, T.J., and Colmer T.D. (2016). Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Funct. Plant Biol.* 43, 1103-1113.
- Nagata, N., and Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruits. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*, 39, 925-928.
- Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S. and Khan, N.A. (2011). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *J. Plant Physiol.* 168, 807-815
- Nemati, I., Moradi, F., Gholizadeh, S., Esmaeili, M., and Bihamta, M. (2011). The effect of salinity stress on ions and soluble sugars distribution in leaves, leaf sheaths and roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Soil Environ.* 57, 26-33.
- Neuberg, M., Pavlíková, D., Pavlík, M., and Balík, J. (2010). The effect of different nitrogen nutrition on proline and asparagine content in plant. *Plant Soil Environ.* 56, 305–311.
- Nicola, S., Egea-Gilabert, C., Niñirola, D., Conesa, E., Pignata, G., Fontana, E., et al., (2015). Nitrogen and aeration levels of the nutrient solution in soilless cultivation systems as important growing conditions affecting inherent quality of baby leaf vegetables: a review. *Acta Hortic.* 1099, 167–177.
- Nieman, R. H., and Clark, R. A. (1976). Interactive effects of salinity and phosphorus nutrition on the concentrations of phosphate and phosphate esters in mature photosynthesizing corn leaves. *Plant Physiol.* 57, 157-161.
- Ntatsi, G., Aliferis, K.A., Roupahel, Y., Napolitano, F., Makris, K., Kalala, G., et al. (2017a). Salinity source alters mineral composition and metabolism of *Cichorium spinosum*. *Environ. Exp. Bot.* 141, 113-123.

- Ntatsi, G., Savvas, D., Papasotiropoulos, V., Katsileros, A., Zuther, E., Hinch, D.K., et al. (2017b). Rootstock sub-optimal temperature tolerance determines transcriptomic responses after long-term root cooling in rootstocks and scions of grafted tomato plants. *Front. Plant Sci.* 8, 911
- Obata, A and Fernie, R. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3225–3243.
- Okazaki, K., Oka, N., Shinano, T., Osaki, M., and Takebe, M. (2008). Differences in the metabolite profiles of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaf in different concentrations of nitrate in the culture solution. *Plant Cell Physiol.* 49, 170–177.
- Orsini, F., Maggio, A., Rouphael, Y., and De Pascale, S. (2016). ‘Physiological Quality’ of organically grown vegetables. *Sci. Hortic.* 208, 131–139.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V.P., and Prasad, S.M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4056–4075.
- Pattanagul, W., and Thitisaksakul, M. (2008). Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Indian J. Exp. Biol.* 46, 736-742.
- Petropoulos, S. A., Fernandes, A., Ntatsi, G., Levizou, E., Barros, L., and Ferreira, I. C. F. R. (2016). Nutritional profile and chemical composition of *Cichorium spinosum* ecotypes. *LWT-Food Sci. Technol.* 73, 95-101.
- Petropoulos, S. A., Levizou, E., Ntatsi, G., Fernandes, A., Petrotos, K., Akoumianakis, K et al. (2017). Salinity effect on nutritional value, chemical composition and bioactive compounds of *Cichorium spinosum* L. *Food Chem.* 214, 129-136.
- Pill, W.G., and Lambeth, V.N. (1977). Effects of NH_4^+ and NO_3^- nutrition with and without pH adjustment on tomato growth, ion composition, and water relations. *J Am Soc Hortic Sci.* 102, 78–81.
- Raab, T.K. and Terry, N. (1994). Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* 105, 1159-1166.

