

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Περιεκτικότητα ελληνικών πληθυσμών του είδους *Silybum marianum* (L.) Gaertn. σε σιλυμαρίνη και στα βιοδραστικά της συστατικά και μελέτη της επίδρασης καλλιεργητικών τεχνικών (πυκνότητα σποράς και εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης *meriquat chloride*) στην αύξηση, στην ποσοτική και ποιοτική απόδοση της καλλιέργειας

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΑΡΑΜΠΑΤΖΗΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ, Msc

ΒΟΛΟΣ 2020

«Περιεκτικότητα ελληνικών πληθυσμών του είδους *Silybum marianum* (L.) Gaertn. σε σιλυμαρίνη και στα βιοδραστικά της συστατικά και μελέτη της επίδρασης καλλιεργητικών τεχνικών (πυκνότητα σποράς και εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride) στην αύξηση, στην ποσοτική και ποιοτική απόδοση της καλλιέργειας»

© Δημήτριος Αραμπατζής

{ISBN}

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (N5343/1932, άρθρο 202).»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Τσιρόπουλος Νικόλαος, *Χημεία-Ανάλυση και Προσδιορισμός Οργανικών Ουσιών*, Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Επιβλέπων.
2. Τσακάλωφ Ανδρέας, *Ιατρική Χημεία*, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
3. Καρκάνης Ανέστης, *Ζιζανιολογία*, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Τσιρόπουλος Νικόλαος, *Χημεία-Ανάλυση και Προσδιορισμός Οργανικών Ουσιών*, Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Επιβλέπων.
2. Τσακάλωφ Ανδρέας, *Ιατρική Χημεία*, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
3. Καρκάνης Ανέστης, *Ζιζανιολογία*, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
4. Δαναλάτος Νικόλαος, *Γεωργία-Οικολογία Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας*, Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
5. Μπιλάλης Δημήτριος, *Γεωργία – Βιολογική Γεωργία*, Καθηγητής του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
6. Ταραντίλης Πέτρος, *Ενόργανη Χημική Ανάλυση Φυσικών Προϊόντων*, Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
7. Ασπροδίνη Ευτυχία, *Φαρμακολογία*, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΑΡΑΜΠΙΑΤΖΗΣ

ΒΟΛΟΣ 2020

Περιεκτικότητα ελληνικών πληθυσμών του είδους *Silybum marianum* (L.) Gaertn. σε σιλυμαρίνη και στα βιοδραστικά της συστατικά και μελέτη της επίδρασης καλλιεργητικών τεχνικών (πυκνότητα σποράς και εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης *meriquat chloride*) στην αύξηση, στην ποσοτική και ποιοτική απόδοση της καλλιέργειας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 24

Συνολικός αριθμός σελίδων: 226

Συνολικός αριθμός πινάκων: 32

Συνολικός αριθμός διαγραμμάτων: 38

Συνολικός αριθμός εικόνων: 25

Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 283

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φυτό γαϊδουράγκαθο (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) είναι ιθαγενές φυτό της λεκάνης της Μεσογείου, το οποίο τώρα έχει εξαπλωθεί και εντοπίζεται σε όλο τον κόσμο. Το γαϊδουράγκαθο καλλιεργείται ως φαρμακευτικό φυτό σε διάφορες χώρες λόγω των φαρμακευτικών ιδιοτήτων του που οφείλονται στη σιλυμαρίνη, ένα μείγμα διαφόρων ουσιών που περιέχεται στο εκχύλισμα των σπόρων. Ακόμη, τα συμπληρώματα διατροφής με γαϊδουράγκαθο (σιλυμαρίνη) βρίσκονται ανάμεσα στα πιο δημοφιλή φυτικά προϊόντα. Επίσης, οι σπόροι και η βιομάζα ολόκληρου του φυτού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ελαίου και ενέργειας αντίστοιχα.

Οι γεωργοί χρησιμοποιούν σπόρους από φυσικούς πληθυσμούς-βιοτύπους ως υλικό πολλαπλασιασμού για την καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου, αν και διάφορες ποικιλίες είναι διαθέσιμες για εμπορική παραγωγή. Επομένως, είναι ανάγκη να αξιολογούνται και να χαρακτηρίζονται οι αυτοφυείς πληθυσμοί ώστε να χρησιμοποιούνται σε προγράμματα βελτίωσης του γαϊδουράγκαθου. Η απόδοση και η ποιότητα του γαϊδουράγκαθου (π.χ. η περιεκτικότητα των σπόρων σε σιλυμαρίνη) εκτός από τον γονότυπο, τη γεωγραφική θέση της καλλιέργειας και τις καιρικές συνθήκες εξαρτάται και από τις εφαρμοζόμενες καλλιεργητικές τεχνικές.

Στο πλαίσιο της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής σχεδιάστηκε και διεξήχθη μια εκτεταμένη μελέτη με σκοπό την αξιολόγηση τριάντα τεσσάρων γηγενών πληθυσμών γαϊδουράγκαθου κυρίως ως προς την περιεκτικότητά τους σε σιλυμαρίνη και στα βιοδραστικά συστατικά της. Επιπλέον, έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων των σπόρων των πληθυσμών. Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στο αγρόκτημα Βελεστίνου, σε τρεις καλλιεργητικές περιόδους, για τη μελέτη της επίδρασης της πυκνότητας της καλλιέργειας και των ρυθμιστών ανάπτυξης στην ανάπτυξη, την ποιότητα και την απόδοση του φυτού σε σιλυμαρίνη, ενώ έγινε και αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη σπόρων του φυτού σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης. Τέλος, διεξήχθησαν πειράματα απομόνωσης της σιλυμαρίνης και των συστατικών της με την καινοτόμο μέθοδο της μη-ομοιοπολικής μοριακής αποτύπωσης χρησιμοποιώντας τις τεχνικές του πολυμερισμού διαλύματος και της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.

Η μελέτη των πληθυσμών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας έδειξε ότι υπάρχει μικρή παραλλακτικότητα στα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Όσον αφορά την περιεκτικότητα των σπόρων σε σιλυμαρίνη διαπιστώθηκε σχετικά μεγάλη διακύμανση, με τις τιμές να κυμαίνονται από 2,31 έως 7,71% και τον μέσο όρο της περιεκτικότητας να είναι 3,29%. Ακόμη, μεγάλη διακύμανση μεταξύ των πληθυσμών καταγράφηκε στην περιεκτικότητα των κύριων συστατικών της σιλυμαρίνης στους σπόρους. Μέσω της ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες οι πληθυσμοί ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες (5 συστάδες). Τέλος, αρκετοί από τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν αποτελούν μια πολύτιμη γενετική πηγή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα βελτίωσης του γαϊδουράγκαθου για τη δημιουργία ποικιλιών, ιδιαίτερα οι πληθυσμοί ‘Σπάτα’ και ‘Καστοριά’ λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε σιλυμαρίνη καθώς και σε σιλυβίνη (Α και Β).

Η πειραματική καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου έδειξε ότι η πυκνότητα των φυτών είχε σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και την απόδοση της καλλιέργειας. Ο ρυθμιστής ανάπτυξης, meriquat chloride, είχε μέτρια επίδραση στο ύψος των φυτών (μείωση από 7,9 έως 14,8%), ενώ δεν επηρέασε τα άλλα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας που μελετήθηκαν, ούτε παρουσίασε κάποια φυτοτοξική επίδραση. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι οι καιρικές συνθήκες επηρέασαν την απόδοση της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου. Η απόδοση σε σπόρο κυμάνθηκε μεταξύ 95,3 και 222,0 kg/στρέμμα, ενώ η απόδοση σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε μεταξύ 3,3 και 6,4 kg/στρέμμα. Από τη μελέτη των σπόρων που έγινε σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης διαπιστώθηκε ότι η περιεκτικότητα των σπόρων σε έλαιο και σιλυμαρίνη αυξάνεται όσο αυξάνεται ο βαθμός ωρίμανσης των σπόρων και ότι οι σπόροι των κεντρικών κεφαλών ωριμάζουν νωρίτερα από τους σπόρους των πλευρικών κεφαλών.

Μελετήθηκαν οι διαδικασίες παρασκευής μοριακά αποτυπωμένων σε σιλυμαρίνη πολυμερών για την ανάπτυξη μεθόδων απομόνωσης της σιλυμαρίνης και των συστατικών της από εκχυλίσματα σπόρων γαϊδουράγκαθου. Η συμβατική αποτύπωση με ριζικό πολυμερισμό βινυλικών μονομερών παρουσία της σιλυβίνης κατέδειξε ότι η σιλυβίνη αναστέλλει πλήρως τον πολυμερισμό, πιθανώς δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες του εκκινητή. Η αποτύπωση της σιλυβίνης με την τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης έδειξε ότι αυτή η μέθοδος είναι πιο αποτελεσματική και χρίζει περαιτέρω μελέτης.

SILYMARIN CONTENT OF WILD GREEK MILK THISTLE (*SILYBUM MARIANUM* (L.) GAERTN.) POPULATIONS AND EFFECT OF CULTIVATION PRACTICES (SOWING DENSITY AND MEPIQUAT CHLORIDE APPLICATION) ON GROWTH, QUALITY AND YIELD OF MILK THISTLE CROP

DIMITRIOS ARAMPATZIS

UNIVERSITY OF THESSALY

Department of Agriculture Crop Production and Rural Environment

ABSTRACT

Milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) is an annual or biennial species native to the Mediterranean basin that is now spread worldwide and it is grown as a medicinal plant in several countries. Silymarin, a mixture of compounds that is contained in the extract from milk thistle seeds, has numerous pharmacological activities. Dietary supplements containing silymarin are among the most popular natural products. Moreover, the seeds and whole plant biomass can be used for oil and bioenergy production, respectively.

Farmers use seeds from wild populations as propagation material for milk thistle cultivation, although a few cultivated varieties are available for commercial production. Consequently, it is imperative that native populations are evaluated and characterised for efficient use in milk thistle breeding programmes. Milk thistle yield and quality (i.e., silymarin content) is dependent not only on to the genotype, the geographical location and the weather conditions but also on the agronomic conditions.

In the framework (context) of this thesis a study was designed and conducted in order to evaluate thirty four native Greek milk thistle populations and to estimate the diversity regarding the silymarin content and the variability in silymarin components. Moreover, antioxidant activity assays were also carried out. Other studies, field experiments, were conducted to determine the effects of a plant growth regulator (mepiquat chloride) and crop density on milk thistle growth, seed yield, and silymarin

accumulation and to evaluate the silymarin content in milk thistle seeds harvested at different ripening stages. Also, experiments were conducted for the separation of silymarin and its constituents using the innovative method of molecular imprinting and the techniques of bulk polymerization and electrospinning.

The characterisation of 30 wild milk thistle populations revealed a relatively low amount of variation in most studied phenotypic traits. Regarding silymarin content a relatively high amount of variation was identified. The average value across all populations was 3.29%, while the values were ranging from 2.31 to 7.71%. Furthermore, significant differences were also observed regarding the relative proportion of silymarin constituents. Our results indicate that an interesting genetic resource for exploitation in milk thistle breeding programmes exists in Greece, especially the ‘Spata’ and ‘Kastoria’ populations due to their high content of silymarin, silybin A, and silybin B.

The results of the field experiments showed that plant density had a significant impact on milk thistle crop growth and seed yield. The plant growth regulator treatment had a moderate effect regarding the plant height (7.9–14.8% reduction), while it did not affect other crop traits and none of the mepiquat chloride treatments showed any phytotoxic effect on the milk thistle crop. Moreover, the impact of climatic conditions on milk thistle production and quality was significant. Seed yield varied between 95.3 to 222.0 kg ha⁻¹, while silymarin yield varied between 3.3 to 6.4 kg ha⁻¹. The evaluation of silymarin content in milk thistle seeds harvested at different ripening stages revealed that the content of oil and silymarin is increasing as the flower heads get more ripe. Also, the seeds of the main flower heads ripen earlier.

A study was conducted in order to prepare molecular imprinted polymers for silymarin and to develop methods for the isolation of silymarin and its constituents from thistle seed extracts. Conventional imprinting by radical polymerization of vinyl monomers in the presence of silybin showed that silybin inhibits polymerization, possibly by free radical scavenging. Imprinting of silybin by electrospinning showed that this method is more effective and requires further study.

Στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Νικολάου Τσιρόπουλου, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση του θέματος της διατριβής, καθώς και για την πολύτιμη επιστημονική υποστήριξη, την άποψη συνεργασία και την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ανδρέα Τσακάλωφ, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τη στήριξη και τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, καθώς και για τη αμέριστη βοήθεια και τις συμβουλές που μου παρείχε όσο καιρό εργάστηκα στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την καθοδήγησή του.

Είμαι ευγνώμων και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ανέστη Καρκάνη, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε και την αμέριστη υποστήριξη του. Τον ευχαριστώ για την άποψη συνεργασία μας και την καθοριστική συμβολή του στην ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής μου.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τους καθηγητές κ. Νικόλαο Δαναλάτο, κ. Δημήτριο Μπιλάλη, κ. Πέτρο Ταραντίλη και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Ευτυχία Ασπροδίνη, μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τόσο για την προθυμία και διάθεση να συμμετέχουν στην εξεταστική επιτροπή για την κρίση της διδακτορικής διατριβής μου όσο και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή κ. Κ. Παναγιώτου και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ι. Τσιβιντζέλη για τη βοήθεια και την επιστημονική καθοδήγηση που μου προσέφεραν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων με την τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή κ. Σ. Ζαούτσο, του τμήματος Μηχανολόγων Μηχανικών Τ.Ε. του ΤΕΙ Λάρισας, και στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Π. Βερίλλη, του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την βοήθειά τους στην παρατήρηση των πολυμερικών δομών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Γ. Νάνο και την υποψήφια διδάκτορα Τ. Γεωργουδάκη για τη συνεργασία και τη βοήθειά τους. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους προπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους συνυπήρξαμε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας και στο Αγρόκτημα Βελεστίνου και ιδιαίτερα στην Ε. Γιάτσου και στον Α. Τζώρτζη.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια κ. Γ. Σωτηροπούλου, του τμήματος Φαρμακευτικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Πατρών, τόσο για τη βοήθεια και τη στήριξή της κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, όσο και για την ενθάρρυνσή της να συνεχίσω τη μεταπτυχιακή μου εκπαίδευση εκπονώντας διδακτορική διατριβή.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την υποστήριξη που μου παρείχαν, καθώς και όλους όσους μου συμπαραστάθηκαν κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	v
ABSTRACT.....	vii
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	xi
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	xvii
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ	xix
ΕΙΚΟΝΕΣ	xxii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xxiv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1. Εισαγωγή.....	1
1.2 Ιστορικά στοιχεία	1
1.3. Βοτανική/μορφολογική περιγραφή του γαϊδουράγκαθου.....	3
1.4. Γεωγραφική κατανομή του φυτού - Χρήσεις.....	4
1.5. Χημική σύσταση της σιλυμαρίνης.....	6
1.6. Περιεκτικότητα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου σε σιλυμαρίνη και τα συστατικά της.....	8
1.7. Περιεκτικότητα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου σε έλαιο	12
1.8. Απομόνωση της σιλυμαρίνης.....	14
1.9. Ανάλυση και προσδιορισμός των συστατικών της σιλυμαρίνης	21
1.10. Βιολογική δραστηριότητα της σιλυμαρίνης και των συστατικών της	25
1.11. Καλλιέργεια του φυτού γαϊδουράγκαθο	30
ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	43
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΙΛΥΜΑΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ.....	43

2.1. Εισαγωγή.....	43
2.2. Υλικά και μέθοδοι.....	44
2.2.1. Υλικά – Όργανα.....	44
2.2.2. Εκχύλιση ελαίου και σιλυμαρίνης.....	46
2.2.3. Προσδιορισμός σιλυμαρίνης και συστατικών της.....	46
2.2.4. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – Μέθοδος DPPH.....	49
2.2.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – Μέθοδος FRAP.....	49
2.2.6. Περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά – Μέθοδος FOLIN-CIOCALTEU...	50
2.2.7. Μέτρηση χρώματος σπόρων.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	53
ΜΟΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ	53
3.1. Εισαγωγή.....	53
3.2. Ιστορικά στοιχεία.....	53
3.3. Βασικές αρχές της μοριακής αποτύπωσης.....	54
3.4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μοριακής αποτύπωσης.....	57
3.5. Επίδραση των παραγόντων πολυμερισμού.....	58
3.6. Ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning).....	62
3.7. Υλικά και μέθοδοι.....	63
3.7.1. Αντιδραστήρια.....	63
3.7.2. Σύνθεση μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών.....	64
3.7.3. Ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning).....	66
3.8. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	69
3.8.1. Σύνθεση μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών.....	69
3.8.2. Ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning).....	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	75
ΜΕΛΕΤΗ ΓΗΓΕΝΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ	75

4.1. Εισαγωγή.....	75
4.2. Συλλογή δειγμάτων.....	76
4.3. Μορφολογία φυτών και σπόρων.....	78
4.4. Στατιστική ανάλυση.....	78
4.5. Αποτελέσματα.....	78
4.5.1. Μορφολογία φυτών και σπόρων.....	78
4.5.2. Περιεκτικότητα σε έλαιο και σιλυμαρίνη.....	79
4.5.3. Περιεκτικότητα σε συστατικά της σιλυμαρίνης.....	85
4.5.4. Στατιστική ανάλυση - Ταξινόμηση πληθυσμών.....	88
4.5.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – Ολικά φαινολικά.....	93
4.6. Συζήτηση.....	95
4.6.1. Μορφολογία φυτών και σπόρων.....	95
4.6.2. Περιεκτικότητα σε έλαιο και σιλυμαρίνη.....	96
4.6.3. Περιεκτικότητα σε συστατικά της σιλυμαρίνης.....	97
4.6.4. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – Ολικά φαινολικά.....	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	105
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ	
ΣΠΟΡΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΥΘΜΙΣΤΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΡΙQUAT CHLORIDE	
ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ	
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΓΑΪΔΟΥΡΑΓΚΑΘΟΥ.....	105
5.1. Εισαγωγή.....	105
5.2. Υλικά και μέθοδοι.....	106
5.2.1 Γενικά.....	106
5.2.2 Καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016 και 2017-2018.....	107
5.2.3. Καλλιεργητική περίοδος 2016-2017.....	111
5.2.4. Στατιστική ανάλυση.....	116
5.2.5. Μετεωρολογικά δεδομένα.....	116

5.3. Αποτελέσματα	119
5.3.1. Καλλιεργητική περίοδος 2015-2016	119
5.3.2. Καλλιεργητική περίοδος 2016-2017	126
5.3.3. Αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε έλαιο και σε σιλυμαρίνη και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης. Μέτρηση χρώματος σπόρων και βάρους 1000 σπόρων.	134
5.3.4. Καλλιεργητική περίοδος 2017-2018	141
5.4 Συζήτηση.....	148
5.4.1 Επίδραση θερμοκρασίας στη βλάστηση των σπόρων.....	148
5.4.2 Χαρακτηριστικά καλλιέργειας κατά τη βλαστική φάση ανάπτυξης.....	150
5.4.3 Απόδοση σε σπόρο και συστατικά της απόδοσης.....	154
5.4.4 Περιεκτικότητα και απόδοση σε έλαιο.....	155
5.4.5 Περιεκτικότητα και απόδοση σε σιλυμαρίνη	156
5.4.6. Περιεκτικότητα σε έλαιο σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης	158
5.4.7. Περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη και στα συστατικά της σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης.....	158
5.4.8. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλίσματος σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης.....	160
5.4.9. Βάρος 1000 σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης.....	160
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	165
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	165
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	169
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	201

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 2.1. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για την ανάλυση των συστατικών της σιλυμαρίνης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.	47
Πίνακας 3.1. Σύσταση των μιγμάτων πολυμερισμού.	65
Πίνακας 3.2. Σύσταση των διαλυμάτων για τη διαδικασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.	67
Πίνακας 4.1. Γεωγραφικά χαρακτηριστικά της περιοχής προέλευσης των πληθυσμών του φυτού <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn που μελετήθηκαν.	77
Πίνακας 4.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των κεφαλών (χρώμα) και των σπόρων από πληθυσμούς του φυτού <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	80
Πίνακας 4.3. Περιεκτικότητα σε έλαιο (%) σπόρων από πληθυσμούς του φυτού <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	83
Πίνακας 4.4. Περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (%) σπόρων από πληθυσμούς του φυτού <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	84
Πίνακας 4.5. Περιεκτικότητα σε συστατικά σιλυμαρίνης ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ σπόρου) σπόρων από πληθυσμούς του φυτού <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	86
Πίνακας 4.6. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) ανάμεσα σε χαρακτηριστικά των πληθυσμών του φυτού <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	88
Πίνακας 4.7. Ανάλυση κύριων συνιστωσών ανάμεσα στα συστατικά της σιλυμαρίνης των πληθυσμών του φυτού <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	92
Πίνακας 4.8. Αντιοξειδωτική ικανότητα και περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά (TPC) εκχυλισμάτων σπόρων από πληθυσμούς του φυτού <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	94
Πίνακας 4.9. Συντελεστές συσχέτισης (Pearson, r) ανάμεσα σε χαρακτηριστικά των πληθυσμών του φυτού <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	103
Πίνακας 5.1. Ιδιότητες εδάφους πειραματικού αγρού.	107
Πίνακας 5.2. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στη διάμετρο της ροζέτας των φυτών.	119
Πίνακας 5.3. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στη συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD).	120
Πίνακας 5.4. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στο ύψος των φυτών.	121
Πίνακας 5.5. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά από 88, 118 και 138 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ).	122
Πίνακας 5.6. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά	

από 8, 24 και 38 ημέρες από την πρώτη εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης (HME).	123
Πίνακας 5.7. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό, το βάρος των 1000 σπόρων (g) και την απόδοση σε σπόρο (kg/στρέμμα).....	124
Πίνακας 5.8. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στην περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο (%), την απόδοση σε έλαιο (kg/στρέμμα), την περιεκτικότητα του σπόρου σε σιλυμαρίνη (%) και την απόδοση σε σιλυμαρίνη (kg/στρέμμα).	125
Πίνακας 5.9. Ανάλυση διασποράς (τιμές F) για την επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στα χαρακτηριστικά του φυτού που μελετήθηκαν την περίοδο 2016-2017.....	130
Πίνακας 5.10. Χαρακτηριστικά χρώματος σε σπόρους διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης: στάδιο I (BBCH 75), στάδιο II (BBCH 79) και στάδιο III (BBCH 88). 140	
Πίνακας 5.11. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στη διάμετρο της ροζέτας των φυτών.	141
Πίνακας 5.12. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στη συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD).....	142
Πίνακας 5.13. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στο ύψος των φυτών.	143
Πίνακας 5.14. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά από 98, 128 και 141 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ).	144
Πίνακας 5.15. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά από 8, 24 και 38 ημέρες από την πρώτη εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης (HME).	145
Πίνακας 5.16. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό, το βάρος των 1000 σπόρων (g) και την απόδοση σε σπόρο (kg/στρέμμα).....	146
Πίνακας 5.17. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στην περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο (%), την απόδοση σε έλαιο (kg/στρέμμα), την περιεκτικότητα του σπόρου σε σιλυμαρίνη (%) και την απόδοση σε σιλυμαρίνη (kg/στρέμμα).	147
Πίνακας 5.18. Συντελεστές συσχέτισης (Pearson, r) ανάμεσα στα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου που μελετήθηκαν την περίοδο 2015-2016.....	162
Πίνακας 5.19. Συντελεστές συσχέτισης (Pearson, r) ανάμεσα στα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου που μελετήθηκαν την περίοδο 2016-2017.....	163
Πίνακας 5.20. Συντελεστές συσχέτισης (Pearson, r) ανάμεσα στα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου που μελετήθηκαν την περίοδο 2017-2018.....	164

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

- Διάγραμμα 3.1.** Αποδέσμευση της σιλυβίνης από τις πολυμερικές μορφές μετά από ανακίνηση με αιθανόλη..... 71
- Διάγραμμα 3.2.** Δέσμευση της σιλυβίνης από τις πολυμερικές μορφές MIP10 και NIP10 μετά από ανακίνηση με διάλυμα σιλυβίνης.72
- Διάγραμμα 3.3.** Δέσμευση των συστατικών της σιλυμαρίνης από την πολυμερική μορφή MIP10 μετά από ανακίνηση με διάλυμα σιλυμαρίνης και αποδέσμευση των συστατικών αυτών μετά από ανακίνηση με αιθανόλη.....72
- Διάγραμμα 3.4.** Δέσμευση των συστατικών της σιλυμαρίνης από την πολυμερική μορφή NIP10 μετά από ανακίνηση με διάλυμα σιλυμαρίνης και αποδέσμευση των συστατικών αυτών μετά από ανακίνηση με αιθανόλη.....73
- Διάγραμμα 4.1.** Περιεκτικότητα κύριων συστατικών στη σιλυμαρίνη (%) σε πληθυσμούς του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.90
- Διάγραμμα 4.2.** Δενδρόγραμμα ταξιδόμησης 34 πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn με βάση την κατανομή των συστατικών της σιλυμαρίνης.91
- Διάγραμμα 4.3.** Γράφημα διάταξης μεταβλητών σε ανάλυση κύριων συνιστωσών ανάμεσα στα συστατικά της σιλυμαρίνης των πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.93
- Διάγραμμα 4.4.** Σύσταση φλαβονολιγνάνων (%) στους πληθυσμούς του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.98
- Διάγραμμα 4.5.** Γράφημα διάταξης μεταβλητών σε ανάλυση κύριων συνιστωσών ανάμεσα στις φλαβονολιγνάνες της σιλυμαρίνης των πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.99
- Διάγραμμα 4.6.** Κατανομή, με βάση την ανάλυση κύριων συνιστωσών ανάμεσα στις φλαβονολιγνάνες της σιλυμαρίνης, των πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn..... 100
- Διάγραμμα 5.1.** Πειραματικό σχέδιο υποδιαιρεμένων τεμαχίων με 3 επαναλήψεις.108
- Διάγραμμα 5.2.** Πειραματικό σχέδιο τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων με δύο επεμβάσεις και 3 επαναλήψεις..... 112
- Διάγραμμα 5.3.** Μέση μηνιαία θερμοκρασία στο αγρόκτημα Βελεστίνου κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016, 2016-2017 και 2017-2018..... 117
- Διάγραμμα 5.4.** Μηνιαίο ύψος βροχόπτωσης στο αγρόκτημα Βελεστίνου κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016, 2016-2017 και 2017-2018..... 117
- Διάγραμμα 5.5.** Ελάχιστες τιμές θερμοκρασίας ανά μήνα στο αγρόκτημα Βελεστίνου κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016, 2016-2017 και 2017-2018. 118

Διάγραμμα 5.6. Μέγιστες τιμές θερμοκρασίας ανά μήνα στο αγρόκτημα Βελεστίνου κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016, 2016-2017 και 2017-2018.	118
Διάγραμμα 5.7. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στη διάμετρο της ροζέτας των φυτών.	126
Διάγραμμα 5.8. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στη συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD).	127
Διάγραμμα 5.9. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στο ύψος των φυτών.....	127
Διάγραμμα 5.10. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά από 33 και 47 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ).	128
Διάγραμμα 5.11. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά από 61, 75 και 89 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ).	129
Διάγραμμα 5.12. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό.....	131
Διάγραμμα 5.13. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στο βάρος των 1000 σπόρων (g).	131
Διάγραμμα 5.14. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στην απόδοση σε σπόρο (kg/στρέμμα).	132
Διάγραμμα 5.15. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στην περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (%).	132
Διάγραμμα 5.16. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στην απόδοση σε σιλυμαρίνη (kg/στρέμμα).....	133
Διάγραμμα 5.17. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στην περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο (%).	133
Διάγραμμα 5.18. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στην απόδοση σε έλαιο (kg/στρέμμα).	134
Διάγραμμα 5.19. Περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο (%) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88).	135
Διάγραμμα 5.20. Περιεκτικότητα του σπόρου σε σιλυμαρίνη (%) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88).	136
Διάγραμμα 5.21. Μέσος όρος της περιεκτικότητας του σπόρου (κεντρικές και πλευρικές κεφαλές) σε συστατικά σιλυμαρίνης (mg/g), στα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88).	137

Διάγραμμα 5.22. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλίσματος σπόρων (μπολ ασκορβικού οξέος ανά 100 g σπόρου) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88).	137
Διάγραμμα 5.23. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλίσματος σπόρων (μπολ ασκορβικού οξέος ανά 100 g σπόρου) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88).	138
Διάγραμμα 5.24. Ολικά φαινολικά στο εκχύλισμα των σπόρων (mg γαλλικού οξέος (GA) ανά 100 g σπόρου) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88).	139
Διάγραμμα 5.25. Βάρος 1000 σπόρων (g) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88).	139
Διάγραμμα 5.26. Ελάχιστες (min), μέγιστες (max) και μέσες (mean) ημερήσιες τιμές θερμοκρασίας από τις 16 Νοεμβρίου έως τις 31 Δεκεμβρίου 2016.	148
Διάγραμμα 5.27. Ημερήσιες μέσες τιμές θερμοκρασίες τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο για τα έτη 2015, 2016 και 2017. Η πρώτη κάθετη μαύρη γραμμή είναι στις 16 Νοεμβρίου, ενώ η δεύτερη στην 1 Δεκεμβρίου.....	149
Διάγραμμα 5.28. Περιεκτικότητα κύριων συστατικών στη σιλυμαρίνη στο στάδιο I (BBCH 75), στο στάδιο II (BBCH 79) και στο στάδιο III (BBCH 88).	159

EΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1.1. Απεικόνιση του φυτού <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn. (Thomé, 1885)...	2
Εικόνα 1.2. Χημικοί τύποι των κύριων συστατικών της σιλυμαρίνης.	7
Εικόνα 2.1. Χρωματογραφήματα πρότυπων διαλυμάτων σιλυμαρίνης, σιλυβίνης και εκχυλισμάτων των σπόρων πληθυσμών του φυτού γαϊδουράγκαθο.	48
Εικόνα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας μοριακής αποτύπωσης με την τεχνική της μη-ομοιοπολικής αποτύπωσης.	55
Εικόνα 3.2. Λειτουργικά μονομερή: Α. 4-βινυλοπυριδίνη, Β. μεθακρυλικό οξύ. Μονομερή δικτύωσης: Γ. αιθυλενο-γλυκολ-διμεθυλακρυλένιο, Δ. διβινυλοβενζόλιο. Εκκινήτης: Ε. αζω-δισ-ισοβουτυρονιτρίλιο.	60
Εικόνα 3.3. Σχηματικό διάγραμμα της διαδικασίας της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.	62
Εικόνα 3.4. Σύνδεση μορίου σιλυβίνης με μόρια 4-βινυλοπυριδίνης με δεσμούς υδρογόνου στο σύμπλοκο υποστρώματος/μονομερούς.	64
Εικόνα 3.5. Αριστερά: πολυ(οξικός βινυλεστέρας). Δεξιά: πολυ(αλλυλαμίνη).	66
Εικόνα 3.6. Διάταξη ηλεκτροστατικής ινοποίησης.	67
Εικόνα 3.7. Πολυμερικές δομές που δημιουργήθηκαν με την τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης. Α: NIP7, Β: NIP8, Γ: NIP9, Δ: MIP7, Ε: MIP8, Ζ: MIP9.	70
Εικόνα 3.8. Πολυμερικές δομές που δημιουργήθηκαν με την τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης. Α και Γ: NIP10, Β και Δ: MIP10.	70
Εικόνα 4.1. Γεωγραφική κατανομή των πληθυσμών του φυτού <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn που μελετήθηκαν.	76
Εικόνα 4.2. Σπόροι πληθυσμών: 1. ‘Κιλελέρ’ (Έτος 2015), 2. ‘Μεσοποταμία 1’ (Έτος 2014), 3. ‘Τρίπολη’, 4. ‘Λαμία’ (Έτος 2015), 5. ‘Άγιος Γεώργιος 1’ (Έτος 2017), 6. ‘Άγιος Γεώργιος 2’, 7. ‘Καστοριά’, 8. ‘Λαμία’ (Έτος 2017).	79
Εικόνα 4.3. Χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος σιλυμαρίνης και εκχυλισμάτων των σπόρων πληθυσμών του φυτού γαϊδουράγκαθο.	82
Εικόνα 5.1. Πειραματικός αγρός (Νοέμβριος 2015).	107
Εικόνα 5.2. Πειραματικός αγρός (Φεβρουάριος 2016).	109
Εικόνα 5.3. Πειραματικός αγρός (Απρίλιος 2016).	110
Εικόνα 5.4. Πειραματικός αγρός (4 Απριλίου 2017).	112
Εικόνα 5.5. Πειραματικός αγρός (25 Απριλίου 2017).	113

Εικόνα 5.6. Πειραματικός αγρός (2 Ιουνίου 2017).....	114
Εικόνα 5.7. Φωτογραφίες φυτών και σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης: στάδιο I (BBCH 75), στάδιο II (BBCH 79) και στάδιο III (BBCH 88).	135
Εικόνα 5.8. Φωτογραφίες σπόρων από κεντρικές κεφαλές διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης (μετά την ξήρανση): στάδιο I (BBCH 75), στάδιο II (BBCH 79) και στάδιο III (BBCH 88).	140
Εικόνα 5.9. Μέτρηση διαμέτρου ροζέτας (07/03/2018).	150
Εικόνα 5.10. Φωτογραφίες ξηρών φυτών (BBCH 99).	151
Εικόνα 5.11. Δύο εβδομάδες μετά την εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης (Απρίλιος 2016).	153

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

HPLC: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)

preparative RP-HPLC: Παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography)

NMR: φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance)

CD spectroscopy: φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism spectroscopy)

TLC: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography)

LC: Υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography)

MS: Φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry)

MS/MS: Διαδοχική φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry)

UPLC: Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (Ultra Performance Liquid Chromatography)

DPPH: 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

TPTZ: 2,4,6-τρις-(2-πυριδύλο)-s-τριαζίνη (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine)

MIP: Μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές (Molecular Imprinted Polymer)

NIP: Πολυμερές αναφοράς (Non-imprinted polymer)

4VPy: 4-βινυλοπυριδίνη (4-Vinylpyridine)

3VBA: 3-βινυλοβενζοϊκό οξύ (3-Vinylbenzoic acid)

EGDMA: αιθυλενο-γλυκολ-διμεθυλακρυλένιο (Ethylene glycol dimethacrylate)

PVAc: πολύ(οξικός βινυλεστέρας) (Polyvinyl acetate)

PAI: πολυ(αλλυλαμίνη) (Poly(allylamine))

ΗΜΣ: Ημέρες από τη Σπορά

ΗΜΕ: Ημέρες από την πρώτη Εφαρμογή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Το φυτό γαϊδουράγκαθο (*Silybum marianum* (L.) Gaertn. ή *Carduus marianus* L., αγγλική ονομασία Milk thistle) είναι ένα είδος που ανήκει στην οικογένεια Asteraceae και είναι ιθαγενές φυτό της λεκάνης της Μεσογείου, το οποίο τώρα έχει εξαπλωθεί και εντοπίζεται σε όλο τον κόσμο. Το γαϊδουράγκαθο καλλιεργείται ως φαρμακευτικό φυτό σε διάφορες χώρες, ενώ στην Ελλάδα θεωρείται ζιζάνιο. Το εκχύλισμα των σπόρων του φυτού εμφανίζει αρκετές φαρμακευτικές ιδιότητες, ενώ τα συμπληρώματα διατροφής με γαϊδουράγκαθο βρίσκονται ανάμεσα στα πιο δημοφιλή φυτικά προϊόντα.

1.2 Ιστορικά στοιχεία

Για περισσότερο από 2000 χρόνια οι σπόροι του φυτού χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία παθήσεων του ήπατος, όπως η κίρρωση, καθώς και για την προστασία του ήπατος από χημικές και περιβαλλοντικές τοξίνες, που προέρχονται μεταξύ άλλων από δαγκώματα φιδιών, δηλητηρίαση απόμανιτάρια και κατανάλωση οينوπνεύματος (Křen & Walterova, 2005). Σύμφωνα με τους Morazzoni και Bombardelli (1995) ο Θεόφραστος (4^{ος} αιώνας π.Χ.) ήταν πιθανώς ο πρώτος που αναφέρθηκε στο φυτό, με το όνομα «πτέρνιξ». Ο Διοσκουρίδης τον 1^ο αιώνα μ.Χ., στο έργο του «Περὶ ὕλης ἰατρικῆς» προτείνει ένα αφέψημα του φυτού «σίλυβον» για τη θεραπεία από δάγκωμα φιδιού, ενώ ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος (1^{ος} αιώνας μ.Χ.) έγραψε ότι το μίγμα χυμού του φυτού «silybum» με μέλι ήταν ευεργετικό για τη διέγερση της ροής της χολής (Polyak, Ferenci & Pawlowsky, 2013; Chambers *et al.*, 2017). Το γαϊδουράγκαθο αποτελούσε μέρος της Παραδοσιακής Ινδικής Ιατρικής (Ram *et al.*, 2005), όχι όμως και της Παραδοσιακής Κινέζικης Ιατρικής (Pei, Chen & Li., 2009), ενώ οι ιθαγενείς αμερικανοί χρησιμοποιούσαν το φυτό για τη θεραπεία δοθιήνων και άλλων παθήσεων του δέρματος (Post-White, Ladas & Kelly, 2007).

Κατά τη διάρκεια του μεσαίωνα, η χρήση του *Silybum marianum* αναφέρεται συστηματικά σε διάφορα βιβλία βοτανικής, όπως του Leonhart Fuchs και του Hieronymus Bock (Morazzoni & Bombardelli, 1995; Biedermann *et al.*, 2014). Μεταξύ άλλων, οι βοτανολόγοι και ιατροί Pietro Andrea Mattioli (1554), Adamus Lonicerus (1564) και Albrecht von Haller (1755) το συνιστούσαν για τη θεραπεία ηπατοχολικών ασθενειών (Schuppan *et al.*, 1999), ενώ ο ιατρός Johann Gottfried Rademacher (1772-1849) έκανε δημοφιλές ένα αιθανολικό εκχύλισμα των σπόρων του φυτού για τη θεραπεία ηπατοσπληνικών διαταραχών (Flora *et al.*, 1998). Σύμφωνα με τον Hobbs (1992, όπ. αναφ. στο Flora *et al.*, 1998), γύρω στα 1900 μία σχολή εναλλακτικής ιατρικής με βοτανολογικές θεραπείες, οι «Eclectics», χρησιμοποιούσαν εκχυλίσματα γαϊδουράγκαθου για την «ηπατική συμφόρηση», τους κισσούς, τις διαταραχές περιόδου και ανωμαλίες του σπλήνα και των νεφρών.



Εικόνα 1.1. Απεικόνιση του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Thomé, 1885).

1.3. Βοτανική/μορφολογική περιγραφή του γαϊδουράγκαθου

Ταξινόμηση του φυτού:

Βασίλειο:Plantae / Υποβασίλειο:Tracheobionta / Υπεράθροισμα:Spermatophyta / Άθροισμα:Magnoliophyta / Κλάση:Magnoliopsida / Υποκλάση:Asteridae / Υπέρταξη:Asteranae / Τάξη:Asterales / Οικογένεια:Asteraceae / Γένος:*Silybum* / Είδος: *S. marianum* (L.) Gaertn.

Το φυτό βλασταίνει περίπου 10-20 ημέρες μετά τη σπορά και αναπτύσσει ισχυρό ριζικό σύστημα. Κατά τα αρχικά στάδια της βλαστητικής ανάπτυξης σχηματίζει ροζέτα η οποία έχει διάμετρο 50-55 cm. Τα φύλλα του φυτού είναι έλλοβα, μεγάλα, ακανθώδη και έχουν χρώμα πράσινο με ακανόνιστου σχήματος λευκές περιοχές κατά μήκος των νεύρων των φύλλων. Ο τρόπος διάταξης των φύλλων στο βλαστό είναι κατ' εναλλαγή, με τα κατώτερα πλήρως εκπτυγμένα φύλλα να έχουν μήκος ως 50-60 cm και τα ανώτερα να είναι μικρότερα. Μετά το στάδιο της ροζέτας, ακολουθούν η ανάπτυξη του βλαστού, η άνθηση, ο σχηματισμός του ανώτερου τμήματος του φυτού και η ωρίμανση των σπόρων (καρποί: τύπος αχαινίου). Ο βλαστός του φυτού είναι όρθιος, ισχυρός, με μικρά αγκάθια και μπορεί να έχει μήκος από 50 έως 240 cm περίπου (Andrzejewska & Skinder, 2006; Ledda *et al.*, 2013). Ο βλαστός διακλαδίζεται και κάθε βλαστός καταλήγει σε μία ταξιανθία (κεφάλιο), διαμέτρου περίπου 5 εκατοστών, που αποτελείται από μωβ άνθη. Το ύψος των φυτών και η δημιουργία των διακλαδώσεων επηρεάζονται από τις καιρικές συνθήκες, τη γονιμότητα του εδάφους και την πυκνότητα σποράς (Martinelli *et al.*, 2015). Κάθε ταξιανθία περιβάλλεται από ένα προστατευτικό πράσινο περίβλημα που αποτελείται από βράκτια που καταλήγουν σε αιχμηρά αγκάθια, ενώ τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα. Το γαϊδουράγκαθο είναι αυτογονιμοποιούμενο είδος με ποσοστό σταυρογονιμοποίησης 2% (Hetz, Liersch & Schieder, 1995). Είναι φυτό μακράς ημέρας, ενώ η άνθησή του και η ωρίμανση των σπόρων δεν είναι ταυτόχρονη (Karkanis *et al.*, 2011). Πρώτα ωριμάζουν οι κεντρικές κεφαλές και μετά οι πλευρικές. Κάθε κεντρική κεφαλή παράγει περίπου 190 σπόρους (achenes) και κάθε πλευρική κεφαλή περίπου 114 (Dodd, 1989). Σύμφωνα με τον Michael (1968c, όπ. αναφ. στο Sindel, 1991), μετά από περίπου εννέα χρόνια το 15% των σπόρων παρέμενε βιώσιμο. Οι σπόροι είναι γυαλιστεροί, έχουν σκληρό περίβλημα, μήκος 5-8 mm (μέγεθος παρόμοιο με το μέγεθος κόκκου ρυζιού), χρώμα καφέ έως μαύρο και

στη μία άκρη τους αναπτύσσεται πάππος (pappus). Το βάρος των 1000 σπόρων κυμαίνεται από 13,9 έως 32,9 g (Andrzejewska & Sadowska, 2008; Rahimi & Kamali, 2012). Κατά την περίοδο ωρίμανσης των σπόρων του φυτού, ξεκινά η γήρανση του φυτού. Συνήθως, όταν οι σπόροι των πλευρικών κεφαλών έχουν ωριμάσει, το φυτό έχει ξεραθεί.

1.4. Γεωγραφική κατανομή του φυτού - Χρήσεις

Το γαϊδουράγκαθο (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), μέλος της οικογένειας Asteraceae, είναι συνήθως ένα χειμερινό μονοετές φυτό (Young, Evans & Hawkes, 1978), ενώ σε κάποιες περιοχές, όπως η Νέα Ζηλανδία, έχει διετή κύκλο ανάπτυξης (Martin, Deo & Douglas, 2000). Είναι αυτοφυές φυτό στις περιοχές της Νότιας Ευρώπης, της Νότιας Ρωσίας, της Μικράς Ασίας και της Βόρειας Αφρικής, ενώ έχει εγκλιματιστεί σε αρκετές χώρες της Κεντρικής Ευρώπης, στη Βόρεια και Νότια Αμερική, στη Νότια Αυστραλία και στην Κεντρική και Δυτική Ασία (Abevanoli *et al.*, 2010; Andrzejewska, Sadowska & Mielcarek, 2011). Υπάρχουν δύο βοτανικές ποικιλίες του γαϊδουράγκαθου, η μία έχει μωβ άνθη και είναι η κυρίαρχη ποικιλία στην οποία αναφέρονται σχεδόν όλες οι μελέτες, και η άλλη έχει λευκά άνθη και απαντάται σε κάποιες περιοχές, όπως η Αίγυπτος, το Ιράν κ.ά. (AbouZid, Chen & Pauli, 2016a).

Στην Ελλάδα, όπως και σε αρκετές χώρες, το γαϊδουράγκαθο θεωρείται ζιζάνιο και συναντάται στις άκρες των δρόμων και σε καλλιέργειες χειμερινών σιτηρών (Karkanis, Bilalis & Efthimiadou, 2011). Σε διάφορες καλλιέργειες (πχ. σιτάρι και ελαιοκράμβη) αποτελεί ζιζάνιο και προκαλεί μείωση των αποδόσεων (μεγαλύτερη από 35%) καθώς και προβλήματα στη συγκομιδή λόγω της μεγάλης βιομάζας του (Shimi, *et al.*, 2006; Khan, Blackshaw & Marwat, 2009). Ακόμη, αποτελεί πρόβλημα για βοσκοτόπους και μη καλλιεργούμενες εκτάσεις, γιατί εκτοπίζει άλλα ωφέλιμα είδη φυτών.

Τμήματα του φυτού, συνήθως τα νεαρά φύλλα και οι νεαροί εκπυσσόμενοι βλαστοί, καταναλώνονται ωμά ή αφού μαγειρευτούν, κυρίως σε χώρες της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής (Tukan, Takruri & Al-Eisawi, 1998; Vaknin *et al.*, 2008; García-Herrera *et al.*, 2014). Οι σπόροι του φυτού (βοτανολογικά ορθώς:

καρποί) χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς. Οι φαρμακευτικές ιδιότητες του γαϊδουράγκαθου οφείλονται στη σιλυμαρίνη, ένα μίγμα ενός φλαβονοειδούς και διαφόρων φλαβονολιγνάνων, που περιέχεται στο εκχύλισμα των σπόρων. Τα συμπληρώματα διατροφής που περιέχουν σιλυμαρίνη είναι μεταξύ των προϊόντων με τις μεγαλύτερες πωλήσεις στις ΗΠΑ και την Ευρώπη (Rosínska *et al.*, 2018). Η σιλυμαρίνη είναι το πρώτο σε κατανάλωση φυτοθεραπευτικό σκεύασμα σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (Seeff *et al.*, 2008), ενώ το 2017 το γαϊδουράγκαθο ήταν στη δέκατη έβδομη και στην έβδομη θέση μεταξύ των φυτικών συμπληρωμάτων στην πολυκαναλική αγορά και στο κανάλι πώλησης φυσικών προϊόντων, αντίστοιχα, στις ΗΠΑ (Smith *et al.*, 2018).

Το γαϊδουράγκαθο καλλιεργείται για την παραγωγή πρώτων υλών για τη φαρμακευτική βιομηχανία στην Αργεντινή, τη Γερμανία, την Αυστρία, την Ουγγαρία (Hlangothia *et al.*, 2016), την Πολωνία (Andrzejewska *et al.*, 2011), την Τσεχία (Školníková, Škarpa & Ryant, 2019), τη Σλοβακία (Habán *et al.*, 2009), τη Βουλγαρία (Zheljazkov *et al.*, 1996), την Ινδία (Ram *et al.*, 2005), το Ιράν και την Κίνα (Pei *et al.*, 2009) που είναι η κύρια παραγωγός χώρα. Έχουν αναπτυχθεί κάποιες εμπορικές ποικιλίες, όπως η Budakalaszti στην Ουγγαρία, η Khoreslo στο Ιράν (Fathi-Achachlouei & Azadmard-Damirchi, 2009), η Silma στην Πολωνία (Andrzejewska & Skinder, 2006) και οι Silyb και Mirel στην Τσεχία (Růžičková, Fojtová & Součková, 2011). Οι καλλιέργειες του γαϊδουράγκαθου συνεχίζουν να παρουσιάζουν χαρακτηριστικά των αυτοφυών φυτών, όπως τα ακανθώδη φύλλα, η ασύγχρονη άνθηση και ωρίμανση, η διασπορά των σπόρων και η μεταβλητότητα στην απόδοση και την ποιότητα της καλλιέργειας (Martinelli *et al.*, 2016).

Οι σπόροι του γαϊδουράγκαθου εκτός της σιλυμαρίνης περιέχουν και έλαιο, το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 18% και 31% του ξηρού βάρους του σπόρου (Alemardan, Karkanis & Salehi, 2013). Δεδομένης της σύνθεσής του, το έλαιο του γαϊδουράγκαθου έχει υψηλή διατροφική αξία και θα μπορούσε το φυτό να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βρώσιμου ελαίου, πρακτική που έχει ήδη αρχίσει να υλοποιείται (Alemardan *et al.*, 2013; Harrabi *et al.*, 2015).

Μελέτες έχουν δείξει ότι το γαϊδουράγκαθο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προγράμματα φυτοεξυγίανσης ή φυτοαποκατάστασης εδαφών που έχουν ρυπανθεί με ραδιενεργό κάισιο 134 (^{134}Cs) ή με βαρέα μέταλλα, όπως μόλυβδος, ψευδάργυρος και

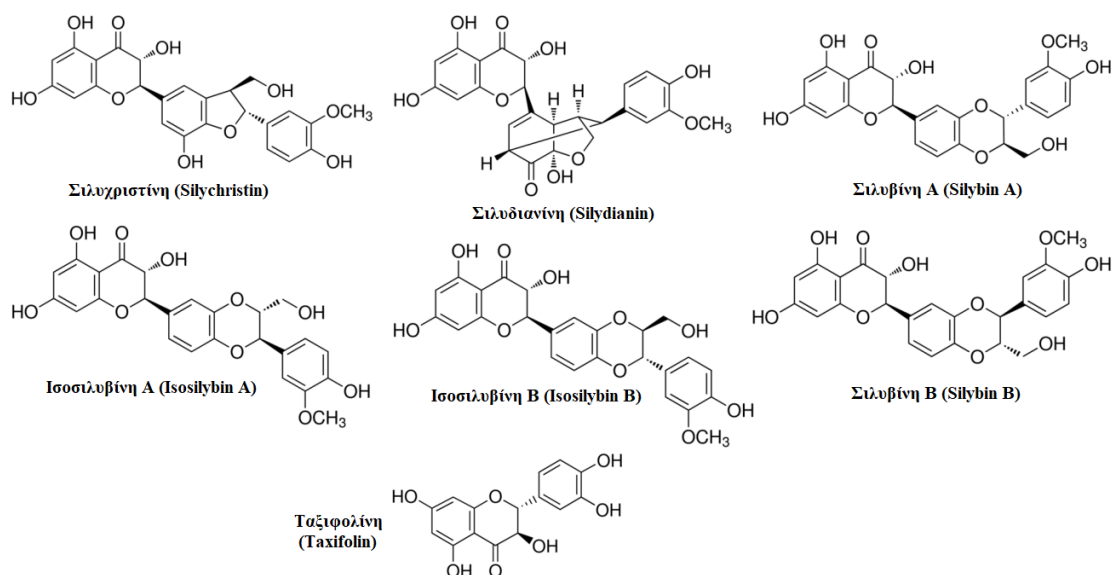
χρώμιο (Tang & Willey, 2003; Brunetti *et al.*, 2009). Η δράση αυτή του γαϊδουράγκαθου θα μπορούσε να συνδυαστεί με τη χρήση του φυτού για την παραγωγή βιομάζας, δεδομένου ότι η καταλληλότητά του για την παραγωγή βιομάζας καταδεικνύεται από αρκετές μελέτες (Ledda *et al.*, 2013; Domínguez *et al.*, 2017). Ακόμη, τα φυτά του γαϊδουράγκαθου ή οι σπόροι ή η σιλυμαρίνη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ζωοτροφές (Andrzejewska, Martinelli & Sadowska, 2015). Τέλος, το γαϊδουράγκαθο χρησιμοποιείται ως διακοσμητικό φυτό σε αμμώδη ή πετρώδη εδάφη (Das, Mukherjee & Vasudevan, 2008).

1.5. Χημική σύσταση της σιλυμαρίνης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι φαρμακευτικές ιδιότητες του γαϊδουράγκαθου οφείλονται στη σιλυμαρίνη, ένα μίγμα διαφόρων ουσιών, που περιέχεται στο εκχύλισμα των σπόρων. Παλαιότερα κυρίως, αλλά ακόμη και σήμερα δεν είναι ξεκάθαρο τι σημαίνει για τους ερευνητές ο όρος «σιλυμαρίνη». Κάποιοι με τον όρο αυτό αναφέρονται στο εκχύλισμα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου, κάποιοι άλλοι στις φλαβονολιγνάνες που υπάρχουν στο εκχύλισμα των σπόρων, ενώ οι περισσότεροι στο φλαβονοειδές ταξιφολίνη και τις κύριες φλαβονολιγνάνες που υπάρχουν στο εκχύλισμα (Šimánek *et al.*, 2000). Στην παρούσα διατριβή, ακολουθώντας και τη διεθνή πρακτική που εφαρμόζεται από τους περισσότερους ερευνητές (Kroll, Shaw & Oberlies, 2007), ως «σιλυμαρίνη» εννοούμε το άθροισμα της ταξιφολίνης και των κύριων φλαβονολιγνανών που υπάρχουν στο εκχύλισμα των σπόρων του φυτού. Κάποιοι ερευνητές σήμερα, αντί του όρου «σιλυμαρίνη», αναφέρονται στις φλαβονολιγνάνες του φυτού ή στις φλαβονολιγνάνες του εκχυλίσματος των σπόρων.

Οι σπόροι του γαϊδουράγκαθου περιέχουν λιπίδια, πρωτεΐνες, σάκχαρα, τοκοφερόλες, στερόλες, φλαβονοειδή, φλαβονολιγνάνες και πολυφαινολικές ενώσεις (Khan *et al.*, 2007; Abevanoli *et al.*, 2010). Αφού απομακρυνθούν τα λιπίδια, στο εκχύλισμα των σπόρων, συνήθως σε μεθανόλη, περιέχεται η σιλυμαρίνη και μία ποσότητα απροσδιόριστων πολυφαινολικών ενώσεων που συχνά αναφέρονται ως «πολυμερικό κλάσμα» και το οποίο μπορεί να αποτελεί μέχρι και το 30-40% του εκχυλίσματος (Biedermann *et al.*, 2014; Chambers *et al.*, 2017).

Τα κύρια συστατικά της σιλυμαρίνης είναι το φλαβονοειδές ταξιφολίνη (taxifolin) και οι φλαβονολιγνάνες σιλυχριστίνη (silychristin), σιλυδιανίνη (silydianin), σιλυβίνη A (silybin A), σιλυβίνη B (silybin B), ισοσιλυβίνη A (isosilybin A) και ισοσιλυβίνη B (isosilybin B). Οι φλαβονολιγνάνες αυτές είναι ισομερείς ενώσεις με σχετική μοριακή μάζα 482 (Kim *et al.*, 2003; Shibano *et al.*, 2007; Liu, Du & Yuan, 2009a).



Εικόνα 1.2. Χημικοί τύποι των κύριων συστατικών της σιλυμαρίνης.

Τα παραπάνω συστατικά της σιλυμαρίνης είναι οι φυτοχημικές ενώσεις που έχουν μελετηθεί περισσότερο, όπως φαίνεται και από τις περίπου 200 μελέτες που δημοσιεύονται κάθε χρόνο σχετικά με αυτές (Chambers, Valentová & Křen, 2015). Άλλα συστατικά της σιλυμαρίνης αποτελούν, μεταξύ άλλων, η ισοσιλυχριστίνη (isosilychristin), η σιλυχριστίνη B (silychristin B), οι ισοσιλυβίνες C και D (isosilybin C, isosilybin D), η 2,3-cis-σιλυβίνη A και η 2,3-cis-σιλυβίνη B (Kaloga, 1981; Smith *et al.*, 2005; Sy-Cordero *et al.*, 2010; Kuki *et al.*, 2012).

