



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΑΕΙΦΟΡΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ
ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΓΡΟΜΕΤΕΩΡΟΛΟΓΙΑ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μεταβολομική και γονιδιοματική μελέτη ποικιλιών κτηνοτροφικού
κουκιού (*Vicia faba L.*) με σκοπό την εύρεση δεικτών για βελτίωση της
ποιότητας του σπόρου»



Λεωνίδας Π. Κουγιτέας

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΤΑΝΗ ΕΛΕΝΗ, Επίκουρη καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2023**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μεταβολομική και γονιδιωματική μελέτη ποικιλιών κτηνοτροφικού
κουκιού (*Vicia faba L.*) με σκοπό την εύρεση δεικτών για βελτίωση της
ποιότητας του σπόρου»

“Metabolomic and genomic study in fodder faba bean (*Vicia faba*) for
seeds’ nutritional quality biomarkers”

Λεωνίδας Π. Κουγιτέας

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΤΑΝΗ ΕΛΕΝΗ, Επίκουρη καθηγήτρια ΓΠΑ (Επιβλέπουσα)

ΜΠΕΜΠΕΛΗ ΠΗΝΕΛΟΠΗ, Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΛΙΦΕΡΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Επίκουρος καθηγητής ΓΠΑ

Μεταβολομική και γονιδιοματική μελέτη ποικιλιών κτηνοτροφικού κουκιού (*Vicia faba* L.) με σκοπό την εύρεση δεικτών για βελτίωση της ποιότητας του σπόρου

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κουκί (*Vicia faba*) είναι ψυχανθές που χαρακτηρίζεται από υψηλές αποδόσεις με την καλλιέργειά του για την παραγωγή ξηρού σπόρου να παρουσιάζει άνοδο τα τελευταία χρόνια. Χρησιμοποιείται ως κτηνοτροφικό φυτό και για κατανάλωση από τον άνθρωπο ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον προσελκύει η φαρμακευτικές του ιδιότητες εξαιτίας της περιεκτικότητας των φυτικών του μερών σε L-DOPA.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο θερμοκήπιο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τέσσερις γονότυποι κτηνοτροφικού κουκιού (ΚΚ10, ΚΚ14, ΚΚ18, ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ) φυτεύτηκαν σε γλάστρες και αξιολογήθηκαν ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους και την περιεκτικότητα φύλλων (σε πρώιμο στάδιο αλλά και στο στάδιο της πλήρους άνθησης) και σπόρων ως προς την διατροφική τους αξία. Ακόμη εξετάστηκε πιθανή συσχέτιση υψηλής περιεκτικότητας μεταβολιτών στα φύλλα με υψηλή περιεκτικότητα στον σπόρο.

Ο γονότυπος ΚΚ18 έδειξε να υπερτερεί στα χαρακτηριστικά των λοβών ενώ ο γονότυπος ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ έδωσε τις υψηλότερες αποδόσεις σε αριθμό λοβών και σπόρων.

Ο γονότυπος ΚΚ18 έδειξε να υπερέχει έναντι των υπολοίπων ως προς την περιεκτικότητα των σπόρων σε οργανικά οξέα, βασικά αμινοξέα (arginine, tryptophan, phenylalanine). Οι γονότυποι ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ και ΚΚ18 έδειξαν επίσης τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις φλαβονοειδών στους σπόρους.

Επιστημονική περιοχή: Βελτίωση φυτών

Λέξεις κλειδιά: Βελτίωση φυτών, κουκί, διατροφική αξία, σπόρος, μεταβολομική

Metabolomic and genomic study in fodder faba bean (*Vicia faba*) for seeds' nutritional quality biomarkers

Department of Crop Science

Laboratory of Plant Breeding and Biometry

ABSTRACT

Faba bean (*Vicia faba*) is a high-yielded legume, mainly cultivated for its dry seeds. Its cultivation depicts a gradual rise during the last decade. Mostly used for animal feeding and human consumption, furthermore, it piques scientists' interest in its pharmaceutical usage due to the high accumulation of L-DOPA in its leaves and seeds.

The current study took place at the greenhouse of the Agricultural University of Athens. Four genotypes of fodder faba bean (KK10, KK14, KK18, POLYKARPI) were sown in pots, and evaluated for their morphological traits. Leaves (collected in the early stage and full anthesis) and seeds were analyzed for their nutritional value. Additionally, the correlation between high accumulated metabolites in leaves and seeds was examined.

Genotype KK18 was shown to excel in pod characteristics while the POLYKARPI genotype gave the highest yields in the number of pods and seeds.

Genotype KK18 was shown to excel over the rest in terms of seed content in organic acids, and essential amino acids (arginine, tryptophan, phenylalanine). The genotypes POLYKARPI and KK18 also showed the lowest concentrations of flavonoids in the seeds.

Scientific area: Plant Breeding

Keywords: Plant breeding, faba bean, nutritional quality, seeds, metabolomics

ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ

Εγώ ο κάτωθι υπογράφων ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΚΟΥΓΙΤΕΑΣ, δηλώνω πως η παρούσα εργασία αποτελεί προϊόν προσωπικής μελέτης. Υποβάλλεται για την εκπλήρωση του μεταπτυχιακού διπλώματος του ΠΜΣ «Καινοτόμες εφαρμογές στην αειφορική γεωργία στη βελτίωση και στην αγρομετεωρολογία» με ειδίκευση στην «Βελτίωση φυτών, αγροβιοποικιλότητα, και φυτογενετικοί πόροι» και δεν έχει υποβληθεί για άλλο σκοπό σε άλλο ίδρυμα. Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

.....

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΚΟΥΓΙΤΕΑΣ

.....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω τις επιβλέπουσες της παρούσας μελέτης, κα. Ελένη Τάνη και κα. Ελένη Αβραάμ, αρχικά γιατί μου εμπιστεύθηκαν και μου ανέθεσαν την παρούσα μελέτη, αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχαν καθόλη την διάρκεια της πειραματικής και γραπτής διαδικασίας.

Ακόμη οφείλω να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Αλιφέρη και την κα. Πηνελόπη Μπεμπέλη για τις συμβουλές τους κατά τη διάρκεια του πειράματος αλλά και για την αποδοχή τους να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή της μελέτης.

Το πείραμα δεν θα μπορούσε να έχει ολοκληρωθεί χωρίς την πολύ σημαντική συμμετοχή των προπτυχιακών φοιτητών Κωνσταντίνου Αθανασόπουλου και Αλέξανδρου Μηλιώνη, οι οποίοι αφιέρωσαν αρκετές ώρες εργασίας στο θερμοκήπιο και στο εργαστήριο για την ανάπτυξη των φυτών, την καταγραφή δεδομένων και την ανάλυση αποτελεσμάτων.

Τέλος, ιδιαίτερα σημαντική ήταν η στήριξη και η βοήθεια των υποψήφιων διδασκόντων του εργαστηρίου της βελτίωσης φυτών, Έφη Σαρρή και Μαρία Γερακάρη, καθώς μέσα από τις πολύτιμες συμβουλές τους αλλά και τον χρόνο που αφιέρωσαν στην παρούσα μελέτη, βοήθησαν να ολοκληρωθεί με επιτυχία η παρούσα εργασία.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	4
ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ.....	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Καλλιέργεια και σημαντικότητα του είδους <i>Vicia faba</i>	1
Σημασία στην ανθρώπινη κατανάλωση.....	3
Σημασία ως κτηνοτροφικό φυτό	4
1.2 Ποιοτικά χαρακτηριστικά του σπόρου.....	5
Πρωτεΐνες.....	5
Αμινοξέα	6
Οργανικά οξέα.....	6
Λιπαρά	7
Υδατάνθρακες	7
Ιχνοστοιχεία	7
Λοιπά στοιχεία	8
Αντι-διατροφικά στοιχεία	9
Τανίνες.....	9
Βικίνη-Κονβικίνη	10
1.3 Βελτίωση του είδους <i>Vicia faba</i>	11
Καταγωγή και ποικιλότητα του είδους.....	11
Προκλήσεις στη βελτίωση του είδους.....	11
Κατεύθυνση βελτίωσης του είδους	12
Η συμβατική βελτίωση στο είδος <i>Vicia faba</i>	12
1.4 Εφαρμογές της μεταβολομικής και των νέων τεχνολογιών στην βελτίωση του <i>V.faba</i>	14
Αρχή της μεθόδου.....	15
1.5 Σκοπός της μελέτης	16
2 Υλικά και μέθοδοι.....	17
2.1 Τοποθεσία	17
2.2 Φυτικό υλικό	17
2.4 Πειραματικό σχέδιο	17
2.5 Εφαρμογές κατά την διάρκεια του πειράματος.....	17
2.6 Δειγματοληψίες	18

2.7	Μορφολογικά και χαρακτηριστικά απόδοσης	18
	Ύψος	18
	Ολικός αριθμός και βάρος λοβών	18
	Ολικός αριθμός και βάρος σπόρων	19
	Χαρακτηριστικά λοβών και σπόρων	19
2.8	Μεταβολομική ανάλυση	19
	Αμινοξέα και οργανικά οξέα.....	19
	Φλαβονοειδή	20
2.9	Γονιδιωματική	21
2.11	Στατιστική ανάλυση.....	21
3	Αποτελέσματα	23
3.1	Μορφολογικά-Αγρονομικά	23
	Ύψος.....	23
	Χαρακτηριστικά λοβών	23
	Ολικά χαρακτηριστικά απόδοσης.....	24
3.2	Ιονομική ανάλυση	25
	Μακροθρεπτικά	25
	Μικροθρεπτικά.....	25
3.3	Οργανικά οξέα	27
	Fumaric acid.....	27
	Succinic acid	27
	Citric acid.....	28
	Malic acid.....	29
3.4	Φλαβονοειδή.....	30
	Flavan-3-ols.....	30
	Flavonols.....	31
	Flavones-Flavonones	33
3.5	Αμινοξέα.....	34
	Essential amino acids (EAA)	34
	Non-essential amino acids (NEAA)	38
3.6	Χρήση μεταβολιτών ως βιοδείκτες ποιότητας σπόρου	42
4.	Συζήτηση	43
	Αγρονομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	43
	Ιχνοστοιχεία	44
	Φλαβονοειδή	46

Οργανικά οξέα.....	49
Αμινοξέα	50
5 Συμπεράσματα.....	53
Βιβλιογραφία	54

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καλλιέργεια και σημαντικότητα του είδους *Vicia faba*

Το *Vicia faba* (κουκί) είναι ιδιαίτερα σημαντικό στη σύγχρονη γεωργία. Η καλλιέργεια- καθώς και η παραγωγή- του, τα τελευταία 10 χρόνια (2011-2021) (Figure 1) δείχνει σταθερά να αυξάνεται με τα τελευταία επίσημα στοιχεία (FAOSTAT, 2021) να υπολογίζουν την παγκόσμια έκταση καλλιέργειας στα 2.722.690 ha για το έτος 2021, έκταση μικρότερη σε σχέση με άλλα ψυχανθή όπως τα κοινά φασόλια, το ρεβίθι και το μπιζέλι. Η παγκόσμια παραγωγή του υπολογίζεται ότι το 2021 πλησίασε τους 6 εκ. τόνους, καθιστώντας το 5^ο σε παραγωγή ψυχανθές για ξηρό σπόρο, 3^ο μέσα στην Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ στην Ελλάδα τόσο η έκταση καλλιέργειας όσο και η παραγωγή του είδους παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα σε σύγκριση με άλλα ψυχανθή- με τα στοιχεία όμως να το κατατάσσουν ως το πιο υψηλοαποδοτικό ψυχανθές στην εγχώρια παραγωγή με απόδοση 34.975 hg/ha.



Figure 1 Παγκόσμια έκταση παραγωγής ξηρού σπόρου κουκιοῦ για την περίοδο 2011-2021

Κύρια παραγωγός χώρα είναι η Κίνα, με ετησία παραγωγή πάνω από 1,6 εκ. τόνους το 2021 (FAOSTAT, 2021), 2^η χώρα σε παγκόσμια παραγωγή είναι η Αιθιοπία ενώ το Σουδάν κατέχει την 7^η θέση στην κατάταξη της παγκόσμιας παραγωγής (Figure 2). Γίνεται επομένως εύκολα αντιληπτό το γεγονός ότι μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική καλλιέργεια για λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες ως ένα εξαγωγίμο προϊόν συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της οικονομίας τους.

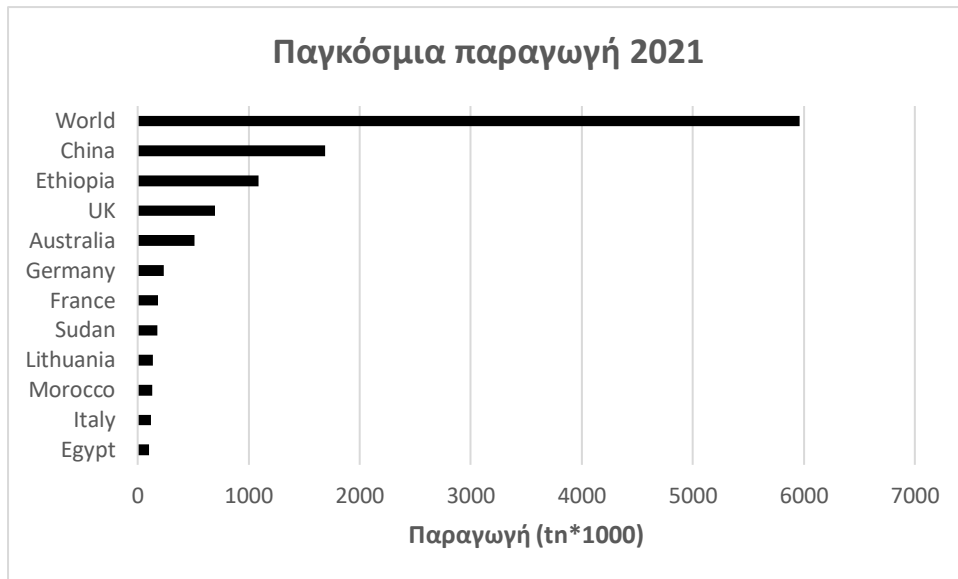


Figure 2 Παγκόσμια παραγωγή ξηρού σπόρου κουκιού και χώρες με την υψηλότερη παραγωγή για το έτος 2021

Στην Ελλάδα η παραγωγή του ξηρού σπόρου (Figure 3) έδειξε μια σημαντική αύξηση από το 2018 και μετά, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει σταθερότητα.



Figure 3 Παραγωγή ξηρού σπόρου κουκιού στην Ελλάδα για την περίοδο 2011-2021

Γνωστό για την μεγάλη του αζωτοδεσμευτική ικανότητα, εμπλουτίζει το έδαφος με πολύτιμα θρεπτικά στοιχεία (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2005; Neugschwandtner R.W. et al. 2021¹) περιορίζοντας σημαντικά το κόστος μιας καλλιέργειας καθώς αποτελεί μια αποδοτική εναλλακτική για περιορισμό της χημικής λίπανσης. Η συμβολή του σε συστήματα χαμηλών εισροών έχει μελετηθεί και το

κουκί έχει βρεθεί να συμβάλει θετικά στην τελική παραγωγή βιομάζας (Balandaite J. et al. 2022²). Ακόμη, δεδομένης της κλιματικής μεταβλητότητας που παρατηρείται και την εναλλαγή ακραίων καιρικών συνθηκών και αλλαγών στο περιβάλλον (Harris S. 2023³) αρκετές μελέτες έχουν εστιάσει στην εύρεση αποδοτικών γονοτύπων σε ακραίες συνθήκες και σε περιβάλλοντα πέραν των ιδανικών της καλλιέργειας είτε με την εύρεση γονιδίων και μοριακών δεικτών που σχετίζονται με την απόκριση σε καταπονήσεις (Lyu I.J. et al. 2021⁴; Maalouf F. et al. 2022⁵) ή με συμβατική αξιολόγηση γονοτύπων ως προς φαινολογικά και αγρονομικά χαρακτηριστικά (Afzal M. et al. 2022⁶; Haq I. et al. 2022⁷). Ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί και στην εφαρμογή εξωγενών παραγόντων και σε γεωργικές πρακτικές που δείχνουν να έχουν ωφέλιμη δράση έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, καθιστώντας την καλλιέργεια πιο αποδοτική ακόμα και σε μη ευνοϊκές συνθήκες, χρήση βιοδιεγερτών αλλά και η συμβίωση με ριζοβακτήρια έχουν δείξει να επιδρούν θετικά στην απόδοση κουκιών σε συνθήκες αλατότητας και κατάκλισης (Benmoussa S. et al. 2022; Kumar A. et al. 2022). Αντίστοιχα, εξωγενής εφαρμογή β-αμινοβουτυρικού οξέος και μαγνησίου έχει βρεθεί να επιδρά θετικά στην απόκριση του φυτού σε συνθήκες ξηρασίας αλλά και θερμικής καταπόνησης (Abid G. et al. 2020; Siddiqui M.H. et al. 2018). Τέλος, η χρήση επικονιαστών εντόμων για πρακτική σταυρογονιμοποίησης στο κουκί έχει δείξει να μειώνει τις αρνητικές συνέπειες της θερμικής καταπόνησης (Bishop J. et al. 2016).

Σημασία στην ανθρώπινη κατανάλωση

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η εύρεση γονοτύπων αλλά και γεωργικών πρακτικών που καθιστούν την καλλιέργεια αποδοτική ακόμα και σε δυσμενή περιβάλλοντα, προκαλεί ενδιαφέρον και υπερτονίζει τα οφέλη της καλλιέργειας σε χώρες του τρίτου κόσμου, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην αντιμετώπιση φαινομένων υποσιτισμού.

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας η ανθρώπινη διατροφή πρέπει να είναι χαμηλή σε νάτριο (<5g ημερησίως), και η κατανάλωση λιπαρών να μην υπερβαίνει το 30% των ημερήσιων θερμίδων και να προέρχεται κυρίως από ακόρεστα λιπαρά (WHO 2019)

Το κουκί είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες, ενώ παρουσιάζει χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο καθώς και χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (το πλήθος των λιπαρών αποτελείται κυρίως από μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα), αλλά και φαινολικές ενώσεις. Επίσης, φαίνεται εκτός από σημαντική πηγή πρωτεϊνών να παρέχει αντικαρκινική, αντιδιαβητική, αντιοξειδωτική καθώς και αρκετές ακόμα ευεργετικές δράσεις στην ανθρώπινη υγεία (Geraldo R. et al. 2022; Martineau-Cote D. et al. 2022).

Σημαντική είναι και η συμβολή του στην ιατρική επιστήμη καθώς φαίνεται να είναι πλούσιο στην ουσία L-DOPA, η οποία ερευνάται για τη δράση της κατά της νόσου του Parkinson (Martineau-Cote D. et al. 2022).

Σημασία ως κτηνοτροφικό φυτό

Ελκύει ιδιαίτερη προσοχή ως κτηνοτροφικό φυτό, με αρκετές μελέτες να επικεντρώνονται σε αυτό και κυρίως ως μια πιθανή πιο οικονομική εναλλακτική λύση στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων ζώων έναντι της ευρέως διαδεδομένης σόγιας. Εξαιτίας της υψηλής διατροφικής του αξίας και λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνη παρέχει μια σημαντική πηγή φυτικών πρωτεϊνών (Hood-Niefer S.D. et al. 2011) με το εύρος να κυμαίνεται από 19-40% αλλά η μέση τιμή να είναι περίπου στο 29% (Warsame A.O. et al. 2019; Adhikari K.N. et al. 2021; Akgun D. and Canci H. et al. 2023). Πολλές μελέτες έχουν εξετάσει τη συμβολή του φυλλώματος σε ενσίρωμα (Angeletti G.S. Fransesco et al. 2022), την ανάμειξή του σπόρου με άλλα δημητριακά, αλλά και την επίδραση στον οργανισμό του ζώου (Tian J. et al. 2018; Alvarenga I.C. et al. 2020; Tusnio A. et al. 2021) υποδεικνύοντας την θετική του συμβολή στο σιτηρέσιο καταλήγοντας να συμφωνούν πως μπορεί να αποτελέσει ένα ισάξιο υποκατάστατο της σόγιας και μια πιο οικονομική επιλογή (Shabul and Obeidat 2022) στο σιτηρέσιο των εκτρεφόμενων ζώων.

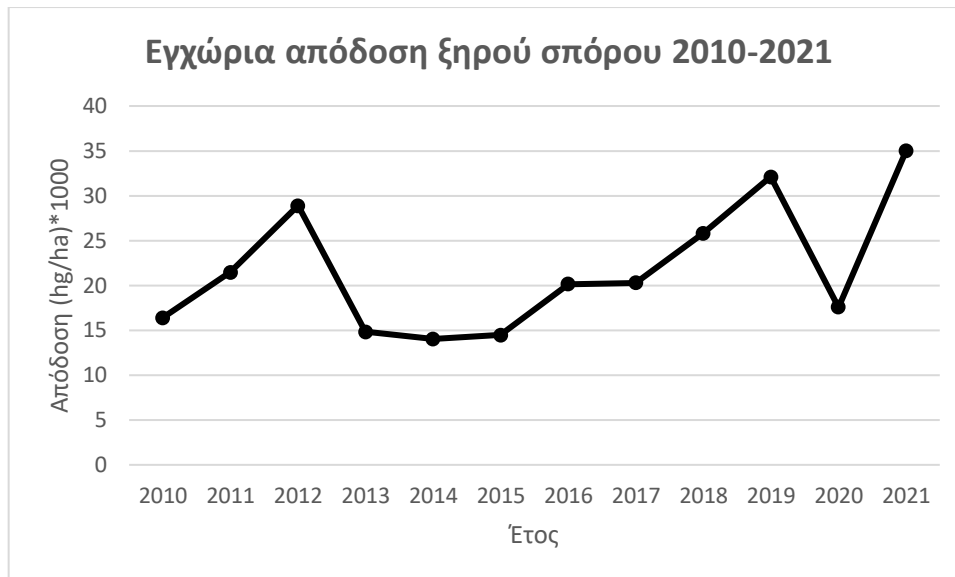


Figure 4 Απόδοση ξηρού κουκιού στην Ελλάδα για την περίοδο 2010-2021

Η χρήση του ως κτηνοτροφικό φυτό περιορίζεται από την ύπαρξη αντιδιατροφικών παραγόντων όπως τανίνες, φυτικά οξέα και αναστολείς τρυψίνης, ουσίες που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την πεπτικότητα του σιτηρέσιου (Meng Z. et al. 2021). Εκτενής αναφορά για τους αντιδιατροφικούς παράγοντες θα γίνει στα επόμενα κεφάλαια. Επιπλέον, πρόβλημα για την εκμετάλλευση του είδους, αποτελούν οι ασταθείς αποδόσεις (Figure 4).

1.2 Ποιοτικά χαρακτηριστικά του σπόρου

Η διατροφική αξία ενός προϊόντος καθορίζεται από την συνολική του περιεκτικότητα σε επιθυμητές ουσίες και από την απουσία ανεπιθύμητων (αντιδιατροφικοί παράγοντες). Αυτές περιλαμβάνουν ένα σύνολο μεταβολιτών που είναι αποτέλεσμα τόσο του πρωτογενούς μεταβολισμού του οργανισμού (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπαρά) όσο και του δευτερογενούς (ανθοκυάνες, φλαβονοειδή και άλλες φαινολικές ενώσεις).

Πρωτεΐνες

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.1, το κουκί αποτελεί μία σημαντική πηγή φυτικών πρωτεϊνών. Οι C.E. Chavez-Murillo et al. (2018) μέσα από τη μελέτη τους αναφέρουν πως το κουκί έδειξε το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης στο σπόρο σε σύγκριση με άλλα ψυχανθή (φακές, ρεβίθια και κοινά φασόλια). Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύονται στο κουκί ανήκουν στις γλοβουλίνες, ενώ σε μικρότερο ποσοστό ανιχνεύονται πρωτεΐνες που ανήκουν στις γλουτελίνες, προλαμίνες και αλβουμίνες

(Martineau-Cote D. et al. 2022). Οι γλοβουλίνες που ανιχνεύονται στον ώριμο σπόρο είναι οι: convicilin, vicilin, a-legumin A&B (Liu Y. et al. 2017; Warsame A.O. et al. 2020; Warsame A.O. et al. 2022).

Αμινοξέα

Σημαντικό ρόλο στην βιολογική αξία των πρωτεϊνών παίζει η σύνθεση των αμινοξέων. Ανάλογα με την ικανότητα του οργανισμού να συνθέτει *de novo* αμινοξέα διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: i) βασικά αμινοξέα (essential amino acids, EAA) τα οποία ο οργανισμός αδυνατεί να συνθέσει ή τα συνθέτει σε ανεπαρκείς ποσότητες και για την κάλυψη των αναγκών τους απαιτείται πρόσληψη αυτών μέσω της τροφής και ii) μη βασικά αμινοξέα (non-essential amino acids, NEAA) κατηγορία αμινοξέων τα οποία ο οργανισμός έχει την δυνατότητα να συνθέσει σε επαρκείς ποσότητες *de novo* (Nelson D.L. and Cox M.M. 2005). Ωστόσο και οι δύο κατηγορίες αποτελούν κρίσιμης βιολογικής σημασίας για τον άνθρωπο και τα ζώα καθώς εμπλέκονται σε σημαντικές βιολογικές λειτουργίες και έλλειψή τους μπορεί να επιφέρει σημαντικές αρνητικές επιδράσεις στην ομοιόσταση του οργανισμού, ενώ ακόμα να προκαλέσει μυοσκελετικές ανωμαλίες, δυσκολίες στη θρέψη, την απορρόφηση και τον μεταβολισμό θρεπτικών στοιχείων και να επηρεάσει την ανοσοποίηση του οργανισμού (Hou Y et al. 2015; Hou Y. and Wu G. 2018). Ακόμα έχουν βρεθεί να σχετίζονται με νευρολογικές λειτουργίες του οργανισμού, να έχουν οξειδωτική δράση και να επηρεάζουν την αναπαραγωγή ικανότητα (Hou Y et al. 2015; Hou Y. and Wu G. 2018).

Το κουκί είναι πλούσιο σε αμινοξέα λευκίνη, λυσίνη θρεονίνη, ιστιδίνη και βαλίνη ενώ φτωχό σε μεθειονίνη, κυστεΐνη και τρυπτοφάνη (Liu Y. et al. 2017; Chavez-Murillo C.E. et al. 2018).

Οργανικά οξέα

Μια κατηγορία οξέων που ανιχνεύεται στα φυτικά μέρη του κουκιού είναι αυτή των οργανικών οξέων. Σε προϊόντα που παράγονται από κουκί βρέθηκαν σημαντικές ποσότητες citric acid, malic acid, succinic acid, lactic acid και oxalic acid (Lin H. et al. 2018). Στη μελέτη των Avramidou E. et al. (2023) ύστερα από μεταβολομική ανάλυση που έγινε στους σπόρους έδειξαν να περιέχουν oxalic acid, malic acid και lactic acid.