- Rahayu, Y.S., Walch-Liu, P., Neumann, G., Romheld, V., von Wiren, N., and Bangerth, F. (2005). Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃⁻-induced stimulation of leaf growth. *J. Exp. Bot.* 56, 1143–1152.
- Rai, S.P., Luthra, R., and Kumar, S. (2003). Salt-tolerant mutants in glycophytic salinity response (GSR) genes in *Catharanthus roseus*. *Theor. Appl. Genet.* 106, 221–230.
- Rengel, Z. (1992). The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environ.* 15, 625–632.
- Richter, J.A., Erban, A., Kopka, J., and Zörb, C. (2015). Metabolic contribution to salt stress in two maize hybrids with contrasting resistance. *Plant Sci.* 233, 107–115.
- Rinaldi, M.A., Patel, A.B., Park, J., Lee, K., and Strader, L.C. (2016). *Arabidopsis thaliana* mutants with altered seedling peroxisome size or distribution reveal genes important for peroxisomal metabolism. *Genetics* 204, 1089–1115.
- Rolland, F., Moore, B., and Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14, 185–205.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., Gonzalez, J.A., Hilal, M., and Prado, F.E. (2009). Soluble sugars- metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* 4, 388-393.
- Rouphael, Y., De Micco, V., Arena, C., Raimondi, G., Colla, G., and De Pascale, S. (2017a). Effect of *Ecklonia maxima* seaweed extract on yield, mineral composition, gas exchange and leaf anatomy of zucchini squash grown under saline conditions. *J. Appl. Phycol.* 29, 459-470.
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., and Colla, G. (2017b). Synergistic action of a microbial-based biostimulant and a plant derived-protein hydrolysate enhances lettuce tolerance to alkalinity and salinity. *Front. Plant Sci.* 8, 131.
- Rouphael Y., and Kyriacou M. C. (2018). Enhancing quality of fresh vegetables through salinity eustress and biofortification applications facilitated by soilless cultivation. *Front. Plant Sci.* 9, 1254.
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bassal, A., Leonardi, C., Giuffrida, F., and Colla, G. (2012). Vegetable quality as affected by genetic, agronomic and environmental factors. *J. Food Agric. Environ.* 10, 680-688.

- Rouphael, Y., Raimondi, G., Lucini, L., Carillo, P., Kyriacou, M. C., Colla, G., et al. (2018a). Physiological and metabolic responses triggered by omeprazole improve tomato plant tolerance to NaCl stress. *Front. Plant Sci.* 9, 249.
- Rouphael, Y., Petropoulos, S. A., Cardarelli, M., and Colla, G. (2018b). Salinity as eustressor for enhancing quality of vegetables. *Sci. Hortic.* 234, 361–369.
- Rouphael, Y., Kyriacou, M. C., Petropoulos, S. A., De Pascale, S., and Colla, G. (2018c). Improving vegetable quality in controlled environments. *Sci. Hortic.* 234, 275–289.
- Roy, S. J., Negrao, S., and Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 115–124.
- Saito, K., and Matsuda F. (2010). Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 463–489.
- Salahas, G., Papasavvas, A., Giannakopoulos, A., Tselios, T., Konstantopoulou, H., and Savvas, D. (2011). Impact of nitrogen deficiency on biomass production, leaf gas exchange, and total phenol and beta cyanin concentrations in red beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) plants. *Eur J Hortic Sci.* 76, 194–200.
- Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., and Hayat, S. (2016) Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiol Biochem.* 109, 54–61.
- Sanchez, E., Soto, J.M., Garcia, P.C., Lopez-Lefebvre, L.R., Rivero, R.M., Ruizand, J.M., et al., (2000). Phenolic and oxidative metabolism as bioindicators of nitrogen deficiency in French bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.cv.strike). *Plant Biol.* 2, 272–277.
- Sanchez-Raya, A. J., and Delgado, I. C. (1996). Mineral nutrient transport by sunflower seedlings grown under saline conditions (NaCl). *J. Plant Nutr.* 19, 1463–1475.
- Sanghera, G. S., Wani, S. H., Hussain, W., and Singh, N. B. (2011). Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Curr. Genom.* 12, 30–43.
- Santamaria, P., Elia, A., and Gonnella, M. (1997). $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ ratio changes, with drawal of N before the harvest and reduction of nitrate leaf content in endive. In Proceedings of 9th International Congress on Soilless Culture, ed. by ISOSC. Grafoprint, Bennekom, The Netherlands, pp. 417–435.