Οι φλαβονολιγνάνες της σιλυμαρίνης προέρχονται από την αντίδραση της κονιφερόλης (coniferyl alcohol) με την ταξιφολίνη μέσω δύο πιθανών βιοσυνθετικών οδών (Schrall & Becker, 1977; Althagafy *et al.*, 2013). Η σιλυβίνη A και η σιλυβίνη B αποτελούν ζεύγος διαστερεοϊσομερών, όπως και η ισοσιλυβίνη A με την ισοσιλυβίνη B (Lee & Liu, 2003). Ακόμη, η σιλυβινίνη (silybinin) είναι ένα σχεδόν ισομοριακό μίγμα των σιλυβινών A και B, του οποίου ο διαχωρισμός είναι εξαιρετικά

περίπλοκος (Křen *et al.*, 2009). Τέλος, όσον αφορά τη διαλυτότητα, η σιλυβίνη έχει πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό (430 mg/L), ενώ η σιλυμαρίνη θεωρείται πρακτικά αδιάλυτη στο νερό (Gažák *et al.*, 2004; Shakeel *et al.*, 2014).

Το τυποποιημένο εκχύλισμα σιλυμαρίνης περιέχει περίπου 70% έως 80% φλαβονολιγνάνες, ενώ περίπου το 20-30% είναι ένα χημικά μη προσδιορισμένο κλάσμα, το οποίο αποτελείται κυρίως από πολυμερικές και οξειδωμένες πολυφαινολικές ενώσεις (Křen & Walterova, 2005). Για παράδειγμα, ένα εμπορικό εκχύλισμα σιλυμαρίνης (Indena) περιείχε 2,2% ταξιφολίνη, 9,4% σιλυχριστίνη, 15,5% σιλυδιανίνη, 1,5% ισοσιλυχριστίνη, 13,1% σιλυβίνη Α, 21,6% σιλυβίνη Β, 6,6% ισοσιλυβίνη Α και 3,9% ισοσιλυβίνη Β (Davis-Searles *et al.*, 2005).

Η βοτανική ποικιλία του γαϊδουράγκαθου με τα λευκά άνθη περιέχει φλαβονολιγνάνες που δεν έχουν προέλθει από την ταξιφολίνη. Οι κυριότερες από αυτές είναι η σιλανδρίνη (silandrin), η σιλυμονίνη (silymonin), η σιλυχερμίνη (silyhermin) και η ισοσιλανδρίνη (isosilandrin) κ.ά. (Chambers *et al.*, 2015).

1.6. Περιεκτικότητα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου σε σιλυμαρίνη και τα συστατικά της

Η σιλυμαρίνη υπάρχει σε διάφορα τμήματα του φυτού, όπως οι ρίζες, τα άνθη και τα φύλλα (Martin *et al.*, 2006; Omar, Hadad & Badr, 2012), αλλά συσσωρεύεται κυρίως στο περίβλημα (integument) του σπόρου (Cappelletti & Caniato, 1984; Giuliani *et al.*, 2018). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή και την Αμερικανική Φαρμακοποιία, οι ώριμοι σπόροι του γαϊδουράγκαθου αποδίδουν τουλάχιστον 1,5-2%, του ξηρού βάρους τους, ως τυποποιημένο εκχύλισμα σιλυμαρίνης (AbouZid *et al.*, 2016b).

Η περιεκτικότητα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου σε σιλυμαρίνη, όπως και η αναλογία των συστατικών της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον γονότυπο του φυτού, τη γεωγραφική θέση της καλλιέργειας, φυσικές και χημικές ιδιότητες εδάφους, τις καιρικές συνθήκες (ανομβρία, συνεχείς βροχοπτώσεις, παγετός) και τις εφαρμοζόμενες καλλιεργητικές τεχνικές (χρόνος σποράς, βάθος σποράς, πυκνότητα καλλιέργειας, λίπανση, άρδευση, χρόνος και τρόπος συγκομιδής, στάδιο ωριμότητας

σπόρων) (Omer *et al.*, 1993; Sadowska & Andrzejewska, 2008; Shokrpour *et al.*, 2008; Radjabian, Rezazadeh & Fallah Huseini, 2008; Karkanis *et al.*, 2011)

Στη Νέα Ζηλανδία, σε πειράματα που διεξήγαγαν οι Martin *et al.* (2006), η περιεκτικότητα των σπόρων σε σιλυμαρίνη (μόνο φλαβονολιγνάνες) εικοσιπέντε γηγενών βιότυπων γαϊδουράγκαθου κυμάνθηκε από 1,03% έως 4,27%, με τον μέσο όρο να είναι 2,47%. Σε καλλιέργεια των βιότυπων αυτών η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε μεταξύ 2,22% και 3,78%, με τον μέσο όρο να είναι 3,13% (για όσους βιότυπους παρήγαγαν σπόρους). Σε καλλιέργεια δύο ποικιλιών γαϊδουράγκαθου από την Γερμανία και την Πολωνία (Silma), που πραγματοποιήθηκε στην ίδια περιοχή, η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη ήταν 2,58% και 2,53%, αντίστοιχα. Όσον αφορά την περιεκτικότητα των φλαβονολιγνάνων στα εκχυλίσματα των εικοσιπέντε βιότυπων, καταγράφηκαν κατά μέσο όρο 24,3% σιλυχριστίνη Α, 3,9% σιλυχριστίνη Β, 23,3% σιλυβίνη Α, 35,7% σιλυβίνη Β, 8,3% ισοσιλυβίνη Α, 2,1% ισοσιλυβίνη Β και καθόλου σιλυδιανίνη.

Στην Αίγυπτο, σε έρευνα των Omar *et al.* (2012) σε καλλιέργεια γαϊδουράγκαθου στην περιοχή Sharkia, η περιεκτικότητα των σπόρων σε σιλυμαρίνη υπολογίστηκε σε 3,79% (1,02% ταξιφολίνη και 2,77% φλαβονολιγνάνες). Σε άλλη έρευνα που διεξήγαγαν οι Elwekeel, Elfishawy και AbouZid (2013) σε φυτά γαϊδουράγκαθου από την περιοχή του κυβερνείου Beni-Suef, της οποίας το κλίμα χαρακτηρίζεται ως ζεστό ερημικό, η περιεκτικότητα σε φλαβονολιγνάνες ήταν 3,5%. Η περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε φλαβονολιγνάνες ήταν 5,6% σιλυχριστίνη, 20,7% σιλυδιανίνη, 31,1% σιλυβίνη και 10,7% ισοσιλυβίνη. Τέλος, σε έρευνα των AbouZid *et al.* (2016a) σε γηγενείς πληθυσμούς, που συλλέχθηκαν από εννέα διαφορετικές περιοχές της Αιγύπτου, η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε από 0,59% έως 2,19%. Σε μετρήσεις που έγιναν σε τρεις πληθυσμούς της ποικιλίας του γαϊδουράγκαθου με λευκά άνθη η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη που καταγράφηκε ήταν 0,06%, 0,92% και 1,59%.

Στο Ιράν, σε βιότυπους που συλλέχθηκαν από δεκατρείς περιοχές στα βόρεια, δυτικά και νοτιανατολικά της χώρας, η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε από 0,69% έως 2,71% (Hasanloo *et al.*, 2005). Σε έρευνα που διεξήγαγαν οι Shokrpour *et al.* (2008) σε βόρειες, βορειοδυτικές και νοτιοδυτικές περιοχές του Ιράν, που χαρακτηρίζονται από ζεστά καλοκαίρια, ήπιους χειμώνες και υψηλή σχετική υγρασία,

συνέλεξαν και ανέλυσαν τριάντα δύο βιότυπους. Ο μέσος όρος της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη των σπόρων από τις βόρειες και βορειοδυτικές περιοχές του Ιράν ήταν 1,44%, ενώ στις νοτιοδυτικές περιοχές ήταν 1,52%. Ακόμη, σε πειράματα που πραγματοποίησαν οι Afshar *et al.* (2015) στην Τεχεράνη μελέτησαν την επίδραση της άρδευσης στη συσσώρευση της σιλυμαρίνης. Σε μία περίοδο δύο ετών, σε καλά αρδευόμενα εδάφη ο μέσος όρος της σιλυμαρίνης ήταν 1,81%, ενώ σε ήπιες και έντονες συνθήκες στρες νερού η περιεκτικότητα ήταν 1,88% και 2,12%, αντίστοιχα.

Στον Καναδά, οι Carrier *et al.* (2003) καλλιέργησαν φυτά γαϊδουράγκαθου στην περιοχή Saskatchewan με σπόρους που είχαν προμηθευτεί από εταιρεία εμπορίας σπόρων. Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη την πρώτη χρονιά της καλλιέργειας ήταν 2,93%, ενώ τη δεύτερη χρονιά ήταν 2,37%. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπολογίστηκε η ποσότητα της ισοσιλβίνης Β (Chambers *et al.*, 2017).

Στη Χιλή, σε πειράματα που πραγματοποίησαν οι Hevia *et al.* (2007) στην περιοχή Concerción χρησιμοποίησαν έναν γηγενή γονότυπο, που συλλέχθηκε από την περιοχή, και έναν γονότυπο από τη Γερμανία. Η μέση τιμή της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη για τον χιλιανό γονότυπο ήταν 5,1%, ενώ για τον γονότυπο από τη Γερμανία ήταν 4,5%.

Στην Ινδία, οι Ram *et al.* (2005) καλλιέργησαν πέντε γηγενείς πληθυσμούς από την περιοχή Jammu και δέκα πληθυσμούς από διάφορες χώρες. Για τους πληθυσμούς από την Ινδία η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε από 2,00% έως 3,56% με τον μέσο όρο να είναι 2,79%. Για τέσσερεις πληθυσμούς από την Ιταλία ο μέσος όρος της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη ήταν 2,74%, για δύο βιότυπους από την Ουγγαρία ήταν 2,42%, ενώ για τους πληθυσμούς από το Ισραήλ, τη Ρουμανία, τη Γερμανία και την Αργεντινή ήταν 2,50%, 2,75%, 2,85% και 2,50%, αντίστοιχα.

Στην Πολωνία, πειράματα αγρού πραγματοποιήθηκαν σε τρεις καλλιεργητικές περιόδους, στην περιοχή Mochelek, με σπόρους της πολωνικής εμπορικής ποικιλίας Silma (Andrzejewska *et al.*, 2011). Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε από 1,89% έως 2,76%, με τον μέσο όρο να είναι 2,46% (0,31% ταξιφολίνη και 2,18% φλαβονολιγνάνες). Η περιεκτικότητα των κύριων συστατικών των φλαβονολιγνάνων ήταν κατά μέσο όρο 33,9% σιλυχριστίνη, 15,1% σιλυδιανίνη, 39,0% σιλυβίνη και 11,9% ισοσιλβίνη.

Στη Σλοβακία, οι Habán *et al.* (2009) καλλιέργησαν την εμπορική ποικιλία Silyb στην περιοχή Nitra σε δύο καλλιεργητικές περιόδους, υπό διάφορες συνθήκες. Την πρώτη περίοδο η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε από 0,84% έως 1,40%, ενώ τη δεύτερη καλλιεργητική περίοδο καταγράφηκαν τιμές μεταξύ 1,51% και 2,00%.

Σε πειράματα που διεξήγαγαν οι Porpe και Petersen (2016) σε δύο βιότυπους γαϊδουράγκαθου που συνέλλεξαν από τους βοτανικούς κήπους του Marburg και της Φρανκφούρτης στη Γερμανία και σε τέσσερις ποικιλίες που προμηθεύτηκαν από εταιρείες εμπορίας σπόρων, από την Πολωνία, την Ουγγαρία και τη Βουλγαρία, η περιεκτικότητα σε φλαβονολιγνάνες κυμάνθηκε από περίπου 0,8% (Βουλγαρία) έως 2,8% (ποικιλία Klenk - Πολωνία). Στους βιότυπους από το Marburg και την Φρανκφούρτη η περιεκτικότητα σε φλαβονολιγνάνες ήταν περίπου 1,7% και 2,4% αντίστοιχα, ενώ στη δεύτερη ποικιλία από την Πολωνία (Caelo) ήταν περίπου 1,0% και στην ποικιλία από την Ουγγαρία (Galke) ήταν περίπου 1,8%. Όταν η απομόνωση των φλαβονολιγνάνων της σιλυμαρίνης έγινε από πλήρως ώριμους και άρτιους σπόρους η περιεκτικότητα για τους βιότυπους από το Marburg, την Φρανκφούρτη και το Klenk υπολογίστηκε σε περίπου 3,0%, 4,0% και 4,5%, αντίστοιχα.

Τέλος, οι Martinelli *et al.* (2016) μελέτησαν είκοσι ένα πληθυσμούς του φυτού που προμηθεύτηκαν από Ινστιτούτα της Γερμανίας, της Αυστρίας και της Ουγγαρίας και είχαν συλλεχθεί από διάφορες χώρες, καθώς και πέντε πληθυσμούς που συνέλλεξαν από την Ιταλία (βοτανικός κήπος Σιένας και Νάπολης και 3 γηγενείς πληθυσμοί από την Κεντρική Ιταλία), τους οποίους καλλιέργησαν σε συνθήκες αγρού. Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε από 3,56% (Καναδάς) έως 5,41% (αυτοφυής πληθυσμός), ενώ ο μέσος όρος ήταν 4,48% (0,29% ταξιφολίνη και 4,19% φλαβονολιγνάνες). Στους πληθυσμούς συμπεριλαμβάνονταν και πληθυσμοί από τη Βόρεια Κορέα, τη Μεγάλη Βρετανία, την Ισπανία και το Βέλγιο, με την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη να υπολογίζεται σε 4,98%, 5,28%, 4,38% και 3,66%, αντίστοιχα. Ακόμη, ο μέσος όρος της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη των ιταλικών πληθυσμών ήταν 5,12%. Όσον αφορά την αναλογία των συστατικών της σιλυμαρίνης παρατηρήθηκε μεγάλη διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς, με τον μέσο όρο να είναι περίπου 6,6% ταξιφολίνη, 11,6% σιλυχριστίνη, 47,6% σιλυδιανίνη, 9,7% σιλυβίνη Α, 11,2% σιλυβίνη Β, 7,1% ισοσιλυβίνη Α και 5,1% ισοσιλυβίνη Β. Η περιεκτικότητα των πληθυσμών σε σιλυβίνη Α ξεπέρασε τα 10,0 mg/g ξηρού βάρους

μόνο σε πέντε από τους είκοσι έξι πληθυσμούς, με την πλειοψηφία αυτών (δεκαπέντε πληθυσμοί) να έχουν περιεκτικότητα μικρότερη του 1,5 mg/g ξηρού βάρους σπόρου. Στους δεκαπέντε αυτούς πληθυσμούς η περιεκτικότητα (mg/g) της ισοσιλβίνης Α ή της ισοσιλβίνης Β ήταν μεγαλύτερη από την περιεκτικότητα τόσο σε σιλυβίνη Α όσο και σε σιλυβίνη Β.

Όλα τα παραπάνω φανερώνουν τη σημαντική επίδραση που έχουν ο καλλιεργούμενος γονότυπος (π.χ. πληθυσμός, βιότυπος, ποικιλία) και η περιοχή καλλιέργειας του φυτού στην περιεκτικότητα και τη σύσταση της σιλυμαρίνης. Ακόμη, αρκετοί από τους παραπάνω πληθυσμούς ή βιότυπους του γαϊδουράγκαθου μπορούν να ενταχθούν σε προγράμματα βελτίωσης για τη δημιουργία ποικιλιών με υψηλή περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη.

1.7. Περιεκτικότητα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου σε έλαιο

Οι σπόροι του γαϊδουράγκαθου, εκτός της σιλυμαρίνης, περιέχουν και έλαιο, η περιεκτικότητα του οποίου κυμαίνεται περίπου μεταξύ 17% και 33% του ξηρού βάρους του σπόρου (Růžičková *et al.*, 2011; Nikolaychenko *et al.*, 2018). Τα κύρια λιπαρά οξέα είναι το λινελαϊκό και το ελαϊκό οξύ, ενώ υπάρχουν ακόμα σε μικρότερα ποσοστά το παλμιτικό, το στεατικό, το λινολενικό, το αραχιδικό και το βεχενικό οξύ (Malekzadeh *et al.*, 2011, Martinelli *et al.*, 2016). Ερευνητές διαπίστωσαν ότι το έλαιο του γαϊδουράγκαθου, του οποίου η σύσταση προσιδιάζει με τη σύσταση του ηλιέλαιου, έχει υψηλή διατροφική αξία, αποτελεί πηγή της βιταμίνης Ε, έχει σχετικά καλή διάρκεια ζωής και προτείνουν τη χρήση του ως βρώσιμου ελαίου και ως συστατικού κατάλληλου τόσο για φαρμακευτικές όσο και για καλλυντικές εφαρμογές (El-Mallah, El-Shami & Hassanein, 2003; Meddeb *et al.*, 2017). Σε ανάλυση των αιθέριων ελαίων των σπόρων του γαϊδουράγκαθου οι Mhamdi *et al.* (2016) βρήκαν η περιεκτικότητά τους ήταν 0,12% του ξηρού βάρους, ενώ ανίχνευσαν δεκατρείς ουσίες, με τις γ-καδινένιο (49,8%) και α-πινένιο (24,5%) να βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες.

Η περιεκτικότητα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου σε έλαιο, όπως και η περιεκτικότητα στα συστατικά της σιλυμαρίνης, επηρεάζεται από τον γονότυπο του φυτού, τη γεωγραφική θέση της καλλιέργειας και τις καιρικές και αγρονομικές

συνθήκες (Ghavami & Ramin, 2008; Malekzadeh *et al.*, 2011; Růžičková *et al.*, 2011; Meddeb *et al.*, 2017).

Στην Τυνησία, σε πειράματα που πραγματοποίησαν οι Mhamdi *et al.* (2016) και οι Meddeb *et al.* (2017) διαπίστωσαν ότι τα κύρια συστατικά του ελαίου του γαϊδουράγκαθου ήταν το λινελαϊκό (50,5-60,3%), το ελαϊκό (15,5-30,2%), το παλμιτικό (5,5-11,4%), το στεατικό (2,9-4,8%), το αραχιδικό (1,8-2,9%) και το βεγενικό οξύ (0,9-2,5%).

Στην Ινδία, σε μία «νάνα» ποικιλία (SMB-5) του γαϊδουράγκαθου η περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο ήταν 18-22%, ενώ τα κύρια συστατικά του ήταν το λινελαϊκό (45,8%), το ελαϊκό (30,9%), το παλμιτικό (9,6%), το στεατικό (4,7%), το λινολενικό (5,3%) και το βεγενικό οξύ (2,4%) (Bahl *et al.*, 2015).

Στη Βουλγαρία, σε πειράματα που διεξήγαγαν οι Zhelev *et al.* (2014) σε βιότυπο του γαϊδουράγκαθου από τα βορειοανατολικά της χώρας, η περιεκτικότητα σε έλαιο ήταν 23,2%, ενώ τα κύρια συστατικά του ήταν το ελαϊκό (50,3%), το λινελαϊκό (27,7%), το παλμιτικό (14,2%), το αραχιδικό (3,0%) και το στεατικό οξύ (2,0%).

Στο Ιράν, η περιεκτικότητα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου σε έλαιο ήταν 26-31%, ενώ τα κύρια συστατικά του ήταν το λινελαϊκό (50-54%), το ελαϊκό (23-29%), το παλμιτικό (7-8%) και το στεατικό οξύ (5-7%) (Fathi-Achachlouei & Azadmard-Damirchi, 2009; Fathi-Achachlouei *et al.*, 2019).

Η περιεκτικότητα σε έλαιο των σπόρων του γαϊδουράγκαθου στην Πολωνία κυμάνθηκε από 19,2% έως 23,7%, ενώ στην Τσεχία είχε τιμές μεταξύ 17,5% και 21,6% (Andrzejewska *et al.*, 2011; Růžičková *et al.* (2011). Σε πειράματα που έκαναν οι Růžičková *et al.* (2011) και οι Prescha *et al.* (2014) σε βιότυπους από την Πολωνία και την Τσεχία διαπίστωσαν ότι τα κύρια συστατικά του ελαίου του γαϊδουράγκαθου ήταν το λινελαϊκό (55,8-66,4%), το ελαϊκό (16,3-22,9%), το παλμιτικό (7,2-8,5%), το στεατικό (3,6-6,3%) και το αραχιδικό οξύ (2,1-3,3%).

Στη Ρωσία, στην περιοχή του Βόλγα (κλίμα στέπας), η περιεκτικότητα σε έλαιο κυμαίνεται από 26,8 έως 33,6% (Nikolaychenko *et al.*, 2018). Σε πειράματα που πραγματοποίησαν οι Martinelli *et al.* (2016) σε είκοσι έξι πληθυσμούς γαϊδουράγκαθου από διάφορες χώρες, η περιεκτικότητα των σπόρων σε έλαιο κυμάνθηκε από 26,7% έως 31,7%, ενώ ο μέσος όρος των περιεκτικότητων των

κύριων συστατικών ήταν λινελαϊκό (56,1%), ελαϊκό (22,2%), παλμιτικό (9,9%), στεατικό (6,2%), αραχιδικό (2,7%) και βεχενικό οξύ (1,7%).

Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι, όπως και στην περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη, ο γονότυπος, οι κλιματικές συνθήκες και η περιοχή καλλιέργειας επηρεάζουν σημαντικά την περιεκτικότητα του συγκεκριμένου είδους σε έλαιο καθώς και τη σύσταση του ελαίου. Ακόμη, το παραπάνω γενετικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προγράμματα βελτίωσης για τη δημιουργία ποικιλιών με μεγάλη περιεκτικότητα σε έλαιο.

Σύμφωνα με έρευνα για τη σύσταση των λιπαρών οξέων σε δεκατέσσερα φυτικά έλαια, το έλαιο του γαϊδουράγκαθου αποτελείται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (64,2%), από μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (20,7%) και από κορεσμένα λιπαρά οξέα (15,1%). Η σύσταση αυτή προσιδιάζει κυρίως με τη σύσταση του σιτέλαιου και του ηλιέλαιου, ενώ διαφέρει πολύ από τη σύσταση του ελαιόλαδου (18,0% πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, 68,2% μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, 19,4% κορεσμένα λιπαρά οξέα – 66,4% ελαϊκό, 16,5% παλμιτικό, 16,4% λινελαϊκό και 2,3% στεατικό οξύ) (Orsanova *et al.*, 2015).

1.8. Απομόνωση της σιλυμαρίνης

Στις αρχές τις δεκαετίας του 1970, οι Wagner, Diesel και Seitz (1974) απομόνωσαν τις ουσίες που είναι γνωστές ως σιλυμαρίνη από τους σπόρους του φυτού *Silybum marianum*. Η τυπική μέθοδος για την απομόνωση της σιλυμαρίνης από τους σπόρους του γαϊδουράγκαθου περιλαμβάνει την αφαίρεση του ελαίου των σπόρων με τη χρήση πετρελαϊκού αιθέρα ή εξανίου, ή τη μερική αφαίρεση του ελαίου με σύνθλιψη, και μετά την εκχύλιση του υπολείμματος με μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη ή οξικό αιθυλεστέρα, είτε με εξίκμαση (percolation) είτε με συσκευή Soxhlet. Στη βιομηχανία ως διαλύτης χρησιμοποιείται συνήθως η ακετόνη ή ο οξικός αιθυλεστέρας (Csupor, Csorba & Hohmann, 2016; Chambers *et al.*, 2017).

Μία μέθοδος για την απομόνωση της σιλυμαρίνης από τους σπόρους του γαϊδουράγκαθου σε βιομηχανικό επίπεδο αναφέρθηκε από τους Madaus, Gorler και Molls (1983). Σύμφωνα με αυτή, μεγάλο μέρος του ελαίου των σπόρων αφαιρείται με σύνθλιψη και μετά γίνεται εκχύλιση του υπολείμματος με οξικό αιθυλεστέρα.

Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη, αφαίρεση του ελαίου του υπολείμματος με πετρελαϊκό αιθέρα, διάλυσή του σε μεθανόλη και καθαρισμός με χλωροφόρμιο και νερό.

Όπως αναφέρεται από τους Benthin, Danz και Hamburger (1999), η διαδικασία απομόνωσης της σιλυμαρίνης από τους σπόρους του γαϊδουράγκαθου σύμφωνα με τη Γερμανική Φαρμακοποιία (DAB 9 monograph), περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά, 5g κονιοποιημένων σπόρων (κόσκινο 710 μm) εκχυλίζονται σε συσκευή Soxhlet με 100 mL πετρελαϊκού αιθέρα για 4 ώρες, ώστε να απομακρυνθεί το έλαιο και μετά ακολουθεί μία νέα εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet με 100 mL μεθανόλης για 5 ώρες. Οι παραπάνω ερευνητές πρότειναν μία νέα τεχνική εκχύλισης για την απομόνωση της σιλυμαρίνης, την εκχύλιση με υγρό υπό πίεση. Χρησιμοποίησαν αρχικά 20 mL εξανίου σε έναν κύκλο εκχύλισης, για την αφαίρεση του ελαίου των σπόρων, και έπειτα η απομόνωση της σιλυμαρίνης έγινε με τη χρήση 20 mL μεθανόλης σε έναν κύκλο εκχύλισης, διάρκειας 5 λεπτών. Η ποσότητα της σιλυβίνης (12mg/g) ήταν περίπου η ίδια με αυτή της μεθόδου της Φαρμακοποιίας (11mg/g), όμως η κατανάλωση των διαλυτών ήταν υποπενταπλάσια.

Οι Kahol *et al.* (2001) πρότειναν έναν διαφορετικό τρόπο απομόνωσης της σιλυμαρίνης. Τα βασικά στάδια της διαδικασίας περιελάμβαναν αρχικά ψύξη των σπόρων στους -20 °C για 24 ώρες, κονιοποίηση των σπόρων, εκχύλιση (τύπου Soxhlet) με εξάνιο για 6 ώρες και μετά μία διαδικασία εξίκμασης με ακετονιτρίλιο στους 20-30 °C για 3 ώρες, επαναλαμβανόμενη άλλες δύο φορές.

Οι Wallace *et al.* (2003a) χρησιμοποίησαν μία λίγο διαφορετική τεχνική από αυτή της Φαρμακοποιίας· έγινε αρχικά εκχύλιση Soxhlet με πετρελαϊκό αιθέρα για 24 ώρες και μετά εκχύλιση Soxhlet με αιθανόλη για 4 ώρες. Η ποσότητα της σιλυβίνης που απομονώθηκε ήταν 16 mg/g, αλλά η διαφορά δεν μπορεί να θεωρηθεί σημαντική, δεδομένου ότι μπορεί να οφειλόταν σε διαφορετική περιεκτικότητα των σπόρων σε σιλυμαρίνη και τα συστατικά της.

Η χρήση της αιθανόλης, της μεθανόλης, του ακετονιτρίλιου και της ακετόνης ως διαλύτες στην διαδικασία εκχύλισης των σπόρων του γαϊδουράγκαθου δοκιμάστηκε από διάφορους ερευνητές (Wallace, Carrier & Clausen, 2003b; 2005). Διαπιστώθηκε ότι η αιθανόλη είναι ο προτιμώμενος διαλύτης, αφού η εκχύλιση με αυτή απέδωσε τη μεγαλύτερη ποσότητα σιλυμαρίνης, αν και παρατηρήθηκε μερική αποικοδόμηση των

ουσιών, ακολουθούμενη κοντά από τη μεθανόλη και μετά από το ακετονιτρίλιο και την ακετόνη. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι το στάδιο απομάκρυνσης του ελαίου των σπόρων του φυτού πριν την εκχύλιση της σιλυμαρίνης είναι απαραίτητο, γιατί με αυτό η απόδοση σε σιλυμαρίνη διπλασιάζεται. Πρέπει να σημειωθεί ότι η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία προτείνει τη χρήση της μεθανόλης ως διαλύτη για την εκχύλιση της σιλυμαρίνης από τους σπόρους του γαϊδουράγκαθου (Wianowska & Wiśniewski, 2015).

Οι Barreto *et al.* (2003) δοκίμασαν μία ασυνεχή διεργασία εκχύλισης (batch extraction) με θερμό νερό για την απομόνωση της σιλυμαρίνης. Η εκχύλιση έγινε σε κονιοποιημένους σπόρους χωρίς να έχει προηγηθεί το στάδιο της απομάκρυνσης του ελαίου των σπόρων. Μετά από 210 λεπτά εκχύλισης σε θερμοκρασία 100 °C, η απόδοση σε ταξιφολίνη και σιλυχριστίνη ήταν μεγαλύτερη από αυτή της τεχνικής των Wallace *et al.* (2003a), αλλά όμως η απόδοση σε σιλυβίνη (A και B) ήταν πολύ μικρότερη (5 mg/g). Η χρήση του νερού ως διαλύτη εκχύλισης των σπόρων του γαϊδουράγκαθου δοκιμάστηκε και από τους Wallace *et al.* (2005), ενώ οι Duan, Carrier και Clausen (2004), δοκίμασαν το νερό σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 100 °C. Η μέγιστη απόδοση σε σιλυμαρίνη δεν αυξανόταν περαιτέρω με την αύξηση της θερμοκρασίας, πιθανόν λόγω της σημαντικής αποικοδόμησης των ουσιών, αλλά ο χρόνος που απαιτήθηκε για να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση μειώθηκε από 200 σε 55 λεπτά, όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 100 °C στους 140 °C. Παρατηρήθηκε έντονη αποικοδόμηση των ουσιών στους 140 °C. Μία παραλλαγή της εκχύλισης με θερμό νερό υπό πίεση προτάθηκε από τους Bunnell *et al.* (2010), με απόδοση όμως μικρότερη από αυτή της εκχύλισης Soxhlet.

Οι Subramaniam *et al.* (2008) παρατήρησαν ότι μία προκατεργασία των κονιοποιημένων σπόρων με διάλυμα 1,5% H₂SO₄ (w/w) για 24 ώρες, ακολουθούμενη από εκχύλιση Soxhlet με νερό για 4 ώρες, είχε την ίδια απόδοση σε σιλυμαρίνη με την εκχύλιση σε δύο στάδια με πετρελαϊκό αιθέρα και αιθανόλη. Μειονέκτημα της προτεινόμενης διαδικασίας ήταν ότι ο διαχωρισμός των διαλυμένων φυτοχημικών ουσιών στο νερό θα απαιτούσε περισσότερη ενέργεια.

Οι Liu *et al.* (2009b) εφάρμοσαν μία διαφορετική τεχνική, χρησιμοποιώντας ένζυμα, για την απομόνωση της σιλυμαρίνης μετά το στάδιο της απομάκρυνσης του ελαίου των σπόρων, με ανακίνηση του δείγματος με πετρελαϊκό αιθέρα τρεις φορές.

Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο πηκτινάση και μετά την κατεργασία του δείγματος με το ένζυμο, ακολούθησε διήθηση και εκχύλιση με επαναρροή του υπολείμματος με αιθανόλη για 1 ώρα, τρεις φορές. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε και εκχύλιση με επαναρροή δείγματος σπόρων, από τους οποίους είχε απομακρυνθεί το έλαιο, με αιθανόλη για 3 ώρες, τρεις φορές. Η απόδοση της υποβοηθούμενης από την πηκτινάση εκχύλισης ήταν $24,8 \pm 1,9$ mg ανά g ξηρού βάρους σπόρων από τους οποίους είχε αφαιρεθεί το έλαιο, και ήταν κατά 138% μεγαλύτερη από αυτή της διαδικασίας χωρίς τη χρήση ενζύμου ($10,4 \pm 1,6$ mg/g).

Οι Wianowska και Wiśniewski (2015) εφάρμοσαν την τεχνική της εκχύλισης με υγρό υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες την ακετόνη, τη μεθανόλη και τον οξικό αιθυλεστέρα. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων πραγματοποίησαν και εκχύλιση 2,0 g σπόρων του γαϊδουράγκαθου με 75 mL εξανίου για 6 ώρες και μετά εκχύλιση του υπολείμματος με 75 mL μεθανόλης για 5 ώρες. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι καλύτερος διαλύτης για την εκχύλιση με υγρό υπό πίεση ήταν η ακετόνη, αν και μόνο η ποσότητα της σιλυδιανίνης ήταν μεγαλύτερη από ότι με την εκχύλιση με μεθανόλη. Η εκχύλιση με τον οξικό αιθυλεστέρα απέδωσε σημαντικά μικρότερη ποσότητα σιλυμαρίνης. Ακόμη οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι οι ποσότητες της σιλυμαρίνης ήταν οι ίδιες ανεξάρτητα από το αν είχε αφαιρεθεί ή όχι το έλαιο από τους σπόρους. Όταν όμως είχε προηγηθεί το στάδιο της αφαίρεσης του ελαίου τα εκχυλίσματα ήταν πιο διαφανή με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια κατά τον προσδιορισμό των συστατικών της σιλυμαρίνης με την αναλυτική μέθοδο. Η θερμοκρασία εκχύλισης κυμάνθηκε από 50 °C έως 150 °C. Παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση στην ποσότητα της σιλυμαρίνης όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 50 °C στους ~100-125 °C. Αυτό οφειλόταν στην αύξηση του ρυθμού μεταφοράς της σιλυμαρίνης από το υπόστρωμα στο διαλύτη και στην αύξηση της διαλυτότητας της σιλυμαρίνης στο διαλύτη. Περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε θερμική αποικοδόμηση της σιλυμαρίνης. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι οι καλύτερες συνθήκες για την εκχύλιση με υγρό υπό πίεση της σιλυμαρίνης από σπόρους γαϊδουράγκαθου ήταν να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης η ακετόνη, η διαδικασία να λάβει χώρα στους 125 °C για 10 λεπτά και να έχει προηγηθεί ένα στάδιο αφαίρεσης του ελαίου των σπόρων (10 λεπτά με εξάνιο στους 50 °C). Η ποσότητα της σιλυμαρίνης κατά τη διαδικασία της εκχύλισης Soxhlet σε δύο στάδια,

με εξάνιο και μεθανόλη, ήταν κατά περίπου 72% μικρότερη αυτής κατά την εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (Wianowska & Wiśniewski, 2015).

Μία τροποποιημένη τεχνική της εκχύλισης με υγρό υπό πίεση, που αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποίησαν οι AbouZid *et al.* (2016a) σε δείγματα από την Αίγυπτο. Έγινε αφαίρεση του ελαίου των σπόρων με εξάνιο στους 50 °C, υπό πίεση 110 bar, για 30 λεπτά και μετά εκχύλιση με ακετόνη στους 70 °C, υπό πίεση 117 bar, για 15 λεπτά, με μία επανάληψη. Οι ποσότητες της σιλυμαρίνης (0,59% έως 2,19%) ήταν μικρότερες από αυτές που υπολόγισαν σε δείγματα σπόρων γαϊδουράγκαθου από την Αίγυπτο οι Omar *et al.* το 2012 (3,79%) και οι Elwekeel *et al.* το 2013 (3,5% - μόνο φλαβονολιγνάνες). Οι Omar *et al.* πραγματοποίησαν εκχύλιση Soxhlet με πετρελαϊκό αιθέρα και μετά χρησιμοποίησαν την τεχνική εκχύλισης της εμβροχής (maceration) με μεθανόλη για 24 ώρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι Elwekeel *et al.* χρησιμοποίησαν την διαδικασία της εκχύλισης Soxhlet σε δύο στάδια, με εξάνιο (4 ώρες) και μεθανόλη (5 ώρες).

Την τεχνική της εκχύλισης με εμβροχή χρησιμοποίησαν και οι Gašo-Sokač, Kovač και Bušić (2011), οι οποίοι μετά την αφαίρεση του ελαίου των σπόρων, αντί της εκχύλισης Soxhlet, τοποθέτησαν το υπόλειμμα σε φιάλη μαζί με ακετόνη και ανακίνησαν το μίγμα για 72 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η απόδοση σε σιλυμαρίνη ήταν 4,1%, παρόμοια με αυτής της εκχύλισης Soxhlet με ακετόνη, την οποία έκαναν οι ίδιοι ερευνητές.

Οι Poppe και Petersen (2016) χρησιμοποίησαν για την απομόνωση της σιλυμαρίνης μία τεχνική εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπερήχους. Αρχικά 1 g σπόρων κονιοποιήθηκε σε υγρό άζωτο και μετά δημιουργήθηκε εναιώρημα με 10 mL διαλύτη. Το εναιώρημα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων στους 70 °C για 10 λεπτά, ανακινούμενο κατά διαστήματα, και η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (3000 g) για 10 λεπτά και το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι καλύτερος διαλύτης ήταν η μεθανόλη, δεδομένου ότι η χρήση ακετόνης ή οξικού αιθυλεστέρα παρήγαγε το 60% ή το 13% αντίστοιχα του ποσού των φλαβονολιγνάνων της σιλυμαρίνης που παράχθηκαν με τη χρήση μεθανόλης, σε έναν κύκλο της διαδικασίας. Παρατήρησαν ότι μόνο το περίπου 50% των φλαβονολιγνάνων μπορούσε σε απομονωθεί σε έναν κύκλο της διαδικασίας εκχύλισης, όπως

περιγράφηκε παραπάνω, ενώ για την απομόνωση ποσοστού μεγαλύτερου του 95% απαιτούνταν να γίνουν πέντε κύκλοι της εκχύλισης. Ακόμη διαπίστωσαν ότι η επανάληψη ή όχι της διαδικασίας εκχύλισης της σιλυμαρίνης δεν επηρέαζε την αναλογία των φλαβονολιγνάνων.

Οι Saleh *et al.* (2015a) εξέτασαν την επίδραση του μεγέθους των κονιοποιημένων σπόρων στην απόδοση σε σιλυμαρίνη και στην αναλογία των συστατικών της σιλυμαρίνης. Χρησιμοποιήθηκαν 43 g κονιοποιημένων σπόρων με μέγεθος 300 μm έως 700μm στο ένα πείραμα και με μέγεθος νανοσωματιδίων στο άλλο. Η διαδικασία απομόνωσης της σιλυμαρίνης περιελάμβανε την τοποθέτηση των δειγμάτων σε μία φιάλη με 800 mL μεθανόλης 80% και την εισδοχή ρύγχους υπερήχων στο διάλυμα, μέχρι το μισό του ύψους του διαλύτη, για 10 λεπτά. Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη του συνήθους μεγέθους κονιοποιημένων σπόρων ήταν 8,5%, ενώ του μεγέθους νανοσωματιδίων σπόρων ήταν περίπου 10%. Ακόμη υπήρξε διαφορά στην περιεκτικότητα των συστατικών της σιλυμαρίνης, με το ποσοστό της ταξιφολίνης και της ισοσιλυβίνης Α να μειώνεται και το ποσοστό των άλλων συστατικών να αυξάνεται. Σε άλλη μελέτη ερευνητές συνέκριναν την τεχνική της υποβοηθούμενης εκχύλισης με υπερήχους με την τεχνική της εκχύλισης με εμβροχή. Η υψηλότερη απόδοση σε σιλυμαρίνη επιτεύχθηκε με την πρώτη τεχνική (Saleh *et al.*, 2015b).

Σύγκριση τριών διαφορετικών τεχνικών εκχύλισης της σιλυμαρίνης από κονιοποιημένους σπόρους (χωρίς να έχει αφαιρεθεί το έλαιο) πραγματοποίησαν οι Saleh *et al.* (2017). Η πρώτη τεχνική περιελάμβανε την εκχύλιση 10 g σπόρων γαϊδουράγκαθου σε συσκευή Soxhlet με 200 mL μεθανόλης 80% για πάνω από 6 ώρες. Στη δεύτερη περίπτωση, 10 g σπόρων εκχυλίστηκαν με την τεχνική της επαναροής χρησιμοποιώντας 200 mL μεθανόλης 80% για 5, 15 και 30 λεπτά. Στο τρίτο πείραμα, 10 g σπόρων εκχυλίστηκαν με τη βοήθεια συσκευής εστιασμένων υπερήχων (400W και 800W) χρησιμοποιώντας 200 mL μεθανόλης 80% για 5, 15 και 30 λεπτά. Οι μεγαλύτερες αποδόσεις σε σιλυμαρίνη επιτεύχθηκαν με τη βοήθεια των υπερήχων: 2,63% με 800W για 15 λεπτά και 2,54% με 400W για 30 λεπτά. Με την εκχύλιση με επαναροή η απόδοση ήταν 2,13%, ενώ με την εκχύλιση Soxhlet η απόδοση ήταν 2,02%. Πρέπει να σημειωθεί στις παραπάνω παρατηρήσεις των ερευνητών, ότι για την τεχνική της εκχύλισης Soxhlet η παράλειψη του σταδίου της αφαίρεσης του ελαίου των σπόρων έχει ως αποτέλεσμα τον υποδιπλασιασμό της απόδοσης σε σιλυμαρίνη (Wallace *et al.*, 2003b).

Μία διαφορετική διαδικασία παραγωγής σιλυμαρίνης εξέτασαν οι Cacho *et al.* (1999) χρησιμοποιώντας καλλιέργειες κάλλου προερχόμενες από κοτυληδόνες γαϊδουράγκαθου. Μεγαλύτερη συσσώρευση σιλυμαρίνης παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες κυτταρικών αιωρημάτων, αλλά αυτή ήταν πολύ μικρή σε σχέση με την ποσότητα σιλυμαρίνης που εξάγεται από τους σπόρους. Σημαντικό πρόβλημα κατά τη διαδικασία παραγωγής της σιλυμαρίνης από καλλιέργειες κυττάρων αποτελεί το γεγονός ότι η συγκέντρωση της σιλυμαρίνης μειώνεται σταδιακά στις επαναλαμβανόμενες υποκαλλιέργειες (Sánchez-Sampedro, Fernández-Tárrago & Corchete, 2009). Προσπάθειες παραγωγής σιλυμαρίνης με καλλιέργεια κυττάρων ή τμημάτων του φυτού (π.χ. ρίζες) έγιναν και από άλλους ερευνητές, οι οποίοι προσπάθησαν να βελτιώσουν την απόδοση σε σιλυμαρίνη είτε χρησιμοποιώντας διάφορες ουσίες που επάγουν την παραγωγή της σιλυμαρίνης, είτε μελετώντας την έκφραση γονιδίων που επηρεάζουν τη συσσώρευση σιλυμαρίνης, είτε τέλος χρησιμοποιώντας μονοχρωματικό φως διαφορετικού μήκους κύματος (Alikaridis *et al.*, 2000; Sánchez-Sampedro, Fernández-Tárrago & Corchete, 2005; Ashtiani, Hasanloo & Bihamta, 2010; Elwekeel, Elfishway & AbouZid, 2012; Torres & Corchete, 2016; Younas *et al.*, 2018). Όπως αναφέρει ο AbouZid (2014) η τεχνολογία καλλιέργειας κυττάρων του φυτού έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδων καλλιέργειας, αλλά το κύριο πρόβλημα για να γίνει η διαδικασία αυτή οικονομικά αποδοτική αποτελεί η χαμηλή παραγωγικότητα, η οποία οφείλεται κυρίως στην μη διαφοροποίηση των καλλιεργούμενων κυττάρων.

Όπως είναι γνωστό και συνάγεται και από τα παραπάνω, η τεχνική εκχύλισης Soxhlet για την απομόνωση της σιλυμαρίνης έχει σημαντικά πλεονεκτήματα και χρησιμοποιείται από πολλούς ερευνητές, ενώ είναι και η προτεινόμενη μέθοδος από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία. Έχει υψηλή απόδοση δεδομένου ότι γίνεται εν θερμώ και το δείγμα έρχεται συνεχώς σε επαφή με τον «νέο» διαλύτη, με αποτέλεσμα να έχουμε αυξημένο ρυθμό μεταφοράς της σιλυμαρίνης από το υπόστρωμα στο διαλύτη και αυξημένη διαλυτότητα της σιλυμαρίνης στο διαλύτη. Ακόμη η τεχνική αυτή είναι απλή και οικονομική, μπορεί να εκχυλίσει μεγάλες ποσότητες δείγματος, ενώ δεν απαιτείται διήθηση μετά το τέλος της εκχύλισης. Σημαντικά μειονεκτήματα της εκχύλισης Soxhlet αποτελούν η μεγάλη σχετικά ποσότητα διαλύτη που απαιτείται και η μεγάλη χρονική διάρκεια της εκχύλισης. Ειδικά όταν έχουμε να χειριστούμε πολλά δείγματα ο μεγάλος χρόνος της εκχύλισης και κυρίως ο αριθμός των συσκευών που

απαιτούνται για να συντομευθεί η διαδικασία καθιστούν το έργο αρκετά δύσκολο. Ακόμη υπάρχει ο κίνδυνος της θερμικής μερικής ή ολικής αποικοδόμησης των ουσιών που εκχυλίζονται, ενώ μετά το τέλος της εκχύλισης απαιτείται και ένα στάδιο εξάτμισης/συμπύκνωσης.

1.9. Ανάλυση και προσδιορισμός των συστατικών της σιλυμαρίνης

Ερευνητές χαρακτήρισαν ως σιλυμαρίνη μία ομάδα ενώσεων που βρήκαν στους σπόρους του γαϊδουράγκαθου και αποτελούνταν από τη φλαβονόλη ταξιφολίνη και τις φλαβονολιγνάνες σιλυβίνη, σιλυδιανίνη και σιλυχριστίνη (Pelter & Hänsel, 1968; Wagner, Hörhammer & Münster, 1968a;1968b;Wagner *et al.*, 1971). Σύμφωνα με τους Pelter και Hänsel (1968) η σιλυβίνη είναι προϊόν αντίδρασης της ταξιφολίνης με την κωνιφερόλη. Η δομή της σιλυβίνης εξακριβώθηκε το 1975, ενώ τέσσερα χρόνια αργότερα, το 1979, ερευνητές αποσαφήνισαν τη δομή της ισοσιλυβίνης και ανέφεραν ότι η σιλυβίνη και η ισοσιλυβίνη φαίνεται να είναι μίγματα διαστεροϊσομερών (Pelter & Hänsel, 1975; Hänsel, Schulz & Pelter, 1975; Arnone, Merlini & Zanarotti, 1979). Η δομή της σιλυχριστίνης επιβεβαιώθηκε το 1977, ενώ το ίδιο έτος δημοσιεύτηκε και η πρώτη ανάλυση της σιλυμαρίνης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), όπου οι κορυφές που ανήκαν στην ισοσιλυβίνη αναφέρθηκαν ως dehydrosilybin (Pelter, Hänsel & Kaloga, 1977; Tittel & Wagner, 1977).

Οι Kim *et al.* (2003) κατάφεραν να διαχωρίσουν πλήρως και να απομονώσουν τα τέσσερα διαστεροϊσομερή της σιλυβίνης (A και B) και της ισοσιλυβίνης (A και B) από σπόρους του φυτού γαϊδουράγκαθο, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της παρασκευαστικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (preparative RP-HPLC). Επίσης, απομόνωσαν και τα υπόλοιπα συστατικά της σιλυμαρίνης, δηλαδή τη σιλυχριστίνη, τη σιλυδιανίνη, την ισοσιλυχριστίνη και την ταξιφολίνη. Οι δομές όλων των συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των στεροχημικών τύπων, επιβεβαιώθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δύο διαστάσεων (2D NMR) και με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD spectroscopy). Την ίδια χρονιά και οι Lee και Liu (2003) διαχώρισαν και απομόνωσαν τα διαστεροϊσομερή της σιλυβίνης και της ισοσιλυβίνης με τη μέθοδο της χρωματογραφίας στήλης (sequential silica gel), επιβεβαίωσαν τις δομές

τους με NMR, ενώ καθόρισαν και τη στερεοχημεία του κάθε συστατικού με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.

Μετά τη διαδικασία απομόνωσης της σιλυμαρίνης ακολουθεί ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών της σιλυμαρίνης. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι για τον χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση των κύριων βιοενεργών συστατικών της σιλυμαρίνης.

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin-Layer Chromatography – TLC) έχει χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση, αλλά και την ποσοτική ανάλυση των συστατικών της σιλυμαρίνης (Wagner & Bladt, 2001; Tučkar, Vrsalović & Kuštrak, 2003). Το φάσμα (UV-365nm) χαρακτηρίζεται από δύο πρασινωπές έντονα φθορίζουσες ζώνες σιλυβίνης/ισοσιλυβίνης και σιλυχριστίνης και μία πορτοκαλί ζώνη ταξιφολίνης, ενώ ανάμεσα στην ταξιφολίνη και τη σιλυβίνη βρίσκεται η σιλυδιανίνη (Wagner & Bladt, 2001). Ένα σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν ξεχωριστά όλες οι φλαβονολιγνάνες (Csupor *et al.*, 2016). Μία μέθοδος υψηλής απόδοσης-TLC (HPTLC) συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικοποίηση της σιλυβίνης σε εκχύλισμα σπόρων γαϊδουράγκαθου από την Αυστρία (Taha, Krawinkel & Morlock, 2015).

Η φασματοσκοπία υπεριώδους (UV) δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αξιόπιστα για την ανάλυση των συστατικών της σιλυμαρίνης σε εκχυλίσματα σπόρων γαϊδουράγκαθου. Επειδή όμως, τα συστατικά της σιλυμαρίνης παρουσιάζουν χαρακτηριστικά μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή των 280-290 nm, μπορεί η μέθοδος να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση διαλυμάτων σιλυμαρίνης, όπως στην περίπτωση διαλυμένων σκευασμάτων σιλυμαρίνης (Rahman, Khan & Azmi, 2004).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται από την πλειονότητα των ερευνητών για την ανάλυση των συστατικών της σιλυμαρίνης στο εκχύλισμα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως οι ανιχνευτές υπεριώδους (UV Detectors) αλλά και οι ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD), ενώ οι χρωματογραφικές στήλες είναι συνήθως οι αντίστροφης φάσης (RP) C-18. Ερευνητές χρησιμοποίησαν και μία πιο πολική στήλη αντίστροφης φάσης C-8, η οποία βελτίωσε τη διακριτικότητα, ενώ και οι κορυφές

είχαν μικρότερο εύρος, αλλά όμως με τη στήλη αυτή δεν κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός των διαστερεοϊσομερών της σιλυβίνης (Quaglia *et al.*, 1999). Η κινητή φάση μπορεί να αποτελείται από μίγμα οξιτισμένου νερού/ακετονιτριλίου (Bilia *et al.*, 2000, Elwekeel *et al.*, 2013), στην πλειονότητα όμως των αναλύσεων αποτελείται από ένα μίγμα οξιτισμένου νερού/μεθανόλης, που έχει δειχθεί ότι διαχωρίζει καλύτερα τα διαστερεοϊσομερή της σιλυβίνης και της ισοσιλυβίνης (Lee *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2009). Η ανάλυση των συστατικών της σιλυμαρίνης επιτυγχάνεται είτε με ισοκρατική έκλυση (Kvasnička *et al.*, 2003), είτε με βαθμιδωτή έκλυση, που παρέχει συνήθως καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών (Graf *et al.*, 2007; Pferschy-Wenzig *et al.*, 2014).

Οι Lee, Narayan και Barrett (2007) σε πειράματα που πραγματοποίησαν χρησιμοποίησαν ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένου με φασματομετρία μαζών (LC/MS) για να αναπτύξουν μία ευαίσθητη και ειδική μέθοδο που ποσοτικοποιεί και συγκρίνει τις αναλογίες των έξι κύριων φλαβονολιγνάνων της σιλυμαρίνης σε εμπορικά τυποποιημένα εκχυλίσματα γαϊδουράγκαθου. Την ίδια χρονιά επιτεύχθηκε για πρώτη φορά με ένα σύστημα LC/MS ο διαχωρισμός δύο ισομερών της σιλυχριστίνης (Shibano *et al.*, 2007). Οι Kuki *et al.* (2012) με ένα σύστημα HPLC συζευγμένου με διαδοχική φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry, MS/MS) ανίχνευσαν και διαχώρισαν μερικώς δύο νέα στερεοϊσομερή της σιλυβίνης και ένα στερεοϊσομερές της ισοσιλυβίνης. Σε άλλη έρευνα, οι Sala *et al.* (2014) ανέπτυξαν και επικύρωσαν δύο μεθόδους HPLC-MS/MS για τη διερεύνηση της φαρμακοκινητικής της σιλυβίνης και του ημιηλεκτρικού εστέρα (hemisuccinate) της σιλυβίνης στο ανθρώπινο πλάσμα του αίματος, ενώ και άλλες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση της σιλυβίνης σε βιολογικά δείγματα (Mascher, Kikuta & Weyhenmeyer, 1993; Hoh *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007).

Μεταξύ των πλεονεκτημάτων της HPLC είναι η ακρίβεια, η ευαισθησία, η αξιόπιστη ανίχνευση και ο διαχωρισμός των κύριων συστατικών της σιλυμαρίνης. Υπάρχουν όμως και μειονεκτήματα, όπως η ανάγκη ενός σταδίου προ-καθαρισμού, η διαθεσιμότητα των πρότυπων ουσιών αναφοράς και κυρίως ο σχετικά μεγάλος χρόνος διάρκειας της ανάλυσης (περίπου 30-35 λεπτά). Η ανάπτυξη μεθόδων υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (UPLC) είχε ως αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη μείωση του χρόνου ανάλυσης (9-10 λεπτά), ενώ παράλληλα αυξήθηκε

ο λόγος σήματος προς θόρυβο (Csupor *et al.*, 2016). Η πρώτη μέθοδος UPLC αντίστροφης φάσης με ανιχνευτή υπεριώδους ανέλυσε οκτώ συστατικά της σιλυμαρίνης και συγκρινόμενη με τη μέθοδο HPLC είχε μικρότερο χρόνο ανάλυσης (9 λεπτά) και μεγαλύτερη αποδοτικότητα και ευαισθησία. Καταλληλότερος διαλύτης έκλουσης βρέθηκε ότι ήταν η μεθανόλη έναντι του ακετονιτριλίου, ενώ η προσθήκη φορμικού οξέος στην κινητή φάση ήταν σημαντική για το διαχωρισμό των κορυφών (Liu *et al.*, 2009a). Ακόμη, οι Wang *et al.* (2010) ανέπτυξαν μία μέθοδο UPLC-MS/MS για την ανάλυση των συστατικών της σιλυμαρίνης σε εκχυλίσματα σπόρων του γαϊδουράγκαθου και για τον ποιοτικό έλεγχο παρασκευασμάτων σιλυμαρίνης, ενώ και οι Graf *et al.* (2016) ανέπτυξαν και επικύρωσαν μία μέθοδο UHPLC-MS/MS για την ποσοτική ανάλυση των φλαβονολιγνάνων σε εκχυλίσματα γαϊδουράγκαθου.