Η κατηγορία των οργανικών οξέων, και ιδιαίτερα το oxalic acid, έχει βρεθεί να σχετίζεται με την απόκριση των φυτικών οργανισμών σε βιοτικές καταπονήσεις και

συγκεκριμένα σε προσβολή από μυκητολογικές ασθένειες (Cessna S.G. et al 2000; Fagundes-Nacarath I.R.F. et al. 2018; Toledo et al. 2019; Alnefaie R.M. et al. 2023).

Πρόσφατες μελέτες χαρακτηρίζουν κάποια από αυτά ως αντιδιατροφικούς παράγοντες. Οργανικά οξέα όπως το oxalic acid και το phytate acid, φαίνεται να σχηματίζουν σύμπλοκα με ιχνοστοιχεία, να δυσχεραίνουν την απορρόφηση αυτών των στοιχείων από τον οργανισμό και να οδηγούν σε ελλείψεις. Περισσότερο φαίνεται να επηρεάζουν τα ιόντα ασβεστίου και καλίου (Rahman M.M. et al. 2012; Shadi H. et al. 2020; Geraldo R. et al. 2022; Alnafaie R.M. et al. 2023).

Λιπαρά

Το κουκί και κυρίως οι σπόροι του χαρακτηρίζονται από μικρό ποσοστό λίπους με τον μέσο όρο να κυμαίνεται σε λιγότερο από 2% (Khan M.A. et al. 2015; Felix M. et al. 2018). Το υψηλότερο ποσοστό είναι μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά με το ολεϊκό και το λινολεϊκό οξύ να φαίνεται πως είναι τα κυριότερα (Martineau-Cote D. et al. 2022; Saied D.B. et al. 2023). Τα μονοακόρεστα και τα πολυακόρεστα λιπαρά έχει βρεθεί να έχουν ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία μειώνοντας σε σημαντικό βαθμό τον κίνδυνο καρδιολογικών ασθενειών, ενώ επιπλέον η κατανάλωση τους συνδέεται με χαμηλά ποσοστά LDL και HDL χοληστερόλης (Lunn J. and Theobald H.E. 2006). Σημαντική ωστόσο είναι η παρουσία ορισμένων κορεσμένων λιπαρών οξέων όπως του παλμιτικού και του στεαρικού οξέος στον ώριμο σπόρο (Avramidou E. et al. 2023; Saied D.B. et al. 2023).

Υδατάνθρακες

Το ποσοστό υδατανθράκων στο κουκί είναι περίπου στο 40% (Khan M.A. et al. 2015; Martineau-Cote D. et al. 2022). Αποτελούμενο κυρίως από αμυλώξη, αμυλοπηκτίνες, φρουκτόζη και σουκρόζη (Vidal-Valdere et al. 1998; Li L. et al. 2018; Martineau-Cote D. et al. 2022).

Ιχνοστοιχεία

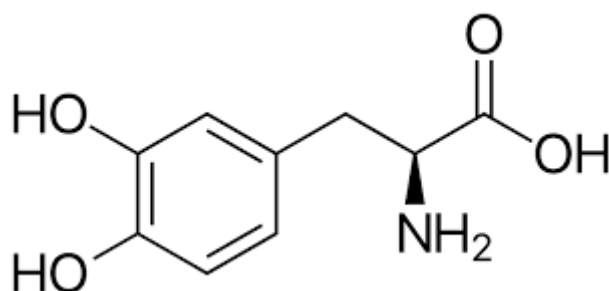
Μελέτες με ιονομική ανάλυση σε σπόρους και άλευρα κουκιού έχουν δείξει ότι αποτελεί μια σημαντική πηγή πολύτιμων ιχνοστοιχείων: K, Fe, Zn, Mg, Ca, Cu ενώ παρουσιάζει χαμηλή περιεκτικότητα Na (Multari S. et al. 2016; Grela E.R. et al. 2017; Millar K.A. et al. 2019), στοιχείο που συνδέεται με υψηλή αρτηριακή πίεση (Farquhar W.B. et al. 2015).

Η πρόσληψη όμως ορισμένων στοιχείων, όπως ο σίδηρος και το ασβέστιο, μπορεί να περιοριστεί από την παρουσία αντι-διατροφικών παραγόντων όπως είναι τα φυτικά οξέα (phytic acid), το οξαλικό οξύ (oxalic acid) και οι ταννίνες, τα οποία σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα και περιορίζουν σε σημαντικό βαθμό την βιοδιαθεσιμότητα αυτών, προκαλώντας σημαντικές ελλείψεις στον οργανισμό (Rahman M.M. et al. 2012, Geraldo R. et al. 2022).

Λοιπά στοιχεία

Το κουκί είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες, μη διαλυτές στο μεγαλύτερο μέρος τους, ποσοστό 11,37%-16,59% (Millar K.A. et al. 2019; Mayer Labba et al. 2021) ενώ έχουν βρεθεί και ποσοστά κοντά στο 20% σε ακατέργαστο σπόρο (Vidal-Valdere C. et al. 1998). Στις ίνες του σπόρου ανιχνεύονται πολλά είδη ολιγοσακχαριτών και πολυσακχαριτών (raffinose, stachyose, verbascose, cellulose, hemicellulose) (Vidal-Valdere C. et al. 1998; Fan P-H et al. 2014). Η κατανάλωση τροφίμων με μεγάλη περιεκτικότητα ινών έχει δείξει να έχει θετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό (Mudryj A.N. et al. 2014).

Στο κουκί απαντώνται και ουσίες με ιδιαίτερη θεραπευτική σημασία όπως η λεβαντόπα και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Εκτεταμένη μελέτη έχει γίνει για την λεβαντόπα (L-DOPA), αμινοξύ του οποίου η βιοσύνθεση σχετίζεται με το αμινοξύ τυροσίνη, καθώς φαίνεται να αποτελεί θεραπεία για τη νόσο του Parkinson (Rabay J.M. et al. 1992; Nagatsu T. and Sawanda M. 2009; LeWitt P.A. 2014). Ανιχνεύεται σε φύλλα, άνθη και σπόρους του είδους *Vicia faba* (Polanowska K. et al. 2019; Duan S. et al. 2022; Tesoro C. et al. 2022) με την μεγαλύτερη ποσότητα της ουσίας να παρουσιάζεται στα νεαρά όργανα και όχι στα ώριμα (Duan S. et al. 2021).



Εικόνα 1 L-DOPA

Το GABA σχετίζεται με το σπόρο (Yang R. et al. 2015), αποτελεί προϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού το οποίο φαίνεται να εμπλέκεται σε απόκριση σε αβιοτική καταπόνηση του φυτού (Martineau-Cote D. et al. 2022) και να σχετίζεται με την μείωση της αρτηριακής πίεσης (Ma P. et al. 2015).

Αντι-διατροφικά στοιχεία

Όπως έχει αναφερθεί, στα φυτικά μέρη του είδους *Vicia faba* απαντώνται αρκετά στοιχεία, κυρίως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού, που δρουν αρνητικά στην θρεπτική αξία του τελικού προϊόντος και περιορίζουν την χρήση του, αυτό τους δίνει τον χαρακτηρισμό “αντιδιατροφικοί παράγοντες”, αυτά μπορεί να είναι φαινολικές ενώσεις και συγκεκριμένα οι τανίνες, φυτικά και οξαλικά οξέα καθώς και αναστολείς τρυψίνης (Martineau-Cote D. et al. 2022). Η παρουσία τους όμως και η μελέτη αυτών των μεταβολιτών έχει δείξει να σχετίζονται και με ορισμένες ευεργετικές ιδιότητες για τον οργανισμό, αντικαρκινική δράση, αντιοξειδωτική κ.α. (Gautam A.K. et al. 2019; Geraldo et al. 2022) γεγονός που καθιστά την παρουσία τους μέσα σε ορισμένα όρια επιθυμητή.

Τανίνες

Οι τανίνες αποτελούν φαινολικές ενώσεις ή αλλιώς πολυφαινόλες, είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού και εμπλέκονται σε αρκετές λειτουργίες του φυτικού οργανισμού, κυρίως ως μηχανισμοί άμυνας σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Ky I. et al. 2016). Στο κουκί σημαντικές ποσότητες συμυκνωμένων τανινών (προανθουκιανιδίνες) ανιχνεύονται στους σπόρους, και συγκεκριμένα στο περίβλημα του σπόρου (Karatas S.C. et al. 2017; Thurau E.G. et al. 2021). Οι προανθουκιανιδίνες είναι παράγωγα προϊόντα που προέρχονται από τον ολιγομερισμό φλαβονολών και συγκεκριμένα από κατεχίνες, έπικατεχίνες και επιγαλλοκατεχίνες (Ky I. et al. 2016). Η παρουσία τους έχει δείξει να επηρεάζει αρνητικά τη διαθεσιμότητα και την πεπτικότητα της πρωτεΐνης από τον οργανισμό (Karatas S.C. et al. 2017; Lamy E. et al. 2011; Thurau E.G. et al. 2021).

Αποτελούν έναν σημαντικό περιοριστικό παράγοντα για τη χρήση του κουκιού σε ευρεία κλίμακα και πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για τη δημιουργία ποικιλιών με χαμηλή περιεκτικότητα σε τανίνες. Σημαντικό βήμα αποτέλεσε, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια, η συσχέτιση του μορφολογικού χαρακτηριστικού του λευκού άνθους με τη χαμηλή περιεκτικότητα του φυτού σε τανίνες, ενώ η εύρεση των γονιδίων που σχετίζονται με την απουσία τους: *zt-1* και *zt-2* έκανε δυνατή τη βελτίωση

υποβοηθούμενη με μοριακούς δείκτες (Hou W. et al. 2018; Gutierrez N. and Torres A.M. 2019; Gutierrez N. et al. 2020).

Βικίνη-Κονβικίνη

Οι γλυκοζίτες βικίνη και κονβικίνη είναι προϊόντα που βρίσκονται κυρίως στους σπόρους του φυτού που σε συνδυασμό με την έλλειψη του ενζύμου G6DP μπορεί να επιφέρουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου.

Λοιποί αντιδιατροφικοί παράγοντες

Όπως αναφέρθηκε, στο κουκί συναντάμε και άλλες κατηγορίες μεταβολιτών που χαρακτηρίζονται ως αντιδιατροφικοί παράγοντες. Φυτικά οξέα, οργανικά οξέα καθώς και αναστολείς τρυψίνης δρουν αρνητικά, σχηματίζουν σύμπλοκα με ιόντα και ωφέλιμα θρεπτικά στοιχεία για τον οργανισμό μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την ικανότητα απορρόφησης τους (Rahman M.M. et al. 2012; Shadi H. et al. 2020; Geraldo R. et al. 2022).

Επεξεργασία για αδρανοποίηση των αντιδιατροφικών παραγόντων

Η κατεργασία των σπόρων με διάφορες μεθόδους έχει δείξει να αδρανοποιεί και να μειώνει την ποσότητα των αντιδιατροφικών παραγόντων που προαναφέρθηκαν (Geraldo R. et al. 2022; Martineau-Cote D. et al. 2022). Συγκεκριμένα, κατεργασία του σπόρου σε υψηλές θερμοκρασίες, είτε με βράσιμο είτε με ψήσιμο, έδειξε να μειώνει την περιεκτικότητα των σπόρων σε βικίνη και κονβικίνη (Cardador-Martinez A. et al. 2012). Κατεργασία των σπόρων με ακτινοβολία γ, θερμική κατεργασία ή και συνδυασμό αυτών των δύο μεθόδων μείωσε την περιεκτικότητα των σπόρων σε τανίνες και φυτικά οξέα ενώ παράλληλα έδρασε θετικά στην πεπτικότητα του σπόρου (Ali Osman A.M. et al. 2012).

Η κατεργασία όμως των σπόρων μπορεί να δράσει αρνητικά σε ορισμένες επιθυμητές ενώσεις. Η L-DOPA φαίνεται να αντιδρά αρνητικά σε θερμική κατεργασία (Cardador-Martinez A. et al. 2012; Polonowska K. et al. 2019).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, καθώς και το γεγονός ότι κάποιες φορές ο σπόρος προορίζεται για συγκεκριμένη χρήση και η επεξεργασία του καθίσταται αδύνατη, για τη δημιουργία ποικιλιών με το επιθυμητό προφίλ μεταβολιτών τόσο σε διατροφικά στοιχεία όσο και σε αντιδιατροφικούς παράγοντες είναι απαραίτητη η βελτίωση του είδους είτε με συμβατικές ή με την χρήση νέων τεχνολογιών της βελτίωσης και μπορεί να επιφέρει πιο σταθερά και επιθυμητά αποτελέσματα.

1.3 Βελτίωση του είδους *Vicia faba*

Το κουκί (*Vicia faba*) είναι διπλοειδές είδος, με χρωμοσωμικό αριθμό $2n=12$ και μέγεθος γονιδιώματος περίπου ίσο με 13Gb (PCD, 2023). Οργανωμένες προσπάθειες για την επιστημονική μελέτη, αναζήτηση και καταγραφή της γενετικής ποικιλότητας στο είδος *Vicia faba* άρχισαν το 1976 από τον Abdalla (Abdalla 1976). Τα πρώτα χρόνια, οι προσπάθειες αυτές εστίαζαν κυρίως στην αναγνώριση και ταυτοποίηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών μεταξύ διαφορετικών γονοτύπων (Cubero J.I. 1973; Suso M.J. and Cubero J.I. 1985). Η εξέλιξη της τεχνολογίας και η ανάπτυξη νέων μεθόδων και τεχνικών γενετικής ανάλυσης και χαρτογράφησης, έκανε εφικτή τη μελέτη του είδους σε γενετικό επίπεδο καθώς και τη κατασκευή γενετικών χαρτών και την μέθοδο της βελτίωσης με χρήση μοριακών δεικτών (Rogers S.O. and Bendich A.J. 1987; Vaz Patto M.C. et al. 1999; Carillo-Pedromo et al. 2020; Avramidou E. et al. 2022). Αυτή η νέα μορφή ποικιλότητας και γενετικών παραλλαγών, αποτέλεσαν ένα ισχυρό εργαλείο για την βελτίωση του είδους, δίνοντας την δυνατότητα στον ερευνητή να ενεργεί στοχευμένα στο γονιδίωμα διευκολύνοντας έτσι την εφαρμογή μοριακών τεχνικών βελτίωσης όπως γενετικής μηχανικής, αλλά και την αξιολόγηση επόμενων γενεών για την μεταφορά, διατήρηση ή και μετάλλαξη των γονιδίων ενδιαφέροντος.

Καταγωγή και ποικιλότητα του είδους

Ο ακριβής πρόγονος του είδους δεν είναι ακόμα γνωστός, ωστόσο σπόροι του έχουν ταυτοποιηθεί και χρονολογούνται 14.000 χρόνια πριν, στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου (Caracuta et al. 2016). Γονότυποι του φυτού παρουσιάζονται πλέον σε διάφορες χώρες ανά τον κόσμο, έχουν μελετηθεί με την χρήση Targeted Next Generation Sequencing (TGNS) και έχουν ταξινομηθεί ως προς τα διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάλογα με την γεωγραφική τους προέλευση (Zhang H et al. 2023). Το υλικό αυτό αποτελεί σημαντική πηγή παραλλακτικότητας για τη βελτίωση του είδους, ενώ ακόμα σημαντική είναι η συνεισφορά των διεθνών τραπεζών (ICARDA, INRA, CSIC) στην διατήρηση του γενετικού υλικού (Maalouf F. et al. 2018).

Προκλήσεις στη βελτίωση του είδους

Το είδος *Vicia faba* εμφανίζει κάποιες σημαντικές δυσκολίες όσον αφορά την βελτίωσή του. Κοντινά συγγενικά είδη που έχουν μελετηθεί (*V. narbonensis*, *V. johannis* και *V. galilea*) έχουν βρεθεί να έχουν διαφορετικό χρωμοσωμικό αριθμό (Raina and Rees 1983, Maxted N. et al. 1991), διαφορές στο πρωτεϊνικό προφίλ

(Ladizinsky G. 1975), ενώ ακόμη έχουν βρεθεί μεγάλες διαφορές στην ποσότητα DNA ανάμεσα στο είδος *V. faba* και σε άγριους συγγενείς (Chooi W.Y. 1970). Όλα τα παραπάνω αποτελούν παράγοντες που οδηγούν σε αδυναμία αποτελεσματικής διασταύρωσης άγριων συγγενών και την παραγωγή γόνιμων απογόνων (Cubero J.I. 1974; Abdalla M.M.F. 1977; Duc et al. 2010), κάνοντας έτσι δύσκολη την εφαρμογή της συμβατικής βελτίωσης στο κουκί. Επιπλέον, το μεγάλο γονιδίωμα του είδους (~13 Gb) καθιστά δύσκολη την ακριβή χαρτογράφηση του, γεγονός που αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στην χρήση μοριακών εργαλείων (Zhang H. et al. 2023).

Κατεύθυνση βελτίωσης του είδους

Μια σημαντική κατεύθυνση της βελτίωσης του κουκιού αποτελεί η σταθερότητα των αποδόσεων, η προσαρμογή σε διαφορετικά περιβάλλοντα και η ανθεκτικότητα σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Ping L. et al. 2018; Adhikari K.N. et al. 2021; Abou-Khater L. et al. 2022; Gutierrez N. et al. 2023). Οι παραπάνω παράγοντες αποτελούν σημαντικά εμπόδια στην καλλιέργεια του και σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία (FAOSTAT, 2021) φαίνεται ότι έχει γίνει σημαντική πρόοδος, καθώς οι αποδόσεις της καλλιέργειας φαίνεται να έχουν αυξηθεί (FAOSTAT, 2021).

Περιοριστικό παράγοντα όμως αποτελούν τα αντιδιατροφικά στοιχεία που ανιχνεύονται κυρίως στους σπόρους- αλλά και σε υπόλοιπα μέρη του φυτού- όπως οι γλυκοζίτες βικίνη (vicine) και κονβικίνη (convicine) που σε συνδυασμό με την έλλειψη του ενζύμου G6PD μπορούν να προκαλέσουν φαβισμό ή αλλιώς κύαμωση, μια μορφή αναιμίας που μπορεί να επιφέρει ακόμα και θάνατο (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005). Επίσης, οι ταννίνες και φαινολικές ενώσεις που περιέχονται κυρίως στο περισπέρμιο του σπόρου μειώνουν την πεπτικότητα των πρωτεϊνών (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005; Demman J. et al. 2022). Ακόμη, η έλλειψη στο βασικό αμινοξύ μεθειονίνη αποτελεί ένα πρόβλημα στην χρήση του φυτού ως αποκλειστικό σιτηρέσιο (Halmenies-Beauchet-Filleau A. et al. 2018).

Η συμβατική βελτίωση στο είδος *Vicia faba*

Στο κουκί (*Vicia faba*), τα πρώτα χρόνια οι προσπάθειες βελτίωσης εστίαζαν κυρίως στην ανθεκτικότητα σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, σε ποιοτικά χαρακτηριστικά και στην σταθερότητα των αποδόσεων με κύριο κριτήριο αγρονομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού ενώ είχε γίνει μια προσπάθεια σύνδεσης της διατροφικής αξίας του φυτού στην κτηνοτροφία με την παρουσία χρωστικών

ουσιών στα άνθη αλλά και την επίδραση που έχει η κατανάλωσή τους από τα εκτρεφόμενα ζώα (Makkar H.P.S. et al. 1998).

Προσπάθειες ωστόσο έχουν γίνει από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Τα ευρήματα της έρευνας των Dickinson et al. 1957 έδειξαν την συσχέτιση λευκόχρωμων άνθων στα φυτά με την χαμηλή περιεκτικότητα τανινών στον σπόρο, αποτέλεσμα με το οποίο συμφωνούν και μεταγενέστερες μελέτες των Carbera A. and Martin A. 1986 και Martin A. et al. 1991, με την τελευταία έρευνα να εμφανίζει σύνδεση του χαρακτηριστικού του λευκού άνθους και της απουσίας τανινών με αρνητική επιρροή στο βάρος των σπόρων αλλά θετική στην απόδοση τους σε αριθμό στα φυτά της F2 γενεάς. Το χαρακτηριστικό αυτό φαίνεται να αποτέλεσε ένας σημαντικό βήμα στην βελτίωση του είδους ως προς την διατροφική του αξία αφού η μελέτη του και η σχέση που εμφανίζει με την παρουσία αντιδιατροφικών παραγόντων στους σπόρους του *V.faba* έγιναν μετέπειτα και ήρθαν να επιβεβαιώσουν τα ευρήματα των προγενέστερων ερευνών. Έτσι για παράδειγμα, ποικιλίες με λευκά άνθη σχετίζονται με απουσία τανινών και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις σε σύγκριση με τα ποικιλίες που φέρουν χρωματιστά άνθη (Makkar H.P.S. et al. 1998).

Το χαρακτηριστικό του λευκού άνθους, η συσχέτιση του με την απουσία τανινών στον σπόρο- και η αρνητική επίδραση που μπορεί να έχει η παρουσία τανινών στην ανάπτυξη των ζώων (Jambunathan R. and Mertz E.T. 1973)- είναι μορφολογικό χαρακτηριστικό που κατά το παρελθόν έχει χρησιμοποιηθεί στην βελτίωση και στην αξιολόγηση γονοτύπων κουκιού ως κτηνοτροφή (Longstaff M. and McNab J.M. 1991) αλλά και ως δείκτης σε πειράματα διασταυρώσεων (De Vries A.Ph. 1977).

Το κουκί είναι είδος μερικώς σταυρογονιμοποιούμενο, εμφανίζει βαθμό σταυρογονιμοποίησης μεταξύ 10-70%, ποσοστό που επηρεάζεται σημαντικά από το περιβάλλον και την παρουσία επικονιαστών (Adhikari K.N. et al. 2021). Κατά το παρελθόν έχουν γίνει μελέτες με διαφορετικά σχήματα βελτίωσης στο κουκί. Η κλασσική δημιουργία υβριδίων παρουσιάζει σημαντική δυσκολία λόγω της απουσίας σταθερής και αξιόπιστης κυτταροπλασματικής αρρενοστεριότητας ,με τις συνθετικές ποικιλίες να δείχνουν να είναι πιο αποτελεσματικό σχέδιο αλλά παράλληλα εμφανίζει και υψηλότερο κόστος λόγω των πολλών αξιολογήσεων που απαιτούνται (Ghaouti L. and Link W. 2009, Brunjes L. and Link W. 2020, Adhikari K.N. et al. 2021).

Οι περισσότερες έρευνες που γίνονται στα διαφορετικά σχέδια βελτίωσης έχουν ως κύριο κριτήριο αποτελεσματικότητας, την απόδοση των φυτών, την προσαρμοστικότητα σε δυσμενή περιβάλλοντα, την αποτελεσματικότητα των

διασταυρώσεων καθώς και την ανάπτυξη ποικιλότητας (Ghaouti L. and Link W. 2009, Adhikari K.N. et al. 2021). Η αξιολόγηση γονοτύπων ως προς την διατροφική ποιότητα του σπόρου απαιτεί την χρήση εξειδικευμένων μηχανημάτων και τεχνικών και είναι δύσκολο να γίνει από τον ανθρώπινο παράγοντα μόνο μέσω της φαινοτύπισης (Duc G. 1991). Υπάρχουν μελέτες συγκριτικής αξιολόγησης ψυχανθών ως προς την διατροφική τους αξία και την παρουσία αντιδιατροφικών παραγόντων, οι οποίες όμως περιορίζονται κυρίως στην μελέτη προϊόντων πρωτογενούς μεταβολισμού και ιόντων (Mnembuka B.V. and Eggun B.O. 1992) ενώ το πλήθος των ερευνών μέχρι τα τέλη του 20^{ου} αιώνα φαίνεται να είναι περιορισμένο. Πριν την εξέλιξη των ομικών τεχνολογιών και την δυνατότητα λεπτομερούς ανάλυσης και γνώσης των διατροφικών στοιχείων ενός οργανισμού (φυτικού ή μη), η πλειοψηφία των μελετών, όσον αφορά την βελτίωση των ειδών, εστίαζε κυρίως σε μορφολογικά στοιχεία καθώς και στοιχεία που ήταν δυνατό να αναλυθούν και να μελετηθούν από τον ανθρώπινο παράγοντα χωρίς την απαραίτητη παρουσία εξειδικευμένων οργάνων.

1.4 Εφαρμογές της μεταβολομικής και των νέων τεχνολογιών στην βελτίωση του *V.faba*

Γίνεται εύκολα αντιληπτό πως υπάρχει η ανάγκη ενός συνδυασμού της συμβατικής βελτίωσης με την χρήση των νέων (ωμικών) τεχνολογιών, προκειμένου να μπορέσει να αξιοποιηθεί στο μέγιστο η ποικιλομορφία του γένους *Vicia* και να δημιουργηθούν νέες, πιο αποτελεσματικές ποικιλίες που θα ανταποκρίνονται στις σύγχρονες απαιτήσεις των καταναλωτών και τις κλιματικές συνθήκες. Η δυνατότητα αυτή δόθηκε σε μεγάλο βαθμό μέσα από την εισαγωγή νέων τεχνολογιών στην βελτίωση και ιδιαίτερος μέσα από την ανάπτυξη της μεταβολομικής που έκανε εφικτή την λεπτομερή καταγραφή και μελέτη των διατροφικών στοιχείων (Multari S. et al. 2016) και αντι-διατροφικών παραγόντων π.χ. πολυφαινόλες (φλαβονοειδή) (Vidal-Valverde C. et al. 1998; Elessawy F.M. et al. 2021; Sheng Z. et al. 2021) καθώς και την απόκριση σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις με την καταγραφή της έκφρασης φυτορμονών και άλλων φυτοχημικών ουσιών στο μεταβόλομα των οργανισμών (Novak O. and Flokova K. 2018). Η χρήση της έχει γίνει ακόμα και για την μελέτη σε επίπεδο πρωτεόματος (Scollo E. et al. 2020).

Αρχή της μεθόδου

Ως μεταβολομική θα μπορούσαμε να ορίσουμε τον κλάδο των ομικών τεχνολογιών που μελετάει το σύνολο των μεταβολιτών ενός οργανισμού (μεταβόλομα, μόρια με μοριακό βάρος < 1500Da). Βασίζεται στην εφαρμογή ενόργανων χημικών αναλύσεων και μπορεί να είναι στοχευμένη (targeted) ή μη (non-targeted) ανάλυση (Lamichhane S. et al. 2018).

Η φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού (NMR), η αέρια χρωματογραφία (GC) και η υγρή χρωματογραφία (LC), όπως και παραλλαγές των μεθόδων π.χ. υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (UHPLC), είναι οι βασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην μεταβολομική ανάλυση και σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία μαζών (MS) και βιοπληροφορικά εργαλεία βοηθάνε στην ανίχνευση, ταυτοποίηση και καταγραφή των μεταβολιτών ενός οργανισμού (Lamichhane S. et al. 2018).

