

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Σχολή Γεωπονικών Επιστημών**

**Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος**

**Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας στην υδατική καταπόνηση  
στη σόγια**



**Βασιλική Παναγιωτοπούλου**

**Βόλος 2020**

# **Μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας στην υδατική καταπόνηση στη σόγια**

**Βασιλική Παναγιωτοπούλου**

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

- **Ουρανία Παυλή**, Επικ. Καθηγήτρια (**Επιβλέπουσα**)  
Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και  
Αγροτικού Περιβάλλοντος, ΠΘ
- **Ιμπραχίμ – Αβραάμ Χα**, Καθηγητής (**Μέλος**)  
Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και  
Αγροτικού Περιβάλλοντος, ΠΘ
- **Σκαράκης Γεώργιος**, Ομοτ. Καθηγητής (**Μέλος**)  
Εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών & Γεωργικού Πειραματισμού, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής  
Παραγωγής, ΓΠΑ

Copyright © *ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΠΟΥΛΟΥ*, 2020.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος» του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του ΠΘ.

Ως την ελάχιστη δυνατή μνεία, με την παρούσα παράγραφο οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της και ιδιαίτερα:

Την κ. Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, που υπήρξε επιβλέπουσα της διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική της καθοδήγηση, τις υποδείξεις της, την επιμονή της, τη συμπαράστασή της και τη συνεχή υποστήριξη που έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας.

Τον κ. Ιμπραχίμ Αβραάμ Χα, Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, και τον κ. Γεώργιο Σκαράκη, Ομότιμο Καθηγητή Βελτίωσης Φυτών & Γεωργικού Πειραματισμού του ΓΠΑ, για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και για τις παραγωγικές συμβουλές τους.

Τον κ. Κωνσταντίνο Αλιφέρη, Λέκτορα του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του ΓΠΑ, για την πολύτιμη συνεισφορά στις αναλύσεις της μεταβολομικής, την επεξεργασία των δεδομένων καθώς και την επιστημονική στήριξη που παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Χρύσα Φώτη για την καθοδήγηση της, την ηθική της υποστήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, μια απλή ευχαριστία δεν είναι αρκετή για τη στήριξη και τη συμπαράσταση της οικογένειάς μου καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Ήταν όλοι τους παρόντες σε κάθε μου βήμα και ο καθένας με τον δικό του τρόπο συνέβαλε στην ολοκλήρωση αυτού του κύκλου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με δεδομένο ότι η σόγια συγκαταλέγεται στα ιδιαίτερα απαιτητικά σε υδατικές εισροές φυτικά είδη, αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της απόκρισης σε μεταβολικό επίπεδο γενετικού υλικού σόγιας υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης με στόχο την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα στην καταπόνηση. Απώτερο σκοπό αποτελεί η αξιοποίηση της γνώσης αυτής για τον προσδιορισμό μεταβολικών συστατικών που σχετίζονται με το γνώρισμα της ανθεκτικότητας και μπορεί να αξιοποιηθούν ως λειτουργικοί δείκτες για την έμμεση επιλογή ανθεκτικών στην ξηρασία γονοτύπων σόγιας. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν δύο ποικιλίες σόγιας, μία ανθεκτική και μία ευαίσθητη στην ξηρασία, οι οποίες υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση κατά την έναρξη του αναπαραγωγικού σταδίου (V6), πριν την άνθιση, που αποτελεί το πλέον κρίσιμο στάδιο για την υδατική καταπόνηση στη σόγια. Τα φυτά υποβλήθηκαν σε καταπόνηση με πλήρη στέρηση άρδευσης για διάστημα 6 ημερών, ενώ ως μάρτυρες αξιοποιήθηκαν φυτά τα οποία αρδεύονταν κανονικά. Ακολούθησε η εκχύλιση μεταβολιτών και προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ φύλλων, με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC/EI/MS). Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση 191 συνολικά μεταβολικών συστατικών, η πλειονότητα των οποίων ανήκει στις χημικές ομάδες των υδατανθράκων, των καρβοξυλικών οξέων, των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων. Η πολυμεταβλητή ανάλυση κατέδειξαν τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των βιολογικών επαναλήψεων των φυτών-μαρτύρων, τόσο της ανθεκτικής όσο και της ευαίσθητης ποικιλίας, από τα καταπονημένα φυτά, υποδεικνύοντας τη σημαντική επίδραση της υδατικής καταπόνησης στο μεταβολισμό των φυτών σόγιας. Ταυτόχρονα, αναδείχθηκε η σημαντική διαφοροποίηση των βιολογικών επαναλήψεων των φυτών-μαρτύρων μεταξύ των δύο ποικιλιών, ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε υψηλή ομοιότητα μεταξύ των καταπονημένων φυτών των δύο ποικιλιών. Σε επίπεδο μεταχείρισης και σε επίπεδο ποικιλίας καταγράφηκε σημαντική μεταβολή στη συσσώρευση συνολικά 25 και 31 συστατικών αντίστοιχα, που ανήκουν στις ομάδες των υδατανθράκων, καρβοξυλικών οξέων, αμινοξέων, φωσφορικών οξέων, λιπαρών οξέων και τερπενίων. Επιπλέον, διαφορική απόκριση μεταξύ των καταπονημένων και των φυτών-μαρτύρων παρατηρήθηκε στους μεταβολίτες σιλιτόλη, μαλονικό οξύ, φουμαρικό οξύ, μαλικό οξύ, L-σερίνη και φωσφορικό άλας. Στο σύνολό τους, τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της

μελέτης μπορεί να αποτελεσουν τη βάση για την περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν τη γενετική ανθεκτικότητα της σόγιας στην υδατική καταπόνηση και την πιθανή εύρεση κατάλληλων δεικτών για την έμμεση επιλογή ανθεκτικών γονοτύπων.

**Λέξεις κλειδιά:** σόγια, αβιοτικές καταπονήσεις, ξηρασία, μεταβολομική ανάλυση, μεταβολίτες-βιοδείκτες

## SUMMARY

Given that soybean is one of the particularly demanding in water inputs crop species, the objective of this thesis was to study the metabolic response of soybean germplasm under drought stress conditions, aiming at understanding the molecular mechanisms governing stress resistance. Further, the thesis is aimed at exploiting such basic knowledge towards the determination of metabolic compounds associated with the trait of resistance that may be employed as functional markers for an indirect selection of drought-tolerant soybean genotypes. To this end, two soybean varieties, one resistant and one drought-sensitive, were selected and subsequently subjected to drought stress while plants entered the reproductive stage (V6), before flowering, which is the most critical stage for water stress in soybean. Plants were drought-stressed, through complete water deprivation for a period of 6 days, while as controls served plants that were normally irrigated. Following extraction of metabolites, leaf metabolic profiles were determined, using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/EI/MS). The analysis yielded a total of 191 metabolic components, the majority of which belong to the chemical groups of carbohydrates, carboxylic acids, amino acids and fatty acids. The multivariate analysis revealed the satisfactory separation of biological repeats of control plants, of both resistant and drought-sensitive variety, from stressed plants, indicating the significant effects of drought stress on the metabolism of soybean plants. At the same time, the significant differentiation of biological repetitions of control plants between the two varieties was evidenced, while on the contrary a high similarity between stressed plants of both varieties was noted. At treatment and at variety level, a significant alteration was noted at the accumulation patterns of 25 and 31 compounds respectively, belonging to the groups of carbohydrates, carboxylic acids, amino acids, phosphoric acids, fatty acids and terpenes. In addition, a differential response between stressed and control plants was observed for the metabolites scyllitol, malonic acid, fumaric acid, malic acid, L-serine and phosphate. Overall, the preliminary results of this study may form the basis for further investigation of the mechanisms governing the genetic resistance of soybean to water stress and the possible determination of suitable markers for an indirect selection of drought-tolerant genotypes.

**Keywords:** soybean, abiotic stresses, drought, metabolomics, metabolites-biomarkers

Εγώ, η Βασιλική Παναγιωτοπούλου, είμαι ο συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.



Ως επιβλέπουσα της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Βασιλική Παναγιωτοπούλου.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Βασιλική Παναγιωτοπούλου', written over a horizontal line.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	2
Περιεχόμενα.....	8
Κατάλογος πινάκων.....	10
Κατάλογος εικόνων- σχημάτων .....	11
<b>1.Εισαγωγή.....</b>	<b>12</b>
1.1 Η Σόγια – Ιστορική αναδρομή .....	12
1.2 Χρήση της σόγιας .....	15
1.3 Βοτανικά χαρακτηριστικά της σόγιας.....	17
1.4 Αύξηση και ανάπτυξη της σόγιας .....	20
1.4.1 Στάδια ανάπτυξης της σόγιας.....	21
1.5 Αγροκλιματικές συνθήκες καλλιέργειας της σόγιας.....	25
1.6 Σύσταση των σπόρων της σόγιας .....	27
1.7 Αβιοτικές καταπονήσεις.....	30
1.7.1 Στάδια απόκρισης των φυτών στις καταπονήσεις.....	31
1.7.2 Μηχανισμοί αντοχής στις καταπονήσεις .....	31
1.8 Υδατική καταπόνηση .....	32
1.8.1 Απόκριση των φυτών στη υδατική καταπόνηση.....	34
1.8.2 Αντίληψη της υδατικής καταπόνησης-Σηματοδότηση.....	35
1.8.3 Μορφολογικές τροποποιήσεις .....	36
1.8.4 Φυσιολογικές τροποποιήσεις .....	37
1.8.5 Επόδραση της υδατικής καταπόνησης στην έκφραση των γονιδίων.....	39
1.9 Μεταβολίτες .....	39
1.9 Σκοπός της μελέτης .....	43
<b>2. Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>44</b>
2.1 Γενετικό υλικό.....	44
2.2 Εφαρμογή υδατικής καταπόνησης σε συνθήκες θερμοκηπίου .....	44
2.3 Συλλογή Φυτικού υλικού .....	44

2.4 Απομόνωση μεταβολιτών .....	45
2.5 Επεξεργασία των δεδομένων.....	46
<b>3. Αποτελέσματα .....</b>	<b>48</b>
3.1 Ανάλυση μεταβολικού προφίλ ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας σόγιας υπό κανονικές και συνθήκες καταπόνησης .....	48
3.2 Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στο μεταβολισμό της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας σόγιας .....	52
3.3 Συγκριτικά μεταβολικές διαφορές της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας σόγιας υπό κανονικές και υπό συνθήκες καταπόνησης.....	55
<b>4. Συζήτηση .....</b>	<b>62</b>
<b>5. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>68</b>

## Κατάλογος Πινάκων

### Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Παγκόσμια παραγωγή σόγιας πηγή USDA.....	15
Πίνακας 1.1 Αναπτυξιακά στάδια σόγιας.....	21
Πίνακας 1.2.Σύσταση σπόρων σόγιας % (ξηράς ουσίας).....	28
Πίνακας 2.1 Δείγματα ιστού που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση μεταβολομικής .....	45
Πίνακας 3.1 Μεταβολίτες που παρουσίασαν σημαντική μεταβολή μεταξύ των καταπονημένων και των φυτών-μαρτύρων στην ανθεκτική και στην ευαίσθητη ποικιλία (διακύμανση τιμή coefficient $\geq 2.0$ και $\leq -2.0$ ).....	50
Πίνακας 3.2 Μεταβολίτες που παρουσίασαν σημαντική μεταβολή μεταξύ της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας στα καταπονημένα και στα φυτά-μάρτυρες (διακύμανση τιμή coefficient $\geq 2.0$ και $\leq -2.0$ ).....	56

## Κατάλογος Εικόνων – Σχημάτων

Εικόνα 1. Μέρη του φυτού σόγιας.....	18
Εικόνα 1.2 Φύλλα ,λόβοι και ώριμοι σπόροι σόγιας.....	19
Εικόνα 1.3 Σπόρος της σόγιας.....	20
Εικόνα 1.4 Στάδια ανάπτυξης της σόγιας.....	23
Εικόνα 2.1 Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων της μεταβολομικής ανάλυσης.....	46
Εικόνα 3.1 Το ποσοστό των ταυτοποιημένων (πλήρως ή μερικώς) μεταβολιτών ανά χημική ομάδα.....	49
Εικόνα 3.2 OPLS-DA score plot (pairwise analysis) για το διαχωρισμό των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ των φυτών-μαρτύρων (Control) και των καταπονημένων φυτών (Drought) της ευαίσθητης και της ανθεκτικής ποικιλίας. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling’s T2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95.0% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Component).....	49
Εικόνα 3.3 Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στη συσσώρευση μεταβολιτών που ανήκουν στις χημικές ομάδες των Α. υδατανθράκων, Β. καρβοξυλικών οξέων, Γ. αμινοξέων και Δ. φωσφορικών οξέων, λιπαρών οξέων και τερπενίων στην ανθεκτική και στην ευαίσθητη ποικιλία. Απεικονίζονται οι μεταβολίτες των οποίων η συσσώρευση διέφερε σημαντικά μεταξύ των καταπονημένων και των φυτών-μαρτύρων.....	54
Εικόνα 3.4 Σημειώνεται ότι οι απόλυτες τιμές είναι ανάλογες τις βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό (Aliferis et al., 2014).....	55
Εικόνα 3.5 Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στη συσσώρευση μεταβολιτών που ανήκουν στις χημικές ομάδες των Α. υδατανθράκων, Β. καρβοξυλικών οξέων, Γ. αμινοξέων και Δ. φωσφορικών οξέων, λιπαρών οξέων και τερπενίων υπό κανονικές και συνθήκες καταπονησης. Απεικονίζονται οι μεταβολίτες των οποίων η συσσώρευση διέφερε σημαντικά μεταξύ των φυτών της ευαίσθητης και της ανθεκτικής ποικιλίας.....	58
Εικόνα 3.6 Μεταβολικό δίκτυο όπου απεικονίζεται η επίδραση της υδατικής καταπόνησης στο μεταβολισμό ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας σόγιας κατά το αναπτυξιακό στάδιο V6. Στο χάρτη απεικονίζεται για κάθε συστατικό η μεταβολή της συσσώρευσής του, σε επίπεδο μεταχείρισης, για την ανθεκτική (αριστερά) και ευαίσθητη (δεξιά). Η αυξημένη συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης, συγκριτικά με τους μάρτυρες, απεικονίζονται με πράσινο ανοδικό βέλος, ενώ η αντίστοιχη μειωμένη συσσώρευση αποδίδεται με κόκκινο καθοδικό βέλος. Με γκρι χρωματισμό, αποδίδονται οι μεταβολίτες που παρουσίασαν μη σημαντική μεταβολή σε επίπεδο μεταχείρισης. Με συνεχή γραμμή αποτυπώνονται οι μεταβολίτες που συνδέονται άμεσα μεταξύ τους, ενώ με διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται η σύνδεση αυτών που συνδέονται έμμεσα σε κοινό βιοχημικό μονοπάτι.....	61

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1 Η Σόγια - Ιστορική αναδρομή

Η σόγια, *Glycine max*, είναι ένα από τα σπουδαιότερα καρποδοτικά ψυχανθή στον κόσμο όσον αφορά τη χρήση της στη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων. Χώρα καταγωγής της σόγιας είναι η Κίνα, όπου έλαβε χώρα και η εξημέρωσή της μεταξύ του 1700 και 1100 π.Χ. Η σόγια συμπεριλαμβάνεται στα πέντε ιερά φυτά της Κίνας, μαζί με τα σιτάρι, ρύζι, κεχρί και σόργο. Τα φυτά αυτά τα έσπερνε συμβολικά ο αυτοκράτορας της Κίνας με τα ίδια του τα χέρια κατά τη γιορτή της σποράς.

Η ιστορία ταξινόμησης του γένους *Glycine*, και κατά συνέπεια και της σόγιας, είναι ιδιαίτερα συγκεχυμένη και χρονολογείται από τότε που ξεκίνησε η καλλιέργειά της. Την ονομασία *Glycine*, χρησιμοποίησε για πρώτη φορά ο Λινναίος στην πρώτη του έκδοση *Genera Plantarum* (1737). Η ονομασία προήλθε από την ελληνική λέξη γλυκής (*glycys*), η οποία πιθανότατα αναφερόταν στη γλυκύτητα του κονδύλου του παραγόμενου από το *Glycine apios*, γνωστό σήμερα ως *Apios Americana* (Medic). Ο Λινναίος απαρίθμησε οκτώ είδη του γένους *Glycine*, τα οποία αργότερα κατατάχθηκαν σε άλλα γένη. Κατά τη μετονομασία του *G. apios* σε *G. americana*, δεν υφίστατο πλέον συσχέτιση με την αρχική προέλευση του ονόματος του γένους *Glycine*, με αποτέλεσμα η λέξη γλυκός να μη συνδέεται με κανένα από τα σημερινά είδη του *Glycine*. Το 1753, ο Λινναίος περιέγραψε τη σόγια συγχρόνως ως *Phaseolus max*, βασιζόμενος σε δείγματα που ταξινόμησε ο ίδιος, καθώς και ως *Dolichos soja*, βασιζόμενος σε περιγραφές άλλων. Ωστόσο, μερικά χρόνια αργότερα, ο Λινναίος έλαβε στην κατοχή του σπόρους του *D. soja* τους οποίους και έσπειρε στην Ουψάλα και διαπίστωσε ότι το *P. max* και *D. soja* ήταν το ίδιο φυτό. Σύμφωνα με αναφορές, ο Λινναίος προόριζε το *P. max* για ένα είδος Ινδικού φασολιού (*mungo bean*) το οποίο όμως περιέγραψε στο *Mantissa Plantarum* (1767) για πρώτη φορά ως *Phaseolus mungo*. Έκτοτε, η ορθή ονομασία για τη σόγια αποτέλεσε αντικείμενο ευρείας μελέτης. Αρχικά, ο Moench, το 1794 ονόμασε το φυτό του Λινναίου *Soja hispida*, ενώ το 1824 ο Savi ονόμασε τη σόγια Ιαπωνική *Soja japonica* και αργότερα ο Miquel (1855) απέδωσε σε μια στενόφυλλη μορφή από την Ιάβα την ονομασία *Soja angustifolia*. Μετέπειτα, ο Maximowicz (1873) χρησιμοποιώντας το όνομα του είδους του Moench παρουσίασε σε δημοσίευμα τη σόγια ως *Glycine hispida*. Παράλληλα, ο Bentham (1864, 1865)

διαίρεσε το γένος *Glycine* σε τρεις υποδιαίρεσεις: α) *Leptolobium*, β) *Johnia* και γ) *Soja*. Ο Herman το 1962 δημοσίευσε μια αναθεωρημένη ταξινόμηση του γένους *Glycine* και των συγγενών του, σύμφωνα με την οποία το γένος *Glycine* περιλάμβανε τρία υπογένη: *Leptocytamus* F.J. Herm με έξι είδη, *Glycine* με δυο είδη και *Soja* F.J., όπου κατατάχθηκε η σόγια και το ετήσιο αυτοφυές.

Οι πρώτες αναφορές σχετικά με την καλλιέργεια σόγιας, καταγράφονται στην Κίνα χιλιάδες χρόνια πριν. Αργότερα, η καλλιέργεια εισήχθη στην Ιαπωνία, περίπου 5-7 χιλιάδες χρόνια πριν. Μετέπειτα, περίπου 3 χιλιάδες χρόνια πριν, καλλιεργούμενες ποικιλίες αναφέρονται στην Κορέα (Shurtleff et al., 2013; Lee et al., 2015). Η σόγια ως καλλιεργούμενο προϊόν αποτελεί μέχρι και σήμερα αναπόσπαστο κομμάτι της παραδοσιακής λαϊκής διατροφής στην Ανατολική και Νοτιοανατολική Ασία.

Στις Η.Π.Α, η καλλιέργεια σόγιας εισήχθη στις αρχές του 18<sup>ου</sup> αιώνα. Στη Βόρειο Αμερική, πρωτοεισήχθη το 1765 και η χρήση της περιοριζόταν στη διατροφή των ζώων. Από το 1930 και έπειτα, δημιουργήθηκαν και άλλα προϊόντα σόγιας που προορίζονταν για τη διατροφή του ανθρώπου καθώς επίσης και τη βιομηχανία υφασμάτων και παραγωγής πλαστικού (Schwarcz et al., 2004). Στη Ν. Αμερική, και συγκεκριμένα στην Αργεντινή, οι πρώτες αναφορές για την καλλιέργεια της σόγιας γίνονται το 1882 (Shurtleff et al., 2012). Αντίθετα, στις Η.Π.Α το ενδιαφέρον για την καλλιέργεια αρχικά ήταν περιορισμένο, ενώ από το 1940 η καλλιέργεια επεκτάθηκε ταχύτατα. Τα τελευταία χρόνια, οι Η.Π.Α παράγουν περίπου το 50 % της παγκόσμιας παραγωγής σόγιας και κατέχουν την πρώτη θέση στις εξαγωγές. Δεύτερη χώρα παραγωγής στον κόσμο είναι η Βραζιλία και ακολουθούν η Αργεντινή και η Κίνα.

Αναφορικά με την Ευρώπη, υπάρχουν ιστορικά δεδομένα που αναφέρουν τη χρήση προϊόντων σόγιας στην Ισπανία και στην Πορτογαλία από το 1600. Ωστόσο, η καλλιέργεια σόγιας εισήχθη στην Ευρώπη στις αρχές του 17<sup>ου</sup> αιώνα, ενώ οι πρώτες αναφορές για την καλλιέργεια χρονολογούνται το 1740 στη Γαλλία. Μετέπειτα, υπάρχει καταγεγραμμένη καλλιεργητική δραστηριότητα σόγιας στην Ελβετία και στην Αυστρία το 1861 και το 1876 αντίστοιχα (Shurtleff et al., 2015). Ακόμη και σήμερα, στην Ευρώπη η καλλιέργεια της σόγιας είναι σχετικά περιορισμένη και αναφέρεται κυρίως στις χώρες Ιταλία, Γαλλία, και Ισπανία, με αποτέλεσμα οι ανάγκες σε σπόρο και σε προϊόντα σόγιας να καλύπτονται με εισαγωγές.

Στη διεθνή αγορά, οι κύριοι ελαιούχοι σπόροι είναι εννέα: Σόγια, βαμβακόσπορος, αραχίδα (φιστίκι) (*Arachis hypogaea* L.), ηλιάνθος (*Helianthus annuus* L.), σπόρος ελαιοκράμβης (*Brassica napus* L.), λιναρόσπορος (*Linum sitatissimum* L.), καρποί κοκκοφοίνικα (*Cocos nucifera* L.), καρποί και πυρήνες φοίνικα (χουρμαδιά) (*Elaeis guineensis* L.). Από αυτούς προέρχεται το 97 % της παγκόσμιας παραγωγής φυτικών ελαίων. Το σογιέλαιο αποτελεί το 30 % του συνόλου των φυτικών ελαίων και ιχθυελαίων.

Σχετικά λίγες χώρες καλύπτουν τις ανάγκες τους σε σόγια και εξάγουν το υπόλοιπο της παραγωγής τους. Οι κυριότερες είναι οι ΗΠΑ, Βραζιλία, Κίνα και Αργεντινή. Παρά το γεγονός ότι οι ΗΠΑ κατέχουν παραδοσιακά την πρώτη θέση στις εξαγωγές σόγιας, η εξαγωγική τους δύναμη έχει μειωθεί σημαντικά λόγω του ανταγωνισμού με τη Βραζιλία. Αντίθετα, οι κυριότερες χώρες που εισάγουν σόγια είναι οι χώρες της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, η Ιαπωνία και η Σοβιετική Ένωση.