Η παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (preparative HPLC) χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό, την απομόνωση και την παραλαβή των συστατικών της σιλυμαρίνης, ώστε αυτά να χρησιμοποιηθούν είτε ως πρότυπα αναφοράς είτε για ερευνητικούς σκοπούς, όπως η διερεύνηση της βιολογικής δραστηριότητας. Όμως, τα χαμηλά ποσοστά ανάκτησης (περίπου 50-60%), και οι μικρές τελικές ποσότητες των συστατικών αποτελούν σημαντικά μειονεκτήματα (Křenek *et al.*, 2014). Οι Kim *et al.* (2003) απομόνωσαν οκτώ συστατικά της σιλυμαρίνης σε ποσότητες γραμμαρίων, οι Lee και Liu (2003) απομόνωσαν τα διαστερεοϊσομερή της σιλυβίνης και της ισοσιλυβίνης, ενώ την παραλαβή συστατικών σιλυμαρίνης πέτυχαν και οι Graf *et al.* (2007) σε μία αρκετά περίπλοκη και κοπιαστική διαδικασία με σχετικά χαμηλά ποσοστά απόδοσης. Οι Li *et al.* (2008) ανέπτυξαν μία μέθοδο παρασκευαστικής HPLC για τον διαχωρισμό και την παραλαβή της σιλυβίνης A και της σιλυβίνης B από πρότυπα σιλυβίνης. Μία μέθοδο παρασκευαστικής χρωματογραφίας κατ' αντιρροή υψηλής ταχύτητας (HSCCC) ανέπτυξαν οι Liu *et al.* (2010) για την απομόνωση και τον καθαρισμό της σιλυχριστίνης, της σιλυδιανίνης και της ταξιφολίνης από τα παραπροϊόντα που προκύπτουν κατά τη διαδικασία απομόνωσης της σιλυβίνης από τη σιλυμαρίνη. Η μέθοδος αυτή παρουσίασε υψηλά ποσοστά ανάκτησης, αλλά τα απαιτούμενα όργανα ήταν δαπανηρά και όχι ευρέως διαθέσιμα (Křenek *et al.*, 2014). Μία παρασκευαστική μέθοδο για την απομόνωση οπτικά καθαρής ισοσιλυβίνης A και ισοσιλυβίνης B ανέπτυξαν οι Gažák *et al.* (2013), η οποία βασιζόταν στον ενζυμικό διαχωρισμό του μίγματος της σιλυμαρίνης και άλλες μεθόδους καθαρισμού.

1.10. Βιολογική δραστηριότητα της σιλυμαρίνης και των συστατικών της

Το έντονο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τα βιοδραστικά συστατικά της σιλυμαρίνης και κυρίως για τη σιλυβίνη είναι φανερό από τα περισσότερα από 12000 άρθρα που έχουν δημοσιευτεί την τελευταία δεκαετία για τη σιλυβινίνη ή ουσίες που σχετίζονται με αυτή και χρησιμοποιούνται μεταξύ άλλων, ως αντιοξειδωτικοί, χημειοπροφυλακτικοί, αντικαρκινικοί και κυρίως ηπατοπροστατευτικοί παράγοντες (Polachi *et al.*, 2016).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σιλυμαρίνη έχει πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό, ενώ είναι διαλυτή σε διαλύτες φαρμακολογικής σημασίας, μεταξύ των οποίων είναι η προπυλενογλυκόλη, η πολυαιθυλενογλυκόλη 400 και ο μονοαιθυλαιθέρας της διαιθυλενογλυκόλης (Transcutol®). Ακόμη, η σιλυμαρίνη δεν εμφανίζει λιποφιλικές ιδιότητες (Woo *et al.*, 2007; Shakeel *et al.*, 2014). Το γεγονός ότι η σιλυβίνη είναι το συστατικό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στη σιλυμαρίνη και είναι εύκολο να απομονωθεί ως μίγμα δύο διαστερεοϊσομερών, το οποίο μπορεί να διαχωριστεί περαιτέρω, έχει ως αποτέλεσμα σχεδόν όλες οι φαρμακοκινητικές παράμετροι της σιλυμαρίνης να αναφέρονται και να έχουν ως πρότυπο την σιλυβίνη. Έχουν γίνει κάποιες έρευνες για τη δράση της ισοσιλυβίνης, ενώ ελάχιστα έχει μελετηθεί η βιολογική δράση της σιλυχριστίνης και της σιλυδιανίνης, λόγω του ότι δεν έχουν απομονωθεί μεγάλες σχετικά ποσότητες από τις ουσίες αυτές (Javed, Kohli & Ali, 2011; Křenek *et al.*, 2014).

Έρευνα που έγινε με σκοπό την αξιολόγηση της απορρόφησης και του μεταβολισμού των φλαβονολιγνανών της σιλυμαρίνης, σε δείγμα 14 ανθρώπων ηλικίας 24±5 ετών που κατανάλωσαν ένα εκχύλισμα σιλυμαρίνης, έδειξε ότι η σιλυχριστίνη, η σιλυδιανίνη, η σιλυβίνη (Α και Β) και η ισοσιλυβίνη (Α και Β) τροποποιήθηκαν εκτεταμένα από ένζυμα του οργανισμού και απεκκρίθηκαν ως ενώσεις που υποδηλώνουν ισχυρή συγγένεια/συνάφεια με ένζυμα της ηπατικής φάσης II (μεταβολισμός ξενοβιοτικών). Η απέκκριση των συζευγμένων με μονογλυκουρονιδια φλαβονολιγνανών κορυφώθηκε δύο ώρες μετά την κατανάλωση της σιλυμαρίνης, ενώ των υπόλοιπων τροποποιημένων φλαβονολιγνανών στις οκτώ ώρες. Η βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονολιγνανών ήταν 0,45±0,28%, υψηλότερη από φλαβονοειδή με παρόμοιο μοριακό βάρος, όπως ανθοκυανίνες (Calani *et al.*, 2012). Οι Wu *et al.* (2007) ανέφεραν ότι σε πειράματα που πραγματοποίησαν σε ποντίκια η

βιοδιαθεσιμότητα της σιλυβίνης στο πλάσμα του αίματος ήταν 0,73%, ενώ σε αντίστοιχα πειράματα οι Marhol *et al.* (2015) διαπίστωσαν ότι η σιλυβίνη B απορροφάται ταχύτερα και σε μεγαλύτερο ποσοστό από τη σιλυβίνη A, με την από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα της σιλυβίνης B να υπολογίζεται σε 0,3%.

Οι κυριότεροι λόγοι για τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της σιλυμαρίνης είναι ο εκτεταμένος μεταβολισμός φάσης II, η χαμηλή διαπερατότητα από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και η ταχεία απέκκριση στη χολή και τα ούρα (Javed *et al.*, 2011). Για να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα της σιλυμαρίνης έχουν παρασκευασθεί διάφορα παράγωγα της σιλυβίνης με μεγαλύτερη διαλυτότητα (Pifferi, Pace & Conti, 1994; Křen *et al.*, 1997). Όμως αυτές οι συζεύξεις της σιλυβίνης μπορεί να επηρεάσουν τη δραστηριότητά της. Για παράδειγμα, το 20-O-β-D-γλυκουρονίδιο της σιλυβίνης έχει σημαντικά χαμηλότερη ικανότητα εκκαθάρισης ελεύθερων ριζών από την ελεύθερη σιλυβίνη, ενώ το 7-O-β-D-γλυκουρονίδιο έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από την ελεύθερη σιλυβίνη (Loguercio & Festi, 2011). Μεταξύ άλλων, η σιλυβίνη συνδυάστηκε σε μοριακό επίπεδο με τη φωσφατιδυλοχολίνη με αποτέλεσμα τη δημιουργία του σκευάσματος Siliphos[®], το οποίο έχει μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα ως προς τη σιλυβίνη και επομένως μεγαλύτερη φαρμακολογική δραστηριότητα (Barzaghi *et al.*, 1990). Εκτός από τη δημιουργία συμπλόκων με φωσφολιπίδια (Yanyu *et al.*, 2006), για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της σιλυμαρίνης, έχουν ακόμη δημιουργηθεί σύμπλοκα με β-κυκλοδεξτρίνες (Arcari *et al.*, 1992), τα οποία έχουν, όπως στην περίπτωση του σκευάσματος Silirex[®], αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα κατά 6,6 φορές (Voionovich *et al.*, 2009). Μία διαφορετική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι ο εγκλωβισμός της σιλυμαρίνης σε λιποσωμικές δομές (Yan-yu *et al.*, 2006), ενώ άλλοι ερευνητές πρότειναν τη δημιουργία συστημάτων στερεής διασποράς (Li & Hu, 2004; Zhang *et al.*, 2008; Yousaf *et al.*, 2019). Πρόσφατα, δημιουργήθηκαν νανοσωματίδια σιλυβίνης υψηλής βιοδιαθεσιμότητας, τα οποία αύξησαν τη διαλυτότητα της σιλυβίνης κατά περισσότερο από 75%, ενώ στρατηγικές της νανοτεχνολογίας, όπως τα πολυμερικά νανοσυστήματα, είναι μία ελπιδοφόρα μέθοδος για την ενίσχυση της θεραπευτικής δράσης της σιλυμαρίνης (Liu *et al.*, 2017; Di Costanzo & Angelico, 2019).

Η δράση της σιλυμαρίνης/σιλυβίνης ως αντιοξειδωτικού έχει τεκμηριωθεί μέσω των παρακάτω πιθανών μηχανισμών: α) πρόληψη του σχηματισμού ελεύθερων ριζών

λόγω αναστολής της δράσης ενζύμων που παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου, β) εκκαθάριση (scavenging) ελευθέρων ριζών και οξειδωτικών, όπως των HOCl, O₂⁻ και H₂O₂ γ) προστατευτική δράση στη μιτοχονδριακή δομή και λειτουργία σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, δ) χηλωτικό αντιδραστήριο για τα μεταλλικά ιόντα του Fe και του Cu, ε) παρεμπόδιση της υπεροξειδωσης λιπιδίων των μεμβρανών και στ) διατήρηση μίας βέλτιστης αντιοξειδωτικής ισορροπίας, προάγοντας τη σύνθεση προστατευτικών ουσιών και ενεργοποιώντας αντιοξειδωτικά ένζυμα σε καταστάσεις στρες. Σε κατάσταση οξειδωτικού και νιτροδωτικού στρες, η σιλυβίνη αναστέλλει τον σχηματισμό των ελεύθερων ριζών O₂⁻ και NO[•], αυξάνει τα επίπεδα της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μειώνει την περιεκτικότητα σε μηλονική διαλδεϋδή και ενεργοποιεί τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Τέλος, η σιλυμαρίνη δεν έχει κάποια άμεση επίδραση στον μεταβολισμό της αιθανόλης στον οργανισμό (Mira, Silva & Manso, 1994; Škottová, Krečman & Šimánek, 1999; Chlopečíková *et al.*, 2004; Ligeret *et al.*, 2008; Trouillas *et al.*, 2008; Köksal *et al.*, 2009; Loguercio & Festi, 2011; Surai, 2015).

Η σιλυμαρίνη παρουσιάζει αντι-ινωτική, αντιφλεγμονώδη και ανοσοτροποποιητική δράση, οι οποίες συμβάλουν σημαντικά στο ρόλο της ως ηπατοπροστατευτικού παράγοντα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αντιφλεγμονώδης δράση της σιλυμαρίνης γίνεται μέσω της καταστολής της απελευθέρωσης κυτταροκινών. Ως ανοσοτροποποιητικός παράγοντας η σιλυμαρίνη αναστέλλει τη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων, ενώ οι δράσεις της έχουν τόσο ανοσοδιεγερτικά όσο και ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η σιλυμαρίνη παίζει ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη μετάσταση διαφόρων κυττάρων, ενώ διεγείρει τον σχηματισμό ριβοσωμάτων, ενισχύοντας την σύνθεση πρωτεϊνών (Mohan *et al.*, 2004; Esmail *et al.*, 2017; Abenavoli *et al.*, 2018). Μάλιστα αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι η σιλυμαρίνη/σιλυβίνη μπορεί να καταστείλει τον πολλαπλασιασμό αρκετών διαφορετικών καρκινικών κυττάρων (π.χ. προστάτη, πνεύμονα, τραχήλου της μήτρας) και επίσης να ρυθμίσει αρνητικά (down-regulate) προϊόντα γονιδιακής έκφρασης που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Agarwal *et al.*, 2006; Tiwari & Mishra, 2015).

Μπορεί η δράση της σιλυμαρίνης να αποδίδεται κυρίως στη σιλυβίνη, για λόγους που έχουμε ήδη αναφέρει, όμως και τα άλλα συστατικά της σιλυμαρίνης μπορεί να

παίζουν ρόλο ή ακόμη και να προκαλούν συγκεκριμένες ωφέλιμες δράσεις της σιλυμαρίνης. Για παράδειγμα, η ισοσιλβινίνη αναφέρεται ως ισχυρότερος καταστολέας της ανάπτυξης προχωρημένου καρκίνου του προστάτη από τη σιλβίνη και τη σιλυμαρίνη, ενώ η ισοσιλβίνη Α επάγει την απόπτωση καρκινικών κυττάρων του προστάτη (Deer *et al.*, 2008a; Deer *et al.*, 2010). Επίσης, οι Pferschy-Wenzig *et al.* (2014) διαπίστωσαν ότι μόνο η ισοσιλβίνη Α, από τα συστατικά της σιλυμαρίνης, ήταν αγωνιστής (agonist) ενός ενεργοποιημένου υποδοχέα γ των πολλαπλασιαστών των υπεροξυσωμάτων (PPAR γ), ενώ ερευνητές βρήκαν ότι η σιλβίνη, η σιλυχριστίνη και η σιλυδιανίνη, ξεχωριστά η κάθε μία ουσία, αναστέλλουν την επαγόμενη από την διφωσφορική αδενοσίνη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τη συσσωμάτωση στο ολικό αίμα (Bijak *et al.*, 2017). Οι Anthony και Saleh (2013) εξέτασαν την ικανότητα εκκαθάρισης ελεύθερων ριζών και την αντιοξειδωτική ικανότητα επτά κύριων, χημικώς καθαρών, συστατικών της σιλυμαρίνης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH, η ταξιφολίνη ήταν πιο αποτελεσματική ακολουθούμενη από τη σιλυδιανίνη και τη σιλυχριστίνη, ενώ σύμφωνα με τη μέθοδο HORAC η ταξιφολίνη ήταν δεύτερη με πρώτη τη σιλυχριστίνη. Η πιο αποτελεσματική αντιοξειδωτική ουσία, σύμφωνα με τη μέθοδο ORAC ήταν πάλι η ταξιφολίνη, με μεγάλη διαφορά από τις υπόλοιπες. Τέλος, σε άλλες δύο δοκιμές (TAC και ABTS) δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ουσίες.

Η σιλυμαρίνη χρησιμοποιείται σε διάφορες ηπατικές διαταραχές, ιδιαίτερα σε χρόνιες παθήσεις, στην κίρρωση και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Έρευνες έχουν δείξει ότι η σιλυμαρίνη προάγει την αναγέννηση των ηπατοκυττάρων, μειώνει την φλεγμονώδη αντίδραση και αναστέλλει την ινογένεση στο ήπαρ, ενώ μπορεί να μειώσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την αγγειογένεση, καταστέλλοντας την ανάπτυξη καρκινικών ηπατικών κυττάρων. Όσον αφορά την προκαλούμενη από το οινόπνευμα ηπατοτοξικότητα, η σιλυμαρίνη είναι ικανή να βελτιώσει τις μεταβολικές διεργασίες του ήπατος, να αυξήσει την ζωτικότητα των κυττάρων και να μειώσει τόσο την υπεροξειδωση των λιπιδίων όσο και την κυτταρική νέκρωση. Η μακροχρόνια χορήγηση σιλυμαρίνης αύξησε σημαντικά το χρόνο επιβίωσης των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα. Πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι η σιλβίνη αναστέλλει τη μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας C, ενώ ορισμένα παραδοσιακά παρασκευάσματα που περιέχουν σιλυμαρίνη έχουν εγκριθεί στην Κίνα για τη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας B. Για τη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του

ήπατος η θεραπεία με σιλυμαρίνη είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία για τη βελτίωση της ηπατικής λειτουργίας, αφού έχει θετικά αποτελέσματα στη μείωση των επιπέδων των τρανσαμινασών, δρα σε πολλαπλούς θεραπευτικούς στόχους και έχει υψηλό προφίλ ασφάλειας. Τέλος, η σιλυμαρίνη χρησιμοποιείται σε ασθένειες του ήπατος που επάγονται από τοξίνες. Η σιλυβίνη ή η σιλυμαρίνη εξακολουθούν να αντιπροσωπεύουν το κύριο μέσο για τη θεραπεία των δηλητηριάσεων από τα μανιτάρια *Amanita phalloides* (Saller *et al.*, 2008; Polyak *et al.*, 2010; Feher & Lengyel, 2012; Federico, Dallio & Loguercio, 2017; Abenavoli *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2019).

Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την αντικαρκινική δράση της σιλυμαρίνης σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η θετική επίδραση της σιλυμαρίνης, τόσο σε μοριακό επίπεδο όσο και σε μηχανιστικό, σε διάφορες νεοπλασίες του προστάτη έχει καταδειχτεί από πολλές μελέτες. Μέσω διαφόρων δράσεων η σιλυμαρίνη/σιλυβίνη εμπλέκεται ως ανοσοενυχυτικό στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, της ουροδόχου κύστης, του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας, του δέρματος, του παχέος εντέρου και των ωοθηκών. Η σιλυβινίνη έχει δείχθει ότι επάγει την απόπτωση σε διάφορα καρκινικά κύτταρα *in vitro* και *in vivo* μέσω στόχευσης πολλαπλών παραγόντων. Επηρεάζοντας την πολλαπλή σηματοδότηση δρα ως ρυθμιστής της αυτοφαγίας και της δράσης microRNAs και ως αναστολέας του κυτταρικού κύκλου. Η σιλυβίνη είναι ικανή όχι μόνο να μειώνει τη νεφροτοξικότητα, τη νευροτοξικότητα και την καρδιοτοξικότητα που σχετίζεται με την αντικαρκινική θεραπεία, αλλά έχει τη δυνατότητα να μειώνει και τη φαρμακευτική αντίσταση των καρκινικών κυττάρων (Greenlee *et al.*, 2007; Tiwari & Mishra, 2015; Polachi *et al.*, 2016; Bosch-Barrera, Queralt & Menendez, 2017; Jahanafrooz *et al.*, 2018).

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει τα προστατευτικά αποτελέσματα της σιλυμαρίνης και της σιλυβίνης έναντι βλαβών του δέρματος επαγόμενων από χημικούς παράγοντες ή την υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ η σιλυμαρίνη μείωσε την επαγόμενη από έγκαυμα, με θερμό νερό, οξειδωτική βλάβη του δέρματος. Ακόμη, έχουν εξεταστεί και άλλες θεραπευτικές δράσεις της σιλυμαρίνης/σιλυβίνης σε διάφορες ασθένειες (π.χ. υπερχοληστερολαιμία, ρευματοειδής αρθρίτιδα, κ.ά.), ενώ έχει βρεθεί ότι η σιλυμαρίνη έχει περιορισμένη επίδραση στη φαρμακοκινητική αρκετών φαρμάκων *in vivo*. Μέχρι σήμερα, σε κλινικό επίπεδο δεν υπάρχουν καλά δομημένες έρευνες με μεγάλο αριθμό ασθενών που να υποστηρίζουν τα αποτελέσματα των

δράσεων της σιλυμαρίνης. Το μόνο ισχυρά τεκμηριωμένο εύρημα των κλινικών ερευνών είναι η απουσία ανεπιθύμητων παρενεργειών σε υψηλές δόσεις σιλυμαρίνης και σιλυβίνης (Gažák, Walterová & Křen, 2007; Toklu *et al.*, 2007; Wu, Lin & Tsai, 2009; Loguercio & Festi, 2011; Tong *et al.*, 2018).

1.11. Καλλιέργεια του φυτού γαϊδουράγκαθο

Το γαϊδουράγκαθο μπορεί να καλλιεργηθεί είτε ως χειμερινό είτε ως εαρινό φυτό, δεδομένου ότι δεν απαιτεί εαρινοποίηση (Groves & Kaye, 1989). Στην Πολωνία που το κλίμα είναι ήπιο ηπειρωτικό, όπως και σε άλλες χώρες με παρόμοιο κλίμα, το φυτό καλλιεργείται ως εαρινό (Andrzejewska *et al.*, 2011). Στις χώρες με μεσογειακό και υποτροπικό κλίμα (Νότια Ευρώπη, Βόρεια Αφρική, Κεντρική και Δυτική Ασία), όπου το γαϊδουράγκαθο είναι συνήθως χειμερινό ζιζάνιο, το φυτό καλλιεργείται ως χειμερινό, ώστε να εξασφαλίζεται η πλήρης ανάπτυξή του.

Έδαφος

Το γαϊδουράγκαθο προσαρμόζεται ικανοποιητικά σε πολλές διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης, ενώ αναπτύσσει ισχυρό ριζικό σύστημα. Το φυτό καλλιεργείται επιτυχώς σε αμμώδη έως βαριά αργιλώδη ή ακόμη και πετρώδη εδάφη (Das *et al.*, 2008; Karkanis *et al.*, 2011). Η καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου σε γόνιμα εδάφη, ακόμη και αν συνιστάται, μπορεί να παρουσιάσει προβλήματα. Σύμφωνα με τους Andrzejewska *et al.* (2011) σε εύφορα εδάφη στην Πολωνία, ιδιαίτερα μετά από καλοκαιρινές βροχοπτώσεις, παρατηρείται μεγάλη βλαστητική ανάπτυξη και τα φυτά σχηματίζουν ταξιανθίες σε αρκετούς δευτερογενείς κλάδους, με αποτέλεσμα να παρατείνεται η βλαστητική ανάπτυξη, να επηρεάζεται δυσμενώς η ομοιόμορφη ωρίμανση και να γίνεται πιο δύσκολη η συγκομιδή. Το pH του εδάφους στις καλλιέργειες γαϊδουράγκαθου είναι συνήθως 5,5-7,6 αν και το φυτό είναι ανεκτικό και σε ακραίες τιμές pH, όπως 4,3 και 8,6 (Tang & Willey, 2003; Brunetti *et al.*, 2009; Karkanis *et al.*, 2011).

Προετοιμασία εδάφους

Όσον αφορά την προετοιμασία του εδάφους πριν τη σπορά, σύμφωνα με τους Nikolaychenko *et al.* (2018) η καλύτερη μέθοδος είναι όργωμα σε βάθος περίπου 25 cm και μετά ένα πέρασμα με καλλιεργητή σε βάθος μικρότερο των 10 cm.

Σπορά

Η σπορά του γαϊδουράγκαθου γίνεται την άνοιξη ή το φθινόπωρο ανάλογα με το αν το φυτό καλλιεργείται ως εαρινό ή χειμερινό, αντίστοιχα. Οι αποδόσεις της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου σε σύστημα μονοκαλλιέργειας στην Πολωνία ήταν 40% μικρότερες από αυτές όταν το γαϊδουράγκαθο καλλιεργούνταν σε εναλλαγή με άλλες καλλιέργειες. Ακόμη, η όψιμη σπορά είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη, ενώ η πρόωγη σπορά αύξησε την απόδοση σε σπόρο μόνο στην περίπτωση εφαρμογής συστήματος αμειψισποράς (Andrzejewska & Skinder, 2006). Η αποθήκευση των σπόρων στους 7 °C ή στους 23 °C για έξι εβδομάδες πριν τη σπορά, σε σχέση με την αποθήκευση στους 15 °C, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του φυτρώματος, αν και το γεγονός αυτό δεν επηρέασε την απόδοση σε σπόρο (Andrzejewska, Ignaczak & Martinelli, 2017). Την ίδια επίδραση είχε και η σπορά σπόρων μεγαλύτερου μεγέθους (βάρους 1000 σπόρων μεγαλύτερου των 22 g). Η απομάκρυνση των μικρών σπόρων (βάρους 1000 σπόρων μικρότερου των 22 g) από τους σπόρους που χρησιμοποιούνται για τη σπορά είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική βελτίωση στην περιεκτικότητα της σιλυμαρίνης στους σπόρους κατά τη συγκομιδή.

Βάθος σποράς

Το βέλτιστο βάθος σποράς για τους σπόρους γαϊδουράγκαθου είναι 1-3 εκατοστά. Σε πειράματα που έκαναν οι Montemurro, Fracchiolla και Lonigro (2007) παρατήρησαν ότι το φύτρωμα των νέων φυτών ήταν μειωμένο όταν το βάθος ήταν μεγαλύτερο των 3 cm (67,5% στα 3 cm και 22,5% στα 6 cm). Επίσης, και οι Young, Evans και Hawkes (1978) συμπέραναν ότι η φυτρωτική ικανότητα των σπόρων γαϊδουράγκαθου μειώνεται με την αύξηση του βάθους σποράς σε αμμώδη ή

αργιλώδη εδάφη, με τη μείωση να είναι σημαντική σε βάθος 8 cm (34% ή 28%, αντίστοιχα). Η φυτρωτικότητα στις καλλιέργειες γαϊδουράγκαθου στην Πολωνία είναι συνήθως 65% (Andrzejewska *et al.*, 2011), ενώ εξαρτάται από την ύπαρξη υγρασίας στο έδαφος σε βάθος 0-10 cm (Nikolaychenko *et al.*, 2018).

Θερμοκρασία εδάφους

Το φύτρωμα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου εξαρτάται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος (Andrzejewska *et al.*, 2017). Σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, κατά την περίοδο σποράς του γαϊδουράγκαθου, η λιγότερο ευνοϊκή θερμοκρασία του εδάφους σε βάθος 5 cm ήταν κατά μέσο όρο το μήνα Απρίλιο 6,1 °C. Οι Martin *et al.* (2000) σε πειράματα αγρού που έκαναν διαπίστωσαν ότι το φύτρωμα των σπόρων ήταν μικρό σε θερμοκρασία εδάφους μικρότερης των 11-13 °C, σε βάθος 10 cm, ενώ ήταν σχεδόν μηδενικό στους 6 °C. Σύμφωνα με εργαστηριακά πειράματα που πραγματοποίησαν οι Groves και Kaye (1989), η βλαστική ικανότητα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου σε θερμοκρασίες 25/15 °C (ημέρα/νύχτα) ήταν 90%, σε 20/10 °C ήταν 65%, ενώ σε 15/5 °C η βλαστική ικανότητα μειώθηκε σε 20%. Σε παρόμοια πειράματα που πραγματοποίησαν οι Young *et al.* (1978) με σπόρους γαϊδουράγκαθου, διαπίστωσαν ότι τη μεγαλύτερη ικανότητα βλάστησης, με ποσοστό 90%, παρουσίασαν οι σπόροι στους 10 °C, πέντε μήνες μετά τη συγκομιδή τους. Σε πειράματα με διακύμανση θερμοκρασίας, η βέλτιστη βλαστική ικανότητα παρατηρήθηκε είτε σε χαμηλές θερμοκρασίες νύχτας (16 ώρες) 2 ή 5 °C και ήπιες θερμοκρασίες ημέρας (8 ώρες) 15 ή 20 °C, είτε σε 10 ή 15 °C θερμοκρασίες νύχτας και 10 έως 30 °C θερμοκρασίες ημέρας. Σύμφωνα με τους Montemurro *et al.* (2007) το μεγαλύτερο ποσοστό βλάστησης των σπόρων παρατηρήθηκε στο σκοτάδι στους 25 °C ή στους 30 °C ή στους 15/25 °C (16/8 ώρες). Στους 5/25 °C (16/8 ώρες) το ποσοστό βλάστησης ήταν μόνο 9%. Τέλος, το 2015 σε εργαστηριακά πειράματα που διεξήγαγαν οι Parmoon *et al.* συμπέραναν ότι η κατώτερη θερμοκρασία για τη βλάστηση του 50% των σπόρων γαϊδουράγκαθου ήταν 5,2±0,8 °C, η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν 24,0±0,1 °C και η μέγιστη 34,3±0,4 °C. Ακόμη, υπολόγισαν τους θερμικούς χρόνους (thermal times) που απαιτούνται για 50% και 90% βλάστηση των σπόρων σε 4,99 και 7,38 θερμικές μονάδες ανά ημέρα, αντίστοιχα.

Καιρικές συνθήκες

Οι καιρικές συνθήκες παίζουν σημαντικό στην καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου, όπως και στις καλλιέργειες πολλών άλλων ειδών. Σύμφωνα με τα πειράματα των Andrzejewska *et al.* (2011) κατά τη διάρκεια τριών χρόνων, η απόδοση σε σπόρο εξαρτιόταν κυρίως από τις καιρικές συνθήκες, ενώ αυτές είχαν την μεγαλύτερη επίδραση και στο ύψος των φυτών και τον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό. Οι Carrier *et al.* (2003) διαπίστωσαν ότι όταν το φθινόπωρο οι καιρικές συνθήκες ήταν ξηροθερμικές, αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης σε σπόρο λόγω του μεγαλύτερου αριθμού ώριμων κεφαλών, ενώ όταν οι συνθήκες ήταν αντίστροφες η απόδοση σε σπόρο μειώνονταν περίπου κατά 50% λόγω της παρατεινόμενης βλαστητικής ανάπτυξης και του μικρότερου αριθμού ώριμων ανοιχτών κεφαλών κατά τη συγκομιδή. Σε μελέτη των Nikolaychenko *et al.* (2018) στην περιοχή του Βόλγα (κλίμα στέπας), η μείωση της απόδοσης κατά τα ξηρά έτη ήταν 25-55%. Καθοριστική είναι η επίδραση των καιρικών συνθηκών, όπως και του γονότυπου, και στην περιεκτικότητα των σπόρων σε έλαιο (Růžičková *et al.*, 2011). Στην Πολωνία και σε άλλες χώρες η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη επηρεάζεται από τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν κατά τη φάση της βλαστητικής ανάπτυξης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται κατά τα θερμά έτη ή όταν η σπορά είναι όψιμη (Andrzejewska & Sadowska, 2008; Habán *et al.*, 2009). Όμως, η αναλογία των συστατικών της σιλυμαρίνης δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από τις καιρικές συνθήκες, αλλά εξαρτάται κυρίως από το γονότυπο (Martin *et al.*, 2006; Andrzejewska & Sadowska, 2008).

Απόσταση – πληθυσμός φυτών

Η απόσταση μεταξύ των σειρών κατά τη σπορά του γαϊδουράγκαθου είναι συνήθως 40-75 εκατοστά (Karkanis *et al.*, 2011). Σε πειράματα των Omer *et al.* (1993) όπου οι σειρές των φυτών απείχαν μεταξύ τους 25 cm και 50 cm, στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας σποράς καταγράφηκαν μεγαλύτερες τιμές για το ύψος των φυτών, τον αριθμό των κεφαλών, την περιεκτικότητα σε έλαιο και την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη, ενώ η μεγαλύτερη απόδοση σε σπόρο, όπως και σε έλαιο, καταγράφηκε στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας. Σύμφωνα με τον Schulte (1999, όπ. αναφ. στο Andrzejewska *et al.*, 2011) ο αριθμός των δευτερογενών βλαστών του φυτού επηρεάζεται από την πυκνότητα σποράς και τις κλιματικές

συνθήκες. Σε πυκνότητα σποράς 10 φυτά/m² τα φυτά είχαν 10-16 πλευρικούς βλαστούς, ενώ σε διπλάσια πυκνότητα σποράς οι βλαστοί μειώθηκαν στο μισό. Σύμφωνα με τον ίδιο ερευνητή, οι μεγαλύτερες αποδόσεις σε σπόρο αναφέρθηκαν για πυκνότητα σποράς 40-50 φυτών/m² στην Ισπανία και 20-30 φυτών/m² στη Γερμανία. Η βέλτιστη πυκνότητα για την καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου στην Πολωνία είναι 30 φυτά/m², ενώ σε πειράματα που έγιναν η πυκνότητα της καλλιέργειας δεν επηρέασε την απόδοση σε σπόρο αλλά επηρέασε διάφορα φυτικά χαρακτηριστικά, αν και η επίδραση των καιρικών συνθηκών σε αυτά ήταν μεγαλύτερη. Στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας (~40 φυτά/m²) παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές για το ύψος των φυτών, τον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό, τον αριθμό των σπόρων ανά ταξιανθία και το βάρος των 1000 σπόρων (Andrzejewska *et al.*, 2011). Σύμφωνα με τους Tahernia *et al.* (2014) η επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (4,6 και 8 φυτά/m²) δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στο ύψος των φυτών, τον αριθμό των κεφαλών ανά φυτό, το βάρος των 1000 σπόρων και την απόδοση σε σπόρο και σε σιλυμαρίνη. Καμία στατιστικά σημαντική επίδραση δεν είχε η πυκνότητα της καλλιέργειας (13 φυτά/m² – 27 φυτά/m²) στο ύψος των φυτών, την απόδοση σε σπόρο και την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη και στα πειράματα των Martin *et al.* (2002). Αντίθετα, σύμφωνα με τους Katar, Arslan και Subasi (2013) το μεγαλύτερο ύψος φυτών, ο μικρότερος αριθμός πλευρικών βλαστών και η μεγαλύτερη απόδοση τόσο σε σπόρο όσο και σε σιλυμαρίνη καταγράφηκε στην καλλιέργεια της μεγαλύτερης πυκνότητας (4 φυτά/m²).

Άρδευση

Το γαϊδουράγκαθο θεωρείται ανθεκτικό στην ξηρασία και η φυσιολογική βροχόπτωση συνήθως είναι επαρκής (Karkanis *et al.*, 2011), ενώ τόσο η έλλειψη όσο και η υπερεπάρκεια νερού περιορίζουν τη συσσώρευση της σιλυμαρίνης (Andrzejewska *et al.*, 2011). Σύμφωνα με τους Hammouda *et al.* (1993), η υψηλότερη περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη παρατηρήθηκε όταν η εδαφική υγρασία ήταν το 60% της υδατοχωρητικότητας του εδάφους, χωρίς λίπανση. Σε πειράματα που πραγματοποίησαν οι Afshar *et al.* (2014) στο Ιράν, μείωσαν την άρδευση που απαιτείται φυσιολογικά κατά 25% ή 50% και διαπίστωσαν ότι η απόδοση σε σπόρο μειώθηκε κατά 7% ή 27%, η απόδοση σε έλαιο μειώθηκε κατά 9% ή 32%, ενώ η

περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη αυξήθηκε κατά 3% ή 17%, αντίστοιχα. Η απόδοση σε σιλυμαρίνη μειώθηκε κατά 13%, όταν η άρδευση περιορίστηκε στο 50%. Ακόμη παρατήρησαν ότι σε συνθήκες έλλειψης νερού μειώθηκε ο αριθμός των σπόρων ανά κεφαλή και ο αριθμός των κεφαλών ανά φυτό. Όσον αφορά τα συστατικά της σιλυμαρίνης, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι λόγω της μείωσης της άρδευσης μειώθηκε το ποσοστό της σιλυδιανίνης και αυξήθηκε το ποσοστό των άλλων συστατικών (Afshar *et al.*, 2015). Σε πειράματα που διεξήγαγαν οι Malekzadeh *et al.* (2011) διαπίστωσαν ότι σε συνθήκες έλλειψης νερού η απόδοση σε έλαιο μειώθηκε κατά 4%, ενώ επηρεάστηκε και η αναλογία των συστατικών του ελαίου.

Λίπανση – Ρυθμιστές ανάπτυξης

Η καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά, δεδομένου ότι μπορεί να προσαρμοστεί και σε ελαφρά εδάφη. Συνήθως πριν τη σπορά εφαρμόζεται λίπανση με κάλιο και φώσφορο (Karkanis *et al.*, 2011). Σε καλλιέργεια του φυτού στην Αίγυπτο οι Omer *et al.* (1993) διαπίστωσαν ότι τόσο η λίπανση με κάλιο ($115 \text{ kg K}_2\text{O ha}^{-1}$) όσο και η λίπανση με άζωτο (140 kg ha^{-1}) αύξησαν την απόδοση σε σπόρο και έλαιο και την περιεκτικότητα σε έλαιο και σιλυμαρίνη. Σε πειράματα που πραγματοποίησαν οι Andrzejewska και Sadowska (2008) με εφαρμογή λίπανσης καλίου (58 και 116 kg K ha^{-1}) παρατήρησαν ότι η λίπανση, όπως και η απόσταση σποράς (20 cm και 50 cm), δεν επηρέασαν την απόδοση σε σπόρο και την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη. Η εφαρμογή λίπανσης αζώτου (100 kg ha^{-1}) αύξησε την απόδοση σε σπόρο σε δύο διαφορετικά έτη, αλλά δεν είχε καμία επίπτωση στην περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη ή στο ύψος των φυτών (Martin *et al.*, 2002). Η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στην καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου εξετάστηκε και από τους Školníková *et al.* (2019) στην Τσεχία. Η λίπανση αύξησε τον αριθμό των κεφαλών ανά φυτό, όπως και το βάρος των σπόρων ανά κεφαλή, ενώ δεν επηρέασε το βάρος των 1000 σπόρων και μείωσε το ύψος των φυτών. Ακόμη η λίπανση αύξησε τόσο το νωπό βάρος του φυτού όσο και το ξηρό βάρος, ενώ η περιεκτικότητα των σπόρων σε σιλυμαρίνη αυξήθηκε κατά 6% μόνο σε μία από τις τέσσερεις επεμβάσεις με λίπανση N, με την τιμή της περιεκτικότητας να μειώνεται στις άλλες τρεις. Οι Afshar *et al.* (2014) χρησιμοποίησαν κομπόστ (vermicompost) και κοπριά πουλερικών σε πειράματα καλλιέργειας γαϊδουράγκαθου

και παρατήρησαν ότι αυξήθηκε η απόδοση σε σπόρο, σε έλαιο και σε σιλυμαρίνη και στις δύο επεμβάσεις, όμως μόνο η επίδραση της κοπριάς πουλερικών ήταν στατιστικά σημαντική.

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στη Νέα Ζηλανδία, τα φυτά ψεκάστηκαν με έναν ρυθμιστή ανάπτυξης (a.i. 850 g kg⁻¹ daminozide) όταν ξεκινούσε η επιμήκυνση του βλαστού και το ύψος τους μειώθηκε από 1,6 m σε 1,3 m, ενώ η απόδοση σε σπόρο αυξήθηκε κατά 19% (Martin *et al.*, 2002).

Πειράματα αγρού πραγματοποίησαν οι Geneva *et al.* (2007) στη Βουλγαρία για να διαπιστώσουν την επίδραση διάφορων ρυθμιστών ανάπτυξης, σε συνδυασμό με λίπανση εδάφους ή διαφυλλική λίπανση, στη απόδοση σε σπόρο και σε σιλυμαρίνη σε καλλιέργεια γαϊδουράγκαθου. Η εφαρμογή μόνο της λίπανσης αύξησε τόσο τον αριθμό των κεφαλών όσο και τον αριθμό των ώριμων κεφαλών, ενώ όταν η εφαρμογή της λίπανσης συνδυάστηκε με την εφαρμογή των ρυθμιστών ανάπτυξης παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση των παραπάνω χαρακτηριστικών. Η απόδοση σε σπόρο ήταν μεγαλύτερη στην επέμβαση με τη λίπανση του εδάφους και τη χρήση του meriquat chloride (a.i. 1,66 kg ha⁻¹) ως ρυθμιστή ανάπτυξης, ενώ ακολούθησαν σε απόδοση οι επεμβάσεις με τη διαφυλλική λίπανση και τη χρήση των meriquat chloride (a.i. 1,66 kg ha⁻¹) και prohexadione-Ca (a.i. 41,66 g ha⁻¹) ως ρυθμιστών ανάπτυξης. Η περιεκτικότητα της σιλυμαρίνης στους σπόρους μειώθηκε όταν εφαρμόστηκε η λίπανση χωρίς ή σε συνδυασμό με την εφαρμογή των ρυθμιστών ανάπτυξης, εκτός της επέμβασης με διαφυλλική λίπανση και τη χρήση του thidiazuron (a.i. 8,33 g ha⁻¹) ως ρυθμιστή ανάπτυξης. Όμως η απόδοση σε σιλυμαρίνη αυξήθηκε λόγω της αύξησης της απόδοσης σε σπόρο.

Σε πειράματα που έγιναν στην περιοχή της Κεντροδυτικής Βουλγαρίας σε δύο καλλιεργητικές περιόδους, η εφαρμογή διαφυλλικής λίπανσης (a.i. 41,66 g ha⁻¹ – N:P:K 20:20:20/12:52:5/15:10:31) αύξησε το ξηρό βάρος των σπόρων ανά κεφαλή, τον αριθμό των σπόρων ανά κεφαλή, τον συνολικό αριθμό των κεφαλών και την απόδοση σε σπόρο. Η δράση αυτή ενισχύθηκε με τη συνδυασμένη εφαρμογή της διαφυλλικής λίπανσης και του ρυθμιστή ανάπτυξης (5-*tert*-butyl-*N*-*m*-tolylpyrazine-2-carboxamide). Την πρώτη καλλιεργητική περίοδο η περιεκτικότητα των σπόρων σε σιλυμαρίνη αυξήθηκε λόγω της συνδυαστικής επίδρασης της λίπανσης και του ρυθμιστή ανάπτυξης (10⁻³ - 10⁻⁵ M). Την δεύτερη περίοδο όμως, η περιεκτικότητα

των σπόρων σε σιλυμαρίνη μειώθηκε κατά περίπου 20% λόγω της εφαρμογής της διαφυλλικής λίπανσης, ενώ όταν αυτή συνδυάστηκε με τον ρυθμιστή ανάπτυξης η μείωση της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη ήταν μικρή (4,4%). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο ύψος των φυτών λόγω της εφαρμογής του ρυθμιστή ανάπτυξης (Stancheva *et al.*, 2010).

Έλεγχος ζιζανίων

Αν και το γαϊδουράγκαθο θεωρείται ζιζάνιο σε αρκετές χώρες και μάλιστα αρκετά ανταγωνιστικό, όταν καλλιεργείται ως φαρμακευτικό φυτό ένας περιοριστικός παράγοντας στην παραγωγή του είναι ο ανταγωνισμός των ζιζανίων, κυρίως στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του. Στα στάδια αυτά, τα ζιζάνια παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των νεαρών φυτών και μειώνουν την απόδοση της καλλιέργειας (Zheljazkov *et al.*, 2006; Andrzejewska *et al.*, 2017).

Ο έλεγχος των ζιζανίων στην καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου δεν είναι εύκολος, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν εγκεκριμένα ζιζανιοκτόνα για την καλλιέργεια. Πειράματα για την εφαρμογή ζιζανιοκτόνων στην καλλιέργεια του φυτού πραγματοποίησαν οι Drapalona και Pluhackova (2014), όμως τα αποτελέσματα δεν είναι ξεκάθαρα, λόγω της επίδρασης των καιρικών συνθηκών. Κατάλληλα ζιζανιοκτόνα για την καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου βρέθηκε ότι είναι τα pendimethalin και fluazifop-p-butyl, δεδομένου ότι για αυτά καταγράφηκαν οι υψηλότερες τιμές για τα χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν, όπως η απόδοση σε σπόρο και το βάρος 1000 σπόρων, ενώ το ποσοστό φυτοτοξικότητας των ζιζανιοκτόνων αυτών βρέθηκε να είναι κατά την πρώτη αξιολόγηση περίπου 5%, με το ποσοστό να μειώνεται στους επόμενους ελέγχους.

Ασθένειες – Έντομα

Το γαϊδουράγκαθο είναι ευπαθές σε διάφορα έντομα και ασθένειες. Οι μύκητες *Puccinia punctiformis* (F. Strauss) Rohl. και *Microbotryum silybum* Vánky & Berner έχουν αναφερθεί ως παθογόνα του γαϊδουράγκαθου (Berner *et al.*, 2002; Souissi, Berner & Smallwood, 2005). Το γαϊδουράγκαθο προσβάλλεται και από διάφορα

έντομα. Οι προνύμφες του *Cleonus piger* Scop. τρέφονται από τις ρίζες του φυτού δημιουργώντας προβλήματα στην καλλιέργεια, ειδικά όταν ακολουθείται το σύστημα μονοκαλλιέργειας (Andrzejewska & Skinder, 2006). Οι προνύμφες του εντόμου *Larinus latus* Herbst προσβάλλουν την ταξιανθία του φυτού και είναι ικανές να καταστρέψουν όλους τους σπόρους (Abdel-Moniem, 2002).

Συγκομιδή – Απόδοση

Στις καλλιέργειες του γαϊδουράγκαθου η ωρίμανση των σπόρων, όπως και η άνθηση, δεν είναι ταυτόχρονη με αποτέλεσμα κατά τη συγκομιδή να συνυπάρχουν όλα τα φυσιολογικά στάδια της ανάπτυξης των κεφαλών και να προβληματίζει το πότε πρέπει να γίνει η συγκομιδή για να έχουμε μεγαλύτερη απόδοση σε σπόρο, αλλά και σε σιλυμαρίνη (Carrier *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2006). Οι Curioni *et al.* (2002) σε καλλιέργεια γαϊδουράγκαθου στην Αργεντινή διαπίστωσαν ότι όταν το ποσοστό των ώριμων κεφαλών είναι 20% ή 50% η συγκομιδή μπορεί να γίνει 18 ή 14 ημέρες μετά, αντίστοιχα. Έρευνα, που έγινε στη Χιλή, έδειξε ότι ο κατάλληλος χρόνος για τη συγκομιδή του γαϊδουράγκαθου είναι όταν τα φυτά βρίσκονται στο φυσιολογικό στάδιο των τεσσάρων ώριμων κεφαλών (Hevia *et al.*, 2007). Τέλος, μελέτη των Sadowska και Andrzejewska (2009) έδειξε ότι η συγκομιδή σε ένα στάδιο όταν το 30% των κεφαλών είναι ώριμο είχε πολύ μεγαλύτερη απόδοση σε σπόρο και σε σιλυμαρίνη, από ότι ο παραδοσιακός τρόπος συγκομιδής σε δύο στάδια ή η συγκομιδή σε ένα στάδιο όταν το 50% των κεφαλών είναι ώριμο.

Έχουν καταγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία διαφορές για την απόδοση της καλλιέργειας σε διάφορες περιοχές και εδάφη διαφορετικής γονιμότητας. Για παράδειγμα, η μέση απόδοση σε σπόρο στην Πολωνία είναι 123 kg/στρέμμα, ενώ σε γόνιμα εδάφη μπορεί να φτάσει τα 200 kg/στρέμμα, και η μέση απόδοση σε σιλυμαρίνη είναι 2,6 kg/στρέμμα (Andrzejewska *et al.*, 2011). Σε μία άλλη χώρα της Κεντρικής Ευρώπης, στη Σλοβακία, η απόδοση σε σπόρο κυμάνθηκε από 23,3 έως 183,2 kg/στρέμμα και η απόδοση σε σιλυμαρίνη από 0,8 έως 2,5 kg/στρέμμα (Habán *et al.*, 2009). Αντίθετα, στη Ρωσία καταγράφηκαν σημαντικά μικρότερες αποδόσεις, οι οποίες κυμάνθηκαν από 67 έως 96 kg/στρέμμα (Nikolaychenko *et al.*, 2018). Στο Ιράν, μια χώρα με μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τις καιρικές συνθήκες, η απόδοση σε σπόρο παρουσιάζει μεγάλο εύρος τιμών και κυμαίνεται από 80,0 έως 241,7

kg/στρέμμα και η απόδοση σε σιλυμαρίνη από 1,4 έως 2,3 kg/στρέμμα (Shokrpour *et al.*, 2008; Shokrpour *et al.*, 2011; Afshar *et al.*, 2014; Tahernia *et al.*, 2014). Στη Βουλγαρία η απόδοση σε σπόρο κυμαίνεται από 87,0 έως 147,6 kg/στρέμμα (Stancheva *et al.*, 2010), ενώ στην Ινδία σε μία ποικιλία (SMB-5) του γαϊδουράγκαθου η απόδοση ήταν 330 kg/στρέμμα (Bahl *et al.*, 2015). Σε όλες τις παραπάνω μελέτες η απόδοση αναφέρεται σε καλλιέργειες χωρίς τη χρήση λίπανσης ή άλλων επεμβάσεων.

ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοποί της παρούσας διατριβής ήταν:

- Η αξιολόγηση ελληνικών πληθυσμών του φυτού γαϊδουράγκαθου (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) ως προς την περιεκτικότητά τους σε έλαιο, σε σιλυμαρίνη και σε βιοδραστικά συστατικά της σιλυμαρίνης.
- Η δοκιμή καινοτόμων τεχνικών για την απομόνωση της σιλυμαρίνης και των συστατικών της από τα εκχυλίσματα των σπόρων του φυτού.
- Η μελέτη της επίδρασης της πυκνότητας της καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης periquat chloride, στην ανάπτυξη, την ποιότητα και την απόδοση του φυτού σε έλαιο και σε σιλυμαρίνη.

Το γαϊδουράγκαθο παρουσιάζει ενδιαφέρον γιατί καλλιεργείται σε διάφορες χώρες λόγω των φαρμακευτικών ιδιοτήτων του που οφείλονται στη σιλυμαρίνη, ένα μίγμα διαφόρων ουσιών που περιέχεται στο εκχύλισμα των σπόρων. Μάλιστα, τα συμπληρώματα διατροφής με σιλυμαρίνη βρίσκονται ανάμεσα στα πιο δημοφιλή φυτικά προϊόντα. Ακόμη, οι σπόροι και η βιομάζα ολόκληρου του φυτού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ελαίου και ενέργειας αντίστοιχα.

Για την αξιολόγηση πληθυσμών του φυτού σχεδιάστηκε και διεξήχθη μια εκτεταμένη μελέτη τριάντα τεσσάρων γηγενών πληθυσμών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, με διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Για την απομόνωση της σιλυμαρίνης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης Soxhlet. Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη και στα συστατικά της πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης και πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, ενώ η κινητή φάση αποτελούνταν από μίγμα οξιτισμένου νερού/μεθανόλης. Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα σιλυμαρίνης και σιλβινίνης για την αξιολόγηση του χρωματογραφικού διαχωρισμού των συστατικών της σιλυμαρίνης και για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης, αντίστοιχα.

Ακόμη, έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων των σπόρων των πληθυσμών, με τις μεθόδους DPPH και FRAP, και της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε ολικά φαινολικά συστατικά, με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Επίσης, εξετάστηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν

και έγινε ανάλυση κύριων συνιστωσών για να εξεταστεί η συμβολή (συνεισφορά) των συστατικών της σιλυμαρίνης στην ποικιλομορφία των πληθυσμών, ενώ χρησιμοποιήθηκε η ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες για την ταξινόμηση των πληθυσμών και για τη δημιουργία ομοιογενών κατηγοριών των πληθυσμών που μελετήθηκαν.

Για την απομόνωση της σιλυμαρίνης και των συστατικών της δοκιμάστηκε η καινοτόμος τεχνική της μη-ομοιοπολικής μοριακής αποτύπωσης. Για τη δημιουργία των μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές του πολυμερισμού διαλύματος και της ηλεκτροστατικής ινοποίησης. Η αξιολόγηση των μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών έγινε με πειράματα στατικής επαναδέσμευσης.

Για τη μελέτη της επίδρασης της πυκνότητας σποράς στην καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου πραγματοποιήθηκαν πειράματα στο αγρόκτημα Βελεστίνου, σε τρεις καλλιεργητικές περιόδους. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η επίδρασή της στη διάμετρο ροζέτας, στη συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD), στο ύψος των φυτών, στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών, στον αριθμό των ταξιανθιών, στο βάρος των 1000 σπόρων, στην απόδοση σε σπόρο και στην περιεκτικότητα και απόδοση σε έλαιο και σιλυμαρίνη.

Δεδομένου ότι είναι επιθυμητή η μείωση του ύψους των φυτών για την ελάττωση της διασποράς των σπόρων (τίναγμα) και τον έλεγχο εντόμων και ασθενειών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την επίδραση του ρυθμιστή ανάπτυξης στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειας.

Τέλος, σε πειραματική καλλιέργεια έγινε αξιολόγηση σπόρων σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης ως προς την περιεκτικότητά τους σε έλαιο, σε σιλυμαρίνη και σε βιοδραστικά συστατικά της σιλυμαρίνης. Η συγκομιδή της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου στο κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης αποτελεί κρίσιμο παράγοντα ώστε να καταστεί οικονομικά βιώσιμη η καλλιέργεια. Ακόμη, έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων των σπόρων του φυτού σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΙΛΥΜΑΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

2.1. Εισαγωγή

Η μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της σιλυμαρίνης εφαρμόστηκε στους σπόρους των φυτών των πληθυσμών που συλλέχθηκαν κατά τη διαδικασία αξιολόγησης των γηγενών πληθυσμών του γαϊδουράγκαθου, στους σπόρους των φυτών που καλλιεργήθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης της πυκνότητας της καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης periquat chloride, στην ανάπτυξη, την ποιότητα και την απόδοση του φυτού σε έλαιο και σε σιλυμαρίνη, καθώς και κατά τη διαδικασία αξιολόγησης των μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών που δημιουργήθηκαν με την τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.

Για την απομόνωση της σιλυμαρίνης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης Soxhlet λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει και λόγω της χρήσης της από πολλούς ερευνητές για το σκοπό αυτό, γεγονός που επιτρέπει την σύγκριση των αποτελεσμάτων, ενώ είναι και η προτεινόμενη μέθοδος από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία. Στα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής περιλαμβάνονται η υψηλή απόδοση, η απλότητά της, το μικρό σχετικά κόστος και η δυνατότητα εκχύλισης μεγάλων ποσοτήτων δείγματος, ενώ δεν απαιτείται διήθηση μετά το τέλος της εκχύλισης. Σημαντικά μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής αποτελούν η μεγάλη σχετικά ποσότητα διαλύτη που απαιτείται και η μεγάλη χρονική διάρκεια της εκχύλισης.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις μεθόδους DPPH και FRAP, και ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, πραγματοποιήθηκε στα εκχυλίσματα των σπόρων των φυτών που συλλέχθηκαν και των φυτών που καλλιεργήθηκαν. Ακόμη, έγινε μέτρηση του χρώματος σε σπόρους των φυτών αυτών.