Κάθε μέθοδος εμφανίζει κάποια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (π.χ. η NMR έχει μεγάλη επαναληψιμότητα αλλά το τελικό χρωματογράφημα επηρεάζεται έντονα από τις συνθήκες του κάθε δείγματος, η MS είναι πιο ευαίσθητη σε σχέση με την NMR) και η επιλογή αυτής εξαρτάται από τον τελικό σκοπό, τις αναλύσεις που θέλει ο ερευνητής να κάνει καθώς και το είδος του οργανισμού που θέλουμε να μελετήσουμε (Lamichhane S. et al. 2018).

Πριν από την τελική ανάγνωση και εξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων κρίνεται απαραίτητη μια πρώτη επεξεργασία των δεδομένων προς αποφυγή σφαλμάτων και τυχόν λανθασμένων συμπερασμάτων στη συνέχεια της στατιστικής ανάλυσης. Η διαδικασία αποτελείται από συγκεκριμένα βήματα και είναι παρόμοια τόσο για την targeted όσο και για την non-targeted ανάλυση. Κατά την εξαγωγή των πρώτων αποτελεσμάτων ο ερευνητής λαμβάνει μια σειρά γραφημάτων για κάθε δείγμα. Αυτά τα γραφήματα καλείται να τα ευθυγραμμίσει με την χρήση βιβλιοθηκών, να ξεκαθαρίσει γραφήματα που δεν σχετίζονται με το δείγμα και μπορεί να αποτελούν θορύβους και κατόπιν να κάνει αναγνώριση της κάθε κορυφής του γραφήματος και με αυτόν τον τρόπο ταυτοποίηση του επιθυμητού μεταβολίτη οργανισμού (Lamichhane S. et al. 2018).

Τα τελευταία χρόνια και με την εισαγωγή νέων τεχνολογιών στην επιστήμη της βελτίωσης έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την αξιολόγηση ποικιλιών του *Vicia faba* και τη δημιουργία νέας παραλλακτικότητας τόσο σε γενετικό όσο και σε μεταβολομικό επίπεδο (Elessawy F.M. et al. 2021; Zhang H et al. 2023).

Όπως αναφέρθηκε, η χρήση της μεταβολομικής έδωσε τη δυνατότητα να μελετηθούν και να επιλεγθούν γονότυποι με υψηλή θρεπτική αξία καθώς και μικρή περιεκτικότητα- ή και απουσία- αντιδιατροφικών παραγόντων (φαινολικές ενώσεις, φυτικά οξέα, βικίνη-κονβικίνη κ.α.) (Elessawy et al. 2019; Mayer Labba I.C. et al. 2020; Johnson J.B. et al. 2021 Shi S-H et al. 2022).

Η εξέλιξη στον τομέα των ομικών τεχνολογιών, δημιουργεί μια νέα δυνατότητα για τους βελτιωτές, την μελέτη διατροφικών και αντιδιατροφικών παραγόντων όχι μόνο σε φαινοτυπικό επίπεδο αλλά και σε γενετικό , με την καταγραφή και ανάπτυξη μοριακών δεικτών για γονίδια ενδιαφέροντος π.χ. *zt-1*, *zt-2* που σχετίζονται με την απουσία τανινών (Hou W. et al. 2018). Έχει καταστεί εφικτή η δημιουργία πιο αξιοποιήσιμων ποικιλιών με μειωμένες συγκεντρώσεις φαινολικών, κυρίως τανινών, καθώς και μειωμένη περιεκτικότητα σε βικίνη και κονβικίνη (Gutierrez N. et al. 2019; Gutierrez N. and Torres A.M. 2020; Bjornsdotter et al. 2021; Murphy M.R. et al. 2023).

1.5 Σκοπός της μελέτης

Κατά την παρούσα μελέτη μία εμπορική ποικιλία κτηνοτροφικού κουκιού (ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ) και τρεις υπό βελτίωση σειρές της εταιρείας AGROLAND (KK10, KK14, KK18) καλλιεργήθηκαν και αξιολογήθηκαν με σκοπό την συγκριτική μελέτη αυτών, ως προς τα διατροφικά χαρακτηριστικά του σπόρου αλλά και νεαρών φύλλων. Αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης αποτέλεσε και η άμεση συσχέτιση μεταβολιτών στα νεαρά φύλλα με τον σπόρο και η παρουσία τους ως ρόλο “δείκτη”.

Στο τέλος του πειράματος οι ποικιλίες αξιολογήθηκαν για μορφολογικά και αγρονομικά χαρακτηριστικά αλλά και την περιεκτικότητα των φυτικών μερών σε αμινοξέα, οργανικά οξέα και φλαβονοειδή.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Τοποθεσία

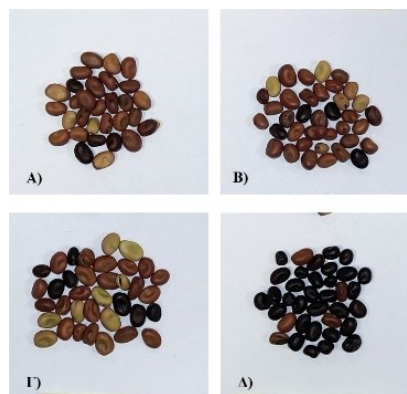
Το πείραμα εγκαταστάθηκε στο θερμοκήπιο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Εικόνα 2α) στην περιοχή του Βοτανικού (Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 11855) στις 23 Δεκεμβρίου του 2021. Στις 8 Απριλίου του 2022 οι γλάστρες μεταφέρθηκαν στον αγρό του Γ.Π.Α. (Εικόνα 2β), σε ίδια διάταξη, λόγω εμφάνισης υψηλών θερμοκρασιών, εντός του θερμοκηπίου, όπου και παρέμειναν για το υπόλοιπο του πειράματος.



α Εικόνα 2 α) Εγκατάσταση του πειράματος στο θερμοκήπιο, β) Μεταφορά του πειράματος στον αγρό

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις ποικιλίες κτηνοτροφικού κουκιού, 3 υπό βελτίωση σειρές (KK10, KK14, KK18) καθώς και μία εμπορική ποικιλία (ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ) από την εταιρία AGROLAND (Εικόνα 3).

Η φύτευση έγινε σε γλάστρες των 4 λίτρων. Δύο σπόροι κουκιού φυτεύτηκαν σε κάθε γλάστρα ενώ με την εμφάνιση των κοτυληδόνων το ένα φυτό αφαιρέθηκε παραμένοντας ένα φυτό σε κάθε γλάστρα.



Εικόνα 3. Σπόροι εγκατάστασης: Α) KK10, Β) KK14, Γ) KK18, Δ) ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ

2.4 Πειραματικό σχέδιο

Για την διεξαγωγή του πειράματος εφαρμόστηκε το εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο (ΕΤΣ) 4x4 με 4 επαναλήψεις.

2.5 Εφαρμογές κατά την διάρκεια του πειράματος

Από τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυτών, παρουσιάστηκε μυκητολογική προσβολή από ριζοκτόνια, προσβολή που παρουσιάστηκε σε κηλίδες και στη συνέχεια

όλα τα φυτά έδειξαν προσβολή. Έγιναν προληπτικά δύο εφαρμογές με 100ml διαλύματος (15,4gr σε 15,4lt, 1:1) από το μυκητοκτόνο Rizolex Gold (1^η επέμβαση στις 23 Μαρτίου 2022, 2^η επέμβαση στις 4 Απριλίου 2022).

Καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκε αφαίρεση των ζιζανίων με τα χέρια, ενώ πότισμα 2 φορές την εβδομάδα κατά τους χειμερινούς μήνες που τους θερινούς μήνες η συχνότητα αυξήθηκε στις 4-5 φορές την εβδομάδα. Απαραίτητη ήταν η υποστύλωση των φυτών σε προχωρημένο αναπτυξιακό στάδιο.

2.6 Δειγματοληψίες

Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στο θερμοκήπιο σε δύο αναπτυξιακά στάδια, ένα πρώιμο στις 10 Μαρτίου 2022 (77 ημέρες από την σπορά) και ένα κατά την άνθηση 12 Απριλίου 2022 (110 ημέρες από την σπορά). Συλλέχθηκε το 4^ο πλήρως ανεπτυγμένο φύλλο από την κορυφή και αμέσως αποθηκεύτηκε σε υγρό άζωτο, κατόπιν έγινε μεταφορά και αποθήκευση στους -80°C.

Από τις 18 Μαΐου του 2022 μέχρι τις 6 Ιουνίου του 2022 έγινε σταδιακά η συλλογή των λοβών στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης.

2.7 Μορφολογικά και χαρακτηριστικά απόδοσης

Στο τέλος του πειράματος έγινε μέτρηση για τα αγρονομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών: ύψος φυτού, ολικός αριθμός λοβών ανά φυτό, ολικό βάρος λοβών ανά φυτό, ολικός αριθμός σπόρων ανά φυτό και ολικό βάρος σπόρων ανά φυτό.

Ακόμη μετρήσεις έγιναν και για τα χαρακτηριστικά των λοβών και των σπόρων.

Ύψος

Από τον Ιανουαρίου 2022 μέχρι το τέλος Μαρτίου 2022 έγινε μέτρηση του ύψους των φυτών ανά 1 ή 2 εβδομάδες. Το ύψος υπολογιζόταν από την βάση του στελέχους μέχρι την άκρη του ακραίου μεριστώματος.

Τα δεδομένα του ύψους δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, Για την στατιστική ανάλυση έγινε μετατροπή των δεδομένων με ύψωση στο τετράγωνο.

Ολικός αριθμός και βάρος λοβών

Από όλα τα φυτά συλλέχθηκαν οι ώριμοι και πλήρως ανεπτυγμένοι λοβοί. Μετρήθηκαν και ζυγίστηκαν ο αριθμός και το βάρος των λοβών από κάθε φυτό ξεχωριστά ώστε να προκύψει ο μέσος όρος.

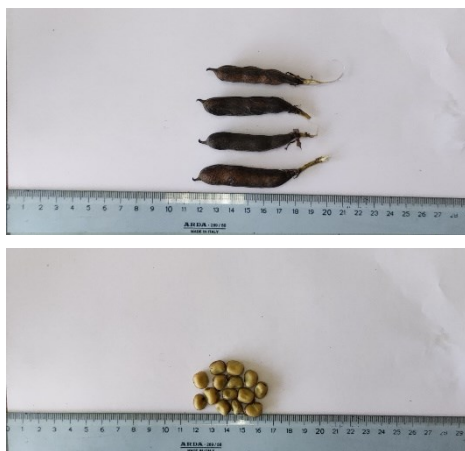
Τα δεδομένα του ολικού βάρους λοβών δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Για την στατιστική ανάλυση έγινε μετατροπή των δεδομένων σε λογαριθμικό επίπεδο.

Ολικός αριθμός και βάρος σπόρων

Για κάθε φυτό αφαιρέθηκαν οι σπόροι από τους λοβούς, μετρήθηκαν και ζυγίστηκαν. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος.

Τα δεδομένα του ολικού βάρους σπόρων δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Για την στατιστική ανάλυση έγινε μετατροπή των δεδομένων σε λογαριθμικό επίπεδο.

Χαρακτηριστικά λοβών και σπόρων



Από κάθε φυτό επιλέχθηκαν τυχαία 4 λοβοί (Εικόνα 4α). Οι λοβοί ζυγίστηκαν και μετρήθηκαν ως προς το μήκος και το πλάτος τους. Στη συνέχεια, για τους ίδιους λοβούς, μετρήθηκαν ο αριθμός των σπόρων και το βάρος αυτών. Στο τέλος προέκυψε ένας μέσος όρος τιμής για κάθε χαρακτηριστικό.

Εικόνα 4 α) Λοβοί της ποικιλίας KK18, β) Σπόροι της ποικιλίας KK18

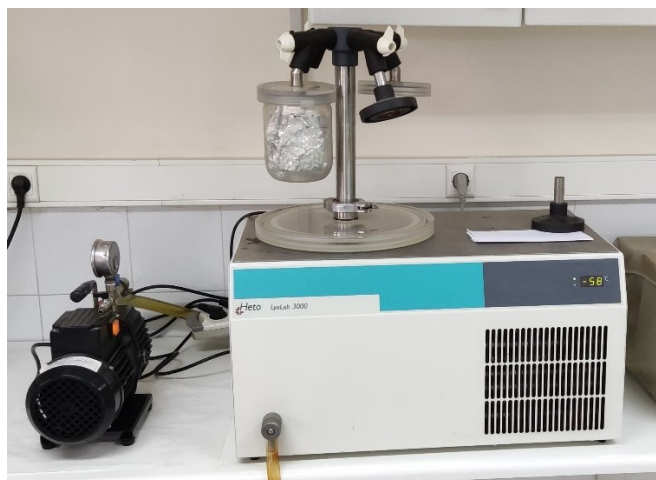
2.8 Μεταβολομική ανάλυση

Αμινοξέα και οργανικά οξέα

Τα φύλλα από τα δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια καθώς και οι σπόροι στάλθηκαν για μεταβολομική ανάλυση στο CEBAS-CSIS στην Μούρθια για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση σε περιεκτικότητα φύλλων-από το πρώιμο στάδιο, το στάδιο της άνθησης- και σπόρων σε οργανικά οξέα και αμινοξέα. Τόσο στα φύλλα όσο και στους σπόρους εφαρμόστηκε λυοφυλλίωση (Thermo scientific, Heto Lyolab 3000) (Εικόνα 5) και ακολούθησε επεξεργασία του λυοφυλλιωμένου ιστού σε μορφή πούδρας με την χρήση γουδιού και την χρήση μπλέντερ για φύλλα και σπόρους αντιστοίχως, σχηματίζοντας 3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε ποικιλία στον κάθε φυτικό ιστό που αναλύθηκε.

100mg φυτικού ιστού ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε 2ml Eppendorf tube για κάθε επανάληψη του κάθε δείγματος. Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε 1000μl buffer μεθανόλης:νερού (80:20 v/v).

Τα δεδομένα των αμινοξέων histidine σε φύλλα του σταδίου άνθησης και threonine στους σπόρους, δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Για την στατιστική τους ανάλυση έγινε μετατροπή σε λογαριθμικό επίπεδο.



Εικόνα 5 Λυοφυλλιοτήης Thermo scientific, Heto Lyolab 3000

Φλαβονοειδή

Φύλλα που συλλέχθηκαν στο στάδιο της άνθησης καθώς και σπόροι στάλθηκαν στο Edmund Mach Foundation (FEM) στο San Michelle, Trentino. Κατόπιν ίδιας επεξεργασίας (λυοφυλλίωση και λειοτριβίση) έγινε ταυτοποίηση με μέθοδο UHPLC για πολυφαινόλες και φλαβονοειδή.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, 100mg λυοφυλλιωμένου και λειοτριβιμένου φυτικού ιστού μεταφέρθηκαν σε 15ml Falcon tubes. Η εκχύλιση έγινε με 4ml διάλυμα 80% MeOH. Στη συνέχεια ακολούθησε εφαρμογή υπερήχων (sonication) στα 59KHz και 100 power για 20' και στη συνέχεια για 20' περιστροφή των Falcon tubes.

Η ανάλυση έγινε με την χρήση χρωματογράφου υψηλής απόδοσης (Agilent UPLC-DAD 1290 Infinity), με στήλες Waters ACQUITY BEH C18 1.7μm, 2.1x150mm και-precolumn-Waters ACQUITY BEH C18 1.7μm, 2.1x5mm. Για την έκλυση των επιθυμητών μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκαν διάλυμα 0,05% φορμικού οξέως σε νερό (0,5ml formic acid σε 1L νερό) και διάλυμα 0,05% φορμικού οξέως σε ακετονιτρίλιο (0,5 formic acid σε 1L acetonitrile).

Τα δεδομένα από τις epicatechin, eriodictyol στους σπόρους δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Τα δεδομένα των robinin, rutin και quercetin-3-gal σε φύλλα του σταδίου άνθησης, δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Για την ανάλυση αυτών των δεδομένων έγινε μετατροπή σε λογαριθμικό επίπεδο.

2.9 Ιονομική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκαν 4 σπόροι από διαφορετικά φυτά κάθε ποικιλίας οι οποίοι υποβλήθηκαν 48hrs σε κρυοξήρανση-λυοφυλλίωση (Thermo scientific, Heto Lyolab 3000) και στη συνέχεια με την χρήση μπλέντερ έγινε η επεξεργασία τους σε μορφή σκόνης.

Για την ποσοτική ανάλυση των ιόντων (K, Na, Ca, Mg, Mn, Zn, Fe, Cu) χρησιμοποιήθηκαν 0,5g από την σκόνη σπόρων για κάθε βιολογική επανάληψη της κάθε ποικιλίας δημιουργώντας 3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε ποικιλία.

Ο ζυγισμένος ιστός τοποθετήθηκε σε κάψες πορσελάνης και μεταφέρθηκε στο πυραντήριο όπου και παρέμεινε για 8 ώρες στους 550°C. Την επόμενη μέρα σε κάθε κάψα προστέθηκαν 10ml HCL και το περιεχόμενο της κάψας πέρασε από διήθηση, με την χρήση ειδικών χάρτινων φίλτρων, σε γυάλινη φιάσκα των 100ml όπου και έγινε συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό έως την ένδειξη των 100ml της φιάσκας. Τέλος το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε πλαστικά μπουκαλάκια των 100ml στο ψυγείο για τις μετέπειτα αναλύσεις.

Η μέτρηση του K^+ και του Na^+ έγινε με την χρήση του Flame Photometer 410. Τα Ca, Mg, Mn, Zn, Fe και Cu μετρήθηκαν με του ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETER AA-7000, SHIMADZU.

2.9 Γονιδιωματική

Γονιδιωματική ανάλυση δεν πραγματοποιήθηκε, λόγω αδυναμίας απομόνωσης RNA, με τα υπάρχοντα πρωτόκολλα.

2.11 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με την χρήση του στατιστικού πακέτου JMP Pro 14. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε έλεγχο για το αν πληρούν τα κριτήρια της κανονικής κατανομής (Saphiro-Wilk test) και ομοσκεδαστικότητας (Levene test, Barlett test).

Για την συγκριτική ανάλυση έγινε εφαρμογή της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων (LSD).

Στα δεδομένα που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή έγινε η απαραίτητη μαθηματική μετατροπή ώστε να ισχύει η συνθήκη της κανονικότητας.

3 Αποτελέσματα

3.1 Μορφολογικά-Αγρονομικά

Κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης τα φυτά αξιολογήθηκαν ως προς το ύψος τους με την μέτρηση που παρουσιάζεται να γίνεται στις 27 Απριλίου του 2022 όταν δηλαδή τα φυτά βρίσκονταν στο αναπαραγωγικό στάδιο. Ακόμα όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι αξιολογήθηκαν τα χαρακτηριστικά των λοβών (βάρος, μήκος, πλάτος, βάρος λοβού και απόδοση κάθε λοβού σε σπόρους) αλλά και τα ολικά χαρακτηριστικά απόδοσης (αριθμός λοβών, βάρος λοβών, αριθμός σπόρων και βάρος σπόρων) όπως αυτά προέκυψαν από κάθε φυτό της καλλιέργειας.

Ύψος

Πίνακας 1 Μέσο ύψος γονοτύπων με το τυπικό σφάλμα

ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΎΨΟΣ (cm)
ΚΚ10	89,80 ± 3,43
ΚΚ14	88,21 ± 3,43
ΚΚ18	87,04 ± 3,43
ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ	85,04 ± 3,43

Το γενετικό υλικό που αξιολογήθηκε δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά το ύψος. Ο μέσος όρος κυμάνθηκε μεταξύ 85,04cm και 89,8cm με τις υπό βελτίωση σειρές να εμφανίζουν μεγαλύτερο ύψος

συγκριτικά με την ποικιλία ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ (Πίνακας 1).

Χαρακτηριστικά λοβών

Για όλα τα χαρακτηριστικά των λοβών, πλην του αριθμού σπόρων ανά λοβό, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους υπό μελέτη γονοτύπους (Πίνακας 2).

Ο γονότυπος ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ είχε στατιστικά μικρότερο πλάτος λοβών (1,07cm) συγκριτικά με τις υπό βελτίωση σειρές οι οποίες δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους. Επίσης, η ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ είχε στατιστικά μικρότερο μήκος λοβού με μέσο μήκος 5,46cm, μικρότερο βάρος λοβού με μέσο βάρος 1,76g και χαμηλότερο βάρος σπόρων ανά λοβό με μέση τιμή 1,35g. Αντιθέτως, τις υψηλότερες τιμές για τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά παρουσίασε η σειρά ΚΚ18 με μέση τιμή πλάτους 1,22cm, μέσο μήκος λοβού 6.48cm, μέσο βάρος λοβού 2,52cm και μέσο βάρος σπόρων ανά λοβό 2,04cm. Το γενετικό υλικό που μελετήθηκε δεν διέφερε στατιστικά ως προς τον

αριθμό σπόρων ανά λοβό με την μέση τιμή να κυμαίνεται μεταξύ 3,3-3,4 σπόροι ανά λοβό(Πίνακας 2).

Πίνακας 2 Χαρακτηριστικά λοβών των υπό αξιολόγηση γονοτύπων με το τυπικό σφάλμα. Τα γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων.

Ποικιλία	Πλάτος (cm)	Μήκος (cm)	Βάρος λοβού (g)	Αριθμός σπόρων	Βάρος σπόρων (g)
ΚΚ10	1,19 ± 0,02 ^a	5,94 ± 0,14 ^b	2,33 ± 0,10 ^{ab}	3,3 ± 0,1	1,82 ± 0,08 ^{ab}
ΚΚ14	1,16 ± 0,02 ^a	5,67 ± 0,14 ^{bc}	2,22 ± 0,10 ^b	3,4 ± 0,1	1,71 ± 0,08 ^b
ΚΚ18	1,22 ± 0,02 ^a	6,48 ± 0,14 ^a	2,52 ± 0,10 ^a	3,3 ± 0,1	2,04 ± 0,08 ^a
ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ	1,07 ± 0,02 ^b	5,46 ± 0,14 ^c	1,76 ± 0,10 ^c	3,4 ± 0,1	1,35 ± 0,08 ^c

Ολικά χαρακτηριστικά απόδοσης

Ο αριθμός σπόρων ανά φυτό διέφερε στατιστικά μεταξύ των υπό μελέτη γονοτύπων με τον γονότυπο ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ να είχε την υψηλότερη απόδοση για κάθε φυτό με μέση τιμή 56,8 σπόρους, ενώ αντίθετα η ΚΚ18 είχε την χαμηλότερη απόδοση με μέση απόδοση ανά φυτό με μέση τιμή 38,3 σπόρους (Πίνακας 3).

Αν και η κρίσιμη τιμή F της ANOVA δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τον συνολικό αριθμό λοβών ανά φυτό, η σύγκριση LSD μεταξύ των υπό μελέτη γονοτύπων έδειξε να υπάρχει διαφορά ανάμεσα στην ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ και την ΚΚ18, με την ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ να αποδίδει 20,3 λοβούς ανά φυτό, και την ΚΚ18 15,4. Τέλος, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για το συνολικό βάρος των λοβών και το συνολικό βάρος των σπόρων ανά φυτό.

Πίνακας 3 Ολικά χαρακτηριστικά λοβών των υπό μελέτη γονοτύπων με το τυπικό σφάλμα. Οι αριθμοί υποδεικνύουν τις στατιστικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων.

ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΛΟΒΩΝ	ΒΑΡΟΣ ΛΟΒΩΝ (g)	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΠΟΡΩΝ	ΒΑΡΟΣ ΣΠΟΡΩΝ (g)
ΚΚ10	20,2 ± 1,7 ^{ab}	35,30 ± 3,16	52,7 ± 4,7 ^a	26,77 ± 2,37
ΚΚ14	17,5 ± 1,7 ^{ab}	28,49 ± 3,16	43,6 ± 4,7 ^{ab}	21,38 ± 2,37
ΚΚ18	15,4 ± 1,7 ^b	29,22 ± 3,16	38,3 ± 4,7 ^b	23,02 ± 2,37
ΠΟΛΥΚΑΡΙΠΗ	20,3 ± 1,7 ^a	29,16 ± 3,16	56,8 ± 4,7 ^a	21,60 ± 2,37

3.2 Ιονομική ανάλυση

Οι σπόροι αξιολογήθηκαν για την περιεκτικότητά τους σε ιόντα, στοιχεία τόσο μακροθρεπτικά (Na, Ca, Mg, K) όσο και μικροθρεπτικά (Fe, Mn, Cu, Zn) (Πίνακας 4).

Μακροθρεπτικά

Οι υπό αξιολόγηση γονότυποι διέφεραν στατιστικά ως προς την περιεκτικότητα του σπόρου σε Na και Ca. Ο γονότυπος ΠΟΛΥΚΑΡΙΠΗ είχε την υψηλότερη συγκέντρωση σε Na και Ca με 0,13mg/g και 0,16mg/g αντίστοιχα. Από τις υπό βελτίωση σειρές η ΚΚ18 με περιεκτικότητα 0,12mg/g είχε την υψηλότερη συγκέντρωση σε Na ενώ η ΚΚ10 με 0,15mg/g σε Ca (Πίνακας 4). Η ANOVA δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές σχετικά με το Mg και το K, με το τελευταίο όμως να παρουσιάζει διαφορές στην LSD ανάλυση (Πίνακας 4).

Μετά την σύγκριση των μέσω τιμών με τον έλεγχο LSD ανάλυση οι ποικιλίες έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα του σπόρου σε K με την ΚΚ10 να έχει συγκέντρωση 9mg/g, υψηλότερη από τους υπόλοιπους γονότυπους, και την ΚΚ18 8,2mg/g, την μικρότερη (Πίνακας 4).

Μικροθρεπτικά

Η περιεκτικότητα των σπόρων σε μικροθρεπτικά στοιχεία διέφερε στατιστικά μόνο ως προς το Mn. Ο γονότυπος ΠΟΛΥΚΑΡΙΠΗ είχε την υψηλότερη συγκέντρωση με 12,49μg/g Mn στον σπόρο ενώ ακολούθησαν η ΚΚ10, ΚΚ18 και ΚΚ14 με συγκέντρωση 12,7 μg/g, 11,76 μg/g και 11,06 μg/g αντίστοιχα (Πίνακας 4).

Πίνακας 4 Μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά στοιχεία στους σπόρους των υπό μελέτη γονοτύπων με το τυπικό σφάλμα. Τα γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων.