- Santamaria, P. (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *J Sci Food Agric.* 86, 10–17.
- Sarasketa, A., González-Moro, M.B., González-Murua, C., and Marino, D. (2016). Nitrogen source and external medium pH interaction differentially affects root and shoot metabolism in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 7, 1–29.
- Savvas, D., and Adamidis, C. (1999). Automated management of nutrient solutions based on target electrical conductivity, pH, and nutrient concentration ratios. *J Plant Nutr.* 22, 1415–1432.
- Savvas, D., Nasi, E., Moustaka, E., Mantzos, N., Barouchas, P., Passam, H.C., et al., (2006). Effects of ammonium nitrogen on lettuce grown on pumice in a closed hydroponic system. *HortScience* 41, 1667–1673.
- Savvas, D., Leneti, H., Mantzos, N., Kakarantza, L., and Barouchas, P. (2010). Effects of enhanced NH_4^+ -N supply and concomitant changes in the concentrations of other nutrients needed for ion balance on the growth, yield, and nutrient status of eggplants grown on rockwool. *J Hort Sci Biotechnol.* 85, 355–361
- Savvas, D., Gianquinto, G.P., Tüzel, Y., and Gruda, N. (2013). Soilless culture, in Good Agricultural Practices for Greenhouse Vegetable Crops. Principles for Mediterranean Climate Areas. FAO, Plant Production and Protection Paper 217. FAO, Rome, chapter 12, pp.303–354.
- Schachtman, D.P., Reid, R.J., and Ayling, S.M. (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116, 447–453.
- Scheible, W.R., Lauerer, M., Schulze, E.D., Caboche, M., and Stitt, M. (1997a). Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant J.* 11, 671–691.
- Scheible, W.R., Lauerer, M., Schulze, E.D., Caboche, M., and Stitt, M. (1997b) Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant J.* 11, 671–691.
- Scheible, W.R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N et al., (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol.* 136, 2483–2499.

- Schlüter, U., Masher, M., Colmsee, C., Scholz, U., Bräutigam, A., Fahnenstich, H., and Sonnewald, U. (2012). Maize source leaf adaptation to nitrogen deficiency affects not only nitrogen and carbon metabolism but also control phosphate homeostasis. *Plant Physiol.* 160, 1384–1406.
- Sengupta, S., Mukherjee, S., and Goswami, L. (2012). Manipulation of inositol metabolism for improved plant survival under stress: a network engineering approach. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 21, 15–23.
- Shabala, S., and Cuin, T. A. (2007). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol. Plant.* 133, 651–669.
- Shabala, S. (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann Bot.* 11, 1209–1221
- Shabala, S., and Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiol. Plantar.* doi: 10.1111/ppl.12165.
- Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J.C. (1999). Sugars as signaling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 410–418.
- Siddiqui, M.H., Khan, M.N., Mohammad, F., and Khan, M.M.A. (2008). Role of nitrogen and gibberellic acid (GA₃) in the regulation of enzyme activities and in osmoprotectant accumulation in *Brassica juncea* L. under salt stress. *J Agron Crop Sci.* 194, 214–224
- Silva-Ortega, C.O., Ochoa-Alfaro, A.E., Reyes-Agüero, J.A., Aguado-Santacruz, G.A., and Jiménez-Bremont, J.F. (2008). Salt stress increases the expression of P5CS gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 82–92.
- Silveira, J.A.G., Viégas, R.D.A., da Rocha, I.M.A., Moreira, A.C.D.O.M., Moreira, R.D.A., and Oliveira, J.T.A. (2003). Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Plant Physiol.* 160, 115–123.
- Singleton, V.L., and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphormolybdic–phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 16, 144–158.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299, 152–178
- Sivasankar, S., and Oaks, A. (1996). Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiol Biochem.* 34, 609– 620.
- Slavin, J. L., and Lloyd, B. (2012). Health benefits of fruits and vegetables. *Adv Nutr.* 3, 506–516.
- Soltani, F., Kashi, A., and Babalar, M. (2007). Effect of nitrogen form on yield, fruit number and leaf nutrient content of two greenhouse cucumber cultivars in soilless culture. *Acta Hortic.* 731, 273–276.
- Sonnewald, U., Brauer, M., Schaewen, A., Stitt, M., and Willmitzer, L. (1991). Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *Plant J.* 1, 95-106.
- Sonneveld, C., and Voogt, W. (2009). *Plant Nutrition of Greenhouse Crops*. Springer, Dordrecht, pp. 431.
- Stitt, M. (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 178–186.
- Stitt, M., and Krapp, A. (1999). The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: The physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* 22, 583–621.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A., and Giridarakumar, S. (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Sci.* 161, 613-619.
- Sung, J., Lee, S., Lee, Y., Ha, S., Song, B., Kim, T., Waters, B.M., and Krishnan, H.B. (2015). Metabolomic profiling from leaves and roots of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium-deficient condition. *Plant Sci.* 241, 55–64.
- Sung, J., Yun, H., Back, S., Fernie, A.R., Kim, Y.X., Lee, Y., Lee, S., Lee, D., and Kim, J. (2018) Changes in mineral nutrient concentrations and C-N metabolism in cabbage shoots and roots following macronutrient deficiency. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 181, 777–786
- Szepesi, A., Csiszar, J., Gemes, K., Horvarth, E., Horvath, F., Simon, L.M., and Tari, I. (2009). Salicylic acid improves the acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase

- activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ contents of the leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *J. Plant Physiol.* 166, 914-925
- Tester, M., and Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91, 503– 527.
- Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., Hollman, P., Chamalides, C., Foufa, E., Kaloudis, T., et al., (2000). Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chem.* 70, 319–323.
- Tschoep, H., Gibon, Y., Carillo, P., Armengaud, P., Szecowka, M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Koehl, K., and Stitt, M. (2009). Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 32, 300–318
- Tsugawa H1, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, VanderGheynst J, Fiehn O, and Arita M. (2015). MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat. Methods* 12, 523-6.
- Tuna, A. L., Kaya, C., Ashraf, M., Altunlu, H., Yokas, I., and Yagmur, B. (2007). The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 59, 173-178.
- Tunçturk, M., Tunçturk, R., and Yasar, F. (2008). Changes in micronutrients, dry weight and plant growth of soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars under salt stress. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 1650-1654.
- Turhan, E., and Eris, A. (2005). Changes of Micronutrients, Dry Weight, and Chlorophyll Contents in Strawberry Plants Under Salt Stress Conditions. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 36, 1021–1028.
- Uchida, A., Andre, T.J., Takashi, H., Temhiro, T., and Tetsuko, T. (2002). Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci.* 163, 515-523
- Urbanczyk-Wochniak, E and. Fernie, AR. (2005). Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *J. Exp. Bot.* 56, 309–321.
- Vardavas, C. I., Majchrzak, D., Wagner, K. H., Elmadfa, I., and Kafatos, A. (2006). The antioxidant and phyloquinone content of wildy grown greens in Crete. *Food Chem.* 99, 813-821.

- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem.* 46, 4113–4117.
- Venema, J. H., Posthumus, F., and van Hasselt, P. R. (1999). Impact of suboptimal temperature on growth, photosynthesis, leaf pigments and carbohydrates of domestic and high-altitude wild *Lycopersicon* species. *Plant Physiol.* 155, 711-718.
- Verbruggen, N., and Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753–759..
- Vidal, E.A., and Gutierrez, R.A. (2008). A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 521–529.
- Víllora, G., Moreno, D.A., Pulgar, G., and Romero, L. (2000). Yield improvement in zucchini under salt stress: determining micronutrient balance. *Sci. Hortic.* 86,175-183.
- Walker, R. (1990) Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Addit Contam.* 7, 717–768.
- Wang, R.C., Okamoto, M., Xing, X.J., and Crawford, N.M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol.* 132, 556–567.
- Wang, W., Ren, G., Li, F., Qi, S., Xu, Y., Wang, B., et al. (2018a). A chalcone synthase gene *AeCHS* from *Abelmoschus esculentus* regulates flavonoid accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Acta Physiol. Plant.* 40, 97.
- Wani, A., Ahmad, A., Hayat, S., and Fariduddin, Q. (2013). Salt-induced modulation in growth, photosynthesis and antioxidant system in two varieties of *Brassica juncea*. *Saudi J. Biol. Sci.* 20, 183-193.
- Weisany, W., Sohrabi. Y., Heidari, G., Siosemardeh, A., and Badakhshan, H. (2014). Effects of zinc application on growth, absorption and distribution of mineral nutrients under salinity stress in soybean (*Glycine max* L.). *J. Plant Nutr.* 37, 2255–2269.