Στην Ελλάδα, οι πρώτες προσπάθειες για την καλλιέργεια της σόγιας χρονολογούνται το 1930, οι οποίες όμως ήταν σχετικά άκαρπες. Η καλλιέργεια προσέλκυσε εκ νέου το ενδιαφέρον το 1987 μετά από επιδότηση της καλλιέργειας από την Ευρωπαϊκή Ένωση με σκοπό να αυξηθεί η παραγωγή σόγιας εντός της ΕΕ και να μειωθούν οι εισαγωγές. Η ανοδική πορεία των καλλιεργούμενων εκτάσεων διατηρήθηκε μέχρι το 1989 (έκταση 76.000 στρ.) ενώ ακολούθως, σημειώθηκε σταδιακή μείωση, με αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια η καλλιέργειά της να λαμβάνει χώρα σε μικρή αλλά σταθερή έκταση στη Β. Ελλάδα, με το προϊόν να χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοντίζελ. Οι λόγοι περιορισμού της καλλιέργειας είναι κυρίως οικονομικοί και σχετίζονται με το χαμηλό εισόδημα για τον παραγωγό λόγω του υπέρογκου κόστους παραγωγής που οφείλεται κυρίως στις δαπάνες άρδευσης. Με τον τρόπο αυτό η καλλιέργεια κατέστη λιγότερο ανταγωνιστική σε σχέση με το βαμβάκι, τον ηλιάνθο και τον αραβόσιτο που σχεδόν μονοπωλούν τις εαρινές καλλιέργειες. Οι προοπτικές συστηματικότερης αξιοποίησης της σόγιας στην Ελλάδα πιθανόν θα αφορούν στην ανάγκη εντόπιας παραγωγής από μη-γενετικά τροποποιημένες ποικιλίες (με δεδομένο ότι το σύνολο σχεδόν της διεθνούς παραγωγής βασίζεται σε ΓΤ ποικιλίες) και ως επίσπορη καλλιέργεια.

Σήμερα, βάσει των δεδομένων της FAOSTAT, οι μεγαλύτεροι παραγωγοί σόγιας κατά αύξουσα σειρά είναι η Ινδία, η Κίνα, η Αργεντινή, η Βραζιλία και η Αμερική. Στην



Ελλάδα, η σόγια καλλιεργείται σε μικρή μόνο έκταση, ενώ τα προϊόντα της εγχώριας παραγωγής αξιοποιούνται για παραγωγή βιοντίζελ και ζωοτροφή.

**Πίνακας 1** Παγκόσμια παραγωγή σόγιας πηγή (USDA).

Χώρα	Παραγωγή (%)
ΗΠΑ	31
Βραζιλία	31
Αργεντινή	18
Κίνα	5
Ινδία	4
Παραγουάη	4
Καναδάς	2

## 1.2 Χρήσεις της σόγιας

Στον εικοστό αιώνα, και ιδιαίτερα μετά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, παρατηρούνται εντυπωσιακές μεταβολές στην παραγωγή της σόγιας. Η μεγάλη ζήτηση της οφείλεται στα δύο κύρια προϊόντα της, την πρωτεΐνη και τα έλαια, που χρησιμοποιούνται με ποικίλους τρόπους τόσο στη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων όσο και στη βιομηχανία. Η επέκταση της καλλιέργειας σόγιας συνοδεύεται με αύξηση των στρεμματικών αποδόσεων. Ωστόσο, προς την κατεύθυνση αυτή συνέβαλε καθοριστικά και η βελτίωση της τεχνικής της καλλιέργειας, η οποία αφορά στη δημιουργία και αξιοποίηση σύγχρονων ποικιλιών με καλά αγρονομικά χαρακτηριστικά, αναβαθμισμένη ανθεκτικότητα και προσαρμοστικότητα σε ποικίλες εδαφοκλιματικές συνθήκες καθώς και στη χρήση κατάλληλων καλλιεργητικών μηχανημάτων και εκλεκτικών ζιζανιοκτόνων.

Το 85 % των προϊόντων της καλλιέργειας σόγιας σε παγκόσμιο επίπεδο μεταποιείται σε σογιάλευρο και σογιέλαιο, ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιείται αυτούσιο για τροφή ή επεξεργάζεται με άλλους τρόπους. Τα προϊόντα της καλλιέργειας ωστόσο προορίζονται για διαφορετικές χρήσεις ανάλογα με την ποικιλία. Οι ποικιλίες με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε έλαια προορίζονται κυρίως για σογιάλευρο, ενώ αντίθετα οι ποικιλίες με υψηλή ελαιοπεριεκτικότητα και χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες αξιοποιούνται κυρίως για εξαγωγή σογιέλαιου.

Πέραν της χρήσης του ως μαγειρικό λάδι, το σογιέλαιο απευθύνεται σε μία ταχέως αναπτυσσόμενη αγορά που αφορά σε παραγωγή φαρμακευτικών ενώσεων, όπως η

βιταμίνη E και άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Στο επίπεδο αυτό, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η χορήγηση 10-15 γραμ. σογιέλαιου ημερησίως οδηγεί σε μείωση της χοληστερόλης που μεταφέρεται με τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (L.D.L.) και αύξηση της χοληστερόλης που μεταφέρεται με τις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (H.D.L.) στο αίμα, παρέχοντας προστασία έναντι της αρτηριοσκλήρυνσης, της στεφανιαίας νόσου, εμφράγματος του μυοκαρδίου και εγκεφαλικών επεισοδίων.

Επιπρόσθετα, με πρωταγωνιστή την Ευρώπη, μία από τις σημαντικότερες χρήσεις του σογιέλαιου αφορά στην παραγωγή βιοντίζελ στο πλαίσιο υποχρεωτικής υποκατάστασης των συμβατικών ορυκτών καυσίμων. Παράλληλα, πολλά στεγανωτικά, σαπούνια και λιπαντικά περιέχουν έλαιο σόγιας. Τα έλαια σόγιας επίσης χρησιμοποιούνται ως βάση των παραγόμενων χρωμάτων στις βιομηχανίες χρωμάτων, βαφών και βερνικιών.

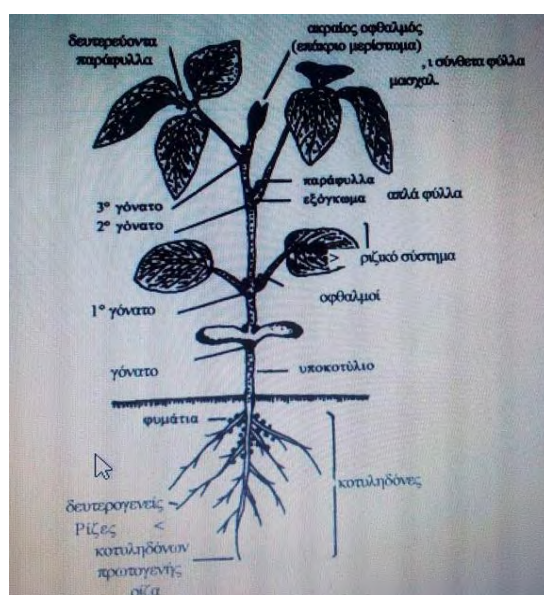
Από την άλλη πλευρά, το σογιάλευρο, χάρη στην πλούσια σύστασή του σε πρωτεΐνη, αποτελεί ένα προϊόν υψηλής διατροφικής αξίας που αποτελεί μέρος της διατροφής ανθρώπων και ζώων. Το σογιάλευρο που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες: α) σε σογιάλευρο με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη 40-60 %, β) συμπυκνωμένα πρωτεϊνούχα σκευάσματα με περιεκτικότητα πρωτεΐνης τουλάχιστον 70 % και γ) εξαιρετικά συμπυκνωμένα πρωτεϊνούχα παρασκευάσματα με περιεκτικότητα πρωτεΐνης 90-97 %. Τα συμπυκνώματα αξιοποιούνται για παρασκευή γάλακτος, εμπλουτισμό σε πρωτεΐνες διαφόρων αλλαντικών σκευασμάτων (λουκάνικων, σαλαμιού, κ.λπ.). Επίσης, λόγω της ιδιότητας να λάβουν οποιοδήποτε σχήμα (π.χ. ίνες σαν του κρέατος), χρώμα και άρωμα, τόσο το σογιάλευρο όσο και άλλα πρωτεϊνούχα συμπυκνώματα, όπως το συμπύκνωμα του βαμβακάλευρου, αξιοποιούνται σήμερα για την παρασκευή τεχνητού κρέατος, το οποίο είναι θρεπτικό, υγιεινό και πανομοιότυπο με το φυσικό κρέας από άποψη εμφάνισης (σχήματος χρώματος και υφής), αρώματος και γεύσης.

Τέλος, οι ιδιότητες της γαλακτοποίησης, συγκράτησης νερού και ζελατινοποίησης των πρωτεϊνών τις καθιστούν ιδανικές για επιπλέον χρήσεις σε συγκολλητικά υλικά, ασφάλτους, μελάνια, χρώματα, καλλυντικά, υλικά καθαρισμού και φυτοφάρμακα /μυκητοκτόνα.

### 1.3 Βοτανικά χαρακτηριστικά της σόγιας

Η σόγια είναι ετήσιο ποώδες φυτό των θερμών κλιμάτων, με όρθια ανάπτυξη. Το ριζικό σύστημα της είναι εκτεταμένο και αποτελείται από μια πασσαλώδη ρίζα που μπορεί να φτάσει σε βάθος 1,5 m και πολλές πλάγιες διακλαδώσεις, ο κύριος όγκος των οποίων βρίσκεται σε βάθος 25-30 cm του ανώτερου εδαφικού στρώματος (Εικόνα 1.1). Στις ρίζες, με την παρουσία των κατάλληλων ριζόβιων βακτηρίων παρατηρείται ο σχηματισμός φυματίων, τα οποία είναι μικρά, σφαιρικά ή περιστασιακά λοβωτά. Σε περίπτωση εμβολιασμού σε έδαφος που στερείται κατάλληλων ριζοβίων, τα φυμάτια εμφανίζονται σε 7-10 ημέρες. Αρχικά τα φυμάτια σχηματίζονται σε μεγάλη πυκνότητα στο πάνω μέρος της πασσαλώδους ρίζας και αυτά υποστηρίζουν με άζωτο το φυτό κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια. Τα φυμάτια των πλάγιων ριζών αποκτούν μεγαλύτερη σημασία κατά την άνθηση και το σχηματισμό των σπόρων.

Ο κύριος βλαστός είναι κυλινδρικός, με ύψος συνήθως γύρω στα 75 cm, όμως μπορεί να φτάσει τα 150 cm, συχνά χνουδωτός και το χρώμα του είναι χαρακτηριστικό της ποικιλίας. Οι κατώτεροι κόμβοι με την πάροδο του χρόνου γίνονται ξυλώδεις. Ο κύριος βλαστός διακλαδίζεται άφθονα από τους κατώτερους κόμβους και οι νέες ποικιλίες έχουν λιγότερες από έξι πλάγιες διακλαδώσεις. Οι κόμβοι του κυρίως βλαστού και των διακλαδώσεων που σχηματίζονται ταυτόχρονα, ανθίζουν και έχουν παρόμοιο αριθμό ανθέων και λοβών. Πολλές φορές οι πλάγιοι βλαστοί εξαιτίας του βάρους των λοβών πλαγιαίνουν ή ακόμα και σπάζουν προκαλώντας σημαντικές απώλειες απόδοσης.



Εικόνα 1.1 Μέρη του φυτού της σόγιας.

Τα πρώτα πραγματικά φύλλα της σόγιας είναι απλά και εκφύονται αντίθετα. Τα υπόλοιπα είναι σύνθετα, κατ' εναλλαγή με τρία ωοειδή φυλλάκια χνουδωτά και φέρουν παράφυλλα. Ο μίσχος του φύλλου είναι μακρύς και τριχωτός (Εικόνα 1.2). Το χρώμα των φύλλων είναι συνήθως σκούρο πράσινο αλλά και ανοιχτό πράσινο, ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε χλωροφύλλη. Με την ξήρανση των λοβών, συνήθως τα φύλλα αποκτούν κίτρινο χρώμα και πέφτουν, χαρακτηριστικό που διευκολύνει τη συγκομιδή. Τα φύλλα εκφύονται σε ταξιανθίες από τη μασχάλη των φύλλων. Κάθε ταξιανθία μπορεί να φέρει μέχρι και 20 μικρά άνθη χρώματος λευκού ή μωβ. Κάθε άνθος μπορεί να φέρει 3-4 ωάρια.

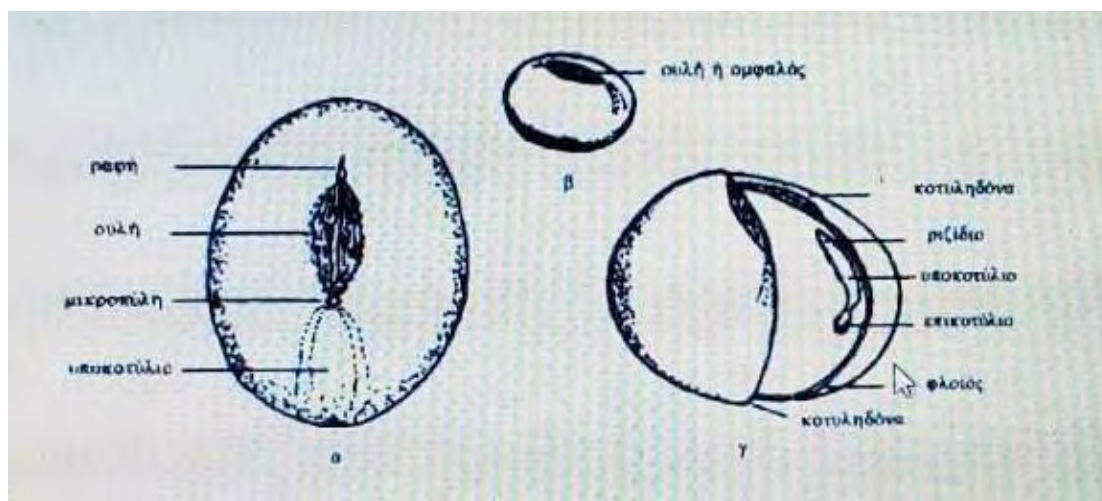
Ο αριθμός των ανθέων σε κάθε μασχάλη επηρεάζεται από τη θέση της επάνω στο φυτό και από διάφορους κλιματολογικούς παράγοντες, όπως η υγρασία και η θερμοκρασία. Ο μηχανισμός της άνθησης επηρεάζεται και από τη διάρκεια της νύχτας. Οι περισσότερες ποικιλίες ανθίζουν μόλις η ημέρα αρχίζει να μικραίνει, ενώ μόνο το 20-40 % των ανθέων σχηματίζει λοβούς. Τα άνθη της σόγιας έχουν μήκος μόλις 6-7 χιλιοστόμετρα και είναι τέλεια, με αποτέλεσμα η γύρη που σχηματίζεται στο άνθος να γονιμοποιεί το ωάριο του ίδιου άνθους. Συνήθως, το 75 % των ανθέων της σόγιας πέφτουν στο έδαφος, με αποτέλεσμα η διατήρηση της ανθοφορίας να αποτελεί σημαντικό στόχο για τους καλλιεργητές. Η καλή θρέψη και η διατήρηση των ιδανικών συνθηκών καλλιέργειας αποτελούν μια αρκετά καλή πρακτική για την διατήρηση των ανθέων επάνω στο φυτό. Οι πρώτοι λοβοί εμφανίζονται 10-14 ημέρες μετά την εμφάνιση του πρώτου άνθους και ο σχηματισμός τους ολοκληρώνεται σε διάστημα 3 εβδομάδων. Ο λοβός της σόγιας μοιάζει με εκείνον των άλλων ψυχανθών, αποτελείται από 2 καρπόφυλλα τα οποία ενώνονται με κοιλιακή και ραχιαία ραφή και το χρώμα του ποικίλει από ανοιχτό κίτρινο έως κιτρινόγκριζο, καστανό ή μαύρο (Εικόνα 1.2).



**Εικόνα 1.2** Φύλλα, λοβοί και ώριμοι σπόροι σόγιας.

Ο καρπός είναι λοβός, μήκους 2-10 cm, με σχήμα επίμηκες ή ελαφρά δρεπανοειδές (Εικόνα 1.2). Ο αριθμός των λοβών ανά φυτό, που κυμαίνεται ευρύτατα από 50 έως 500 ή και περισσότερο, αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της ποικιλίας, αν και επηρεάζεται πολύ από τις κλιματολογικές συνθήκες. Ο λοβός είναι τριχωτός, ενώ κατά την ωρίμανση έχει χρώμα συνήθως καφέ ή μαύρο αλλά και πράσινο, ή ελαφρώς κοκκινωπό. Κάθε λοβός περιέχει τρεις και περιστασιακά περισσότερους σπόρους.

Οι σπόροι της σόγιας είναι σκληροί και διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα, αποτελούνται από το φλοιό και ένα μεγάλο έμβryo και στερούνται ή περιέχουν ελάχιστους ιστούς ενδοσπερμίου. Το σχήμα ποικίλει από σχεδόν σφαιρικό έως έντονα πεπλατυσμένο και επίμηκες, ενώ στις περισσότερες ποικιλίες είναι γενικά ωοειδές με διάμετρο 5-10 mm (Εικόνα 1.2, 1.3). Το περισπέρμιο είναι λείο και γυαλιστερό με ένα μικρό ευδιάκριτο οφθαλμό και έχει χρώμα κίτρινο, πράσινο, καστανό έως μαύρο, ενώ μπορεί να υπάρχουν και σπόροι μονόχρωμοι, δίχρωμοι ή ακόμη και ποικιλόχρωμοι ανάλογα με την ποικιλία. Το χρώμα των σπόρων οφείλεται στις ανθοκυανίνες, στις χλωροφύλλες και στους συνδυασμούς των προϊόντων διάσπασης αυτών. Οι χρωστικές αυτές εντοπίζονται κυρίως στα πασσαλώδη κύτταρα της επιδερμίδας του φλοιού (Carlson and Lersten, 1987). Το βάρος 1000 σπόρων κυμαίνεται από 50 έως 400 γρ (Παπακόστα, 2012).



**Εικόνα 1.3** Σπόρος της σόγιας.

Ο φλοιός ή περίβλημα περιβάλλει το έμβryo και φέρει στην εξωτερική επιφάνεια την ουλή, η οποία έχει σχήμα γραμμοειδές έως ωοειδές και εμφανίζεται όταν ο σπόρος

αποσπάται από την σπερματική βλάστη, την μικροπύλη η οποία είναι μια μικρή οπή που βρίσκεται στο ένα άκρο της ουλής και σχηματίζεται κατά την ανάπτυξη του σπόρου και την ραφή, μια μικρή χαραγή στο άλλο άκρο της ουλής εκτεινόμενη μέχρι τη χάλαζα. Ο φλοιός αποτελείται από τρία μέρη την επιδερμίδα με πασσαλώδη κύτταρα, την υποδερμίδα με σκληροποιημένα κύτταρα και με αρκετό μεσοκυττάριο χώρο και τον εσωτερικό παρεγχυματικό ιστό. Ο παρεγχυματικός ιστός είναι ομοιόμορφος σε όλο το φλοιό εκτός από την περιοχή της ουλής όπου σχηματίζονται τρεις ζώνες η εξωτερική, η μεσαία και η εσωτερική (Carlson and Lersten, 1987).

#### **1.4 Αύξηση και ανάπτυξη της σόγιας**

Στη σόγια παρατηρούνται δύο τρόποι ανάπτυξης του υπέργειου τμήματος της το καθορισμένο και το συνεχές. Στις ποικιλίες καθορισμένης ανάπτυξης, η βλαστική ανάπτυξη του κυρίως βλαστού έχει ολοκληρωθεί κατά την έναρξη της άνθησης ή λίγο αργότερα, ενώ στις ποικιλίες συνεχούς ανάπτυξης η βλαστική ανάπτυξη συνεχίζεται και μετά την ολοκλήρωση της άνθησης, δηλαδή λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα βλαστική και αναπαραγωγική ανάπτυξη.

Διακρίνονται τέσσερα στάδια κατά την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος της σόγιας σε συνθήκες αγρού :

- ταχεία ανάπτυξη της ρίζας κατακόρυφα κάτω από τη γραμμή ανάπτυξης των φυτών, κατά τη διάρκεια βλαστικής ανάπτυξης,
- διακλάδωση των ριζών κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης,
- μειωμένη ανάπτυξη των ριζών κάτω από τη γραμμή σποράς και αυξημένη ανάπτυξη των ριζών μεταξύ των γραμμών σποράς κατά το σχηματισμό των λοβών,
- παύση ανάπτυξης της ρίζας και μείωση της μάζας των ριζών λόγω αποσύνθεσης κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ωρίμανσης.

Ο γονότυπος καθορίζει την έναρξη της άνθησης. Οι κλιματολογικές συνθήκες επηρεάζουν επίσης την άνθηση καθώς επίσης και η φωτοπερίοδος. Η άνθηση γίνεται ορατή 25-50 ημέρες από τη σπορά.

### 1.4.1 Στάδια ανάπτυξης της σόγιας

Η βλάστηση της σόγιας είναι επίγεια και με τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες (υγρασία, θερμοκρασία και βάθος σποράς), τα σπορόφυτα εμφανίζονται 4 - 5 ημέρες μετά τη σπορά (Whigham, 1983). Στην επίγεια βλάστηση, η υποκοτύλη είναι ενεργή και ωθεί τις κοτυληδόνες πάνω από το έδαφος κατά την ανάπτυξή της (Nelson and Larson, 1984)

Η ανάπτυξη της σόγιας διαχωρίζεται σε δυο στάδια, το βλαστικό και το αναπαραγωγικό (Fehr and Caviness, 1977) (Πίνακας 1.1) (Εικόνα 1.4). Τα αναπτυξιακά στάδια της σόγιας είναι πλήρως καθορισμένα. Το βλαστικό στάδιο (V) αριθμείται σύμφωνα με τον αριθμό των πλήρως ανεπτυγμένων τρίφυλλων, ενώ το αναπαραγωγικό στάδιο (R) αρχίζει κατά την ανθοφορία και συνεχίζει με τη καρποφορία φυτών και την ωρίμανση. Την έναρξη νέου σταδίου ανάπτυξης σηματοδοτεί η φάση κατά την οποία τουλάχιστον το 50 % των φυτών πληρούν τα καθορισμένα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά.