ΜΑΚΡΟΘΡΕΠΤΙΚΑ

ΠΟΙΚΙΛΙΑ	Na (mg/g)	Ca (mg/g)	Mg (mg/g)	K (mg/g)
ΚΚ10	0,10 ± 0,01 ^{ab}	0,15 ^b	1,05 ± 0,03	9,00 ± 0,20 ^a
ΚΚ14	0,08 ± 0,01 ^b	0,14 ^{bc}	1,07 ± 0,03	8,73 ± 0,20 ^{ab}
ΚΚ18	0,12 ± 0,01 ^a	0,14 ^c	1,07 ± 0,03	8,20 ± 0,20 ^b
ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ	0,13 ± 0,01 ^a	0,16 ^a	1,08 ± 0,03	8,47 ± 0,20 ^{ab}

ΜΙΚΡΟΘΡΕΠΤΙΚΑ

ΠΟΙΚΙΛΙΑ	Fe (μg/g)	Mn (μg/g)	Cu (μg/g)	Zn (μg/g)
ΚΚ10	49,15 ± 1,89	12,70 ± 0,26 ^a	10,69 ± 0,45	45,91 ± 1,13
ΚΚ14	47,10 ± 1,89	11,06 ± 0,26 ^c	11,14 ± 0,45	43,03 ± 1,13
ΚΚ18	49,07 ± 1,89	11,76 ± 0,26 ^{bc}	10,47 ± 0,45	46,37 ± 1,13
ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ	50,63 ± 1,89	12,49 ± 0,26 ^{ab}	10,96 ± 0,45	44,47 ± 1,13

3.3 Οργανικά οξέα

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης έγινε ανάλυση φυλλικών δειγμάτων σε δύο στάδια ανάπτυξης του φυτού (ένα πρώιμο στάδιο και κατά την πλήρη άνθηση) και ανάλυση σπόρων για την περιεκτικότητά τους σε οργανικά οξέα (fumaric, succinic, citric, malic) (Πίνακας 5).

Fumaric acid

Το φουμαρικό οξύ έδειξε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα φύλλα με μια μικρή μείωση στο στάδιο της πλήρους άνθησης. Από την στατιστική ανάλυση δεν προέκυψε καμία σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των γονοτύπων σε κανένα από τα δύο στάδια φύλλων. (Figure 5).

Στατιστικά σημαντική διαφορά υπάρχει στους σπόρους. . Τη μεγαλύτερη μέση συγκέντρωση φουμαρικού οξέος στους σπόρους είχε η υπό βελτίωση σειρά ΚΚ18 με μέση συγκέντρωση στο σπόρο 7,75μg/g (Πίνακας 5).

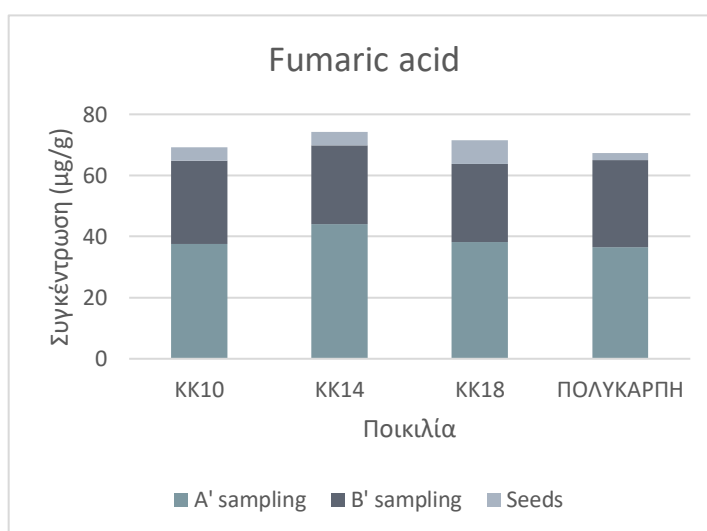


Figure 5 Συγκέντρωση φουμαρικού οξέος σε φύλλα πρώιμου σταδίου (A' sampling), φύλλα από το στάδιο της άνθησης (B' sampling) και τους σπόρους (Seeds)

Succinic acid

Οι υπό αξιολόγηση γονότυποι του πειράματος παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση σουκιμικού οξέος στα φύλλα του πρώιμου σταδίου ενώ δεν διέφεραν στατιστικά κατά την πλήρη άνθηση. Στα δείγματα των σπόρων η ANOVA δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά, ωστόσο μετά από ανάλυση LSD οι ποικιλίες έδειξαν να έχουν διαφορές (Πίνακας 5). Η συγκέντρωση του σουκιμικού οξέος ήταν υψηλότερη στα φύλλα που συλλέχθηκαν κατά το στάδιο της άνθησης (Figure 6).

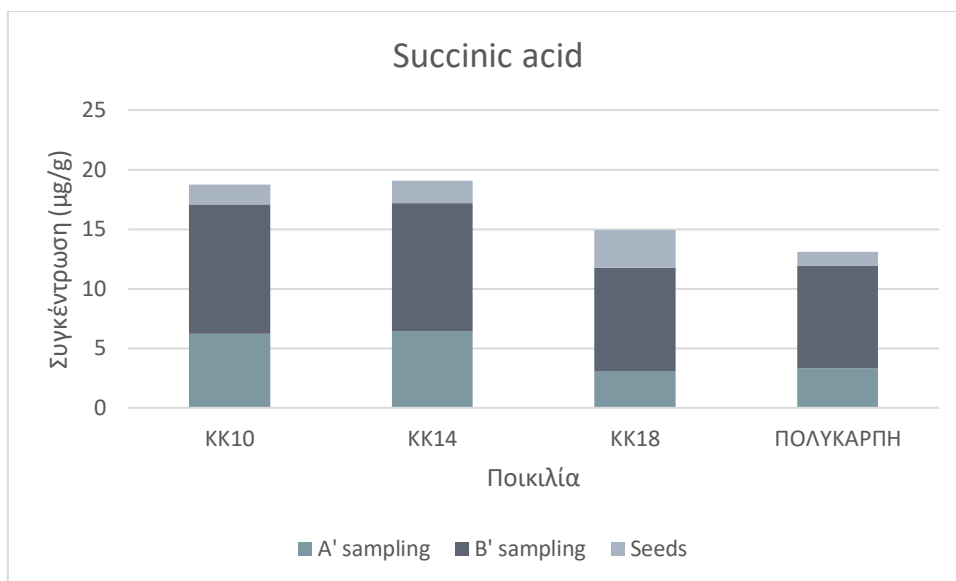


Figure 6 Συγκέντρωση σουκιμικού οξέος σε φύλλα πρώιμου σταδίου (A' sampling), φύλλα σταδίου άνθησης (B' sampling) και σπόρους (Seeds)

Citric acid

Το κιτρικό οξύ έδειξε τις μεγαλύτερες τιμές συγκεντρώσεων στα οργανικά οξέα, τόσο στα φύλλα όσο και στους σπόρους (Figure 7), ανάμεσα στα οργανικά οξέα που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Οι γονότυποι που μελετήθηκαν διέφεραν σημαντικά ως προς την περιεκτικότητα σε κιτρικό οξύ μόνο κατά το πρώιμο στάδιο στα δείγματα των φύλλων (Πίνακας 5). Ο γονότυπος ΚΚ18 είχε την υψηλότερη μέση συγκέντρωση με 4.553,79µg/g ενώ αμέσως επόμενη ήταν ο γονότυπος ΚΚ14 με 3.488µg/g κιτρικού οξέος στα νεαρά φύλλα (Πίνακας 5).

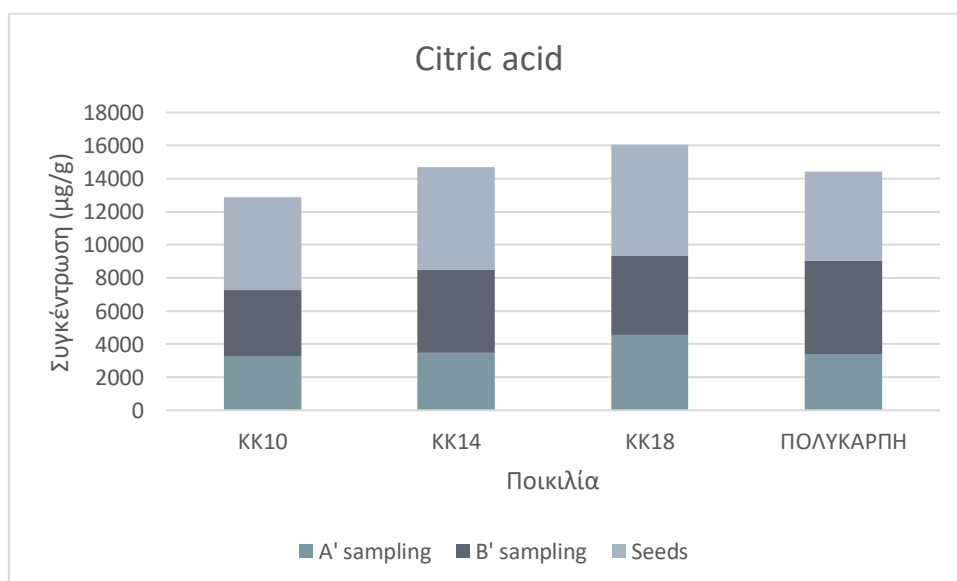


Figure 7 Συγκέντρωση κιτρικού οξέος σε φύλλα πρώιμου σταδίου (A' sampling), φύλλα σταδίου άνθησης (B' sampling) και σπόρους (Seeds).

Malic acid

Το μηλικό οξύ είχε μεγαλύτερη μέση συγκέντρωση στα φύλλα και ιδιαίτερα στα φύλλα που συλλέχθηκαν σε πρώιμο στάδιο (Figure 8), χωρίς όμως να παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους υπό μελέτη γονοτύπους (Πίνακας 5).

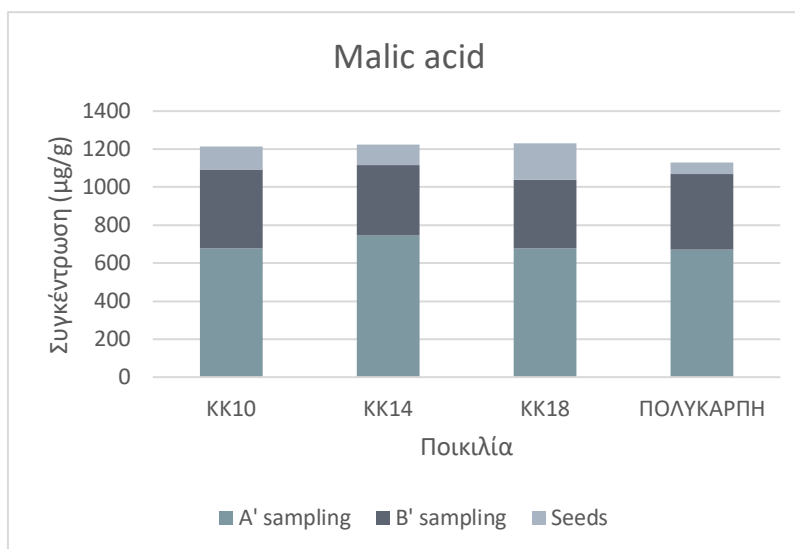


Figure 8 Συγκέντρωση μηλικού οξέος σε φύλλα πρώιμου σταδίου (A' sampling), φύλλα σταδίου άνθησης (B' sampling) και σπόρους (Seeds)

Στις αναλύσεις που έγιναν στους σπόρους, οι γονότυποι παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Ο KK18 είχε την υψηλότερη μέση συγκέντρωση μηλικού οξέος στους σπόρους με μέση συγκέντρωση 190,81µg/g, αντίθετα η ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ έδειξε την μικρότερη συγκέντρωση με 59,68µg/g. Ενδιάμεσα, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ο KK10 με 122,13µg/g μέση συγκέντρωση μηλικού οξέος στον σπόρο, και ο KK14 με 108µg/g (Πίνακας 5).

Πίνακας 5 Συγκεντρώσεις οργανικών οξέων των υπό μελέτη γονοτύπων, με το τυπικό σφάλμα. Τα γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων. A'= φύλλα πρώιμου σταδίου, B' = φύλλα στο στάδιο της άνθησης, S' = σπόροι

		Οργανικά οξέα (μg/g)			
ΟΞΥ		ΠΟΙΚΙΛΙΑ			
		ΚΚ10	ΚΚ14	ΚΚ18	ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ
Μηλικό	A'	678,60 ± 59,16	747,03 ± 59,16	678,03 ± 59,16	669,87 ± 59,16
	B'	412,72 ± 17,39	369,10 ± 17,39	361,32 ± 17,39	399,61 ± 17,39
	S'	122,13 ± 16,50 ^b	108,09 ± 16,50 ^{bc}	190,81 ± 16,50 ^a	59,68 ± 16,50 ^c
Κιτρικό	A'	3.222,05 ± 266,53 ^b	3.488,00 ± 266,53 ^b	4.553,79 ± 266,53 ^a	3.391,18 ± 266,53 ^b
	B'	4.042,99 ± 638,90	5.013,40 ± 638,90	4.817,01 ± 638,90	5.672,33 ± 638,90
	S'	5.599,82 ± 557,36	6.177,85 ± 557,36	6.665,42 ± 557,36	5.374,01 ± 557,36
Σουκμικό	A'	6,22 ± 0,81 ^a	6,41 ± 0,81 ^a	3,06 ± 0,81 ^b	3,32 ± 0,81 ^b
	B'	10,84 ± 1,55	10,77 ± 1,55	8,71 ± 1,55	8,62 ± 1,55
	S'	1,67 ± 0,57 ^{ab}	1,88 ± 0,57 ^{ab}	3,16 ± 0,57 ^a	1,13 ± 0,57 ^b
Φουμαρικό	A'	37,49 ± 2,60	43,99 ± 2,60	38,26 ± 2,60	36,60 ± 2,60
	B'	27,29 ± 2,03	25,91 ± 2,03	25,55 ± 2,03	28,51 ± 2,03
	S'	4,42 ± 0,71 ^b	4,44 ± 0,71 ^b	7,75 ± 0,71 ^a	2,18 ± 0,71 ^b

3.4 Φλαβονοειδή

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν 10 μεταβολίτες από την κατηγορία των φλαβονοειδών- πιο συγκεκριμένα οι υποκατηγορίες φλαβάν-3-ολες, φλαβονόνες, φλαβόνες και φλαβονόνες- που ανιχνεύθηκαν σε φύλλα στο στάδιο της άνθησης και στους σπόρους.

Flavan-3-ols

Πίνακας 6 Συγκέντρωση επικατεχίνης και επιγαλλοκατεχίνης των υπό αξιολόγηση γονοτύπων στους σπόρους. Αναγράφεται το τυπικό σφάλμα. Τα γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων.

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, επικατεχίνες και επιγαλλοκατεχίνες ανιχνεύθηκαν μόνο στους σπόρους (Πίνακας 6).

Και οι δύο ουσίες που ανιχνεύθηκαν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους υπό μελέτη γονοτύπους (Πίνακας 6).

Ποικιλία	Flavan-3-ols (μg/g)	
	Epicatechin	Epigallocatechin
ΚΚ10	51,29 ± 6,80 ^a	19,63 ± 2,43 ^a
ΚΚ14	25,88 ± 6,80 ^a	9,65 ± 2,43 ^b
ΚΚ18	9,51 ± 6,80 ^b	5,47 ± 2,43 ^{bc}
ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ	0,32 ± 6,80 ^c	0,42 ± 2,43 ^c

Την υψηλότερη περιεκτικότητα σε επικατεχίνες είχαν οι γονότυποι ΚΚ10 και ΚΚ14 με μέση συγκέντρωση στο 51,89μg/g και 25,88μg/g αντίστοιχα, ενώ την μικρότερη η ποικιλία ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ με μέση τιμή 0,32μ g/g (Figure 9, Πίνακας 6).

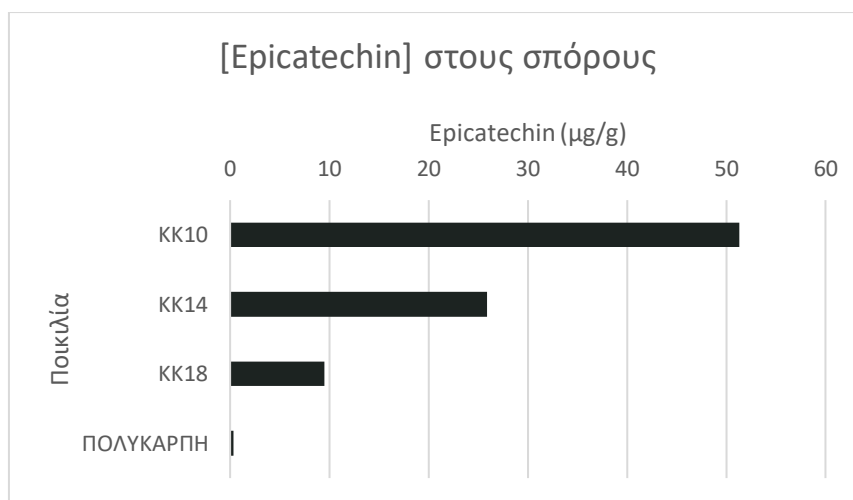


Figure 9 Συγκέντρωση επικατεχίνης στους σπόρους των υπό αξιολόγηση γονοτύπων.

Αντίστοιχα και στην περιεκτικότητα των σπόρων σε επιγαλλοκατεχίνες, ο γονότυπος ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ είχε την χαμηλότερη μέση συγκέντρωση με 0,42μg/g ενώ η ΚΚ10 την υψηλότερη με 19,63μg/g (Figure 10, Πίνακας 6).

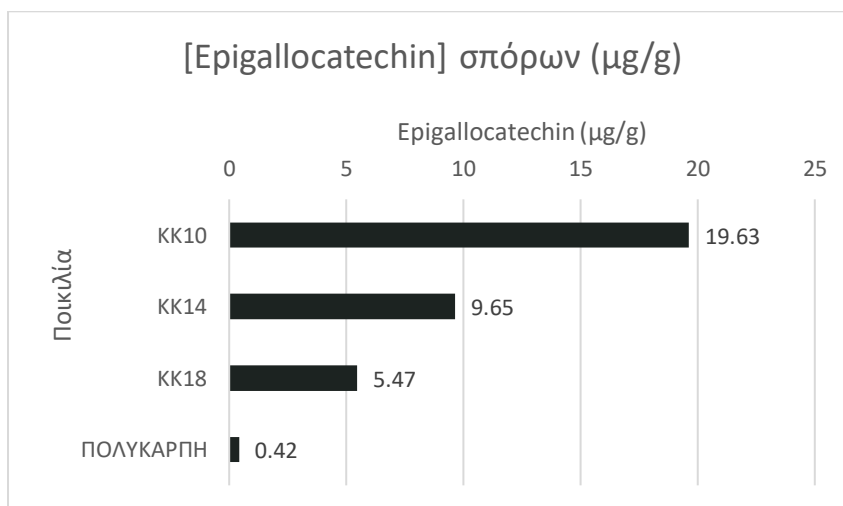


Figure 10 Συγκέντρωση επιγαλλοκατεχίνης στους σπόρους των υπό αξιολόγηση γονοτύπων.

Flavonols

Στην κατηγορία των φλαβονολών που ανιχνεύθηκαν, η πλειοψηφία των μεταβολιτών ανήκουν στην υποκατηγορία των γλυκοζιτών κερσετίνης (quercetin-gal, quervetin-3-glc, quercetin-3-glc-ara, quercetin-3-rha, rutin) (Figure 11, 12). Η παρουσία τους ήταν εμφανής κυρίως στα φύλλα καθώς στους σπόρους δεν

ανιχνεύθηκαν ή ανιχνεύθηκαν σε μεμονωμένα δείγματα σε μικρές ποσότητες. Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν υπήρχαν ανάμεσα στους γονοτύπους για κανένα από τους μεταβολίτες αυτής της κατηγορίας.

A)

B)

Γ)

Δ)

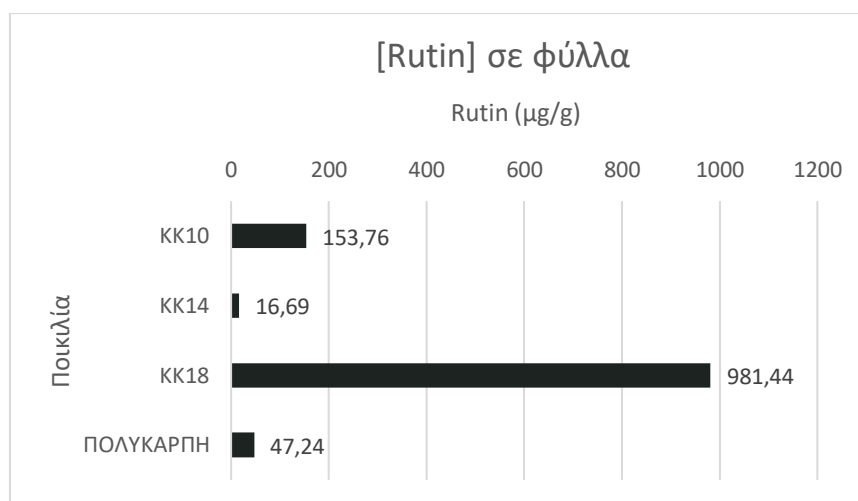


Figure 12 Συγκέντρωση ρουτίνης των γονοτύπων σε φύλλα του σταδίου άνθησης.

Flavones-Flavonones

Η εριοδικτυόλη, μεταβολίτης της υποκατηγορίας των φλαβονονών, ανιχνεύθηκε σε σπόρους και σε φύλλα των υπό μελέτη γονοτύπων (Figure 13), χωρίς ωστόσο να προκύψει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσά τους.

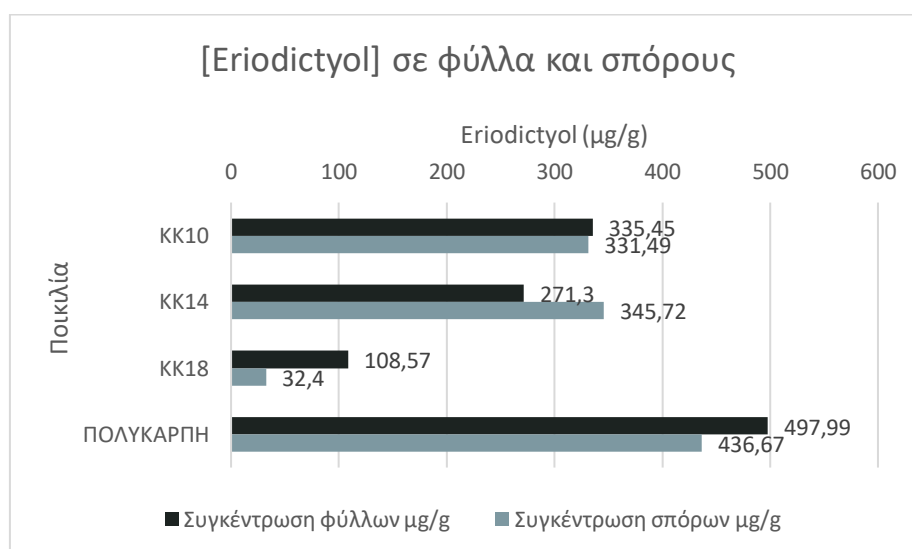


Figure 13 Συγκέντρωση εριοδικτυόλης σε φύλλα του σταδίου άνθησης και σπόρους των γονοτύπων

Στην κατηγορία των φλαβόνων, ανιχνεύθηκαν η ρομπινίνη (Figure 14) και η λουτεολίνη (Figure 15). Η ρομπινίνη ανιχνεύθηκε σε φύλλα από το στάδιο της άνθησης, ενώ στους σπόρους κάποια μεμονωμένα δείγματα είχαν μικρές ποσότητες. Η λουτεολίνη ανιχνεύθηκε κυρίως στα φύλλα και στους σπόρους σε μικρές ποσότητες. Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν υπήρχαν μεταξύ των γονοτύπων για κανέναν από τους δύο μεταβολίτες.

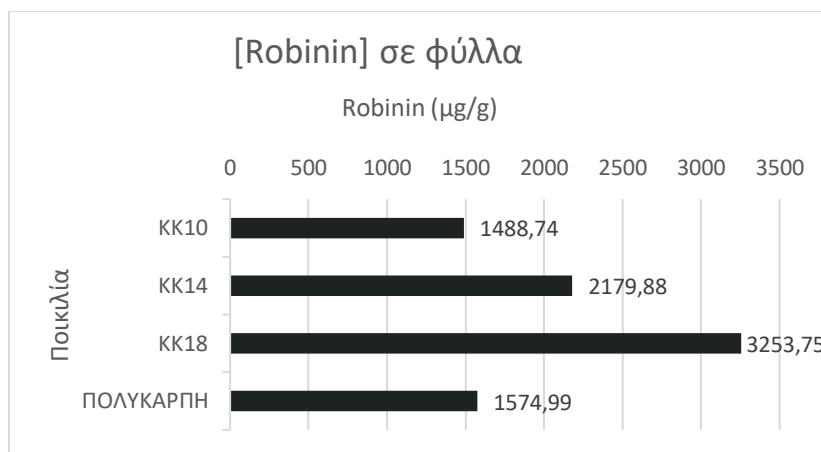


Figure 14 Συγκέντρωση ρομπινίνης σε φύλλα του σταδίου άνθησης,

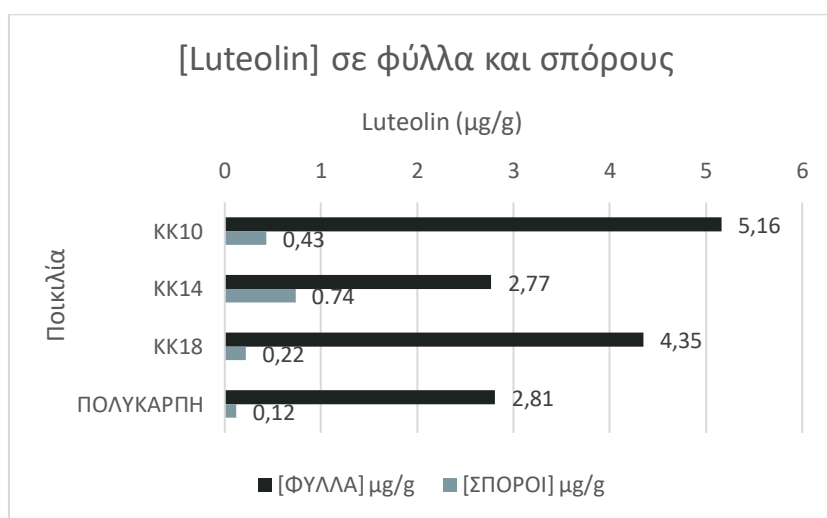


Figure 15 Συγκέντρωση λουτεολίνης σε φύλλα του σταδίου άνθησης και σπόρους

3.5 Αμινοξέα

Στην παρούσα μελέτη, σε φύλλα και σπόρους, ανιχνεύθηκαν και μελετήθηκαν 18 διαφορετικά αμινοξέα, απαραίτητα (ΕΑΑ) και μη (ΝΕΑΑ). Η παρουσία τους ήταν πιο έντονη στους σπόρους, ενώ ορισμένα από αυτά είτε απουσίαζαν από τα φύλλα είτε η παρουσία τους ήταν αμελητέα και δεν ήταν δυνατή στατιστική ανάλυση και αξιολόγηση.