2.2. Υλικά και μέθοδοι

2.2.1. Υλικά – Όργανα

Αντιδραστήρια

- 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλδραζύλιο (DPPH), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- 2,4,6-τρις-(2-πυριδιλο)-s-τριαζίνη (TPTZ), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Χλωριούχος σίδηρος (III) ένυδρος, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck, Germany
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, PENTA, Prague, Czech republic
- Μεθανικό οξύ, Carlo Erba Reagents, France
- Αιθανικό οξύ (Glacial), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Υδροχλωρικό οξύ
- Αιθανικό νάτριο ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3), Merck, Germany

Πρότυπες ενώσεις

- Σιλυβίνη $\geq 98\%$ (Σιλυβίνη Α και Β), *BCBP6193V* (99,1%), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Σιλυμαρίνη, *BCBJ0393V* (45,0% Silybin), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- L-Ασκορβικό οξύ, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Γαλλικό οξύ (3,4,5-Trihydrobenzoic), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Διαλύτες

- Μεθανόλη (HPLC Grade), Fisher Scientific, UK
- Νερό (LC-MS Grade), Fisher Scientific, UK
- Εξάνιο (ACS reagent), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Μεθανόλη (ACS reagent), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Ακετόνη (Analytical reagent), Fisher Scientific, UK
- Ακετονιτρίλιο (HPLC grade), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Απόλυτη αιθανόλη (ACS reagent), Riedel-de Haen, Germany

Αναλώσιμα - Υλικά

- Φύσιγγες εκχύλισης κυτταρίνης 30x100mm, Whatman International Ltd, England
- Φίλτρα μεμβράνης νάιλον 0,45 μm , Captiva Agilent Technologies, USA

- Φιαλίδια χρωματογραφίας
- Γυάλινα βιδωτά φιαλίδια 40 mL
- Μικροσύριγγες 10-500 μ L
- Γυάλινες σύριγγες 2-5 mL
- Μικροπιπέτες Pasteur μίας χρήσης 3,5 mL
- Σιφόνια μέτρησης και πλήρωσης 1-25 mL
- Ογκομετρικές φιάλες 10-1000 mL
- Σφαιρικές φιάλες 250-500 mL
- Ποτήρια ζέσεως 10-500 mL
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ταινίες σφράγισης Parafilm
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια πιπετών Pipette Tip
- Κυψελίδες φασματοφωτόμετρου

Όργανα - Συσκευές

- Ηλεκτρικός κόφτης μύλος
- Συσκευή εκχύλισης Soxhlet
- Περιστροφικός εξατμιστήρας, BUCHI Rotavapor R-300, συνδεδεμένος με αντλία κενού και σύστημα ψύξης
- Ζυγός ακριβείας $\pm 0,0001$ g, KERN ALS 220-4, Germany
- Ζυγός ακριβείας $\pm 0,01$ g, Sartorius GT1100B-G, USA
- Θερμομανδύας, EM Electromantles, Electrothermal, UK
- Συσκευή ανακίνησης (Vortex) Heidolph, Germany
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) HP1100 (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, Germany) εφοδιασμένο με σύστημα τριμερούς παροχής και ανιχνευτή UV μεταβλητού μήκους κύματος
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Optizen Pop, Mecasys, Korea)
- Χρωματόμετρο Chroma CR-400 (Konica Minolta Inc., Tokyo, Japan)
- Υδατόλουτρο
- Πεχάμετρο, micropH 2002, CRISON, Spain
- Μαγνητικός αναδευτήρας, NUOVA Stir Plate, Thermolyne, USA
- Αυτόματη πιπέτα, Nichipet EX, NICHIRYO, Japan
- Λουτρό υπερήχων, TRANSSONIC T 460/H, Elma, Germany

2.2.2. Εκχύλιση ελαίου και σιλυμαρίνης

Για τον προσδιορισμό των συστατικών σιλυμαρίνης ποσότητα αποξηραμένων και καθαρισμένων σπόρων αλέστηκαν σε έναν μύλο. Το κονιοποιημένο δείγμα (5,000 g) τοποθετήθηκε σε πορώδη περιέκτη (φύσιγγα κυτταρίνης) και έγινε πολλαπλή εκχύλιση εν θερμώ με 200 mL εξανίου για 4 ώρες, σε κατάλληλη συσκευή Soxhlet. Το έλαιο ανακτήθηκε με εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό στους 40°C σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) και ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας. Το υπόλειμμα της εκχύλισης ξηράνθηκε στον αέρα και εκχυλίστηκε με 200 mL μεθανόλης για 4 ώρες σε συσκευή Soxhlet. Το εκχύλισμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό μειωμένη πίεση στους 40°C και ανασυστάθηκε σε 25 mL μεθανόλης. 1 mL του εκχυλίσματος αραιώθηκε περαιτέρω στα 25 mL με μεθανόλη, διηθήθηκε μέσω μεμβράνης νάilon 0,45 μm και ακολούθως χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, όπως περιγράφεται παρακάτω. Εξετάστηκαν τρία δείγματα για κάθε πληθυσμό.

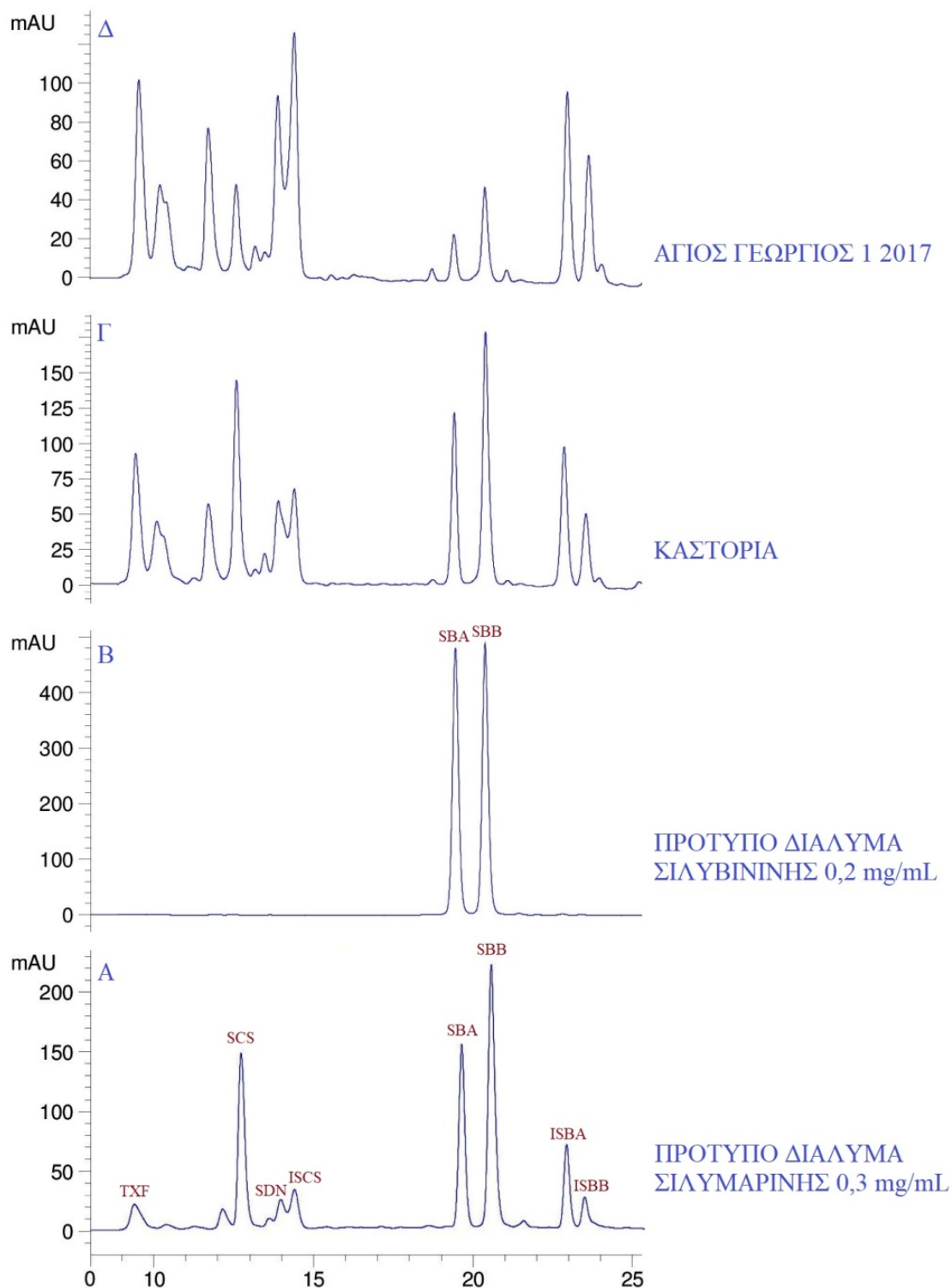
2.2.3. Προσδιορισμός σιλυμαρίνης και συστατικών της

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη και στα συστατικά της πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε χρωματογράφο HP 1100 (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, Germany) που είναι εφοδιασμένος με σύστημα τριμερούς παροχής και ανιχνευτή UV μεταβλητού μήκους κύματος. Χρησιμοποιήθηκε μία στήλη αντίστροφης φάσης Novapak C-18 (150 mm x 3,9 mm, 5,0 μm) που λειτουργούσε με ρυθμό ροής 1 mL·min⁻¹. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μL και η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 40°C. Για τον διαχωρισμό των συστατικών της σιλυμαρίνης χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης (Πίνακας 2.1). Η βαθμιδωτή έκλυση που χρησιμοποιήθηκε, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μεθανόλης, οδήγησε σε καλύτερη ανάλυση των πολικών συστατικών. Ο ανιχνευτής UV λειτουργούσε στα 288 nm. Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν 34 λεπτά.

Πίνακας 2.1. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης για την ανάλυση των συστατικών της σιλυμαρίνης με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. A: μεθανόλη (HPLC Grade), B: νερό (HPLC Grade) που περιέχει 0,1% μεθανικό οξύ.

Χρόνος (min)	Σύσταση μίγματος έκλυσης
0-4	30% A – 70% B
4-8	→ 40% A – 60% B
8-10	40% A – 60% B
10-21	→ 50% A – 50% B
21-25	50% A – 50% B
25-27	→ 80% A – 20% B
27-30	80% A – 20% B
30-32	→ 30% A – 70% B
32-34	30% A – 70% B

Η σιλυβινίνη (Sigma-Aldrich, USA) και η σιλυμαρίνη (Sigma-Aldrich, USA) χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα αναφοράς για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών της σιλυμαρίνης. Τα πρότυπα διαλύματα σιλυμαρίνης και σιλυβινίνης που παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των συστατικών της σιλυμαρίνης και για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού τους (Εικόνα 2.1). Τα πρότυπα διαλύματα σιλυβινίνης χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης, η οποία σχεδιάστηκε με βάση το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών σιλυβινίνης A και B έναντι των συγκεντρώσεων πρότυπων διαλυμάτων σιλυβινίνης. Η συγκέντρωση κάθε σχετικού συστατικού της σιλυμαρίνης στα δείγματα που αναλύθηκαν υπολογίστηκε όπως για τη σιλυβίνη, μετατρέποντας την αντίστοιχη περιοχή του σε συγκέντρωση χρησιμοποιώντας την καμπύλη βαθμονόμησης. Η συνολική περιεκτικότητα σιλυμαρίνης στα δείγματα υπολογίστηκε ως το άθροισμα των μεμονωμένων συστατικών σιλυμαρίνης (φλαβονολιγνάνες και ταξιφολίνη) που προέκυψαν από την ανάλυση HPLC. Όλες οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν.



Εικόνα 2.1. Χρωματογραφήματα πρότυπων διαλυμάτων σιλυμαρίνης, σιλυβινίνης και εκχυλισμάτων των σπόρων πληθυσμών του φυτού γαϊδουράγκαθο. TXF:ταξιφολίνη, SCS:σίλυχριστίνη, SDN:σίλυδιανίνη, ISCS:ισοσίλυχριστίνη, SBA:σίλυβίνη Α, SBB:σίλυβίνη Β, ISBA:ισοσίλυβίνη Α, ISBB:ισοσίλυβίνη Β. Χρόνος κατακράτησης (λεπτά): TXF:9,5 – SCS:12,7 – SDN:14,0 – ISCS:14,4 – SBA:19,7 – SBB:20,6 – ISBA:23,0 – ISBB:23,5.

2.2.4. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – Μέθοδος DPPH

Η ικανότητα εκκαθάρισης των ριζών DDPH[•] από τα εκχυλίσματα των σπόρων του φυτού προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας μία μέθοδο που προτάθηκε από τον Blois (1958), με κάποιες τροποποιήσεις. Η συγκέντρωση του διαλύματος DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο) που χρησιμοποιήθηκε ήταν 60 μM σε μεθανόλη, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της ακρίβειας των φασματοφωτομετρικών μετρήσεων (Sharma & Bhat, 2009). 200 μL εκχυλίσματος σπόρων (δείγμα) ή ασκορβικού οξέος (πρότυπο) ή μεθανόλης (control) αναμίχθηκαν με 3 mL διαλύματος DPPH, που παρασκευαζόταν αυθημερόν. Το μίγμα αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες ταινίες σφράγισης. Η απορρόφηση κάθε μίγματος μετρήθηκε στα 517 nm έναντι ενός τυφλού. Σε αυτό το μήκος κύματος απορροφά η ρίζα DDPH[•], η οποία είναι μια σταθερή ρίζα χρωμογόνου με βαθύ μωβ χρώμα. Όταν η ρίζα αναχθεί από ένα αντιοξειδωτικό το χρώμα αλλάζει σε ανοιχτό κίτρινο και η απορρόφηση μειώνεται. Δηλαδή, η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι τόσο μεγαλύτερη όσο περισσότερο μειώνεται η απορρόφηση της ρίζας DDPH[•]. Η ικανότητα εκκαθάρισης των ελεύθερων ριζών υπολογίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\% DPPH \cdot quenched = \left(1 - \frac{A_{sample}}{A_{control}} \right) \times 100$$

Παρασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας διαλύματα ασκορβικού οξέος σε μεθανόλη διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,1-1,0 mM). Η ικανότητα εκκαθάρισης των ριζών DDPH[•] εκφράστηκε ως μmol ασκορβικού οξέος ανά 100 g ξηρού βάρους σπόρου. Όλοι οι προσδιορισμοί έγιναν εις τριπλούν.

2.2.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – Μέθοδος FRAP

Το ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό (αναγωγική ισχύς) των εκχυλισμάτων των σπόρων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία FRAP σύμφωνα με τους Benzie και Strain (1996), με κάποιες τροποποιήσεις. Το αντιδραστήριο FRAP παρασκευάστηκε με ανάμιξη (α) ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος/οξικού νατρίου 300 mM με pH 3,6 (3,1 g οξικού νατρίου.3H₂O και 16 ml κρυσταλλικού (glacial) οξικού οξέος ανά λίτρο ρυθμιστικού διαλύματος), (β) διαλύματος TPTZ

(2,4,6-τρεις-(2-πυριδύλο)-s-τριαζίνη) 10 mM σε HCl 40 mM και (γ) διαλύματος $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, σε αναλογία 10:1:1 (v/v/v). 200 μL εκχυλίσματος σπόρων αναμίχθηκαν με 3 mL αντιδραστηρίου FRAP και το μίγμα αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε σε υδρόλουτρο (37°C) για 4 λεπτά. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 593 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος απορροφά το σύμπλοκο Fe^{2+} -TPTZ, που έχει έντονο μπλε χρώμα, και παράγεται από την αναγωγή του αρχικού συμπλόκου Fe^{3+} -TPTZ από αντιοξειδωτικά σε όξινο μέσο. Δηλαδή, η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι τόσο μεγαλύτερη όσο περισσότερο αυξάνεται η απορρόφηση του συμπλόκου Fe^{2+} -TPTZ. Παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος. Όλα τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν την ημέρα παρασκευής. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μmol ασκορβικού οξέος ανά 100 g ξηρού βάρους σπόρου. Όλοι οι προσδιορισμοί έγιναν εις τριπλούν.

2.2.6. Περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά – Μέθοδος FOLIN-CIOCALTEU

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών εκχυλισμάτων. Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων των σπόρων σε φαινολικές ουσίες (ολικά φαινολικά) προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu, όπως περιγράφηκε προηγουμένως από τους Gao *et al.* (2000) και τους Wojdyło, Oszmiański και Czemerzys (2007). 100 μL εκχυλίσματος σπόρων (δείγμα), γαλλικού οξέος (πρότυπο) ή αποσταγμένου νερού (control) αναμίχθηκαν με 2,2 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (αραιωμένο δέκα φορές σε απεσταγμένο νερό) και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 λεπτά, προστέθηκε 1 mL ανθρακικού νατρίου 20% και το μίγμα τοποθετήθηκε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η απορρόφηση του μίγματος μετρήθηκε στα 765 nm έναντι αποσταγμένου νερού ως τυφλό, σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Optizen Pop, Mecacys, Κορέα). Τα ολικά φαινολικά υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του γαλλικού οξέος (50-500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμο γαλλικού οξέος (mg γαλλικού οξέος ανά 100 g ξηρού βάρους). Όλοι οι προσδιορισμοί έγιναν εις τριπλούν.

2.2.7. Μέτρηση χρώματος σπόρων

Για τη μέτρηση του χρώματος των σπόρων προσδιορίστηκαν οι παράμετροι L^* , C^* , h° χρησιμοποιώντας τον μετρητή Chroma CR-400 (Konica Minolta Inc., Tokyo, Japan). Το L^* αντιπροσωπεύει τη φωτεινότητα, το C^* καθορίζει την χρωματική πυκνότητα (chroma) και το h° τη χροιά (hue angle). Οι τιμές της χρωματικής πυκνότητας και της χροιάς υπολογίστηκαν με τη βοήθεια των εξισώσεων (1) και (2), αντίστοιχα, όπως προτείνεται από τον McGuire (1992):

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (1)$$

$$h^\circ = \left(\frac{\arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)}{6.2832} \right) \times 360 \quad (2)$$

Όπου το a^* είναι η συντεταγμένη κόκκινου/πράσινου και b^* είναι η συντεταγμένη κίτρινου/μπλε.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΟΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ

3.1. Εισαγωγή

Η μοριακή αποτύπωση είναι μία τεχνική σύνθεσης μακρομοριακών δομών με ειδικές θέσεις επιλεκτικής δέσμευσης προκαθορισμένων χημικών ή βιοχημικών ενώσεων με συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως μοριακός όγκος, λειτουργικές ομάδες και στερεοχημική διάταξή τους. Η παρασκευή μοριακών αποτυπωμάτων συνίσταται στον συμπολυμερισμό διαλύματος ενός λειτουργικού μονομερούς που έχει τη δυνατότητα διαμόρφωσης ομοιοπολικών ή μη ομοιοπολικών δεσμών με το προς αποτύπωση μόριο (υπόστρωμα) και ενός μονομερούς δικτύωσης. Ο συμπολυμερισμός γίνεται παρουσία του προς αποτύπωση μορίου-προτύπου έτσι ώστε μετά από την ολοκλήρωσή του το υπόστρωμα να είναι ενσωματωμένο στην τρισδιάστατη δομή του πολυμερούς. Η επακόλουθη απομάκρυνση του υποστρώματος από το πολυμερές αφήνει ειδικές κοιλότητες-αποτυπώματα που έχουν το σχήμα και τον όγκο του προτύπου και συμπληρωματικές λειτουργικές ομάδες σε κατάλληλη στερεοχημική διάταξη.

Τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIP) έχουν καταστεί ελκυστικά σε διάφορους τομείς όπως ο καθαρισμός και ο διαχωρισμός (HPLC, εκχύλιση στερεάς φάσης), οι χημικοί και βιολογικοί αισθητήρες, τα συνθετικά αντισώματα, η χορήγηση φαρμάκων και η κατάλυση (Schirhagl, 2013; Chen *et al.*, 2016).

3.2. Ιστορικά στοιχεία

Η πρώτη εργασία για τη μοριακή αποτύπωση δημοσιεύτηκε από τον Ρώσο Polyakov (1931). Σημαντικές ήταν και οι μελέτες του Dickey τη δεκαετία του 1940, ο οποίος στηρίχθηκε στο έργο του δασκάλου του Pauling για τη σύνθεση αντισωμάτων *in vitro* (Pauling, 1940; Pauling & Campbell, 1942; Dickey, 1949). Όμως, η μοριακή αποτύπωση όπως την ξέρουμε σήμερα καθορίστηκε από το έργο του Wulff και των συνεργατών του για την ομοιοπολική αποτύπωση, τη δεκαετία του 1970 (Wulff,

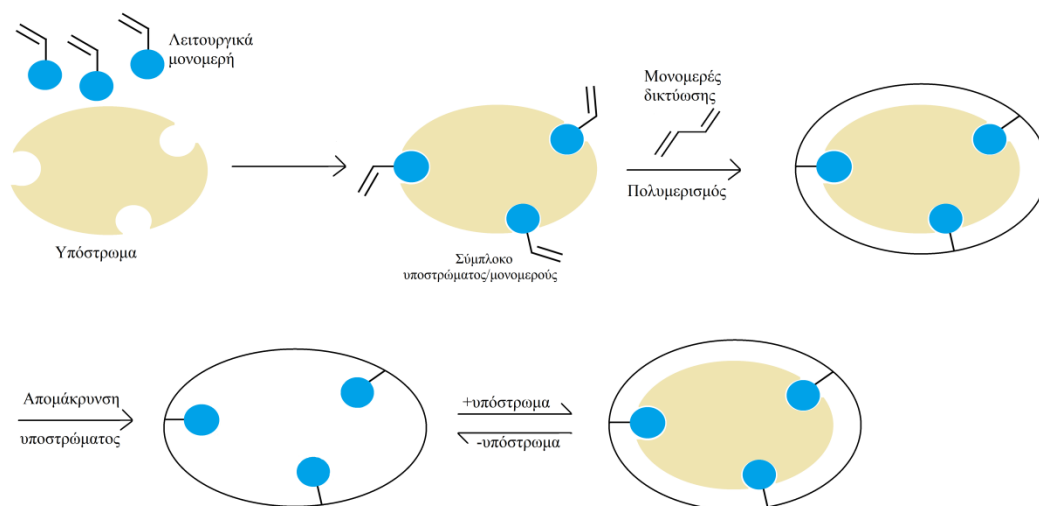
Sarhan & Zabrocki, 1973; Wulff *et al.*, 1977) και το έργο του Mosbach και των συνεργατών του που εισήγαγε τη μη-ομοιοπολική αποτύπωση (Sellergren, Lepistoe & Mosbach, 1988) και τα τεχνητά αντισώματα (antibody mimics) (Vlatakis *et al.*, 1993).

3.3. Βασικές αρχές της μοριακής αποτύπωσης

Η τεχνολογία της μοριακής αποτύπωσης μας παρέχει στρατηγικές για τη δημιουργία ειδικών θέσεων αναγνώρισης και επιλεκτικής δέσμευσης μορίων με δυνατότητες ανάλογες με εκείνες των φυσικών αντισωμάτων και των βιολογικών υποδοχέων (O'Mahony *et al.*, 2006). Ως εκ τούτου τα MIP συχνά αναφέρονται ως συνθετικά αντισώματα ή συνθετικοί υποδοχείς.

Για την παρασκευή των μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών χρησιμοποιείται ένα μίγμα που αποτελείται από το προς αποτύπωση μόριο (υπόστρωμα), το λειτουργικό μονομερές, το μονομερές δικτύωσης, τον εκκινητή πολυμερισμού και έναν κατάλληλο διαλύτη, συνήθως απρωτικό και μη πολικό. Το λειτουργικό μονομερές διαθέτει λειτουργικές ομάδες που έχουν δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τις λειτουργικές ομάδες του μορίου προτύπου με διαμόρφωση ομοιοπολικών ή μη ομοιοπολικών δεσμών. Αρχικά το υπόστρωμα αλληλεπιδρά με το λειτουργικό μονομερές σχηματίζοντας σύμπλοκα με δυνατότητα πολυμερισμού (Εικόνα 3.1). Στη συνέχεια αυτά συμπολυμερίζονται με το μονομερές δικτύωσης παρουσία εκκινητή που ενεργοποιείται με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας ή θέρμανσης, δημιουργώντας ένα άκαμπτο τρισδιάστατο πυκνά διασταυρωμένο πολυμερές με ενσωματωμένα μόρια του υποστρώματος. Στην περίπτωση που ο τρόπος πολυμερισμού είναι πολυμερισμός διαλύματος ή μάζας διαμορφώνεται ένας μονόλιθος που κονιοποιείται σε σωματίδια κατάλληλου μεγέθους (τάξης μm) και τα μόρια του υποστρώματος απομακρύνονται με κατάλληλο τρόπο (π.χ. έκπλυση με κατάλληλα συστήματα διαλυτών) αφήνοντας κοιλότητες που έχουν χωρική (μέγεθος και σχήμα) και χημική (χωροταξική διάταξη ή συμπληρωματική λειτουργικότητα) μνήμη του υποστρώματος, το οποίο μπορούν να επαναδεσμεύσουν επιλεκτικά από ένα μίγμα παρόμοιων ενώσεων (Kandimalla & Ju, 2004; Cheong, Yang & Ali, 2013). Σύμφωνα με τους Vasapollo *et al.* (2011) για την αξιολόγηση της ειδικής συγγένειας του MIP προς το υπόστρωμα χρησιμοποιείται συνήθως η τεχνική της στατικής επαναδέσμευσης (batch rebinding).

Ανάλογα με τον τύπο των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα λειτουργικά μονομερή και το υπόστρωμα στο προς πολυμερισμό σύμπλοκο και κατά τη διάρκεια της επανασύνδεσης, η μοριακή αποτύπωση μπορεί να ταξινομηθεί σε ομοιοπολική, μη ομοιοπολική και ημι-ομοιοπολική αποτύπωση (García-Calzón & Díaz-García, 2007).



Εικόνα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας μοριακής αποτύπωσης με την τεχνική της μη-ομοιοπολικής αποτύπωσης.

Ομοιοπολική μοριακή αποτύπωση

Η ομοιοπολική αποτύπωση (προ-οργανωμένη ή στοιχειομετρική προσέγγιση) αναπτύχθηκε από τους Wulff και Shea και κατά τη διαδικασία αυτή το υπόστρωμα συνδέεται με το ή τα λειτουργικά μονομερή με ομοιοπολικούς δεσμούς πριν το στάδιο του συμπολυμερισμού με το μονομερές δικτύωσης (Wulff, 1982; Shea & Thompson, 1985). Μετά το σχηματισμό του MIP ο ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ των μορίων του υποστρώματος και των λειτουργικών μονομερών διασπάται χημικώς και το υπόστρωμα απομακρύνεται, ενώ αυτό μπορεί να επαναδεσμευτεί με αναδημιουργία των δεσμών αυτών.

Το κύριο πλεονέκτημα της ομοιοπολικής αποτύπωσης είναι ότι οι λειτουργικές ομάδες των μονομερών συνδέονται μόνο με το υπόστρωμα και η σύνδεση αυτή επηρεάζεται πολύ λίγο από την πολικότητα του διαλύτη και τις συνθήκες του πολυμερισμού (π.χ. θερμοκρασία, pH). Έτσι έχουμε μία περισσότερο ομοιογενή κατανομή των θέσεων δέσμευσης και μείωση των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης.

Ωστόσο, με αυτή την προσέγγιση μπορεί να αποτυπωθεί μόνο ένας περιορισμένος αριθμός ενώσεων αφού οι αναστρέψιμες αντιδράσεις συμπύκνωσης σε ήπιες συνθήκες είναι περιορισμένες, ενώ και η επαναδέσμευση του υποστρώματος με αναδιάταξη των ομοιοπολικών δεσμών είναι πολύ αργή (Haupt, 2001; Alexander *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2016).

Μη-Ομοιοπολική μοριακή αποτύπωση

Η μη-ομοιοπολική αποτύπωση επινοήθηκε από τον Mosbach και τους συνεργάτες του (Arshady & Mosbach, 1981) και βασίζεται σε μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (δεσμοί υδρογόνου, ιοντικές αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις van der Waals, π-π αλληλεπιδράσεις, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και χηλικές αλληλεπιδράσεις μετάλλου-ιόντος) μεταξύ των χαρακτηριστικών ομάδων των λειτουργικών μονομερών και του υποστρώματος προκειμένου το προς πολυμερισμό σύμπλοκο να αποκτήσει συγκεκριμένο χωρικό προσανατολισμό (Kandimalla & Ju, 2004; Zhang, Ye & Mosbach, 2006). Η απομάκρυνση του υποστρώματος γίνεται εύκολα με επαναλαμβανόμενη έκπλυση του MIP με κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών. Η επαναδέσμευση του υποστρώματος επιτυγχάνεται μέσω των παραπάνω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων.

Η μη-ομοιοπολική αποτύπωση είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική μοριακής αποτύπωσης, λόγω της απλότητας και της ευελιξίας της. Στα πλεονεκτήματά της περιλαμβάνονται η εύκολη παρασκευή του συμπλόκου υποστρώματος/μονομερούς, η εύκολη απομάκρυνση του υποστρώματος από το MIP, η δυνατότητα επιλογής από ευρύ φάσμα λειτουργικών μονομερών και η εφαρμογή της σε πληθώρα μορίων υποστρώματος. Ακόμη, τα αποτυπωμένα πολυμερή με αυτή την τεχνική εμφανίζουν πολύ ταχύτερη κινητική επαναδέσμευσης από αυτά που παρασκευάζονται με την ομοιοπολική προσέγγιση, καθιστώντας τα κατάλληλα για εφαρμογές που περιλαμβάνουν τη χρήση τους ως στατικές φάσεις σε συστήματα HPLC και ως αισθητήρες (Komiyama *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006).

Παρόλα τα πλεονεκτήματά της η τεχνική της μη ομοιοπολικής αποτύπωσης παρουσιάζει και μειονεκτήματα, ένα από τα οποία είναι η ευαισθησία των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ομάδων του λειτουργικού μονομερούς

και του υποστρώματος σε ελαφρές διαταραχές, όπως π.χ. η παρουσία νερού (Lofgreen & Ozin, 2014). Το κύριο μειονέκτημα της μη ομοιοπολικής αποτύπωσης είναι ότι το στάδιο της παρασκευής του συμπλόκου υποστρώματος/μονομερούς δεν είναι μια πλήρως καθορισμένη διαδικασία. Η περίσσεια, συνήθως, του λειτουργικού μονομερούς και η ασθενής σταθερότητα των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές στοιχειομετρίες υποστρώματος/μονομερούς με αποτέλεσμα τη δημιουργία ετερογενών θέσεων δέσμησης (Umpleby II, Bode & Shimizu, 2000). Η δημιουργία θέσεων δέσμησης διαφορετικής συγγένειας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της εκλεκτικότητας ως προς το υπόστρωμα (θέσεις χαμηλής συγγένειας) και της περιορισμένης χωρητικότητας, λόγω των λιγότερων θέσεων υψηλής συγγένειας (Lisichkin & Krutyakov, 2006).

Ημι-ομοιοπολική μοριακή αποτύπωση

Η τεχνική της ημι-ομοιοπολικής αποτύπωσης αναπτύχθηκε από τον Whitcombe και τους συνεργάτες του ως μία προσπάθεια να συνδυαστούν τα πλεονεκτήματα της ομοιοπολικής και της μη-ομοιοπολικής αποτύπωσης (Whitcombe *et al.*, 1995). Κατά τη διαδικασία αυτή το λειτουργικό μονομερές συνδέεται με το υπόστρωμα με ομοιοπολικούς δεσμούς, ενώ η επαναδέσμηση του υποστρώματος βασίζεται μόνο σε μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Έτσι έχουμε μία καθορισμένη διαδικασία κατά το σχηματισμό του συμπλόκου υποστρώματος/λειτουργικού μονομερούς που οδηγεί σε πιο ομοιόμορφη κατανομή των θέσεων δέσμησης και κατά την επαναδέσμηση έχουμε μία γρήγορη και εύκολη διαδικασία χωρίς κινητικούς περιορισμούς. Με την ημι-ομοιοπολική αποτύπωση έχουμε ισχυρή δέσμηση του προτύπου και αποδοτική επαναδέσμευσή του (Kirsch *et al.*, 2004).

3.4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μοριακής αποτύπωσης

Τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή έχουν ικανότητα αναγνώρισης, λόγω υψηλής συγγένειας και επιλεκτικότητας, η οποία είναι παρόμοια με εκείνη των φυσικών υποδοχέων, ενώ η σταθερότητά τους είναι ανώτερη των βιομορίων αυτών. Τα MIP μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε σκληρές χημικές και φυσικές συνθήκες (υψηλές θερμοκρασίες, ακραίες τιμές pH, οργανικοί διαλύτες, πίεση) χωρίς εμφανή απώλεια

συγγένειας για το υπόστρωμα, ενώ μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν. Αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς να χάσουν τη λειτουργικότητά τους, έχουν μικρό κόστος, απλότητα στην παρασκευή τους και ευκολία προσαρμογής σε διαφορετικές εφαρμογές (Svenson & Nicholls, 2001; Zhuang *et al.*, 2008; Vasapollo *et al.*, 2011; Chianella *et al.*, 2013).

Τα MIP παρουσιάζουν όμως και σημαντικά μειονεκτήματα. Δεν υπάρχει μια γενική διαδικασία (καθολική τεχνική) για την παρασκευή τους, με αποτέλεσμα ο σχεδιασμός ενός νέου MIP για ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα να απαιτεί συχνά πολύ χρόνο και κόπο για τη σύνθεση και τον έλεγχο της επιλεκτικότητας, σε διάφορες πειραματικές συνθήκες. Ακόμη τα MIP εμφανίζουν συνήθως ασυμβατότητα με τα υδατικά μέσα, ενώ στην περίπτωση της ετερογενούς κατανομής των θέσεων δέσμευσης έχουμε μείωση της εκλεκτικότητας και περιορισμένη χωρητικότητα. Επίσης, μπορούν να εμφανιστούν προβλήματα σταδιακής απομάκρυνσης του υποστρώματος (template bleeding) όταν δεν έχει απομακρυνθεί πλήρως το υπόστρωμα, και αργής μεταφοράς μάζας (Chen, Xu & Li, 2011; Vasapollo *et al.*, 2011; Chianella *et al.*, 2013).

3.5. Επίδραση των παραγόντων πολυμερισμού

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για τη σύνθεση ενός μοριακά αποτυπωμένου πολυμερούς απαιτείται το προς αποτύπωση μόριο (υπόστρωμα), το λειτουργικό μονομερές, το μονομερές δικτύωσης, ο εκκινητής του πολυμερισμού και ο διαλύτης. Η χημική δομή και η συγκέντρωση καθενός από τα παραπάνω συστατικά, όπως και η θερμοκρασία και ο χρόνος πολυμερισμού παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παρασκευή του επιθυμητού πολυμερούς. Θα αναφερθούμε στην τεχνική της μη-ομοιοπολικής αποτύπωσης δεδομένου ότι είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική και αυτή με την οποία έγινε η προσπάθεια μοριακής αποτύπωσης της σιλβίνης.

Υπόστρωμα

Κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου μορίου προς αποτύπωση αποτελούν μεταξύ άλλων η διαθεσιμότητα, η σταθερότητα, η τοξικότητα και η διαλυτότητά του.

Το υπόστρωμα θα πρέπει να περιέχει ομάδα ή ομάδες κατάλληλες για τη μη ομοιοπολική σύνδεσή του με τα λειτουργικά μονομερή. Ακόμη θα πρέπει να είναι χημικά αδρανές υπό τις συνθήκες του πολυμερισμού, ενώ οι χαρακτηριστικές του ομάδες δεν πρέπει να πολυμερίζονται ή να επιβραδύνουν ή ακόμη και να αναστέλλουν τον πολυμερισμό. Η δομή πρέπει να είναι σταθερή σε μέτρια υψηλές θερμοκρασίες (π.χ. 60 °C) ή/και στην υπεριώδη ακτινοβολία. Τέλος, το υπόστρωμα θα πρέπει να είναι διαλυτό στον χρησιμοποιούμενο για τη μοριακή αποτύπωση διαλύτη (Selligren & Andersson, 2000; Cormack & Elorza, 2004; Dias *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011).

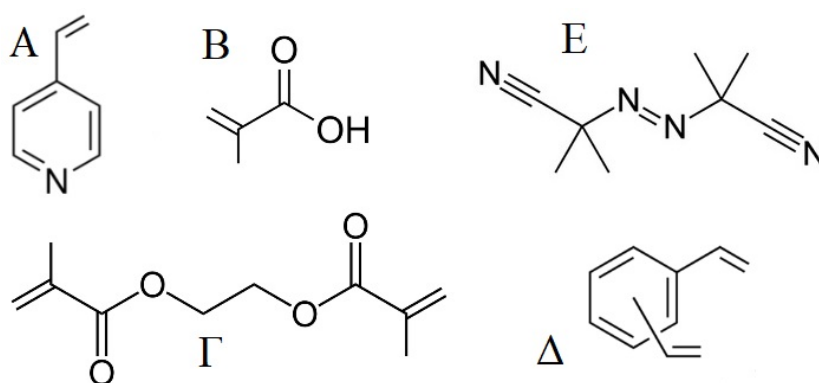
Λειτουργικό μονομερές

Ο ρόλος του μονομερούς είναι να αλληλεπιδράσει με το υπόστρωμα και να σχηματίσει το προς πολυμερισμό σύμπλοκο. Γενικά, το λειτουργικό μονομερές αποτελείται από δύο μονάδες. Τη μονάδα αναγνώρισης/σύνδεσης του μονομερούς και τη μονάδα που θα πολυμεριστεί, π.χ. βινυλομάδα (Chen *et al.*, 2016). Η ισχύς των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μονομερούς και του υποστρώματος επηρεάζει τη συγγένεια (affinity) του μοριακού πολυμερούς και καθορίζει την πιστότητα (accuracy) και την εκλεκτικότητα των θέσεων δέσμευσης (Koochraei *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Για να είναι ισχυρή η αλληλεπίδραση μεταξύ του μονομερούς και του υποστρώματος και συνεπώς πιο σταθερό το σύμπλοκό τους, θα πρέπει οι λειτουργικότητές τους να είναι συμπληρωματικές, π.χ. δότης – δέκτης δεσμών υδρογόνου (Yan & Row, 2006).

Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει τον αριθμό και τις ιδιότητες αναγνώρισης των αποτυπωμένων κοιλοτήτων (θέσεων δέσμευσης) είναι η αναλογία της συγκέντρωσης του λειτουργικού μονομερούς προς το υπόστρωμα (Pardo *et al.*, 2012). Γνωρίζοντας ότι στη μη-ομοιοπολική αποτύπωση η δημιουργία του συμπλόκου υποστρώματος-μονομερούς βασίζεται στην αρχή Le Chatelier, η βέλτιστη αναλογία υποστρώματος/μονομερούς επιτυγχάνεται εμπειρικά, αξιολογώντας μοριακά πολυμερή που έχουν δημιουργηθεί με διαφορετικές αναλογίες (Kim & Spivak, 2003). Οι περισσότεροι ερευνητές βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της μελέτης του Selligren (1989) επιλέγουν συνήθως ως αναλογία υποστρώματος/μονομερούς την 1:4. Αν το υπόστρωμα έχει περισσότερες από τέσσερις θέσεις δέσμευσης η

συγκέντρωση του μονομερούς μπορεί να αυξηθεί (π.χ. 1:6), αλλά η σημαντική περίσσεια του μονομερούς πρέπει να αποφεύγεται γιατί τότε τα μονομερή δεν συμπλέκονται με το υπόστρωμα και μειώνεται η εκλεκτικότητα της δέσμευσης, λόγω της δημιουργίας μεγάλου αριθμού μη ειδικών θέσεων δέσμευσης (Pardo *et al.*, 2012). Όταν χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα δύο ή περισσότερα λειτουργικά μονομερή είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η επιμέρους δραστηριότητά τους, ώστε να είναι εφικτός ο συμπολυμερισμός (Ramstroem, Andersson & Mosbach, 1993).

Όπως είναι γνωστό, ο αριθμός των λειτουργικών μονομερών που χρησιμοποιούνται στη μοριακή αποτύπωση είναι περιορισμένος, γεγονός το οποίο περιορίζει την εκλεκτικότητα και τις εφαρμογές της τεχνολογίας της μοριακής αποτύπωσης (Chen *et al.*, 2016). Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα λειτουργικά μονομερή είναι το μεθακρυλικό οξύ και η 4-βινυλοπυριδίνη (Εικόνα 3.2) για βασικές και όξινες ομάδες του υποστρώματος, αντίστοιχα (Pardo *et al.*, 2012).



Εικόνα 3.2. Λειτουργικά μονομερή: Α. 4-βινυλοπυριδίνη, Β. μεθακρυλικό οξύ. Μονομερή δικτύωσης: Γ. αιθυλενο-γλυκολ-διμεθυλακρυλένιο, Δ. διβινυλοβενζόλιο. Εκκινητής: Ε. αζω-δισ-ισοβουτυρονιτρίλιο.

Μονομέρες δικτύωσης

Το μονομέρες δικτύωσης συμπολυμερίζεται με το λειτουργικό μονομέρες, σταθεροποιώντας τα μόρια του μονομερούς γύρω από τα μόρια του υποστρώματος εξασφαλίζοντας έτσι τη δημιουργία τρισδιάστατων πυκνά διασταυρωμένων πολυμερών (Chen *et al.*, 2011). Ακόμη, σε συνδυασμό με τον διαλύτη καθορίζει τη μορφολογία του μοριακού πολυμερούς, δηλαδή αν θα είναι μακροπορώδες στερεό ή θα έχει τη μορφή πηκτής ή σκόνης μικροπηκτής (Cormack & Elorza, 2004).

Η ποσότητα και το είδος του μονομερούς δικτύωσης επιδρά καθοριστικά στην ικανότητα δέσμευσης και στην εκλεκτικότητα του μοριακού πολυμερούς. Συνήθως, όταν το μονομερές δικτύωσης προστίθεται σε μικρές ποσότητες έχουμε ασταθείς μηχανικές ιδιότητες του πολυμερούς, λόγω του μικρού βαθμού διασταύρωσης, ενώ όταν έχουμε πολύ μεγάλες ποσότητες του μονομερούς διασταύρωσης μειώνεται ο αριθμός των θέσεων δέσμευσης ανά μονάδα μάζας του πολυμερούς (Yan & Row, 2006; Chen *et al.*, 2016). Το ποσοστό του μονομερούς δικτύωσης συχνά κυμαίνεται κοντά στο 80% (Cormack & Elorza, 2004), ενώ ευρέως χρησιμοποιούμενα μονομερή δικτύωσης (Εικόνα 3.2) είναι το αιθυλενο-γλυκολ-διμεθυλακρυλένιο και το διβινυλοβενζόλιο (Chen *et al.*, 2011).

Διαλύτης (Πορογενές)

Τα συστατικά του μίγματος πολυμερισμού, δηλαδή το υπόστρωμα, το λειτουργικό μονομερές, το μονομερές δικτύωσης και ο εκκινητής, πρέπει να διαλύονται στο διαλύτη ώστε να είναι όλα στην ίδια φάση. Ο διαλύτης δεν δρα μόνο ως μέσο διασποράς, αλλά παίζει καθοριστικό ρόλο και στη δημιουργία των πόρων (πορογενές) στο πολυμερές. Η χρήση ενός θερμοδυναμικά καλού διαλύτη οδηγεί στο σχηματισμό πολυμερούς με καλά σχηματισμένους πόρους και μεγάλη ειδική επιφάνεια.

Η πολικότητα του διαλύτη επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ του υποστρώματος και του λειτουργικού μονομερούς και για το λόγο αυτό όταν η αλληλεπίδραση γίνεται μέσω δεσμών υδρογόνου, ο σχηματισμός συμπλόκου υποστρώματος-μονομερούς εννοείται από διαλύτες που είναι απρωτικοί και μη πολικοί. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι το τολουόλιο, το ακετονιτρίλιο, το χλωροφόρμιο και το διχλωρομεθάνιο (Cormack & Elorza, 2004; Yan & Row, 2006; Pardo *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016).

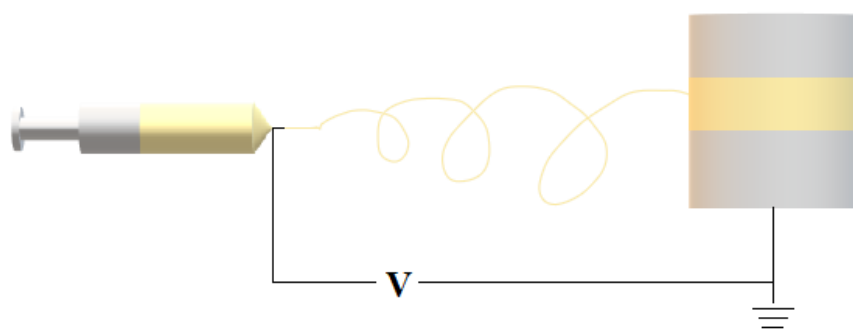
Εκκινητής

Όπως γνωρίζουμε, η πλειονότητα των μοριακών πολυμερών δημιουργείται με ριζικό πολυμερισμό, ο οποίος μπορεί να εκκινηθεί είτε θερμικά είτε φωτοχημικά. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ουσία για την παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι το αζω-

δισ-ισοβουτυρονιτρίλιο (Εικόνα 3.2). Ακόμη, προκειμένου τα μοριακά πολυμερή να εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα αναγνώρισης και επιλεκτικής δέσμευσης, συνίσταται να συντίθενται σε σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, χρησιμοποιώντας χαμηλή συγκέντρωση εκκινητή και σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (π.χ. 60 °C). Επίσης, δεδομένου ότι το οξυγόνο παίζει ανασταλτικό ρόλο στον ριζικό πολυμερισμό, πρέπει να αφαιρείται από το μίγμα του πολυμερισμού πριν το στάδιο της διάδοσης. Η απομάκρυνση του διαλυμένου οξυγόνου επιτυγχάνεται με συνεχή διέλευση από το μίγμα αδρανούς αερίου, όπως το άζωτο (Yan & Row, 2006; Pardo *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016).

3.6. Ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning)

Η ηλεκτροστατική ινοποίηση ή ηλεκτρόκλωση (electrospinning) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία πολυμερικών ινών με διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 50 και 500 nm. Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης, χρησιμοποιείται ένα ηλεκτροστατικό πεδίο υψηλής τάσης για τη φόρτιση της επιφάνειας μίας σταγόνας ενός πολυμερικού διαλύματος και την εκτόξευση ενός πίδακα του διαλύματος προς έναν γειωμένο χώρο συλλογής των ινών (Εικόνα 4.3). Η τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης είναι ένας νέος τρόπος αποτύπωσης που δεν απαιτεί ριζικό πολυμερισμό (Chronakis *et al.*, 2006; Ghorani, Tucker & Yoshikawa, 2015; Ruggieri *et al.*, 2015; Mohammadi, Saraji & Jafari, 2019).



Εικόνα 3.3. Σχηματικό διάγραμμα της διαδικασίας της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.

Κατά τη διαδικασία της μοριακής αποτύπωσης με την τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, σε μια τυπική διάταξη, το πολυμερικό διάλυμα τοποθετείται σε μία σύριγγα και εξωθείται από την άκρη της βελόνας με σταθερή

ταχύτητα. Ένα τροφοδοτικό υψηλής τάσης δημιουργεί ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ της βελόνας και του συλλέκτη, ο οποίος είναι συνήθως ένας μεταλλικός κύλινδρος ή πλακίδιο. Όταν το ηλεκτρικό πεδίο είναι αρκετά ισχυρό ώστε οι ηλεκτρικές δυνάμεις να υπερνικήσουν την επιφανειακή τάση του υγρού σχηματίζεται κώνος Taylor στην άκρη της βελόνας και το διάλυμα του πολυμερούς εκτοξεύεται προς τον συλλέκτη. Η διαδρομή του φορτισμένου πίδακα ελέγχεται από το ηλεκτρικό πεδίο. Αρχικά ακολουθεί μία γραμμική τροχιά, λόγω όμως του ηλεκτρικού πεδίου ο πίδακας εκτείνεται μέσω σπειροειδών βρόχων που αυξάνουν σε διάμετρο, ενώ ο διαλύτης εξατμίζεται σταδιακά και οι ίνες του πολυμερούς συλλέγονται στον στόχο (Greiner & Wendorff, 2007; Wen *et al.*, 2017).

Η διαδικασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης και η μορφολογία των πολυμερικών ινών επηρεάζεται από τους παρακάτω παράγοντες: δομή και μοριακό βάρος του πολυμερούς, ένταση ηλεκτρικού πεδίου, ταχύτητα ροής, απόσταση μεταξύ βελόνας και συλλέκτη, θερμοκρασία, υγρασία και παραμέτρους του πολυμερικού διαλύματος, όπως ιξώδες, αγωγιμότητα, επιφανειακή τάση και συγκέντρωση (Chakraborty *et al.*, 2009; Ghorani & Tucker, 2015).

3.7. Υλικά και μέθοδοι

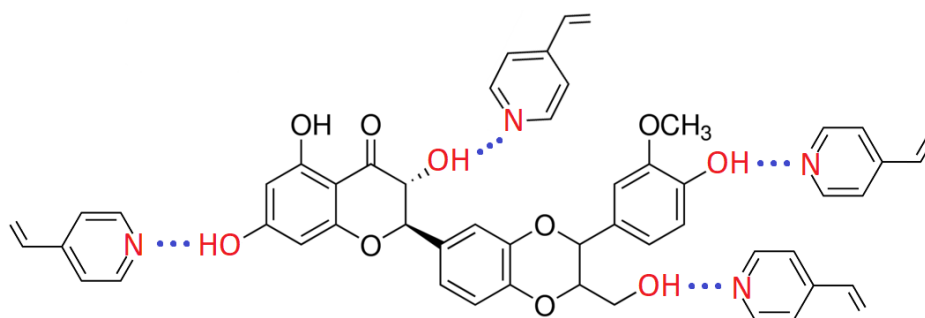
3.7.1. Αντιδραστήρια

- Σιλβινίνη $\geq 98\%$, *BCBP6193V* (99,1%), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- 4-βινυλοπυριδίνη, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
- Αιθυλενο-γλυκολ-διμεθυλακρυλένιο, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
- 3-βινυλοβενζοϊκό οξύ, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
- αζω-δισ-ισοβουτυρονιτρίλιο, Acros Organics, Geel, Belgium
- πολυ(οξικός βινυλεστέρας), Mw=100000, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
- Διάλυμα πολυ(αλλυλαμίνης), 10 wt% in H₂O, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
- Ακετόνη (Analytical reagent), Fisher Scientific, UK
- Μεθανόλη (HPLC Grade), Fisher Scientific, UK
- Νερό (LC-MS Grade), Fisher Scientific, UK
- Μεθανόλη (ACS reagent), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Ακετονιτρίλιο (HPLC grade), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

- ο Αιθανικό οξύ, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- ο Χλωροφόρμιο, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

3.7.2. Σύνθεση μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών

Ως λειτουργικό μονομερές κατάλληλο να αλληλεπιδράσει με το υπόστρωμα και να σχηματίσει το προς πολυμερισμό σύμπλοκο επιλέχθηκε η 4-βινυλοπυριδίνη. Τα μόρια της σιλβίνης και της 4-βινυλοπυριδίνης σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου (υπάρχει η δυνατότητα σχηματισμού 4 δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων της σιλβίνης και του ατόμου αζώτου της 4-βινυλοπυριδίνης), ενώ αναπτύσσονται ανάμεσά τους και υδρόφοβες/π-π αλληλεπιδράσεις, οι οποίες ενισχύουν περαιτέρω τη σταθερότητα του συμπλόκου υποστρώματος-λειτουργικού μονομερούς (Εικόνα 3.4). Ακόμη, ως λειτουργικό μονομερές χρησιμοποιήθηκε και το 3-βινυλοβενζοϊκό οξύ.



Εικόνα 3.4. Σύνδεση μορίου σιλβίνης με μόρια 4-βινυλοπυριδίνης με δεσμούς υδρογόνου στο σύμπλοκο υποστρώματος/μονομερούς.

Παράλληλα με τη σύνθεση του μοριακά αποτυπωμένου πολυμερούς (MIP) έγινε και η σύνθεση του πολυμερούς αναφοράς (NIP), ώστε να αξιολογηθεί η απόδοση της διαδικασίας της μοριακής αποτύπωσης. Η σύνθεση του NIP γίνεται με την ίδια πειραματική διαδικασία με την οποία γίνεται η σύνθεση του MIP, χωρίς όμως την παρουσία του μορίου του υποστρώματος. Η αξιολόγηση της ικανότητας δέσμευσης και της εκλεκτικότητας του MIP εκτιμάται σε σύγκριση με το NIP. Το αιθυλενογλυκολ-διμεθυλακρυλένιο χρησιμοποιήθηκε ως μονομερές δικτύωσης και το αζω-δισ-ισοβουτυρονιτρίλιο χρησιμοποιήθηκε ως εκκινητής του ριζικού πολυμερισμού. Η εκκίνηση του πολυμερισμού έγινε με θέρμανση του διαλύματος στους 60 °C, οπότε το αζω-δισ-ισοβουτυρονιτρίλιο διασπάστηκε παράγοντας ελεύθερες ρίζες. Η ακετόνη,

το ακετονιτρίλιο και το χλωροφόρμιο χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες. Η σύσταση των μιγμάτων πολυμερισμού αναφέρονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Σύσταση των μιγμάτων πολυμερισμού. (MIP: μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές, NIP: πολυμερές αναφοράς, 4VPy: 4-βινυλοπυριδίνη, 3VBA: 3-βινυλοβενζοϊκό οξύ, EGDMA: αιθυλενο-γλυκολ-διμεθυλακρυλένιο)

Πολυμερές	Υπόστρωμα (Y)	Λειτουργικό Μονομερές (ΔΜ)	Μονομερές Δικτύωσης (ΜΔ)	Αναλογία Y/ΔΜ/ΜΔ	Διαλύτης (Πορογενές)
MIP1	Σιλβίνη	4VPy	EGDMA	1/6/30	Ακετονιτρίλιο
NIP1	-	4VPy	EGDMA		
MIP2	Σιλβίνη	4VPy	EGDMA	1/6/30	Ακετόνη
NIP2	-	4VPy	EGDMA		
MIP3	Σιλβίνη	4VPy	EGDMA	1/8/40	Ακετόνη
NIP3	-	4VPy	EGDMA		
MIP4	Σιλβίνη	4VPy	EGDMA	1/6/30	Χλωροφόρμιο
NIP4	-	4VPy	EGDMA		
MIP5	Σιλβίνη	3VBA	EGDMA	1/6/30	Ακετονιτρίλιο
NIP5	-	3VBA	EGDMA		
MIP6	Σιλβίνη	3VBA	EGDMA	1/6/30	Ακετόνη
NIP6	-	3VBA	EGDMA		

Πειραματική διαδικασία μοριακής αποτύπωσης

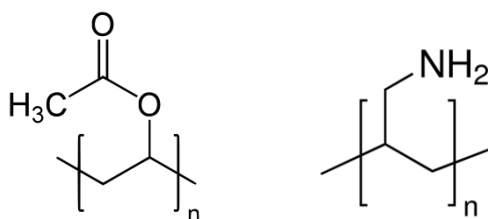
Δεδομένου ότι τα λειτουργικά μονομερή και το μονομερές δικτύωσης, που διατίθενται στο εμπόριο, περιέχουν σε μικρό ποσοστό αναστολείς πολυμερισμού ώστε να μην πολυμερίζονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους, πραγματοποιείται καθαρισμός αυτών. Τα μονομερή, πριν τη χρήση τους, υποβάλλονται σε απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση και παραλαμβάνονται σε καθαρή μορφή. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών είναι η τεχνική του πολυμερισμού διαλύματος.

Η ποσότητα του υποστρώματος (0,2 mmol) τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη και διαλύεται στον διαλύτη. Έπειτα στο διάλυμα προστίθεται το λειτουργικό μονομερές και το μίγμα υποστρώματος-μονομερούς αφήνεται για 20 περίπου λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ώστε να αλληλεπιδράσει το λειτουργικό μονομερές με το υπόστρωμα και να σχηματιστεί το προς πολυμερισμό σύμπλοκο. Κατόπιν,

προστίθεται στο διάλυμα το μονομερές δικτύωσης και ο εκκινητής του πολυμερισμού. Το τελικό διάλυμα μεταφέρεται γρήγορα σε σωλήνα πολυμερισμού και τοποθετείται σε παγόλουτρο. Κατά την παραμονή του στο παγόλουτρο και αφού το διάλυμα έχει ψυχθεί, γίνεται απομάκρυνση του διαλυμένου οξυγόνου με συνεχή διέλευση αζώτου από το μίγμα για 5 περίπου λεπτά. Έπειτα, ο σωλήνας πολυμερισμού βυθίζεται στιγμιαία σε υγρό άζωτο ώστε να παγώσει το περιεχόμενο διάλυμα και ο σωλήνας σφραγίζεται, με τη βοήθεια φλόγιστρου, αεροστεγώς υπό κενό. Μετά, ο σωλήνας με το προς πολυμερισμό διάλυμα τοποθετείται σε υδρόλουτρο στους 60 °C, ώστε να διασπαστεί ο εκκινητής, να παραχθούν ελεύθερες ρίζες και να ξεκινήσει ο πολυμερισμός. Ο σωλήνας παραμένει στο υδρόλουτρο για 24 ώρες ώστε να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός. Με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία, χωρίς όμως την προσθήκη του υποστρώματος, γίνεται η σύνθεση του πολυμερούς αναφοράς.