**Πίνακας 1.1** Αναπτυξιακά στάδια σόγιας.

<b>Βλαστικά στάδια</b>		
<b>VE</b>	Βλάστηση	Εμφάνιση νεαρών σποροφύτων με τις κοτυληδόνες
<b>VC</b>	Κοτυληδόνες	Πλήρης ανάπτυξη κοτυληδόνων
<b>V1</b>	Πρώτο γόνατο (node)	Εμφάνιση πρώτου γόνατου και πλήρης ανάπτυξη πρώτων φύλλων
<b>V2</b>	Δύο γόνατα	2 γόνατα στο κύριο στέλεχος με πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα
<b>Vn</b>		Τα βλαστικά στάδια συνεχίζονται (Vn) μέχρι εμφάνιση πρώτου άνθους
<b>Αναπαραγωγικά στάδια</b>		
<b>R1</b>	Έναρξη άνθησης	Εμφάνιση τουλάχιστον ενός άνθους στο κύριο στέλεχος
<b>R2</b>	Πλήρης άνθηση	Άνη και στα δύο τελευταία γόνατα του κύριου στελέχους
<b>R3</b>	Έναρξη σχηματισμού λοβών	Μήκος λοβών περίπου 4,8mm
<b>R4</b>	Πλήρης ανάπτυξη λοβών	Μήκος λοβών περίπου 19mm
<b>R5</b>	Έναρξη σχηματισμού σπόρων	3,2mm μήκος
<b>R6</b>	Πλήρης γέμισμα σπόρων	Λοβοί έχουν γεμίσει με σπόρους

<b>R7</b>	Έναρξη ωρίμανσης	Εμφάνιση τουλάχιστον ενός ώριμου λοβού στο κύριο στέλεχος
<b>R8</b>	Πλήρης ωρίμανση	95% των λοβών έχουν χρώμα καφέ

(Πηγή: McWilliams D.A., Berglund D.R., Endres G.J. 1999. *Soybean growth and management Quick Guide*. North Dakota State University)

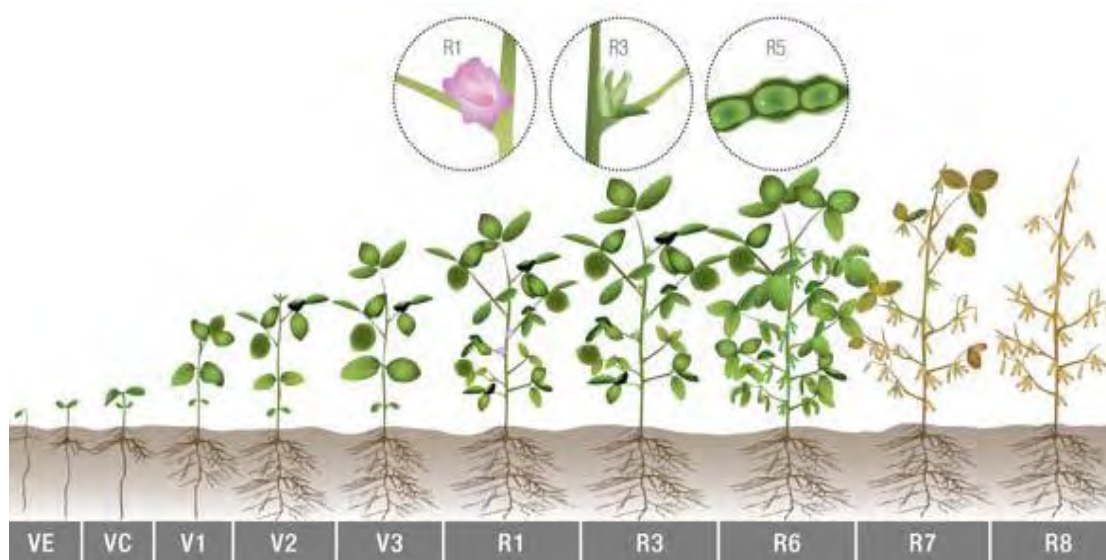
Τα φυτά είναι ευαίσθητα στη φωτοπερίοδο και συνεπώς, η μετάβαση από το βλαστικό στο αναπαραγωγικό στάδιο εξαρτάται από το μήκος της ημέρας. Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία ελέγχουν τη διάρκεια των σταδίων πριν και μετά την άνθηση. Μεγάλη φωτοπερίοδος, καθυστερεί την έναρξη της άνθησης και επιβραδύνει το ρυθμό ανάπτυξης του ανθικών καταβολών (Kantolic and Slafer, 2007). Η άριστη ημερομηνία σποράς ανάλογα την ποικιλία και την περιοχή καλλιέργειας, είναι πολύ σημαντική για τη απρόσκοπτη ανάπτυξη των φυτών και την αυξημένη απόδοση σε σπόρο. Αν η σπορά καθυστερήσει λίγες εβδομάδες, το μήκος του στελέχους και η συσσώρευση της ξηράς ουσίας του φυτού στο στάδιο ανάπτυξης R1, είναι πιθανό να μειωθούν κατά το ήμισυ. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο παίζει η άριστη πυκνότητα φύτευσης. Όταν η βλάστηση των σπόρων δεν είναι ικανοποιητική, η πυκνότητα φύτευσης πρέπει να αυξηθεί (Fehr et al., 1971).

Οι σπόροι σόγιας βλαστάνουν λίγες μέρες μετά την σπορά και η εμφάνιση των σποροφύτων γίνεται περίπου 7-10 μέρες μετά (PE), όταν η εδαφική υγρασία και η θερμοκρασία είναι άριστες. Μετά την ανάπτυξη των κοτυληδόνων, κάνουν την εμφάνισή τους τα πρώτα φύλλα (VC). Κατά στάδιο αυτό, τα θρεπτικά αποθέματα στις κοτυληδόνες αξιοποιούνται για τη θρέψη του φυτού καθώς και την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και των βλαστών. Ακολούθως, εμφανίζονται τα τρίφυλλα φύλλα (V1, V2, Vn) (Εικόνα 1.4). Το βλαστικό στάδιο, ξεκινά από την εμφάνιση των σποροφύτων στον αγρό έως το στάδιο R5, όπου αναπτύσσονται οι βλαστοί και το ριζικό σύστημα (Egli and Leggett, 1973).

Το αναπαραγωγικό στάδιο ξεκινά από την έναρξη της άνθησης (R1). Ως φυτό μικρής φωτοπερίοδου, η σόγια ανθίζει όταν η διάρκεια της ημέρας μικραίνει περισσότερο από 14 ώρες, γνώρισμα ωστόσο που εξαρτάται από την ποικιλία και την ημερομηνία σποράς. Η περίοδος της άνθησης μπορεί να διαρκέσει 3-5 εβδομάδες (Carlson and Lersten, 1987), και η πλήρης άνθηση συντελείται στο R2 στάδιο. Η εμφάνιση των



λοβών ξεκινά (R3) περίπου ένα μήνα μετά το R1 στάδιο. Ένα μήνα μετά το R5 στάδιο, το φυτό της σόγιας αρχίζει να ωριμάζει (R7 στάδιο). Η μεγέθυνση του σπόρου ξεκινά κατά το R5 στάδιο και ολοκληρώνεται στο R6 στάδιο (Board and Tan, 1995). Κατά το R7 στάδιο, λαμβάνει χώρα η εμφάνιση τουλάχιστον ενός ώριμου λοβού στο κύριο στέλεχος, ενώ με την πάροδο δύο η τριών εβδομάδων το φυτό ξηραίνεται και είναι έτοιμο προς συγκομιδή (R8 στάδιο) (Εικόνα 1.4).



**Εικόνα 1.4** Στάδια ανάπτυξης της σόγιας. Ως V- και R-στάδια ορίζονται τα βλαστικά και αναπαραγωγικά στάδια, αντίστοιχα.

(Πηγή: Πανεπιστήμιο του Ιλινόις 1999).

Η βλαστική ανάπτυξη συνεχίζεται και μετά το R1 στάδιο και στον καθορισμένο και ημι-καθορισμένο τύπο ανάπτυξης. Η βλαστική ανάπτυξη των στελεχών και του φυλλώματος συνεχίζεται μέχρι το R5 στάδιο. Από την κύρια ρίζα, αναπτύσσονται οι δευτερεύουσες ρίζες. Τα πρώτα ριζικά φυμάτια σχηματίζονται στο βασικό τμήμα της κύριας ρίζας και γίνονται ορατά περίπου 10 ημέρες μετά τη σπορά. Ξεκινούν να δεσμεύουν το άζωτο ( $N_2$ ) περίπου 15- 20 μέρες μετά τη σπορά, όταν η διάμετρός τους φτάσει περίπου τα 2 mm (Sato et al., 2001). Στα επόμενα στάδια, τα φυμάτια που σχηματίστηκαν στο βασικό τμήμα της πρωτογενούς ρίζας υποβαθμίζονται και ένας μεγαλύτερος αριθμός νέων φυματίων αναπτύσσεται από τις πλευρικές ρίζες κοντά στην επιφάνεια του εδάφους, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στον ανεφοδιασμό του φυτού με άζωτο, κατά το στάδιο γεμίσματος των λοβών.

Μετά τη γονιμοποίηση του άνθους, οι λοβοί αναπτύσσονται αργά τις πρώτες μέρες και σταδιακά αυξάνεται ο ρυθμός ανάπτυξής τους, μέχρι οι λοβοί να φτάσουν το μέγιστο μήκος τους, έπειτα περίπου από 15-20 ημέρες (Whigham, 1983). Η συγκομιδή πραγματοποιείται στο στάδιο R8, όταν τουλάχιστον το 70 % των λοβών έχουν αποκτήσει καφέ χρωματισμό και έχουν πέσει τα φύλλα. Στο στάδιο της συγκομιδής, οι σπόροι έχουν υγρασία 14-16 %.

Κατά την ωρίμανση της σόγιας, διακρίνονται δυο φάσεις: η φυσιολογική ωρίμανση και η πλήρης ωρίμανση (Κατράνης, 1989). Κατά τη φυσιολογική ωρίμανση, το σύνολο των λοβών έχει κίτρινο χρωματισμό και τουλάχιστον ένας λοβός στο κύριο στέλεχος του φυτού έχει καφέ χρωματισμό. Σε αυτό το στάδιο, η υγρασία των σπόρων κυμαίνεται γύρω στο 50 %. Ακολουθεί η πλήρης ωρίμανση, που πραγματοποιείται περίπου 10 - 15 ημέρες αργότερα, ανάλογα με την πρωιμότητα της ποικιλίας και τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες. Κατά την πλήρη ωρίμανση, οι σπόροι στους λοβούς έχουν λιγότερο από 16 % υγρασία, είναι στρογγυλοί και έχουν σκληρύνει.

Η συγκομιδή πρέπει να γίνεται χωρίς καθυστέρηση, γιατί υπάρχει ο κίνδυνος υποβάθμισης της ποιότητας των σπόρων καθώς και ποσοτικών απωλειών λόγω των καιρικών συνθηκών, οι οποίες επηρεάζουν τόσο την ωρίμανση όσο και τη συγκομιδή. Γενικότερα, κρύες και ξηρικές συνθήκες ευνοούν την καλή ποιότητα του σπόρου, ενώ ζεστός και υγρός καιρός, με συχνές βροχές, συντελεί στη χαμηλή ποιότητα και στην κακή εμφάνιση του σπόρου (Cartter and Hartwig, 1963).

Το τίναγμα των λοβών και σπόρων στη σόγια, είναι ένα σημαντικό εμπόδιο και αποτελεί εμπορικό μειονέκτημα των ποικιλιών, καθώς προκαλεί σημαντικές απώλειες στην παραγωγή, οι οποίες είναι εντονότερες σε τροπικές και υπό-τροπικές περιοχές. Σημαντικό παράγοντα στη συγκομιδή αποτελεί το ποσοστό υγρασίας που περιέχει ο σπόρος. Εάν καθυστερήσει η συγκομιδή, λαμβάνει χώρα υπερωρίμανση των σπόρων, οδηγώντας σε σημαντικές απώλειες απόδοσης ιδιαίτερα υπό ξηρικές συνθήκες. Η ώριμη σόγια πρέπει να συγκομίζεται όταν οι σπόροι είναι στο στάδιο «hard dough».

Για τη σωστή αποθήκευση και βιωσιμότητα των σπόρων, η σόγια πρέπει να έχει περιεχόμενη υγρασία περίπου 12-13 % (www.fao.org). Πιο στεγνοί σπόροι (λιγότερο από 12%) αυξάνουν τις πιθανότητες ραγίσματος του περιβλήματος των σπόρων και του διαχωρισμού τους. Επίσης, μπορεί να γίνει η συγκομιδή με υψηλή υγρασία του σπόρου (17-18 %), η οποία όμως απαιτεί έπειτα μετέπειτα ξήρανση σε ξηραντήριο,

καθώς κατά την αποθήκευση η υγρασία των σπόρων πρέπει να είναι μικρότερη από 14 % (Acquaah, 2007).

## 1.5 Αγροκλιματικές συνθήκες καλλιέργειας σόγιας

Ως φυτό θερμών κλιμάτων, η σόγια αρχικά περιορίστηκε γεωγραφικά ως προς την καλλιέργειά της. Ωστόσο, η δημιουργία σύγχρονων ποικιλιών με προσαρμοστικότητα σε ποικίλες αγροκλιματικές συνθήκες επέτρεψε την επέκταση της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα σήμερα να είναι εφικτή η καλλιέργειά της από τον Ισημερινό μέχρι τη Σουηδία (Tanner και Hume, 1978).

Η θερμοκρασία επηρεάζει όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυτού. Στο πλαίσιο αυτό, μελέτες που διεξήχθησαν στο θερμοκήπιο υπό ελεγχόμενες συνθήκες κατέδειξαν ότι σε θερμοκρασία 16 °C το φύτευμα συντελείται σε 7-10 ημέρες, ενώ σε θερμοκρασία 21-32 °C το φύτευμα συντελείται σε 3-5 ημέρες (Cartter και Hartwig, 1963). Πέραν της εξάρτησης από τη θερμοκρασία, το φύτευμα στο χωράφι εξαρτάται επίσης από την ποικιλία, το βάθος σποράς και την ευρωστία του σπόρου. Μεταξύ των ποικιλιών, διαφοροποιείται σημαντικά ο χρόνος φυτρώματος των σπόρων, γεγονός που αποδίδεται κυρίως σε διαφορές που σχετίζονται με την ταχύτητα επιμήκυνσης του υποκοτυλίου και την αντοχή στο ψύχος (Grabe και Metzger, 1969; Littlejohns and Tanner, 1976). Ερευνητές αναφέρουν ότι οι πρώιμες σπορές συχνά χρειάζονται 10-14 ημέρες για το φύτευμα, ενώ στο αντίστοιχο διάστημα για τις οψιμότερες σπορές είναι 5-7 ημέρες (Cartter και Hartwig, 1963). Οι Tanner και Hume (1978) αναφέρουν ότι υπό την επικράτηση χαμηλών εδαφικών θερμοκρασιών, το φύτευμα διαρκεί 2-3 εβδομάδες σε πρώιμες σπορές. Όταν το φύτευμα συντελείται αργά, λόγω χαμηλών θερμοκρασιών, τα φυτά έως ότου εκπτυχθούν στην επιφάνεια του εδάφους αντιμετωπίζουν κίνδυνο προσβολής από διάφορες ασθένειες και έντομα, που οδηγούν σε αραιό φύτευμα, ανεπιτυχή εγκατάσταση της καλλιέργειας και τελικά μειωμένη απόδοση. Η επικράτηση υψηλών θερμοκρασιών μετά το φύτευμα ευνοεί τη γρήγορη ανάπτυξη του φυτού, ενώ η σταδιακή άνοδος της θερμοκρασίας αυξάνει τον ρυθμό ανάπτυξης του φυτού. Απόρροια της ταχείας ανάπτυξης είναι η καλύτερη κάλυψη της επιφάνειας του χωραφιού και σκιάσή της, γεγονός που επιδρά θετικά στον ανταγωνισμό έναντι των ζιζανίων. Ως ελάχιστη θερμοκρασία για το πλείστο των φυσιολογικών διεργασιών του φυτού, ορίζεται αυτή των 10 °C. Μελέτες αναφέρουν

τη διακοπή της άνθισης στη θερμοκρασία αυτή, ενώ ακόμη έχει σημειωθεί και παύση της βλάστησης (Carter και Hartwig, 1963). Θερμοκρασίες κάτω των 24-25 °C επιβραδύνουν την άνθιση και την ωρίμανση, ενώ άνω των 35 °C επηρεάζουν δυσμενώς την ανάπτυξη του φυτού (Tanner και Hume, 1978). Σε υψηλές θερμοκρασίες, άνω των 35 °C, μπορεί να σημειωθεί πτώση των ανθέων και λοβών, οδηγώντας σε σημαντική μείωση της παραγωγής.

Η θερμοκρασία επιδρά επίσης στα ποιοτικά χαρακτηριστικά της σόγιας και συγκεκριμένα στην ποιότητα του σπόρου και στην περιεκτικότητά του σε λάδι. Οι υψηλές θερμοκρασίες κατά την περίοδο γεμίσματος των σπόρων στους λοβούς έχουν δυσμενή επίδραση στην ποιότητα του σπόρου. Επίσης, οι υψηλές θερμοκρασίες ημέρας και νύχτας (33 °C και 28 °C αντίστοιχα) επιταχύνουν την ωρίμανση και το γήρας των φύλλων καθώς και το χρόνο γεμίσματος των σπόρων. Σύμφωνα με τους Egli και Wardlaw (1980), οι ανωτέρω διεργασίες είναι υπεύθυνες για την παρατηρηθείσα μείωση της παραγωγής υπό συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών ημέρας και νύχτας. Αντίθετα, έχει παρατηρηθεί ότι η σόγια δίνει υψηλές αποδόσεις με δροσερό καιρό. Ειδικότερα, η επικράτηση θερμοκρασιών που κυμαίνονται μεταξύ 25-26 °C και 18° C για ημέρα και νύχτα αντίστοιχα εξασφαλίζει τη βέλτιστη και απρόσκοπτη ανάπτυξη της καλλιέργειας καθώς και την επίτευξη ικανοποιητικών αποδόσεων.

Οι απαιτήσεις του φυτού σε νερό κυμαίνονται από 500 έως 1000 mm (βροχόπτωση και άρδευση) και εξαρτώνται από το είδος του εδάφους, τις κλιματικές συνθήκες, τη διάρκεια καθώς και το βιολογικό κύκλο και το παραγωγικό δυναμικό της ποικιλίας. Ωστόσο, η σόγια γενικά κατατάσσεται στα ευαίσθητα στην έλλειψη επαρκούς εδαφικής υγρασίας φυτά, με τις ανάγκες σε νερό να είναι περιορισμένες κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης και να αυξάνονται σημαντικά κατά την άνθιση και το στάδιο γεμίσματος των λοβών. Επιβλαβή επίδραση στην ανάπτυξη της σόγιας έχει και η κατάκλιση του εδάφους με νερό.

Η σόγια μπορεί να καλλιεργηθεί σε όλους τους τύπους εδαφών που έχουν καλή στράγγιση εκτός από τα αμμώδη, όπου επιτυγχάνονται μειωμένες αποδόσεις. Τα μέσης σύστασης εδάφη είναι βέλτιστα για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων. Τα αργιλώδη παρουσιάζουν δυσκολίες στη σπορά και το φύτευμα, αλλά εφόσον συντελεστεί το φύτευμα τα φυτά προσαρμόζονται πολύ καλά. Επίσης, ικανοποιητική παραγωγή επιτυγχάνεται και σε συνθήκες καλλιέργειας σε οργανικά εδάφη. Υπό συνθήκες

καλλιέργειας σε φτωχά εδάφη, συνιστάται συνδυασμός με αυξημένες εισροές λίπανσης.

Τέλος, οι βέλτιστες συνθήκες εδαφικού pH κυμαίνονται μεταξύ 6 και 6,8. Οι συνθήκες αυτές επιτρέπουν την απρόσκοπτη ανάπτυξη του φυτού (Tanner και Hume, 1978). Υπό συνθήκες  $pH > 7,5$ , είναι πιθανή η εμφάνιση προβλημάτων που σχετίζονται με τη διαθεσιμότητα Fe, Mn, Cu και Zn (Johnson, 1987). Τέλος, σε εδάφη όπου το pH είναι μεγαλύτερο από 5,8 είναι αναγκαία η προσθήκη ασβεστίου.

## 1.6 Σύσταση των σπόρων της σόγιας

Ο σπόρος της σόγιας αποτελείται από τρία μέρη: το φλοιό ή περίβλημα του σπόρου, τις κοτυληδόνες και τον άξονα του εμβρύου που περιλαμβάνει το επικοτύλιο, το υποκοτύλιο και το ριζίδιο. Ο φλοιός αποτελεί το 8-10 % του συνολικού βάρους του σπόρου, ενώ οι κοτυληδόνες και ο άξονας του εμβρύου συνιστούν το 88-91 % και το 2 % (επί ξηρού βάρους) αντίστοιχα.

Οι σπόροι της σόγιας είναι πλούσιοι σε πρωτεΐνες και λιπαρές ουσίες. Τα δύο αυτά συστατικά αποτελούν το 60 % περίπου του βάρους του σπόρου και βρίσκονται κυρίως στις κοτυληδόνες. Η σύσταση ωστόσο των σπόρων ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία και τις συνθήκες του περιβάλλοντος όπου αναπτύσσονται τα φυτά.

**Πίνακας 1.2** Σύσταση σπόρων σόγιας % (ξηράς ουσίας).

Φυτικά μέρη	%	Πρωτεΐνες	Λιπαρές ουσίες	Υδατάνθρακες	Τέφρα
Ολόκληροι σπόροι	100	40	21	34	5
Κοτυληδόνες	88-91	43	23	29	5
Φλοιός	8-10	9	1	86	4,3
Άξονας εμβρύου	2	41	11	43	4,4

→ **Πρωτεΐνες:** Οι πρωτεΐνες της σόγιας έχουν υψηλή βιολογική αξία, προσεγγίζοντας αρκετά, από άποψη περιεκτικότητας σε απαραίτητα αμινοξέα, τις ζωικές πρωτεΐνες και το πρότυπο της παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO)

του FAO. Η περιεκτικότητα των σπόρων σε έλαια είναι αντιστρόφως ανάλογη της περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες της σόγιας είναι σχετικά φτωχές σε μεθειονίνη και κυστίνη, στο σύνολο των θειούχων, αλλά πλούσιες σε λυσίνη. Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη σύνθεση των πρωτεϊνών μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών. Το 1/3 περίπου του βάρους των σπόρων της σόγιας αποτελούν οι υδατάνθρακες, οι οποίοι ποικίλουν ανάλογα με το περιβάλλον και την ποικιλία, περιλαμβάνουν τους διαλυτούς και αδιάλυτους στο νερό υδατάνθρακες. Οι φλοιοί περιλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό των μη διαλυτών υδατανθράκων. Οι σογιονιφάδες περιέχουν περίπου 11,5 % υδατοδιαλυτά ζάχαρα. Τα κυριότερα σάκχαρα που απαντώνται στους σπόρους της σόγιας είναι η σακχαρόζη (5 %), η ραφινόζη (1,1 %) και η σταχυόζη (3,8 %). Επίσης απαντώνται γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, κα. Τα σάκχαρα ραφινόζη (τριζαχαρίτης) και σταχυόζη (τετραζαχαρίτης) είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία αερίων στον πεπτικό σωλήνα των ζώων και του ανθρώπου μετά τη βρώση σόγιας, όταν υπάρχει έλλειψη του ενζύμου α-γαλακτοσιδάση.