Essential amino acids (EAA)

Στην κατηγορία των απαραίτητων αμινοξέων ανιχνεύθηκαν και μελετήθηκαν, σε φύλλα και σπόρους: arginine, histidine, lysine, methionine, threonine, valine, tryptophan, phenylalanine, iso-leucine και L-leucine.

Τα αμινοξέα histidine, lysine και methionine βρέθηκαν σε μικρές ποσότητες σε επίπεδο νανογραμμάρων (Πίνακας 7). Η lysine βρέθηκε μόνο στους σπόρους του

φυτού χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των γονοτύπων. Στα φύλλα μόνο αυτά που συλλέχθηκαν στο στάδιο της πλήρους άνθησης έδωσαν κάποια ελάχιστα δεδομένα τα οποία δεν ήταν αρκετά για την διεξαγωγή συμπερασμάτων και στατιστικής ανάλυσης.

Η methionine ανιχνεύτηκε στα φύλλα στο στάδιο της άνθησης και στους σπόρους (στους οποίους το συγκεκριμένο αμινοξύ δεν ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα). Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν υπήρχε ανάμεσα στους γονοτύπους.

Το αμινοξύ histidine ανιχνεύτηκε σε όλα τα φυτικά δείγματα που αναλύθηκαν (φύλλα πρώιμου σταδίου, φύλλα κατά την άνθηση και σπόροι), με την στατιστική ανάλυση να δίνει διαφορές στους σπόρους. Η σειρά ΚΚ18 είχε στατιστικά την υψηλότερη συγκέντρωση στο συγκεκριμένο αμινοξύ με μέση περιεκτικότητα 443.67ng/g συγκριτικά με τους υπόλοιπους γονότυπους.

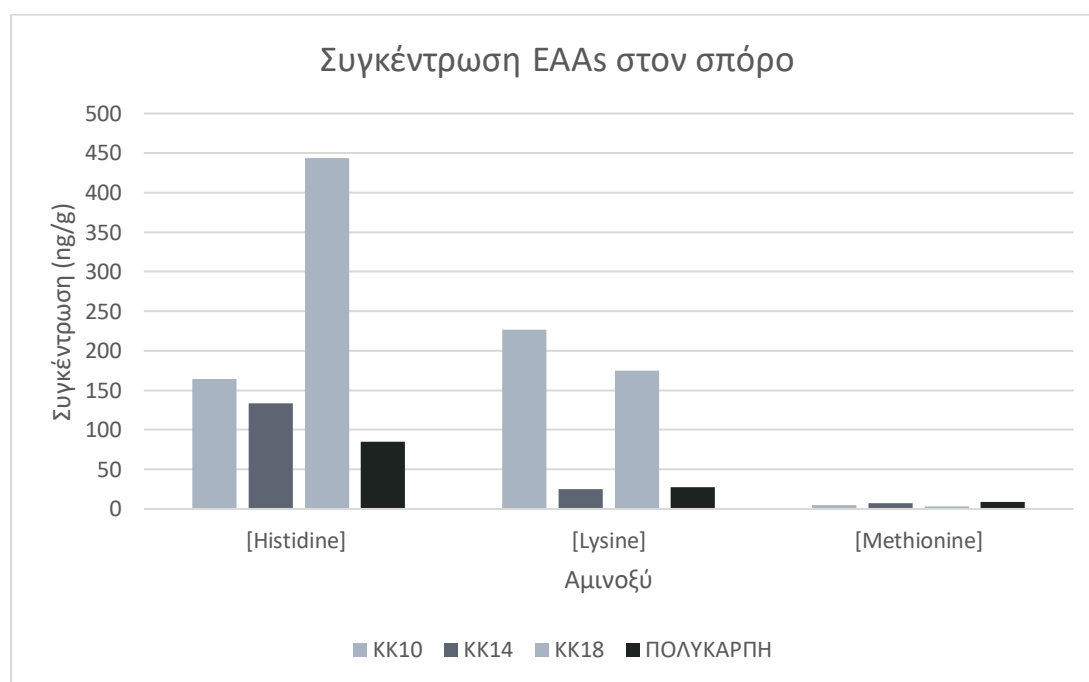


Figure 16 Συγκέντρωση των αμινοξέων histidine, lysine και methionine στους σπόρους,

Πίνακας 7 Συγκέντρωση ιστοιδίνης (histidine), λυσίνης (lysine), μεθειωνίνης (methionine) σε φύλλα πρώιμου σταδίου, φύλλα από το στάδιο της άνθησης και σπόρους. Αναγράφεται το τυπικό σφάλμα. Τα γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων.

Αμινοξύ		Ποικιλία			
		ΚΚ10	ΚΚ14	ΚΚ18	ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ
Histidine (ng/g)	Πρώιμο	8,90 ± 10,48	23,83 ± 10,48	27,25 ± 12,48	20,17 ± 10,48
	Άνθηση	12,36 ± 47,63	17,65 ± 58,34	101,19 ± 47,63	20,26 ± 47,63
	Σπόροι	164,49 ± 79,42 ^b	133,36 ± 79,42 ^b	443,67 ± 79,42 ^a	85,19 ± 79,42 ^b
Lysine (ng/g)	Πρώιμο	-	-	-	-
	Άνθηση	-	-	-	-
	Σπόροι	226,86 ± 89,44	25,29 ± 89,44	174,90 ± 89,44	27,25 ± 109,55
Methionine (ng/g)	Πρώιμο	-	-	-	-
	Άνθηση	38,92 ± 33,52	78,26 ± 33,52	23,63 ± 33,52	45,39 ± 33,52
	Σπόροι	4,50 ± 1,24	7,46 ± 1,24	2,88 ± 1,75	8,72 ± 1,24

Τα απαραίτητα αμινοξέα threonine, valine, tryptophan, phenylalanine, iso-leucine και leucine, ανιχνεύθηκαν σε όλα τα φυτικά μέρη που αναλύθηκαν (Πίνακας 8). Η ANOVA δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά για κανένα από αυτά. Με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων (LSD), ωστόσο, προέκυψαν στατιστικές διαφορές σε κάποια αμινοξέα ανάμεσα σε διάφορους γονοτύπους. Τα αμινοξέα valine, iso-leucine και leucine δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε κανένα από τα στάδια και φυτικά μέρη που αναλύθηκαν (Πίνακας 8).

Η περιεκτικότητα των σπόρων σε threonine, tryptophan και phenylalanine διέφερε στατιστικά (μέσω της LSD) ανάμεσα στους γονοτύπους (Πίνακας 8). Ο γονότυπος ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ είχε την μικρότερη μέση περιεκτικότητα στον σπόρο σχετικά με αυτά τα αμινοξέα με μέση συγκέντρωση threonine 0,22μg/g, 1,69μg/g, tryptophan και 3,80μg/g phenylalanine. Αντίθετα, η ΚΚ18 είχε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε phenylalanine και tryptophan στους σπόρους με 7,91μg/g και 3,08μg/g αντίστοιχα, ενώ η ΚΚ10 την υψηλότερη περιεκτικότητα threonine στον σπόρο με 0,99μg/g (Πίνακας 8).

Όσον αφορά τα αμινοξέα threonine και tryptophan εκτός των σπόρων είχαν διαφορές και στα φύλλα, με το πρώτο να δείχνει διαφορές στα φύλλα που αναλύθηκαν από το στάδιο της άνθησης ενώ το δεύτερο σε φύλλα πρώιμου σταδίου (Πίνακας 8). Συγκεκριμένα η σειρά ΚΚ18 είχε την υψηλότερη συγκέντρωση σε φύλλα που συλλέχθηκαν στο στάδιο της άνθησης, με μέση περιεκτικότητα 5,68μg/g threonine. Σε

πρώιμο στάδιο, στο αμινοξύ tryptophan ο γονότυπος ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ είχε την υψηλότερη συγκέντρωση στα φύλλα με μέση τιμή 10,91μg/g ενώ η ΚΚ18 είχε την χαμηλότερη συγκέντρωση στα φύλλα αυτού του σταδίου με μέση περιεκτικότητα tryptophan 2,26μg/g.

Το αμινοξύ arginine ανιχνεύθηκε μόνο στους σπόρους του φυτού- σε πρώιμο στάδιο δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα, ενώ στο στάδιο της άνθησης μόνο σε δύο από τα δείγματα-με την LSD να δείχνει διαφορές ανάμεσα στους γονοτύπους. Η ΚΚ18 είχε την υψηλότερη συγκέντρωση στον σπόρο με 17,07μg/g και τις ΚΚ10 και ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ την μικρότερη με 9,04μg/g και 9,49μg/g αντίστοιχα (Πίνακας 8).

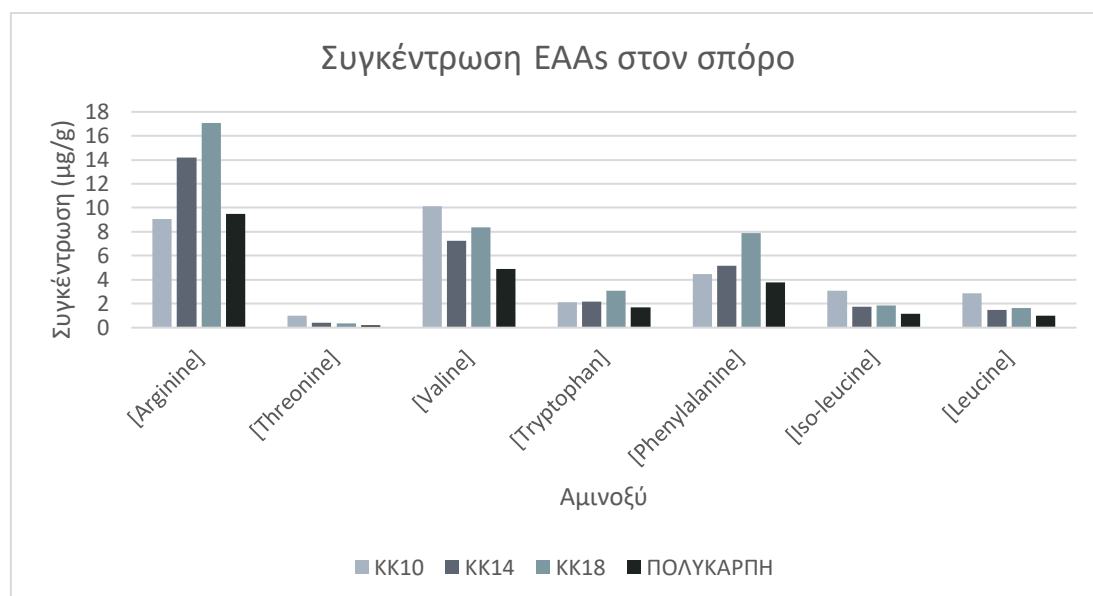


Figure 17 Συγκέντρωση ΕΑAs στους σπόρους των υπό αξιολόγηση γονοτύπων,

Πίνακας 8 Συγκέντρωση EAAs σε φύλλα πρώιμου σταδίου, σε φύλλα του σταδίου άνθησης και σε σπόρους των υπό αξιολόγηση γονοτύπων. Αναγράφεται το τυπικό σφάλμα. Τα γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων.

Αμινοξύ		Ποικιλία			
		ΚΚ10	ΚΚ14	ΚΚ18	ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ
Arginine (μg/g)	Πρώιμο	-	-	-	-
	Ανθηση Σπόρος	- 9,04 ± 2,26 ^b	- 14,19 ± 2,26 ^{ab}	- 17,07 ± 2,26 ^a	- 9,49 ± 2,26 ^b
Threonine (μg/g)	Πρώιμο	0,86 ± 0,62	1,87 ± 1,73	2,49 ± 1,73	2,50 ± 0,76
	Ανθηση Σπόρος	1,95 ± 1,07 ^b 0,99 ± 0,25 ^a	2,47 ± 1,07 ^{ab} 0,43 ± 0,35 ^{ab}	5,68 ± 1,07 ^a 0,35 ± 0,20 ^{ab}	2,68 ± 1,07 ^{ab} 0,22 ± 0,20 ^b
Valine (μg/g)	Πρώιμο	19,48 ± 3,32	23,19 ± 3,32	20,23 ± 3,32	15,55 ± 3,32
	Ανθηση Σπόρος	22,34 ± 4,92 10,15 ± 2,12	22,25 ± 4,92 7,23 ± 2,12	26,47 ± 4,92 8,36 ± 2,12	27,13 ± 4,92 4,87 ± 2,12
Tryptophan (μg/g)	Πρώιμο	3,56 ± 2,46 ^{ab}	7,16 ± 2,46 ^{ab}	2,26 ± 2,46 ^b	10,91 ± 2,46 ^a
	Ανθηση Σπόρος	2,27 ± 3,85 2,12 ± 0,31 ^{ab}	7,95 ± 3,85 2,18 ± 0,31 ^{ab}	6,34 ± 3,85 3,08 ± 0,31 ^a	5,22 ± 3,85 1,69 ± 0,31 ^b
Phenylalanine (μg/g)	Πρώιμο	9,53 ± 1,44	13,17 ± 1,44	10,47 ± 1,44	10,74 ± 1,44
	Ανθηση Σπόρος	9,87 ± 1,67 4,48 ± 1,20 ^{ab}	9,70 ± 1,67 5,15 ± 1,20 ^{ab}	11,08 ± 1,67 7,91 ± 1,20 ^a	9,76 ± 1,67 3,80 ± 1,20 ^b
Iso-leucine (μg/g)	Πρώιμο	2,94 ± 0,45	3,04 ± 0,45	2,20 ± 0,45	2,06 ± 0,45
	Ανθηση Σπόρος	6,02 ± 1,72 3,06 ± 0,70	5,86 ± 1,72 1,73 ± 0,70	7,34 ± 1,72 1,84 ± 0,70	7,48 ± 1,72 1,14 ± 0,70
Leucine (μg/g)	Πρώιμο	3,21 ± 0,53	3,32 ± 0,53	2,26 ± 0,53	2,16 ± 0,53
	Ανθηση Σπόρος	5,43 ± 1,63 2,86 ± 0,66	5,03 ± 1,63 1,49 ± 0,66	6,63 ± 1,63 1,62 ± 0,66	6,62 ± 1,63 0,99 ± 0,66

Non-essential amino acids (NEAA)

Τα μη απαραίτητα αμινοξέα που ανιχνεύθηκαν και μελετήθηκαν στα φυτικά μέρη των γονοτύπων περιλαμβάνουν τα: L-citrulline, tyrosine, asparagine, glutamate, proline, aspartate, glutamine και L-norleucine (Πίνακας 9).

Στα αμινοξέα tyrosine, asparagine, glutamate και L-norleucine δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των υπό μελέτη γονοτύπων. Στην tyrosine τα δεδομένα από τα φύλλα πρώιμου σταδίου δεν ήταν επαρκή για αξιόπιστη στατιστική ανάλυση (Πίνακας 9).

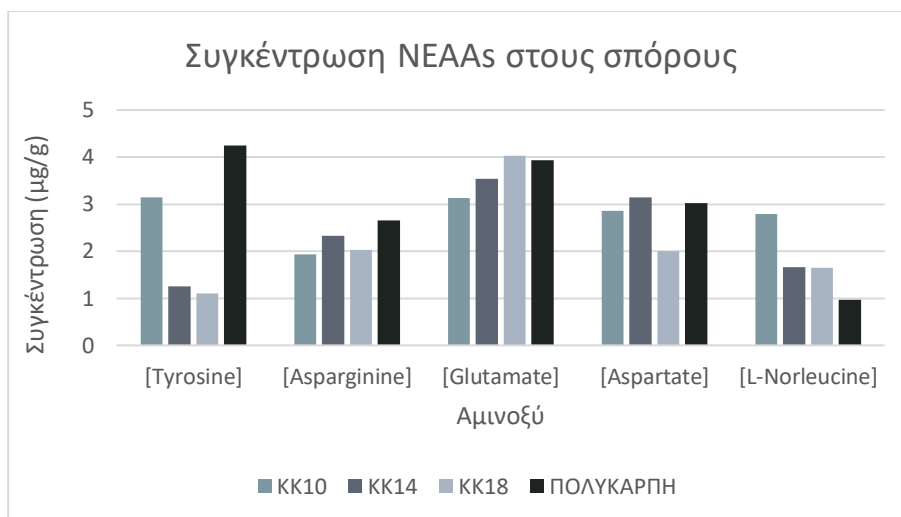


Figure 18 Συγκέντρωση ΝΕΑAs στους σπόρους των υπό αξιολόγηση γονοτύπων,

Σε L-citrulline και aspartate η ANOVA δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά. Κατόπιν ανάλυσης με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων (LSD), υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους σπόρους. Όσον αφορά την L-citrulline, ο γονότυπος KK14 είχε την υψηλότερη

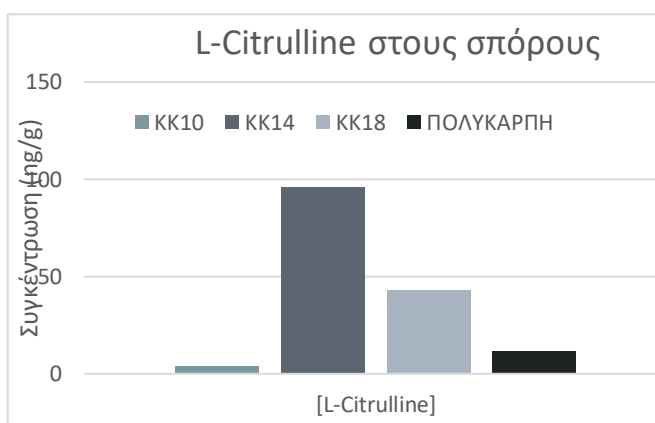


Figure 19 Συγκέντρωση L-Citrulline στους σπόρους των υπό αξιολόγηση γονοτύπων.

συγκέντρωση με μέση περιεκτικότητα σπόρου στα 96,02ng/g και η KK10 την χαμηλότερη με 3,86ng/g. Η KK14 είχε επίσης και την υψηλότερη συγκέντρωση aspartate στους σπόρους, μαζί με την ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ, με μέση περιεκτικότητα 3,14μg/g για την KK14 και 3,02μg/g για την ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ, αντίθετα η KK18 είχε την χαμηλότερη συγκέντρωση aspartate στον σπόρο με μέση συγκέντρωση 2μg/g. Στο αμινοξύ l-citrulline ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις σε ελάχιστα δείγματα φύλλων του πρώιμου και του σταδίου άνθησης (Πίνακας 9).

Σύμφωνα με την ANOVA δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων ως προς την περιεκτικότητα σε proline και glutamine στους σπόρους και στα φύλλα στα δύο στάδια ανάπτυξης. Η περιεκτικότητα σε proline και glutamine στα φύλλα του πρώιμου σταδίου διέφερε στατιστικά, μεταξύ των γονοτύπων σύμφωνα με την ανάλυση LSD. Η σειρά ΚΚ14 με μέση

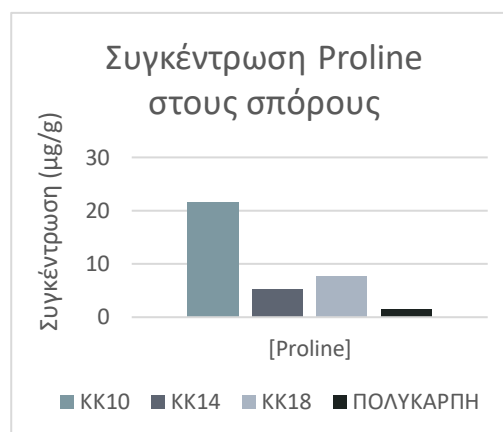


Figure 20 Συγκέντρωση προλίνης (proline) στους σπόρους των υπό αξιολόγηση γονοτύπων.

συγκέντρωση proline στα φύλλα πρώιμου σταδίου 461,49μg/g είχε την υψηλότερη μέση τιμή και ο γονότυπος ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ με 134,23μg/g την χαμηλότερη. Αντίθετα, για το αμινοξύ glutamine, ο γονότυπος ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ είχε την υψηλότερη μέση συγκέντρωση με 3,05μg/g και η ΚΚ14 την χαμηλότερη με 1,75μg/g (Πίνακας 9).

Πίνακας 9 Συγκέντρωση ΝΕΑAs σε φύλλα πρώιμου σταδίου, σε φύλλα του σταδίου άνθησης και σε σπόρους των υπό αξιολόγηση γονοτύπων. Αναγράφεται το τυπικό σφάλμα. Τα γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων.

Αμινοξύ		Ποικιλία			
		ΚΚ10	ΚΚ14	ΚΚ18	ΠΟΛΥΚΑΡΙΠΗ
L-Citrulline (ng/g)	Πρώιμο	-	-	-	-
	Άνθηση	-	-	-	-
	Σπόροι	3,86 ± 25,37	96,02 ± 25,37	42,94 ± 25,37	11,29 ± 31,08
Tyrosine (μg/g)	Πρώιμο	-	-	-	-
	Άνθηση	0,38 ± 0,13	0,36 ± 0,13	0,28 ± 0,13	0,19 ± 0,13
	Σπόροι	3,14 ± 1,81	1,25 ± 1,81	1,11 ± 1,81	4,24 ± 1,81
Asparagine (μg/g)	Πρώιμο	3,14 ± 1,12	3,94 ± 1,12	2,88 ± 1,12	3,54 ± 1,12
	Άνθηση	4,45 ± 2,39	5,88 ± 2,39	4,12 ± 2,39	6,36 ± 2,39
	Σπόροι	1,93 ± 0,30	2,33 ± 0,30	2,03 ± 0,30	2,65 ± 0,30
Glutamate (μg/g)	Πρώιμο	9,60 ± 1,07	11,66 ± 1,07	10,10 ± 1,07	9,25 ± 1,07
	Άνθηση	8,31 ± 1,28	6,98 ± 1,28	8,27 ± 1,28	5,07 ± 1,28
	Σπόροι	3,13 ± 0,41	3,54 ± 0,41	4,03 ± 0,41	3,93 ± 0,41
Proline (μg/g)	Πρώιμο	195,15 ± 99,83 ^{ab}	461,49 ± 99,83 ^a	145,29 ± 99,83 ^{ab}	134,23 ± 99,83 ^b
	Άνθηση	202,48 ± 84,97	189,21 ± 84,97	332,85 ± 84,97	226,47 ± 84,97
	Σπόροι	21,58 ± 7,03	5,29 ± 7,03	7,75 ± 7,03	1,53 ± 7,03
Aspartate (μg/g)	Πρώιμο	4,95 ± 0,99	5,94 ± 0,99	5,00 ± 0,99	4,27 ± 0,99
	Άνθηση	3,64 ± 0,71	3,10 ± 0,71	4,50 ± 0,71	3,08 ± 0,71
	Σπόροι	2,86 ± 0,28 ^{ab}	3,14 ± 0,28 ^a	2,00 ± 0,28 ^b	3,02 ± 0,28 ^a
Glutamine (μg/g)	Πρώιμο	1,94 ± 0,37 ^{ab}	1,75 ± 0,37 ^b	2,51 ± 0,37 ^{ab}	3,05 ± 0,37 ^a
	Άνθηση	2,35 ± 0,39	1,94 ± 0,39	2,68 ± 0,39	1,89 ± 0,39
	Σπόροι	-	-	-	-
L-Norleucine (μg/g)	Πρώιμο	2,93 ± 0,44	3,06 ± 0,44	2,20 ± 0,44	1,93 ± 0,44
	Άνθηση	4,79 ± 1,54	4,62 ± 1,54	5,98 ± 1,54	6,04 ± 1,54
	Σπόροι	2,79 ± 0,64	1,66 ± 0,64	1,65 ± 0,64	0,97 ± 0,64

3.6 Χρήση μεταβολιτών ως βιοδείκτες ποιότητας σπόρου

Σύμφωνα με τις στατιστικές αναλύσεις που έγιναν στα δείγματα της παρούσας μελέτης, σε καμία περίπτωση η περιεκτικότητα των μεταβολιτών (αμινοξέα, φλαβονοειδή, οργανικά οξέα) δεν σχετιζόταν στατιστικά σημαντικά με την αντίστοιχη στα φύλλα στα δύο στάδια ανάπτυξης.

4. Συζήτηση

Αγρονομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά

Στην παρούσα μελέτη οι γονότυποι αξιολογήθηκαν ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά: ύψος, πλάτος λοβού, μήκος λοβού, βάρος λοβού αριθμός και βάρος σπόρων για τον κάθε λοβό, καθώς και για χαρακτηριστικά απόδοσης του κάθε φυτού: αριθμός λοβών ανά φυτό, βάρος λοβών φυτό, αριθμός και βάρος σπόρων ανά φυτό, Στατιστικές διαφορές προέκυψαν για τα χαρακτηριστικά των λοβών, πλην του αριθμού σπόρων για κάθε λοβό, ενώ στα ολικά χαρακτηριστικά ο συνολικός αριθμός λοβών και ο συνολικός αριθμός σπόρων φάνηκαν να διαφέρουν μεταξύ των γονοτύπων (Πίνακας 1,2,3).

Το μέσο ύψος των γονοτύπων κυμάνθηκε μεταξύ 85,04-89,80cm (μέσο ύψος ~87,5cm), με τον γονότυπο ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ να παρουσιάζει την ελάχιστη τιμή και την ΚΚ10 την μέγιστη, ενώ ενδιάμεσα ήταν οι ΚΚ14 με μέσο ύψος 88,21cm και η ΚΚ18 με 87,04cm (Πίνακας 1), οι ποικιλίες δεν έδειξαν κάποια διαφορά μεταξύ τους, τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά της μελέτης του [Sharifi P. 2015](#) όπου ύστερα από αξιολόγηση τοπικών πληθυσμών και βελτιωμένων σειρών του ίδιου είδους, από την περιοχή του Ιράν και της Συρίας, δεν προέκυψαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών με το μέσο ύψος να παρουσιάζεται στα 80,15cm. Οι [Malek N. et al. 2021](#) αντίθετα σε αξιολόγηση 14 γονοτύπων κουκιού που έκαναν στην περιοχή της Αλγερίας, παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στα ύψη των γονοτύπων, με εύρος από 68,12cm-90,12cm και μέση τιμή 81,36cm. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται είτε στο γενετικό υλικό που έχει χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση είτε στις συνθήκες καλλιέργειας.

Στα χαρακτηριστικά των λοβών οι διαφορές ήταν εμφανείς, για την πλειοψηφία των χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν (Πίνακας 2). Η υπό βελτίωση σειρά ΚΚ18 έδειξε να υπερτερεί έναντι των υπολοίπων σε μήκος, πλάτος, βάρος λοβού και βάρος σπόρων ανά λοβό. Οι [Kumar et al. 2020](#) εντόπισαν επίσης διαφορές στα χαρακτηριστικά των λοβών στους γονοτύπους που μελέτησαν, με το μήκος των λοβών να κυμαίνεται μεταξύ 6,40-8,65cm (μέσο μήκος 7,36cm), μέσο πλάτος 1,46cm και βάρος λοβού στα 7,40g, τιμές υψηλότερες από αυτές της σειράς ΚΚ18 που παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές στην παρούσα μελέτη για τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά. Τα αποτελέσματα των [Al Barri T. and Shtaya M.J.Y. 2013](#) έδειξαν να υπάρχει στενή

συσχέτιση μεταξύ των χαρακτηριστικών “μήκος λοβού” και “πλάτος λοβού”, καθώς η ποικιλία KK18 που παρουσίασε την υψηλότερη τιμή για το μέσο μήκος του λοβού στα 6,48cm είχε αντίστοιχα και το μέγιστο πλάτος με μέση τιμή 1,22cm. Αντίστοιχα, ο γονότυπος ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ που είχε την χαμηλότερη στατιστικά τιμή για το μέσο μήκος λοβού (5,46cm), είχε το χαμηλότερο πλάτος λοβού στα 1,07cm.