3.7.3. Ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning)

Για την παρασκευή των πολυμερικών ινών χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια: πολυ(οξικός βινυλεστέρας) (PVAc), με μέσο μοριακό βάρος ~ 100000 και διάλυμα πολυ(αλλυλαμίνης) (PAI), με μέσο μοριακό βάρος ~ 65000 (Εικόνα 3.5). Ως διαλύτης του πολυμερούς χρησιμοποιήθηκε ακετόνη. Παρασκευάστηκαν διαλύματα PVAc σε ακετόνη και διαλύματα του PVAc σε ακετόνη στα οποία προστέθηκε σιλυβίνη (5% w/w του PVAc). Ακόμη προστέθηκε σιλυβίνη (υπόστρωμα) σε διάλυμα PVAc σε μεθανόλη (αντί του μονομερούς δικτύωσης) και PAI (αντί του λειτουργικού μονομερούς). Μετά την προσθήκη της σιλυβίνης ακολούθησε μηχανική ανάδευση, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός φάσεων στα διαλύματα πριν τη διαδικασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης. Έγινε και παρασκευή του πολυμερούς αναφοράς (NIP). Η σύσταση των παρασκευασθέντων διαλυμάτων αναφέρεται στον πίνακα 3.2.

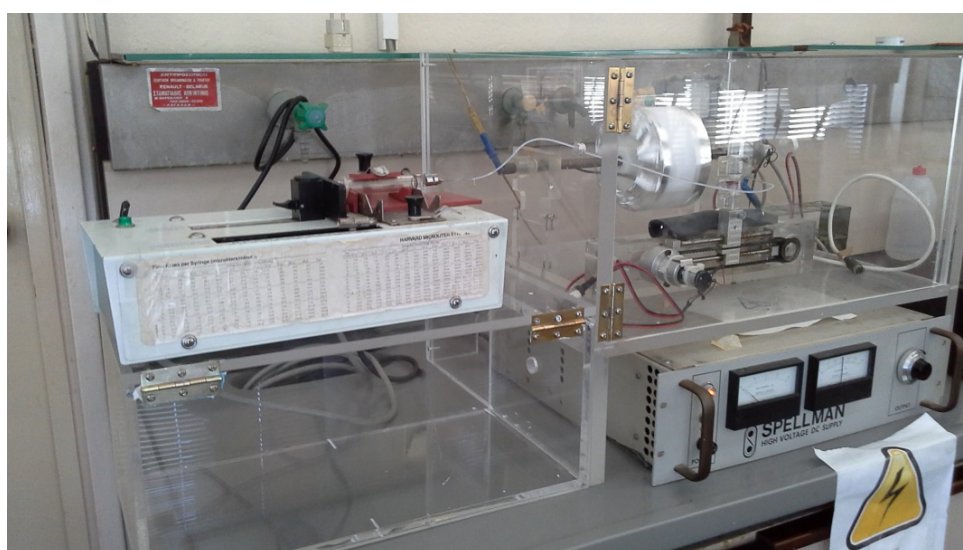


Εικόνα 3.5. Αριστερά: πολυ(οξικός βινυλεστέρας). Δεξιά: πολυ(αλλυλαμίνη).

Πίνακας 3.2. Σύσταση των διαλυμάτων για τη διαδικασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης. (MIP: μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές, NIP: πολυμερές αναφοράς, PVAc: πολυ(οξικός βινυλεστέρας), PAI: διάλυμα πολυ(αλλυλαμίνης))

Πολυμερές	Υπόστρωμα (Y)	Διάλυμα πολυμερούς w/w (Π1)	Διάλυμα πολυμερούς (Π2)	Αναλογία Y/Π2/Π1	Διαλύτης
MIP7 NIP7	Σιλυβίνη -	PVAc 20% PVAc 20%	- -	1/20	Ακετόνη
MIP8 NIP8	Σιλυβίνη -	PVAc 25% PVAc 25%	- -	1/20	Ακετόνη
MIP9 NIP9	Σιλυβίνη -	PVAc 30% PVAc 30%	- -	1/20	Ακετόνη
MIP10 NIP10	Σιλυβίνη -	PVAc 10% PVAc 20%	PAI PAI	1/7/16	Μεθανόλη

Η διαδικασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης πραγματοποιήθηκε σε ειδική διάταξη του εργαστηρίου Φυσικοχημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Εικόνα 3.6). Χρησιμοποιήθηκε σύριγγα των 10 mL, με διάμετρο βελόνας 1mm και η ταχύτητα ροής του διαλύματος ήταν $1,4 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$. Η απόσταση βελόνας και συλλέκτη (περιστρεφόμενο τύμπανο με φύλλο αλουμινίου) ήταν 7cm. Η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 15 kV και η θερμοκρασία περιβάλλοντος $27 \text{ }^\circ\text{C}$.



Εικόνα 3.6. Διάταξη ηλεκτροστατικής ινοποίησης.

Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

Η παρατήρηση των πολυμερικών δομών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) στο μικροσκόπιο Geol JSM-6510 του τμήματος Μηχανολόγων Μηχανικών Τ.Ε. του ΤΕΙ Λάρισας και στο μικροσκόπιο Cambridge Stereoscan 240 του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Μετά την λήψη των εικόνων SEM έγινε σε αυτές ανάλυση με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού.

Αξιολόγηση των αποτυπωμένων μοριακών πολυμερών

Η αξιολόγηση των μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών που δημιουργήθηκαν με τη διαδικασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης πραγματοποιήθηκε με πειράματα στατικής επαναδέσμευσης. Μετά από δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν επιλέχθηκε ως κατάλληλος διαλύτης για την έκπλυση του υποστρώματος η αιθανόλη. Τμήμα (20 cm²) του προς μελέτη δείγματος ανακινήθηκε με αιθανόλη (10 mL) σε φιαλίδιο για 2 ώρες. Πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω πειράματα στατικής επαναδέσμευσης:

1°. Τμήμα (10 cm²) του προς μελέτη δείγματος (MIP10) ανακινήθηκε με αιθανόλη (5 mL) σε φιαλίδιο για 2 ώρες. Έπειτα, το δείγμα (MIP10 και NIP10) τοποθετήθηκε σε διάλυμα σιλβίνης (0,065 mg/mL) σε μεθανόλη/νερό (1:3) για 2 ώρες, ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν λήψη μέρους του διαλύματος και υπολογισμός της συγκέντρωσης της σιλβίνης με HPLC.

2°. Τμήμα (10 cm²) του προς μελέτη δείγματος (MIP10) ανακινήθηκε με αιθανόλη (5 mL) σε φιαλίδιο για 2 ώρες. Έπειτα, το δείγμα (MIP10 και NIP10) τοποθετήθηκε σε διάλυμα σιλυμαρίνης (0,09 mg/mL) σε μεθανόλη/νερό (1:3) για 2 ώρες, ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν λήψη μέρους του διαλύματος και υπολογισμός της συγκέντρωσης των συστατικών της σιλυμαρίνης με HPLC. Ακολούθησε ανακίνηση σε φιαλίδιο με αιθανόλη (10 mL) του MIP10 για 1 ώρα και του NIP10 για 2 ώρες.

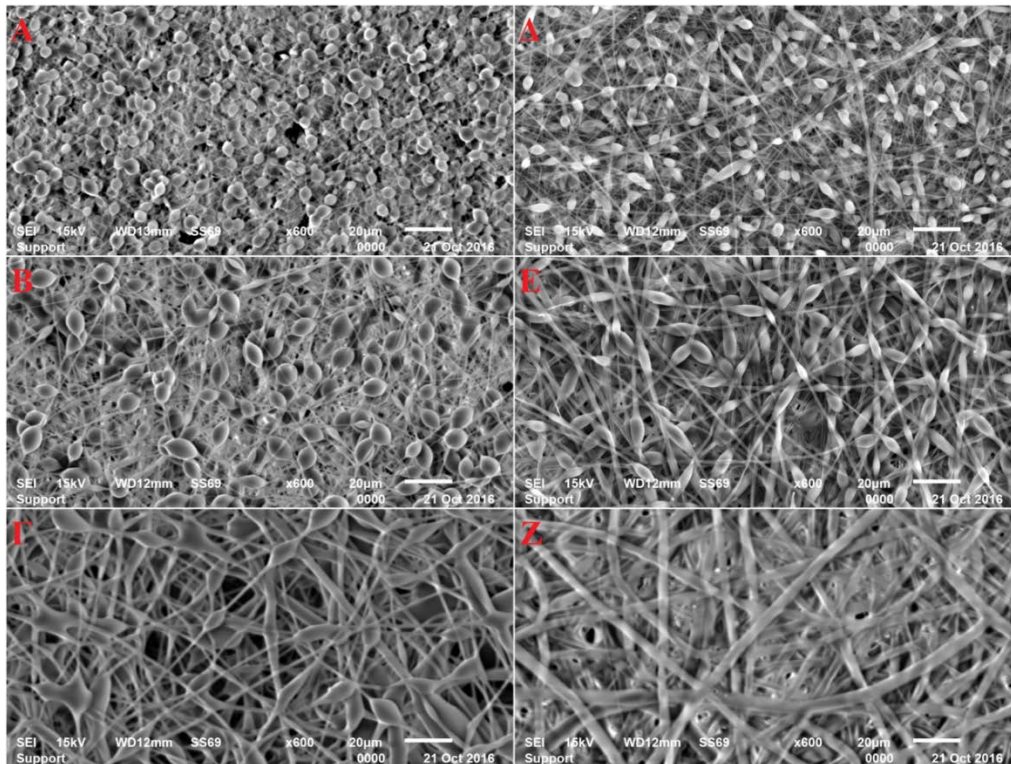
3.8. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.8.1. Σύνθεση μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών

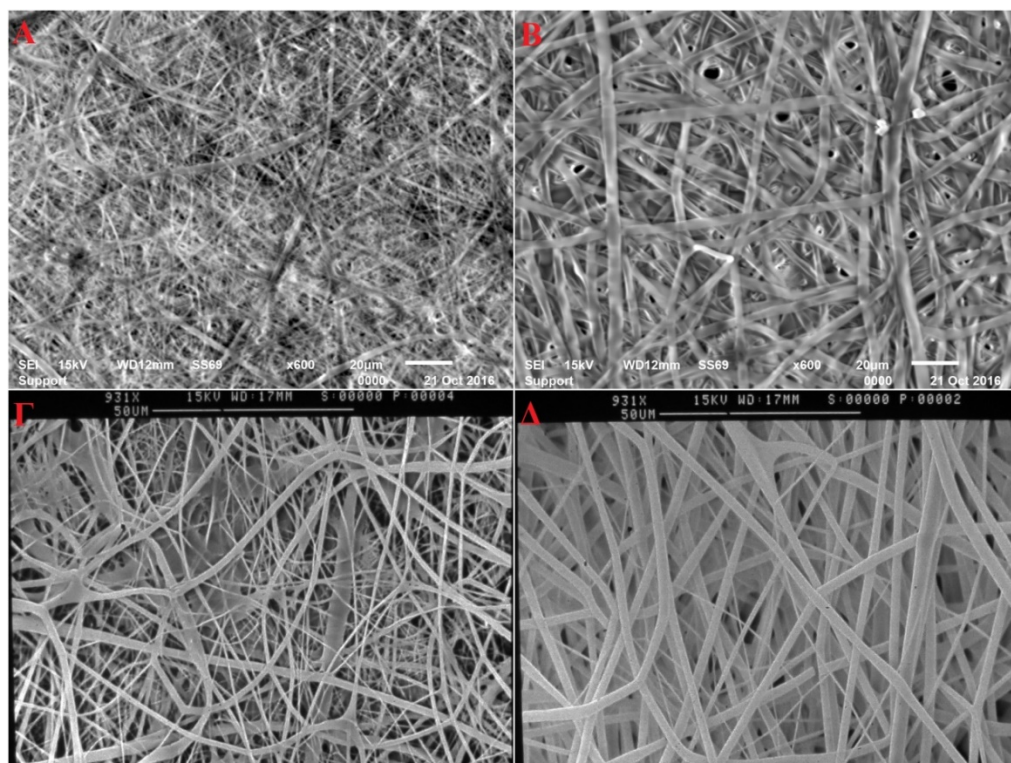
Η σύνθεση μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών ως προς τη σιλυβίνη με την τεχνική του πολυμερισμού διαλύματος δεν επιτεύχθηκε. Η δημιουργία των πολυμερών αναφοράς (NIP) και η μη εκκίνηση του πολυμερισμού στο προς πολυμερισμό διάλυμα που περιείχε το υπόστρωμα (σιλυβίνη) υποδηλώνει ότι η σιλυβίνη δρα ως παρεμποδιστής της δράσης του εκκινητή του πολυμερισμού. Η παρουσία της σιλυβίνης στο προς πολυμερισμό διάλυμα αναστέλλει την παραγωγή ελεύθερων ριζών από τον εκκινητή του πολυμερισμού ή εξουδετερώνει τη δράση των ελεύθερων ριζών αναστέλλοντας τον πολυμερισμό. Αυτό δεν ήταν αναμενόμενο από τη μελέτη της βιβλιογραφίας για τη σιλυβίνη (Anthony & Saleh, 2013), δεδομένου ότι για την κερκετίνη, που εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα εκκαθάρισης των ριζών DPPH^{*} (Murakami *et al.*, 2015) από τη σιλυβίνη, είναι εφικτή η σύνθεση μοριακά αποτυπωμένων ως προς την κερκετίνη πολυμερών με την τεχνική του πολυμερισμού διαλύματος. Συνεπώς, ανεξάρτητα από την ικανότητα εκκαθάρισης ελεύθερων ριζών (free radical scavenging activity) που μετράται με τη μέθοδο DPPH ή γενικά την αντιοξειδωτική ικανότητα που μετράται ως προς συγκεκριμένα μόρια ή ρίζες, ανάλογα με τη δοκιμή μέτρησης, σημασία έχει η συμπεριφορά μιας αντιοξειδωτικής ουσίας ως προς μία συγκεκριμένη ουσία, όπως π.χ. ο εκκινητής του πολυμερισμού.

3.8.2. Ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning)

Με την τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης δημιουργήθηκαν πολυμερικές δομές (nanofibers mat) τόσο απουσία όσο και παρουσία σιλυβίνης. Η παρατήρηση των πολυμερικών δομών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και η ανάλυση με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού έδειξε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση στα διαλύματα του πολυ(οξικού βινυλεστέρα) (NIP) μεγαλώνει το μέγεθος των σφαιριδίων (beeds) και το πάχος των ινών, ενώ μειώνεται και ο αριθμός των σφαιριδίων (Εικόνα 3.7. Α-Γ). Στις δομές που παρασκευάστηκαν παρουσία σιλυβίνης (MIP) υπάρχουν πιο πολλές ίνες, οι οποίες έχουν και μεγαλύτερη διάμετρο από ότι στα NIP (Εικόνα 3.7. Δ-Z). Ακόμη στα MIP τα beeds είναι ατρακτοειδή, ενώ στο MIP9 (PVAc 30% w/w) υπάρχουν μόνο ίνες.



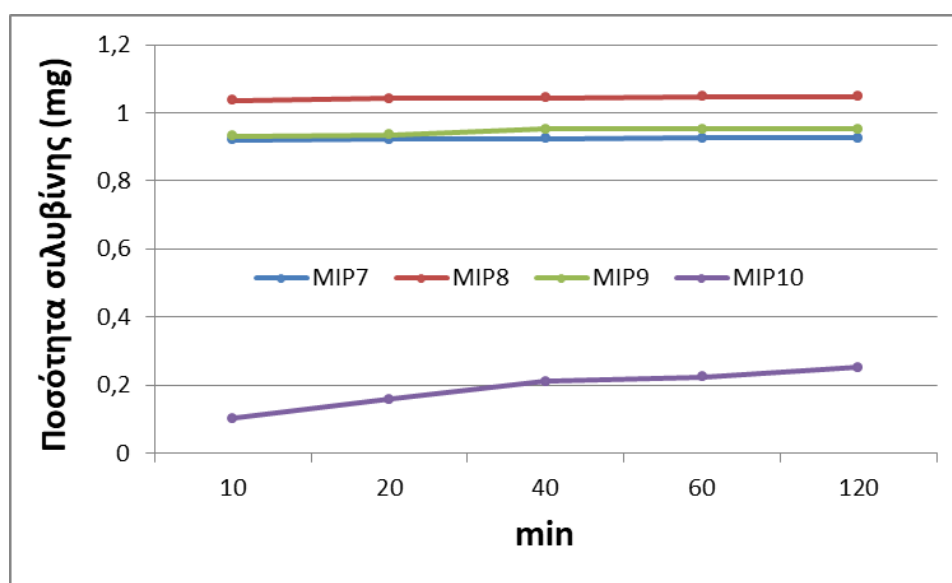
Εικόνα 3.7. Πολυμερικές δομές που δημιουργήθηκαν με την τεχνική της ηλεκτροϊνιοποίησης. Α: NIP7, Β: NIP8, Γ: NIP9, Δ: MIP7, Ε: MIP8, Ζ: MIP9. Οι εικόνες ελήφθησαν με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Geol JSM-6510.



Εικόνα 3.8. Πολυμερικές δομές που δημιουργήθηκαν με την τεχνική της ηλεκτροϊνιοποίησης. Α και Γ: NIP10, Β και Δ: MIP10. Οι εικόνες Α και Β ελήφθησαν με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Geol JSM-6510, ενώ οι εικόνες Γ και Δ με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Cambridge Stereoscan 240.

Στις πολυμερικές δομές που δημιουργήθηκαν παρουσία πολυ(αλλυλαμίνης) υπάρχουν μόνο fibers, οι οποίες έχουν μεγαλύτερη διάμετρο στο MIP10 (Εικόνα 3.8).

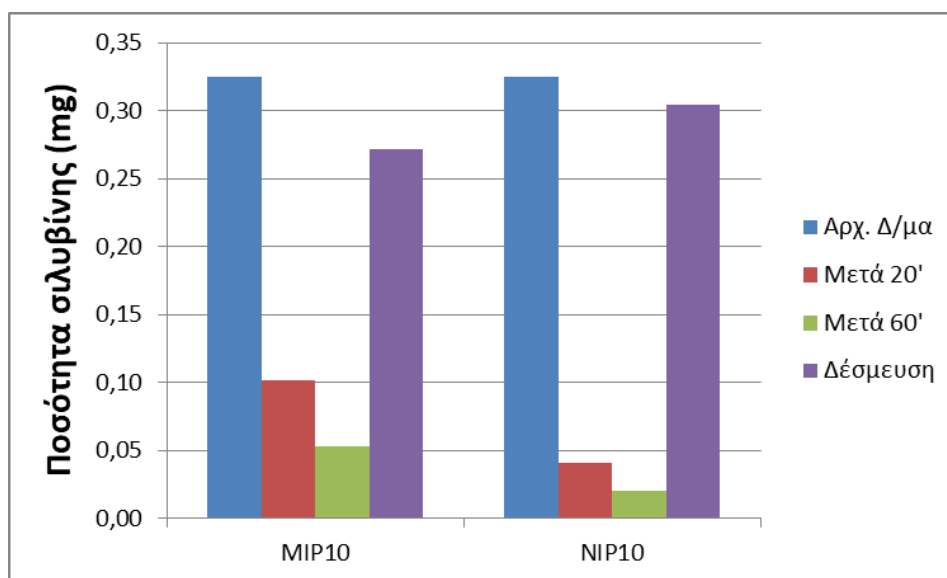
Κατά την ανακίνηση του προς μελέτη δείγματος (MIP7, MIP8 και MIP9) με αιθανόλη (έκπλυση του υποστρώματος) διαπιστώθηκε ότι η σιλυβίνη αποδεσμεύτηκε στα πρώτα λεπτά, γεγονός που δείχνει ότι δεν αναπτύχθηκαν δυνάμεις μεταξύ της σιλυβίνης και του πολυ(οξικού βινυλεστέρα). Αντίθετα, η αποδέσμευση της σιλυβίνης από τις πολυμερικές δομές που δημιουργήθηκαν παρουσία πολυ(αλλυλαμίνης) έγινε σταδιακά σε διάστημα δύο ωρών (Διάγραμμα 3.1).



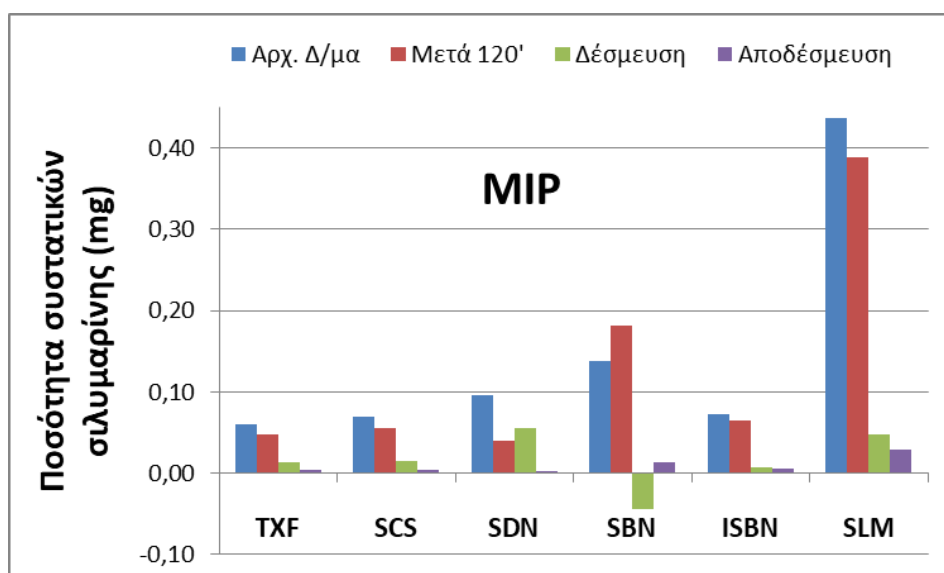
Διάγραμμα 3.1. Αποδέσμευση της σιλυβίνης από τις πολυμερικές μορφές μετά από ανακίνηση με αιθανόλη.

Στο 1^ο πείραμα στατικής επαναδέσμευσης που έγινε διαπιστώθηκε ότι μετά την έκπλυση του πολυμερούς (MIP10) με αιθανόλη και την τοποθέτησή του σε διάλυμα σιλυβίνης, αυτό συγκράτησε το 83,5% της σιλυβίνης του διαλύματος. Η ποσότητα της σιλυβίνης που συγκρατήθηκε από το MIP10 (0,272 mg) ήταν 2,2 φορές περισσότερη από την ποσότητα σιλυβίνης που ελευθερώθηκε (0,125 mg) κατά την έκπυσή του με αιθανόλη. Το πολυμερές αναφοράς (NIP10) συγκράτησε 0,305 mg, το 93,7% της σιλυβίνης του διαλύματος (Διάγραμμα 3.2). Η αναλογία μορίων μεταξύ της πολυ(αλλυλαμίνης) και της σιλυβίνης στο NIP10 υπολογίστηκε σε 15:1, ενώ η αντίστοιχη αναλογία στο MIP10 υπολογίστηκε σε 8:1. Πρέπει να σημειωθεί ότι το NIP περιείχε διπλάσια ποσότητα πολυ(αλλυλαμίνης) σε σχέση με το MIP, οπότε πιθανώς για το λόγο αυτό να δέσμευσε περισσότερη ποσότητα σιλυβίνης από το MIP.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η πολυ(αλλυλαμίνη) δεν δημιουργήσε ειδικές θέσεις δέσμευσης, αλλά ότι μεταξύ της πολυ(αλλυλαμίνης) και της σιλυβίνης αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων της σιλυβίνης και των αμινομάδων της πολυ(αλλυλαμίνης) και πιθανώς και υδρόφοβες/π-π αλληλεπιδράσεις.

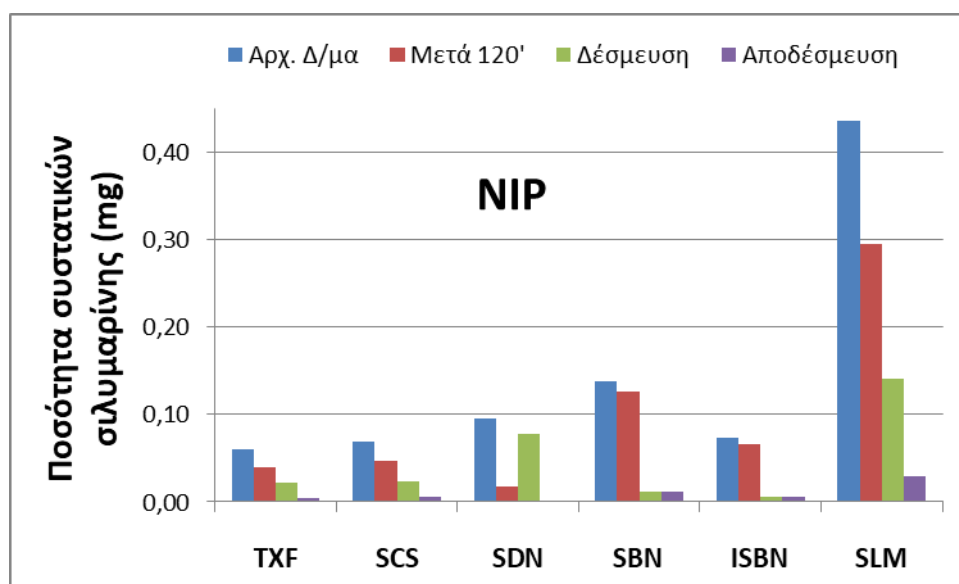


Διάγραμμα 3.2. Δέσμευση της σιλυβίνης από τις πολυμερικές μορφές MIP10 και NIP10 μετά από ανακίνηση με διάλυμα σιλυβίνης.



Διάγραμμα 3.3. Δέσμευση των συστατικών της σιλυμαρίνης από την πολυμερική μορφή MIP10 μετά από ανακίνηση με διάλυμα σιλυμαρίνης και αποδέσμευση των συστατικών αυτών μετά από ανακίνηση με αιθανόλη. TXF:ταξιφολίνη, SCS:σιλυχριστίνη, SDN:σιλυδιανίνη, SBN:σιλυβίνη, ISBN:ισοσιλυβίνη και SLM: σιλυμαρίνη.

Στο 2^ο πείραμα στατικής επαναδέσμευσης που έγινε διαπιστώθηκε ότι μετά την απομάκρυνση του υποστρώματος από το MIP10 και την τοποθέτησή του σε διάλυμα σιλυμαρίνης, αυτό συγκράτησε το 11,0% της σιλυμαρίνης του διαλύματος (Διάγραμμα 3.3). Όσον αφορά τα συστατικά της σιλυμαρίνης, το MIP δέσμευσε το 23,0% της ταξιφολίνης, το 21,7% της σιλυχριστίνης, το 57,3% της σιλυδιανίνης, και το 11,0% της ισοσιλυβίνης. Κατά τη διαδικασία της δέσμευσης των συστατικών της σιλυμαρίνης δεν δεσμεύτηκε ποσότητα σιλυβίνης, αντίθετα αποδεσμεύτηκε ποσότητα σιλυβίνης στο διάλυμα, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στο 1^ο πείραμα, όπου όμως υπήρχε διάλυμα σιλυβίνης. Κατά την έκπλυση με αιθανόλη που ακολούθησε διαπιστώθηκε ότι αποδεσμεύτηκε το 21,4% της ποσότητας της ταξιφολίνης που είχε δεσμευτεί, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τη σιλυχριστίνη, την σιλυδιανίνη και την ισοσιλυβίνη ήταν 26,7%, 5,5% και 62,5%. Τα παραπάνω μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι κατά τη διαδικασία της μοριακής αποτύπωσης η σιλυβίνη δεν αποτυπώθηκε ισχυρά αλλά μέρος της παγιδεύτηκε. Ακόμη, είναι φανερό ότι στο MIP αναπτύχθηκαν ισχυρότεροι δεσμοί μεταξύ της πολυ(αλλυλαμίνης) και της σιλυδιανίνης (κυρίως), της ταξιφολίνης και της σιλυχριστίνης από τους δεσμούς μεταξύ της πολυ(αλλυλαμίνης) και της σιλυβίνης κατά την αποτύπωση.



Διάγραμμα 3.4. Δέσμευση των συστατικών της σιλυμαρίνης από την πολυμερική μορφή NIP10 μετά από ανακίνηση με διάλυμα σιλυμαρίνης και αποδέσμευση των συστατικών αυτών μετά από ανακίνηση με αιθανόλη. TXF:ταξιφολίνη, SCS:σιλυχριστίνη, SDN:σιλυδιανίνη, SBN:σιλυβίνη, ISBN:ισοσιλυβίνη και SLM: σιλυμαρίνη.

Το NIP10 δέσμευσε το 32,3% της σιλυμαρίνης του διαλύματος (0,141 mg). Όσον αφορά τα συστατικά της σιλυμαρίνης, το NIP δέσμευσε το 36,1% της ταξιφολίνης, το 33,3% της σιλυχριστίνης, το 81,2% της σιλυδιανίνης, το 8,0% της σιλυβίνης και το 8,2% της ισοσιλυβίνης (Διάγραμμα 3.4). Κατά τη διαδικασία της έκπλυσης με αιθανόλη που ακολούθησε διαπιστώθηκε ότι αποδεσμεύτηκε το 18,2% της ποσότητας της ταξιφολίνης που είχε δεσμευτεί, το 26,1% της ποσότητας της σιλυχριστίνης, και μόνο το 1,3% της ποσότητας της σιλυδιανίνης, ενώ για τη σιλυβίνη και την ισοσιλυβίνη το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 100%. Μετά την έκπλυση με αιθανόλη παρέμεινε δεσμευμένο το 29,5% της ταξιφολίνης (0,018 mg), το 24,6% της σιλυχριστίνης (0,017 mg) και το 80,2% της σιλυδιανίνης (0,077 mg). Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι στο NIP αναπτύσσονται αρκετά ισχυροί δεσμοί ανάμεσα στα μόρια της πολυ(αλλυλαμίνης) και της σιλυδιανίνης, οπότε θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το πολυμερές αυτό για τη δέσμευση κυρίως της σιλυδιανίνης αλλά και μερικώς της ταξιφολίνης και της σιλυχριστίνης σε ένα διάλυμα σιλυμαρίνης. Ακόμη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το NIP για τον εμπλουτισμό σε σιλυβίνη και ισοσιλυβίνη ενός διαλύματος σιλυμαρίνης, δεδομένου ότι δεσμεύει ποσότητες σιλυδιανίνης κυρίως, αλλά και ταξιφολίνης και σιλυχριστίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΛΕΤΗ ΓΗΓΕΝΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

4.1. Εισαγωγή

Το γαϊδουράγκαθο καλλιεργείται σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες όπως η Πολωνία και η Τσεχία (Andrzejewska *et al.*, 2011; Školníková *et al.*, 2019), συνήθως για την παραγωγή σιλυμαρίνης (Alemardan *et al.*, 2013), ενώ οι σπόροι και η βιομάζα ολόκληρου του φυτού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ελαίου και ενέργειας αντίστοιχα (Andrzejewska *et al.*, 2015; Domínguez *et al.*, 2017). Οι γεωργοί χρησιμοποιούν σπόρους από φυσικούς πληθυσμούς ως υλικό πολλαπλασιασμού για την καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου, αν και διάφορες ποικιλίες όπως οι Mirel και Silyb, στην Τσεχία, είναι διαθέσιμες για εμπορική παραγωγή (Růžičková *et al.*, 2011). Επομένως, είναι ανάγκη να αξιολογούνται και να χαρακτηρίζονται οι αυτοφυείς πληθυσμοί ώστε να χρησιμοποιούνται σε προγράμματα βελτίωσης του γαϊδουράγκαθου. Σε μελέτες που διεξήχθησαν στη Νέα Ζηλανδία, την Ινδία, την Αίγυπτο, την Πολωνία, το Ιράν και άλλες χώρες έχει διαπιστωθεί υψηλή μεταβλητότητα στην περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη και τα συστατικά της σε αυτοφυείς πληθυσμούς ή βιότοπους γαϊδουράγκαθου (Ram *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006; Shokrpour *et al.*, 2008; Andrzejewska *et al.*, 2011; Omar *et al.*, 2012; AbouZid *et al.*, 2016a; Martinelli *et al.*, 2016), ενώ δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη και τα συστατικά της μεταξύ αυτοφυών ελληνικών πληθυσμών γαϊδουράγκαθου. Έτσι σχεδιάστηκε και διεξήχθη μια εκτεταμένη μελέτη με σκοπό την αξιολόγηση τριάντα τεσσάρων γηγενών πληθυσμών γαϊδουράγκαθου, η οποία βασίστηκε σε επιλεγμένα μορφολογικά (βάρος σπόρου, χρώμα άνθους και σπόρου) και βιοχημικά χαρακτηριστικά, όπως η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη και τα βιοδραστικά συστατικά της. Επιπλέον, έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων των σπόρων των πληθυσμών και της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε ολικά φαινολικά συστατικά, ενώ εξετάστηκαν και οι συσχετίσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν.

4.2. Συλλογή δειγμάτων

Συλλέχθηκαν σπόροι από φυτά γαϊδουράγκαθου από τριάντα τέσσερις γηγενείς πληθυσμούς στην Ελλάδα, κατά τη διάρκεια των τελευταίων δέκα ημερών του Μαΐου για τέσσερα συναπτά έτη (2014 έως 2017). Οι πληθυσμοί προέρχονταν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας με διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Εικόνα 4.1). Τα γεωγραφικά δεδομένα (υψόμετρο, γεωγραφικό πλάτος και μήκος) των θέσεων από τις οποίες συλλέχθηκαν οι σπόροι των πληθυσμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1. Για όλους τους πληθυσμούς, οι σπόροι συλλέχθηκαν από τις κεντρικές κεφαλές των φυτών.



Εικόνα 4.1. Γεωγραφική κατανομή των πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn που μελετήθηκαν.

Πίνακας 4.1. Γεωγραφικά χαρακτηριστικά της περιοχής προέλευσης των πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn που μελετήθηκαν.

A/A	Πληθυσμός	Περιφερειακή Ενότητα	Γεωγραφικό πλάτος	Γεωγραφικό μήκος	Υψόμετρο (m)
1	Τρίπολη	Αρκαδία	37°29'	22°22'	659
2	Σπάτα	Αττική	37°57'	23°54'	122
3	Αλίαρτος	Βοιωτία	38°23'	23°05'	93
4	Κάστρο		28°29'	23°10'	96
5	Θέρμη	Θεσσαλονίκη	40°32'	23°00'	41
6	Νησέλι	Ιμαθία	40°35'	22°28'	9
7	Καστοριά	Καστοριά	40°30'	21°14'	646
8	Σιάτιστα	Κοζάνη	40°16'	21°30'	685
9	Αμπελιά	Λάρισα	39°18'	22°29'	188
10	Κάτω Αιγάνη		39°56'	22°39'	10
11	Κιλελέρ		39°31'	22°38'	56
12	Ομορφοχώρι		39°40'	22°28'	64
13	Τερψιθέα		39°37'	22°21'	116
14	Φάρσαλα		39°17'	22°21'	147
15	Αγριά		Μαγνησία	39°20'	23°01'
16	Βελεστίνο	39°23'		22°45'	77
17	Μικροθήβες	39°15'		22°44'	105
18	Φυτόκου	39°23'		22°56'	46
19	Καλαμπάκα	Τρίκαλα	39°40'	21°39'	180
20	Άγιος Γεώργιος 1	Φθιώτιδα	39°01'	22°20'	496
21	Άγιος Γεώργιος 2		39°03'	22°24'	505
22	Άγιος Στέφανος		39°01'	22°15'	477
23	Ανθήλη		38°50'	22°30'	5
24	Αργύρια		38°48'	22°03'	701
25	Γραμμένη		38°96'	22°19'	179
26	Καλαμάκι		39°00'	22°35'	781
27	Καστρί		38°56'	22°12'	93
28	Λαμία		38°54'	22°26'	104
29	Μεσοποταμία 1		38°56'	22°11'	89
30	Μεσοποταμία 2		38°55'	22°13'	92
31	Νέο Μοναστήρι		39°12'	22°17'	131
32	Ξυνιάδα-Λίμνη		39°03'	22°17'	461
33	Παλαιοντέρβενο		39°01'	22°20'	563
34	Τρίλοφο		38°59'	22°12'	356

4.3. Μορφολογία φυτών και σπόρων

Καταγράφηκαν μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος και το χρώμα των σπόρων, τα χαρακτηριστικά των φύλλων και το χρώμα των κεφαλών για καθένα από τα τριάντα φυτά που αξιολογήθηκαν για κάθε πληθυσμό γαιΐδουράγκαθου. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους του σπόρου, προσδιορίστηκε το βάρος των 1000 σπόρων (4 ζυγίσσεις των 100 σπόρων ανά πληθυσμό).

4.4. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσες τιμές τριών επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα. Υπολογίστηκαν επίσης οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (CV) για τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό IBM SPSS Statistics (Version 24, IBM Corporation, Armonk, NY). Ακόμη, έγινε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για να εξεταστεί η συμβολή κάθε μεταβλητής στη συνολική ποικιλομορφία χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες μεταβλητές: βάρος 1000 σπόρων, περιεκτικότητα σε έλαιο και περιεκτικότητες των συστατικών της σιλυμαρίνης. Χρησιμοποιήθηκαν κύριες συνιστώσες με ιδιοτιμή (Eigenvalue) >1 . Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης (Pearson, r) για να εξεταστεί η σχέση μεταξύ των συστατικών της σιλυμαρίνης και των καταγεγραμμένων αγρονομικών χαρακτηριστικών. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε η ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες (hierarchical clustering) για την ταξινόμηση των πληθυσμών γαιΐδουράγκαθου και για τη δημιουργία ομοιογενών κατηγοριών των πληθυσμών που μελετήθηκαν. Τέλος, έγινε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για να εξεταστεί η συμβολή της ταξιφολίνης και των φλαβονολιγνανών της σιλυμαρίνης στην ποικιλομορφία των πληθυσμών.

4.5. Αποτελέσματα

4.5.1. Μορφολογία φυτών και σπόρων

Οι πληθυσμοί του γαιΐδουράγκαθου που συλλέχθηκαν χαρακτηρίζονταν από ποικιλόχρωμα φύλλα και μωβ άνθη. Το χρώμα των σπόρων ήταν κυρίως καφέ, ενώ οι σπόροι των πληθυσμών 'Μεσοποταμία 1' και 'Σπάτα' ήταν μαύροι. (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2. Σπόροι πληθυσμών: 1. ‘Κιλελέρ’ (Έτος 2015), 2. ‘Μεσοποταμία 1’ (Έτος 2014), 3. ‘Τρίπολη’, 4. ‘Λαμία’ (Έτος 2015), 5. ‘Άγιος Γεώργιος 1’ (Έτος 2017), 6. ‘Άγιος Γεώργιος 2’, 7. ‘Καστοριά’, 8. ‘Λαμία’ (Έτος 2017).

Όσον αφορά τις μετρήσεις των παραμέτρων του χρώματος των σπόρων των πληθυσμών, η φωτεινότητα L^* κυμαινόταν μεταξύ 28,12 και 42,79, με μέση τιμή 34,69 και σχετική τυπική απόκλιση (CV) 11,6%, ενώ η χρωματική πυκνότητα C^* κυμαινόταν μεταξύ 5,50 και 14,09, με μέση τιμή 9,75 (CV=23,0%). Οι χαμηλότερες τιμές και για τις δύο αυτές παραμέτρους καταγράφηκαν στους πληθυσμούς ‘Μεσοποταμία 1’ και ‘Σπάτα’. Η χροιά h° κυμάνθηκε από 71,84 έως 80,71, με τη μέση τιμή να είναι 76,08 (CV=2,5%). Όσον αφορά το μέγεθος των σπόρων, οι τιμές του βάρους των 1000 σπόρων κυμαίνονταν από 14,91 έως 25,90 g (Πίνακας 4.2).

4.5.2. Περιεκτικότητα σε έλαιο και σιλυμαρίνη

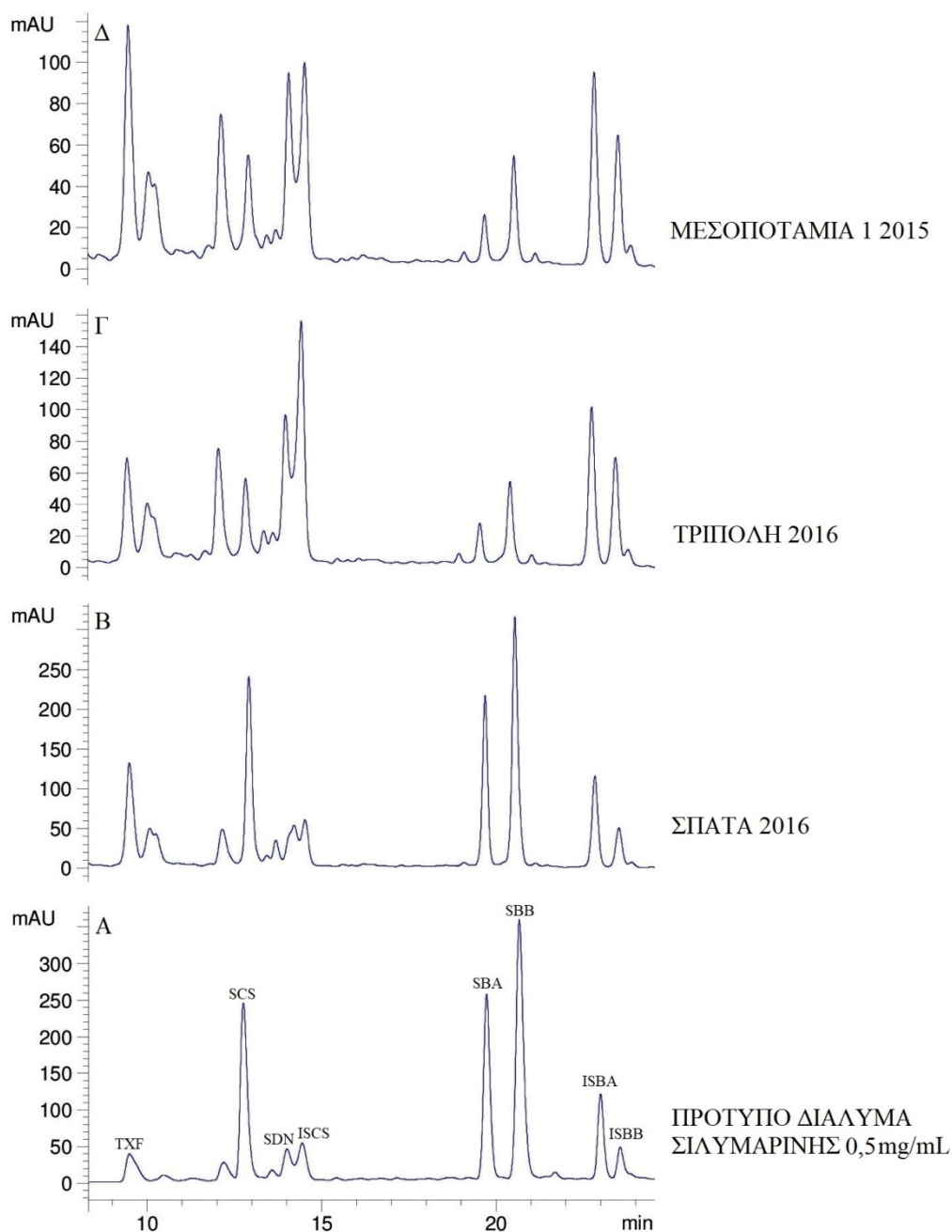
Διαφορές παρατηρήθηκαν στην περιεκτικότητα των σπόρων σε έλαιο για τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν, με τη μέση τιμή να είναι 26,64%, ενώ η σχετική τυπική απόκλιση ήταν 5,6%. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα καταγράφηκε στους πληθυσμούς ‘Φυτόκου’ (31,10%), ‘Άγιος Γεώργιος 1’ (Έτος 2015) (30,48%) και ‘Κάτω Αιγάνη’ (29,27%), ενώ η μικρότερη τιμή (24,49%) στον πληθυσμό ‘Μεσοποταμία 1’ (Έτος 2017) (Πίνακας 4.3).

Πίνακας 4.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των κεφαλών (χρώμα) και των σπόρων από πληθυσμούς του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Πληθυσμός	Έτος	Χρώμα ταξιανθίας	Χρώμα σπόρων	Βάρος 1000 σπόρων (g)	L*	C*	h°
‘Τρίπολη’	2016	Μωβ	Καφέ	25,90±0,46	36,06±0,43	10,57±0,19	76,44±0,76
‘Σπάτα’	2015		Μαύρο	24,26±0,79	28,86±0,92	5,95±0,34	73,08±1,43
	2016		Μαύρο	21,72±0,23	28,23±0,65	5,69±0,49	72,04±0,98
‘Αλίαρτος’	2015		Καφέ	20,13±0,07	31,70±0,81	8,87±0,74	78,10±0,50
‘Κάστρο’	2014		Καφέ	21,78±0,09	32,10±0,21	8,58±0,39	75,87±0,33
‘Θέρμη’	2016		Καφέ	19,44±0,66	42,79±0,35	13,94±0,49	80,67±0,72
‘Νησέλι’	2016		Καφέ	16,10±0,18	41,52±0,69	14,09±0,39	80,71±0,61
‘Καστοριά’	2016		Καφέ	21,85±0,13	34,07±0,52	8,28±0,79	77,57±1,99
‘Σιάτισσα’	2016		Καφέ	18,43±0,46	39,33±0,60	11,83±0,37	77,47±0,71
‘Αμπελιά’	2014		Καφέ	18,87±0,22	31,86±0,43	8,98±0,13	80,43±1,03
	2017		Καφέ	19,01±0,25	39,91±0,19	12,48±0,30	77,18±0,61
‘Κάτω Αιγάνη’	2016		Καφέ	18,74±0,17	38,69±1,17	11,10±0,34	74,09±1,40
‘Κιλελέρ’	2015		Καφέ	19,23±0,22	32,07±1,33	8,81±0,34	75,51±0,69
	2016		Καφέ	20,68±0,14	36,70±0,45	9,25±0,35	78,24±0,37
‘Ομορφοχώρι’	2015		Καφέ	17,32±0,16	33,80±0,33	10,23±0,38	76,58±0,84
‘Τερψιθέα’	2015		Καφέ	17,63±0,47	33,17±0,66	9,20±0,39	76,27±0,58
‘Φάρσαλα’	2017		Καφέ	18,34±0,12	39,39±0,20	12,10±0,28	76,76±0,62
‘Αγριά’	2016		Καφέ	16,86±0,14	36,32±0,73	9,55±0,41	74,13±0,94
‘Βελεστίνο’	2014		Καφέ	19,19±0,19	34,02±0,25	10,27±0,32	76,13±0,44
	2015		Καφέ	20,39±0,44	30,79±0,96	7,72±0,58	74,78±1,26
‘Μικροθήβες’	2014	Καφέ	21,82±0,25	32,53±0,52	8,38±0,49	77,65±0,59	
	2017	Καφέ	18,53±0,45	39,16±0,68	12,35±0,25	76,56±0,43	
‘Φυτόκου’	2015	Καφέ	19,84±0,30	31,98±0,88	9,14±0,20	75,68±1,47	
‘Καλαμπάκα’	2015	Σκούρο Καφέ	20,53±0,18	30,42±0,20	7,11±0,21	75,89±0,84	
‘Άγιος Γεώργιος’	2014	Καφέ	24,82±0,40	33,91±0,94	8,85±0,25	76,30±0,58	

Πληθυσμός	Έτος	Χρώμα ταξιανθίας	Χρώμα σπόρων	Βάρος 1000 σπόρων	L*	C*	h°
‘Άγιος Γεώργιος 1’	2015	Μωβ	Καφέ	22,12±0,51	34,00±1,40	9,18±0,15	75,85±0,53
	2017		Καφέ	22,73±0,13	41,00±0,78	12,75±0,58	75,49±0,75
‘Άγιος Γεώργιος 2’	2017		Καφέ	19,33±0,38	38,63±0,16	12,28±0,35	75,98±0,67
‘Άγιος Στέφανος’	2015		Καφέ	20,84±0,18	33,38±0,58	9,29±0,60	75,10±0,25
	2017		Καφέ	20,99±0,25	35,67±0,49	9,73±0,08	73,25±0,59
‘Ανθήλη’	2015		Καφέ	20,58±0,39	30,16±0,22	7,71±0,17	77,15±0,64
‘Αργύρια’	2017		Καφέ	20,73±0,37	40,35±0,05	12,16±0,25	74,93±0,16
‘Γραμμένη’	2014		Καφέ	23,08±0,47	31,31±0,51	7,50±0,43	75,06±2,34
‘Καλαμάκι’	2017		Καφέ	21,55±0,54	39,37±0,96	13,20±0,49	75,91±0,41
‘Καστρί’	2014		Καφέ	18,26±0,19	31,03±0,28	7,72±0,24	76,32±1,78
	2017		Καφέ	19,13±0,69	36,57±0,78	9,70±0,15	75,86±0,48
‘Λαμιά’	2015		Καφέ	17,86±0,28	30,21±0,01	7,55±0,09	77,13±0,06
	2017		Καφέ	20,18±0,26	35,85±0,20	10,74±0,21	72,96±0,38
‘Μεσοποταμία 1’	2014		Μαύρο	20,97±0,20	28,12±0,34	5,50±0,41	78,08±1,21
	2015		Μαύρο	21,77±0,29	28,96±0,22	5,75±0,27	74,71±1,81
	2017		Μαύρο	19,41±0,19	29,79±0,38	6,73±0,21	74,75±1,45
‘Μεσοποταμία 2’	2015		Καφέ	22,06±0,19	32,29±1,04	9,61±0,31	74,90±0,96
‘Νέο Μοναστήρι’	2014		Καφέ	23,02±0,26	33,32±0,70	9,67±0,37	75,34±2,25
	2017		Καφέ	14,91±0,15	40,84±1,21	13,34±0,22	75,47±0,20
‘Ξυνιάδα-Λίμνη’	2014		Καφέ	21,10±0,16	34,07±1,04	10,40±0,62	78,58±1,03
	2017	Καφέ	19,13±0,14	41,79±1,07	13,42±0,57	77,49±0,16	
‘Παλαιοντέρβενο’	2014	Καφέ	22,25±0,32	33,12±0,33	9,64±0,76	76,56±0,90	
	2017	Καφέ	24,33±0,04	38,09±1,99	11,52±0,87	75,34±1,31	
‘Τρίλοφο’	2014	Καφέ	19,99±0,38	30,67±0,90	7,90±0,36	75,94±0,97	
	2017	Καφέ	16,66±0,27	36,37±0,52	11,38±0,50	71,84±0,71	

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέση τιμή±τυπικό σφάλμα



Εικόνα 4.3. Χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος σιλυμαρίνης και εκχυλισμάτων των σπόρων πληθυσμών του φυτού γαϊδουράγκαθο. TXF:ταξιφολίνη, SCS:σιλυχριστίνη, SDN:σιλυδιανίνη, ISCS:ισοσιλυχριστίνη, SBA:σιλυβίνη Α, SBB:σιλυβίνη Β, ISBA:ισοσιλυβίνη Α, ISBB:ισοσιλυβίνη Β. Χρόνος κατακράτησης (λεπτά): TXF:9,5 – SCS:12,7 – SDN:14,0 – ISCS:14,4 – SBA:19,7 – SBB:20,6 – ISBA:23,0 – ISBB:23,5.

Πίνακας 4.3. Περιεκτικότητα σε έλαιο (%) σπόρων από πληθυσμούς του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Πληθυσμός	Έτος	Περιεκτικότητα σε έλαιο (%)	Πληθυσμός	Έτος	Περιεκτικότητα σε έλαιο (%)
‘Τρίπολη’	2016	28,55±0,33	‘Άγιος Γεώργιος 1’	2015	30,48±0,50
‘Σπάτα’	2015	27,73±0,59		2017	26,45±0,35
	2016	27,85±0,25	‘Άγιος Γεώργιος 2’	2017	25,60±0,32
‘Αλίαρτος’	2015	26,89±0,41	‘Άγιος Στέφανος’	2015	26,92±0,36
‘Κάστρο’	2014	27,80±0,73		2017	26,03±0,38
‘Θέρμη’	2016	25,35±0,53	‘Ανθήλη’	2015	25,63±0,39
‘Νησέλι’	2016	26,37±0,16	‘Αργύρια’	2017	26,69±0,35
‘Καστοριά’	2016	28,63±0,45	‘Γραμμένη’	2014	27,24±0,38
‘Σιάτιστα’	2016	24,83±0,40	‘Καλαμάκι’	2017	25,59±0,35
‘Αμπελιά’	2014	25,39±0,41	‘Καστρί’	2014	28,50±0,51
	2017	25,60±0,29		2017	25,04±0,35
‘Κάτω Αιγάνη’	2016	29,27±0,38	‘Λαμία’	2015	27,83±0,40
‘Κιλελέρ’	2015	25,76±0,41		2017	26,14±0,28
	2016	26,18±0,31	‘Μεσοποταμία 1’	2014	25,15±0,38
‘Όμορφοχώρι’	2015	26,84±0,24		2015	25,10±0,28
‘Τερψιθέα’	2015	24,65±0,53		2017	24,49±0,37
‘Φάρσαλα’	2017	25,29±0,35	‘Μεσοποταμία 2’	2015	27,68±0,32
‘Αγριά’	2016	26,69±0,51	‘Νέο Μοναστήρι’	2014	26,96±0,44
‘Βελεστίνο’	2014	26,79±0,36		2017	25,21±0,32
	2015	26,95±0,28	‘Ξυνιάδα-Λίμνη’	2014	28,25±0,23
‘Μικροθήβες’	2014	26,38±0,27		2017	25,08±0,46
	2017	24,65±0,33	‘Παλαιοντέρβενο’	2014	26,71±0,47
‘Φυτόκου’	2015	31,10±0,69		2017	25,76±0,59
‘Καλαμπάκα’	2015	26,82±0,36	‘Τρίλοφο’	2014	27,02±0,29
‘Άγιος Γεώργιος 1’	2014	28,54±0,40		2017	25,42±0,35

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέση τιμή±τυπικό σφάλμα

Πίνακας 4.4. Περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (%) σπόρων από πληθυσμούς του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Πληθυσμός	Έτος	Περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (%)	Πληθυσμός	Έτος	Περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (%)
‘Τρίπολη’	2016	4,22±0,11	‘Άγιος Γεώργιος 1’	2015	2,97±0,06
‘Σπάτα’	2015	5,88±0,26		2017	3,23±0,06
	2016	7,71±0,18	‘Άγιος Γεώργιος 2’	2017	2,72±0,04
‘Αλίαρτος’	2015	3,08±0,04	‘Άγιος Στέφανος’	2015	2,94±0,03
‘Κάστρο’	2014	3,28±0,09		2017	3,63±0,09
‘Θέρμη’	2016	2,40±0,03	‘Ανθήλη’	2015	2,75±0,09
‘Νησέλι’	2016	3,28±0,10	‘Αργύρια’	2017	3,88±0,07
‘Καστοριά’	2016	5,04±0,12	‘Γραμμένη’	2014	3,23±0,09
‘Σιάτιστα’	2016	2,78±0,12	‘Καλαμάκι’	2017	3,80±0,10
‘Αμπελιά’	2014	2,43±0,04	‘Καστρί’	2014	3,46±0,05
	2017	3,09±0,02		2017	3,44±0,11
‘Κάτω Αιγάνη’	2016	4,04±0,03	‘Λαμία’	2015	3,08±0,06
‘Κιλελέρ’	2015	2,61±0,06		2017	3,13±0,04
	2016	3,32±0,06	2014	3,62±0,13	
‘Όμορφοχώρι’	2015	2,78±0,07	‘Μεσοποταμία 1’	2015	3,50±0,16
‘Τερψιθέα’	2015	2,94±0,02		2017	3,35±0,03
‘Φάρσαλα’	2017	3,30±0,09	‘Μεσοποταμία 2’	2015	2,65±0,04
‘Αγριά’	2016	3,35±0,14	‘Νέο Μοναστήρι’	2014	3,32±0,11
‘Βελεστίνο’	2014	2,31±0,01		2017	3,36±0,10
	2015	2,83±0,05	‘Ξυνιάδα-Λίμνη’	2014	2,36±0,02
‘Μικροθήβες’	2014	2,93±0,12		2017	3,24±0,03
	2017	2,85±0,09	‘Παλαιοντέρβενο’	2014	2,44±0,03
‘Φυτόκου’	2015	3,22±0,11		2017	3,29±0,08
‘Καλαμπάκα’	2015	3,31±0,12	‘Τρίλοφο’	2014	2,60±0,07
‘Άγιος Γεώργιος 1’	2014	2,72±0,01		2017	2,97±0,10

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέση τιμή±τυπικό σφάλμα

Υψηλή μεταβλητότητα παρατηρήθηκε στις τιμές της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη για τα 50 δείγματα από τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Η μέση τιμή ήταν 3,29%, ενώ η σχετική τυπική απόκλιση ήταν 27,4%. Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη στους σπόρους των περισσότερων πληθυσμών ήταν μικρότερη από 4%, ενώ η διάμεσος τιμή ήταν 3,22%. Οι μεγαλύτερες τιμές καταγράφηκαν στους πληθυσμούς από τα Σπάτα (5,88% και 7,71%), την Καστοριά (5,04%) και την Τρίπολη (4,22%), ενώ οι μικρότερες στους πληθυσμούς ‘Θέρμη’, ‘Ξυνιάδα-Λίμνη’ (Έτος 2014) και ‘Βελεστίνο’ (Έτος 2014) με τιμές 2,40%, 2,36% και 2,31%, αντίστοιχα (Πίνακας 4.4).