- **Έλαια:** Τα έλαια αποτελούν περίπου το 19 % της σύστασης των σπόρων της σόγιας, ενώ κύριο συστατικό τους είναι τα τριγλυκερίδια. Χαρακτηριστικό του σογιέλαιου είναι οι σχετικά μεγάλες ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών στοιχείων (polyunsaturated acids PUFA) και συγκεκριμένα, 55 % λινολεϊκού οξέος και 8 % α-λινολενικού οξέος επί του συνόλου των λιπαρών οξέων. Το λινολενικό οξύ είναι ένα απαραίτητο λιπαρό οξύ (essential fatty acid –EFA), που ανήκει στην οικογένεια των ω-6 PUFAS, και θεωρείται ότι έχει σημαντική διατροφική αξία. Το α-λινολενικό οξύ ανήκει επίσης στην κατηγορία των απαραίτητων ω-3 λιπαρών οξέων παίζοντας σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών μεταβολικών οδών. Ωστόσο, η παρουσία λιποξυγενασών στη σόγια, καθιστά το λάδι της σόγιας επιρρεπές στην τάγγιση. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις, υπάρχουν φωσφολιπίδια (λεκιθίνη), τοκοφερόλες και φυτοστερόλες (Dixit et al., 2011).
- **Υδατάνθρακες:** Η σόγια περιέχει περίπου 35 % υδατάνθρακες εκ των οποίων οι περισσότεροι είναι μη αμυλούχοι πολυσακχαρίτες. Περιέχει επίσης σε μικρότερα όμως ποσοστά ολιγοσακχαρίτες όπως σταχυόζη (4 %) και ραφινόζη (1,1 %) (Grieshop et al., 2003).

- **Βιταμίνες:** Η σόγια είναι μία από τις καλύτερες πηγές Β-βιταμινών (Liu et al., 1997), όμως είναι φτωχή σε βιταμίνη Β12. Το σογιέλαιο περιέχει σημαντικά φυσικά αντιοξειδωτικά όπως οι τοκοφερόλες (Liu et al., 1997; Sugano et al., 2006). Η σόγια επίσης περιέχει 5 % μέταλλα (Sugano et al., 2006) και είναι πλούσια σε Ca, Mg, K, P και Fe.
- **Φυτοστερόλες:** Το σογιέλαιο περιέχει περίπου 300-40 mg/100g φυτικών στερολών. Τα κυριότερα συστατικά των στερολών είναι η β-σιτοστερόλη (53-56 %), καμπεστερόλη (20-23 %) και στιγμαστερόλη (17-21%) (Ozawa et al., 2001). Οι φυτοστερόλες αυτές διαφέρουν από τη χοληστερόλη στη δομή των πλευρικών αλυσίδων τους. Έχει αποδειχθεί ότι οι φυτοστερόλες συμβάλλουν στη μείωση της χοληστερόλης παρόλο που ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός (Parraga et al., 2011).
- **Φερριτίνες:** Η σόγια περιέχει φερριτίνη, η οποία είναι μια πρωτεΐνη αποθήκευσης σιδήρου (Lonnerdal et al., 2009). Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η απορρόφηση του σιδήρου από τη φερριτίνη της σόγιας είναι ανάλογη αυτής από την φερριτίνη ζωικής προέλευσης.
- **Φωσφολιπίδια:** Η περιεκτικότητα του σογιέλαιου σε φωσφολιπίδια κυμαίνεται από 1-3 % (Liu et al., 2006), συμπεριλαμβανομένου της φωσφατιδυλοχολίνης (35 %), φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνης (25 %), φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (15 %) και φωσφατιδικού οξέος (5-10 %).
- **Ισοφλαβόνες:** Οι ισοφλαβόνες είναι μια υπο-ομάδα των ετεροκυκλικών φυτικών φαινολικών ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία φλαβονοειδών που αποτελούν τα φυτοοιστρογόνα. Η σόγια αποτελεί την πιο άφθονη πηγή ισοφλαβονών (Kudou et al., 1991) στη φύση. Περιέχει τρεις τύπους ισοφλαβονών, τις γενιστεΐνη, νατνζεΐνη και γλυκιτεΐνη.

## 1.7 Βιοτικές καταπονήσεις

Ως αβιοτική καταπόνηση θεωρείται η επίδραση των δυσμενών αβιοτικών παραγόντων που τείνουν να παρεμποδίσουν την κανονική λειτουργία των φυσιολογικών

μηχανισμών και λειτουργιών των φυτών. Στις αβιοτικές καταπονήσεις συγκαταλέγονται η αλατότητα, η υπερεπάρκεια ή ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας, οι ακραίες θερμοκρασίες, η ανοξία, τα ιόντα, τα βαρέα μέταλλα (στο περιβάλλον ή το έδαφος), αλλά και ατμοσφαιρικής προέλευσης παράγοντες καταπόνησης, όπως το όζον, η συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (οξειδωτικές), η επίδραση του ανέμου, της βαρύτητας, ήχου, των μαγνητικών πεδίων και η έκθεση σε ορατή, υπεριώδη, υπέρυθη και ιοντίζουσα ακτινοβολία.

Οι σημαντικότερες αβιοτικές καταπονήσεις, σε σχέση με τις αλλαγές που προκαλούν στις μοριακές, μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές αντιδράσεις των φυτών είναι: η υδατική καταπόνηση (ξηρασία), η υψηλή θερμοκρασία, ο παγετός, η αλατότητα, η οξειδωτική καταπόνηση, η παρουσία βαρέων μετάλλων και η υπερεπάρκεια εδαφικής υγρασίας που μπορεί να προκαλέσει ανοξία. Προκειμένου να καταστεί εφικτή η αύξηση, ανάπτυξη και επιβίωση των φυτών υπό δυσμενείς συνθήκες που προκαλούνται από αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης, τα φυτά καλούνται να προσαρμοστούν, το οποίο συνεπάγεται την ανάπτυξη ή ενεργοποίηση μιας αλληλουχίας αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο. Η προσαρμογή των φυτών προϋποθέτει αρχικά την αντίληψη του ερεθίσματος και έπειτα την πρόσληψη μεταφορά του σήματος, το οποίο τελικά οδηγεί στην επαγωγή των κατάλληλων μηχανισμών άμυνας. Οι μεταβολές μπορεί να είναι παροδικές ή μόνιμες και ακόμη και να είναι κληρονομήσιμες σε επόμενες γενιές.

### **1.7.1 Στάδια απόκρισης των φυτών στις καταπονήσεις**

Οι φάσεις από τις οποίες διέρχεται το φυτό από τη στιγμή που γίνεται αντίληψη του ερεθίσματος συνοψίζονται στα ακόλουθα στάδια :

- Στάδιο συναγερμού (alarm stage), όπου το φυτό αντιλαμβάνεται το αρχικό ερέθισμα και σηματοδοτείται η έναρξη πληθώρας μεταβολών σε φυσιολογικό επίπεδο. Η εξέλιξη των μεταβολών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διάρκεια της καταπόνησης. Η συνέχιση της επικράτησης δυσμενών συνθηκών οδηγεί σε οξεία ή χρόνια βλάβη του φυτού, ενώ σε περίπτωση παρατεταμένης έκθεσης στον παράγοντα καταπόνησης παρατηρείται χρόνια βλάβη ή ακόμη και αδυναμία



επιβίωσης του φυτού. Αντίθετα, η σύντομη επικράτηση δυσμενών συνθηκών και η εξάλειψη του παράγοντα καταπόνησης συχνά οδηγεί σε ανάκαμψη του φυτού.

- Στάδιο αντοχής (resistance stage), όπου το φυτό ενεργοποιώντας αμυντικούς μηχανισμούς μπορεί να εγκλιματιστεί, να προσαρμοστεί ή να επιδιορθώσει τις όποιες βλάβες έχουν προκληθεί από τον παράγοντα καταπόνησης.
- Στάδιο εξάντλησης (exhaustion stage), όπου το φυτό στερείται πλέον της ικανότητας να ανταπεξέλθει στις συνθήκες καταπόνησης, με αποτέλεσμα να οδηγείται σταδιακά σε χρόνια βλάβη και νέκρωση.
- Στάδιο αναγέννησης (regeneration stage), όπου το φυτό μπορεί να επιστρέψει στα φυσιολογικά επίπεδα, υπό την προϋπόθεση ότι οι βλάβες που έχει υποστεί είναι αναστρέψιμες.

### **1.7.2 Μηχανισμοί αντοχής στις καταπονήσεις**

Τα φυτά προκειμένου να ανταπεξέλθουν στην επικράτηση δυσμενών συνθηκών / αβιοτικών καταπονήσεων έχουν αναπτύξει μία πληθώρα αμυντικών μηχανισμών, που διακρίνονται στους μηχανισμούς αποφυγής (escape) και μηχανισμούς ανοχής (tolerance) ή αντοχής, οι οποίοι αντίστοιχα εκδηλώνονται ως φαινότυποι ανθεκτικότητας και ανεκτικότητας στην καταπόνηση.

Οι μηχανισμοί αποφυγής αφορούν σε τροποποιήσεις οι οποίες οδηγούν σε αποφυγή του παράγοντα καταπόνησης και οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν μεταβολή των φυσιολογικών λειτουργιών, όπως λήθαργος των σπόρων, ή των μορφολογικών και ανατομικών χαρακτηριστικών του φυτού, όπως ανάπτυξη μεγαλύτερου ριζικού συστήματος, κάλυψη των φύλλων με τριχίδια, κηρώδεις ουσίες κ.α. Αναφορικά με τους μηχανισμούς ανοχής, το φυτό ανταπεξέρχεται της καταπόνησης ερχόμενο σε ισορροπία με το περιβάλλον μέσω διαφόρων λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου της συσσώρευσης αλάτων στους φυτικούς ιστούς υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας ή μείωσης του υδατικού δυναμικού των κυττάρων υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης.

Οι μηχανισμοί αντοχής κατατάσσονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: i) τους εγγενείς μηχανισμούς (constitutive), ii) τους μηχανισμούς προσαρμογής (adaptive) και iii) τους μηχανισμούς εγκλιματισμού (acclimation hardening). Οι εγγενείς μηχανισμοί αφορούν

σε γενετικώς καθορισμένα χαρακτηριστικά τα οποία εκφράζονται δομικά, ανεξάρτητα από την ύπαρξη της καταπόνησης. Οι μηχανισμοί προσαρμογής είναι εξειδικευμένες μακροχρόνιες αντιδράσεις που περιλαμβάνουν τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο. Οι μηχανισμοί εγκλιματισμού είναι ταχείες αντιδράσεις μεταβολισμού και αύξησης που λαμβάνουν χώρα σε μεταβολές περιβάλλοντος, βραχυχρόνιες και συνήθεις. Κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού, το φυτό αγγίζει την ομοιόσταση του, αυξάνοντας τον αναβολισμό του και μειώνοντας τη συσσώρευση υποτοξικών υποπροϊόντων.

## **1.8 Υδατική καταπόνηση**

Η διαθεσιμότητα του νερού στο περιβάλλον επηρεάζει σημαντικότερα τη δυνατότητα αύξησης, ανάπτυξης και επιβίωσης των φυτικών οργανισμών. Οι επιδράσεις της υδατικής καταπόνησης εξετάζονται κυρίως υπό το πρίσμα της έλλειψης και όχι της περίσσειας νερού. Η ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας αποτελεί το σημαντικότερο, από πλευράς απωλειών γεωργικής παραγωγής, παράγοντα καταπόνησης σε παγκόσμιο επίπεδο (Sangakkara et al., 2010). Η σημαντικότητα του εν λόγω παράγοντα καταπόνησης εντείνεται περαιτέρω από το γεγονός ότι συνθήκες ξηρασίας επικρατούν στο ένα τρίτο περίπου του χέρσου του πλανήτη, ενώ εποχικό ή τοπικό περιορισμό στη διαθεσιμότητα του νερού υφίσταται ένα σημαντικό ποσοστό της ξηράς.

Η υδατική καταπόνηση εμφανίζεται είτε υπό τη μορφή αφυδάτωσης (ξηρασία) είτε υπό τη μορφή ωσμωτικής καταπόνησης (αλατότητα). Κοινό χαρακτηριστικό και των δύο καταστάσεων είναι η διαμόρφωση χαμηλού υδατικού δυναμικού στους φυτικούς ιστούς (Καραμπουρνιώτης 2003). Η ξηρασία είναι αποτέλεσμα της περιορισμένης διαθεσιμότητας του νερού (από την ατμόσφαιρα ή το έδαφος) και της απώλειάς του μέσω της εξατμισοδιαπνοής. Η ξηρασία αποτελεί μια πολυδιάστατη μορφή καταπόνησης που επηρεάζει τα ανατομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των οργάνων των φυτών, προκαλώντας παράλληλα σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα πολλών βιοχημικών μονοπατιών που συνδέονται με αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων.

Τα τελευταία χρόνια συχνά φαινόμενα ξηρασίας και ασυνήθεις καιρικές συνθήκες έχουν παρατηρηθεί σε όλο τον κόσμο. Σχεδόν κάθε χρόνο, αυξάνεται η επιφάνεια της γεωργικής έκτασης που πλήττεται με ξηρασία, με αποτέλεσμα να παρατηρείται

περιορισμός του δυναμικού απόδοσης πληθώρας καλλιεργειών και σημαντική μείωση της γεωργικής παραγωγής. Λαμβάνοντας υπόψη τις προβλέψεις για αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, που αναμένεται να φτάσει τα 9 δισεκατομμύρια το 2050, καθίσταται σαφώς αναγκαία την αύξηση της παραγωγής κατά 40 % στις περιοχές που αναμένεται να πληγούν από την ξηρασία μέχρι το 2025 (Penisi et al., 2008). Στο πλαίσιο αυτό, αξίζει να αναφερθεί ότι οι νότιες πολιτείες της Βραζιλίας, οι οποίες συνιστούν το δεύτερο μεγαλύτερο παραγωγό σόγιας σε παγκόσμιο επίπεδο, παρουσίασαν απώλειες της τάξης του 20 % της παραγωγής τους, λόγω ξηρασίας κατά τη διάρκεια των περιόδων 2003/2004 και 2004/2005 (Polizel et al., 2011).

Βάσει των ανωτέρω, καθίσταται προφανής η πίεση για αύξηση του δυναμικού απόδοσης των καλλιεργειών υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Προς την κατεύθυνση αυτή, είναι επιτακτική η ανάγκη για τη δημιουργία σύγχρονων ποικιλιών που με γενετική αντοχή στην ξηρασία. Η επίτευξη του στόχου αυτού προϋποθέτει πρωτίστως την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με την απόκριση των φυτών στην ξηρασία και σε δεύτερο επίπεδο την αξιοποίηση της γνώσης αυτής για το σχεδιασμό βελτιωτικών προγραμμάτων που στοχεύουν στη βελτίωση της αντοχής στην ξηρασία.

### **1.8.1 Απόκριση των φυτών στην υδατική καταπόνηση**

Το οπλοστάσιο των φυτών έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων, και ειδικότερα της υδατικής, περιλαμβάνει πληθώρα στρατηγικών άμυνας (αποφυγή, διαφυγή, αντοχή), οι οποίες συμβάλουν στην εξομάλυνση των αρνητικών επιπτώσεών τους. Στην κατηγορία των φυτών που ακολουθούν τη στρατηγική αποφυγής της ξηρασίας ανήκουν τα είδη που κατά τη θερινή περίοδο εισέρχονται σε λήθαργο, όπως ορισμένα είδη αγρωστωδών (Vilagrosa et al., 2012). Η στρατηγική της διαφυγής περιλαμβάνει τροποποιήσεις που στοχεύουν στη διατήρηση υψηλού υδατικού δυναμικού, η οποία επιτυγχάνεται μέσω μορφολογικών αλλαγών όπως το κλείσιμο των στομάτων, η μείωση της φυλλικής επιφάνειας και η ανάπτυξη εκτεταμένου ριζικού συστήματος (Levitt, 1980). Τέλος, η στρατηγική της αντοχής σχετίζεται με τροποποιήσεις που στοχεύουν στη διατήρηση των φυσιολογικών λειτουργιών ακόμα και υπό συνθήκες χαμηλού υδατικού δυναμικού. Αυτές περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ειδικών φυσιολογικών, βιοχημικών και μοριακών κυτταρικών μηχανισμών που στοχεύουν στη ρύθμιση της

γονιδιακής έκφρασης και τη συσσώρευση πληθώρας συστατικών –πρωτεϊνών, ενζύμων, μεταβολιτών- που δρουν προστατευτικά έναντι της καταπόνησης (Bohnert et al., 1996; Kasuga et al., 1999). Τα εν λόγω συστατικά μπορεί να έχουν εξειδικευμένο ρόλο για την εκάστοτε καταπόνηση ή σύνθεσή τους να λαμβάνει χώρα σε απόκριση περιβαλλοντικών συνθηκών που προκαλούν αφυδάτωση, όπως η ξηρασία, ο παγετός, η αλατότητα και η υψηλή θερμοκρασία.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η υδατική καταπόνηση μπορεί να έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού ενεργοποιώντας το μεταβολισμό του, ωστόσο σε συνθήκες οξείας η παρατεταμένης καταπόνησης παρατηρείται πρόκληση βλαβών που επιδρούν αρνητικά στην ανάπτυξη του φυτού. Η διαδικασία της ανάκαμψης, που επιτελείται με το πέρας της καταπόνησης, συχνά οδηγεί στην επαναφορά των φυσιολογικών λειτουργιών σε κανονικά επίπεδα αλλά και στην προσαρμογή των φυτών στην υδατική καταπόνηση και σκληραγώγησή τους, που είναι ιδιαίτερα επιθυμητή λαμβάνοντας υπόψη τις συνεχείς αλλαγές στις κλιματικές συνθήκες (Yordanov et al., 2003).

### **1.8.2 Αντίληψη της υδατικής καταπόνησης - Σηματοδότηση**

Στην αντίληψη του υδατικού στρες, από μέρους του φυτού, συμμετέχουν οι αισθητήρες της μεμβράνης που συνιστούν μεταφορείς ιόντων, των οποίων η δραστηριότητα μεταβάλλεται σε απόκριση του ωσμωτικού στρες οδηγώντας σε αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων. Άμεσο αποτέλεσμα της υδατικής καταπόνησης στα φυτικά κύτταρα, είναι η εισροή  $Ca^{2+}$  που συνιστά κομβικό σηματοδοτικό μόριο. Αμέσως μετά την αντίληψη του ερεθίσματος, λαμβάνει χώρα το οξειδωτικό στρες που οφείλεται στην παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου ( reactive oxygen species- ROS). Εξαιτίας της μείωσης του φωτοσυνθετικού ρυθμού, αυξάνεται η συγκέντρωση των ROS. Η περιορισμένη δέσμευση  $CO_2$  μειώνει την αναγέννηση του NADP μέσω του κύκλου του Calvin, προκαλώντας μείωση της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στην πραγματικότητα, κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης υπό συνθήκες ξηρασίας πραγματοποιείται μεγαλύτερη διαρροή ηλεκτρονίων προς το  $O_2$  από την αντίδραση Mehler οξυγόνου (Cruz, 2008). Η παραγωγή των ROS σχετίζεται με τη σηματοδότηση *per se* και όχι με δυνητικές κυτταρικές βλάβες, καθώς δρουν προστατευτικά έναντι του αβιοτικού στρες μέσω της ενεργοποίησης αμυντικών μεταβολικών μονοπατιών.

Τα τελευταία χρόνια, έχει ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός χημικών παραγώγων που σχετίζονται με τη συστημική διαμεσολαβούμενη σηματοδότηση στα φυτά. Στις ενώσεις αυτές περιλαμβάνονται το αμπισικό οξύ (ABA), το σαλικυλικό οξύ (SA), η αυξίνη, το αυθυλένιο (ET), το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το ιασμονικό οξύ (JA), διάφορα πεπτίδια και πρωτεΐνες, ηλεκτρικά σήματα και μόρια RNA (Karpinski et al., 2013; Shah et al., 2014; Wang et al., 2014; Wendehenne et al., 2014)

Η ορμόνη ABA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο συμμετέχοντας στη ρύθμιση και στην προσαρμογή του φυτού υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, όπου παρατηρείται σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης ABA, καθιστώντας την ορμόνη αποκρινόμενη στο στρες (Tuteja et al., 2008). Δύο είναι οι κυριότερες πηγές παραγωγής αμπισικού οξέος: α) οι ρίζες, που παράγουν και εξάγουν ABA προς τα αγγεία του ξύλου και β) τα φύλλα, εξαιτίας της αφυδάτωσης του κυταροπλάσματος, ένα ποσοστό του συνολικού ABA των χλωροπλαστών απελευθερώνεται στους αποπλασματικούς χώρους. υπό συνθήκες υδατικής ανεπάρκειας στο εδαφικό περιβάλλον, η συγκέντρωση της ορμόνης στις ρίζες αυξάνεται δραματικά. Οπότε, το ABA μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα διασυστημικό σήμα κινδύνου που προειδοποιεί ότι ελλοχεύουν κίνδυνοι σχετικά με τη δυνατότητα τροφοδοσίας νερού στα υπέργεια φυτικά μέρη.

Η μετάδοση του σήματος πραγματοποιείται είτε μέσω ABA-ανεξάρτητων ή μέσω ABA-εξαρτώμενων οδών, ενώ και στις δύο περιπτώσεις στόχος είναι η ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων (Xiong et al., 2002; Chaves et al., 2003).

### **1.8.3 Μορφολογικές τροποποιήσεις**

Πρώτη γραμμή απόκρισης των φυτών στην ξηρασία είναι ο περιορισμός της επιφάνειας των αναπτυσσόμενων φύλλων. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει καθώς η διάταση των μεριστωματικών ιστών αποτελεί ένα πολύ ευαίσθητο μηχανισμό στην έλλειψη νερού, λόγω της άμεσης εξάρτησης από την ύπαρξη επαρκούς πίεσης σπαργής, η οποία μειώνεται από την έλλειψη νερού. Η μείωση της φυλλικής επιφάνειας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων διαπνοής και τη συνεπακόλουθη μείωση της απώλειας νερού.

Δεύτερη γραμμή αντίδρασης, είναι η μεταβολή του λόγου υπέργειου προς υπόγειο τμήμα του φυτού. Κατά κανόνα, σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης η ανάπτυξη της

ρίζας είναι λιγότερο ευαίσθητη σε σύγκριση με την αντίστοιχη του βλαστού, και κυρίως των φύλλων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ενεργητική ωσμωτική προσαρμογή της ρίζας ως μέτρου αντιμετώπισης της υδατικής ανεπάρκειας στο έδαφος (Sharp et al., 2004), η οποία προκαλεί πτώση του υδατικού δυναμικού των κυττάρων, σε επίπεδα τα οποία είναι χαμηλότερα από του υδατικού δυναμικού του εδαφικού διαλύματος. Τα κύτταρα των ριζών έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλότερα δυναμικά νερού έναντι των κυττάρων των φύλλων. Η μείωση του λόγου βλαστός/ρίζας είναι μία συνηθισμένη πρακτική υπό συνθήκες ξηρασίας, η οποία απορρέει είτε από την αύξηση της ριζικής ανάπτυξης ή από μια σχετικά μεγαλύτερη μείωση της βλαστικής αύξησης σε σχέση με την αύξηση της ρίζας (Franco et al., 2006).