Οι στατιστικές αναλύσεις που έγιναν στη μελέτη δεν έδειξαν κάποια σημαντική διαφορά όσον αφορά τον αριθμό των σπόρων ανά λοβό, με τις τιμές να κυμαίνονται από 3,3 σπόρους ανά λοβό (KK10 και KK18) και 3,4 (KK14 και ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ). Αντίθετα οι [Kumar et al. 2020](#), βρήκαν διαφορές στους γονότυπους που μελέτησαν, με το εύρος των τιμών όσον αφορά τον αριθμό των σπόρων ανά λοβό να κυμαίνεται μεταξύ 3 και 4,05. Παρόμοια η KK18 είχε το υψηλότερο βάρος σπόρων ενώ η ποικιλία ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ το μικρότερο.

Στα ολικά χαρακτηριστικά απόδοσης που μελετήθηκαν διαφορές παρατηρήθηκαν στον αριθμό των λοβών και τον αριθμό των σπόρων ανά φυτό, η ποικιλία ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ με μέσο αριθμό λοβών ανά φυτό 20,3 και αριθμό σπόρων ανά φυτό 56,8, υπερτερούσε έναντι των άλλων γονοτύπων και αμέσως επόμενη η σειρά KK10 με τιμές 20,2 και 52,7 αντίστοιχα ([Πίνακας 3](#)). Σε αξιολόγηση που έγινε σε 13 τοπικές ποικιλίες κουκιού της Νοτίου Ιταλίας ([De Cillis F. et al. 2023](#)), υπήρχε ποικιλομορφία, που προέρχεται κυρίως από τον γονότυπο, ως προς τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά, με τιμές μικρότερες από αυτές των γονοτύπων στην παρούσα μελέτη. Οι τοπικοί πληθυσμοί των [De Cillis F. et al. 2023](#), έδωσαν μέγιστο αριθμό λοβών ανά φυτό 8,6 και μέγιστο αριθμό σπόρων ανά φυτό 25,6.

Σχετικά με το ολικό βάρος λοβών και το ολικό βάρος σπόρων ανά φυτό, , στα οι γονότυποι δεν διέφεραν μεταξύ τους. Αντίθετα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των [Al Barri T. and Shtaya M.J.Y. 2013](#) και [Sharifi P. 2015](#), οι γονότυποι που μελέτησαν διέφεραν μεταξύ τους για τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά. Επιπλέον, οι [Al Barri T. and Shtaya M.J.Y. 2013](#) αναφέρουν θετική συσχέτιση του χαρακτηριστικού “μήκος λοβού” και “βάρος λοβού ανά φυτό”, κάτι το οποίο δεν προέκυψε από την παρούσα μελέτη.

Ιχνοστοιχεία

Η ανάλυση που έγινε στους γονοτύπους ως προς την περιεκτικότητα των σπόρων σε μάκρο- (Na Ca, Mg, K) και μικροθρεπτικά (Fe, Mn, Cu, Zn) στοιχεία, έδειξε πως οι γονότυποι διαφέρουν ως προς το Na, το Ca, το K και το Mn ([Πίνακας 4](#)).

Ανάμεσα στους γονοτύπους που μελετήθηκαν, οι διαφορές στο Na ήταν μικρές, με την ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ και ΚΚ18 να έχουν τις υψηλότερες τιμές (0,13mg/g και 0,12mg/g αντίστοιχα) και την ΚΚ14 την μικρότερη με 0,08mg/g. Το νάτριο (Na) έχει βρεθεί να σχετίζεται με υψηλή αρτηριακή πίεση και η συγκέντρωση του σε υψηλές τιμές δεν είναι επιθυμητή (Martineau-Cote D. et al. 2022). Οι σπόροι της σειράς ΚΚ10 υπερτερούσαν σε περιεκτικότητα καλίου με 9mg/g, ελαφρώς μεγαλύτερη συγκέντρωση από εκείνη της ποικιλίας ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ που είχε 8,47mg/g κάλιο στον σπόρο ενώ η ΚΚ18 με 8,20mg/g είχε τη μικρότερη συγκέντρωση στον σπόρο. Το κάλιο σύμφωνα με τους Papanikolaou Y. and Fulgoni V.L. 2008 δρα ως ρυθμιστής της αρτηριακής πίεσης συμβάλλοντας στην πρόληψη καρδιαγγειακών ασθενειών, ενώ αντίστοιχη επίδραση φαίνεται να έχει και το μαγνήσιο Papanikolaou Y. and Fulgoni V.L. 2008. Όσον αφορά το Ca, η ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ είχε υψηλότερη συγκέντρωση με 0,16mg/g στον σπόρο μπροστά από την ΚΚ10 (0,15mg/g) και τις ΚΚ14 και ΚΚ18 που είχαν 0,14mg/g ασβεστίου στον σπόρο. Η έλλειψη του ασβεστίου μπορεί να οδηγήσει σε παθήσεις των οστών ενώ σημαντικό πρόβλημα στις τροφές φυτικής προέλευσης αποτελεί η παρουσία φυτικών οξέων, καθώς δημιουργούν σύμπλοκα με τα ιόντα Ca και Mg, μειώνοντας σε σημαντικό βαθμό την βιοδιαθεσιμότητα τους, με αποτέλεσμα να παρατηρείται έλλειψη αυτών των στοιχείων στους οργανισμούς των ζώων που καταναλώνουν την τροφή (Rahman M.M. et al. 2012). Στη συγκέντρωση μαγνησίου (Mg) οι γονότυποι δεν είχαν καμία στατιστική διαφορά με τις τιμές να κυμαίνονται από το 1,05mg/g (ΚΚ10) έως 1,08mg/g (ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ). Οι Multari S. et al. 2016 σε ανάλυση αλεύρου από κουκί μετρήσαν υψηλότερες τιμές σε ασβέστιο και νάτριο (0,27mg/g και 0,22mg/g αντίστοιχα) αλλά όχι σε μαγνήσιο και κάλιο των οποίων οι τιμές ήταν 0,55mg/g και 5,5mg/g. Ακόμα, οι Grela E.R et al. 2017 σε αξιολόγηση σπόρων ποικιλίας κουκιού με λευκό άνθος, βρήκαν μέση τιμή νατρίου 0,20mg/g, ασβεστίου 1,19mg/g, μαγνησίου 1,26mg/g και καλίου 11,8mg/g, τιμές υψηλότερες από αυτές που είχαν οι γονότυποι στην παρούσα μελέτη.

Οι γονότυποι, παρουσίασαν διαφορές ως προς την περιεκτικότητα των σπόρων σε μαγγάνιο (Mn), με τους γονοτύπους ΚΚ10 και ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ να έχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις με 12,70μg/g και 12,49μg/g, τον ΚΚ18 να ακολουθεί με 11,76μg/g και τελευταία την ΚΚ14 με 11,06μg/g. Οι σπόροι δεν είχαν διαφορές στην περιεκτικότητα σιδήρου (Fe), χαλκού (Cu) και ψευδαργύρου (Zn). Η περιεκτικότητα του σιδήρου κυμάνθηκε μεταξύ 47,10μg/g και 50,63μg/g, του χαλκού από 10,47μg/g μέχρι 11,14μg/g και του ψευδαργύρου από 43,03μg/g μέχρι 46,37μg/g.

Αν και είναι σπάνιο να παρατηρηθεί έλλειψη μαγγανίου σε έναν οργανισμό, έλλειψη του μπορεί να επιφέρει αρνητικές συνέπειες στον μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθρακών (Li L. 2018). Ο σίδηρος, ο χαλκός και ο ψευδάργυρος αποτελούν απαραίτητα ιχνοστοιχεία για έναν οργανισμό και έλλειψη αυτών έχει βρεθεί να σχετίζεται με αναιμία, παθήσεις στα οστά, αδύναμο ανοσοποιητικό και στην ομαλή λειτουργία του μεταβολισμού (Collins 2014, Prohaska 2012, Fairweather-Trait S.J. et al. 2010). Ιδιαίτερο πρόβλημα στην απορρόφηση σιδήρου και ψευδαργύρου από τον οργανισμό αποτελεί η παρουσία φυτικών οξέων και ταννινών (Geraldo R. Et al. 2022).

Σε μελέτη των Mattila P. et al. 2018 όπου αξιολογήθηκαν σπόροι κουκιού, τα ευρήματα έδειξαν γονότυπους με συγκέντρωση σιδήρου χαμηλότερη από αυτή της παρούσας μελέτης, με μέση συγκέντρωση σιδήρου 26,5μg/g, μικρές ωστόσο ήταν οι διαφορές στον ψευδάργυρο και το μαγγάνιο με μέση συγκέντρωση 48,5μg/g και 14,4μg/g αντίστοιχα, ενώ οι σπόροι είχαν συγκέντρωση χαλκού μεγαλύτερη από τους γονοτύπους της παρούσας μελέτης με συγκέντρωση 16,6μg/g. Διαφορές έδειξαν και τα ευρήματα των Mayer Labba et al. 2020, όσον αφορά τον Fe και τον Zn, οι οποίοι μελέτησαν 15 μικρόσπερμες ποικιλίες κουκιού από τη Σουηδία με λευκά και έγχρωμα άνθη, οι οποίες είχαν ένα μεγάλο εύρος στην περιεκτικότητα σιδήρου (18μg/g-70μg/g) και ψευδάργυρο 9-52μg/g, με τις έγχρωμες ποικιλίες να υπερτερούν στην περιεκτικότητα σιδήρου ενώ τις λευκές σε αυτή του ψευδαργύρου. Στην παρούσα μελέτη όλες οι ποικιλίες που αξιολογήθηκαν είχαν το χαρακτηριστικό του λευκού άνθους, η KK18 έδειξε την υψηλότερη συγκέντρωση ψευδαργύρου στα 46,37μg/g και την ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ να υπερτερεί σε σίδηρο έναντι των υπολοίπων σημειώνοντας μέση συγκέντρωση σιδήρου στον σπόρο 50,63μg/g.

Φλαβονοειδή

Στα φύλλα και τους σπόρους των γονοτύπων ανιχνεύθηκαν φαινολικές ενώσεις που ανήκουν σε υποκατηγορίες φλαβονοειδών (φλαβαν-3-όλες, φλαβονόνες, φλαβονόλες, φλαβόνες), ορισμένες ανιχνεύθηκαν μόνο στα φύλλα, άλλες μόνο στους σπόρους ενώ άλλες βρέθηκαν και στα δύο φυτικά μέρη που ανλύθηκαν.

Φλαβάν-3-όλες (επικατεχίνες, επιγαλλοκατεχίνες) βρέθηκαν μόνο στους σπόρους των γονοτύπων παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 6). Οι σπόροι της KK10 είχαν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε επικατεχίνες και επιγαλλοκατεχίνες με συγκεντρώσεις 51,29μg/g και 19,63μg/g αντίστοιχα. Την

μικρότερη συγκέντρωση είχαν οι σπόροι της ποικιλίας ΠΟΛΥΚΑΡΙΠΗ με 0,32μg/g επικατεχίνες και 0,42μg/g επιγαλλοκατεχίνες (Figure 9, 10). Η επι- και επιγαλλοκατεχίνη είναι ενώσεις που απαντώνται ως επί το πλείστον στο κακάο και υπάρχει έντονο ενδιαφέρον στην μελέτη τους καθώς σχετίζονται με ευεργετικές για τον οργανισμό ιδιότητες (μείωση αρτηριακής πίεσης) (Bernatova 2018). Αποτελούν όμως πρόδρομα μόρια των τανινών (Ky I et al. 2016). Σύμφωνα με τους Geraldo R. et al. 2022, οι τανίνες κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις, αποτελούν ανεπιθύμητο παράγοντα για το σιτηρέσιο των εκτρεφόμενων ζώων, καθώς δρουν αρνητικά στην πρόσληψη και αφομοίωση ουσιών και ιχνοστοιχείων. Οι Elessawy et al. 2019 σε μελέτη τους βρήκαν αντίστοιχα αποτελέσματα, σε ποικιλίες κουκιού με λευκά άνθη και λευκά άνθη με μαύρα στίγματα, παρουσιάζοντας μεγάλο εύρος των σπόρων σε φλαβάν-3-όλες, με τις επικατεχίνες μεταξύ 0-500μg/g και τις επιγαλλοκατεχίνες από 0μg/g έως περίπου 400μg/g.

Φλαβονόλες ανιχνευθήκαν στα φύλλα των υπό μελέτη γονοτύπων που συλλέχθηκαν κατά το στάδιο της άνθησης, ενώ ελάχιστες ήταν οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν στους σπόρους. Πρόκειται για γλυκοζίτες κερσετίνης (quercetin-3-gal, quercetin-3-glc, quercetin-3-glc-ara, quercetin-3-rha και rutin) (Figure 11, 12). Για καμία ουσία δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων ενώ παρουσίασαν μεγάλο εύρος τιμών. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης στην οποία δεν ανιχνεύθηκε ρουτίνη στους σπόρους, οι Johnson J.B. et al. 2021, εντόπισαν ρουτίνη (rutin) στους σπόρους 10 διαφορετικών ποικιλιών κουκιού, χωρίς όμως να εντοπίσουν κάποια διαφορά ανάμεσα στους γονότυπους που αξιολόγησαν. Η συγκέντρωση ρουτίνης στους σπόρους των ποικιλιών των Johnson J.B. et al. 2021 ήταν σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη στα φύλλα των υπό μελέτη γονοτύπων, καθώς είχαν εύρος 4,04-15,87μg/g ενώ η συγκέντρωση στα φύλλα των γονοτύπων της παρούσας μελέτης κυμάνθηκε από 16,69μg/g για την υπό βελτίωση σειρά KK14 έως 981,44μg/g για την σειρά KK18. Η απουσία της ρουτίνης από τα φύλλα δεν επιτρέπει την συσχέτιση της με τις συγκεντρώσεις που βρέθηκαν στους σπόρους,

Γλυκοζίτες κερσετίνης σε σπόρους και λοβούς έχουν βρεθεί επίσης και από τους Spanou C. et al. 2012, ενώ οι Elessawy F.M. et al. 2023 σε μελέτη που έκαναν σε 7 διαφορετικές υπό βελτίωση σειρές κουκιού, εντόπισαν γλυκοζίτες κερσετίνης στα άνθη με μεγαλύτερη συγκέντρωση να επιδεικνύουν τα έγχρωμα άνθη. Οι γλυκοζίτες

κερσετίνης φαίνεται να εμπλέκονται σε αρκετά στάδια του μεταβολισμού των φυτών (ανάπτυξη, φωτοσύνθεση κ.α.), η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση συνδέεται με την απόκριση των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Salenge T. et al. 2023; Singh P. et al. 2021), Ανάμεσα στους γλυκοζίτες κερσετίνης που ανιχνεύθηκαν στα φύλλα των υπό μελέτη γονοτύπων, η σειρά KK18 είχε την υψηλότερη συγκέντρωση σε quercetin-3-gal και quercetin-3-glc με 174,02μg/g και 61,98μg/g αντίστοιχα, ενώ η ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ υπερτερούσε σε quercetin-3-glc-ara (67,01μg/g) και quercetin-3-rha (55,31μg/g). Αντίθετα, η σειρά KK14 είχε την χαμηλότερη συγκέντρωση σε quercetin-3-gal, quercetin-3-glc-ara και quercetin-3-rha με 4,86μg/g, 4,83μg/g και 13,27μg/g αντίστοιχα, ενώ η KK10 την χαμηλότερη συγκέντρωση σε quercetin-3-glc με 31,33μg/g.

Η ρομπινίνη και η λουτεολίνη εντοπίστηκαν στα φύλλα (Figure 14), με τη λουτεολίνη να έχει και μικρές ποσότητες στους σπόρους. (Figure 15) Είναι φαινολικές ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των φλαβόνων. Αρκετές μελέτες έχουν εστιάσει στην πιθανή φαρμακευτική τους χρήση. Οι Janeesh P.A. and Abraham A. 2014 στην μελέτη τους έδειξαν ότι η ρομπινίνη έχει ωφέλιμη δράση στην καταπολέμηση καρδιακών παθήσεων. Μελέτες έχουν γίνει ακόμη για την αντιφλεγμονώδη και αντιαρθριτική δράση της ρομπινίνης (Tsiklauri L. et al. 2021) καθώς και για τη χρήση της ως φάρμακο κατά της οστεοπόρωσης (Hong G. et al. 2021). Η λουτεολίνη είναι ουσία που απαντάται σε φυτά και βότανα με το ενδιαφέρον των ερευνητών να στρέφεται στην ενδεχόμενη αντικαρκινική δράση που φαίνεται να έχει (Imran M. et al. 2019), αλλά και για τη δράση της στην καταπολέμηση δερματικών παθήσεων (Gendrish F. et al. 2020). Στα φύλλα των γονοτύπων που μελετήθηκαν οι τιμές της ρομπινίνης δεν έδειξαν στατιστικές διαφορές αλλά έδειξαν μεγάλο εύρος με την KK10 να έχει τη χαμηλότερη περιεκτικότητα στα φύλλα με 1.488,74μg/g και την KK18 την υψηλότερη με 3.253,75μg/g. Τα επίπεδα της λουτεολίνης κυμάνθηκαν σε χαμηλότερες τιμές με την ποικιλία KK10 να έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα στα φύλλα με 5,16μg/g και την KK14 την υψηλότερη στα φύλλα με 0,74μg/g. Οι Ellessawy F.M. et al. 2019 σε σπόρους κουκιού βρήκαν συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 50μg/g λουτεολίνης.

Η εριοδικτυόλη (eriodictyol) που ανιχνεύθηκε σε φύλλα και σπόρους (Figure 13), χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους γονοτύπους, ανήκει στην υποκατηγορία των φλαβονονών. Όπως οι πλειοψηφία

των φλαβονοειδών ενώσεων, έτσι και η εριοδικτυόλη έχει μελετηθεί για την φαρμακευτική δράση της, με μελέτες να την συνδέουν με αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αναλγητική και αντιοξειδωτική δράση καθώς και σαν δραστική ουσία με ωφέλιμη δράση σε νευρολογικές και καρδιακές παθήσεις (Deng Z. et al. 2020; Islam A. et al. 2020). Στην παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση εριοδικτυόλης στα φύλλα κυμάνθηκε από 108,57μg/g (KK18) έως 497,99μg/g ενώ στους σπόρους η KK18 είχε τη μικρότερη συγκέντρωση με 32,40μg/g και η ΠΟΛΥΚΑΡΙΠΗ την μεγαλύτερη με 436,67μg/g. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι Ellassawy F.M. et al. 2019, σε τέσσερις γονοτύπους κουκιού οι σπόροι δεν κατέγραψαν συγκέντρωση εριοδικτυόλης.

Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα και η μελέτη τους παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς έχει βρεθεί να έχουν πολλές εφαρμογές στην σύγχρονη φαρμακευτική βιομηχανία και στη βιομηχανία τροφίμων. Το φουμαρικό οξύ έχει μελετηθεί για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες απέναντι σε δερματικές παθήσεις (ψωρίαση), ευεργετική δράση σε καρδιακές αλλά και νευρολογικές παθήσεις (Das et al. 2016). Ακόμα χρησιμοποιείται προσθετικό σε τρόφιμα για τη βελτίωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών αλλά και στην βιομηχανία του γάλακτος και της πτηνοτροφίας για τη μείωση εκπομπών CH₄ (Das et al. 2016). Οργανικά οξέα όπως το μηλικό, το κιτρικό, το σουκιμικό, αλλά και το φουμαρικό που αναφέρθηκε παραπάνω, συμβάλλουν στην γευστική ισορροπία, την χημική σύσταση, το pH, αλλά και την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων στα οποία είναι παρόντα (Lin H. et al. 2018). Στην παρούσα μελέτη οργανικά οξέα (μηλικό, κιτρικό, σουκιμικό, φουμαρικό), ανιχνεύθηκαν σε όλους τους φυτικούς ιστούς που αναλύθηκαν (φύλλα πρώιμου σταδίου, φύλλα κατά την άνθηση, σπόροι) (Πίνακας 5).

Το μηλικό και το φουμαρικό οξύ διέφεραν σημαντικά στου σπόρους των γονοτύπων ενώ στα φύλλα δεν εμφάνισαν καμία διαφορά, με τα φύλλα πρώιμου σταδίου ωστόσο να παρουσιάζουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις (Πίνακας 5, Figure 5, 8). Την υψηλότερη συγκέντρωση μηλικού οξέος στους σπόρους είχε η σειρά KK18 με 190,81μg/g ενώ τη μικρότερη η ΠΟΛΥΚΑΡΙΠΗ με 59,68μg/g. Οι Avramidou E. et al. 2023 σε μεταβολόμικη αξιολόγηση των σπόρων για τους ίδιους γενότυπους, η σειρά KK14 είχε την υψηλότερη συγκέντρωση σε μηλικό οξύ και η KK10 τη χαμηλότερη. Αυτό υποδεικνύει ότι και άλλοι παράγοντες εκτός του γονοτύπου επηρεάζουν τη συγκέντρωση μηλικού οξέος στο σπόρο. Το μηλικό οξύ που βρέθηκε σε παράγωγα

προϊόντα κουκιού (Lin H. et al. 2018) είχε υψηλότερες συγκεντρώσεις (εύρος 2.162-3.649μg/g) συγκριτικά με τους φυτικούς ιστούς στην παρούσα μελέτη. Η συγκέντρωση του φουμαρικού οξέος ήταν χαμηλότερη από αυτή του μηλικού, με εύρος που κυμάνθηκε στους σπόρους μεταξύ 2,18μg/g (ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ) και 7,72μg/g (ΚΚ18), στα φύλλα κατά το στάδιο της άνθησης μεταξύ 25,55μg/g (ΚΚ18) και 28,51μg/g (ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ) και στα φύλλα σε πρώιμο στάδιο μεταξύ 36,60μg/g (ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ) και 43,99μg/g (ΚΚ14). Η συγκέντρωση του φουμαρικού οξέος ήταν αισθητά μικρότερη από αυτή που βρέθηκε σε φυτά αραβίδοψης από τους Chia D.W. et al. 2000, με τα αποτελέσματα όμως να συμφωνούν στην πιο έντονη παρουσία φουμαρικού οξέος στα φύλλα έναντι των σπόρων (2.100μg/g στα φύλλα αραβίδοψης έναντι 90μg/g στους σπόρους). Ακόμα, οι Chia D.W. et al. 2000, μέτρησαν την περιεκτικότητα φουμαρικού οξέος σε φύλλα από φασόλια και τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλότερες συγκεντρώσεις (340μg/g-380μg/g) από αυτές της παρούσας μελέτης. Συγκέντρωση παρόμοια με αυτή των γονοτύπων που μελετήθηκαν βρήκαν οι Lin H. et al. 2018 στα δείγματα των οποίων το φουμαρικό οξύ είχε μεγάλη διακύμανση με τιμές από 0,02μg/g έως 5,2μg/g.

Η συγκέντρωση σουκιμικού οξέος φύλλα πρώιμου σταδίου και στους σπόρους διέφερε μεταξύ των γονοτύπων (Πίνακας 5, Figure 6), ενώ η συγκέντρωση σε κιτρικό μόνο στα φύλλα πρώιμου σταδίου. Ακόμη, η παρουσία του κιτρικού ήταν αισθητά πιο έντονη συγκριτικά με τα υπόλοιπα οργανικά οξέα. Η συγκέντρωση του σουκιμικού και του κιτρικού στα φύλλα έδειξε να αυξάνεται στο στάδιο της άνθησης (Figure 7), με το κιτρικό να έχει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους σπόρους. Σουκιμικό και κιτρικό οξύ έχουν βρεθεί σε μέλι και μελίτωμα που προέρχεται από το φυτό *Mimosa scrabella* της οικογένειας Fabaceae (Seraglio et al. 2021). Οι συγκεντρώσεις του σουκιμικού οξέος σε φύλλα και σπόρους ήταν μικρότερες από αυτές στα δείγματα των Lin H. Et al. 2018. Τα φύλλα από το στάδιο της άνθησης και οι σπόροι έδειξαν παρόμοιες συγκεντρώσεις κιτρικού οξέος, με την μέση συγκέντρωση των σπόρων της ΚΚ18 να ξεπερνάει την μέγιστη συγκέντρωση στα δείγματα των Lin H. Et al. 2018.

Αμινοξέα

Σε φύλλα από το στάδιο της άνθησης και στους σπόρους που μελετήθηκαν, βρέθηκαν 18 διαφορετικά αμινοξέα, απαραίτητα και μη-. Τα αμινοξέα-και ιδιαίτερα η αργινίνη (arginine), η γλουταμίνη (glutamine) και η κυστεΐνη (cysteine)- αποτελούν ζωτικής σημασίας ενώσεις τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα. Είναι πρόδρομα μόρια στο σχηματισμό πρωτεϊνών τα οποία εμπλέκονται σε μεταβολικά μονοπάτια

ανοσοποίησης καθώς και σε απόκριση του οργανισμού ύστερα από προσβολή από παθογόνα (Li P. et al. 2007). Ιδιαίτερο είναι το ενδιαφέρον της ιατρικής καθώς φαίνεται να αποτελούν ένα μέσο για την καταπολέμηση του καρκίνου στον άνθρωπο (Jimenez-Alonso and Lopez-Lazaro 2023), ενώ τα αμινοξέα τρυπτοφάνη (tryptophan), γλουταμίνη (glutamine) και τυροσίνη (tyrosine) έχουν δείξει να συνδέονται με την ομαλή λειτουργία του ύπνου (Zhao M et al. 2020). Ακόμα, έχουν επίδραση στην γεύση των τελικών προϊόντων προσδίδοντας συγκεκριμένη γεύση (Lin H. et al. 2018).