4.5.3. Περιεκτικότητα σε συστατικά της σιλυμαρίνης

Η περιεκτικότητα σε ταξιφολίνη και σε φλαβονολιγνάνες παρουσίασε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους πληθυσμούς που μελετήθηκαν (Πίνακας 4.5). Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις κυμαίνονταν από 15,0% για την ισοσιλυβίνη Α έως 154,3% για τη σιλυβίνη Α. Η μέση τιμή της ταξιφολίνης ήταν 5,04 mg ανά g ξηρού βάρους σπόρου ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw), ενώ η σχετική τυπική απόκλιση (CV) ήταν 27,3%. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ταξιφολίνη βρέθηκε στους πληθυσμούς από τα Σπάτα, τη Μεσοποταμία 1 και την Καστοριά. Η περιεκτικότητα σε σιλυβίνη Α κυμάνθηκε από 0,44 έως 11,77 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw, ενώ η περιεκτικότητα σε σιλυχριστίνη κυμάνθηκε από 2,05 έως 15,11 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw (CV=67,9%). Οι μεγαλύτερες τιμές και για τα δύο αυτά συστατικά παρατηρήθηκαν στους πληθυσμούς από τα Σπάτα και την Καστοριά. Μεγάλες διαφορές ανάμεσα στους πληθυσμούς καταγράφηκαν και για την περιεκτικότητα σε σιλυβίνη Β (CV=107,0%). Οι ποσότητες της σιλυδιανίνης και της ισοσιλυχριστίνης παρουσιάζονται ως μία (σιλυδιανίνη), επειδή τα δύο αυτά συστατικά της σιλυμαρίνης, έχοντας παρόμοιους χρόνους κατακράτησης, συχνά αναγνωρίζονται ως ένα σε πολλές μελέτες. Η μέση τιμή της σιλυδιανίνης ήταν 12,12 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw (CV=26,6%), με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται στους πληθυσμούς από την Τρίπολη και τα Αργύρια. Ακόμη, η μέση τιμή της ισοσιλυβίνης Α ήταν 4,66 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw, ενώ της ισοσιλυβίνης Β ήταν 3,63 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw (CV=18,5%). Οι μεγαλύτερες τιμές για την ισοσιλυβίνη Α βρέθηκαν στους πληθυσμούς από τα Σπάτα και την Καστοριά, ενώ για την ισοσιλυβίνη Β στους πληθυσμούς από την Τρίπολη και την Κάτω Αιγάνη.

Πίνακας 4.5. Περιεκτικότητα σε συστατικά σιλυμαρίνης ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ σπόρου) σπόρων από πληθυσμούς του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Πληθυσμός	Έτος	TXF	SCS	SDN	SBA	SBB	ISBA	ISBB
‘Τρίπολη’	2016	4,87±0,07	3,47±0,35	19,24±0,85	0,93±0,03	2,64±0,07	5,79±0,19	5,38±0,20
‘Σπάτα’	2015	6,77±0,15	11,04±0,54	9,71±0,70	7,96±0,40	13,81±0,97	5,97±0,28	3,48±0,16
	2016	10,22±0,23	15,11±0,85	9,75±0,41	11,77±0,31	19,62±1,00	7,15±0,19	3,52±0,11
‘Αλιάρτος’	2015	5,47±0,08	3,42±0,44	8,41±0,64	0,79±0,02	2,63±0,08	5,25±0,20	4,80±0,21
‘Κάστρο’	2014	4,03±0,15	2,76±0,37	15,63±0,55	0,83±0,03	1,97±0,06	4,42±0,26	3,20±0,24
‘Θέρμη’	2016	4,15±0,06	2,14±0,15	8,98±0,35	0,44±0,02	1,51±0,02	3,75±0,12	3,21±0,07
‘Νησέλι’	2016	5,48±0,19	2,96±0,17	11,95±0,67	0,77±0,04	2,11±0,04	5,04±0,20	4,46±0,14
‘Καστοριά’	2016	7,11±0,08	8,27±0,28	9,54±0,45	5,73±0,15	9,68±0,29	5,91±0,10	4,18±0,06
‘Σιάτιστα’	2016	3,17±0,10	2,05±0,14	14,15±1,02	0,45±0,01	1,36±0,03	3,59±0,10	3,05±0,08
‘Αμπελιά’	2014	3,66±0,14	2,07±0,08	10,55±0,51	0,59±0,02	1,54±0,04	3,35±0,14	2,54±0,05
	2017	4,87±0,12	2,69±0,19	12,35±0,35	1,05±0,04	2,39±0,06	4,34±0,09	3,22±0,12
‘Κάτω Αιγάνη’	2016	5,42±0,19	3,51±0,33	17,44±0,77	0,80±0,04	2,58±0,04	5,60±0,22	5,04±0,20
‘Κιλελέρ’	2015	4,73±0,14	3,05±0,46	6,62±0,24	0,58±0,03	2,21±0,07	4,83±0,22	3,98±0,20
	2016	5,12±0,11	2,48±0,11	15,89±0,79	0,53±0,02	1,64±0,04	4,22±0,17	3,50±0,13
‘Ομοροχώρι’	2015	5,13±0,15	2,78±0,21	8,28±0,58	0,65±0,01	2,12±0,05	4,67±0,15	4,08±0,19
‘Τερμηθέα’	2015	5,42±0,12	3,05±0,18	8,26±0,40	0,65±0,02	2,46±0,06	5,09±0,12	4,39±0,17
‘Φάρσαλα’	2017	4,81±0,15	2,75±0,22	14,33±1,04	1,06±0,04	2,38±0,07	4,44±0,15	3,26±0,10
‘Αγριά’	2016	4,61±0,15	3,21±0,35	12,93±0,82	0,74±0,03	2,25±0,05	5,17±0,27	4,63±0,16
‘Βελεστίνο’	2014	4,13±0,09	2,26±0,22	8,37±0,27	0,66±0,02	1,57±0,03	3,48±0,10	2,58±0,04
	2015	3,83±0,07	2,88±0,25	9,21±0,47	0,64±0,02	2,33±0,06	4,78±0,16	4,54±0,15
‘Μικροθήβες’	2014	5,05±0,11	3,12±0,19	10,05±1,07	0,87±0,04	2,19±0,07	4,69±0,10	3,32±0,09
	2017	3,33±0,08	2,83±0,12	11,20±0,84	1,04±0,03	2,45±0,06	4,32±0,14	3,29±0,16
‘Φυτόκου’	2015	4,74±0,09	2,98±0,17	12,51±0,64	0,59±0,02	2,26±0,06	5,02±0,19	3,99±0,09
‘Καλαμπάκα’	2015	4,27±0,10	2,90±0,11	14,01±0,82	0,58±0,02	2,15±0,05	4,83±0,17	4,20±0,16
‘Άγιος Γεώργιος 1’	2014	4,50±0,12	2,13±0,12	10,60±0,49	0,90±0,03	2,09±0,04	4,09±0,14	2,84±0,06

TXF:ταξιφολίνη, SCS:σιλυχριστίνη, SDN:σιλυδιανίνη, SBA:σιλυβίνη Α, SBB:σιλυβίνη Β, ISBA:ισοσιλυβίνη Α, ISBB:ισοσιλυβίνη Β.

Πίνακας 4.5. Περιεκτικότητα σε συστατικά σιλυμαρίνης ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ σπόρου) σπόρων από πληθυσμούς του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Πληθυσμός	Έτος	TXF	SCS	SDN	SBA	SBB	ISBA	ISBB
‘Άγιος Γεώργιος 1’	2015	3,35±0,15	2,59±0,23	12,32±0,69	0,58±0,02	2,06±0,06	4,81±0,25	3,89±0,14
	2017	5,82±0,18	2,66±0,13	13,33±0,42	0,87±0,04	1,98±0,05	4,37±0,13	3,25±0,11
‘Άγιος Γεώργιος 2’	2017	4,99±0,13	2,66±0,10	8,83±0,22	1,05±0,02	2,35±0,03	4,21±0,10	3,13±0,13
‘Άγιος Στέφανος’	2015	4,06±0,08	3,00±0,17	8,84±0,33	0,74±0,03	2,68±0,04	5,35±0,18	4,69±0,13
	2017	4,98±0,18	3,01±0,24	16,12±0,87	1,19±0,09	2,48±0,04	4,95±0,21	3,58±0,17
‘Ανθήλη’	2015	3,23±0,15	2,65±0,17	10,49±0,68	0,60±0,02	2,08±0,06	4,43±0,12	3,90±0,13
‘Αργύρια’	2017	6,30±0,22	2,75±0,25	18,10±0,59	1,13±0,06	2,47±0,07	4,69±0,18	3,38±0,15
‘Γραμμένη’	2014	4,70±0,07	2,92±0,15	13,65±0,84	0,87±0,03	2,22±0,06	4,63±0,14	3,28±0,15
‘Καλαμάκι’	2017	5,88±0,31	2,91±0,13	17,57±0,96	1,18±0,04	2,40±0,04	4,66±0,12	3,40±0,15
‘Καστρί’	2014	6,88±0,21	2,74±0,23	13,36±0,43	0,92±0,03	2,36±0,07	5,02±0,21	3,34±0,10
	2017	4,34±0,15	2,74±0,18	15,31±1,01	0,99±0,04	2,44±0,07	4,81±0,18	3,65±0,13
‘Λαμία’	2015	5,04±0,11	3,38±0,19	8,41±0,64	0,74±0,02	2,72±0,07	5,60±0,13	4,84±0,23
	2017	5,21±0,18	2,76±0,35	11,71±0,76	0,97±0,03	2,45±0,06	4,61±0,24	3,57±0,07
‘Μεσοποταμία 1’	2014	8,13±0,26	2,57±0,21	15,42±0,62	0,80±0,01	2,03±0,03	4,26±0,12	3,04±0,10
	2015	7,19±0,14	3,18±0,28	12,94±0,94	0,65±0,01	2,22±0,04	4,70±0,15	4,00±0,11
	2017	6,01±0,14	2,50±0,13	14,52±0,72	0,81±0,04	2,05±0,04	4,24±0,17	3,26±0,17
‘Μεσοποταμία 2’	2015	6,28±0,19	2,79±0,22	6,78±0,28	0,56±0,01	1,96±0,04	4,25±0,13	3,80±0,17
‘Νέο Μοναστήρι’	2014	3,28±0,07	2,50±0,21	17,66±1,09	0,70±0,03	1,87±0,04	4,11±0,11	3,07±0,12
	2017	3,64±0,12	2,79±0,19	15,29±0,82	0,92±0,03	2,30±0,03	4,87±0,17	3,74±0,12
‘Ξυνιάδα-Λίμνη’	2014	3,93±0,07	2,13±0,15	8,56±0,28	0,80±0,02	1,83±0,04	3,76±0,06	2,58±0,09
	2017	6,03±0,23	2,77±0,18	13,10±0,53	0,95±0,04	2,01±0,03	4,26±0,27	3,19±0,15
‘Παλαιοντέρβενο’	2014	3,30±0,06	2,60±0,15	8,75±0,37	0,82±0,02	2,06±0,06	4,01±0,08	2,84±0,08
	2017	4,70±0,25	2,71±0,11	14,23±0,82	0,96±0,05	2,27±0,05	4,50±0,12	3,43±0,17
‘Τρίλοφο’	2014	3,80±0,10	2,50±0,19	10,20±0,82	0,80±0,02	2,01±0,05	3,84±0,17	2,84±0,11
	2017	6,18±0,14	2,50±0,23	10,47±0,62	1,01±0,05	2,05±0,06	4,29±0,20	3,18±0,09

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέση τιμή±τυπικό σφάλμα

4.5.4. Στατιστική ανάλυση - Ταξινόμηση πληθυσμών

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για την αξιολόγηση των κύριων πηγών της ποικιλομορφίας που εμφανίζουν οι τριάντα τέσσερις πληθυσμοί του φυτού γαϊδουράγκαθο που μελετήθηκαν (Πίνακας 4.6). Η χρήση της παραγοντικής ανάλυσης ως αποδεκτής στατιστικής μεθόδου για την ανάλυση των δεδομένων μας επιβεβαιώθηκε από τον δείκτη Kaiser-Meyer-Olkin ο οποίος ήταν 0,734 και τον έλεγχο σφαιρικότητας του Bartlett που απόρριψε τη μηδενική υπόθεση ότι ο πίνακας συσχετίσεων είναι ταυτοτικός, ενώ και η συμμετοχικότητα (communality) κάθε μεταβλητής ήταν ικανοποιητική (>0,6).

Πίνακας 4.6. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) ανάμεσα σε χαρακτηριστικά των πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

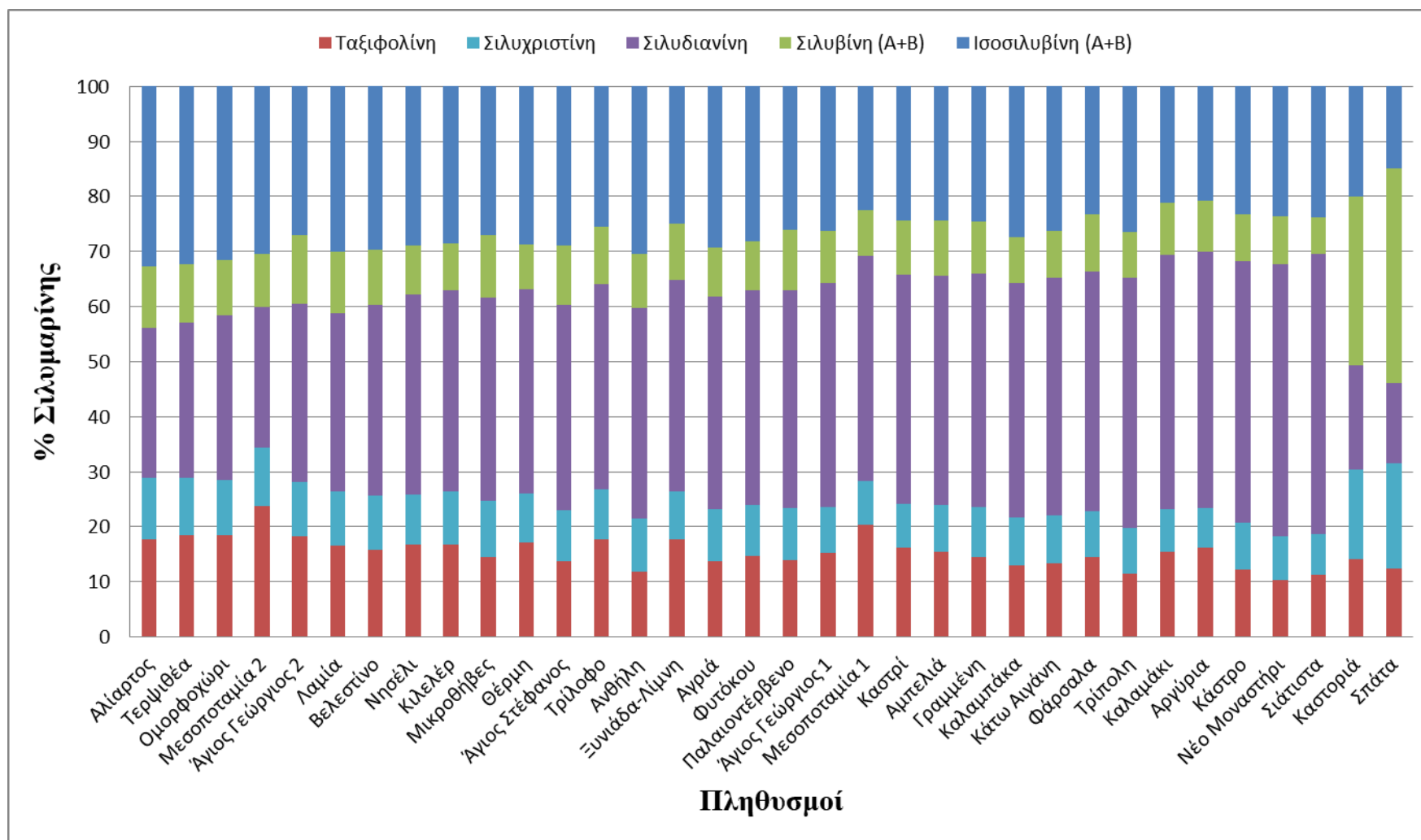
Μεταβλητές	PC1	PC2	PC3
Ταξιφολίνη	0,714	-0,191	-0,246
Σιλυχριστίνη	0,968	-0,169	-0,040
Σιλυβίνη Α	0,937	-0,298	-0,011
Σιλυβίνη Β	0,955	-0,228	-0,023
Ισοσιλυβίνη Α	0,848	0,454	-0,174
Ισοσιλυβίνη Β	0,277	0,884	-0,260
Περιεκτικότητα σε έλαιο	0,368	0,514	0,602
Βάρος 1000 σπόρων	0,294	-0,075	0,833
Ιδιοτιμές (Eigenvalues)	4,256	1,463	1,217
Ποσοστό συνεισφοράς συνιστώσας στην ολική διακύμανση (%)	53,19	18,29	15,21
Αθροιστικό ποσοστό συνεισφοράς στην ολική διακύμανση (%)	53,19	71,48	86,69

Η ανάλυση PCA έδειξε ότι τρεις συνιστώσες (PC) με ιδιοτιμή μεγαλύτερη της μονάδας (Eigenvalue>1) συνεισέφεραν το 86,69% της ολικής διακύμανσης, με τις PC1 και PC2 να αντιπροσωπεύουν το 71,48% της παρατηρούμενης διακύμανσης. Η πρώτη κύρια συνιστώσα ερμήνευσε το 53,19% της ολικής διακύμανσης, ενώ οι μεταβλητές που συνέβαλαν στη διαμόρφωσή της ήταν η ταξιφολίνη, η σιλυχριστίνη,

η σιλυβίνη Α, η σιλυβίνη Β και η ισοσιλυβίνη Α. Η ισοσιλυβίνη Β, η περιεκτικότητα σε έλαιο και η ισοσιλυβίνη Α συσχετίζονταν με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC2, 18,29%), ενώ το βάρος των 1000 σπόρων και η περιεκτικότητα σε έλαιο συσχετίστηκε με την τρίτη κύρια συνιστώσα (PC3, 15,21%).

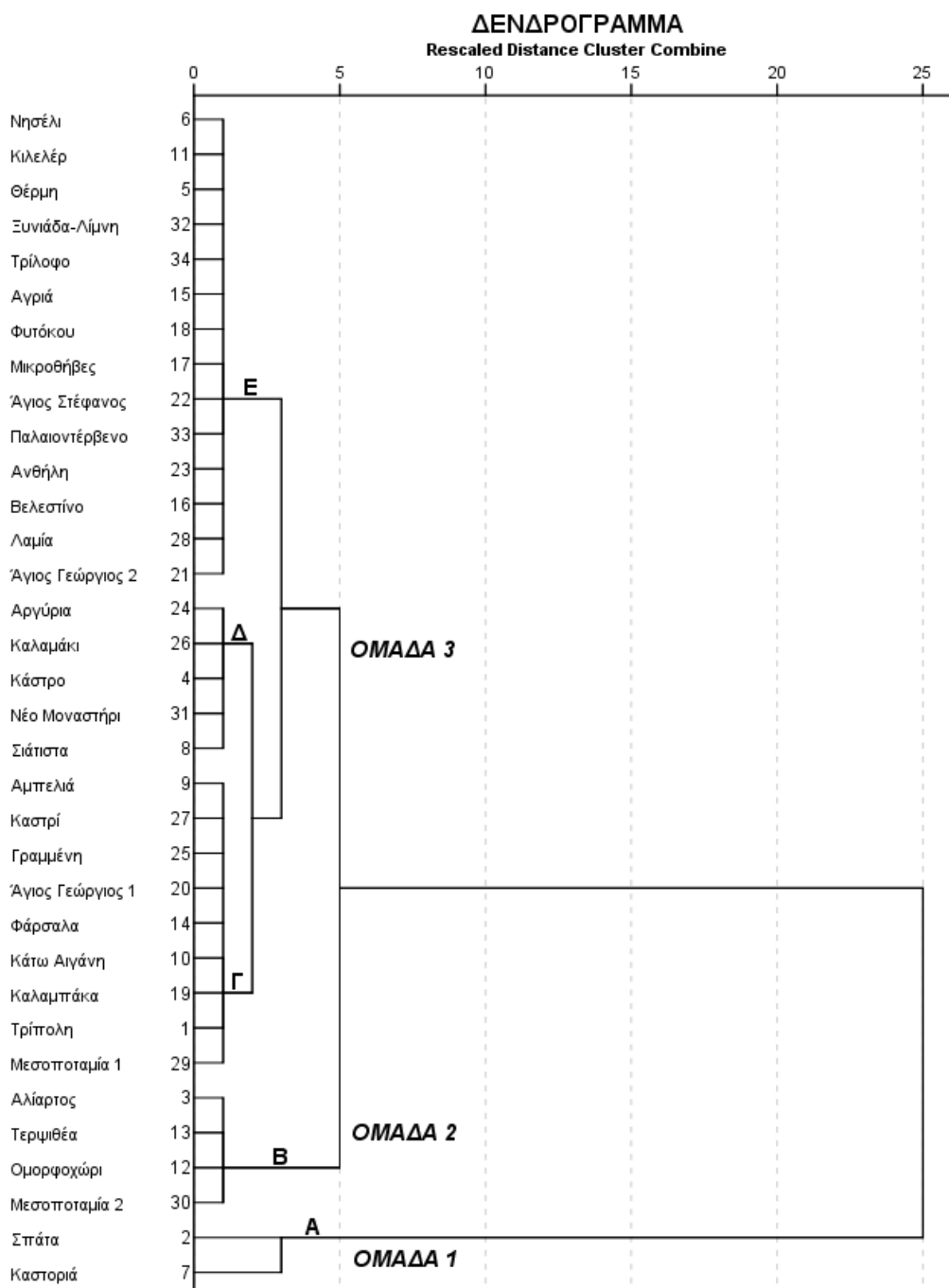
Οι ποσότητες των κύριων συστατικών της σιλυμαρίνης παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 4.1, ως ποσοστό της συνολικής ποσότητας της σιλυμαρίνης. Ο μέσος όρος του ποσοστού της ταξιφολίνης ήταν 15,42% και η σχετική τυπική απόκλιση (CV) ήταν 18,2%, ενώ η υψηλότερη τιμή καταγράφηκε στους πληθυσμούς ‘Μεσοποταμία 2’ (23,78%) και ‘Μεσοποταμία 1’ (20,34%). Το ποσοστό της σιλυχριστίνης κυμάνθηκε από 7,08% (‘Αργύρια’) έως 19,19% (‘Σπάτα’). Ο μέσος όρος του ποσοστού της σιλυχριστίνης ήταν 9,54% και η σχετική τυπική απόκλιση ήταν 24,3%, ενώ για την σιλυβίνη (Α+Β) ήταν 11,07% (CV=56,0%). Το ποσοστό της σιλυβίνης (Α και Β) κυμάνθηκε μεταξύ 6,52 και 38,87%, με το μεγαλύτερο ποσοστό να παρατηρείται στους πληθυσμούς που προέρχονταν από τα Σπάτα (38,87%) και την Καστοριά (30,57%). Όσον αφορά το ποσοστό της σιλυδιανίνης (μαζί με την ισοσιλυχριστίνη), η μέση τιμή ήταν 37,70%, με σχετική τυπικά απόκλιση 21,4%. Το υψηλότερο ποσοστό καταγράφηκε στους πληθυσμούς από τη Σιάτιστα (50,87%) και το Νέο Μοναστήρι (49,39%), ενώ το χαμηλότερο καταγράφηκε στους πληθυσμούς από τα Σπάτα (14,58%) και την Καστοριά (18,92%). Ο μέσος όρος του ποσοστού της ισοσιλυβίνης (Α και Β) ήταν 26,27% (CV=14,6%). Το υψηλότερο ποσοστό καταγράφηκε στους πληθυσμούς ‘Αλιάρτος’ (32,67%) και ‘Τερψιθέα’ (32,32%), ενώ το χαμηλότερο παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς ‘Σπάτα’ (14,96%) και ‘Καστοριά’ (20,01%).

Η ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες έγινε με το μοντέλο διασύνδεσης της ιεραρχικής ταξιδόμησης και με τη μέθοδο της συσσωρευτικής (agglomerative) ταξιδόμησης (Διάγραμμα 4.2). Ως συντελεστής ομοιότητας των πληθυσμών επιλέχθηκε η τετραγωνική Ευκλείδεια απόσταση και οι πληθυσμοί υποβλήθηκαν στην ανάλυση ταξιδόμησης με την τεχνική της μέσης διασύνδεσης. Οι τριάντα τέσσερις πληθυσμοί γαϊδουράγκαθου, βάση της κατανομής των συστατικών της σιλυμαρίνης, διευθετήθηκαν σε τρεις ομάδες (5 συστάδες), με τους πληθυσμούς της ομάδας 1 να διαχωρίζονται πλήρως από τους υπόλοιπους.



Διάγραμμα 4.1. Περιεκτικότητα κύριων συστατικών στη σιλυμαρίνη (%) σε πληθυσμούς του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Η ομάδα 1 (συστάδα Α) περιλάμβανε τους πληθυσμούς από τα Σπάτα και την Καστοριά που έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε σιλυχριστίνη και σιλυβίνη (Α και Β) από τους υπόλοιπους πληθυσμούς. Η ομάδα 2 (συστάδα Β) περιλάμβανε τους πληθυσμούς από την Αλίαρτο, την Τερψιθέα, το Ομορφοχώρι και τη Μεσοποταμία 2 που είχαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε ισοσιλυβίνη (Α και Β) και ταξιφολίνη.



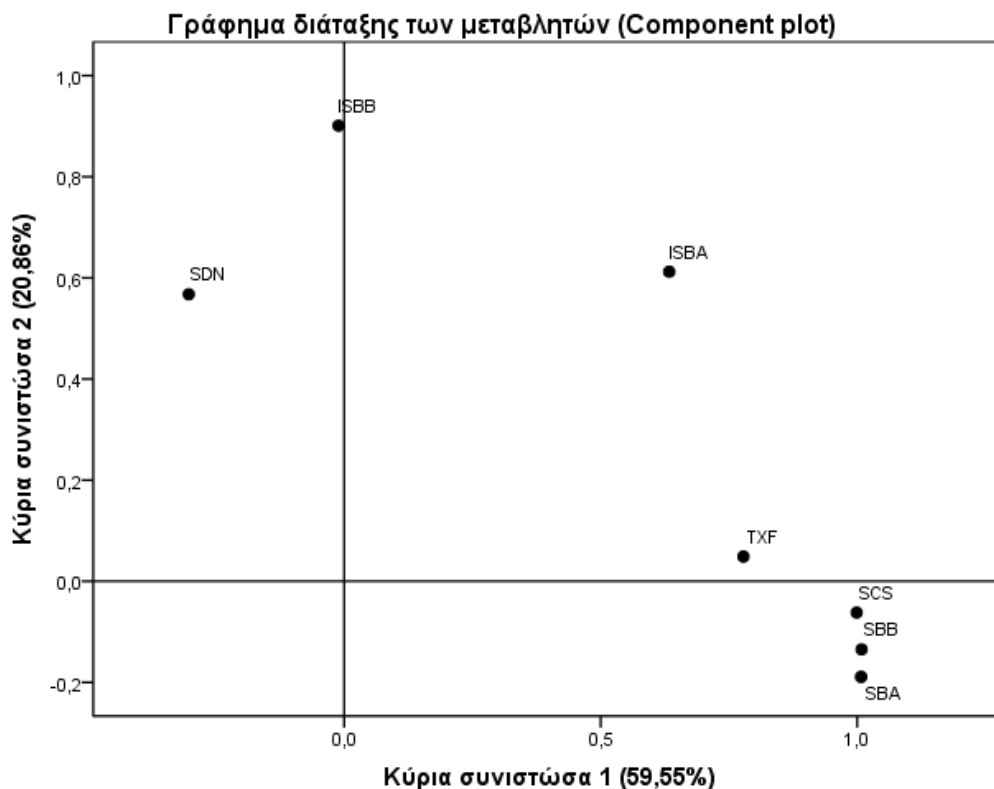
Διάγραμμα 4.2. Δενδρόγραμμα ταξιδόμησης 34 πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn με βάση την κατανομή των συστατικών της σιλυμαρίνης, με την τεχνική της μέσης διασύνδεσης και τετραγωνική Ευκλείδεια απόσταση ομοιότητας.

Τέλος, η ομάδα 3 περιλάμβανε συστάδες με ποικίλα χαρακτηριστικά, όπως μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε σιλυδιανίνη (συστάδα Δ), μεγαλύτερο άθροισμα ταξιφολίνης και σιλυδιανίνης (συστάδα Γ) και μεγαλύτερο άθροισμα σιλυβίνης και ισοσιλυβίνης (συστάδα Ε).

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) που έγινε για να εξεταστεί η συμβολή των κύριων συστατικών της σιλυμαρίνης στη συνολική ποικιλομορφία κρίθηκε αποδεκτή ως στατιστική μέθοδος για την ανάλυση των δεδομένων μας, δεδομένου ότι ο δείκτης Kaiser-Meyer-Olkin ήταν 0,701 και ο έλεγχος σφαιρικότητας του Bartlett απόρριψε τη μηδενική υπόθεση ότι ο πίνακας συσχετίσεων είναι ταυτοτικός. Η ανάλυση έδειξε ότι δύο συνιστώσες με ιδιοτιμή μεγαλύτερη της μονάδας (Eigenvalue>1) συνεισέφεραν το 80,41% της ολικής διακύμανσης, με την πρώτη κύρια συνιστώσα να ερμηνεύει το 59,55% της ολικής διακύμανσης (Πίνακας 4.7). Οι μεταβλητές που συνέβαλαν στη διαμόρφωσή της συνιστώσας αυτής ήταν η ταξιφολίνη, η σιλυχριστίνη, η σιλυβίνη Α, η σιλυβίνη Β και η ισοσιλυβίνη Α, ενώ με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα συσχετιζόνταν η ισοσιλυβίνη Β και η σιλυδιανίνη. Με τη μέθοδο περιστροφής Promax που χρησιμοποιήσαμε έγινε διακριτή η συσχέτιση των μεταβλητών με τις κύριες συνιστώσες (Διάγραμμα 4.3).

Πίνακας 4.7. Ανάλυση κύριων συνιστωσών ανάμεσα στα συστατικά της σιλυμαρίνης των πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Μεταβλητές	PC1	PC2
Ταξιφολίνη	0,791	-0,018
Σιλυχριστίνη	0,976	-0,142
Σιλυδιανίνη	-0,121	0,563
Σιλυβίνη Α	0,944	-0,263
Σιλυβίνη Β	0,962	-0,211
Ισοσιλυβίνη Α	0,827	0,528
Ισοσιλυβίνη Β	0,276	0,855
Ιδιοτιμές (Eigenvalues)	4,168	1,461
Ποσοστό συνεισφοράς συνιστώσας στην ολική διακύμανση (%)	59,55	20,86
Αθροιστικό ποσοστό συνεισφοράς στην ολική διακύμανση (%)	59,55	80,41



Διάγραμμα 4.3. Γράφημα διάταξης μεταβλητών σε ανάλυση κύριων συνιστωσών ανάμεσα στα συστατικά της σιλυμαρίνης των πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

4.5.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – Ολικά φαινολικά

Η ικανότητα εκκαθάρισης των ριζών DDPH^{*} από τα εκχυλίσματα των σπόρων του φυτού κυμάνθηκε από 2866 έως 4239 μmol ασκορβικού οξέος ανά 100 g ξηρού βάρους και η σχετική τυπική απόκλιση (CV) ήταν 9,6% (Πίνακας 4.8). Η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα καταγράφηκε στους πληθυσμούς ‘Αργύρια’, ‘Μεσοποταμία 1’ (Έτος 2017) και ‘Ξυνιάδα-Λίμνη’ (Έτος 2017), ενώ η χαμηλότερη στους πληθυσμούς ‘Ανθήλη’ και ‘Άγιο Γεώργιο 1’ (Έτος 2015). Το ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό των εκχυλισμάτων των σπόρων που προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου FRAP κυμάνθηκε μεταξύ 7339 και 12417 μmol ασκορβικού οξέος ανά 100 g ξηρού βάρους (CV=13,8%). Η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα καταγράφηκε στους πληθυσμούς ‘Αργύρια’, ‘Μεσοποταμία 1’ (Έτος 2017) και ‘Άγιος Στέφανος’ (Έτος 2017), ενώ η χαμηλότερη στους πληθυσμούς ‘Κιλελέρ’ (Έτος 2015) και ‘Ανθήλη’.

Πίνακας 4.8. Αντιοξειδωτική ικανότητα και περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά (TPC) εκχυλισμάτων σπόρων από πληθυσμούς του φυτού *Silybum marianum*. DPPH/FRAP: μmol ασκορβικού οξέος/100g dw, TPC: mg γαλλικού οξέος/100g. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα.

Πληθυσμός	Έτος	DPPH	FRAP	TPC	Πληθυσμός	Έτος	DPPH	FRAP	TPC
‘Τρίπολη’	2016	3683 \pm 66	10746 \pm 129	2620 \pm 40	‘Άγιος Γεώργιος 1’	2015	2897 \pm 81	8292 \pm 237	1687 \pm 18
‘Σπάτα’	2015	3623 \pm 70	10513 \pm 525	2812 \pm 77		2017	4005 \pm 101	10759 \pm 269	2885 \pm 37
	2016	3999 \pm 95	11699 \pm 222	3075 \pm 46	‘Άγιος Γεώργιος 2’	2017	3790 \pm 81	10159 \pm 108	2706 \pm 41
‘Αλίαρτος’	2015	3460 \pm 77	8579 \pm 136	2649 \pm 39	‘Άγιος Στέφανος’	2015	3182 \pm 82	8657 \pm 317	2268 \pm 42
‘Κάστρο’	2014	3095 \pm 85	9610 \pm 232	2406 \pm 48		2017	4015 \pm 48	12039 \pm 168	2889 \pm 27
‘Θέρμη’	2016	3369 \pm 87	8527 \pm 139	2311 \pm 38	‘Ανθήλη’	2015	2866 \pm 49	7443 \pm 107	1971 \pm 34
‘Νησέλι’	2016	3680 \pm 81	10328 \pm 188	2797 \pm 46	‘Αργύρια’	2017	4239 \pm 65	12417 \pm 189	3075 \pm 48
‘Καστοριά’	2016	3269 \pm 50	10720 \pm 187	2952 \pm 37	‘Γραμμένη’	2014	3663 \pm 77	9885 \pm 247	2361 \pm 19
‘Σιάτιστα’	2016	3305 \pm 88	9206 \pm 242	2242 \pm 45	‘Καλαμάκι’	2017	3961 \pm 36	11699 \pm 119	2990 \pm 62
‘Αμπελιά’	2014	3333 \pm 83	8122 \pm 120	2015 \pm 56	‘Καστρί’	2014	3940 \pm 36	9937 \pm 418	2795 \pm 79
	2017	3772 \pm 133	11322 \pm 605	2527 \pm 31		2017	3715 \pm 64	9584 \pm 148	2808 \pm 54
‘Κάτω Αιγάνη’	2016	3670 \pm 68	10603 \pm 142	2736 \pm 17	‘Λαμία’	2015	3543 \pm 45	9127 \pm 135	2438 \pm 32
‘Κιλελέρ’	2015	3261 \pm 78	7339 \pm 92	2124 \pm 68		2017	3896 \pm 90	10446 \pm 342	2353 \pm 52
	2016	3141 \pm 48	8370 \pm 139	2084 \pm 31	2014	3489 \pm 115	8579 \pm 94	2771 \pm 43	
‘Όμορφοχώρι’	2015	3237 \pm 139	8671 \pm 206	2450 \pm 74	‘Μεσοποταμία 1’	2015	3391 \pm 64	8827 \pm 175	2312 \pm 40
‘Τερψιθέα’	2015	3298 \pm 62	8697 \pm 181	2885 \pm 60		2017	4078 \pm 74	12039 \pm 166	2784 \pm 60
‘Φάρσαλα’	2017	3700 \pm 81	10668 \pm 222	2674 \pm 41	‘Μεσοποταμία 2’	2015	3441 \pm 74	8553 \pm 124	2264 \pm 50
‘Άγρια’	2016	3579 \pm 160	9728 \pm 359	2442 \pm 26	‘Νέο Μοναστήρι’	2014	3434 \pm 53	9023 \pm 276	2223 \pm 24
‘Βελεστίνο’	2014	3563 \pm 78	8152 \pm 715	2166 \pm 47		2017	3700 \pm 142	11033 \pm 230	2889 \pm 37
	2015	3196 \pm 61	8161 \pm 119	2211 \pm 36	‘Ξυνιάδα-Λίμνη’	2014	3264 \pm 61	8711 \pm 113	2227 \pm 34
‘Μικροθήβες’	2014	2939 \pm 46	9323 \pm 199	2536 \pm 68		2017	4059 \pm 75	11277 \pm 75	2709 \pm 50
	2017	3646 \pm 44	10472 \pm 274	2613 \pm 22	‘Παλιοντέρβενο’	2014	3154 \pm 114	8814 \pm 175	2393 \pm 65
‘Φυτόκου’	2015	3242 \pm 103	7796 \pm 75	2381 \pm 35		2017	3752 \pm 126	11033 \pm 159	2280 \pm 34
‘Καλαμπάκα’	2015	3093 \pm 53	7966 \pm 118	2134 \pm 35	‘Τρίλοφο’	2014	3302 \pm 48	8396 \pm 114	1809 \pm 45
‘Άγιος Γεώργιος 1’	2014	3505 \pm 55	8605 \pm 97	2479 \pm 26		2017	4024 \pm 83	10942 \pm 344	2803 \pm 41

Τα ολικά φαινολικά που προσδιορίστηκαν με τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu στα εκχυλίσματα των σπόρων κυμάνθηκαν από 1687 έως 3075 mg γαλλικού οξέος ανά 100 g ξηρού βάρους. Οι υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν στους πληθυσμούς ‘Αργύρια’, ‘Σπάτα’ (Έτος 2016), ‘Καλαμάκι’ και ‘Καστοριά’. Οι χαμηλότερες τιμές καταγράφηκαν στους πληθυσμούς ‘Άγιος Γεώργιος 1’ (Έτος 2015), ‘Τρίλοφο’ (Έτος 2014) και ‘Ανθήλη’.

4.6. Συζήτηση

4.6.1. Μορφολογία φυτών και σπόρων

Η μελέτη των τριάντα τεσσάρων πληθυσμών γαϊδουράγκαθου έδειξε μία σχετικά μικρή παραλλακτικότητα στα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Τα ποικιλόχρωμα φύλλα και τα μωβ άνθη ήταν χαρακτηριστικά σε όλους τους πληθυσμούς. Πρόσφατα, οι Martinelli *et al.* (2016) μελετώντας 26 δείγματα πληθυσμών γαϊδουράγκαθου από διάφορες χώρες παρατήρησαν ότι σε τρία από αυτά υπήρχαν φυτά με μη ποικιλόχρωμα φύλλα, ενώ σε έναν πληθυσμό υπήρχαν κάποια φυτά με λευκά άνθη. Σε έρευνα που διεξήγαγαν στην Αίγυπτο οι AbouZid *et al.* (2016a) σε γηγενείς πληθυσμούς γαϊδουράγκαθου διαπίστωσαν ότι το μωβ χρώμα ήταν κυρίαρχο έναντι του λευκού στις ταξιανθίες των φυτών.

Όσον αφορά το χρώμα των σπόρων, η πλειονότητα των πληθυσμών του γαϊδουράγκαθου που μελετήθηκαν αποτελούνταν από φυτά με καφέ σπόρους, ενώ μόνο οι πληθυσμοί ‘Μεσοποταμία 1’ και ‘Σπάτα’ είχαν σπόρους μαύρου χρώματος. Πληθυσμοί του φυτού που μελετήθηκαν στην Αίγυπτο ταξινομήθηκαν ως προς το χρώμα των σπόρων σε τρεις κατηγορίες: φυτά με καφέ, μαύρους ή κρεμ σπόρους (AbouZid *et al.*, 2016a). Όσον αφορά το μέγεθος των σπόρων, ο μέσος όρος του βάρους των 1000 σπόρων ήταν 20,29 g και η σχετική τυπική απόκλιση ήταν 11,2%. Η σχετικά μικρή τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης υποδηλώνει ότι για αυτό το χαρακτηριστικό δεν είναι διαθέσιμη μια ευρεία γενετική ποικιλότητα. Σε πρόσφατη μελέτη, οι Martinelli *et al.* (2016) παρατήρησαν ότι ο μέσος όρος του βάρους των 1000 σπόρων ήταν 24,51 g και η σχετική τυπική απόκλιση ήταν 9,6%, ενώ όπως έχουμε αναφέρει το βάρος των 1000 σπόρων, σε διάφορες μελέτες, κυμαίνεται από 13,9 έως 32,9 g (Andrzejewska & Sadowska, 2008; Rahimi & Kamali, 2012).

4.6.2. Περιεκτικότητα σε έλαιο και σιλυμαρίνη

Δεδομένου ότι το γαϊδουράγκαθο καλλιεργείται κυρίως για την παραγωγή σιλυμαρίνης, η αξιολόγηση των υφιστάμενων επιπέδων ποικιλότητας της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη των πληθυσμών του γαϊδουράγκαθου που φύονται στην Ελλάδα είναι το πρώτο βήμα για τη χρήση αυτών των πληθυσμών σε μελλοντικά προγράμματα αναπαραγωγής (βελτίωσης του είδους). Η μελέτη αυτών των πληθυσμών αποκάλυψε μια σχετικά μεγάλη διακύμανση της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη ($CV=27,4\%$). Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε από 2,31 έως 7,71%, ενώ μόνο τέσσερις πληθυσμοί είχαν τιμές μεγαλύτερες του 4%. Σε παρόμοιες μελέτες η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμαινόταν μεταξύ 1,03 και 4,27% στη Νέα Ζηλανδία, μεταξύ 0,69 και 2,71% στο Ιράν, μεταξύ 2,00 και 3,56% στην Ινδία και μεταξύ 1,89 και 2,76% σε μία εμπορική ποικιλία στην Πολωνία (Martin *et al.*, 2006; Hasanloo *et al.*, 2005; Ram *et al.*, 2005; Andrzejewska *et al.*, 2011). Στην Αίγυπτο ο μέσος όρος της περιεκτικότητας των σπόρων σε σιλυμαρίνη ήταν 3,79% (Omar *et al.*, 2012).

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι στην έρευνά μας αρκετοί πληθυσμοί γαϊδουράγκαθου εμφάνισαν διαφορές στην περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη μεταξύ των ετών, όπως ο πληθυσμός 'Ξυνιάδα-Λίμνη' (2,36% το 2014 και 3,24% το 2017) και ο πληθυσμός 'Άγιος Γεώργιος 1' (2,72% το 2014, 2,97% το 2015 και 3,23% το 2017), ενώ σε άλλους η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη παρέμεινε σχετικά σταθερή, όπως στον πληθυσμό 'Μεσοποταμία 1' (3,62% το 2014, 3,50% το 2015 και 3,35% το 2017) και στον πληθυσμό 'Νέο Μοναστήρι' (3,32% το 2014 και 3,36% το 2017). Σε μελέτη τους οι Martin *et al.* (2006) ανέφεραν σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη μεταξύ των ετών. Οι παρατηρούμενες διαφορές στην περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη για τους ίδιους πληθυσμούς κατά την περίοδο έρευνας είναι πιθανό να οφειλόταν κυρίως στις καιρικές συνθήκες. Αρκετοί ερευνητές ανέφεραν ότι η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη επηρεάζεται από τις καιρικές συνθήκες (Carrier *et al.*, 2003; Andrzejewska & Sadowska, 2008; Alemardan *et al.*, 2013).

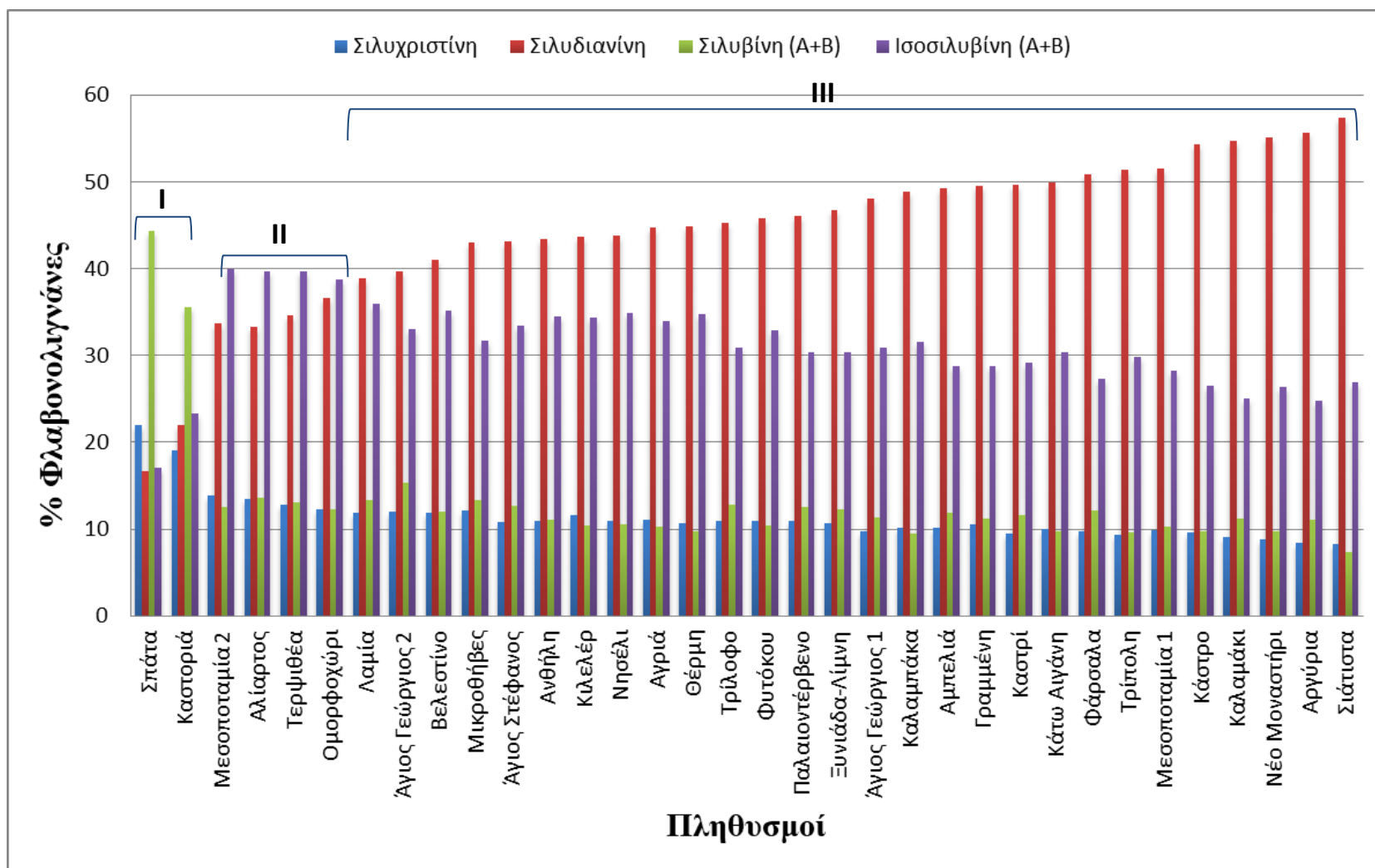
Αν και το γαϊδουράγκαθο καλλιεργείται κυρίως για παραγωγή σιλυμαρίνης, μπορεί να καλλιεργηθεί και για την παραγωγή ελαίου από τους σπόρους του (Meddeb *et al.*, 2017). Στην παρούσα έρευνα, η περιεκτικότητα σε έλαιο κυμάνθηκε μεταξύ 24,49 και 31,10%, ενώ η σχετική τυπική απόκλιση ήταν 5,6%. Σε παρόμοια έρευνα η

περιεκτικότητα σε έλαιο σε διάφορους πληθυσμούς γαϊδουράγκαθου που προέρχονταν από την Ιταλία και άλλες χώρες κυμάνθηκε από 26,68 έως 31,74%, με σχετική τυπική απόκλιση 6,0% (Martinelli *et al.*, 2016). Σε ψυχρότερα κλίματα η περιεκτικότητα των σπόρων σε έλαιο είναι συχνά χαμηλότερη (19,2% έως 23,7% στην Πολωνία και 17,5% έως 21,6% στην Τσεχία) από την περιεκτικότητα στην περιοχή της Μεσογείου (Andrzejewska *et al.*, 2011; Růžičková *et al.*, 2011). Η περιεκτικότητα σε έλαιο βρέθηκε να έχει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με το βάρος των 1000 σπόρων ($r=0,42$, $p<0,01$, Πίνακας 4.9). Σε αντίθεση, οι Martinelli *et al.* (2016) δεν διαπίστωσαν συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε έλαιο και του βάρους των 1000 σπόρων.

4.6.3. Περιεκτικότητα σε συστατικά της σιλυμαρίνης

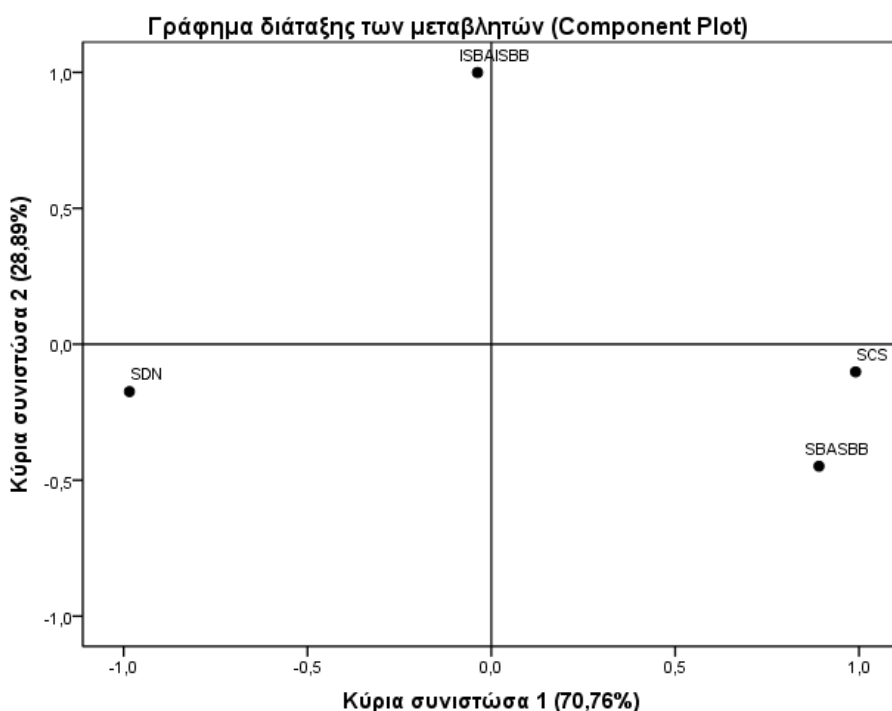
Για να συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας με αυτά άλλων ερευνητών υπολογίστηκε η σχετική περιεκτικότητα των διαφόρων φλαβονολιγνανών (Διάγραμμα 4.4), δηλαδή της σιλυχριστίνης, της σιλυδιανίνης, της σιλυβίνης (Α και Β) και της ισοσιλυβίνης (Α και Β). Η περιεκτικότητα κατά μέσο όρο των φλαβονολιγνανών ήταν 11,29% σιλυχριστίνη (SCS), 44,5% σιλυδιανίνη (SDN), 13,1% σιλυβίνη (SB) και 31,2% ισοσιλυβίνη (ISB). Η αναλογία αυτή των φλαβονολιγνανών διαφέρει από αυτές που έχουν αναφέρει άλλοι ερευνητές όπως οι Andrzejewska *et al.* (2011) για την Πολωνία (33,9% SCS, 15,1% SDN, 39,0% SB και 11,9% ISB), οι Elwekeel *et al.* (2013) για την Αίγυπτο (8,3% SCS, 30,4% SDN, 45,6% SB και 15,7% ISB), οι Martin *et al.* (2006) για τη Νέα Ζηλανδία (24,3% SCS A, 3,9% SCS B, 0,0% SDN, 59,0% SB και 10,4% ISB) και οι Martinelli *et al.* (2016) για είκοσι έξι πληθυσμούς από διάφορες χώρες (12,6% SCS, 51,6% SDN, 22,6% SB και 13,2% ISB).

Οι πληθυσμοί που προέρχονταν από τα Σπάτα και την Καστοριά είχαν παρόμοια σύσταση φλαβονολιγνανών και τελείως διαφορετική από τους άλλους πληθυσμούς [τύπος Ι]. Η περιεκτικότητα σε σιλυχριστίνη ήταν περίπου 20%, η υψηλότερη μεταξύ όλων των πληθυσμών, ενώ η περιεκτικότητα σε σιλυδιανίνη και σε ισοσιλυβίνη ήταν από 17 έως 23% για το κάθε συστατικό, η χαμηλότερη μεταξύ όλων των πληθυσμών. Η κυρίαρχη φλαβονολιγνάνη ήταν η σιλυβίνη με περιεκτικότητα 44,4% για τον πληθυσμό 'Σπάτα' και 35,6% για τον πληθυσμό 'Καστοριά'.