Ωστόσο, πέραν της αναλογίας βλαστού/ρίζας, η καταπόνηση οδηγεί σε μία σειρά μορφολογικών προσαρμογών που σχετίζονται με το μήκος ρίζας, το φρέσκο βάρος (FW), το ξηρό βάρος (DW), τη διάμετρος και επιφάνεια, το βάθος ρίζας ή το πάχος του φλοιού καθώς και φυσιολογικών προσαρμογών, όπως η σκλήρυνση και η υδραυλική αγωγιμότητα. Οι μεταβολές αυτές συμβαίνουν σε συνάρτηση της μεταβαλλόμενης σχέσης πηγής/κατανάλωσης, καθώς υπό συνθήκες καταπόνησης ένα μεγαλύτερο ποσοστό φωτοσυνθετικών προϊόντων κατευθύνεται προς τη ρίζα. Το γεγονός οφείλεται στο ότι κατά τα αρχικά στάδια της καταπόνησης, ο περιορισμός της διάτασης των φύλλων εμφανίζεται ως πρώτο σύμπτωμα, με αποτέλεσμα αφενός μεν να περιορίζονται οι ανάγκες τους σε φωτοσυνθετικά προϊόντα και αφετέρου να παρεμποδίζεται η λειτουργία της φωτοσύνθεσης σε επόμενα στάδια. Η αλληλουχία των προσαρμογών αυτών έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της ρίζας σε βαθύτερα εδαφικά στρώματα, όπου απαντάται περισσότερη υγρασία.

Επίσης, ως απόκριση στην υδατική καταπόνηση τα φυτά συντελείται πτώση των γηραιότερων φύλλων, ώστε να μειωθεί η διαπνέουσα επιφάνεια. Σε πολλές περιπτώσεις, η έντονη και παρατεταμένη έλλειψη νερού έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή μόνο των κορυφαίων νεαρών φύλλων στο βλαστό. Ο μηχανισμός αυτός στον οποίο εμπλέκεται το αιθυλένιο, αναφέρεται ως εξισορρόπηση φυλλικής επιφάνειας και έχει ως προφανή στόχο το δραστικό περιορισμό των επιφανειών οι οποίες διαπνέουν, οδηγώντας σε εξοικονόμηση νερού (Καραμπουρνιώτης, 2003).

#### 1.8.4 Φυσιολογικές τροποποιήσεις

Η έλλειψη εδαφικής υγρασίας σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης δυνητικά επιφέρει μείωση της απόδοσης. Το υδατικό στρες μπορεί να προκαλέσει μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων και των φύλλων, περιορισμό του ανοίγματος των στοματίων των φύλλων, μείωση της φωτοσύνθεσης και της ανάπτυξης των φυτών, βλάβες στους χλωροπλάστες και σε τελική φάση ξήρανση ολόκληρου του φυτού. Κατά τη βλαστική ανάπτυξη, η έλλειψη του νερού προκαλεί:

- Μείωση της συνολικής φωτοσύνθεσης με μείωση του ρυθμού δέσμευσης του άνθρακα (C), λόγω του αναπόφευκτου κλεισίματος των στοματίων, που οδηγεί σε παρεμπόδιση της αφομοίωσης του CO<sub>2</sub> της ατμόσφαιρας. Το κλείσιμο των στομάτων γίνεται είτε παθητικά είτε μέσω του αμπισσικού οξέως (ABA). Επιπλέον, η επικράτηση του δυναμικού του νερού στον πρωτοπλάστη επιδρά στη δομική και λειτουργική ακεραιότητα της φωτοσυνθετικής συσκευής (Καραμπουρνιώτης, 2003).
- Επίδραση στο σχηματισμό χλωροφύλλης. Όταν το υδατικό δυναμικό των φύλλων είναι κάτω από -0,5 MPa μειώνεται ο σχηματισμός της χλωροφύλλης, ενώ στο - 1,0 MPa προκαλείται αποδιοργάνωση της δομής των χλωροπλάστων με σοβαρές επιπτώσεις σε βιοχημικό επίπεδο.
- Μείωση της αναπνοής,
- Μείωση της μεταφοράς των ανόργανων θρεπτικών συστατικών και των προϊόντων φωτοσύνθεσης
- Μείωση ή ανάσχεση της αύξησης του μεγέθους των κυττάρων λόγω μειωμένης σπαργής. Η αύξηση του μεγέθους των κυττάρων, εκτός από την ελάχιστη απαιτούμενη σπαργή, εξαρτάται και από βιοχημικούς παράγοντες. Το στρες που υφίστανται τα φυτά προκαλεί αφυδάτωση του κυττάρου, μείωση της πίεσης της σπαργής, μείωση του κυτταρικού όγκου και αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων, σε επίπεδα που μπορεί να αποβούν τοξικά. Συγκεκριμένα η υδατική καταπόνηση επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία των μεμβρανών. Ο πρωτοπλάστης συρρικνώνεται και συνοδεύεται από συμπύκνωση της υδατικής φάσης και αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών (αφυδάτωση του κυτταροπλάσματος). Οι μεμβρανικές αντλίες μειώνουν τη δραστηριότητά τους και παράλληλα δημιουργούνται ανεπιθύμητοι πόροι. Σε κυτταρικό επίπεδο,

επέρχεται απώλεια της διαμερισματοποίησης και συνολική μεταβολική δυσλειτουργία

- Μείωση της δέσμευσης του αζώτου στα φυμάτια των ριζών. Σε ότι αφορά την ευαισθησία των διαφόρων σταδίων ανάπτυξης της σόγιας στην έλλειψη εδαφικής υγρασίας, το αναπαραγωγικό στάδιο και κυρίως αυτό του «γεμίσματος» των σπόρων είναι τα πλέον ευαίσθητα.

Η συντελούσα μείωση της φωτοσύνθεσης, των διαθέσιμων θρεπτικών στοιχείων, της μεταφοράς των φωτοσυνθετικών προϊόντων, της δέσμευσης του N<sub>2</sub> στα φυμάτια, σε συνδυασμό με τις προαναφερθείσες επιπτώσεις, τελικά εκδηλώνονται με ανθόρροια, καρπόρροια και μείωση του μεγέθους και του βάρους των σπόρων.

Η αντιμετώπιση των αρνητικών επιπτώσεων της υδατικής καταπόνησης βασίζεται κατά κύριο λόγο στη χρήση ποικιλιών με γενετική ανθεκτικότητα στην έλλειψη εδαφικής υγρασίας καθώς και στη πρωϊμότερη σπορά. Το βαθύτερο και πλουσιότερο ριζικό σύστημα ως ποικιλιακό χαρακτηριστικό, προσδίδει ανθεκτικότητα στην ξηρασία. Άλλα ποικιλιακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αντοχή των φυτών στην ξηρασία είναι η κατεύθυνση των φύλλων και το άνοιγμα/κλείσιμο των στοματίων, που συντελούν στον περιορισμό της διαπνοής, η ωσμωτική ρύθμιση και το κλείσιμο των στοματίων υπό συνθήκες χαμηλού υδατικού δυναμικού.

### **1.8.5 Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στην έκφραση των γονιδίων**

Πέραν των μεταβολών που συμβαίνουν σε μορφολογικό και φυσιολογικό επίπεδο, ο περιορισμός των δυσμενών επιπτώσεων της υδατικής καταπόνησης περιλαμβάνει μεταβολικές διευθετήσεις εγκλιματισμού καθώς και *de novo* σύνθεση πρωτεϊνικών μορίων απαραίτητων για τη σύνθεση μεταβολιτών. Στις πρωτεΐνες αυτές, περιλαμβάνονται ένζυμα-κλειδιά, τα οποία συμβάλουν στην υδρόλυση πρωτεϊνών που έχουν μετουσιωθεί λόγω αντίξοων συνθηκών, όπως οι ακουοπορίνες και οι ΑΤΡάσες.

Ως απόκριση στην υδατική καταπόνηση, τα φυτά διαθέτουν μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην ξηρασία. Οι αλλαγές μπορεί να αφορούν σε αύξηση ή μείωση της γονιδιακής έκφρασης εξιδεικευμένων γονιδίων, μεταγραφικών παραγόντων ή ακόμη και οικογενειών γονιδίων. Η αύξηση



συνήθως σχετίζεται με την επαγωγή της ανθεκτικότητας, ενώ η μείωση αποδίδεται είτε σε στοχευμένη μείωση της έκφρασης προϊόντων που δρουν ως αναστολείς μορίων που επάγουν την ανθεκτικότητα είτε σε αδυναμία διατήρησης των φυσιολογικών επιπέδων γονιδιακής έκφρασης λόγω καταπόνησης.

## 1.9 Μεταβολομική

Τα τελευταία χρόνια, οι "ομικές" τεχνολογίες αποκτούν αξιοποιούνται ολοένα και περισσότερο σε πρακτικές εφαρμογές στις γεωπονικές επιστήμες, συμπεριλαμβανομένου της Βελτίωσης Φυτών. Στις "ομικές" τεχνολογίες, περιλαμβάνονται η γονιδιωματική (genomics), η μεταγραφομική (transcriptomics), η πρωτεομική (proteomics) και η μεταβολομική (metabolomics), οι οποίες στοχεύουν αντίστοιχα στην εύρεση πολυμορφισμών στο επίπεδο του γονιδιώματος, του μεταγραφώματος (mRNA), του πρωτεώματος και μεταβολώματος (Garcia-Reyero and Denslow, 2006). Λόγω του μεγάλου όγκου και της πολυπλοκότητας των δεδομένων που αποκτώνται από τις "ομικές" αναλύσεις, απαιτείται προηγμένη ανάλυση των δεδομένων με τη χρήση εξελιγμένων λογισμικών βιοπληροφορικής.

Οι αναδυόμενες μελέτες υπογραμμίζουν το γεγονός ότι οι "ομικές" προσεγγίσεις, σε συνδυασμό με τη χρήση πρότυπων βιολογικών συστημάτων για εφαρμογές στη βιοτεχνολογία, μπορούν να συμβάλουν καθοριστικά στην εις βάθος κατανόηση και αποσαφήνιση των μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων. Μία από τις ταχύτερα αναπτυσσόμενες "ομικές" τεχνολογίες αποτελεί η μεταβολομική (metabolomics), η οποία λειτουργεί ως συνδετικός κρίκος μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου (Aliferis and Jabaji, 2011). Το μεταβολικό προφίλ ενός οργανισμού αποτελεί το αποτέλεσμα της μεταγραφής και μετάφρασης του γονιδιώματος, της ρύθμισης αυτών από μετά-μεταγραφικούς (posttranscriptional) και μετά-μεταφραστικούς (post-translational) παράγοντες καθώς και της επίδρασης των συνθηκών που επικρατούν στο περιβάλλον ανάπτυξής του (Xu et al., 2014).

Η μεταβολομική ορίζεται ως η ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση ενός μεγάλου εύρους μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος (Fiehn, 2002). Μέσω της ταυτόχρονου προσδιορισμού μεμονωμένων μεταβολικών συστατικών καθώς και μεταβολικών δικτύων στα οποία εμπλέκονται τα συστατικά αυτά, είναι εφικτή η ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση μεταβολών στο μεταβολικό προφίλ του οργανισμού κατά την έκθεσή του σε βιοτικούς ή/και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Πέραν της

απόκτησης βασικής γνώσης σχετικά με την κατανόηση της απόκρισης του φυτού στην καταπόνηση, απώτερο σκοπό αποτελεί η ανακάλυψη των μεταβολικών συστατικών-βιοσημαντών (biomarkers) που τη χαρακτηρίζουν και μπορεί δυνητικά να αξιοποιηθούν ως δείκτες για την επιλογή επιθυμητών γονοτύπων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Η μεταβολομική είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ολοκληρωμένη μελέτη της φυσιολογίας των οργανισμών, που περιλαμβάνει εκτός από χημικές αναλύσεις και την εξαγωγή δεδομένων, τον πειραματικό σχεδιασμό και την εκτέλεση, την προεπεξεργασία των δεδομένων, τις αναλύσεις της βιοπληροφορικής και τη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Κεντρικό ρόλο στη μεταβολομική έχει η επιλογή της αναλυτικής πλατφόρμας που θα χρησιμοποιηθεί για τις αναλύσεις δειγμάτων. Η επιλογή εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες και η χημική σύνθεση των δειγμάτων, το αντικείμενο της μελέτης, ο διαθέσιμος εξοπλισμός και η τεχνογνωσία. Αν και έχουν αναπτυχθεί αρκετά αναλυτικά όργανα για την μεταβολομική, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR) (Raiston-Hooper et al., 2008) και η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS) έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κύριο λόγο σε μελέτες της μεταβολομικής (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011)

Είναι αξιοσημείωτο ότι οι αναλυτικές πλατφόρμες που αξιοποιούνται στη μεταβολομική διαφέρουν, μεταξύ άλλων, στην ευαισθησία και δυνατότητα ανίχνευσης μεταβολιτών που απαντώνται σε μικρές συγκεντρώσεις. Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα λόγω της μεγάλης επαναληψιμότητάς της (reproducibility) καθώς και των περιορισμένων χειρισμών στην προετοιμασία των δειγμάτων, όμως το όριο ανίχνευσης με NMR ανιχνευτή είναι μικρό (1-5  $\mu\text{M}$ ) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Η ανίχνευση μεταβολιτών με φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS), συνδυασμένη με αέρια (Gas Chromatography, GC) ή υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC), είναι η πλέον διαδεδομένη πλατφόρμα για μεταβολομικές αναλύσεις, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας και των διαθέσιμων μεταβολικών βιβλιοθηκών (πχ NIST, MassBank) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Σε αναλύσεις φασματομετρίας μάζας, απαιτείται η διάκριση μεταξύ των μεταβολικών χαρακτηριστικών του βιολογικού δείγματος και αυτών που δεν προέρχονται από το δείγμα (π.χ. ρύπανση του μηχανήματος ή του δείγματος, μη καθαρότητα των διαλυτών,

στήλη, χρήση χημικών αντιδραστηρίων). Με την ανάλυση "τυφλών" δειγμάτων (blank samples), τα οποία προετοιμάζονται με το ίδιο πρωτόκολλο με τα βιολογικά δείγματα, είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των δυο κατηγοριών (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Επιπλέον, η χρήση προηγμένων ανιχνευτών, όπως ο ανιχνευτής πτήσης ιόντων (Time of Flight, TOF), σε συνδυασμό με ανιχνευτή MS στον αέριο χρωματογράφο και ο ανιχνευτής στην υγρή χρωματογραφία, έχουν συμβάλει ουσιαστικά προς τη βελτίωση της ευαισθησίας των μεταβολομικών αναλύσεων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

## Σκοπός της μελέτης

Με δεδομένο ότι η σόγια συγκαταλέγεται στα ιδιαίτερα απαιτητικά σε υδατικές εισροές φυτικά είδη, αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της μεταβολικής απόκρισης γενετικού υλικού σόγιας στην υδατική καταπόνηση με στόχο την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα στην καταπόνηση. Στο πλαίσιο αυτό, επιλέχθηκαν δύο ποικιλίες σόγιας, μία ανθεκτική και μία ευαίσθητη στην ξηρασία, οι οποίες υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση κατά την έναρξη του αναπαραγωγικού σταδίου και ακολούθησε ο προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ φύλλων, με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC/EI/MS). Τα δεδομένα της μεταβολομικής αξιολογούνται υπό το πρίσμα της αξιοποίησής τους για τον προσδιορισμό μεταβολικών συστατικών που σχετίζονται με το γνώρισμα της ανθεκτικότητας και μπορεί να αξιοποιηθούν ως λειτουργικοί δείκτες για την έμμεση επιλογή ανθεκτικών στην ξηρασία γονοτύπων σόγιας.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1 Γενετικό Υλικό

Γενετικό υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν 2 ποικιλίες σόγιας οι οποίες διαφέρουν ως προς την απόκρισή τους στην υδατική καταπόνηση. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι ποικιλίες Crawford (ευαίσθητη) και Jackson P548617 (ανθεκτική), που προέρχονται από συλλογές του USDA.

### 2.2 Εφαρμογή Υδατικής καταπόνησης σε συνθήκες θερμοκηπίου

Τα πειράματα υδατικής καταπόνησης σε φυτά σόγιας διεξήχθησαν στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ. Συνολικά αναπτύχθηκαν 120 φυτά σόγιας, 60 φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας Crawford και 60 της ανθεκτικής ποικιλίας Jackson P548617.

Η σπορά έγινε τον Απρίλιο του 2015 σε φυτοδοχεία διαμέτρου 20 εκ. που περιείχαν μίγμα φυτοχώματος. Τα φυτά ποτίζονταν κανονικά για χρονικό διάστημα δύο μηνών. Με το πέρας 2 μηνών (Ιούνιος, 2015), και όταν > 50 % των φυτών βρισκόταν στο V6 αναπτυξιακό στάδιο (λίγο πριν την άνθηση), εφαρμόστηκε η υδατική καταπόνηση. Το στάδιο V6 θεωρείται το πλέον κρίσιμο στάδιο για ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας στη σόγια (Cho and Yamakawa, 2006). Η περίοδος καταπόνησης διήρκησε 6 ημέρες και κατά το διάστημα αυτό, τα φυτά υποβλήθηκαν σε πλήρη έλλειψη νερού. Ως μάρτυρες, αξιοποιήθηκαν φυτά, τα οποία αρδεύονταν κανονικά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Συνολικά, εφαρμόστηκαν τέσσερις επεμβάσεις, που αφορούσαν στις δύο ποικιλίες (ευαίσθητη και ανθεκτική) και σε δύο επίπεδα άρδευσης (κανονικό και ελλειμματικό).

### 2.3 Συλλογή φυτικού υλικού

Η συλλογή φυτικού ιστού έγινε την 6<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της υδατικής καταπόνησης, όπου λήφθηκαν δείγματα φύλλων. Για τις αναλύσεις της μεταβολομικής,

συλλέχθηκαν 4 δείγματα για κάθε ποικιλία και επίπεδο άρδευσης (σύνολο: 16 δείγματα φύλλων), ενώ κάθε δείγμα προέρχονταν από μηχανική ανάμιξη 5 φυτών (bulk) (Πίνακας 2.1).

**Πίνακας 2.1** Δείγματα ιστού που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις της μεταβολομικής.

Φυτικός ιστός	Ποικιλία	Επίπεδο άρδευσης		Αρ. δειγμάτων
Φύλλα	Ανθεκτική - <i>Jackson P548617</i>	Κανονικό	Ελλειμματικό	8
	Ευαίσθητη - <i>Crawford</i>	Κανονικό	Ελλειμματικό	8
<b>Σύνολο</b>				<b>16 δείγματα</b>

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν, τοποθετήθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στη βαθιά κατάψυξη (-80 °C), έως ότου χρησιμοποιηθούν για τις αναλύσεις της μεταβολομικής. Η άμεση μεταφορά του ιστού στο υγρό άζωτο καθίσταται απαραίτητη, ώστε να περιοριστούν κατά το δυνατό περισσότερο τυχόν μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση που σχετίζονται με τον τραυματισμό των φύλλων κατά τη δειγματοληψία.

## 2.4 Απομόνωση μεταβολιτών

Ακολούθησε η απομόνωση των μεταβολιτών από τα δείγματα φύλλων της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας προκειμένου να μελετηθεί συγκριτικά το μεταβολικό προφίλ των καταπονημένων φυτών και των μαρτύρων (Εικόνα 2.1).

Για την απομόνωση των μεταβολιτών, αρχικά έγινε λειοτρίβηση του φυτικού ιστού με χρήση υγρού αζώτου και 50 mg κονιορτοποιημένου ιστού σε μεταφέρθηκαν σε eppendorf. Ακολούθησε η προσθήκη 0,5 ml μίγματος μεθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (50:50, v/v), ενώ ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ριβιτόλη (0.2 mg ribitol /mL μεθανόλης) για την έμμεση ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 20 min και ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντιο περιστροφικό αναδευτήρα (200 rpm) (GFL 3006) για 2h. Έπειτα από φιλτράρισμα, τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν σε συμπυκνωτή κενού (150 rpm) υπό

ψύξη για 2h στους 24 °C και ακολούθησε παραγωγοποίηση των δειγμάτων προκειμένου να αυξηθεί η πτητικότητα των μεταβολιτών. Για την παραγωγοποίηση των πολικών μεταβολιτών έγινε προσθήκη 80 μl δ/τος υδροχλωρικής μεθοξυλαμίνης (MEOX) (Sigma-Aldrich Ltd) και επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο (Daihan Labtech co Ltd) για 120 min στους 30 °C. Για την παραγωγοποίηση των μη-πολικών μεταβολιτών, έγινε προσθήκη 80 μl MSTFA και επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο, για 90 min στους 37 °C.

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας (GC-MS Agilent 6890n, Agilent Technologies In.) με ανιχνευτή μάζας 5973 (Inert Mass Selective Detector, MSD) και αυτόματο δειγματολήπτη (7683 autosampler). Οι αναλύσεις της μεταβολομικής πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του ΓΠΑ. Στις αναλύσεις, συμμετείχαν "τυφλά" δείγματα (blank) για τον έλεγχο μολύνσεων και την επαλήθευση της πιστότητας των αναλύσεων.

**Εικόνα 2.1** Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων της μεταβολομικής ανάλυσης.



## 2.5 Επεξεργασία των δεδομένων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού MS DIAL (Tsugawa *et al.* 2015). Η μήτρα που προέκυψε από την ανωτέρω επεξεργασία εξήχθη στο MS Excel για περαιτέρω επεξεργασία και φιλτράρισμα των δεδομένων. Με βάση την ανάλυση των χρωματογραφημάτων, κορυφές που δεν αντιστοιχούσαν σε μεταβολικά συστατικά που σχετίζονται με το βιολογικό υλικό και κορυφές με μη ικανοποιητική επαναληψιμότητα για την επέμβαση αφαιρούνταν προκειμένου να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των ερευνητικών δεδομένων. Ακολούθησε πολυμεταβλητή ανάλυση των δεδομένων, με το λογισμικό SIMCA-P v.13.0.3, προκειμένου να προσδιοριστούν οι τάσεις στα δεδομένα καθώς και οι πιθανοί

μεταβολίτες με ρόλο βιοδείκτη (Aliferis and Jabaji, 2010). Για την ανίχνευση πιθανών ακραίων τιμών εφαρμόστηκε PCA, ενώ για την ανακάλυψη των βιοδεικτών εφαρμόστηκε OPLS-DA ( $P < 0.05$ ) (Aliferis and Jabaji, 2012; Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Επίσης, κατασκευάστηκε μεταβολικός χάρτης (metabolic map) χρησιμοποιώντας ως διακύμανση για τους μεταβολίτες τιμή Coefficient  $\geq 2,5$  και  $\leq -2,5$ . Τέλος, για επιλεγμένους μεταβολίτες κατασκευάστηκαν διαγράμματα που απεικονίζουν τη μεταβολή στη συσσώρευση συγκεκριμένων μεταβολιτών που διέφεραν σημαντικά είτε σε επίπεδο ποικιλίας είτε σε επίπεδο μεταχείρισης.