Μεγάλης σημασία παρουσιάζουν και στην κτηνοτροφία με πολλές μελέτες να εστιάζουν σε αυτά. Σε μελέτη των Davis T.A. et al. 2007 έδειξαν την κρίσιμη παρουσία των αμινοξέων για τη σύνθεση μυϊκού ιστού σε νεαρά χοιρίδια. Η σωστή αναλογία ενός σιτηρεσίου σε αμινοξέα και ενεργειακό περιεχόμενο, καθώς και ιχνοστοιχεία, αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ομαλή ανάπτυξη εκτρεφόμενων χοίρων (Wu Y. et al. 2020). Ακόμη έχει μελετηθεί η λειτουργία και η σημαντικότητα ορισμένων. Η γλουταμίνη (glutamine) έχει βρεθεί να αποτελεί ένα απαραίτητο αμινοξύ για την ομαλή και φυσιολογική ανάπτυξη για τους χοίρους, ειδικά στο στάδιο του απογαλακτισμού, καθώς συμβάλλει στην ομαλή σωματική ανάπτυξη και την ανάπτυξη του εντέρου (Ji F.J. et al. 2019). Η ασπαργινίνη (asparagine), επίσης, έχει στενή συσχέτιση με την μεταφορά του αζώτου μέσα στον οργανισμό (Suliman and Tran 2012). Ενώ ακόμα τα αμινοξέα αργινίνη (arginine) και κιτροουλίνη (citrulline) έχουν μελετηθεί για μείωση της αρτηριακής πίεσης (Khalaf D. et al. 2019).

Τα αμινοξέα histidine, lysine, methionine και L-citrulline βρέθηκαν σε μικρές ποσότητες, επιπέδου νανογραμμαρίων (Πίνακας 7, Figure 16, 19), στους φυτικούς ιστούς, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Millar K. et al. 2019 που βρήκαν υψηλές συγκεντρώσεις lysine αλλά μικρές συγκεντρώσεις methionine. Οι σπόροι των γονοτύπων που μελετήθηκαν είχαν διαφορές ως προς την περιεκτικότητα σε histidine και l-citrulline. Η KK18 είχε την υψηλότερη συγκέντρωση στους σπόρους με 443,67ng/g ενώ η KK14 την υψηλότερη συγκέντρωση l-citrulline με 25,37ng/g. Οι διαφορές και η μεγάλη διακύμανση των συγκεντρώσεων ιστοιδίνης στους σπόρους των γονοτύπων έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα των Mayer L. et al. 2020 των οποίων οι γονότυποι δεν έδειξαν μεγάλες διαφορές όσον αφορά την περιεκτικότητα ιστοιδίνης.

Τα απαραίτητα αμινοξέα: threonine, valine, tryptophan, phenylalanine, iso-leucine και leucine ανιχνεύθηκαν σε όλα τα φυτικά μέρη που αναλύθηκαν ενώ το

ήμιαπαραίτητο αμινοξύ arginine ανιχνεύθηκε μόνο στους σπόρους (Πίνακας 8). Στην μελέτη των [Mattila P. et al. 2018](#) τα αντίστοιχα αμινοξέα έδειξαν να έχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Αντίστοιχα, στην μελέτη των [Millar K. et al. 2019](#) τα αμινοξέα phenilalanine, valine και arginine έδειξαν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα.

Τα μη-απαραίτητα αμινοξέα: tyrosine, asparagine, glutamate, proline, aspartate, και l-norleucine (Πίνακας 9) βρέθηκαν στα φύλλα και στους σπόρους των γονοτύπων, με εξαίρεση την glutamine που δεν είχε επαρκείς συγκεντρώσεις στους σπόρους. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ανάμεσα στα αμινοξέα, απαραίτητα και μη-, είχε η προλίνη, με την ποικιλία ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ να έχει τη χαμηλότερη περιεκτικότητα στους σπόρους. Οι [Mayer L. et al. 2020](#) στα δείγματα που εξέτασαν δεν βρήκαν αντίστοιχα αποτελέσματα, καθώς η προλίνη στις ποικιλίες της μελέτης τους δεν φάνηκε να έχει την υψηλότερη συγκέντρωση ανάμεσα στα αμινοξέα. Το glutamate σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη εμφάνισε υψηλές συγκεντρώσεις,

5 Συμπεράσματα

Η μελέτη έγινε με σκοπό την αξιολόγηση τεσσάρων γονοτύπων κτηνοτροφικού κουκιού (ΚΚ10, ΚΚ14, ΚΚ18, ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ) ως προς τα διατροφικά χαρακτηριστικά, κυρίως, του σπόρου, αλλά και την ενδεχόμενη συσχέτιση μεταβολιτών διατροφικής αξίας, μεταξύ φύλλων και σπόρων.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμπεραίνεται ότι οι σπόροι του γονότυπου ΚΚ18 υπερέχει έναντι των υπολοίπων στην πλειοψηφία των επιθυμητών διατροφικών παραγόντων (οργανικά οξέα, βασικά αμινοξέα), και η ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ σε ιχνοστοιχεία. Παράλληλα εμφανίζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε φλαβονοειδή. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών στους σπόρους όλων των γονοτύπων επιβεβαιώνει στην αρνητική τους σχέση με το χαρακτηριστικό του λευκού άνθους.

Κανένας από τους μεταβολίτες που ορίζουν την διατροφική αξία του σπόρου και που να υπερέχει σημαντικά ανάμεσα στους γονοτύπους δεν έδειξε αντίστοιχα αποτελέσματα σε όλα τα στάδια. Δεν καθίσταται επομένως δυνατός ο χαρακτηρισμός κάποιου μεταβολίτη σε στάδιο φύλλου ως «βιοδείκτης» και επιπλέον μελέτη ως προς αυτό κρίνεται αναγκαία για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Όλοι οι γονότυποι που μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη έδειξαν να πληρούν ένα ανταγωνιστικό διατροφικό προφίλ και να εμφανίζουν τις δυνατότητες για επιπλέον βελτίωση ως προς τα διατροφικά χαρακτηριστικά τους αλλά και την σταθερότητα χαρακτηριστικών όπως τα αμινοξέα, με τους γονοτύπους ΚΚ18 και ΠΟΛΥΚΑΡΠΗ να υπερέχουν έναντι των υπολοίπων. Για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, κρίνεται αναγκαίο η περαιτέρω μελέτη και αξιολόγηση αυτών,

Βιβλιογραφία

- Abdalla, M. M. F. “Intraspecific Unilateral Incompatibility in *Vicia Faba* L.” *Theoretical and Applied Genetics* 50, no. 5 (1977): 227–33. <https://doi.org/10.1007/BF00273756>.
- Abid, Ghassen, Rim Nefissi Ouertani, Salwa Harzalli Jebara, Hatem Boubakri, Yordan Muhovski, Emna Ghouili, Souhir Abdelkarim, et al. “Alleviation of Drought Stress in Faba Bean (*Vicia Faba* L.) by Exogenous Application of β -Aminobutyric Acid (BABA).” *Physiology and Molecular Biology of Plants* 26, no. 6 (June 2020): 1173–86. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00796-0>.
- Abou-Khater, Lynn, Fouad Maalouf, Abdulqader Jighly, Diego Rubiales, and Shiv Kumar. “Adaptability and Stability of Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Accessions under Diverse Environments and Herbicide Treatments.” *Plants* 11, no. 3 (January 19, 2022): 251. <https://doi.org/10.3390/plants11030251>.
- Adhikari, Kedar N., Hamid Khazaei, Lamiae Ghaoui, Fouad Maalouf, Albert Vandenberg, Wolfgang Link, and Donal M. O’Sullivan. “Conventional and Molecular Breeding Tools for Accelerating Genetic Gain in Faba Bean (*Vicia Faba* L.).” *Frontiers in Plant Science* 12 (October 13, 2021): 744259. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.744259>.
- Afzal, Muhammad, Salem S. Alghamdi, Hussein H. Migdadi, Ehab El-Harty, and Sulieman A. Al-Faifi. “Agronomical and Physiological Responses of Faba Bean Genotypes to Salt Stress.” *Agriculture* 12, no. 2 (February 7, 2022): 235. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020235>.
- Akgun, Didem, and Huseyin Canci. “Selection of Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Genotypes for High Yield, Essential Amino Acids and Low Anti-Nutritional Factors.” *Agriculture* 13, no. 5 (April 24, 2023): 932. <https://doi.org/10.3390/agriculture13050932>.
- Al Barri, Talal, and Munqez J Y Shtaya. “Phenotypic Characterization of Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Landraces Grown in Palestine.” *Journal of Agricultural Science* 5, no. 2 (January 15, 2013): p110. <https://doi.org/10.5539/jas.v5n2p110>.
- Al Shabuol, Nawras L., and Belal S. Obeidat. “Feeding of Faba Beans (*Vicia Faba* L.) Enhances the Growth Performance of Lambs.” *Veterinary World*, April 12, 2022, 906–10. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.906-910>.
- Alnefaie, Rasha M., Sahar A. EL-Sayed, Amany A. Ramadan, Ahmed I. Elmezien, Ahmed M. El-Taher, Timothy O. Randhir, and Ahmed Bondok. “Physiological and Anatomical Responses of Faba Bean Plants Infected with Chocolate Spot Disease to Chemical Inducers.” *Life* 13, no. 2 (January 31, 2023): 392. <https://doi.org/10.3390/life13020392>.
- Altaf Khan, Muhammad, Megahed H. Ammar, Hussein M. Migdadi, Ehab H. El-Harty, Magdi A. Osman, Muhammad Farooq, and Salem S. Alghamdi. “Comparative Nutritional Profiles of Various Faba Bean and Chickpea Genotypes.” *International Journal of Agriculture and Biology* 17, no. 3 (April 1, 2015): 449–57. <https://doi.org/10.17957/IJAB/17.3.14.990>.
- Angeletti, Francesco G. S., Marco Mariotti, Beatrice Tozzi, Silvia Pampana, and Sergio Saia. “Herbage and Silage Quality Improved More by Mixing Barley and Faba Bean Than by N Fertilization or Stage of Harvest.” *Agronomy* 12, no. 8 (July 29, 2022): 1790. <https://doi.org/10.3390/agronomy12081790>.
- Avramidou, Eleni, Ioannis Ganopoulos, Photini Mylona, Eleni M. Abraham, Irini Nianiou-Obeidat, Maslin Osathanunkul, and Panagiotis Madesis. “Comparative Analysis of the Genetic Diversity of Faba Bean (*Vicia Faba* L.).” *Sustainability* 15, no. 2 (January 5, 2023): 1016. <https://doi.org/10.3390/su15021016>.

- Avramidou, Eleni, Efi Sarri, Ioannis Ganopoulos, Panagiotis Madesis, Leonidas Kougiteas, Evgenia-Anna Papadopoulou, Konstantinos A. Aliferis, Eleni M. Abraham, and Eleni Tani. "Genetic and Metabolite Variability among Commercial Varieties and Advanced Lines of *Vicia Faba* L." *Plants* 12, no. 4 (February 17, 2023): 908. <https://doi.org/10.3390/plants12040908>.
- Balandaitė, Jovita, Kęstutis Romaneckas, Austėja Švereikaitė, Rasa Kimbirauskienė, Aušra Sinkevičienė, and Andrius Romaneckas. "The Biomass Productivity of Maize, Hemp and Faba Bean Multi-Crops." *Agronomy* 12, no. 12 (December 16, 2022): 3193. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123193>.
- Benmoussa, Sabrine, Issam Nouairi, Imen Rajhi, Saber Rezgui, Khediri Manai, Wael Taamali, Zouhaier Abbes, Kais Zribi, Renaud Brouquisse, and Haythem Mhadhbi. "Growth Performance and Nitrogen Fixing Efficiency of Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Genotypes in Symbiosis with Rhizobia under Combined Salinity and Hypoxia Stresses." *Agronomy* 12, no. 3 (February 28, 2022): 606. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030606>.
- Bernatova, Iveta. "Biological Activities of (-)-Epicatechin and (-)-Epicatechin-Containing Foods: Focus on Cardiovascular and Neuropsychological Health." *Biotechnology Advances* 36, no. 3 (May 2018): 666–81. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.009>.
- Bishop Jacob, Jones, Hannah, Elizabeth, Lukac, Martin and Potts Simon Geoffrey "Insect pollination reduces yield loss following heat stress in faba bean (*Vicia faba* L.), *Agriculture Ecosystems & Environment*, Vol 220, (15 March 2016), p:89-96
- Björnsdotter, Emilie, Marcin Nadzieja, Wei Chang, Leandro Escobar-Herrera, Davide Mancinotti, Deepti Angra, Xinxing Xia, et al. "VC1 Catalyses a Key Step in the Biosynthesis of Vicine in Faba Bean." *Nature Plants* 7, no. 7 (July 5, 2021): 923–31. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00950-w>.
- Brünjes, Lisa, and Wolfgang Link. "Paternal Outcrossing Success Differs among Faba Bean Genotypes and Impacts Breeding of Synthetic Cultivars." *Theoretical and Applied Genetics* 134, no. 8 (August 2021): 2411–27. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03832-z>.
- Cabrera, A., and A. Martin. "Variation in Tannin Content in *Vicia Faba* L." *The Journal of Agricultural Science* 106, no. 2 (April 1986): 377–82. <https://doi.org/10.1017/S0021859600063978>.
- Çalışkantürk Karataş, Selen, Demet Günay, and Sedat Sayar. "In Vitro Evaluation of Whole Faba Bean and Its Seed Coat as a Potential Source of Functional Food Components." *Food Chemistry* 230 (September 2017): 182–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.037>.
- Caracuta, Valentina, Mina Weinstein-Evron, Daniel Kaufman, Reuven Yeshurun, Jeremie Silvent, and Elisabetta Boaretto. "14,000-Year-Old Seeds Indicate the Levantine Origin of the Lost Progenitor of Faba Bean." *Scientific Reports* 6, no. 1 (November 23, 2016): 37399. <https://doi.org/10.1038/srep37399>.
- Cardador-Martínez, Anaberta, Karina Maya-Ocaña, Alicia Ortiz-Moreno, Braulio E. Herrera-Cabrera, G. Dávila-Ortiz, Mercedes Múzquiz, Mercedes Martín-Pedrosa, Carmen Burbano, Carmen Cuadrado, and Cristian Jiménez-Martínez. "Effect of Roasting and Boiling on the Content of Vicine, Convicine and L-3,4-Dihydroxyphenylalanine in *Vicia Faba* L.: Effect of Thermal Treatment on Faba Beans." *Journal of Food Quality* 35, no. 6 (December 2012): 419–28. <https://doi.org/10.1111/jfq.12006>.

- Carrillo-Perdomo, E., A. Vidal, J. Kreplak, H. Duborjal, M. Leveugle, J. Duarte, C. Desmetz, et al. “Development of New Genetic Resources for Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Breeding through the Discovery of Gene-Based SNP Markers and the Construction of a High-Density Consensus Map.” *Scientific Reports* 10, no. 1 (April 22, 2020): 6790. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63664-7>.
- Cessna, Stephen G, Valerie E Sears, Martin B Dickman, and Philip S Low. “Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia Sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant,” *The Plant Cell*, Vol 12, (November 2000), 2191-2199
- Chávez-Murillo, Carolina Estefanía, Jorge Ivan Veyna-Torres, Luisa María Cavazos-Tamez, Julián de la Rosa-Millán, and Sergio Othon Serna-Saldívar. “Physicochemical Characteristics, ATR-FTIR Molecular Interactions and in Vitro Starch and Protein Digestion of Thermally-Treated Whole Pulse Flours.” *Food Research International* 105 (March 2018): 371–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.029>.
- Chia, David W., Tennessee J. Yoder, Wolf-Dieter Reiter, and Susan I. Gibson. “Fumaric Acid: An Overlooked Form of Fixed Carbon in Arabidopsis and Other Plant Species.” *Planta* 211, no. 5 (2000): 743–51.
- Chooi, W Y. “VARIATION IN NUCLEAR DNA CONTENT IN THE GENUS *VICIA*.” *Genetics* 68, no. 2 (June 1, 1971): 195–211. <https://doi.org/10.1093/genetics/68.2.195>.
- Collins JF. and Copper. In: Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, eds. “Modern Nutrition in Health and Disease.” 11th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; (2014):206-16.
- Corsato Alvarenga, Isabella, Dalton Holt, and Charles G Aldrich. “Evaluation of Faba Beans as an Ingredient in Dog Diets: Apparent Total Tract Digestibility of Extruded Diets with Graded Levels of Dehulled Faba Beans (*Vicia Faba* L.) by Dogs.” *Journal of Animal Science* 98, no. 4 (April 1, 2020): skaa085. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa085>.
- Cubero, José I. “Evolutionary Trends in *Vicia Faba* L.” *Theoretical and Applied Genetics* 43, no. 2 (April 1973): 59–65. <https://doi.org/10.1007/BF00274958>.
- Das, Ratul Kumar, Satinder Kaur Brar, and Mausam Verma. “Recent Advances in the Biomedical Applications of Fumaric Acid and Its Ester Derivatives: The Multifaceted Alternative Therapeutics.” *Pharmacological Reports* 68, no. 2 (April 2016): 404–14. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.10.007>.
- Davis, T. A., A. Suryawan, R. A. Orellana, H. V. Nguyen, and M. L. Fiorotto. “Postnatal Ontogeny of Skeletal Muscle Protein Synthesis in Pigs^{1,2}.” *Journal of Animal Science* 86, no. suppl_14 (April 1, 2008): E13–18. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0419>.
- De Cillis, Francesca, Claudia Ruta, Cataldo Pulvento, Luigi Tedone, and Giuseppe De Mastro. “Variability in Productive and Biochemical Traits of *Vicia Faba* L. Landraces from Apulia Region (South Italy).” *Horticulturae* 9, no. 5 (May 19, 2023): 601. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050601>.
- Demann, Johannes, Finn Petersen, Georg Dusel, Manuela Bog, Reindert Devlamynck, Andreas Ulbrich, Hans-Werner Olf, and Heiner Westendarp. “Nutritional Value of Duckweed as Protein Feed for Broiler Chickens—Digestibility of Crude Protein, Amino Acids and Phosphorus.” *Animals* 13, no. 1 (December 29, 2022): 130. <https://doi.org/10.3390/ani13010130>.
- Deng, Zirong, Sabba Hassan, Muhammad Rafiq, Hongshui Li, Yang He, Yi Cai, Xi Kang, Zhaoguo Liu, and Tingdong Yan. “Pharmacological Activity of

- Eriodictyol: The Major Natural Polyphenolic Flavanone.” Edited by Hua Wu. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2020 (December 12, 2020): 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/6681352>.
- Duan , Shucheng, Soon Jae Kwon, Chan Saem Gil and Seok Hyun Eom "Improvign the Antioxidant Activity and Flavor of Faba (*Vicia faba* L.) Leaves by Domestic Cooking Methods" *Antioxidants* 2022,11,931
- Duan, Shucheng, Soon Jae Kwon, You Jin Lim, Chan Saem Gil, Chengwu Jin, and Seok Hyun Eom. “L-3,4-Dihydroxyphenylalanine Accumulation in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Tissues during Different Growth Stages.” *Agronomy* 11, no. 3 (March 8, 2021): 502. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030502>.
- Duc G. "Selection for nutritional quality in faba bean", CIHEAM (1991)
- Duc, G., P. Marget, R. Esnault, J. Le Guen, and D. Bastianelli. “Genetic Variability for Feeding Value of Faba Bean Seeds (*Vicia Faba*): Comparative Chemical Composition of Isogenics Involving Zero-Tannin and Zero-Vicine Genes.” *The Journal of Agricultural Science* 133, no. 2 (September 1999): 185–96. <https://doi.org/10.1017/S0021859699006905>.
- Elessawy, Fatma M., Navid Bazghaleh, Albert Vandenberg, and Randy W. Purves. “Polyphenol Profile Comparisons of Seed Coats of Five Pulse Crops Using a Semi-quantitative Liquid Chromatography-mass Spectrometric Method.” *Phytochemical Analysis* 31, no. 4 (July 2020): 458–71. <https://doi.org/10.1002/pca.2909>.
- Elessawy, Fatma M., Albert Vandenberg, Anas El-Aneed, and Randy W. Purves. “An Untargeted Metabolomics Approach for Correlating Pulse Crop Seed Coat Polyphenol Profiles with Antioxidant Capacity and Iron Chelation Ability.” *Molecules* 26, no. 13 (June 23, 2021): 3833. <https://doi.org/10.3390/molecules26133833>.
- Fagundes-Nacarath, I.R.F., D. Debona, and F.A. Rodrigues. “Oxalic Acid-Mediated Biochemical and Physiological Changes in the Common Bean-Sclerotinia Sclerotiorum Interaction.” *Plant Physiology and Biochemistry* 129 (August 2018): 109–21. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.028>.
- Fairweather-Tait, Susan J., Linda J. Harvey, and Rachel Collings. “Risk–Benefit Analysis of Mineral Intakes: Case Studies on Copper and Iron.” *Proceedings of the Nutrition Society* 70, no. 1 (February 2011): 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0029665110003873>.
- Fan, Pei-Hong, Mei-Tong Zang, and Jie Xing. “Oligosaccharides Composition in Eight Food Legumes Species as Detected by High-Resolution Mass Spectrometry: Determination of Oligosaccharides in Food Legumes Using HRMS.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95, no. 11 (August 30, 2015): 2228–36. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6940>.
- FAOSTAT, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Farquhar, William B., David G. Edwards, Claudine T. Jurkowitz, and William S. Weintraub. “Dietary Sodium and Health.” *Journal of the American College of Cardiology* 65, no. 10 (March 2015): 1042–50. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.12.039>.
- Felix, Manuel, Alejandra Lopez-Osorio, Alberto Romero, and Antonio Guerrero. “Faba Bean Protein Flour Obtained by Densification: A Sustainable Method to Develop Protein Concentrates with Food Applications.” *LWT* 93 (July 2018): 563–69. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.078>.
- Gautam, Ajay Kumar, Divakar Sharma, Juhi Sharma, and Khem Chand Saini. “Legume Lectins: Potential Use as a Diagnostics and Therapeutics against the Cancer.”

- International Journal of Biological Macromolecules* 142 (January 2020): 474–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.119>.
- Gendrisch, Fabian, Philipp R. Esser, Christoph M. Schempp, and Ute Wölfle. “Luteolin as a Modulator of Skin Aging and Inflammation.” *BioFactors* 47, no. 2 (March 2021): 170–80. <https://doi.org/10.1002/biof.1699>.
- Geraldo, Rafaela, Carla S. Santos, Elisabete Pinto, and Marta W. Vasconcelos. “Widening the Perspectives for Legume Consumption: The Case of Bioactive Non-Nutrients.” *Frontiers in Plant Science* 13 (February 10, 2022): 772054. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.772054>.
- Ghaouti, Lamiae, and Wolfgang Link. “Local vs. Formal Breeding and Inbred Line vs. Synthetic Cultivar for Organic Farming: Case of *Vicia Faba* L.” *Field Crops Research* 110, no. 2 (February 2009): 167–72. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.07.013>.
- Grela, Eugeniusz R., Wioletta Samolińska, Bożena Kiczorowska, Renata Klebaniuk, and Piotr Kiczorowski. “Content of Minerals and Fatty Acids and Their Correlation with Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of Leguminous Seeds.” *Biological Trace Element Research* 180, no. 2 (December 2017): 338–48. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1005-3>.
- Gu, Bon-Jae, Maria Dian Pratiwi Masli, and Girish M. Ganjyal. “Whole Faba Bean Flour Exhibits Unique Expansion Characteristics Relative to the Whole Flours of Lima, Pinto, and Red Kidney Beans during Extrusion.” *Journal of Food Science* 85, no. 2 (February 2020): 404–13. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14951>.
- Gutierrez, Natalia, Carmen M. Avila, and Ana M. Torres. “The BHLH Transcription Factor VvTT8 Underlies Zt2, the Locus Determining Zero Tannin Content in Faba Bean (*Vicia Faba* L.)” *Scientific Reports* 10, no. 1 (August 31, 2020): 14299. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71070-2>.
- Gutiérrez, Natalia, Marie Pégard, Christiane Balko, and Ana M. Torres. “Genome-Wide Association Analysis for Drought Tolerance and Associated Traits in Faba Bean (*Vicia Faba* L.)” *Frontiers in Plant Science* 14 (February 1, 2023): 1091875. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1091875>.
- Gutierrez, Natalia, and Ana M. Torres. “Characterization and Diagnostic Marker for TTG1 Regulating Tannin and Anthocyanin Biosynthesis in Faba Bean.” *Scientific Reports* 9, no. 1 (November 7, 2019): 16174. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52575-x>.
- Halmemies-Beauchet-Filleau, A., M. Rinne, M. Lamminen, C. Mapato, T. Ampapon, M. Wanapat, and A. Vanhatalo. “Review: Alternative and Novel Feeds for Ruminants: Nutritive Value, Product Quality and Environmental Aspects.” *Animal* 12 (2018): s295–309. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002252>.
- Haq, Irfanul, Dalal Nasser Binjawhar, Zahid Ullah, Ahmad Ali, Hassan Sher, and Iftikhar Ali. “Wild *Vicia* Species Possess a Drought Tolerance System for Faba Bean Improvement.” *Genes* 13, no. 10 (October 17, 2022): 1877. <https://doi.org/10.3390/genes13101877>.
- Harris, Stuart A. “Comparison of Recently Proposed Causes of Climate Change.” *Atmosphere* 14, no. 8 (August 3, 2023): 1244. <https://doi.org/10.3390/atmos14081244>.
- Hong, Guoju, Zhenqiu Chen, Xiaorui Han, Lin Zhou, Fengxiang Pang, Rishana Wu, Yingshan Shen, et al. “A Novel RANKL-targeted Flavonoid Glycoside Prevents Osteoporosis through Inhibiting NFATc1 and Reactive Oxygen

- Species.” *Clinical and Translational Medicine* 11, no. 5 (May 2021): e392. <https://doi.org/10.1002/ctm2.392>.
- Hood-Niefer, Shannon D, Thomas D Warkentin, Ravindra N Chibbar, Albert Vandenberg, and Robert T Tyler. “Effect of Genotype and Environment on the Concentrations of Starch and Protein in, and the Physicochemical Properties of Starch from, Field Pea and Fababean: Effect of Genotype and Environment on the Concentrations of Starch and Protein.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, no. 1 (January 15, 2012): 141–50. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4552>.
- Hou, Wanwei, Xiaojuan Zhang, Qingbiao Yan, Ping Li, Weichao Sha, Yingying Tian, and Yujiao Liu. “Linkage Map of a Gene Controlling Zero Tannins (Zt-1) in Faba Bean (*Vicia Faba* L.) with SSR and ISSR Markers.” *Agronomy* 8, no. 6 (May 23, 2018): 80. <https://doi.org/10.3390/agronomy8060080>.
- Hou, Yongqing, and Guoyao Wu. “Nutritionally Essential Amino Acids.” *Advances in Nutrition* 9, no. 6 (November 2018): 849–51. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy054>.
- Hou, Yongqing, Yulong Yin, and Guoyao Wu. “Dietary Essentiality of ‘Nutritionally Non-Essential Amino Acids’ for Animals and Humans.” *Experimental Biology and Medicine* 240, no. 8 (August 2015): 997–1007. <https://doi.org/10.1177/1535370215587913>.
- Imran, Muhammad, Abdur Rauf, Tareq Abu-Izneid, Muhammad Nadeem, Mohammad Ali Shariati, Imtiaz Ali Khan, Ali Imran, et al. “Luteolin, a Flavonoid, as an Anticancer Agent: A Review.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 112 (April 2019): 108612. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108612>.
- Islam, Anowarul, Md Sadikul Islam, Md Khalesur Rahman, Md Nazim Uddin, and Md Rashedunnabi Akanda. “The Pharmacological and Biological Roles of Eriodictyol.” *Archives of Pharmacal Research* 43, no. 6 (June 2020): 582–92. <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01243-0>.
- Jambunathan, Ramamurthi, and Edwin T Mertz. “Relationship between Tannin Levels, Rat Growth, and Distribution of Proteins in Sorghum,” *J Agr Food Chem*, 21, 4, (1973)
- Janeesh, P.A., and A. Abraham. “Robinin Modulates Doxorubicin-Induced Cardiac Apoptosis by TGF-B1 Signaling Pathway in Sprague Dawley Rats.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 68, no. 8 (October 2014): 989–98. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.09.010>.
- Ji F.J, Wang L.X., Yang H.S., Hu A. and Yin Y.L. "Review: The roles and functions of glutamine on intestinal health and performance of weaning pigs", *Animals*, 13,11, (2019)
- Jiménez-Alonso, Julio José, and Miguel López-Lázaro. “Dietary Manipulation of Amino Acids for Cancer Therapy.” *Nutrients* 15, no. 13 (June 25, 2023): 2879. <https://doi.org/10.3390/nu15132879>.
- Johnson, Joel B., Daniel J. Skylas, Janice S. Mani, Jinle Xiang, Kerry B. Walsh, and Mani Naiker. “Phenolic Profiles of Ten Australian Faba Bean Varieties.” *Molecules* 26, no. 15 (July 30, 2021): 4642. <https://doi.org/10.3390/molecules26154642>.
- Khalaf, David, Marcus Krüger, Markus Wehland, Manfred Infanger, and Daniela Grimm. “The Effects of Oral L-Arginine and l-Citrulline Supplementation on Blood Pressure.” *Nutrients* 11, no. 7 (July 22, 2019): 1679. <https://doi.org/10.3390/nu11071679>.