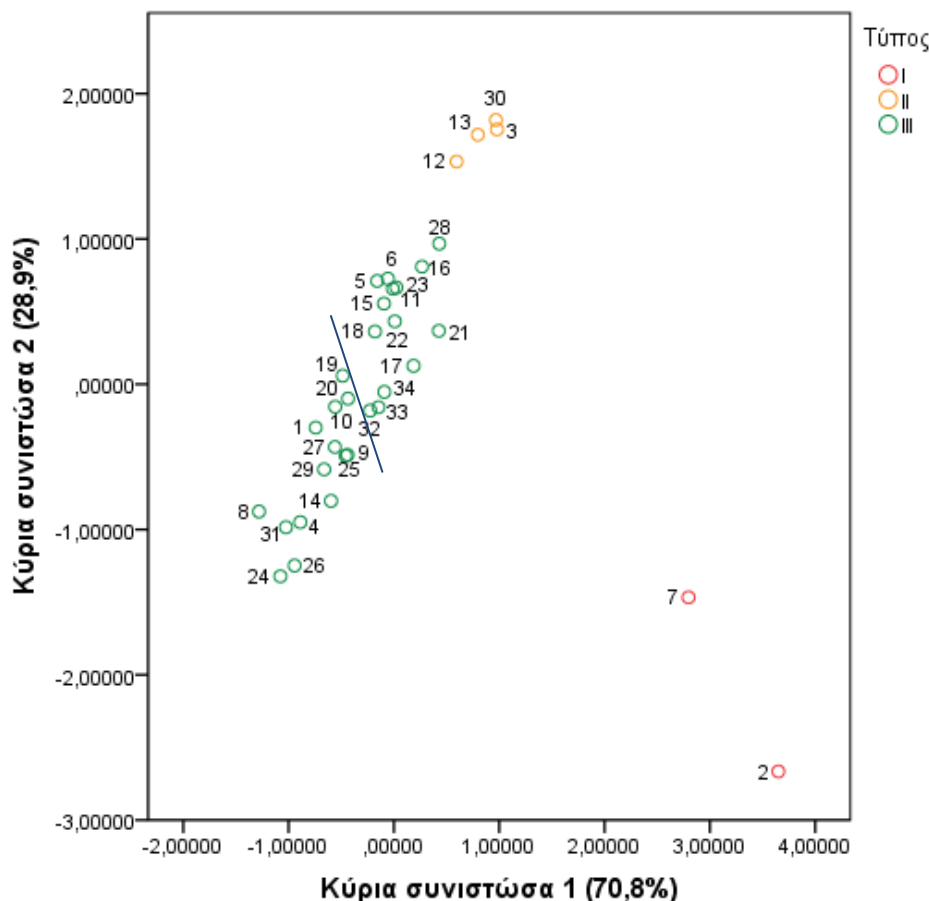


Διάγραμμα 4.4. Σύσταση φλαβονολιγνάνων (%) στους πληθυσμούς του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Στους πληθυσμούς ‘Μεσοποταμία 2’, ‘Αλίαρτο’, ‘Τερψιθέα’ και ‘Ομορφοχώρι’ παρατηρήθηκε κυριαρχία της ισοσιλβίνης, με ποσοστό 39-40% της συνολικής περιεκτικότητας. Η περιεκτικότητα σε σιλυχριστίνη και σε σιλυβίνη ήταν περίπου 12-14% για το κάθε συστατικό, ενώ το ποσοστό της σιλυδιανίνης ήταν από 33 έως 37% [τύπος III]. Σε όλους τους άλλους πληθυσμούς, το κυρίαρχο ισομερές ήταν η σιλυδιανίνη με περιεκτικότητα που κυμαινόταν μεταξύ 39 και 57% της συνολικής περιεκτικότητας σε φλαβονολιγνάνες [τύπος III]. Το ποσοστό της σιλυχριστίνης ήταν μεταξύ 8-12%, της σιλυβίνης ήταν από 7 έως 15% και της ισοσιλβίνης ήταν μεταξύ 25 και 36%. Όπως προκύπτει από τις παρατηρήσεις μας και από την ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες που έγινε, στον τύπο III των πληθυσμών μπορούμε να διακρίνουμε δύο ίσες υποομάδες, με τη μία να έχει μεγαλύτερα ποσοστά σε σιλυδιανίνη και μικρότερα σε ισοσιλβίνη και σιλυχριστίνη σε σχέση με την άλλη. Ο διαχωρισμός των πληθυσμών που μελετήθηκαν σε τρεις τύπους, ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε φλαβονολιγνάνες, επιβεβαιώνεται και από την ανάλυση κύριων συνιστωσών που έγινε για να εξεταστεί η συμβολή των φλαβονολιγνάνων στην ποικιλομορφία των πληθυσμών (Διαγράμματα 4.5 και 4.6).



Διάγραμμα 4.5. Γράφημα διάταξης μεταβλητών σε ανάλυση κύριων συνιστωσών ανάμεσα στις φλαβονολιγνάνες της σιλυμαρίνης των πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.



Διάγραμμα 4.6. Κατανομή, με βάση την ανάλυση κύριων συνιστωσών ανάμεσα στις φλαβονολιγνάνες της σιλυμαρίνης, των πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Οι τρεις χημειότυποι στους οποίους κατατάξαμε τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν είναι διαφορετικοί από αυτούς που περιγράφονται από τους Martinelli *et al.* (2016) και από τους Poppe και Petersen (2016). Αν και βρέθηκαν ορισμένες ομοιότητες μεταξύ του τύπου I, του χημειότυπου C από τη μελέτη των Martinelli *et al.* (2016) και του τύπου III όπως περιγράφεται από τους Poppe και Petersen (2016), η περιεκτικότητα σε σιλυδιανίνη ήταν διαφορετική (περίπου 20% στον τύπο I, 30-45% στον χημειότυπο C και περίπου 40% στον τύπο III).

Στα ευρήματά μας και σε αντίθεση με άλλες μελέτες (Martin *et al.*, 2006; Martinelli *et al.*, 2016; Poppe & Petersen, 2016), δεν υπήρχαν πληθυσμοί με περιεκτικότητα σε σιλυδιανίνη κάτω από 15% ή πάνω από 60% της συνολικής περιεκτικότητας σε φλαβονολιγνάνες. Το κύριο χαρακτηριστικό όλων των πληθυσμών, εκτός εκείνων από τα Σπάτα και την Καστοριά, ήταν η σημαντική περιεκτικότητα σε ισοσιλβίνη (A και B), με τιμές μεταξύ 25 και 40% της συνολικής

περιεκτικότητας σε φλαβονολιγνάνες στη σιλυμαρίνη. Η ισοσιλβίνη A ήταν κατά μέσο όρο 25% περισσότερη από την ισοσιλβίνη B. Αν και η βιολογική δραστηριότητα της σιλυμαρίνης συχνά αποδίδεται στη σιλυβίνη A και στη σιλυβίνη B (Chambers *et al.*, 2017), μελέτες υποστηρίζουν τη συμβολή και άλλων φλαβονολιγνάνων στις ευεργετικές επιδράσεις της σιλυμαρίνης. Σύμφωνα με τους Deerp *et al.* (2008b), η ισοσιλβίνη B είναι μία πολύτιμη βιοδραστική ουσία κατά του καρκίνου του προστάτη, ενώ οι Davis-Searles *et al.* (2005) αναγνώρισαν τον σημαντικό ρόλο των ισοσιλβινών A και B ως αναστολέων της ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης (Pearson, r) έδειξαν ότι η ταξιφολίνη, η σιλυχριστίνη, η σιλυβίνη (A και B) και η ισοσιλβίνη A είχαν στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με τη σιλυμαρίνη (Πίνακας 4.9). Στη μελέτη τους οι Martinelli *et al.* (2016) ανέφεραν ότι η συνολική περιεκτικότητα σιλυμαρίνης παρουσίασε θετική συσχέτιση με την ταξιφολίνη και την ισοσιλβίνη A. Ανάμεσα στα συστατικά της σιλυμαρίνης, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ισχυρές θετικές συσχετίσεις μεταξύ της σιλυχριστίνης και της ταξιφολίνης ($r=0,633$, $p<0,001$), της σιλυβίνης A ($r=0,986$, $p<0,001$), της σιλυβίνης B ($r=0,995$, $p<0,001$) και της ισοσιλβίνης A ($r=0,743$, $p<0,001$). Ακόμη, η σιλυβίνη A είχε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την ταξιφολίνη ($r=0,623$, $p<0,001$), τη σιλυβίνη B ($r=0,996$, $p<0,001$) και την ισοσιλβίνη A ($r=0,656$, $p<0,001$). Τέλος, η σιλυβίνη B είχε ισχυρή θετική συσχέτιση τόσο με την ταξιφολίνη ($r=0,620$, $p<0,001$) όσο και με την ισοσιλβίνη A ($r=0,703$, $p<0,001$), ενώ ισχυρή θετική συσχέτιση παρουσίασε η ισοσιλβίνη A με την ταξιφολίνη και την ισοσιλβίνη B. Η μελέτη των πληθυσμών έδειξε επίσης ότι η αναλογία των φλαβονολιγνάνων στη σιλυμαρίνη σε διαφορετικά έτη δεν άλλαξε σημαντικά, υποδεικνύοντας ότι η σύνθεση της σιλυμαρίνης είναι σε μεγάλο βαθμό υπό γενετικό έλεγχο, όπως αναφέρθηκε και από τους Martin *et al.* (2006) και τους Andrzejewska και Sadowska (2008). Για παράδειγμα στον πληθυσμό ‘Καστρί’ το ποσοστό (%) της σιλυχριστίνης, της σιλυδιανίνης, της σιλυβίνης A, της σιλυβίνης B, της ισοσιλβίνης A και της ισοσιλβίνης B ήταν αντίστοιχα 9,9 – 48,1 – 3,3 – 8,2 – 16,1 – 12,2 το 2014, ενώ το 2017 ήταν 9,1 – 51,1 – 3,3 – 8,3 – 17,1 – 12,1. Η γενετική σταθερότητα ενός πληθυσμού πιθανόν οφείλεται στον τρόπο επικονίασης και είναι αξιοσημείωτο ότι το γαϊδουράγκαθο είναι ένα είδος αυτογονιμοποιούμενο, με ποσοστό σταυρογονιμοποίησης μόνο 2% (Hetz *et al.*, 1995).

4.6.4. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – Ολικά φαινολικά

Η ικανότητα εκκαθάρισης των ριζών DDPH[•] από τα εκχυλίσματα των σπόρων του γαϊδουράγκαθου διέφερε μεταξύ των πληθυσμών που μελετήθηκαν. Η μέση αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν 3529 μmol ασκορβικού οξέος ανά 100 g ξηρού βάρους. Σε πρόσφατη μελέτη, οι Lucini *et al.* (2016) αξιολόγησαν την αντιοξειδωτική δράση δεκαπέντε εκχυλισμάτων σπόρων από διάφορους γονότυπους γαϊδουράγκαθου ευρωπαϊκής προέλευσης, και οι τιμές κυμαίνονταν από 1763 έως 5303 μmol trolox equivalents ανά 100 g, ενώ η μέση τιμή ήταν 3730 μmol trolox equivalents/100 g. Οι Sulas *et al.* (2016) σε ανάλογα πειράματα σε δύο πληθυσμούς από τη Σαρδηνία υπολόγισαν την αντιοξειδωτική ικανότητα σε 3830 και 4080 μmol trolox equivalents ανά 100 g ξηρού βάρους. Ο μέσος όρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας (ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό), που προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου FRAP, ήταν 9632 μmol ασκορβικού οξέος ανά 100 g ξηρού βάρους. Και στις δύο μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH και FRAP) οι υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν στους πληθυσμούς ‘Αργύρια’ και ‘Μεσοποταμία 1’ (Έτος 2017).

Στην ανάλυση συσχέτισης που έγινε η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη είχε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ($r=0,507$, $p<0,001$) με τα αποτελέσματα της μεθόδου FRAP, ενώ θετική συσχέτιση ($r=0,345$, $p<0,001$) είχε και με τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH (Πίνακας 4.9). Ακόμη, η αντιοξειδωτική ικανότητα που εκτιμήθηκε και με τις δύο μεθόδους βρέθηκε να έχει θετική συσχέτιση με την περιεκτικότητα σε ταξιφολίνη και σιλυδιανίνη, ενώ το ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό βρέθηκε να έχει θετική συσχέτιση με την περιεκτικότητα σε σιλυχριστίνη, σιλυβίνη Α, σιλυβίνη Β και ισοσιλυβίνη Α. Τέλος, βρέθηκε στατιστικά σημαντική ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων ($r=0,830$, $p<0,001$), όπως έγινε και στη μελέτη των Lucini *et al.* (2016).

Η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά διέφερε μεταξύ των πληθυσμών που μελετήθηκαν. Η μέση τιμή, που προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ήταν 2500 mg γαλλικού οξέος (GAE) ανά 100 g ξηρού βάρους, ενώ η σχετική τυπικά απόκλιση ήταν 13,2%. Σε πειράματα που έκαναν οι Stancheva *et al.*, (2010) διαπίστωσαν ότι η συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες των σπόρων κυμαινόταν μεταξύ 2582 και 2911 mg ανά 100 g ξηρού βάρους. Οι υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν στους πληθυσμούς ‘Αργύρια’ και ‘Σπάτα’ (Έτος 2016).

Πίνακας 4.9. Συντελεστές συσχέτισης (Pearson, r) ανάμεσα σε χαρακτηριστικά των πληθυσμών του φυτού *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

	SW	SLM	Oil	TXF	SCS	SDN	SBA	SBB	ISBA	ISBB	DPPH	FRAP	TPC
Βάρος 1000 σπόρων (SW)	1	0,267	0,361**	0,102	0,235	0,161	0,244	0,239	0,109	-0,094	-0,113	-0,004	-0,133
Περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (SLM)	0,267	1	0,231	0,714***	0,911***	0,236	0,897***	0,900***	0,794***	0,207	0,345*	0,507***	0,545***
Περιεκτικότητα σε έλαιο (Oil)	0,361**	0,231	1	0,046	0,247	-0,032	0,202	0,230	0,393**	0,282*	-0,250	-0,191	-0,171
Ταξιφολίνη (TXF)	0,102	0,714***	0,046	1	0,633***	0,020	0,623***	0,620***	0,546***	0,092	0,476***	0,419**	0,618***
Σιλυχριστίνη (SCS)	0,235	0,911***	0,247	0,633***	1	-0,160	0,986***	0,995***	0,743***	0,132	0,150	0,291*	0,380**
Σιλυδιανίνη (SDN)	0,161	0,236	-0,032	0,020	-0,160	1	-0,145	-0,169	0,036	0,031	0,367**	0,485***	0,269
Σιλυβίνη Α (SBA)	0,244	0,897***	0,202	0,623***	0,986***	-0,145	1	0,996***	0,656***	-0,009	0,206	0,342*	0,399**
Σιλυβίνη Β (SBB)	0,239	0,900***	0,230	0,620***	0,995***	-0,169	0,996***	1	0,703***	0,065	0,170	0,301*	0,379**
Ισοσιλυβίνη Α (ISBA)	0,109	0,794***	0,393**	0,546***	0,743***	0,036	0,656***	0,703***	1	0,682***	0,148	0,302*	0,460***
Ισοσιλυβίνη Β (ISBB)	-0,094	0,207	0,282*	0,092	0,132	0,031	-0,009	0,065	0,682***	1	-0,136	-0,053	0,101
Αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH)	-0,113	0,345*	-0,250	0,476***	0,150	0,367**	0,206	0,170	0,148	-0,136	1	0,830***	0,701***
Αντιοξειδωτική ικανότητα (FRAP)	-0,004	0,507***	-0,191	0,419**	0,291*	0,485***	0,342*	0,301*	0,302*	-0,053	0,830***	1	0,751***
Ολικά φαινολικά (TPC)	-0,133	0,545***	-0,171	0,618***	0,380**	0,269	0,399**	0,379**	0,460***	0,101	0,701***	0,751***	1

*, **, ***: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05, 0,01 και 0,001, αντίστοιχα.

Στη μελέτη τους οι Lucini *et al.* (2016) βρήκαν ότι η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά σε διάφορους γονοτύπους γαϊδουράγκαθου γάλακτος κυμαινόταν από 206 έως 360 mg GAE ανά 100 g, ενώ οι Sulas *et al.* (2016) βρήκαν ότι η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά ήταν 1066 και 1002 mg/100 g σε δύο πληθυσμούς.

Στην ανάλυση συσχέτισης που έγινε η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά είχε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ($r=0,545$, $p<0,001$) με την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (Πίνακας 4.9). Ακόμη, διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση με την περιεκτικότητα σε σιλυχριστίνη, σιλυβίνη Α και σιλυβίνη Β, ενώ η συσχέτιση με την ταξιφολίνη και την ισοσιλυβίνη Α βρέθηκε να είναι ισχυρά θετική. Στη μελέτη τους οι Lucini *et al.* (2016) δεν διαπίστωσαν καμία συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των διαφόρων συστατικών της σιλυμαρίνης και των ολικών φαινολικών ή της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Τέλος, βρέθηκε στατιστικά σημαντική ισχυρή θετική συσχέτιση της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά τόσο με τη μέθοδο DPPH ($r=0,701$, $p<0,001$) όσο και με τη μέθοδο FRAP ($r=0,751$, $p<0,001$).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα των συσχετίσεων συνάγεται ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων των σπόρων του γαϊδουράγκαθου σχετίζεται με τη σιλυμαρίνη και την περιεκτικότητά των εκχυλισμάτων στα συστατικά της. Ακόμη, παρότι συνήθως η αντιοξειδωτική δράση της σιλυμαρίνης αποδίδεται στη σιλυβίνη, η συμμετοχή των άλλων συστατικών της σιλυμαρίνης δεν είναι αμελητέα, τουναντίον, όπως φαίνεται και από τις μετρήσεις στους διάφορους πληθυσμούς, μπορεί οι πληθυσμοί από τα Σπάτα και την Καστοριά, που είχαν πολύ μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε σιλυβίνη (και Α και Β), να είχαν αποτελέσματα πάνω από το μέσο όρο, αλλά οι μεγαλύτερες τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρατηρήθηκαν σε άλλους πληθυσμούς. Ο πληθυσμός 'Αργύρια' που κατέγραψε τις μεγαλύτερες τιμές σε όλες τις δοκιμές, είχε υψηλή περιεκτικότητα σε ταξιφολίνη και σιλυδιανίνη και μάλιστα είχε το μεγαλύτερο άθροισμα σε αυτές τις δύο ουσίες. Τα συμπεράσματά μας αυτά επιβεβαιώνονται και από τη μελέτη των Anthony και Saleh (2013), οι οποίοι εξέτασαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των κύριων συστατικών της σιλυμαρίνης και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η πιο αποτελεσματική αντιοξειδωτική ουσία είναι η ταξιφολίνη, αν και με τη μέθοδο DPPH οι πιο αποτελεσματικές αντιοξειδωτικές ουσίες ήταν η ταξιφολίνη και η σιλυδιανίνη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΣΠΟΡΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΥΘΜΙΣΤΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΡΙQUAT CHLORIDE ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΓΑΪΔΟΥΡΑΓΚΑΘΟΥ

5.1. Εισαγωγή

Η απόδοση και η ποιότητα του γαϊδουράγκαθου (π.χ. η περιεκτικότητα των σπόρων σε σιλυμαρίνη) εξαρτάται εκτός από τον γονότυπο, τη γεωγραφική θέση της καλλιέργειας και τις καιρικές συνθήκες, και από τις αγρονομικές συνθήκες. Μεταξύ άλλων αγρονομικών παραμέτρων, όπως ο χρόνος σποράς, η λίπανση, η άρδευση και ο χρόνος συγκομιδής, η επιλογή της κατάλληλης πυκνότητας φυτών είναι κρίσιμη προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η ανάπτυξη και η απόδοση της καλλιέργειας (Sadowska & Andrzejewska, 2009; Karkanis *et al.*, 2011). Σύμφωνα με τους Omer *et al.* (1993) η μεγαλύτερη απόδοση σε σπόρο καταγράφηκε στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας. Ωστόσο, η βέλτιστη πυκνότητα της καλλιέργειας εξαρτάται και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Andrzejewska *et al.*, 2011). Στις καλλιέργειες στην περιοχή της Μεσογείου η μεγάλη πυκνότητα των φυτών ενδέχεται να αυξήσει τον κίνδυνο ξηρασίας κατά τη διάρκεια των αναπαραγωγικών σταδίων (άνθηση, καρπόδεση). Σε αυτό το πλαίσιο, είναι σημαντικό να εξεταστούν οι επιπτώσεις της πυκνότητας της καλλιέργειας στην ανάπτυξη των φυτών και την απόδοση σε σπόρο σε ημιξηρικές συνθήκες. Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Zangani *et al.* (2018) ανέφεραν ότι η απόδοση σε σπόρο του γαϊδουράγκαθου μειώθηκε σημαντικά σε συνθήκες υδατικού στρες. Αντίθετα, βρέθηκε να ενισχύεται η βιοσύνθεση της σιλυμαρίνης σε σπόρους γαϊδουράγκαθου υπό συνθήκες ξηρασίας (Afshar *et al.*, 2015).

Μία ακόμη σημαντική πρόκληση που αντιμετωπίζουν οι παραγωγοί γαϊδουράγκαθου είναι η διασπορά των σπόρων («τίναγμα»), η οποία αποτελεί τον βασικό περιοριστικό παράγοντα στην οικονομικά βιώσιμη παραγωγή του φυτού. Το πρόβλημα αυτό επιδεινώνεται όταν η συγκομιδή γίνεται με μηχανικές μεθόδους, οπότε για να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες απόδοσης πρέπει να μειωθεί το ύψος του

φυτού. Ακόμη, η μείωση του ύψους των φυτών είναι απαραίτητη για τον έλεγχο εντόμων και ασθενειών στην καλλιέργεια γαϊδουράγκαθου. Η εφαρμογή ρυθμιστών ανάπτυξης φυτών, όπως το *meriquat chloride*, μπορεί να συμβάλει στην επίτευξη αυτών των στόχων, καθώς διάφορα είδη φυτών ανταποκρίνονται στην εφαρμογή των επιβραδυντών ανάπτυξης (Nichols, Snipes & Jones, 2003; Suzuki *et al.*, 2018), ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι και τα φυτά γαϊδουράγκαθου ανταποκρίνονται στην εφαρμογή ρυθμιστών ανάπτυξης (Geneva *et al.*, 2007, Stancheva *et al.*, 2010). Μεταξύ των επιπτώσεων αυτών των ρυθμιστών ήταν η αύξηση της απόδοσης σε σπόρο και σε σιλυμαρίνη.

Η συγκομιδή της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου στο κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τη βελτιστοποίηση της ποιότητας του συγκομισθέντος προϊόντος. Η αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη σπόρων του φυτού σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά συμπεράσματα, ώστε να καταστεί οικονομικά βιώσιμη η παραγωγή γαϊδουράγκαθου.

5.2. Υλικά και μέθοδοι

5.2.1 Γενικά

Πραγματοποιήθηκαν τα ακόλουθα πειράματα στο αγρόκτημα Βελεστίνου του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (22°75'67''E, 39°39'60''N):

Πείραμα 1: Μελέτη της επίδρασης επιλεγμένων καλλιεργητικών τεχνικών (απόσταση φυτών, επιβραδυντές ανάπτυξης) στην ανάπτυξη, την ποιότητα και την απόδοση του φυτού *Silybum marianum* L. Gaertn σε σιλυμαρίνη, σε καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν στο αγρόκτημα Βελεστίνου του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τις καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016 και 2017-2018.

Πείραμα 2: Μελέτη της επίδρασης επιλεγμένων καλλιεργητικών τεχνικών (απόσταση φυτών) στην ανάπτυξη, την ποιότητα και την απόδοση του φυτού *Silybum marianum* L. Gaertn σε σιλυμαρίνη σε καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε στο αγρόκτημα Βελεστίνου του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, την καλλιεργητική περίοδο

2016-2017. Αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη και της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων των σπόρων του φυτού διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης.

Οι ιδιότητές του εδάφους του πειραματικού αγρού αναφέρονται στον Πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1. Ιδιότητες εδάφους πειραματικού αγρού.

Τύπος εδάφους	
Άμμος	38%
ΐλος	36%
Άργιλος	26%
pH	7,4 (1:1 έδαφος/νερό)

Από τον παραπάνω πίνακα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το έδαφος χαρακτηρίζεται ως αμμοαργιλοπηλώδες, ενώ η τιμή του pH βρίσκεται σε επίπεδα που δεν δημιουργούν προβλήματα.

5.2.2 Καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016 και 2017-2018

Πειραματικό σχέδιο

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε έκταση 400 m² και οι διαστάσεις των τεμαχίων ήταν 2x5 m. Στα τεμάχια σπάρθηκαν 4 σειρές (Απόσταση Α) ή 5 σειρές (Απόσταση Β). Οι σειρές απέχον μεταξύ τους 50 cm (Απόσταση Α) και 35 cm (Απόσταση Β). Ο ρυθμιστής ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν meriquat chloride (Pix 5 SL).



Εικόνα 5.1. Πειραματικός αγρός (Νοέμβριος 2015).

Εφαρμόστηκε το σχέδιο των υποδιαιρεμένων τεμαχίων με 3 επαναλήψεις (Διάγραμμα 5.1, Εικόνα 5.1). Το σχέδιο περιελάμβανε δύο κύρια τεμάχια (πυκνότητα καλλιέργειας A: 28 φυτά/m² και πυκνότητα καλλιέργειας B: 40 φυτά/m²) και τέσσερα υποτεμάχια (1. αφέκαστος μάρτυρας, 2. εφαρμογή meriquat chloride στη δόση των 7,5 g δ.ο./στρέμμα (MC7,5), 3. εφαρμογή meriquat chloride στη δόση των 10,0 g δ.ο./στρέμμα (MC10) και 4. εφαρμογή meriquat chloride σε δύο δόσεις με διαφορά δύο εβδομάδων, με την πρώτη δόση να είναι 3,75 g δ.ο./στρέμμα και τη δεύτερη δόση να είναι 7,5 g δ.ο./στρέμμα (MC11,2)).

Απόσταση B Μάρτυρας	Απόσταση A Ρυθμιστής MC7,5	Απόσταση B Ρυθμιστής MC10
Απόσταση B Ρυθμιστής MC11,2	Απόσταση A Μάρτυρας	Απόσταση B Ρυθμιστής MC11,2
Απόσταση B Ρυθμιστής MC10	Απόσταση A Ρυθμιστής MC11,2	Απόσταση B Μάρτυρας
Απόσταση B Ρυθμιστής MC7,5	Απόσταση A Ρυθμιστής MC10	Απόσταση B Ρυθμιστής MC7,5
Απόσταση A Ρυθμιστής MC11,2	Απόσταση B Ρυθμιστής MC10	Απόσταση A Ρυθμιστής MC11,2
Απόσταση A Ρυθμιστής MC10	Απόσταση B Ρυθμιστής MC7,5	Απόσταση A Ρυθμιστής MC10
Απόσταση A Ρυθμιστής MC7,5	Απόσταση B Ρυθμιστής MC11,2	Απόσταση A Μάρτυρας
Απόσταση A Μάρτυρας	Απόσταση B Μάρτυρας	Απόσταση A Ρυθμιστής MC7,5

Διάγραμμα 5.1. Πειραματικό σχέδιο υποδιαιρεμένων τεμαχίων με 3 επαναλήψεις.

Καλλιεργητικά στοιχεία

Προετοιμασία εδάφους – Λίπανση – Ζιζανιοκτονία

Για την κατεργασία του εδάφους χρησιμοποιήθηκε άροτρο, με βάθος κατεργασίας 20-30 cm και στη συνέχεια έγινε ένα πέρασμα με καλλιεργητή. Πριν τη σορά εφαρμόστηκε λίπανση (25 kg ανά στρέμμα) με ανόργανο λίπασμα 16-20-0

(N:P₂O₅:K₂O). Έγινε καταπολέμηση των ζιζανίων με σκάλισμα στα μέσα Φεβρουαρίου και τις δύο καλλιεργητικές περιόδους. Στον αγρό πριν την καλλιέργεια του φυτού είχε καλλιεργηθεί σιτάρι.

Φυτικό υλικό – Σπορά

Χρησιμοποιήθηκε σπόρος από πληθυσμό του φυτού από την περιοχή Άγιος Γεώργιος Φθιώτιδας. Η σπορά πραγματοποιήθηκε στις 5 Νοεμβρίου 2015 και στις 30 Οκτωβρίου 2017. Οι σειρές απείχαν μεταξύ τους 50 cm (Απόσταση Α) και 35 cm (Απόσταση Β), ενώ το βάθος σποράς ήταν 2-3 cm. Πραγματοποιήθηκε αραίωση των φυτών, στο στάδιο των τεσσάρων φύλλων, προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή πυκνότητα της καλλιέργειας (Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2. Πειραματικός αγρός (Φεβρουάριος 2016).

Εφαρμογή ρυθμιστή ανάπτυξης

Ο πρώτος ψεκασμός έγινε στις 29 Μαρτίου και ο δεύτερος στις 12 Απριλίου 2016, για την 1^η καλλιεργητική περίοδο, ενώ για την καλλιεργητική περίοδο 2017-2018 οι ψεκασμοί έγιναν στις 27 Μαρτίου και στις 10 Απριλίου 2018 (Εικόνα 5.3). Ο ρυθμιστής ανάπτυξης (meriquat chloride) εφαρμόστηκε κατά την περίοδο της ταχείας βλαστικής ανάπτυξης, όταν τα φυτά είχαν ύψος περίπου 40 cm, και συνδυάστηκε με το επιφανειοδραστικό alkylethersulfate sodium salt (Biorpower SL) με δόση 38 g δ.ο./στρέμμα. Η εφαρμογή έγινε με χειροκίνητο ψεκαστήρα, με πίεση 300 kPa, χρησιμοποιώντας ακροφύσια κενού κώνου και συνολικό όγκο νερού 50 L/στρέμμα.



Εικόνα 5.3. Πειραματικός αγρός (Απρίλιος 2016).

Μετρήσεις

Τα φυτικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν ήταν:

- **Διάμετρος ροζέτας.** Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δέκα φυτά τυχαία επιλεγμένα από κάθε πειραματικό τεμάχιο, αποφεύγοντας τη συλλογή φυτών από την αρχή και το τέλος των σειρών. Οι μετρήσεις έγιναν πριν την εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης, η οποία έγινε κατά την διάρκεια της περιόδου επιμήκυνσης του βλαστού.
- **Συγκέντρωση χλωροφύλλης.** Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το φορητό όργανο SPAD-502 chlorophyll meter (Konica Minolta Optics Inc., Osaka, Japan) σε πλήρως εκπτυγμένα φύλλα ανά τακτά χρονικά διαστήματα με δέκα μετρήσεις ανά πειραματικό τεμάχιο. Το όργανο αυτό χρησιμοποιεί την απορρόφηση για τον υπολογισμό της σχετικής συγκέντρωσης χλωροφύλλης (τιμές SPAD) στους ιστούς των φύλλων.
- **Ύψος.** Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δέκα φυτά ανά πειραματικό τεμάχιο, αποφεύγοντας τη μέτρηση φυτών από την αρχή και το τέλος των σειρών.

- **Νωπό – Ξηρό βάρος.** Οι μετρήσεις του νωπού βάρους πραγματοποιήθηκαν σε τρία φυτά ανά πειραματικό τεμάχιο. Μετά από ξήρανση των φυτών σε κλίβανο, σε θερμοκρασία 60 °C για 4 ημέρες, έγινε η μέτρηση του ξηρού βάρους. Όλες οι ζυγίσεις έγιναν με ζυγαριά ακριβείας.
- **Αριθμός ταξιανθιών.** Μετρήθηκε ο αριθμός των ταξιανθιών σε δέκα φυτά ανά πειραματικό τεμάχιο, αποφεύγοντας τη μέτρηση σε φυτά από την αρχή και το τέλος των σειρών.
- **Απόδοση σε σπόρο.** Πραγματοποιήθηκε συγκομιδή ταξιανθιών στις 5 Ιουνίου 2016 και στις 3 Ιουνίου 2018 από την κεντρική σειρά και σε μήκος 1 m και υπολογίστηκε η απόδοση. Προκειμένου να μειωθεί η διασπορά των σπόρων, η συγκομιδή πραγματοποιήθηκε όταν τουλάχιστον το 60% των κεφαλών είχε φτάσει στο στάδιο ανάπτυξης 88 της κλίμακας BBCH, όπως περιγράφεται από τον Martinelli *et al.* (2015).
- **Συστατικά της απόδοσης (βάρος 1000 σπόρων).** Μετά τη συγκομιδή υπολογίστηκε το βάρος των 1000 σπόρων (3 ζυγίσεις 100 σπόρων ανά πειραματικό τεμάχιο).
- **Προσδιορισμός περιεκτικότητας και απόδοσης σε έλαιο και σιλυμαρίνη.** Προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο και σε σιλυμαρίνη και τα συστατικά της, σύμφωνα με τις μεθόδους που αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2. Επίσης, προσδιορίστηκε η απόδοση σε σιλυμαρίνη και σε έλαιο.

5.2.3. Καλλιεργητική περίοδος 2016-2017

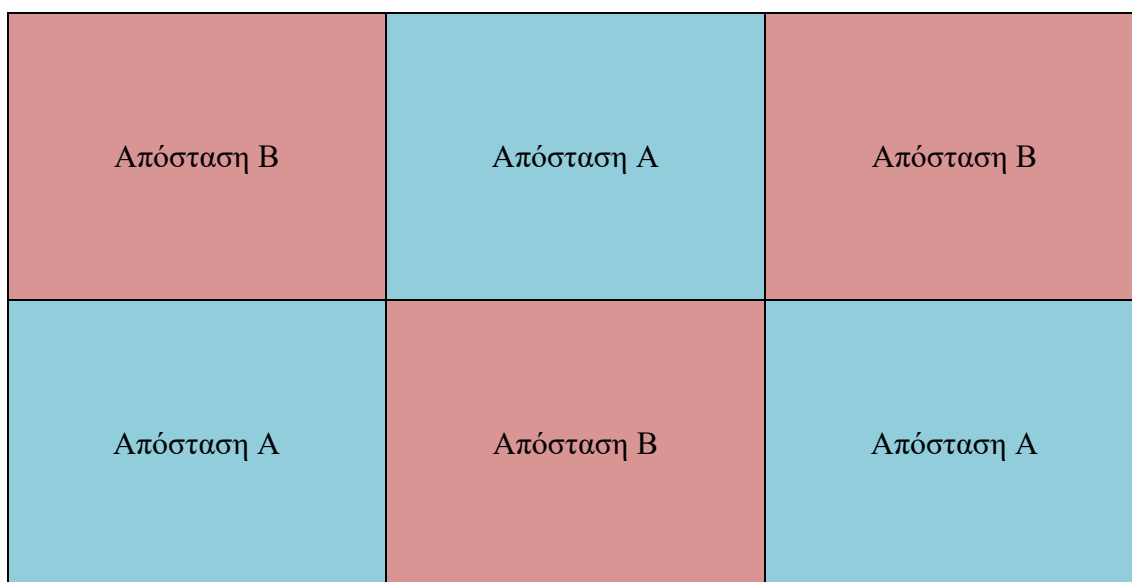
Δεν πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης γιατί μετά τη σπορά στις 16 Νοεμβρίου 2016 οι συνθήκες ήταν ιδιαίτερα δυσμενείς για το φύτεμα και έγινε δεύτερη σπορά στις 5 Μαρτίου 2017. Η όψιμη σπορά είχε ως αποτέλεσμα την ταχύτερη ανάπτυξη των φυτών, την πρόωρη ανάπτυξη των βλαστών και κατά συνέπεια την πρόωρη άνθηση των φυτών. Τα φυτά στο συγκεκριμένο έτος είχαν μικρότερο ύψος σε σχέση με τις άλλες καλλιεργητικές περιόδους και γι' αυτό δεν εφαρμόστηκε ρυθμιστής ανάπτυξης.

Πειραματικό σχέδιο

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε έκταση 400 m² και οι διαστάσεις των τεμαχίων ήταν 2x20 m. Στα τεμάχια σπάρθηκαν 4 σειρές ή 5 σειρές.



Εικόνα 5.4. Πειραματικός αγρός (4 Απριλίου 2017).



Διάγραμμα 5.2. Πειραματικό σχέδιο τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων με δύο επεμβάσεις και 3 επαναλήψεις.

Εφαρμόστηκε το σχέδιο των τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων με δύο επεμβάσεις (Απόσταση Α και Απόσταση Β) και 3 επαναλήψεις (Διάγραμμα 5.2, Εικόνα 5.4).

Καλλιεργητικά στοιχεία

Προετοιμασία εδάφους – Λίπανση – Ζιζανιοκτονία

Για την κατεργασία του εδάφους χρησιμοποιήθηκε άροτρο, με βάθος κατεργασίας 20-30 cm και στη συνέχεια έγινε ένα πέρασμα με καλλιεργητή. Εφαρμόστηκε λίπανση όπως και στο προηγούμενο έτος και έγινε καταπολέμηση των ζιζανίων με σκάλισμα 1 μήνα μετά τη σπορά. Στον αγρό πριν την καλλιέργεια του φυτού είχε καλλιεργηθεί σιτάρι.

Φυτικό υλικό – Σπορά

Χρησιμοποιήθηκε σπόρος από πληθυσμό του φυτού από την περιοχή Άγιος Γεώργιος Φθιώτιδας. Η σπορά πραγματοποιήθηκε στις 16 Νοεμβρίου 2016, αλλά λόγω του μη ικανοποιητικού φυτρώματος των σπόρων, εξαιτίας των δυσμενών καιρικών συνθηκών, πραγματοποιήθηκε δεύτερη σπορά στις 5 Μαρτίου 2017. Στη δεύτερη σπορά χρησιμοποιήθηκε σπόρος από τα Σπάτα Αττικής. Οι σειρές απέχουν μεταξύ τους 50 cm (Απόσταση Α) και 35 cm (Απόσταση Β), ενώ το βάθος σποράς ήταν 2-3 cm. Πραγματοποιήθηκε αραίωση των φυτών, στο στάδιο των τεσσάρων φύλλων, προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή πυκνότητα φύτευσης (Εικόνα 5.5).



Εικόνα 5.5. Πειραματικός αγρός (25 Απριλίου 2017).

Συγκομιδή

Η συγκομιδή των ταξιανθιών έγινε σε τρία διαφορετικά στάδια ωρίμανσης, στις 2 Ιουνίου (στάδιο I: BBCH 75), στις 10 Ιουνίου (στάδιο II: BBCH 79) και στις 22 Ιουνίου 2017 (στάδιο III: BBCH 88).



Εικόνα 5.6. Πειραματικός αγρός (2 Ιουνίου 2017).

Μετρήσεις

Τα χαρακτηριστικά του φυτού *Silybum marianum* L. Gaertn που μελετήθηκαν ήταν:

- **Διάμετρος ροζέτας.** Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δέκα φυτά τυχαία επιλεγμένα από κάθε πειραματικό τεμάχιο, αποφεύγοντας τη συλλογή φυτών από την αρχή και το τέλος των σειρών.
- **Συγκέντρωση χλωροφύλλης.** Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το φορητό όργανο SPAD-502 chlorophyll meter (Konica Minolta Optics Inc., Osaka, Japan) σε πλήρως εκπτυγμένα φύλλα ανά τακτά χρονικά διαστήματα με δέκα μετρήσεις ανά πειραματικό τεμάχιο. Το όργανο χρησιμοποιεί την απορρόφηση για τον υπολογισμό της σχετικής συγκέντρωσης χλωροφύλλης (τιμές SPAD) στους ιστούς των φύλλων.

- **Ύψος.** Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δέκα φυτά ανά πειραματικό τεμάχιο, αποφεύγοντας τη μέτρηση φυτών από την αρχή και το τέλος των σειρών.
- **Νωπό – Ξηρό βάρος.** Οι μετρήσεις του νωπού βάρους πραγματοποιήθηκαν σε τρία φυτά ανά πειραματικό τεμάχιο, με ζυγαριά ακριβείας.
- **Ξηρό βάρος.** Οι μετρήσεις του ξηρού βάρους πραγματοποιήθηκαν μετά από ξήρανση των φυτών σε κλίβανο, σε θερμοκρασία 60 °C για 4 ημέρες, με ζυγαριά ακριβείας.
- **Αριθμός ταξιανθιών.** Μετρήθηκε ο αριθμός των ταξιανθιών σε δέκα φυτά ανά πειραματικό τεμάχιο, αποφεύγοντας τη μέτρηση σε φυτά από την αρχή και το τέλος των σειρών.
- **Απόδοση σε σπόρο.** Πραγματοποιήθηκε συγκομιδή ταξιανθιών στις 22 Ιουνίου 2017 από την κεντρική σειρά και σε μήκος 1 m και υπολογίστηκε η απόδοση. Προκειμένου να μειωθεί η διασπορά των σπόρων, η συγκομιδή πραγματοποιήθηκε όταν τουλάχιστον το 60% των κεφαλών είχε φτάσει στο στάδιο ανάπτυξης 88 της κλίμακας BBCH, όπως περιγράφεται από τον Martinelli *et al.* (2015).
- **Συστατικά της απόδοσης (βάρος 1000 σπόρων).** Μετά τη συγκομιδή μετρήθηκε το βάρος των 1000 σπόρων (3 ζυγίσεις 100 σπόρων ανά πειραματικό τεμάχιο).
- **Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε έλαιο και σιλυμαρίνη, όπως και στα συστατικά της σιλυμαρίνης, σε σπόρους διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης.** Πραγματοποιήθηκε συγκομιδή ταξιανθιών στις 2, 10 και 22 Ιουνίου 2017 στο στάδιο ανάπτυξης 75, 79 και 88, αντίστοιχα, της κλίμακας BBCH (Martinelli *et al.*, 2015). Προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε έλαιο και σε σιλυμαρίνη και τα συστατικά της σε σπόρους από τα τρία στάδια ωρίμανσης.

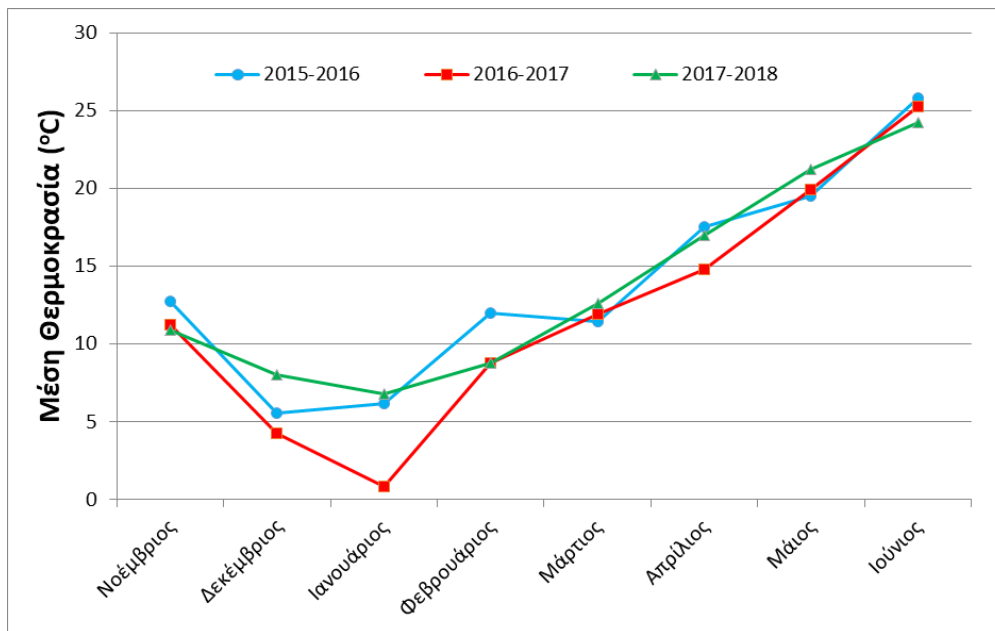
- **Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης.** Για τη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος των σπόρων σε μεθανόλη χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH, FRAP και Folin-Ciocalteu, όπως περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2.
- **Βάρος 1000 σπόρων.** Μετρήθηκε το βάρος των 1000 σπόρων (3 ζυγίσεις 100 σπόρων ανά πειραματικό τεμάχιο), για κάθε στάδιο ωρίμανσης.
- **Χρώμα σπόρων.** Μετρήθηκαν οι χρωματικές παράμετροι L*, C*, h° με το όργανο CR-400 Chroma Meter (Konica Minolta Inc., Tokyo, Japan) σε σπόρους από τα τρία διαφορετικά στάδια ωρίμανσης.

5.2.4. Στατιστική ανάλυση

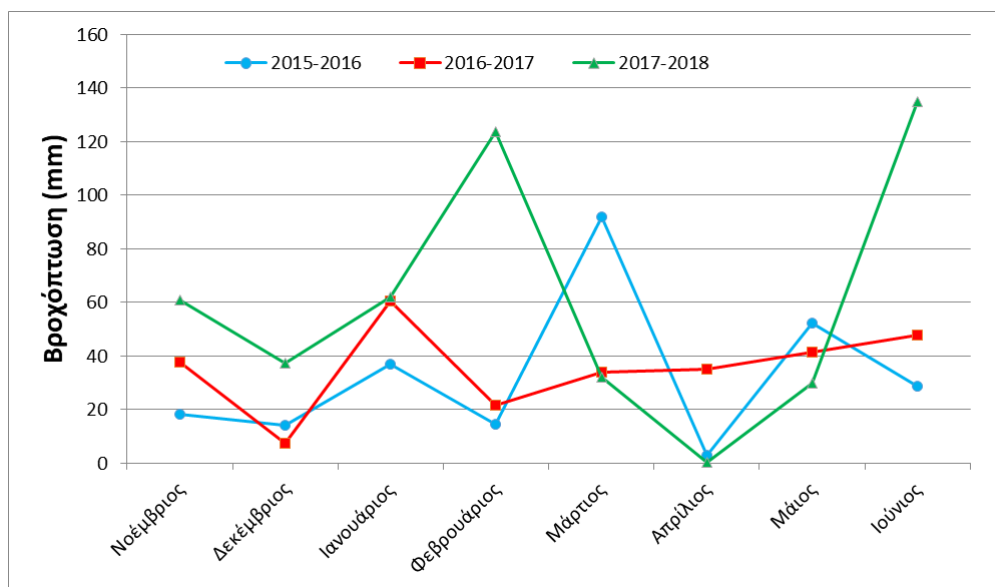
Για κάθε έτος, τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν βάσει του πειραματικού σχεδίου. Αρχικά, εφαρμόστηκε ανάλυση διασποράς (ANOVA) για την αξιολόγηση των επιδράσεων της πυκνότητας καλλιέργειας (παράγοντας 1) και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (παράγοντας 2), καθώς και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Όταν η πυκνότητα της καλλιέργειας και/ή η εφαρμογή του meriquat chloride ήταν στατιστικά σημαντική, αλλά η αλληλεπίδραση μεταξύ τους ήταν στατιστικά μη σημαντική, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων χρησιμοποιώντας τη δοκιμή της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD, $p < 0,05$). Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης (Pearson, r) για να εξεταστεί η σχέση μεταξύ των χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό SigmaPlot 12 (Systat Software, San Jose, CA, USA).

5.2.5. Μετεωρολογικά δεδομένα

Παρακάτω παρουσιάζονται η μέση μηνιαία θερμοκρασία (Διάγραμμα 5.3) και το μηνιαίο ύψος βροχόπτωσης (Διάγραμμα 5.4) από το Νοέμβριο έως τον Ιούνιο για τις καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016, 2016-2017 και 2017-2018.

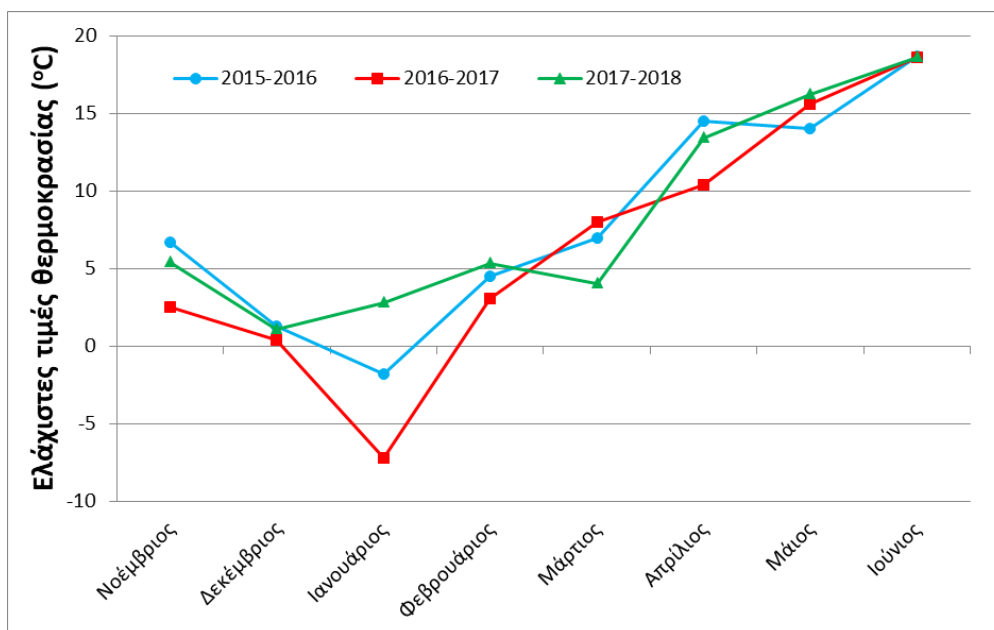


Διάγραμμα 5.3. Μέση μηνιαία θερμοκρασία στο αγρόκτημα Βελεστίνου κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016, 2016-2017 και 2017-2018.

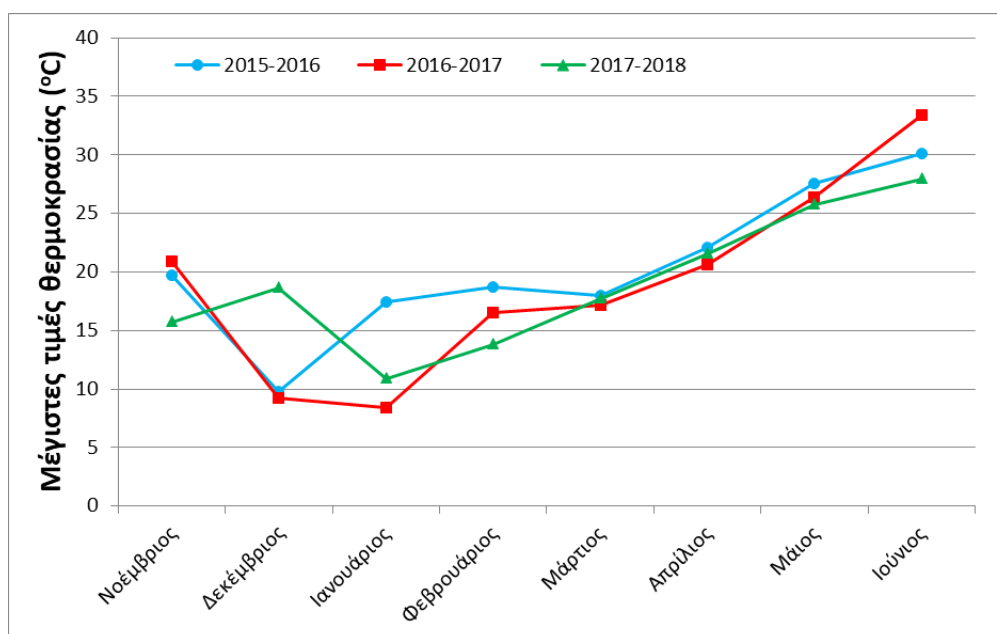


Διάγραμμα 5.4. Μηνιαίο ύψος βροχόπτωσης στο αγρόκτημα Βελεστίνου κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016, 2016-2017 και 2017-2018.

Το συνολικό ύψος βροχής την 1^η καλλιεργητική περίοδο ήταν 259 mm, τη 2^η περίοδο ήταν 285, ενώ την 3^η περίοδο ήταν 481 mm. Παρακάτω παρουσιάζονται οι ελάχιστες (διάγραμμα 5.5) και οι μέγιστες (διάγραμμα 5.6) τιμές θερμοκρασίας ανά μήνα την περίοδο από Νοέμβριο έως Ιούνιο για όλες τις καλλιεργητικές περιόδους. Η χαμηλότερη τιμή που σημειώθηκε ήταν -7,2 °C (2016-2017).



Διάγραμμα 5.5. Ελάχιστες τιμές θερμοκρασίας ανά μήνα στο αγρόκτημα Βελεστίνου κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016, 2016-2017 και 2017-2018.



Διάγραμμα 5.6. Μέγιστες τιμές θερμοκρασίας ανά μήνα στο αγρόκτημα Βελεστίνου κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2015-2016, 2016-2017 και 2017-2018.

5.3. Αποτελέσματα

5.3.1. Καλλιεργητική περίοδος 2015-2016

Διάμετρος ροζέτας

Στην 1^η μέτρηση δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ στη 2^η μέτρηση η επίδραση της πυκνότητας της καλλιέργειας στη διάμετρο της ροζέτας ήταν στατιστικά σημαντική. Κατά τη 2^η μέτρηση η μεγαλύτερη διάμετρος ροζέτας (55,8 cm) καταγράφηκε στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας Α, ενώ η αύξηση από την 1^η στη 2^η μέτρηση ήταν 195,2% για την πυκνότητα Α και 177,5% για την πυκνότητα καλλιέργειας Β (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 5.2. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στη διάμετρο της ροζέτας των φυτών μετά από 88 και 118 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ).

Επέμβαση	Διάμετρος ροζέτας (cm)	
	01/02/2016	02/03/2016
	88 ΗΜΣ	118 ΗΜΣ
Παράγοντας: Πυκνότητα φυτών		
Πυκνότητα Α	18,9	55,8
Πυκνότητα Β	18,7	51,9
Ανάλυση διασποράς		
Τιμές F	0,038 ^{ns}	9,375*
LSD_{5%}	-	2,84
<i>Πυκνότητα Α: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα Β: 40 φυτά/m²</i>		
<i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i>		
<i>*: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05</i>		

Συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD)

Στην 1^η μέτρηση δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ στις υπόλοιπες η επίδραση της πυκνότητας των φυτών στη συγκέντρωση χλωροφύλλης ήταν στατιστικά σημαντική. Στις τρεις τελευταίες μετρήσεις η μεγαλύτερη τιμή καταγράφηκε στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας Α. Στην 3^η μέτρηση η συγκέντρωση χλωροφύλλης στις δύο πυκνότητες διέφερε κατά 7,0%, ενώ στην 4^η

κατά 14,8%. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω της εφαρμογής του meriquat chloride στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης και δεν υπήρξε αλληλεπίδραση μεταξύ της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης (Πίνακας 5.3).

Πίνακας 5.3. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στη συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD) μετά από 88 και 118 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ) και μετά από 24 και 38 ημέρες από την πρώτη εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης (ΗΜΕ).

Επέμβαση	Συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD)			
	01/02	02/03	22/04	06/05
	88 ΗΜΣ	118 ΗΜΣ	24 ΗΜΕ	38 ΗΜΕ
Παράγοντας 1: Πυκνότητα φυτών				
Πυκνότητα Α	40,3	40,4	39,7	38,0
Πυκνότητα Β	40,5	38,5	37,1	33,1
LSD_{5%}	-	1,47	1,84	1,99
Παράγοντας 2: Meriquat chloride				
Μάρτυρας	-	-	38,7	36,6
MC7,5	-	-	38,2	37,2
MC10	-	-	37,6	34,5
MC11,2	-	-	39,1	34,0
LSD_{5%}	-	-	-	-
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F				
Πυκνότητα φυτών (D)	0,056 ^{ns}	8,267 [*]	8,712 ^{**}	26,705 ^{***}
Meriquat chloride (MC)	-	-	0,526 ^{ns}	2,778 ^{ns}
D x MC	-	-	0,690 ^{ns}	0,178 ^{ns}
<p><i>Πυκνότητα Α: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα Β: 40 φυτά/m²</i></p> <p><i>MC7,5: εφαρμογή MC στη δόση των 7,5 g δ.ο./στρέμμα, MC10: εφαρμογή MC στη δόση των 10 g δ.ο./στρέμμα και MC11,2: εφαρμογή MC σε δύο δόσεις 37,5 g δ.ο./στρέμμα και 75 g δ.ο./στρέμμα με διάστημα 2 εβδομάδων μεταξύ των ψεκασμών.</i></p> <p><i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i></p> <p><i>*, **, ***: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05, 0,01 και 0,001, αντίστοιχα</i></p> <p><i>° Στις 88 και 118 ΗΜΣ δεν είχε εφαρμοστεί ακόμη ο ρυθμιστής ανάπτυξης.</i></p>				

Ύψος φυτών

Πίνακας 5.4. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στο ύψος των φυτών μετά από 138 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ) και μετά από 8, 24 και 38 ημέρες από την πρώτη εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης (ΗΜΕ).