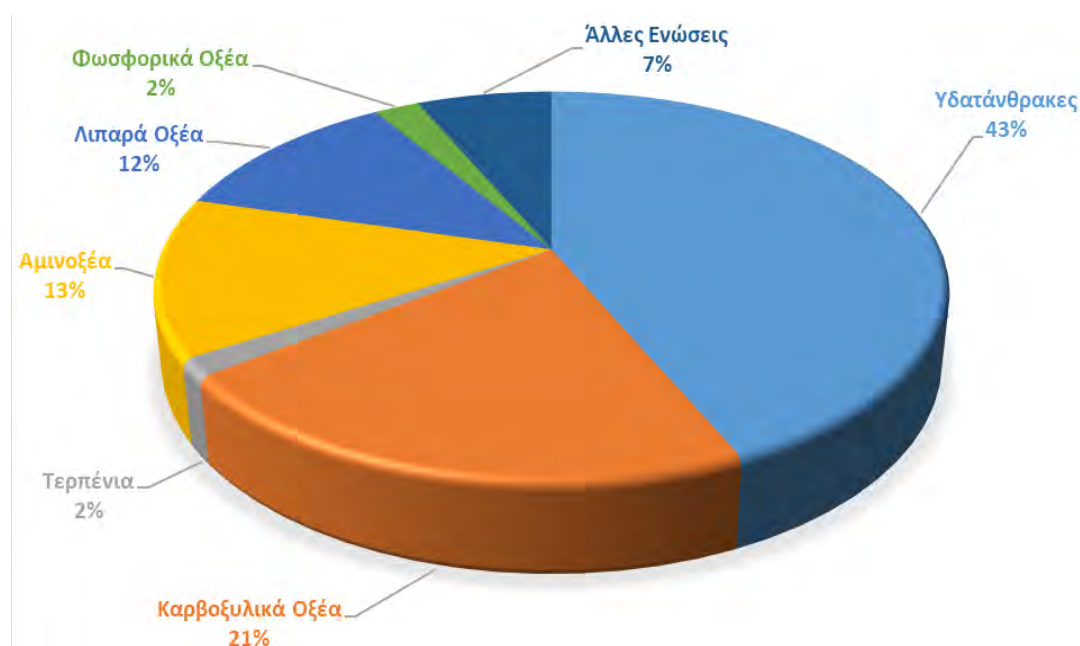


### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Ανάλυση μεταβολικού προφίλ ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας σόγιας υπό κανονικές και συνθήκες καταπόνησης

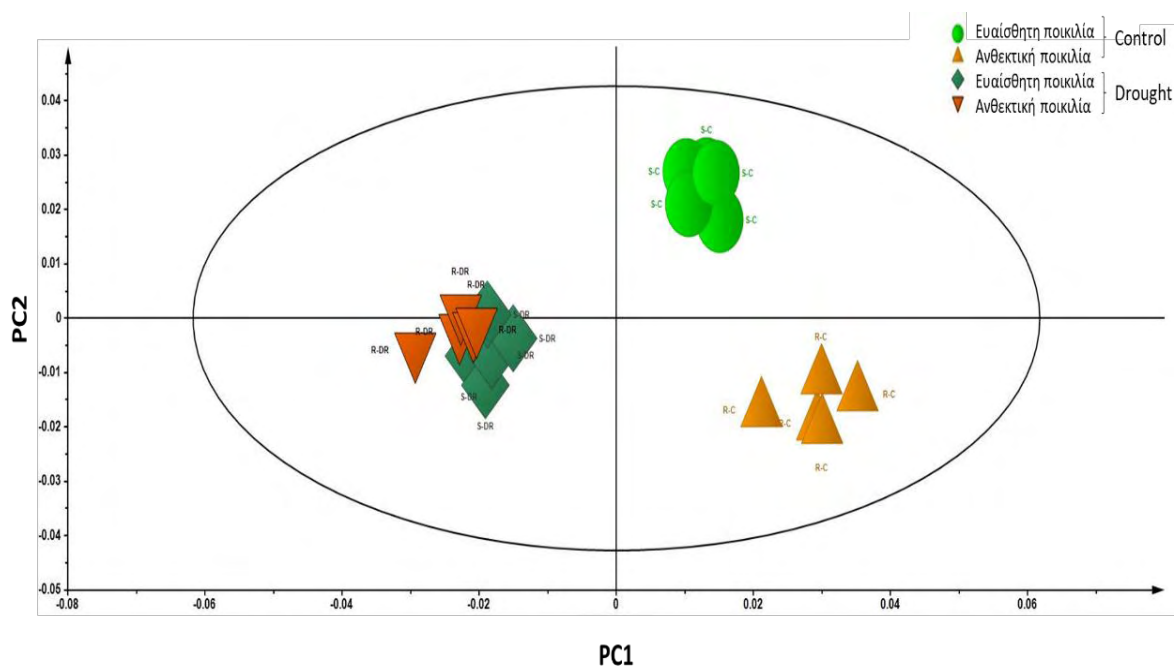
Η ανάλυση του GC/EI/MS μεταβολικού προφίλ 2 ποικιλιών σόγιας με διαφορετική απόκριση στην υδατική καταπόνηση –ανθεκτική και ευαίσθητη- επέτρεψε την ανίχνευση συνολικά 191 μεταβολικών συστατικών, εκ των οποίων 136 ταυτοποιήθηκαν, είτε απόλυτα είτε δυνητικά, ενώ για 55 δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίησή τους.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ανιχνευθέντων μεταβολιτών ανήκουν στην χημική ομάδα των υδατανθράκων, των καρβοξυλικών οξέων, των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων, ενώ οι υπόλοιποι κατατάσσονται σε άλλες ομάδες, όπως αυτές των φωσφορικών οξέων και των τερπενίων. Πιο αναλυτικά, από τους 136 ταυτοποιημένους μεταβολίτες, το 43 % ανήκει στην ομάδα των υδατανθράκων, το 21 % στην ομάδα των καρβοξυλικών οξέων, το 13 % στην ομάδα των αμινοξέων, το 12 % στην ομάδα των λιπαρών οξέων, το 2 % στην ομάδα των φωσφορικών οξέων, το 2 % επίσης στην ομάδα των τερπενίων και το υπόλοιπο 7 % σε άλλες χημικές ομάδες (Εικόνα 3.1).



**Εικόνα 3.1** Το ποσοστό των ταυτοποιημένων (πλήρως ή μερικώς) μεταβολιτών ανά χημική ομάδα.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση, η οποία κατέδειξε των έλλειψη ακραίων τιμών (outliers) καθώς και την υψηλή επαναληψιμότητα των βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων καθώς και των πρωτοκόλλων βιοπληροφορικής ανάλυσης. Η ανακάλυψη των τάσεων ανάμεσα στις επεμβάσεις βασίστηκε στην εφαρμογή OPLS-DA (Εικόνα 3.2). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατέδειξαν τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των βιολογικών επαναλήψεων των φυτών-μαρτύρων, τόσο της ανθεκτικής όσο και της ευαίσθητης ποικιλίας, από τα καταπονημένα φυτά, υποδεικνύοντας τη σημαντική επίδραση της υδατικής καταπόνησης στο μεταβολισμό των φυτών σόγιας. Ταυτόχρονα, αναδείχθηκε η σημαντική διαφοροποίηση των βιολογικών επαναλήψεων των φυτών-μαρτύρων μεταξύ των δύο ποικιλιών, ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε υψηλή ομοιότητα μεταξύ των καταπονημένων φυτών των δύο ποικιλιών.



**Εικόνα 3.2** OPLS-DA score plot (pairwise analysis) για το διαχωρισμό των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ των φυτών-μαρτύρων (Control) και των καταπονημένων φυτών (Drought) της ευαίσθητης και της ανθεκτικής ποικιλίας. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T<sup>2</sup> σε διάστημα εμπιστοσύνης 95.0% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Component).

### 3.2 Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στο μεταβολισμό της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας σόγιας

Με στόχο την κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας της σόγιας έναντι της υδατικής καταπόνησης αναλύθηκε συγκριτικά το μεταβολικό προφίλ των καταπονημένων και των φυτών-μαρτύρων, τόσο στην ανθεκτική όσο και στην ευαίσθητη ποικιλία, χρησιμοποιώντας ως διακύμανση τιμή Coefficient  $\geq 2.0$  και  $\leq -2.0$  (Πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1** Μεταβολίτες που παρουσίασαν σημαντική μεταβολή μεταξύ των καταπονημένων και των φυτών-μαρτύρων στην ανθεκτική και στην ευαίσθητη ποικιλία (διακύμανση τιμή coefficient  $\geq 2.0$  και  $\leq -2.0$ ).

Μεταβολίτης	Ανθεκτική	Ευαίσθητη
	Control vs Καταπόνηση	Control vs Καταπόνηση
<b>Υδατάνθρακες</b>		
D-φρουκτόζη	-4,9*	-10,7*
D-γλυκόζη	-3,3*	-11,4*
α,α-τρεχαλόζη	29,0*	10,5*
σουκρόζη	2,3*	4,4*
γλυκερόλη	1,8	5,8*
3-φωσφορική γλυκερόλη	-1,2	3,1*
μυο-ινοσιτόλη	4,1*	7,9*
σιλιτόλη	-10,8*	0,5
σορβιτόλη	-2,6*	-0,2
2-O-γλυκερολ-d γαλακτοπυρανοσίδη	0,2	7,3*
<b>Καρβοξυλικά οξέα</b>		
μαλονικό οξύ	-0,9	10,8*
σουσινικό οξύ	0,2	7,6*
2-κετογλουταρικό οξύ	-0,5	2,4*
φουμαρικό οξύ	2,1*	-1,2
μαλικό οξύ	-3,9*	7,2*
σικιμικό οξύ	2,2*	1,8
<b>Αμινοξέα</b>		
GABA	1,9	2,8*
L-ασπαράγινη	2,5*	4,3*
L-σερίνη	-0,7	-3,5*
L-τρυπτοφάνη	1,6	3,3*

<b>Φωσφορικά οξέα</b>		
φωσφορικό άλας	-0,8	6,3*
<b>Λιπαρά οξέα</b>		
παλμιτικό οξύ	3,0*	4,7*
α-λινολενικό οξύ	1,1	3,4*
στεατικό οξύ	1,8	8,1*
<b>Τερπένια</b>		
Phytol	2,4*	1,8

Σημαντικοί (\*) θεωρήθηκαν οι μεταβολίτες οι οποίοι εμφάνισαν τιμή *Coefficient*  $\geq 2.0$  και  $\leq -2.0$ .

Ακολουθώς, παρατίθενται οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες ανά χημική ομάδα, με ιδιαίτερη αναφορά στους μεταβολίτες των οποίων η συσσώρευση μεταβλήθηκε σημαντικά υπό συνθήκες καταπόνησης.

#### Υδατάνθρακες

Στη χημική ομάδα των υδατανθράκων, συνολικά ανιχνεύτηκαν 59 μεταβολίτες, εκ των οποίων οι 20 ταυτοποιήθηκαν πλήρως. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σημαντική ήταν η επίδραση της καταπόνησης στο επίπεδο συσσώρευσης 10 μεταβολιτών και συγκεκριμένα των D-φρουκτόζη, D-γλυκόζη, α,α-τρεχαλόζη, σουκρόζη, γλυκερόλη, 3-φωσφορική γλυκερόλη, μυο-ινοσιτόλη, σιλιτόλη, σορβιτόλη και 2-O-γλυκερολ-d γαλακτοπυρανοσίδη.

Υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, οι μεταβολίτες D-φρουκτόζη, D-γλυκόζη και σορβιτόλη εμφάνισαν αυξητική τάση τόσο στην ανθεκτική όσο και στην ευαίσθητη ποικιλία. Ειδικότερα, η D-φρουκτόζη και η D-γλυκόζη παρουσίασαν μεγαλύτερη αύξηση στην ευαίσθητη ποικιλία ενώ η σορβιτόλη εμφάνισε αντίστροφη συμπεριφορά, με σημαντικότερη την αύξηση στην ανθεκτική ποικιλία. Αντίθετα, η α,α-τρεχαλόζη, η σουκρόζη, η γλυκερόλη, η μυο-ινοσιτόλη και η 2-O-γλυκερολ-d γαλακτοπυρανοσίδη παρουσίασαν μειωτική τάση υπό συνθήκες καταπόνησης και στις δύο υπό μελέτη ποικιλίες. Πιο συγκεκριμένα, η συσσώρευση της α,α-τρεχαλόζης, της σουκρόζης και της μυο-ινοσιτόλης εμφάνισε σημαντική μείωση και στις δύο ποικιλίες ενώ η μείωση στη συσσώρευση της γλυκερόλης και της 2-O-γλυκερολ-d γαλακτοπυρανοσίδη υπήρξε σημαντική μόνο στην ευαίσθητη ποικιλία.

Τέλος, αξιοσημείωτη είναι η διαφορετική απόκριση της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας ως προς τη συσσώρευση των μεταβολιτών 3-φωσφορική γλυκερόλη και σιλιτόλη, τα οποία παρουσίασαν αυξητική τάση στην ανθεκτική και μειωτική τάση στην ευαίσθητη ποικιλία. Σημαντική ωστόσο ήταν η μείωση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης στην ευαίσθητη ποικιλία και η αύξηση της σιλιτόλης στην ανθεκτική ποικιλία (Εικόνα 3.3Α).

### Καρβοξυλικά οξέα

Αναφορικά με τη χημική ομάδα των καρβοξυλικών οξέων, ανιχνεύθηκαν συνολικά 29 μεταβολίτες, με πλήρη ταυτοποίηση σε 22 συστατικά εκ των οποίων τα 6 (μαλονικό οξύ, σουκινικό οξύ, 2-κετογλουταρικό οξύ, φουμαρικό οξύ, μαλικό οξύ, σικιμικό οξύ) εμφάνισαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους υπό συνθήκες καταπόνησης.

Πιο αναλυτικά, τόσο η συσσώρευση του σουκινικού όσο και του σικιμικού οξέος παρουσίασαν μειωτική τάση και στις δύο ποικιλίες, με μεγαλύτερη ωστόσο μείωση να σημειώνεται στη συσσώρευση του σουκινικού οξέος στην ευαίσθητη ποικιλία. Αντιθέτως, το μαλονικό οξύ, το 2-κετογλουταρικό οξύ και το μαλικό οξύ εμφάνισαν αυξητική τάση στην ανθεκτική ποικιλία και μειωτική τάση στην ευαίσθητη ποικιλία, υποδεικνύοντας τη διαφορετική απόκρισή τους στην καταπόνηση ξηρασίας.

Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο ότι η μείωση της συσσώρευσης του μαλονικού οξέος και του μαλικού οξέος στην ευαίσθητη ποικιλία υπήρξε σημαντική. Αντίθετα, το φουμαρικό οξύ παρουσίασε μειωμένη και αυξημένη συσσώρευση στην ανθεκτική και ευαίσθητη ποικιλία, αντίστοιχα (Εικόνα 3.3Β).

### Αμινοξέα

Στην χημική ομάδα των αμινοξέων ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν πλήρως 18 αμινοξέα. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη σημαντική επίδραση της καταπόνησης στη συσσώρευση των μεταβολιτών GABA, L-ασπαραγίνη, L-σερίνη και L-τρυπτοφάνη.

Ειδικότερα, η συσσώρευση των μεταβολιτών GABA, L-ασπαραγίνη και L-τρυπτοφάνη σημείωσαν μείωση υπό συνθήκες καταπόνησης τόσο στην ανθεκτική ποικιλία όσο και στην ευαίσθητη ποικιλία. Αναλυτικότερα, η συσσώρευση των ανωτέρω συστατικών μειώθηκε σημαντικά στην ευαίσθητη ποικιλία, ενώ η συσσώρευση της L-ασπαραγίνης σημείωσε σημαντική μείωση και στις δύο ποικιλίες. Αντίθετα, αυξημένη συσσώρευση

καταγράφηκε για την L-σερίνη και στις δύο ποικιλίες, με σημαντική ωστόσο την αύξηση στην ευαίσθητη ποικιλία (Εικόνα 3.3Γ).

#### Λιπαρά οξέα

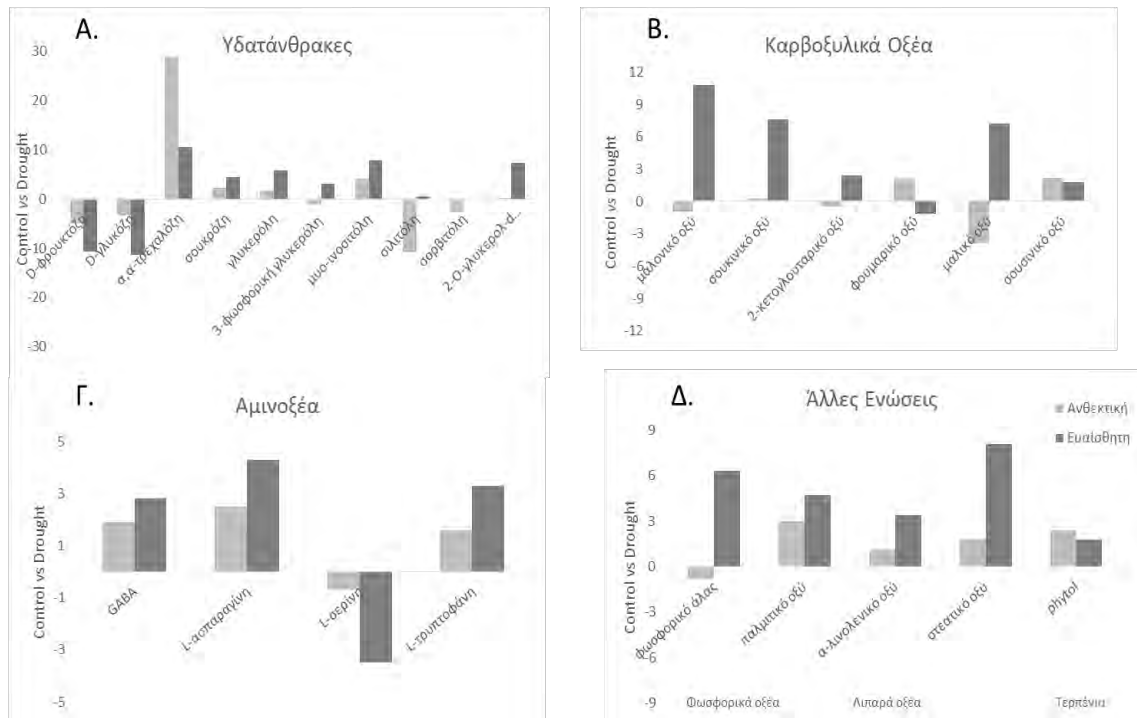
Στη χημική ομάδα των λιπαρών οξέων ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν πλήρως 16 μεταβολικά συστατικά με σημαντική τη συσσώρευση 3 εξ αυτών (παλμιτικό οξύ, α-λινολενικό οξύ, στεατικό οξύ).

Το σύνολο των λιπαρών οξέων, παλμιτικό οξύ, α-λινολενικό οξύ και στεατικό οξύ, παρουσίασε μείωση στην συσσώρευσή τους υπό συνθήκες καταπόνησης τόσο στην ανθεκτική ποικιλία όσο και στην ευαίσθητη ποικιλία. Σημαντική ωστόσο μείωση σημείωσαν και τα 3 συστατικά στην ευαίσθητη ποικιλία, ενώ στην ανθεκτική ποικιλία σημαντική ήταν μόνο η μείωση του παλμιτικού οξέος (Εικόνα 3.3Δ).

#### Φωσφορικά οξέα - Τερπένια

Στη χημική ομάδα των φωσφορικών οξέων, ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν πλήρως 3 μεταβολίτες, εκ των οποίων το φωσφορικό άλας παρουσίασε σημαντική διαφορική απόκριση στη συσσώρευσή του υπό συνθήκες καταπόνησης. Το φωσφορικό άλας αυξήθηκε στην ανθεκτική και μειώθηκε σημαντικά στην ευαίσθητη ποικιλία.

Τέλος, στη χημική ομάδα των τερπενίων ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν πλήρως 2 μεταβολικά συστατικά. Ειδικότερα, η συσσώρευση του μεταβολίτη phytoI παρουσίασε μείωση υπό την επίδραση της καταπόνησης, η οποία ωστόσο υπήρξε σημαντική στην ανθεκτική ποικιλία (Εικόνα 3.3Δ).



**Εικόνα 3.3** Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στη συσσώρευση μεταβολιτών που ανήκουν στις χημικές ομάδες των Α. υδατανθράκων, Β. καρβοξυλικών οξέων, Γ. αμινοξέων και Δ. φωσφορικών οξέων, λιπαρών οξέων και τερπενίων στην ανθεκτική και στην ευαίσθητη ποικιλία. Απεικονίζονται οι μεταβολίτες των οποίων η συσσώρευση διέφερε σημαντικά μεταξύ των καταπονημένων και των φυτών-μαρτύρων.

Περαιτέρω, κατασκευάστηκε μεταβολικός χάρτης ο οποίος απεικονίζει την τάση αύξησης ή μείωσης των σημαντικών μεταβολιτών για τις υπό μελέτη ποικιλίες σόγιας (Εικόνα 3.4). Σημειώνεται ότι οι απόλυτες τιμές είναι ανάλογες τις βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό (Aliferis et al., 2014).



**Εικόνα 3.4** Μεταβολικός χάρτης (metabolic map) των μεταβολιτών που διέφεραν σημαντικά μεταξύ των καταπονημένων και των φυτών-μαρτύρων της ευαίσθητης και της ανθεκτικής ποικιλίας σόγιας, χρησιμοποιώντας ως διακύμανση για τους μεταβολίτες τιμή Coefficient  $\geq 2.0$  και  $\leq -2.0$  (<http://www.heatmapper.ca/>).

### 3.3 Συγκριτικές μεταβολικές διαφορές μεταξύ της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας σόγιας υπό κανονικές και υπό συνθήκες καταπόνησης

Με σκοπό την ανακάλυψη των μεταβολιτών που διέφεραν σημαντικά μεταξύ της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας τόσο υπό κανονικές όσο και υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μεταβολικών προφίλ των δύο ποικιλιών, χρησιμοποιώντας ως διακύμανση τιμή Coefficient  $\geq 2.0$  και  $\leq -2.0$ .

Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω συγκρίσεων, καταγράφηκε σημαντική μεταβολή στη συσσώρευση 13 μεταβολικών συστατικών που ανήκουν στη χημική ομάδα των υδατανθράκων, 8 μεταβολιτών στην ομάδα των καρβοξυλικών οξέων, 10



μεταβολιτών στην ομάδα των αμινοξέων και 4 μεταβολιτών στις ομάδες των φωσφορικών οξέων, των λιπαρών οξέων και των τερπενίων (Πίνακας 3.2).

**Πίνακας 3.2** Μεταβολίτες που παρουσίασαν σημαντική μεταβολή μεταξύ της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας στα καταπονημένα και στα φυτά-μάρτυρες (διακύμανση τιμή coefficient  $\geq 2.0$  και  $\leq -2.0$ ).