- Kumar, Anand, Alpa Yadav, Parmdeep Singh Dhanda, Anil Kumar Delta, Meenakshi Sharma, and Prashant Kaushik. "Salinity Stress and the Influence of Bioinoculants on the Morphological and Biochemical Characteristics of Faba Bean (*Vicia Faba L.*)." *Sustainability* 14, no. 21 (November 7, 2022): 14656. <https://doi.org/10.3390/su142114656>.
- Kumar, Sanket, Santanu Layek, Anamika Upadhyay, M.K. Pandit, Rajib Nath, and Ashutosh Sarker. "Genetic Characterization for Quantitative and Qualitative Traits and Its Relationship in Faba Bean (*Vicia Faba L.*)." *Indian Journal Of Agricultural Research*, no. of (August 28, 2019). <https://doi.org/10.18805/IJARE.A-5252>.
- Ky, I., A. Le Floch, L. Zeng, L. Pechamat, M. Jourdes, and P.-L. Teissedre. "Tannins." In *Encyclopedia of Food and Health*, 247–55. Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00683-8>.
- Ladizinsky, G. "Seed Protein Electrophoresis of the Wild and Cultivated Species of Selection Faba of *Vicia*." *Euphytica* 24, no. 3 (November 1975): 785–88. <https://doi.org/10.1007/BF00132919>.
- Lamichhane, Santosh, Partho Sen, Alex M. Dickens, Tuulia Hyötyläinen, and Matej Orešič. "An Overview of Metabolomics Data Analysis: Current Tools and Future Perspectives." In *Comprehensive Analytical Chemistry*, 82:387–413. Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2018.07.001>.
- Lamy, Elsa, Harshadrai Rawel, Florian J. Schweigert, Fernando Capela e Silva, Ana Ferreira, Ana Rodrigues Costa, Célia Antunes, André Martinho Almeida, Ana Varela Coelho, and Elvira Sales-Baptista. "The Effect of Tannins on Mediterranean Ruminant Ingestive Behavior: The Role of the Oral Cavity." *Molecules* 16, no. 4 (March 25, 2011): 2766–84. <https://doi.org/10.3390/molecules16042766>.
- Lei, Zhentian, Barbara W. Sumner, Anil Bhatia, Saurav J. Sarma, and Lloyd W. Sumner. "UHPLC-MS Analyses of Plant Flavonoids." *Current Protocols in Plant Biology* 4, no. 1 (March 2019). <https://doi.org/10.1002/cppb.20085>.
- LeWitt, Peter A. "Levodopa Therapy for Parkinson's Disease: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Levodopa Pharmacokinetics and Pharmacodynamics." *Movement Disorders* 30, no. 1 (January 2015): 64–72. <https://doi.org/10.1002/mds.26082>.
- Li, Liying, Tommy Z. Yuan, Rashim Setia, Ramadoss Bharathi Raja, Bin Zhang, and Yongfeng Ai. "Characteristics of Pea, Lentil and Faba Bean Starches Isolated from Air-Classified Flours in Comparison with Commercial Starches." *Food Chemistry* 276 (March 2019): 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.064>.
- Li L and Yang X. "The Essential Element Manganese, Oxidative Stress, and Metabolic Diseases: Links and Interactions." *Oxid Med Cell Longev* (2018): 7580707. [[PubMed abstract](#)]
- Li, Peng, Yu-Long Yin, Defa Li, Sung Woo Kim, and Guoyao Wu. "Amino Acids and Immune Function." *British Journal of Nutrition* 98, no. 2 (August 2007): 237–52. <https://doi.org/10.1017/S000711450769936X>.
- Li, Ping, Yanxia Zhang, Xuexia Wu, and Yujiao Liu. "Drought Stress Impact on Leaf Proteome Variations of Faba Bean (*Vicia Faba L.*) in the Qinghai–Tibet Plateau of China." *3 Biotech* 8, no. 2 (February 2018): 110. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1088-3>.
- Lin, Hongbin, Xiaoyu Yu, Jiaying Fang, Yunhao Lu, Ping Liu, Yage Xing, Qin Wang, Zhenming Che, and Qiang He. "Flavor Compounds in Pixian Broad-Bean Paste:

- Non-Volatile Organic Acids and Amino Acids.” *Molecules* 23, no. 6 (May 29, 2018): 1299. <https://doi.org/10.3390/molecules23061299>.
- Liu, Yujiao, Xuexia Wu, Wanwei Hou, Ping Li, Weichao Sha, and Yingying Tian. “Structure and Function of Seed Storage Proteins in Faba Bean (*Vicia Faba* L.)” *3 Biotech* 7, no. 1 (May 2017): 74. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0691-z>.
- Longstaff, Margaret, and J. M. McNAB. “The Inhibitory Effects of Hull Polysaccharides and Tannins of Field Beans (*Vicia Faba* L.) on the Digestion of Amino Acids, Starch and Lipid and on Digestive Enzyme Activities in Young Chicks.” *British Journal of Nutrition* 65, no. 2 (March 1991): 199–216. <https://doi.org/10.1079/BJN19910081>.
- Lunn, J., and H. E. Theobald. “The Health Effects of Dietary Unsaturated Fatty Acids.” *Nutrition Bulletin* 31, no. 3 (September 2006): 178–224. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2006.00571.x>.
- Lyu, Jae Il, Rahul Ramekar, Jung Min Kim, Nguyen Ngoc Hung, Ji Su Seo, Jin-Baek Kim, Ik-Young Choi, Kyong-Cheul Park, and Soon-Jae Kwon. “Unraveling the Complexity of Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Transcriptome to Reveal Cold-Stress-Responsive Genes Using Long-Read Isoform Sequencing Technology.” *Scientific Reports* 11, no. 1 (October 26, 2021): 21094. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00506-0>.
- Ma, Pengju, Ting Li, Fanceng Ji, Haibo Wang, and Juntao Pang. “Effect of GABA on Blood Pressure and Blood Dynamics of Anesthetic Rats,” *Int J Clin Exp Med*, 8(8):14296-14302, 2015
- Maalouf, Fouad, Lynn Abou-Khater, Zayed Babiker, Abdulqader Jighly, Alsamman M. Alsamman, Jinguo Hu, Yu Ma, et al. “Genetic Dissection of Heat Stress Tolerance in Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Using GWAS.” *Plants* 11, no. 9 (April 20, 2022): 1108. <https://doi.org/10.3390/plants11091108>.
- Makkar, Harinder P S, Klaus Becker, Hj Abel, and Elke Pawelzik. “Nutrient Contents, Rumen Protein Degradability and Antinutritional Factors in Some Colour- and White-Flowering Cultivars Of *Vicia Faba* Beans.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75, no. 4 (December 1997): 511–20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199712\)75:4<511::AID-JSFA907>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199712)75:4<511::AID-JSFA907>3.0.CO;2-M).
- . “Nutrient Contents, Rumen Protein Degradability and Antinutritional Factors in Some Colour- and White-Flowering Cultivars Of *Vicia Faba* Beans.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75, no. 4 (December 1997): 511–20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199712\)75:4<511::AID-JSFA907>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199712)75:4<511::AID-JSFA907>3.0.CO;2-M).
- Malek, Nawel, Meriem Miyassa Aci, Khalil Khamassi, Antonio Lupini, Mustapha Rouissi, and Leila Hanifi-Mekliche. “Agro-Morphological and Molecular Variability among Algerian Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Accessions.” *Agronomy* 11, no. 8 (July 22, 2021): 1456. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081456>.
- Mariotti Francois "Animal and Plant Protein Sources and Cardiometabolic Health", *Advances in Nutrition*, 10,4, (November 2019)
- MARTIN, A. “Antinutritional Factors in Faba Bean. Tannin Content in *Vicia Faba*: Possibilities for Plant Breeding,” n.d.
- Martineau-Côté, Delphine, Allaoua Achouri, Salwa Karboune, and Lamia L’Hocine. “Faba Bean: An Untapped Source of Quality Plant Proteins and Bioactives.” *Nutrients* 14, no. 8 (April 7, 2022): 1541. <https://doi.org/10.3390/nu14081541>.
- Mattila, Pirjo, Sari Mäkinen, Merja Euroala, Taina Jalava, Juha-Matti Pihlava, Jarkko Hellström, and Anne Pihlanto. “Nutritional Value of Commercial Protein-Rich

- Plant Products.” *Plant Foods for Human Nutrition* 73, no. 2 (June 2018): 108–15. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0660-7>.
- Maxted, N., M. A. Callimassia, and M. D. Bennett. “Cytotaxonomic Studies of Eastern Mediterranean *Vicia* Species (Leguminosae).” *Plant Systematics and Evolution* 177, no. 3–4 (1991): 221–34. <https://doi.org/10.1007/BF00937959>.
- Mayer Labba, Inger-Cecilia, Hanne Frøkiær, and Ann-Sofie Sandberg. “Nutritional and Antinutritional Composition of Fava Bean (*Vicia Faba* L., Var. Minor) Cultivars.” *Food Research International* 140 (February 2021): 110038. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110038>.
- Meng, Zhu, Qingqing Liu, Yan Zhang, Jiahong Chen, Zhipeng Sun, Chunhuan Ren, Zijun Zhang, Xiao Cheng, and Yafeng Huang. “Nutritive Value of Fava Bean (*Vicia Faba* L.) as a Feedstuff Resource in Livestock Nutrition: A Review.” *Food Science & Nutrition* 9, no. 9 (September 2021): 5244–62. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2342>.
- Millar, K.A., E. Gallagher, R. Burke, S. McCarthy, and C. Barry-Ryan. “Proximate Composition and Anti-Nutritional Factors of Fava-Bean (*Vicia Faba*), Green-Pea and Yellow-Pea (*Pisum Sativum*) Flour.” *Journal of Food Composition and Analysis* 82 (September 2019): 103233. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103233>.
- Mnembuka, B. V., and B. O. Eggum. “The Nutritive Value of Some Selected Tanzanian Plant Food Sources.” *Plant Foods for Human Nutrition* 44, no. 1 (July 1993): 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF01088477>.
- Mudryj, Adriana N., Nancy Yu, and Harold M. Aukema. “Nutritional and Health Benefits of Pulses.” *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 39, no. 11 (November 2014): 1197–1204. <https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0557>.
- Multari, Salvatore, Madalina Neacsu, Lorraine Scobbie, Louise Cantlay, Gary Duncan, Nicholas Vaughan, Derek Stewart, and Wendy R. Russell. “Nutritional and Phytochemical Content of High-Protein Crops.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, no. 41 (October 19, 2016): 7800–7811. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00926>.
- Murphy, Rebecca M., Joanna C. Stanczyk, Fang Huang, Matthew E. Loewen, Trent C. Yang, and Michele C. Loewen. “Reduction of Phenolics in Fava Bean Meal Using Recombinantly Produced and Purified *Bacillus Ligninophilus* Catechol 2,3-Dioxygenase.” *Bioresources and Bioprocessing* 10, no. 1 (February 12, 2023): 13. <https://doi.org/10.1186/s40643-023-00633-8>.
- Nagatsu, Toshiharu, and Makoto Sawada. “L-Dopa Therapy for Parkinson’s Disease: Past, Present, and Future.” *Parkinsonism & Related Disorders* 15 (January 2009): S3–8. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70004-5](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70004-5).
- Nelson L. David and Cox M. Michael "PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY", 2005
- Neuschwandtner, Reinhard W., Alexander Bernhuber, Stefan Kammlander, Helmut Wagentristl, Agnieszka Klimek-Kopyra, Tomáš Lošák, Kuanysh K. Zholamanov, and Hans-Peter Kaul. “Nitrogen Yields and Biological Nitrogen Fixation of Winter Grain Legumes.” *Agronomy* 11, no. 4 (April 2, 2021): 681. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040681>.
- Nolte, Tanja, Simon Jansen, Steffen Weigend, Daniel Moerlein, Ingrid Halle, Henner Simianer, and Ahmad Reza Sharifi. “Genotypic and Dietary Effects on Egg Quality of Local Chicken Breeds and Their Crosses Fed with Fava Beans.” *Animals* 11, no. 7 (June 29, 2021): 1947. <https://doi.org/10.3390/ani11071947>.
- Novák, Ondřej, and Kristýna Floková. “An UHPLC-MS/MS Method for Target Profiling of Stress-Related Phytohormones.” In *Plant Metabolomics*, edited by

- Carla António, 1778:183–92. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7819-9_13.
- Osman, Asha Mohamed Ali, Amro B. Hassan, Gammaa A. M. Osman, Nagat Mohammed, Mohamed A. H. Rushdi, Eiman E. Diab, and Elfadil E. Babiker. “Effects of Gamma Irradiation and/or Cooking on Nutritional Quality of Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Cultivars Seeds.” *Journal of Food Science and Technology* 51, no. 8 (August 2014): 1554–60. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0662-7>.
- Papanikolaou, Yanni, and Victor L. Fulgoni. “Bean Consumption Is Associated with Greater Nutrient Intake, Reduced Systolic Blood Pressure, Lower Body Weight, and a Smaller Waist Circumference in Adults: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002.” *Journal of the American College of Nutrition* 27, no. 5 (October 2008): 569–76. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719740>.
- Patto, M. C. Vaz, A. M. Torres, A. Koblizkova, J. Macas, and J. I. Cubero. “Development of a Genetic Composite Map of *Vicia Faba* Using F2 Populations Derived from Trisomic Plants.” *Theoretical and Applied Genetics* 98, no. 5 (April 1999): 736–43. <https://doi.org/10.1007/s001220051129>.
- PCD, https://www.pulsedb.org/V_faba
- Polanowska, Katarzyna, Rafal Łukasik, Maciej Kuligowski, and Jacek Nowak. “Development of a Sustainable, Simple, and Robust Method for Efficient 1-DOPA Extraction.” *Molecules* 24, no. 12 (June 24, 2019): 2325. <https://doi.org/10.3390/molecules24122325>.
- Priyanka, Singh, Yamshi, Arif, Andrzej, Bajguz and Shamsul Hayat “The role of quercetin in plants” (2021)
- Prohaska JR. and Copper. In: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, eds. “Present Knowledge in Nutrition.” 10th ed. Washington, DC: Wiley-Blackwell; (2012):540-53.
- Rabey, J M, Y Vered, H Shabtai, E Graff, and A D Korczyn. “Improvement of Parkinsonian Features Correlate with High Plasma Levodopa Values after Broad Bean (*Vicia Faba*) Consumption.” *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 55, no. 8 (August 1, 1992): 725–27. <https://doi.org/10.1136/jnnp.55.8.725>.
- Rahman, M. M., R. B. Abdullah, and W. E. Wan Khadijah. “A Review of Oxalate Poisoning in Domestic Animals: Tolerance and Performance Aspects: Oxalate Poisoning in Animals.” *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97, no. 4 (August 2013): 605–14. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01309.x>.
- Raina, S N, and H Rees. “DNA VARIATION BETWEEN AND WITHIN CHROMOSOME COMPLEMENTS OF *V/CIA* SPECIES,” *Heredity*, 51(1), (1983), p:335-346
- Razzaq, Ali, Bushra Sadia, Ali Raza, Muhammad Khalid Hameed, and Fozia Saleem. “Metabolomics: A Way Forward for Crop Improvement.” *Metabolites* 9, no. 12 (December 14, 2019): 303. <https://doi.org/10.3390/metabo9120303>.
- Rogers, Scott O, and Arnold J Bendich. “Heritability and Variability in Ribosomal RNA Genes of *Vicia Faba*.” *Genetics* 117, no. 2 (October 1, 1987): 285–95. <https://doi.org/10.1093/genetics/117.2.285>.
- Saied, Doaa B., Nehal S. Ramadan, Magdy M. El-Sayed, and Mohamed A. Farag. “Effect of Maturity Stage on Cereal and Leguminous Seeds’ Metabolome as Analyzed Using Gas Chromatography Mass-Spectrometry (GC-MS) and

- Chemometric Tools.” *Metabolites* 13, no. 2 (January 23, 2023): 163. <https://doi.org/10.3390/metabo13020163>.
- Scollo, Emanuele, David C.A. Neville, M. Jose Oruna-Concha, Martine Trotin, and Rainer Cramer. “UHPLC–MS/MS Analysis of Cocoa Bean Proteomes from Four Different Genotypes.” *Food Chemistry* 303 (January 2020): 125244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125244>.
- Selenge, Temuulen, Sara F. Vieira, Odontuya Gendaram, Rui L. Reis, Soninkhishig Tsolmon, Enkhtuul Tsendeekhuu, Helena Ferreira, and Nuno M. Neves. “Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of *Stellera Chamaejasme* L. Roots and Aerial Parts Extracts.” *Life* 13, no. 8 (July 29, 2023): 1654. <https://doi.org/10.3390/life13081654>.
- Seraglio, Silvana, Katia, Tischer, Bergamo, Greici, Brugnerotto, Patricia, Gonzaga, Luciano, Valdemiro, Fett, Roseane, Costa, Anna, Carolina, Oliveira “Aliphatic organic acids as promising authenticity markers of bracatinga honeydew honey”, *Food Chemistry*, 343, 2021
- Shadi, Hossein, Yousef Rouzbehan, Javad Rezaei, and Hassan Fazaeli. “Yield, Chemical Composition, Fermentation Characteristics, in Vitro Ruminal Variables, and Degradability of Ensiled Amaranth (*Amaranthus Hypochondriacus*) Cultivars Compared with Corn (*Zea Mays*) Silage.” *Translational Animal Science* 4, no. 4 (October 1, 2020): txaa180. <https://doi.org/10.1093/tas/txaa180>.
- Sharifi, Peyman. “Genetic Variation for Seed Yield and Some of Agro-Morphological Traits in Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Genotypes.” *Acta Agriculturae Slovenica* 105, no. 1 (November 26, 2015). <https://doi.org/10.14720/aas.2015.105.1.08>.
- Sheng, Zhili, Yueming Jiang, Junmei Liu, and Bao Yang. “UHPLC–MS/MS Analysis on Flavonoids Composition in *Astragalus Membranaceus* and Their Antioxidant Activity.” *Antioxidants* 10, no. 11 (November 22, 2021): 1852. <https://doi.org/10.3390/antiox10111852>.
- Shi, Shou-Heng, Seung-Seop Lee, Ya-Ming Zhu, Zhu-Qun Jin, Fei-Bo Wu, and Cheng-Wei Qiu. “Comparative Metabolomic Profiling Reveals Key Secondary Metabolites Associated with High Quality and Nutritional Value in Broad Bean (*Vicia Faba* L.)” *Molecules* 27, no. 24 (December 16, 2022): 8995. <https://doi.org/10.3390/molecules27248995>.
- Siddiqui, Manzer H., Saud A. Alamri, Mutahhar Y.Y. Al-Khaishany, Mohammed A. Al-Qutami, Hayssam M. Ali, Mohamed H. Al-Wahaibi, Mona S. Al-Wahaibi, and Hesham F. Alharby. “Mitigation of Adverse Effects of Heat Stress on *Vicia Faba* by Exogenous Application of Magnesium.” *Saudi Journal of Biological Sciences* 25, no. 7 (November 2018): 1393–1401. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.09.022>.
- Spanou, Chrysoula, Aristidis S. Veskokoukis, Thalia Kerasiotti, Maria Kontou, Apostolos Angelis, Nektarios Aligiannis, Alexios-Leandros Skaltsounis, and Dimitrios Kouretas. “Flavonoid Glycosides Isolated from Unique Legume Plant Extracts as Novel Inhibitors of Xanthine Oxidase.” Edited by Kamyar Afarinkia. *PLoS ONE* 7, no. 3 (March 2, 2012): e32214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032214>.
- Suliaman, Saad, and Lam-Son Phan Tran. “Asparagine: An Amide of Particular Distinction in the Regulation of Symbiotic Nitrogen Fixation of Legumes.” *Critical Reviews in Biotechnology* 33, no. 3 (September 2013): 309–27. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.695770>.

- Suso, M. J., and J. I. Cubero. "Genetic Changes under Domestication in *Vicia Faba*." *Theoretical and Applied Genetics* 72, no. 3 (June 1986): 364–72. <https://doi.org/10.1007/BF00288574>.
- Tesoro, Carmen, Rosanna Ciriello, Filomena Lelario, Angela Di Capua, Raffaella Pascale, Giuliana Bianco, Mario Dell'Agli, et al. "Development and Validation of a Reversed-Phase HPLC Method with UV Detection for the Determination of L-Dopa in *Vicia Faba* L. Broad Beans." *Molecules* 27, no. 21 (November 2, 2022): 7468. <https://doi.org/10.3390/molecules27217468>.
- Thurau, Emma G., Andry Narcisse Rahajanirina, and Mitchell T. Irwin. "Condensed Tannins in the Diet of Folivorous Diademed Sifakas and the Gap between Crude and Available Protein." *American Journal of Primatology* 83, no. 3 (March 2021): e23239. <https://doi.org/10.1002/ajp.23239>.
- Tian, Jing-jing, Hong Ji, Yi-fei Wang, Jun Xie, Guang-jun Wang, Zhi-fei Li, Er-meng Yu, De-guang Yu, Kai Zhang, and Wang-bao Gong. "Lipid Accumulation in Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idellus*) Fed Faba Beans (*Vicia Faba* L.)." *Fish Physiology and Biochemistry* 45, no. 2 (April 2019): 631–42. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0589-7>.
- Toledo, Nataly Maria Viva, Priscila Brigide, Rubén López-Nicolás, Carmen Frontela, Gaspar Ros, and Solange Guidolin Canniatti-Brazaca. "Higher Inositol Phosphates and Total Oxalate of Cookies Containing Fruit By-products and Their Influence on Calcium, Iron, and Zinc Bioavailability by Caco-2 Cells." *Cereal Chemistry* 96, no. 3 (May 2019): 456–64. <https://doi.org/10.1002/cche.10145>.
- Tsiklauri, Lia, Karol Švík, Martin Chrastina, Silvester Poništ, František Dráfi, Lukáš Slovák, Mery Alania, Ether Kemertelidze, and Katarina Bauerova. "Bioflavonoid Robinin from *Astragalus Falcatus* Lam. Mildly Improves the Effect of Methotrexate in Rats with Adjuvant Arthritis." *Nutrients* 13, no. 4 (April 13, 2021): 1268. <https://doi.org/10.3390/nu13041268>.
- Tuśnio, Anna, Marcin Barszcz, Marcin Taciak, Ewa Świąch, Agnieszka Wójtowicz, and Jacek Skomiał. "The Effect of a Diet Containing Extruded Faba Bean Seeds on Growth Performance and Selected Microbial Activity Indices in the Large Intestine of Piglets." *Animals* 11, no. 6 (June 7, 2021): 1703. <https://doi.org/10.3390/ani11061703>.
- Vidal-Valverde, Concepción, Juana Frias, Cristina Sotomayor, Concepción Diaz-Pollan, M. Fernandez, and Gloria Urbano. "Nutrients and Antinutritional Factors in Faba Beans as Affected by Processing." *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A* 207, no. 2 (August 4, 1998): 140–45. <https://doi.org/10.1007/s002170050308>.
- Vries, A. Ph. de. "Cross-Fertilization Behaviour of Some White Flowering Varieties of *Vicia Faba*." *Euphytica* 27, no. 2 (June 1978): 389–95. <https://doi.org/10.1007/BF00043164>.
- Warsame, Ahmed O., Nicholas Michael, Donal M. O'Sullivan, and Paola Tosi. "Identification and Quantification of Major Faba Bean Seed Proteins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, no. 32 (August 12, 2020): 8535–44. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02927>.
- . "Seed Development and Protein Accumulation Patterns in Faba Bean (*Vicia Faba*, L.)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 70, no. 30 (August 3, 2022): 9295–9304. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02061>.
- Warsame, Ahmed O., Donal M. O'Sullivan, and Paola Tosi. "Seed Storage Proteins of Faba Bean (*Vicia Faba* L.): Current Status and Prospects for Genetic

- Improvement.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, no. 48 (December 5, 2018): 12617–26. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04992>.
- WHO "Healthy Diet" (2019)
- Wu, Yi, Jianfei Zhao, Chenchen Xu, Ning Ma, Ting He, Jinshan Zhao, Xi Ma, and Phil A Thacker. “Progress towards Pig Nutrition in the Last 27 Years.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100, no. 14 (November 2020): 5102–10. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9095>.
- Yang, R, Y Yin, and Z Gu. “Polyamine Degradation Pathway Regulating Growth and GABA Accumulation in Germinating Fava Bean under Hypoxia-NaCl Stress,” n.d.
- Zhang, Hongyan, Yujiao Liu, Xuxiao Zong, Changcai Teng, Wanwei Hou, Ping Li, and Dezhi Du. “Genetic Diversity of Global Faba Bean Germplasm Resources Based on the 130K TNGS Genotyping Platform.” *Agronomy* 13, no. 3 (March 10, 2023): 811. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030811>.
- Zhao, Mingxia, Houzhen Tuo, Shuhui Wang, and Lin Zhao. “The Effects of Dietary Nutrition on Sleep and Sleep Disorders.” *Mediators of Inflammation* 2020 (June 25, 2020): 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/3142874>.
- Παπακώστα-Τασοπούλου, Δέσποινα “ΨΥΧΑΝΘΗ (Καρποδοτικά-Χορτοδοτικά)” , *Σύγχρονη Παιδεία*, (2005)