- Widodo, J.H.P., Newbiggin, E., Tester, M., Bacic, A., and Roessner, U. (2009). Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *J. Exp. Bot.* 60, 4089–4103.
- Wu, J., Seliskar, D.M., and Gallagher, J.L. (1998). Stress tolerance in the marsh plant *Spartina patens*: impact of NaCl on growth and root plasma membrane lipid composition. *Physiol Plant.* 102, 307–317.
- Wu, D., Cai, S., Chen, M., Ye, L., Chen, Z., Zhang, H., Dai, F., Wu, F., and Zhang, G. (2013). Tissue metabolic responses to salt stress in wild and cultivated barley. *PLoS One* 8, e55431.
- Wu, X., He, J., Chen, J., Yang, S., and Zha, D. (2013). Alleviation of exogenous 6-benzyladenine on two genotypes of eggplant (*Solanum melongena* Mill.) growth under salt stress. *Protoplasma* 251, 169–176
- Wu, H. (2018). Plant salt tolerance and Na⁺ sensing and transport. *The Crop J.* 6, 215-225.
- Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 208, 2819–2830.
- Zeghichi, S., Kallithraka, S., and Simopoulos, A. P. (2003). Nutritional composition of Molokhia (*Corchorus olitorius*) and stamnagathi (*Cichorium spinosum*). *World Rev. Nutr. Diet.* 91, 1-21.
- Zhang, Y.Y., Liu, J., and Liu, Y.L. (2004). Nitric oxide alleviates growth inhibition of maize seedlings under salt stress. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* 30, 455–459.
- Zhang, M., Barg, R., Yin, M., GuetaDahan, Y., LeikinFrenkel, A., Salts, Y., Shabtai, S., Ben and Hayyim, G. (2005) Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct x-3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. *Plant J.* 44, 361–371
- Zhang, J., Yang, D., Li, M., and Shi, L. (2016). Metabolic profiles reveal changes in wild and cultivated soybean seedling leaves under salt stress. *PLoS One* 11, 1–17.
- Zhang, Q., Song, X., and Bartels, D. (2018). Sugar metabolism in the desiccation tolerant grass *Oropetium thomaeum* in response to environmental stresses. *Plant Sci.* 270, 30-36
- Zhishen, J., Mengcheng, T., and Wu, J. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555-559

- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53, 247–273.
- Zhu, J.K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 441–445.
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., and Yu J. (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Sci.* 167, 527-533
- Zolman, B.K., Silva, I.D., and Bartel, B. (2001). The Arabidopsis pxa1 mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiol.* 127, 1266–1278.
- Ακουμιανάκης, Κ. (2010). Το σταμναγκάθι: ένα εξαιρετο αυτοφυές λαχανευόμενο είδος που εξελίχθηκε σε καλλιεργούμενο. Αγροτύπος.
- Αλιμπέρτης, Α. (1994). Κρήτη, το φαράγγι της Σαμαριάς και τα φυτά του. Τυποκρέτα. Σελ. 68- 69.
- Κλάδος, Ε., & Klados, Ε. (2010). Επίδραση υποστρώματος και αλατότητας σε υδροπονική καλλιέργεια σταμναγκαθίου. (πτυχιακή μελέτη).
- Μενδώνη, Ε. (2015). Επίδραση της εποχής σποράς στην ανάπτυξη και την ποιότητα αυτοφών λαχανευόμενων ειδών (πτυχιακή μελέτη)
- Παππά, Ε. (2016). Καταγραφή της διαχρονικής εξέλιξης των μοεφολογικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών δέκα λαχανευόμενων ειδών, καλλιεργούμενων σε σύστημα επίπλευσης. (πτυχιακή μελέτη).
- Σάββας, Δ., 2016. Γενική Λαχανοκομία. Εκδόσεις Πεδίο, Αθήνα, σελ. 706.
- Σταυριδάκης, Κ. (2006). Η άγρια βρώσιμη χλωρίδα της Κρήτης, Εκδόσεις Κλεόνικος Γ. Σταυριδάκης, Ρέθυμνο
- Τσαρούχας, Η. (2011). Συγκριτική μελέτη της επίδρασης του συστήματος επίπλευσης και του φυτοδοχείου στην ανάπτυξη και παραγωγή σταμναγκαθίου (*Cichorium spinosum*) (πτυχιακή μελέτη)
- Link: www.bicofcrete.gr