Μεταβολίτης	Control	Υδατική καταπόνηση
	Ευαίσθητη vs Ανθεκτική	Ευαίσθητη vs Ανθεκτική
<b>Υδατάνθρακες</b>		
D-φρουκτόζη	-7,8*	-11,8*
D-γλυκόζη	-3,6*	16,7*
α,α-τρεχαλόζη	-31,1*	39,4*
σουκρόζη	3,2*	-1,2
γλυκερόλη	7,3*	-3,4*
3-φωσφορική γλυκερόλη	2,7*	1,9
μυο-ινοσιτόλη	8,5*	5,7*
σιλιτόλη	10,4*	-3,2*
σορβιτόλη	5,7*	2,4*
mυο-ινοσιτόλη	0,2	-3,4*
ξυλιτόλη	2,2*	-1,0
2-O-γλυκερολ-d γαλακτοπυρανοσίδη	5,1*	-9,5*
δαδεφελουλόζη	-2,0*	-3,1*
<b>Καρβοξυλικά οξέα</b>		
μαλονικό οξύ	16,6*	2,9*
σουσινικό οξύ	5,1*	-10,0*
φουμαρικό οξύ	-3,5*	0,8
μαλικό οξύ	-5,1*	-26,3*
γλυκερικό οξύ	0,2	-2,3*
σικιμικό οξύ	1,8	5,6*
θρεονικό οξύ-1,4-lactone	-0,7	-3,0*
α-κετογλουταρικό	-5,1*	-7,1*
<b>Αμινοξέα</b>		
L-ασπαραγίνη	2,7*	1,4
ασπαρτικό οξύ	0,4	2,0*
L-σερίνη	-0,8	6,5*
L-τρυπτοφάνη	0,1	-2,9*
L-φαινυλαλανίνη	1,0	-3,1*
L-τυροσίνη	-1,5	-2,2*

b-αλανίνη	-0,1	-3,4*
L-ισολευκίνη	-0,5	-2,4*
L-λευκίνη	-0,4	-2,9*
πυρογλουταμικό οξύ	0,1	4,4*
<b>Φωσφορικά οξέα</b>		
φωσφορικό άλας	7,3*	-5,6*
<b>Λιπαρά οξέα</b>		
α-λινολενικό οξύ	3,5*	-0,4
στεαρικό οξύ	8,8*	-1,4
<b>Τερπένια</b>		
Phytol	-2,6*	-1,2

Σημαντικοί (\*) θεωρήθηκαν οι μεταβολίτες οι οποίοι εμφάνισαν τιμή *Coefficient*  $\geq 2.0$  και  $\leq -2.0$ .

### Υδατάνθρακες

Στην ομάδα των υδατανθράκων, σημαντικές διαφορές μεταξύ της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας σημειώθηκαν στη συσσώρευση των συστατικών D-φρουκτόζη, D-γλυκόζη, α,α-τρεχαλόζη, σουκρόζη, γλυκερόλη, 3-φωσφορική γλυκερόλη, μυο-ινοσιτόλη, σιλιτόλη, σορβιτόλη, μικο-ινοσιτόλη, ξυλιτόλη, 2-O-γλυκερολ-d γαλακτοπυρανοσίδη και δαδεφελουλόζη (Εικόνα 3.5A).

### Καρβοξυλικά οξέα

Στην ομάδα των καρβοξυλικών οξέων, σημαντικά διέφερε η συσσώρευση των συστατικών μαλονικό οξύ, σουσινικό οξύ, φουμαρικό οξύ, μαλικό οξύ, γλυκερικό οξύ, σικιμικό οξύ, θρεονικό οξύ-1,4-lactone και α-κετογλουταρικό (Εικόνα 3.5B).

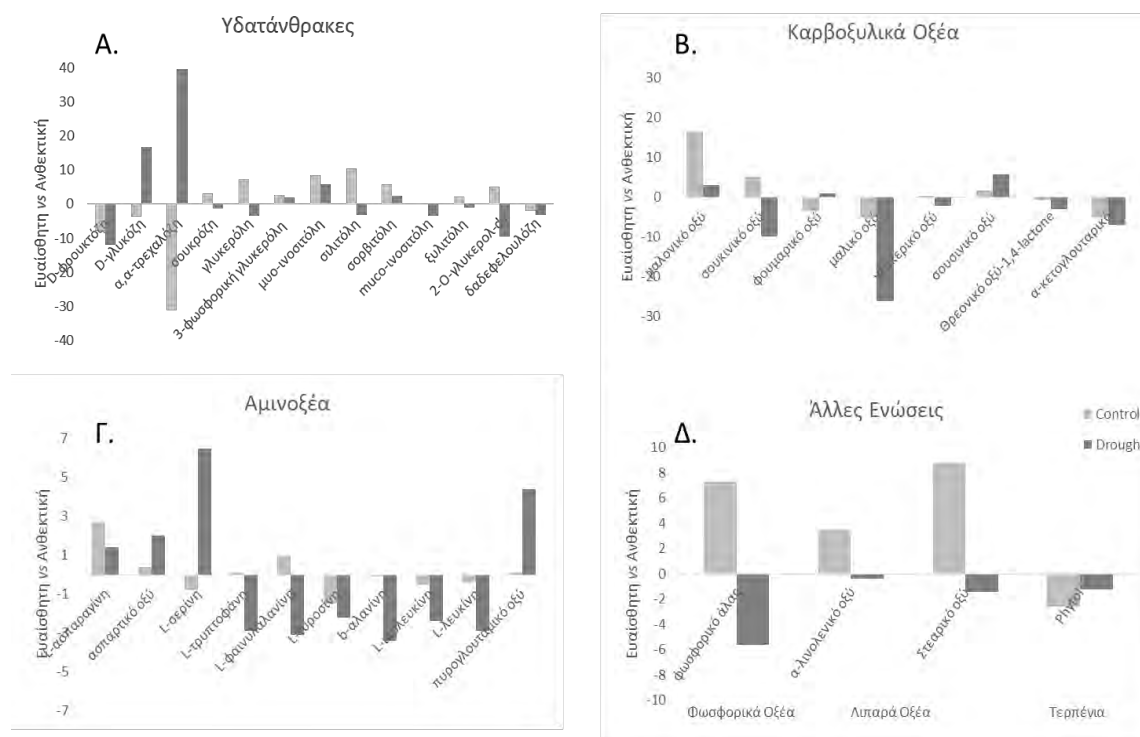
### Αμινοξέα

Σημαντική διαφορά σε επίπεδο ποικιλίας καταγράφηκε στα αμινοξέα L-ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ, L-σερίνη, L-τρυπτοφάνη, L-φαινυλαλανίνη, L-τυροσίνη, b-αλανίνη, L-ισολευκίνη, L-λευκίνη και πυρογλουταμικό οξύ (Εικόνα 3.5Γ).

### Φωσφορικά οξέα - Λιπαρά οξέα - Τερπένια

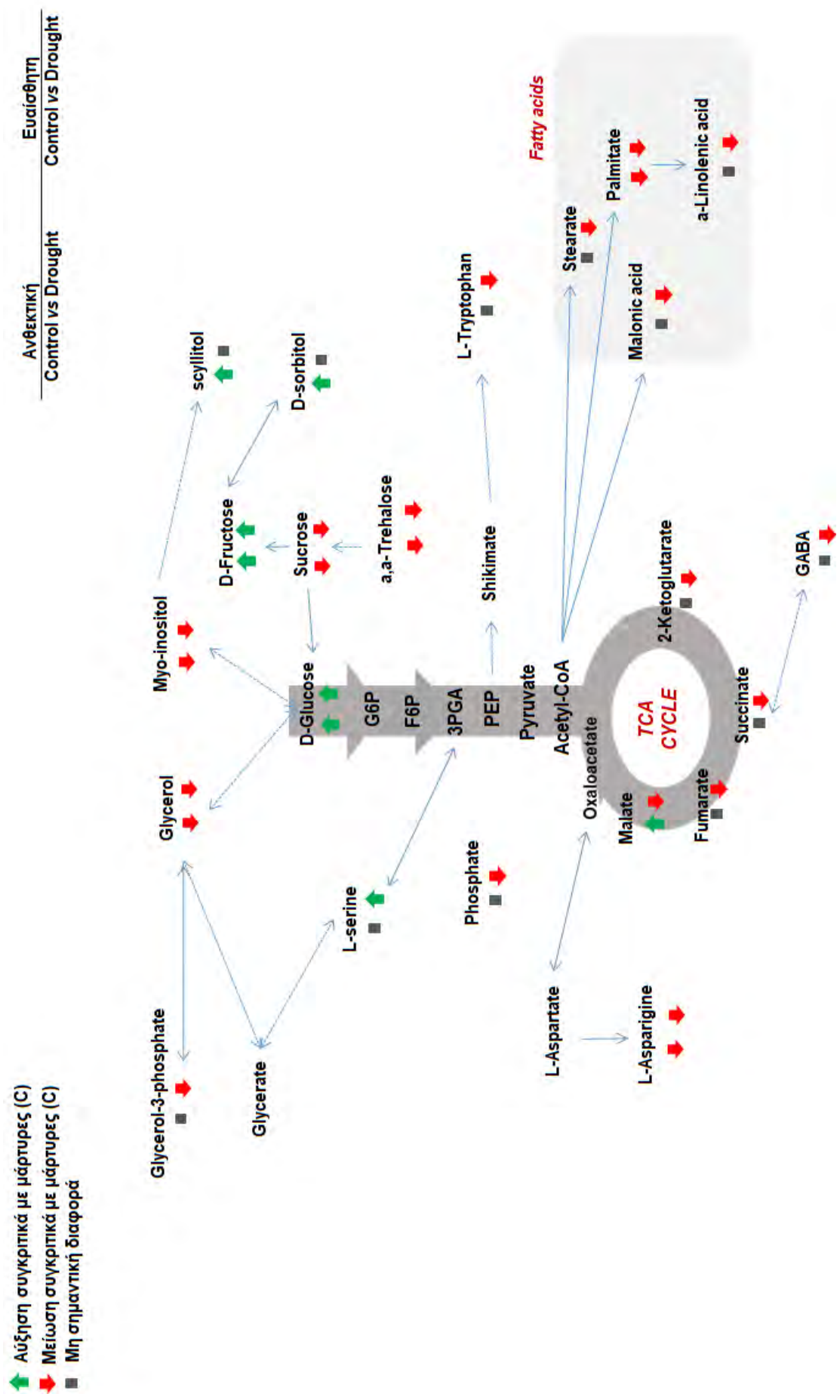
Σημαντικές διαφορές μεταξύ της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας σημειώθηκαν στη συσσώρευση συστατικών που ανήκουν στις ομάδες των φωσφορικών οξέων, λιπαρών οξέων και τερπενίων. Ειδικότερα διαφορετική απόκριση των ποικιλιών

παρατηρήθηκε για τα συστατικά φωσφορικό άλας, α-λινολενικό οξύ, στεαρικό οξύ και phytol (Εικόνα 3.5Δ).



**Εικόνα 3.5** Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στη συσσώρευση μεταβολιτών που ανήκουν στις χημικές ομάδες των Α. υδατανθράκων, Β. καρβοξυλικών οξέων, Γ. αμινοξέων και Δ. φωσφορικών οξέων, λιπαρών οξέων και τερπενίων υπό κανονικές και συνθήκες καταπονής. Απεικονίζονται οι μεταβολίτες των οποίων η συσσώρευση διέφερε σημαντικά μεταξύ των φυτών της ευαίσθητης και της ανθεκτικής ποικιλίας.

Τέλος, κατασκευάστηκε μεταβολικός χάρτης, όπου απεικονίζονται οι συγκρίσεις στο μεταβολισμό των καταπονημένων φυτών, συγκριτικά με τους μάρτυρες, για την ανθεκτική και ευαίσθητη ποικιλία σόγιας. Τα μεταβολικά συστατικά που εμφάνισαν αυξημένη συσσώρευση, συγκριτικά με τους μάρτυρες, απεικονίζονται με πράσινο ανοδικό βέλος, ενώ τα συστατικά που σημείωσαν αντίστοιχη μειωμένη συσσώρευση απεικονίζονται με κόκκινο καθοδικό βέλος. Με γκρι χρωματισμό, αποδίδονται οι μεταβολίτες που παρουσίασαν μη σημαντική μεταβολή σε επίπεδο μεταχείρισης. (Εικόνα 3.6).



**Εικόνα 3.6** Μεταβολικό δίκτυο όπου απεικονίζεται η επίδραση της υδατικής καταπόνησης στο μεταβολισμό ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας σόγιας κατά το αναπτυξιακό στάδιο V6. Στο χάρτη απεικονίζεται για κάθε συστατικό η μεταβολή της συσσώρευσής του, σε επίπεδο μεταχείρισης, για την ανθεκτική (αριστερά) και ευαίσθητη (δεξιά). Η αυξημένη συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης, συγκριτικά με τους μάρτυρες, απεικονίζονται με πράσινο ανοδικό βέλος, ενώ η αντίστοιχη μειωμένη συσσώρευση αποδίδεται με κόκκινο καθοδικό βέλος. Με γκρι χρωματισμό, αποδίδονται οι μεταβολίτες που παρουσίασαν μη σημαντική μεταβολή σε επίπεδο μεταχείρισης. Με συνεχή γραμμή αποτυπώνονται οι μεταβολίτες που συνδέονται άμεσα μεταξύ τους, ενώ με διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται η σύνδεση αυτών που συνδέονται έμμεσα σε κοινό βιοχημικό μονοπάτι.

## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Οι αβιοτικές καταπονήσεις συγκαταλέγονται ανάμεσα στους πλέον σοβαρούς περιοριστικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των καλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο, προκαλώντας απώλειες απόδοσης που συχνά ξεπερνούν το 50 % του δυναμικού παραγωγικότητας (Bray et al., 2000). Βάσει των αλλαγών λαμβάνουν χώρα σε, φυσιολογικό, μορφολογικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο, η ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας θεωρείται ως μία από πλέον επιζήμιες αβιοτικές καταπονήσεις σε παγκόσμιο επίπεδο.

Η σόγια συγκαταλέγεται στις πλέον απαιτητικές σε εισροές καλλιέργειες, με την εξασφάλιση του μέγιστου παραγωγικού δυναμικού να επιτυγχάνεται υπό συνθήκες επικράτησης άριστων εδαφοκλιματικών συνθηκών. Η έλλειψη εδαφικής υγρασίας και η υψηλή αλατότητα είναι οι σημαντικότερες αβιοτικές καταπονήσεις που επηρεάζουν δυσμενώς την ανάπτυξη της καλλιέργειας καθώς προκαλούν διαταραχή κυρίως στην ιοντική και οσμωτική ισορροπία των κυττάρων (Shilpi and Narendra, 2005). Το κρίσιμότερο στάδιο της σόγιας στην υδατική καταπόνηση είναι η άνθηση, όπου σημειώνεται δραστηκότητα μείωση της απόδοσης, που μπορεί να φτάσει και το 40% του παραγωγικού δυναμικού, ενώ παράλληλα συντελείται και ποιοτική υποβάθμιση του σπόρου.

Υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, η πλειονότητα των καλλιεργούμενων ποικιλιών σόγιας αδυνατούν να διατηρήσουν την υψηλή παραγωγικότητά τους. Δεδομένων των καταστρεπτικών επιπτώσεων της ξηρασίας στη σόγια, καταβάλλονται συνεχείς προσπάθειες για τη βελτίωση των γνωρισμάτων ανθεκτικότητας, με την έμφαση να δίνεται στη διατήρηση του παραγωγικού δυναμικού υπό συνθήκες υδατικής ανεπάρκειας (Ku et al. 2013; Narayanan and Fallen 2019). Οι συμβατικές βελτιωτικές προσεγγίσεις εστιάζουν στο συνδυασμό επιθυμητών γνωρισμάτων, μέσω επαναλαμβανόμενων διαδικασιών διασταύρωσης και επιλογής, ενώ οι επιλογές συνήθως βασίζονται σε εκτίμηση του δυναμικού απόδοσης σε περιβάλλοντα καταπόνησης (Devi et al. 2014). Η επίτευξη αυτού του βελτιωτικού στόχου ωστόσο, θέτει σημαντικές προκλήσεις λόγω του σύνθετου γενετικού υπόβαθρου των γνωρισμάτων ανθεκτικότητας, σε συνδυασμό με τις σημαντικές  $G \times E$  αλληλεπιδράσεις, καθώς και τις πρακτικές δυσκολίες που ενέχει η επίτευξη

ομοιόμορφες συνθήκες στα περιβάλλοντα επιλογής (Shaheen and Hood-Nowotny 2005). Επιπρόσθετα, η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα βέλτιστων μεθόδων αξιολόγησης του μεγάλου αριθμού γονοτύπων που απαιτείται για τη βελτίωση γνωρισμάτων με σύνθετη γενετική βάση (Zeigler and Puckridge 1995).

Τις τελευταίες δεκαετίες, η πρόοδος και τα επιτεύγματα στην επιστήμη της μοριακής βιολογίας, συμπεριλαμβανομένων των "ομικών" τεχνολογιών, έχουν συμβάλει καθοριστικά στην εις βάθος κατανόηση των σύνθετων βιοχημικών φαινομένων και παρέχουν τη δυνατότητα ουσιαστικής αναβάθμισης των σχετικών βελτιωτικών διαδικασιών. Ιδιαίτερα, η μεταβολομική έχει συνδράμει καθοριστικά στη γνώση σχετικά με το βιολογικό ρόλο των μεταβολικών συστατικών και τη λειτουργία τους σε βιοχημικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη μεταβολική απόκριση των φυτών υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (Fiehn et al., 2000; Fiehn 2001, 2002; Bino et al., 2004; Jorge and António, 2017). Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τις πρακτικές εφαρμογές της μεταβολομικής στη βελτίωση των φυτών, και ειδικότερα στον προσδιορισμό των μεταβολιτών που σχετίζονται με την άμυνα έναντι καταπονήσεων καθώς και στην αξιοποίηση της γνώσης αυτής για το σχεδιασμό δεικτών που μπορεί να αξιοποιηθούν στις βελτιωτικές διαδικασίες που στοχεύουν στη βελτίωση γνωρισμάτων ανθεκτικότητας (metabolomics-assisted breeding) (Shulaev et al., 2008; Fernie and Schauer, 2009; Arbona et al., 2013).

Προς την κατεύθυνση αυτή, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό του μεταβολικού προφίλ δύο ποικιλιών σόγιας -ανθεκτικής και ευαίσθητης- υπό κανονικές συνθήκες και υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Η καταπόνηση πραγματοποιήθηκε κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο, όπου > 50 % των φυτών βρισκόταν στο στάδιο πριν την άνθηση, το οποίο θεωρείται ως το πλέον κρίσιμο στάδιο στην έλλειψη εδαφικής υγρασίας στη σόγια (Cho and Yamakawa, 2006). Ο προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ έγινε με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC – MS).

Το μεγαλύτερο ποσοστό των υπό μελέτη μεταβολικών προφίλ αποτελούνταν από μεταβολίτες που ανήκουν στις χημικές ομάδες των υδατανθράκων, των καρβοξυλικών οξέων, των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων ενώ οι υπόλοιποι συγκαταλέγονται σε άλλες χημικές ομάδες όπως αυτές των φωσφορικών οξέων και των τερπενίων.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ κατέδειξαν τη σημαντική επίδραση της καταπόνησης στα συστατικά που ανήκουν στη χημική ομάδα των υδατανθράκων, με σημαντικές μεταβολές να σημειώνονται στη συσσώρευση των μεταβολιτών D-φρουκτόζη, D-γλυκόζη, α,α-τρεχαλόζη, σουκρόζη, γλυκερόλη, 3-φωσφορική γλυκερόλη, μυο-ινοσιτόλη, σιλιτόλη, σορβιτόλη και 2-O-γλυκερολ-d γαλακτοπυρανοσίδη. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με το γνωστό ρόλο των υδατανθράκων στη ρύθμιση της φωτοσύνθεσης καθώς και στην προσαρμογή των φυτών υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένου της ξηρασίας (Ramel et al., 2009). Οι υδατάνθρακες χρησιμοποιούνται είτε ως πηγή ενέργειας, είτε ως αρχικά δομικά μόρια για τη σύνθεση πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών. Σημαντικές ομάδες αποτελούν οι εξόζες, οι οποίες είναι μονοσακχαρίτες με 6 άτομα άνθρακα (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννόζη), οι δισακχαρίτες (μαλτόζη, σουκρόζη) (Rodrigues et al., 2006) καθώς και οι πολυόλες.

Οδούς καταβολισμού των υδατανθράκων αποτελούν η γλυκόλυση, όπου η γλυκόζη μετατρέπεται σε pyruvate με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας σε μορφή ATP και NADPH, η μετατροπή του pyruvate σε acetyl-coA στα μιτοχόνδρια και ο κύκλος τρικαρβονικών οξέων (κύκλος Krebs), κατά τον οποίο οξειδώνεται η πλειονότητα των υδατανθράκων και παράγονται οι πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση αμινοξέων (Compagno et al., 2014). Ο αναβολισμός των υδατανθράκων περιλαμβάνει τη γλυκονεογένεση, είτε μέσω του κύκλου Krebs είτε μέσω του εναλλακτικού glyoxylate cycle όπου συντίθεται γλυκόζη από pyruvate, το μονοπάτι βιοσύνθεσης γλυκογόνου (glycogen) και το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (pentose phosphate pathway, PPP) όπου παράγονται μόρια NADH και δημιουργούνται πολυπλοκότερα μόρια σακχάρων (Rodrigues et al., 2006, Compagno et al., 2014).

Στην παρούσα μελέτη, οι πλέον σημαντικές μεταβολές σημειώθηκαν στα σάκχαρα D-φρουκτόζη, D-γλυκόζη και α-α τρεχαλόζη καθώς και στα συστατικά σιλιτόλη και μυο-ινοσιτόλη, που ανήκουν στην ομάδα των πολυολών. Ειδικότερα, η καταπόνηση οδήγησε σε αυξημένη συσσώρευση D-φρουκτόζης και D-γλυκόζης και στις δύο ποικιλίες, με μεγαλύτερη ωστόσο την αύξηση στην ευαίσθητη ποικιλία. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα ερευνών όπου αναφέρεται ότι διαλυτά σάκχαρα, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, συσσωρεύονται ως απόκριση στο στρες (Iordachescu et al., 2008), ενώ τους αποδίδεται ρόλος οσμωλυτών που συμβάλουν στη διατήρηση της πίεσης σπαργής (Kaplan and Guy, 2004).



Αναφορικά με την τρεχαλόζη, εμφάνισε μειωμένη συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης και στις δύο ποικιλίες, γεγονός που αντιτίθεται με το ρόλο της τρεχαλόζης, ο οποίος σχετίζεται με την αποθήκευση υδατανθράκων στα ευκαρυωτικά κύτταρα, με την αντοχή και λειτουργικότητα των κυτταρικών μεμβρανών υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (Iturriaga et al., 2009, Aliferis and Jabaji, 2010) και προστασία των κυττάρων από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Elbein et al., 2003, Eleutherio et al., 2015). Επιπλέον η αύξηση της συγκέντρωσης της τρεχαλόζης προστατεύει τα κύτταρα από ακραίες θερμοκρασίες (Elbein et al., 2003).

Στην ομάδα των πολυολών, σημαντική ήταν η μεταβολή στη συσσώρευση της μυο-ινοσιτόλης και σιλιτόλης, με τη πρώτη να παρουσιάζει μείωση και στις δύο ποικιλίες ενώ η δεύτερη εμφάνισε σημαντική αύξηση στην ανθεκτική ποικιλία και μικρή μείωση στην ευαίσθητη ποικιλία. Σύμφωνα με σχετικές έρευνες, στις πολυόλες αποδίδεται ρόλος ωσμορυθμιστικών μορίων που συμβάλουν στη διατήρηση της μεταβολικής δραστηριότητας υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένου της υδατικής (Patonnier et al., 1999; Rizhsky et al., 2004).

Τα αμινοξέα αποτελούν δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών και συμμετέχουν στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών χωρίς την χρήση ριβοσωμάτων (Nonribosomal peptide synthesis, NRPS) (Bayram et al., 2016) και στην ανάπτυξη του οργανισμού (cell growth) (Kim and Kim, 2017). Παρά το γεγονός ότι συνεχώς αυξανόμενος αριθμός μελετών υπογραμμίζει τον καταλυτικό ρόλο των αμινοξέων, και την αυξημένη συσσώρευσή τους υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (Chaves et al., 2003; Chaves and Oliveira, 2004; Kaplan et al. 2004; Lugan et al. 2010), τα δεδομένα της μεταβολομικής κατέδειξαν σημαντική διαφορά για τα συστατικά GABA, L-ασπαραγίνη, και L-τρυπτοφάνη, η οποία ωστόσο αφορούσε σε μειωμένη συσσώρευσή τους στα καταπονημένα φυτά και των δύο ποικιλιών. Εξαίρεση σε αυτή την τάση, αποτέλεσε η L-σερίνη, η οποία σημείωσε σημαντική αύξηση στα καταπονημένα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε αντίθεση με αποτελέσματα άλλων ερευνών που αναφέρουν ότι η οφειλόμενη στο υδατικό στρες αυξημένη συσσώρευση αμινοξέων αποδίδεται είτε σε υδρόλυση πρωτεϊνών είτε στην προσπάθεια διατήρησης του ωσμωτικού δυναμικού των κυττάρων (Bayram et al., 2016). Ιδιαίτερα, για το GABA έχει αποδειχθεί η συνεισφορά του στη φυσιολογία των οργανισμών, μέσω της ρύθμισης του pH κατά την απόκριση των φυτών σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης και την ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών, είτε άμεσα είτε

έμμεσα δρώντας ως σηματοδοτικό μόριο (signaling molecule) (Kinnersley and Turano, 2000; Bach et al., 2009; Aliferis and Jabaji, 2012).

Μία άλλη χημική ομάδα που περιλαμβάνει συστατικά με ενεργό ρόλο υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης είναι αυτή των καρβοξυλικών οξέων, τα οποία συμβάλουν στον περιορισμό των ενεργών μορφών οξυγόνου καθώς και στη ωσμωτική προσαρμογή (Loutfy et al., 2012; Pavli et al., 2013). Η συγκριτική αξιολόγηση του μεταβολικού προφίλ των καταπονημένων φυτών και των μαρτύρων κατέδειξε σημαντικές διαφορές στη συσσώρευση των συστατικών μαλονικό οξύ, σουκινικό οξύ, 2-κετογλουταρικό οξύ, φουμαρικό οξύ, μαλικό οξύ, σικιμικό οξύ. Αξιοσημείωτη ωστόσο υπήρξε η μείωση του σουκινικού, του μαλονικού και του μαλικού οξέος στα καταπονημένα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας, με το τελευταίο να εμφανίζει αυξημένη συσσώρευση στα αντίστοιχα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας. Η παρατηρηθείσα μειωμένη συσσώρευση των συστατικών σουκινικό οξύ, μαλονικό οξύ και μαλικό οξύ βρίσκεται σε συμφωνία με αναφορές σχετικά με τη θετική συσχέτιση της αυξημένης συσσώρευσής τους με την εκδήλωση ανθεκτικότητας έναντι του υδατικού στρες (Levi *et al.* 2011; Merewitz *et al.* 2012).

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν ενδιαφέρουσες ενδείξεις σχετικά με τη διαφορική συσσώρευση συγκεκριμένων μεταβολικών συστατικών, τα οποία διέφεραν είτε σε επίπεδο μεταχείρισης είτε σε επίπεδο ποικιλίας. Τα συστατικά αυτά σαφώς χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης ως προς τη δυνατότητα αξιοποίησής τους ως λειτουργικούς δείκτες για τη διάκριση μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων γονοτύπων. Υπό το πρίσμα αυτό, διαφορετική απόκριση μεταξύ των καταπονημένων και των φυτών-μαρτύρων παρατηρήθηκε στους μεταβολίτες σιλιτόλη, μαλονικό οξύ, φουμαρικό οξύ, μαλικό οξύ, L-σερίνη και φωσφορικό άλας. Αντίστοιχα, οι ποικιλίες διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ως προς τη συσσώρευση ενός μεγάλου εύρους συστατικών που ανήκουν στις χημικές ομάδες των σακχάρων, καρβοξυλικών οξέων, αμινοξέων και άλλων ενώσεων. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι οι διαφορές που σημειώθηκαν δεν είναι αντιπροσωπευτικές των τάσεων που συνήθως απαντώνται σε γενετικό υλικό με διαπιστωμένη ευαισθησία και ανθεκτικότητα στην υδατική καταπόνηση, γεγονός που πιθανότατα αποδίδεται στο διαφορετικό τύπο ανάπτυξης των ποικιλιών. Ειδικότερα, η ευαίσθητη ποικιλία χαρακτηρίζεται ως καθορισμένης ανάπτυξης, ενώ αντίθετα η ανθεκτική αφορά σε ποικιλία συνεχούς ανάπτυξης. Η τελευταία, αν και καταχωρημένη ως ανθεκτική στην υδατική καταπόνηση, πιθανώς δε

διαθέτει γενετική ανθεκτικότητα *per se* αλλά η απόκρισή της υπό συνθήκες υδατικού στρες εν μέρει αποδίδεται σε ένα τύπο αποφυγής του στρες, καθώς το πλέον κρίσιμο για την καταπόνηση αναπαραγωγικό στάδιο συμπίπτει με τη συνέχιση της βλαστικής της ανάπτυξης. Αν και δεν προσφέρεται η δυνατότητα επαρκούς τεκμηρίωσης των μεταβολικών αποκρίσεων στο υπό μελέτη γενετικό υλικό, τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της μελέτης μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για την περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν τη γενετική ανθεκτικότητα της σόγιας στην υδατική καταπόνηση και την πιθανή εύρεση κατάλληλων δεικτών για την έμμεση επιλογή ανθεκτικών γονοτύπων. Είναι προφανές ότι η δυνατότητα αξιοποίησής τους για το σκοπό αυτό προϋποθέτει την επιβεβαίωση της αξιοπιστίας τους μέσω συσχέτισης των μεταβολικών δεδομένων με την εκατοστιαία απώλεια της απόδοσης του γενετικού υλικού υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης σε πειράματα αγρού.

## 5 Βιβλιογραφία

---

### ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acquaah, G. 2007. Principles of Plant Genetics and Breeding. Blackwell Publishing, 519-528.

Aliferis K. A., Chrysayi-Tokousbaliides M., 2011. Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives. *Metabolomics*, 7, 35-53.

Aliferis, K.A and Jabaji, S. 2011. Metabolomics—A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pesticide Biochemistry and physiology*, 100, 105-117.

Aliferis, K. A. and Jabaji, S. 2012. FT-ICR/MS and GC-EI/MS metabolomics networking unravels global potato sprout's responses to *Rhizoctonia solani* infection. *PLoS One*, 7, e42576.

Arbona V., Manzi M., Ollas C., Gomez-Cadenas A. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:4885–4911. doi: 10.3390/ijms14034885.

Bach, B., Meudec, E., Lepourte, J.-P., Rossignol, T., Blondin, B., Dequin, S. & Camarasa, C. 2009. New Insights into  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Catabolism: Evidence for  $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid and Polyhydroxybutyrate Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4231-4239.

Bino RJ, Hall RD, Fiehn O, Kopka J, Saito K, Draper J, et al. 2004. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in Plant Science*. 9:418-425. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.07.004

Board, J.E. and Tan, Q. 1995. Assimilatory capacity effects on soybean yield components and pod formation. *Crop Science* 35, 846–851.

Bohnert HJ and Jensen RG. 1996. Metabolic engineering for increased salt tolerance—The next step. *Aust J Plant Psysio* 23, 661-667.

Carlson, J.B. and N.R. Lersten. 1987. Reproductive morphology, 95-137. In J.R. Wilcox (ed) Soybeans: Improvement, Production and uses, 2nd ed. Agronomy Monograph. N 16.

Bayram, Ö., Feussner, K., Dumkou, M., Herrfurth, C., Feussner, I. & Braus, G. H. 2016. Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during light dependent *Aspergillus nidulans* development. Fungal Genetics and Biology, 87, 30-53.

Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses, in: W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 158–1249.

Carlson, J.B. and Lersten, N.R. 1987. Reproductive Morphology. In: J.R. Wilcox (Ed.) Soybeans: Improvement, Production, and Uses. Agronomy 16, 95-134.

Cartter, J.L., and E.E. Hartwig. 1963. 'The management of Soybean'. In The Soybean: Genet. Breed. Physiol, Nutr. Manag. Norman ed., 161-226.

Chaves MM, Pereira Js and Maroco J.2003. Understanding plant response to drought- from genes to the whole plant. Functional plant biology 30, 239-264.

Chaves MM, Oliveira MM. 2004 . Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: Prospects for water-saving agriculture. Journal of Experimental Botany.55:2365-2384. DOI: 10.1093/jxb/erh269

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CP, Osório ML, et al. 2002. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. Annals of Botany.89:907-916. DOI: 10.1093/aob/mcf105

Cho J.-W., Yamakawa T., 2006. Effects on Growth and Seed Yield of Small Seed Soybean Cultivars of Flooding Conditions in Paddy Field. Fac. Agr., Kyushu Univ., 51 (2), 189–193.

Compagno, C., Dasko, S. and Piskur, J. 2014. Introduction to Carbon Metabolism in Yeast. In: PIŠKUR, J. & COMPAGNO, C. (eds.) Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN 978-3-642-55013-3.

Cruz Maria Elena.2008. Drought stress and reactive oxygen species, Production, scavenging and signaling .Plant Signaling and behavior 3:3, 156-165.

Devi M J, Sinclair T R, Chen P, Carter T E. 2014. Evaluation of elite southern maturity soybean breeding lines for drought-tolerant traits. Agronomy Journal, 106, 1947-1954.

Dixit Ajay k., J. X. Antony, Navin K. Sharma and Rakesh K. Tiwari.2011. Soybean constituents and their functional benefits. Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products Medicinal of Natural Products in Medicinal Chemistry 367-383. ISBN: 978-81-308-0488--4

Egli, D.B. and S.J. Crafts-Brandner. 1996. Soybean. In Zamski, E. and A.A. Schaffer (eds.) Photoassimilate distribution in plant and crops: Source - sink relationship, Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 595-623.

Egli, D.B. and Leggett, J.E. 1973. Dry matter accumulation patterns in determinate and indeterminate soybeans. Crop Science 13, 220-222.

Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I. and Carrol, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology, 13, 17r-27r.

Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., Magalhaes, R. 2015. Revisiting yeast trehalose metabolism. Current Genetics, 61, 263-274.

Fehr, W.R., Caviness and C.E. 1977. Stages of soybean development. Iowa State Univ. Agric. Exp. Stn. Spec. Rep., 80.

Fernie A.R., Schauer N.2009. Metabolomics-assisted breeding: A viable option for crop improvement? Trends Genet.25:39–48. doi: 10.1016/j.tig.2008.10.010.

Fiehn O. 2001. Combining genomics, metabolome analysis and biochemical modelling to understand metabolic networks. Comparative and Functional Genomics.2:155-168. DOI: 10.1002/cfg.82

Fiehn O. 2002. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. Plant Molecular Biology.48:155-171. DOI: 10.1023/A:1013713905833

- Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*.18:1157-1161. DOI: 10.1038/81137
- Grabe, D.F., and F.B. Metzger. 1969. Temperature-induced-inhibition of soybeans hypocotyl elongation and seeding emergence. *Crop. Science*. 9, 331-333.
- Grieshop C.M., Kadzere, C.T., Clapper, G.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Frazier, R.L., Fahey, G.C. J. 2003. Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. *Agric. Food Chemistry*, 51, 7684-7691.
- Iordachescu M and Imai R.2008.Trehalosebiosynthesis in response to abiotic stresses. *J interg Plant Biol*. 50, 1223-1229.
- Iturriaga, G., Suarez, R. and Nova-Franco, B. 2009. Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 3793-3810.
- Johnson, R.R. 1987. Crop Management. In *Soybeans: Improvement Production and Uses*. Agronomy Monograph no 16. 2nd, 355-389.
- Kasuga, T., Taylor, J. W., and White, T. J. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus, *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. Clin. Microbiol*. 37,653– 663.
- Kantolic, A.G. and Slafer, G.A. 2007. Development and Seed Number in Indeterminate Soybean as Affected by Timing and Duration of Exposure to Long Photoperiods after Flowering. *Ann Bot*. 99 (5), 925–933.
- Jorge TF and António C . 2017. Plant Metabolomics in a Changing World: Metabolite Responses to Abiotic Stress Combinations, *Plant, Abiotic Stress and Responses to Climate Change*, Violeta Andjelkovic, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.71769.
- Kaplan, F. and Guy, C.L. 2004. Beta-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology*, 135, 1674-1684.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D.W., Zhao, W., Schiller, K.C., Gatzke, N., Sung, D.Y. and Guy, C.L. 2004 . Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136, 4159-4168

Kaprinski S, Szechynska-Hebda M, Wituszynskaw, Burdiak P. 2013. Light acclimation, retrograde, signalling cell death and immune defenses in plants. *Plant, Cell and Environment* 36, 736-744.

Ku Y S, Au-Yeung W K, Yung Y L, Li M W, Wen C Q, Liu X, Lam H M. 2013. Drought stress and tolerance in soybean. In: Board J E, ed., *A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships*. IntechOpen52945, London. DOI: 10.5772.

Kim, J. and Kim, K. H. 2017. Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. 57, 64-71.

Kinnersley A.M., Turano F.J., 2000. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19, 479-509.

Kosturkova Georgina, Rositsa Todorova, Margarita Dimitrova, Krasimiva Tusheva. 2014. Establishment of tests for facilitating screening of drought tolerance in soybean. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, vol XVII ISSN 2285-1364, CD-ROM ISSN 2285-5521, ISSN online 2285-1372, ISSN-L 2285-1364.

Kudou S., Fleury, Y., Welti, D., Uchida, T., Kitamura, K., Okubo, K. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2227-2233.

Levitt, J. 1980. *Responses of Plant to Environmental Stress: Water, Radiation, Salt and Other Stresses*. Academic Press, New York, 365.

Littlejohns, D.A. and Tanner, J.W. 1976. *Can J. Plant Sci* 56, 371-375.

Liu, K., 1997. *Soybeans: chemistry, technology and utilization*. New York: Chapman & Hall. ISBN 978-0-8342-1299-2

Lonnerdal B. and Am. J. Clin. 2009. *Nutr.* 89, 1680S-5S.

Loutfy, N., El-Tayeb, M.A., Hassanen, A.M., Moustafa, M.F., Sakuma, Y. and Inouhe, M. 2012. Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Research*, 125, 173–184.



Lugan, R., Niogret, M.F., Leport, L., Guegan, J.P., Larher, F.R., Savoure, A., Kopka, J. and Bouchereau, A. 2010. Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *The Plant Journal*, 64, 215-229.

Merewitz, E.B., Du, H., Yu, W., Liu, Y., Gianfagna, T. and Huang, B. 2011. Elevated cytokinin content in ipt transgenic creeping bentgrass promotes drought tolerance through regulating metabolite accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 63, 1315–28. DOI: 10.1093/jxb/err372 PMID: 22131157.

Mohammadkhani N. Heidari R.2008.Effect of Drought on Soluble Protein in Two Maize Varieties, *Turkish Journal of Biology*, No 32, 23-30.

Narayanan S, Fallen B. 2019. Evaluation of soybean plant introductions for traits that can improve emergence under varied soil moisture levels. *Agronomy*, 9, 118.

Nelson, C.J. and Larson, K.L. 1984. Seedling growth. In: Tesar, M.B. (Ed.) *Physiological basis of crop growth and development*. Am. Soc. Agron., Madison, Wisconsin 93– 129.

Oertli JJ.1985. The response of plant cells to different forms of moisture stress. *J Plant Physiology* 121, 295-300.

Ozawa Y., Sato, H., Nakatani, A., Mori, O., Hara, Y., Akiyama., Y., Morinaga, Y. J. *Oleo Sci.*, 50, 217-223.

Parraga Ignacio, Jesús López-Torres, Fernando Andrés, Beatriz Navarro, José M del Campo, Mercedes Garcia-Reyes, Maria P Galdón, Ángeles, Lloret, Juan C Parvais Ahmad M.N.V Prasad 2012. *Abiotic stress responses in Plants*, Springer.

Patonnier, M.P. Peltire, J.P. and Marigo, G. 1999. Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. *Journal of Experimental Botany*, 50, 1223-1229.

Pavli, O.I., Vlachos, C.E., Kalloniati, C., Flemetakis, E. and Skaracis, G.N. 2013. Metabolite profiling reveals the effect of drought on sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) metabolism. *Plant Omics Journal*, 6, 371–376.

Precioso and Joseba Rabanales. 2011. Effect of Plant sterols on the lipid profile of patients with hypercholesterolaemia. *Randomised, experimental study* 11: 73.

Franco, J. A., Cros, V., Bafion, S. Martinez-Sanchez, J. J. 2002b. Nursery Irrigation Regimes And Establishment Irrigation Affect The Postplanting Growth Of *Limonium Cossonianum* In Semiarid Conditions. *Israel Journal of Plant Sciences*, 50, 25-32.

Pennisi E. 2008. Plant genetics. The blue revolution, drop by drop, gene by gene. *Science* 320, 171-173.

Polizel AM, Medri ME, Nakashima K, Yamanaka N, Farias JRB, et al. 2011. Molecular anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with rd29A:AtDREB1A for the improvement of drought tolerance. *Genetics and molecular research: GMR* 10: 3641-3656.

Ramel, F., Sulmon, C., Bogard, M., Coué e, I. and Gouesbet, G. 2009a. Differential dynamics of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology*, 9, 28

Rizhsky, L., Liang, H.J., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S. and Mittler, R. 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*, 134, 1683-1696.

Rodrigues F., Ludovico P., Leão C., 2006. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. In: Péter G., Rosa C. (eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*. Springer, Berlin, Heidelberg. ISBN 978-3-540-26100-1.

Sangakkara, U. R., Amarasekera, P. Stamp, P. 2010. Irrigation Regimes Affect Early Root Development, Shoot Growth and Yields Of Maize (*Zea Mays* L.) In Tropical Minor Seasons. *Plant, Soil And Environment*, 56, 228-234.

Sato, T., Onoma, N., Fujikake, H., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Ohyama, T. 2001. Changes in four leghemoglobin components in nodules of hypernodulating soybean (*Glycine max* [L] Merr.) mutant and its parent in the early nodule developmental stage. *Plant and Soil* 237, 129-135.

Shah Juoti, Ratnesh Chaturvedi, Zulkarnain Chowdhury, Barney Venables, Robby A. Petros. 2014. Signalling by small metabolites in systemic acquired resistance. *The Plant J.* 79(4), 645-58. doi: 10.1111/tpj.12464.

Sakthivelu G. M.K Akitha Pevi, P. Giridhar, T. Rajasekaran, G.A Ravishankar, T Nedev, G. Kosturkova. 2008. Drought included alterations in growth, osmotic potential and in vitro regeneration of soybean. *Special issue 34 (1-2)* 103-112.

.Shaheen R, Hood-Nowotny R C. 2005. Effect of drought and salinity on carbon isotope discrimination in wheat cultivars. *Plant Science*, 168, 901-909.

Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, J. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J. Nguyen, H. T. 2004. Root Growth Maintenance during Water Deficits: Physiology to Functional Genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2343- 2351.

Shulaev V., Cortes D., Miller G., Mittler R. 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiol Plant.* 132:199–208. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.01025.x.

Shilpi M., Narendra T., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139–158

Shurtleff W., Aoyagi, A., 2013. *History of Whole Dry Soybeans, Used as Beans, or Ground, Mashed or Flaked (240 BCE to 2013)*. Lafayette, California, pp. 950.

Shurtleff W.; Aoyagi, A., 2012. *History of Soybeans and Soyfoods in South America (1882-2009)*. Soy Info Center. ISBN 978-1-928914-23-5

Shurtleff W., Aoyagi, A. 2015. "History of Soybeans and Soyfoods in Austria and Switzerland (1781---2015)." Lafayette California: Soyinfo Center. ISBN 978-1-928914-77-8. 705 pp.

Sugano, M., Ed. 2006. *Soy in Health and Disease Prevention*, CRC Press, FL, USA

Tanner, J.W., and D.J. Hume. 1978. 'Management and Production. In Soybean: Physiol'. Agron., and Utilization. Norman ed., 157-188.

Tsugawa H., Cajka T., Kind T., Ma Y., Higgins B., Ikeda, K., Kanazawa M., Vandergheynst J., Fiehn O., Arita M., 2015. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature methods*, 12, 523-526.

Tuteja Narendra and Sopory Sydhir.2008. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signalling and Behavior* 3:8, 525-536

Vilagrosa A., E. Chirino, J.J Peguero-Pina, T.S Barigah, H. Cochard and E. Gil-Pelegrín 2012. Xylem Cavitation and Embolism in Plants Living in Water, Limited Ecosystems. DOI:10.1007/978-3-642-32653-0\_3. Corpus ID: 12400972.

Wang S., Blumwald E., 2014. Stress included Chloroplast Degradation Arabidopsis Regulated via a Process Independent of Autophagy and Senescence-Associated Vacuoles. *The Plant Cell*. PMID: 25538186 PMCID: PMC4311210 DOI: 10.1105/tpc.114.133116

Wendehenne P, Gao M, Kachroo P.2014. Free radical –mediated systemic immunity in plants *curv Plant Biol* Whigham, D.K. 1983. Soybean. In: International Rice Research Institute (Ed.) Potential productivity of field crops under different environments. IRR, Los Banos, Philippines, 205-225.

Xiong L., Schumaker K., Zhu J.-K., 2002. Cell signaling during Cold, Drought and Salt Stress. *The Plant Cell*. PMID: 12045276 PMCID: PMC151254 DOI: 10.1105/tpc.000596

Yordanov, I., Velikova, T. Tsonev, 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant Psysiol.*, special issue, 187-206.

Zeigler R S, Puckridge D W. 1995. Improving sustainable productivity in rice based rainfed lowland systems of South and Southeast Asia. *Feeding four billion people: the challenge for rice research in the 21st century. GeoJournal*, 35, 307-324.

## **ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Κατράνης Στ. Ν. 1989. Η Τεχνική της Καλλιέργειας. Εκδ. Ι. Δ. Τόλης: Η Σόγια. Σελ. 83-109.

Καραμπουρνιώτης Γ.Α. 2003. Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών. Εκδ. Έμβρυο, ISBN-13 978-960-8002-14-2. Σελ. 275.

Παπακώστα-Τασοπούλου Δ. 2005. Ψυχανθή: Καρποδοτικά – Χορτοδοτικά. Ειδική Γεωργία Ι (Τεύχος Β'). Εκδ. Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη, Σελ. 211-238.

Παπακώστα- Τασοπούλου Δ. 2012. Ειδική Γεωργία: Σιτηρά και Ψυχανθή. Εκδ. Σύγχρονη Παιδεία. ISBN: 9789603571056. Σελ.760.