Επέμβαση	Ύψος (cm)			
	22/03	06/04	22/04	06/05
	138ΗΜΣ	8 ΗΜΕ	24 ΗΜΕ	38 ΗΜΕ
Παράγοντας 1: Πυκνότητα φυτών				
Πυκνότητα Α	20,1	67,5	142,1	188,4
Πυκνότητα Β	21,6	64,8	134,0	178,1
LSD_{5%}	-	-	6,70	5,89
Παράγοντας 2: Meriquat chloride				
Μάρτυρας	-	68,1	152,0 ^a	196,7 ^a
MC7,5	-	66,6	137,3 ^b	181,2 ^b
MC10	-	64,1	131,2 ^b	175,6 ^b
MC11,2	-	65,9	131,6 ^b	179,6 ^b
LSD_{5%}	-	-	9,48	8,34
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F				
Πυκνότητα φυτών (D)	0,745 ^{ns}	0,205 ^{ns}	6,540 [*]	13,739 ^{**}
Meriquat chloride (MC)	-	0,077 ^{ns}	9,498 ^{***}	11,037 ^{***}
D x MC	-	0,033 ^{ns}	0,286 ^{ns}	1,148 ^{ns}
<p><i>Πυκνότητα Α: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα Β: 40 φυτά/m²</i></p> <p><i>MC7,5: εφαρμογή MC στη δόση των 7,5 g δ.ο./στρέμμα, MC10: εφαρμογή MC στη δόση των 10 g δ.ο./στρέμμα και MC11,2: εφαρμογή MC σε δύο δόσεις 37,5 g δ.ο./στρέμμα και 75 g δ.ο./στρέμμα με διάστημα 2 εβδομάδων μεταξύ των ψεκασμών.</i></p> <p><i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i></p> <p><i>*, **, ***: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05, 0,01 και 0,001, αντίστοιχα</i></p> <p><i>° Στις 138 ΗΜΣ δεν είχε εφαρμοστεί ακόμη ο ρυθμιστής ανάπτυξης.</i></p>				

Στην 1^η και στη 2^η μέτρηση (8 ημέρες μετά την εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης – 8 ΗΜΕ) δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στην 3^η μέτρηση οι τιμές του ύψους κυμάνθηκαν από 131,2 έως 152,0 cm και στην 4^η μέτρηση από 175,6 έως 196,7 cm. Η πυκνότητας σποράς είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στο ύψος

στις δύο τελευταίες μετρήσεις, με τις μεγαλύτερες τιμές να καταγράφονται στην καλλιέργεια της μικρότερης πυκνότητας. Στατιστικά σημαντικές διαφορές, όσον αφορά την επίδραση του periquat chloride, παρατηρήθηκαν στις δύο τελευταίες μετρήσεις (24 ΗΜΕ και 38 ΗΜΕ). Τα μικρότερα ύψη φυτών καταγράφηκαν στην επέμβαση MC10, με τιμές 131,2 cm (24 ΗΜΕ) και 175,6 cm (38 ΗΜΕ), μικρότερες κατά 13,7% και 10,7% από τις αντίστοιχες τιμές για την επέμβαση του αφέκαστου μάρτυρα. Δεν υπήρξε αλληλεπίδραση μεταξύ της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης για το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό (Πίνακας 5.4).

Ξηρό βάρος

Το ξηρό βάρος κυμάνθηκε από 2353,7 έως 2544,0 kg/στρέμμα. Η πυκνότητα των φυτών είχε σημαντική επίδραση στο ξηρό βάρος, με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας. Για την πυκνότητα καλλιέργειας Β η μεταβολή από την 2^η μέτρηση στην 3^η ήταν 37,3%, ενώ για την πυκνότητα Α ήταν 59,6%. Η εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης δεν επηρέασε, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών (Πίνακες 5.5 και 5.6).

Πίνακας 5.5. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά από 88, 118 και 138 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ).

Επέμβαση	Ξηρό βάρος (kg/στρέμμα)		
	01/02	02/03	22/03
	88ΗΜΣ	118ΗΜΣ	138ΗΜΣ
Παράγοντας: Πυκνότητα φυτών			
Πυκνότητα Α	30,3	311,4	496,9
Πυκνότητα Β	45,6	426,7	585,7
Ανάλυση Διασποράς			
Τιμές F	23,771 ^{***}	41,470 ^{***}	6,001 [*]
LSD_{5%}	6,87	39,39	79,75
<i>Πυκνότητα Α: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα Β: 40 φυτά/m²</i> <i>* , ***: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και 0,001, αντίστοιχα</i> <i>° Δεν είχε εφαρμοστεί ακόμη ο ρυθμιστής ανάπτυξης.</i>			

Πίνακας 5.6. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά από 8, 24 και 38 ημέρες από την πρώτη εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης (HME).

Επέμβαση	Ξηρό βάρος (kg/στρέμμα)		
	06/04	22/04	06/05
	8HME	24HME	38HME
Παράγοντας 1: Πυκνότητα φυτών			
Πυκνότητα Α	1019,9	2194,7	2353,7
Πυκνότητα Β	1118,2	2401,7	2544,0
LSD_{5%}	91,13	144,55	149,66
Παράγοντας 2: Meriquat chloride			
Μάρτυρας	1152,2	2246,0	2384,3
MC7,5	1071,0	2323,5	2506,2
MC10	1002,0	2285,3	2495,0
MC11,2	1051,0	2338,0	2409,9
LSD_{5%}	-	-	-
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F			
Πυκνότητα φυτών (D)	5,232 [*]	9,216 ^{**}	7,264 [*]
Meriquat chloride (MC)	2,116 ^{ns}	0,367 ^{ns}	0,742 ^{ns}
D x MC	0,186 ^{ns}	0,366 ^{ns}	0,501 ^{ns}
<i>Πυκνότητα Α: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα Β: 40 φυτά/m²</i> <i>MC7,5: εφαρμογή MC στη δόση των 7,5 g δ.ο./στρέμμα, MC10: εφαρμογή MC στη δόση των 10 g δ.ο./στρέμμα και MC11,2: εφαρμογή MC σε δύο δόσεις 37,5 g δ.ο./στρέμμα και 75 g δ.ο./στρέμμα με διάστημα 2 εβδομάδων μεταξύ των ψεκασμών.</i> <i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i> <i>*, **: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και 0,01, αντίστοιχα</i>			

Αριθμός ταξιανθιών – Βάρος 1000 σπόρων – Απόδοση σε σπόρο

Ο αριθμός των ταξιανθιών ανά φυτό στην πυκνότητα Α ήταν μεγαλύτερος από ότι στην πυκνότητα Β, ενώ το βάρος 1000 σπόρων διέφερε μόνο κατά 0,3% στις δύο πυκνότητες. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για κάποιο από τα δύο παραπάνω χαρακτηριστικά λόγω της επίδρασης της πυκνότητας των φυτών ή λόγω της επέμβασης του ρυθμιστή ανάπτυξης. Όσον αφορά την απόδοση σε σπόρο,

δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω της χρήσης του meriquat chloride, ενώ η πυκνότητα της καλλιέργειας την επηρέασε σημαντικά. Η υψηλότερη τιμή της απόδοσης σε σπόρο καταγράφηκε στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας B, με την τιμή αυτή να είναι κατά 15,1% μεγαλύτερη από την απόδοση σε σπόρο στην πυκνότητα A (Πίνακας 5.7).

Πίνακας 5.7. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό, το βάρος των 1000 σπόρων (g) και την απόδοση σε σπόρο (kg/στρέμμα).

Επέμβαση	Αριθμός ταξιανθιών ανά φυτό	Βάρος 1000 σπόρων (g)	Απόδοση σε σπόρο (kg/στρέμμα)
Παράγοντας 1: Πυκνότητα φυτών			
Πυκνότητα A	5,95	20,37	192,9
Πυκνότητα B	4,97	20,44	222,0
LSD_{5%}	-	-	18,62
Παράγοντας 2: Meriquat chloride			
Μάρτυρας	5,79	20,18	205,8
MC7,5	5,50	20,33	207,4
MC10	5,33	20,89	207,5
MC11,2	5,22	20,22	209,0
LSD_{5%}	-	-	-
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F			
Πυκνότητα φυτών (D)	4,263 ^{ns}	0,033 ^{ns}	11,027 ^{**}
Meriquat chloride (MC)	0,275 ^{ns}	0,583 ^{ns}	0,022 ^{ns}
D x MC	0,144 ^{ns}	0,302 ^{ns}	0,443 ^{ns}
<i>Πυκνότητα A: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα B: 40 φυτά/m²</i>			
<i>MC7,5: εφαρμογή MC στη δόση των 7,5 g δ.ο./στρέμμα, MC10: εφαρμογή MC στη δόση των 10 g δ.ο./στρέμμα και MC11,2: εφαρμογή MC σε δύο δόσεις 37,5 g δ.ο./στρέμμα και 75 g δ.ο./στρέμμα με διάστημα 2 εβδομάδων μεταξύ των ψεκασμών.</i>			
<i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i>			
<i>** : Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01</i>			

Περιεκτικότητα και απόδοση σε έλαιο και σιλυμαρίνη

Η περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο κυμάνθηκε από 26,4 έως 27,3%, ενώ η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε από 2,73 έως 3,01%. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αποστάσεων σποράς τόσο για την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη όσο και για την περιεκτικότητα σε έλαιο (Πίνακας 5.8).

Πίνακας 5.8. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στην περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο (%), την απόδοση σε έλαιο (kg/στρέμμα), την περιεκτικότητα του σπόρου σε σιλυμαρίνη (%) και την απόδοση σε σιλυμαρίνη (kg/στρέμμα).

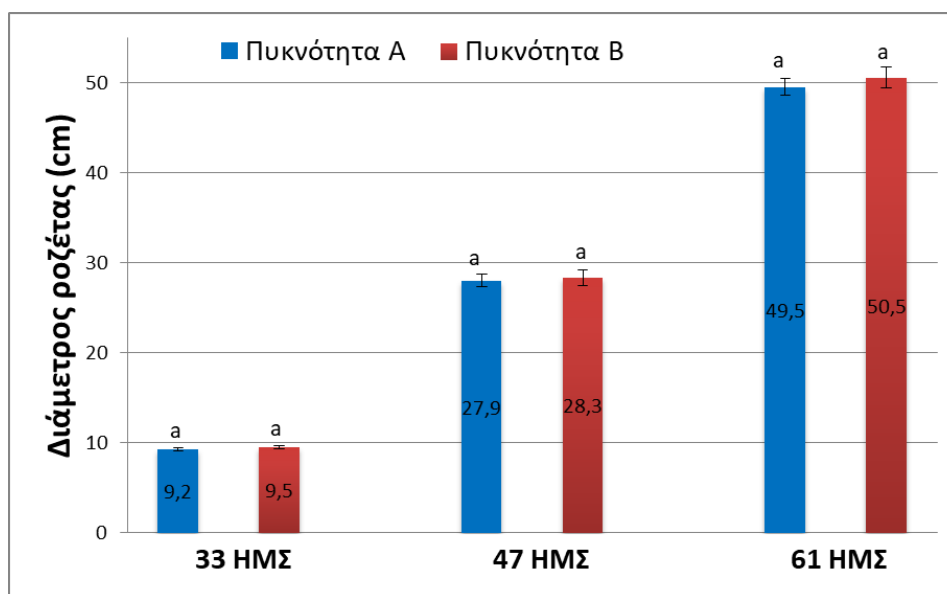
Επέμβαση	Έλαιο (%)	Απόδοση σε έλαιο (kg/στρέμμα)	Σιλυμαρίνη (%)	Απόδοση σε σιλυμαρίνη (kg/στρέμμα)
Παράγοντας 1: Πυκνότητα φυτών				
Πυκνότητα A	27,0	52,1	2,83	5,4
Πυκνότητα B	26,6	59,1	2,87	6,3
LSD _{5%}	-	5,25	-	0,48
Παράγοντας 2: Meriquat chloride				
Μάρτυρας	26,7	55,0	2,73	5,6
MC7,5	26,4	54,8	2,84	5,9
MC10	27,3	56,6	2,81	5,8
MC11,2	26,9	56,0	3,01	6,2
LSD _{5%}	-	-	-	-
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F				
Πυκνότητα φυτών (D)	0,649 ^{ns}	7,911 [*]	0,077 ^{ns}	16,488 ^{***}
Meriquat chloride (MC)	0,630 ^{ns}	0,115 ^{ns}	0,590 ^{ns}	1,474 ^{ns}
D x MC	0,477 ^{ns}	0,137 ^{ns}	0,453 ^{ns}	1,702 ^{ns}
<i>Πυκνότητα A: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα B: 40 φυτά/m²</i> <i>MC7,5: εφαρμογή MC στη δόση των 7,5 g δ.ο./στρέμμα, MC10: εφαρμογή MC στη δόση των 10 g δ.ο./στρέμμα και MC11,2: εφαρμογή MC σε δύο δόσεις 37,5 g δ.ο./στρέμμα και 75 g δ.ο./στρέμμα με διάστημα 2 εβδομάδων μεταξύ των ψεκασμών.</i> <i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i> <i>*, ***: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και 0,001, αντίστοιχα</i>				

Η πυκνότητα των φυτών είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην απόδοση σε έλαιο και σιλυμαρίνη. Οι υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας και για τα δύο χαρακτηριστικά. Η απόδοση σε έλαιο στην πυκνότητα B ήταν κατά 13,4% μεγαλύτερη από ότι στην πυκνότητα A, ενώ η απόδοση σε σιλυμαρίνη ήταν μεγαλύτερη κατά 16,7%. Δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω της εφαρμογής του periquat chloride στην απόδοση σε σιλυμαρίνη και έλαιο.

5.3.2. Καλλιεργητική περίοδος 2016-2017

Διάμετρος ροζέτας

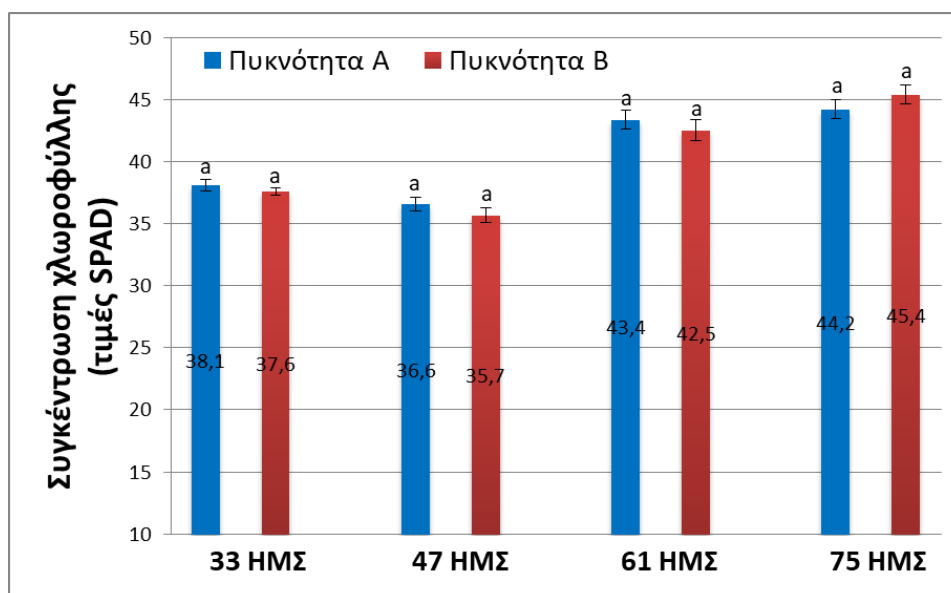
Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη διάμετρο της ροζέτας για τις δύο πυκνότητες καλλιέργειας (Πίνακας 5.9). Κατά την 3^η μέτρηση (61 ημέρες μετά τη σπορά) η μεγαλύτερη διάμετρος ροζέτας (50,5 cm) καταγράφηκε στην επέμβαση της πυκνότητας B. Η μεταβολή από την 1^η στη 2^η μέτρηση ήταν 203,3% για την πυκνότητα A, ενώ η μεταβολή από τη 2^η στην 3^η μέτρηση για την πυκνότητα B ήταν 78,4% (Διάγραμμα 5.7).



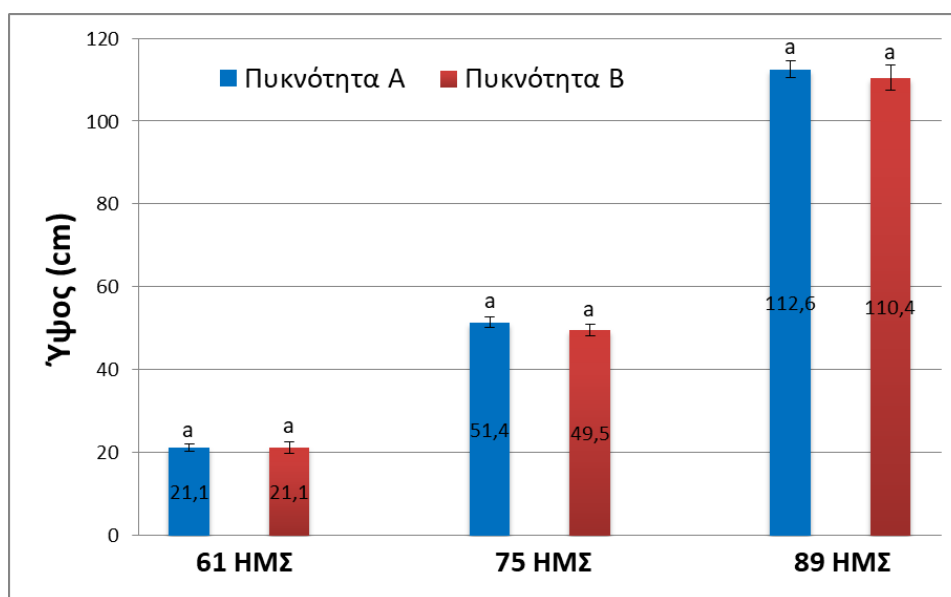
Διάγραμμα 5.7. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα A:28 φυτά/m² και πυκνότητα B:40 φυτά/m²) στη διάμετρο της ροζέτας των φυτών μετά από 33, 47 και 61 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

Συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD)

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, λόγω της διαφορετικής πυκνότητας σποράς (Πίνακας 5.9), στη συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD). Στις δύο τελευταίες μετρήσεις παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης, με τις τιμές SPAD να είναι μεγαλύτερες του 42 (Διάγραμμα 5.8).



Διάγραμμα 5.8. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα A:28 φυτά/m² και πυκνότητα B:40 φυτά/m²) στη συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD) μετά από 33, 47, 61 και 75 ημέρες από τη σπορά (HMS). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).



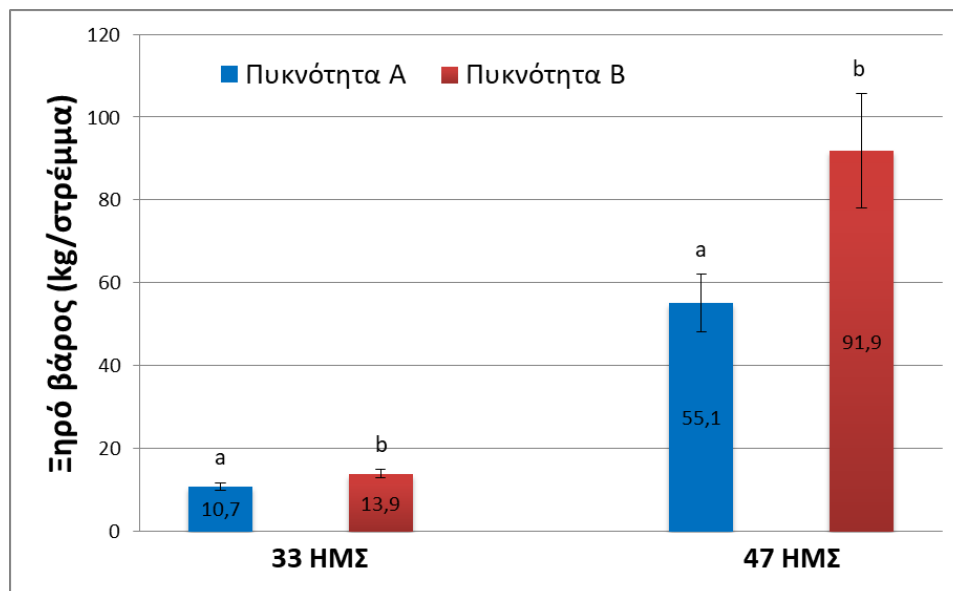
Διάγραμμα 5.9. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα A:28 φυτά/m² και πυκνότητα B:40 φυτά/m²) στο ύψος των φυτών μετά από 61, 75 και 89 ημέρες από τη σπορά (HMS). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

Ύψος φυτών

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, όσον αφορά την επίδραση της πυκνότητας σποράς (Πίνακας 5.9). Στη 2^η μέτρηση και στην 3^η μέτρηση οι μεγαλύτερες τιμές (51,4 cm και 112,6 cm, αντίστοιχα) καταγράφηκαν στην καλλιέργεια της μικρότερης πυκνότητας Α. Η αύξηση ανάμεσα στις δύο πρώτες μετρήσεις ήταν 143,6%, ενώ ανάμεσα στη 2^η και 3^η μέτρηση ήταν 119,1%, για την πυκνότητα Α. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο πυκνότητες για τη 2^η και την 3^η μέτρηση ήταν 3,8% και 2,0%, αντίστοιχα. (Διάγραμμα 5.9).

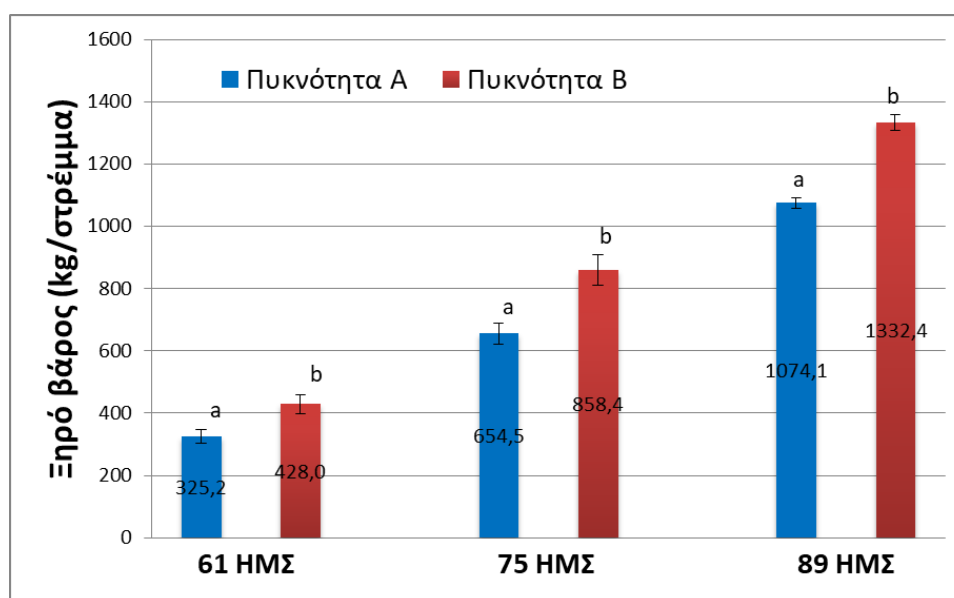
Ξηρό βάρος

Η πυκνότητα των φυτών είχε σημαντική επίδραση στο ξηρό βάρος, με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας Β (Πίνακας 5.9). Για τις δύο πρώτες μετρήσεις υπήρξε επίδραση της πυκνότητας της καλλιέργειας σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Η ελάχιστη σημαντική διαφορά για επίπεδο σημαντικότητας 5% ($LSD_{5\%}$) για την 1^η και 2^η μέτρηση είχε τιμή 2,80 και 34,11, αντίστοιχα. Η αύξηση ανάμεσα στις δύο μετρήσεις ήταν 415,0% για την πυκνότητα Α, ενώ για την πυκνότητα Β ήταν 561,2% (Διάγραμμα 5.10).



Διάγραμμα 5.10. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα Α:28 φυτά/m² και πυκνότητα Β:40 φυτά/m²) στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά από 33 και 47 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

Το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών ήταν κατά 24,0% μεγαλύτερο στην πυκνότητα Β από ότι στην πυκνότητα Α, στην τελευταία μέτρηση. Η επίδραση της πυκνότητας της καλλιέργειας στο ξηρό βάρος ήταν σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05, 0,01 και 0,001 για την 3^η, 4^η και 5^η μέτρηση, ενώ η ελάχιστη σημαντική διαφορά LSD_{5%} είχε τιμή 72,29, 138,06 και 73,12, αντίστοιχα. Για την πυκνότητα Β η αύξηση μεταξύ της 3^{ης} και 4^{ης} μέτρησης ήταν 100,6% και η αύξηση μεταξύ των δύο τελευταίων μετρήσεων ήταν 55,2%, ενώ για την πυκνότητα Α ήταν 101,3% και 64,1%, αντίστοιχα (Διάγραμμα 5.11).



Διάγραμμα 5.11. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα Α:28 φυτά/m² και πυκνότητα Β:40 φυτά/m²) στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά από 61, 75 και 89 ημέρες από τη σπορά (HMS). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

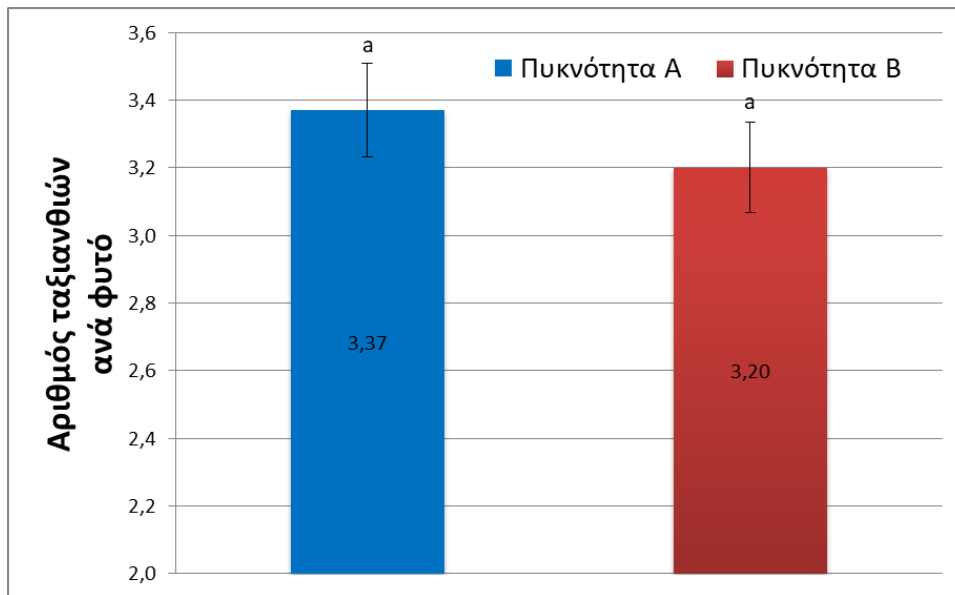
Αριθμός ταξιανθιών – Βάρος 1000 σπόρων – Απόδοση σε σπόρο

Στον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω της επίδρασης της πυκνότητας των φυτών (Πίνακας 5.9). Η διαφορά στον μέσο όρο του αριθμού των ταξιανθιών ανά φυτό για τις δύο αποστάσεις ήταν 5,3% (Διάγραμμα 5.12).

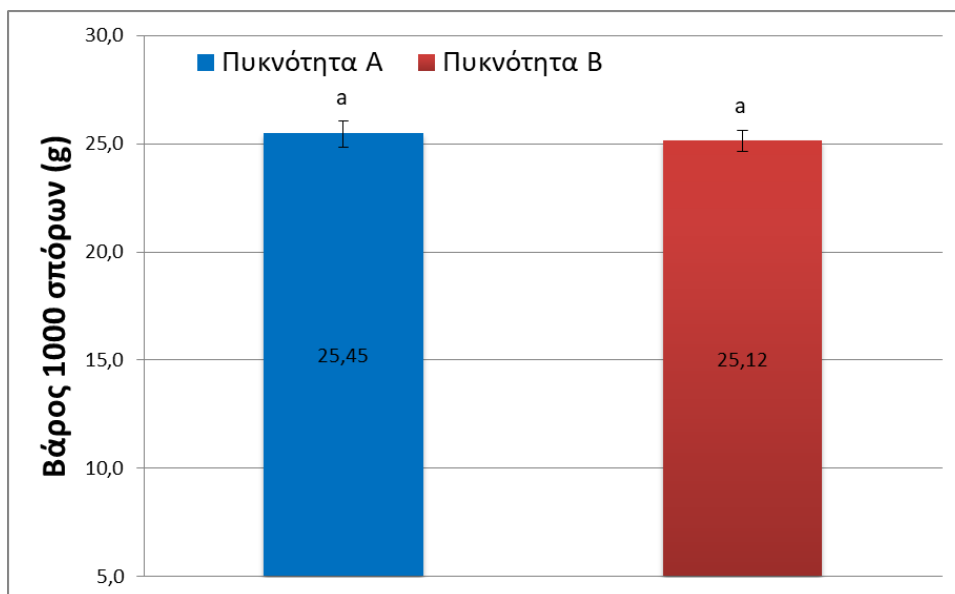
Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω της διαφορετικής πυκνότητας των φυτών για το βάρος 1000 σπόρων (Πίνακας 5.9), ενώ η διαφορά ανάμεσα στις δύο πυκνότητες ήταν 1,3% (Διάγραμμα 5.13).

Πίνακας 5.9. Ανάλυση διασποράς (τιμές F) για την επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στα χαρακτηριστικά του φυτού που μελετήθηκαν την περίοδο 2016-2017.

Επέμβαση	Διάμετρος ροζέτας (cm)			Ξηρό βάρος (kg/στρέμμα)					Αριθμός ταξιανθιών ανά φυτό	Βάρος 1000 σπόρων (g)	Απόδοση σε σπόρο (kg/στρέμμα)
	7/4/17	21/4/17	5/5/17	7/4/17	21/4/17	5/5/17	19/5/17	2/6/17			
	33 ΗΜΣ	47 ΗΜΣ	61 ΗΜΣ	33 ΗΜΣ	47 ΗΜΣ	61 ΗΜΣ	75 ΗΜΣ	89 ΗΜΣ			
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F	0,852 ^{ns}	0,080 ^{ns}	0,427 ^{ns}	6,050 [*]	5,640 [*]	9,799 ^{**}	10,562 ^{**}	60,456 ^{***}	0,605 ^{ns}	0,605 ^{ns}	170,182 ^{***}
LSD_{5%}	-	-	-	2,80	34,11	72,29	138,06	73,12	-	-	7,651
Επέμβαση	Συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD)				Ύψος (cm)			Έλαιο (%)	Απόδοση σε έλαιο (kg/στρέμμα)	Σιλυμαρίνη (%)	Απόδοση σε σιλυμαρίνη (kg/στρέμμα)
	7/4/17	21/4/17	5/5/17	19/5/17	5/5/17	19/5/17	2/6/17				
	33 ΗΜΣ	47 ΗΜΣ	61 ΗΜΣ	75 ΗΜΣ	61 ΗΜΣ	75 ΗΜΣ	89 ΗΜΣ				
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F	0,579 ^{ns}	1,503 ^{ns}	0,809 ^{ns}	1,937 ^{ns}	0,003 ^{ns}	0,968 ^{ns}	0,340 ^{ns}	16,206 ^{**}	177,660 ^{***}	2,591 ^{ns}	108,717 ^{***}
LSD_{5%}	-	-	-	-	-	-	-	0,46	1,58	-	0,47
<i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i>											
<i>*, **, ***: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05, 0,01 και 0,001, αντίστοιχα</i>											

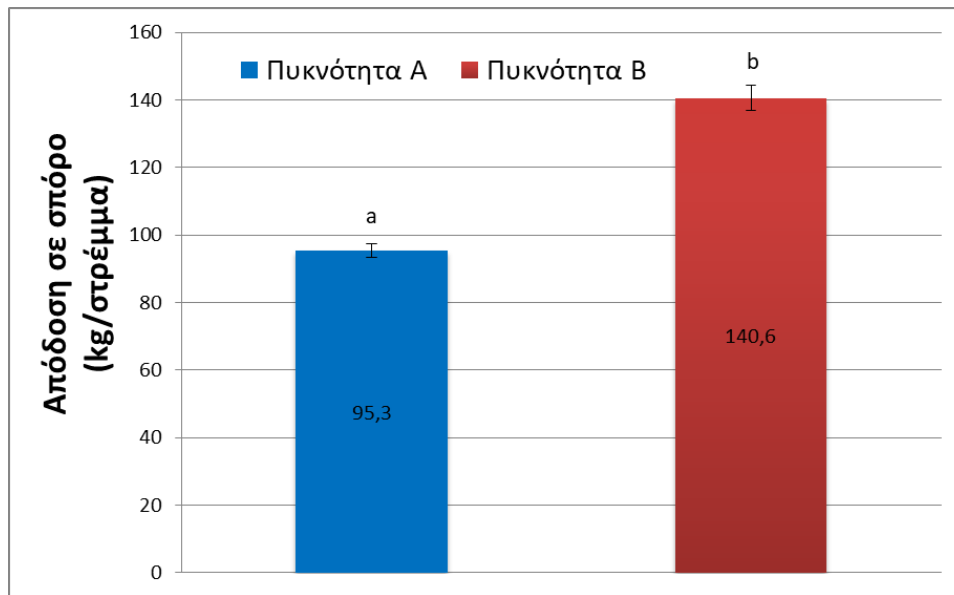


Διάγραμμα 5.12. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα A:28 φυτά/m² και πυκνότητα B:40 φυτά/m²) στον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).



Διάγραμμα 5.13. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα A:28 φυτά/m² και πυκνότητα B:40 φυτά/m²) στο βάρος των 1000 σπόρων (g). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

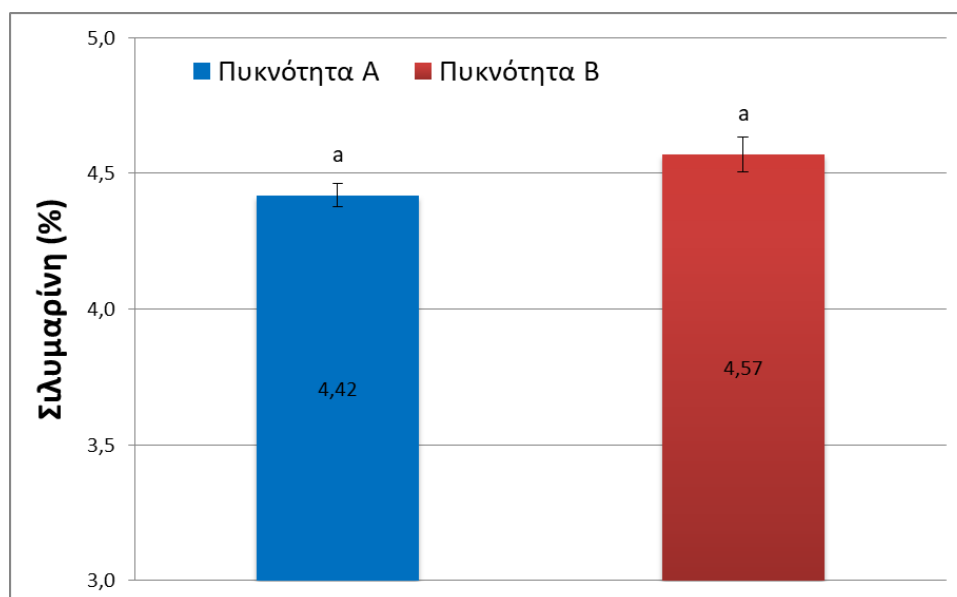
Όσον αφορά την απόδοση σε σπόρο, η πυκνότητα της καλλιέργειας την επηρέασε σημαντικά ($LSD_{5\%}=7,65$), σε επίπεδο σημαντικότητας 0,001 (Πίνακας 5.9). Ο μέσος όρος της απόδοσης σε σπόρο στην πυκνότητα B ήταν κατά 47,5% μεγαλύτερος από αυτόν στην πυκνότητα καλλιέργειας A (Διάγραμμα 5.14).



Διάγραμμα 5.14. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα Α:28 φυτά/m² και πυκνότητα Β:40 φυτά/m²) στην απόδοση σε σπόρο (kg/στρέμμα). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

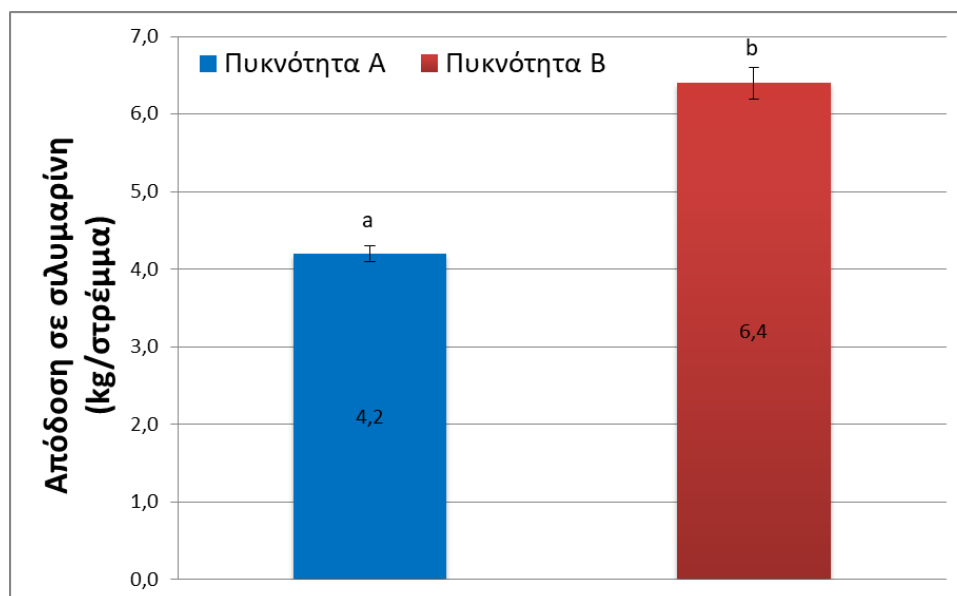
Περιεκτικότητα και απόδοση σε έλαιο και σιλυμαρίνη

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αποστάσεων για την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (Πίνακας 5.9). Η διαφορά ανάμεσα στους μέσους όρους της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη για τις δύο πυκνότητες καλλιέργειας ήταν 3,9% (Διάγραμμα 5.15).

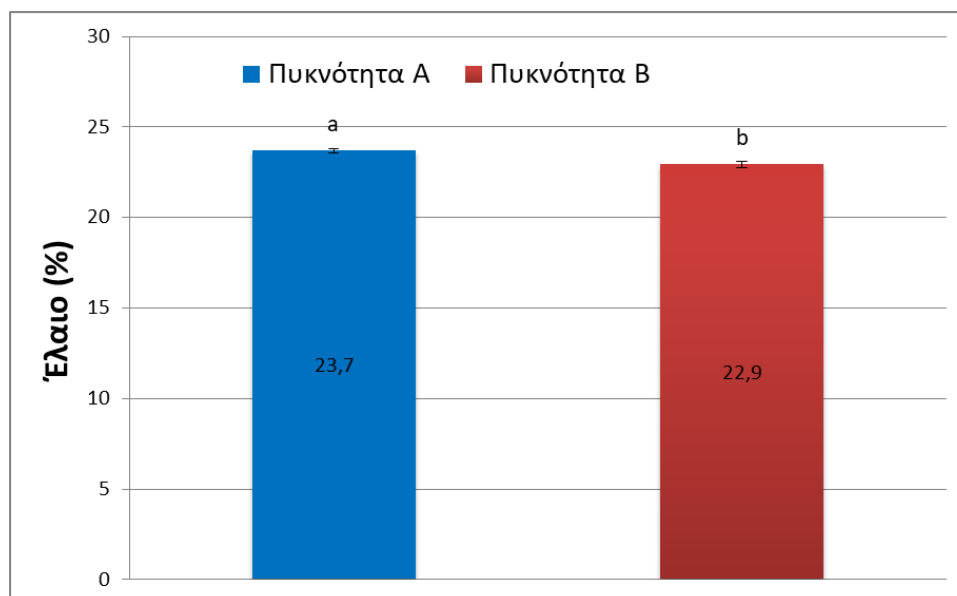


Διάγραμμα 5.15. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα Α:28 φυτά/m² και πυκνότητα Β:40 φυτά/m²) στην περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (%). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

Αντίθετα, παρατηρήθηκε επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στην απόδοση σε σιλυμαρίνη (Πίνακας 5.9) σε επίπεδο σημαντικότητας 0,001 ($LSD_{5\%}=0,47$). Ο μέσος όρος της απόδοσης σε σιλυμαρίνη στην πυκνότητα Β ήταν κατά 52,4% μεγαλύτερος από αυτόν στην καλλιέργεια της πυκνότητας Α (Διάγραμμα 5.16).



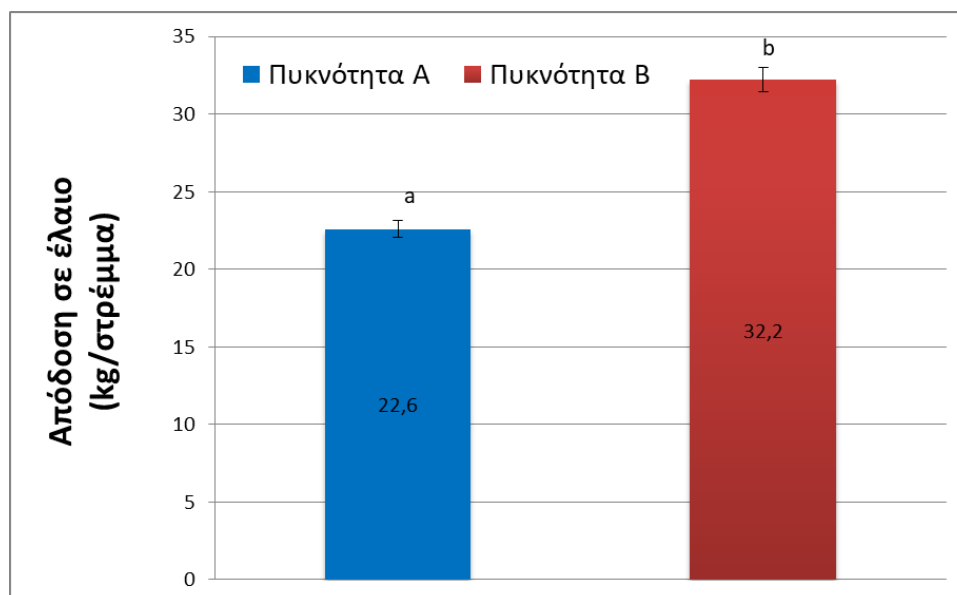
Διάγραμμα 5.16. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα Α:28 φυτά/m² και πυκνότητα Β:40 φυτά/m²) στην απόδοση σε σιλυμαρίνη (kg/στρέμμα). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).



Διάγραμμα 5.17. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα Α:28 φυτά/m² και πυκνότητα Β:40 φυτά/m²) στην περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο (%). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

Η πυκνότητα των φυτών είχε σημαντική επίδραση (Πίνακας 5.9) στην περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο ($LSD_{5\%}= 0,46$). Η υψηλότερη τιμή καταγράφηκε στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας, ενώ ο μέσος όρος της περιεκτικότητας σε έλαιο ήταν κατά 3,4% μεγαλύτερος στην πυκνότητα A από αυτόν στην καλλιέργεια της πυκνότητας B (Διάγραμμα 5.17).

Στατιστικά σημαντική επίδραση είχε η πυκνότητα της καλλιέργειας (Πίνακας 5.9) και στην απόδοση σε έλαιο (επίπεδο σημαντικότητας 0,001). Η υψηλότερη τιμή καταγράφηκε στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας ($LSD_{5\%}=1,58$). Ο μέσος όρος της απόδοσης σε έλαιο στην πυκνότητα B ήταν κατά 42,5% μεγαλύτερος από αυτόν στην καλλιέργεια της πυκνότητας A (Διάγραμμα 5.18).



Διάγραμμα 5.18. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας (πυκνότητα A:28 φυτά/m² και πυκνότητα B:40 φυτά/m²) στην απόδοση σε έλαιο (kg/στρέμμα). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

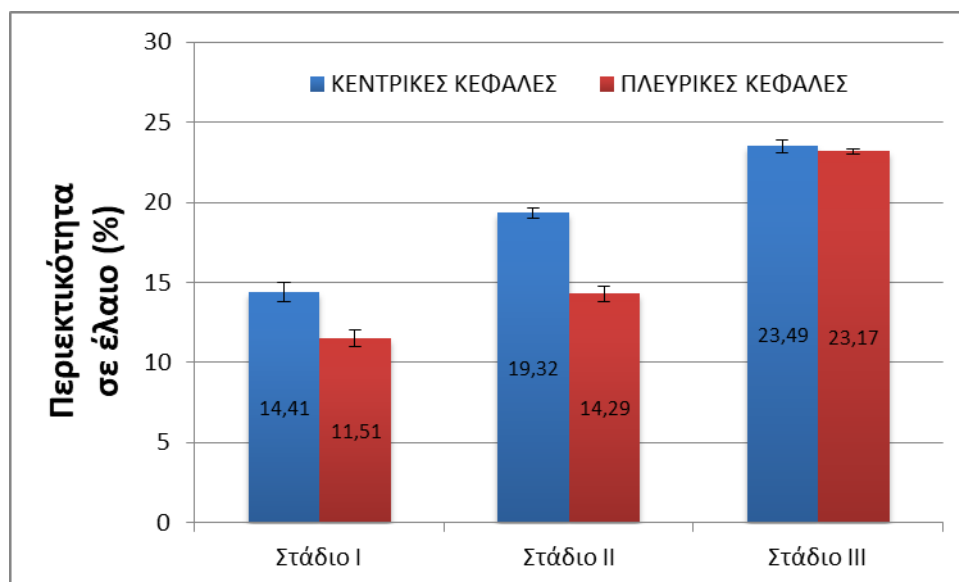
5.3.3. Αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε έλαιο και σε σιλυμαρίνη και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης. Μέτρηση χρώματος σπόρων και βάρους 1000 σπόρων.

Πραγματοποιήθηκε συγκομιδή ταξιανθιών, από τεμάχια στα οποία η πυκνότητα καλλιέργειας ήταν 40 φυτά/m², στα στάδια ανάπτυξης 75 (Στάδιο I), 79 (Στάδιο II) και 88 (Στάδιο III) της κλίμακας BBCH, όπως περιγράφεται από τον Martinelli *et al.* (2015) (Εικόνα 5.7).



Εικόνα 5.7. Φωτογραφίες φυτών και σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης: στάδιο I (BBCH 75), στάδιο II (BBCH 79) και στάδιο III (BBCH 88).

Περιεκτικότητα σε έλαιο

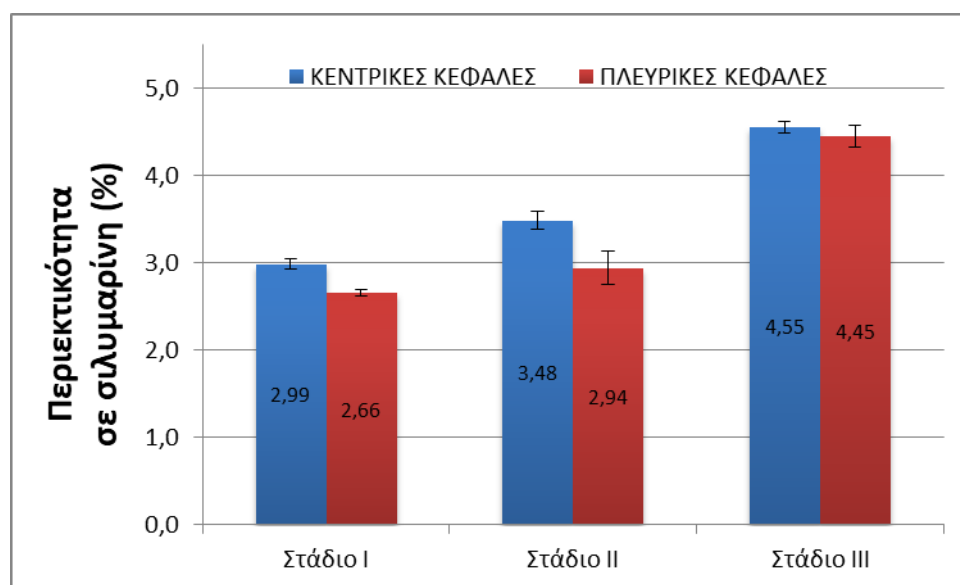


Διάγραμμα 5.19. Περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο (%) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

Ο μέσος όρος της περιεκτικότητας του σπόρου σε έλαιο στο στάδιο I ήταν 12,96%, στο στάδιο II ήταν 16,81%, ενώ στο στάδιο III ήταν 23,33%. Η αύξηση από το στάδιο I στο στάδιο II της περιεκτικότητας σε έλαιο ήταν 29,71%, ενώ από το στάδιο II στο στάδιο III ήταν 38,79%. Η αύξηση από το στάδιο I στο τελικό στάδιο συγκομιδής ήταν 80,02% και σε κάθε στάδιο οι κεντρικές κεφαλές είχαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε έλαιο από ότι οι πλευρικές (Διάγραμμα 5.19).

Περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη και στα συστατικά της

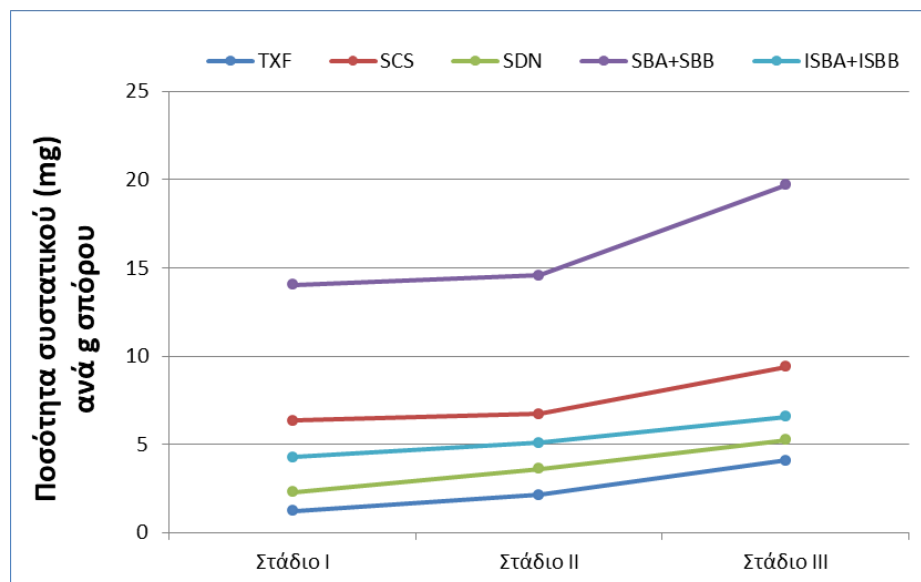
Στο στάδιο I η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κατά μέσο όρο ήταν 2,82%, στο στάδιο II ήταν 3,21%, ενώ στο στάδιο III αυξήθηκε σε 4,50%. Η μεταβολή της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη από το στάδιο I στο στάδιο II ήταν 13,85% και από το στάδιο II στο στάδιο III ήταν 40,06%, ενώ από το στάδιο I στο III ήταν 59,57% (Διάγραμμα 5.20).



Διάγραμμα 5.20. Περιεκτικότητα του σπόρου σε σιλυμαρίνη (%) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

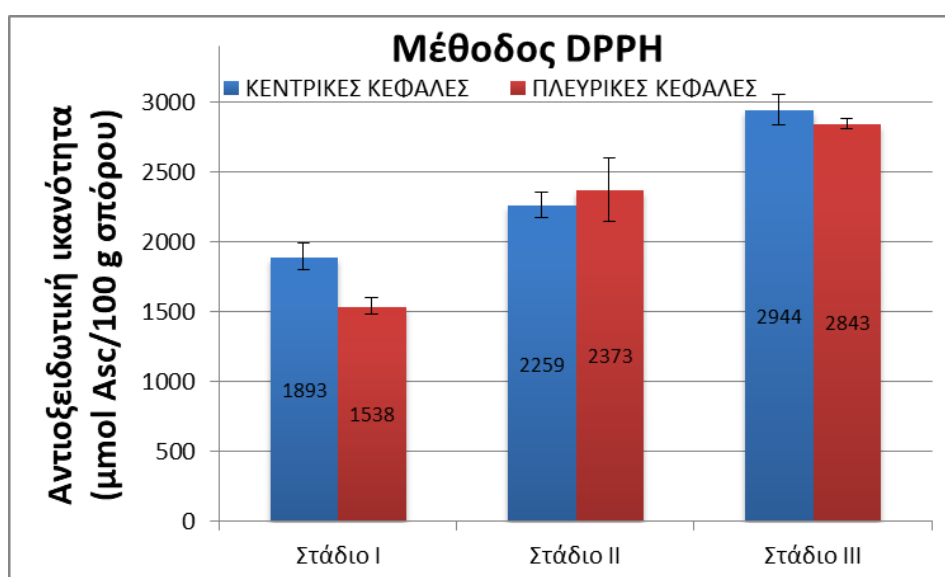
Η περιεκτικότητα του σπόρου κατά μέσο όρο (κεντρικές και πλευρικές κεφαλές) στο στάδιο III σε ταξιφολίνη ήταν 4,08 mg ανά g σπόρου, σε σιλυχριστίνη 9,41 mg/g, σε σιλυδιανίνη 5,25 mg/g, σε σιλυβίνη (A και B) ήταν 19,68 mg/g, ενώ σε ισοσιλυβίνη (A και B) 6,56 mg/g. Η αύξηση της σιλυβίνης από το στάδιο I στο στάδιο II ήταν 3,56%, ενώ από το στάδιο II στο στάδιο III ήταν 35,16%. Η μεταβολή

από το στάδιο I στο τελικό στάδιο ήταν για την ταξιφολίνη 231,71%, ενώ για τη σιλυχριστίνη 48,19% (Διάγραμμα 5.21). Τα ποσοστά μεταβολής ήταν αντίστοιχα για τις κεντρικές ή πλευρικές κεφαλές με τον μέσο όρο.



Διάγραμμα 5.21. Μέσος όρος της περιεκτικότητας του σπόρου (κεντρικές και πλευρικές κεφαλές) σε συστατικά σιλυμαρίνης (mg/g), στα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88). TXF: ταξιφολίνη, SCS: σιλυχριστίνη, SDN: σιλυδιανίνη, SBA: σιλυβίνη A, SBB: σιλυβίνη B, ISBA: ισοσιλυβίνη A και ISBB: ισοσιλυβίνη B.

Αντιοξειδωτική ικανότητα – Μέθοδος DPPH

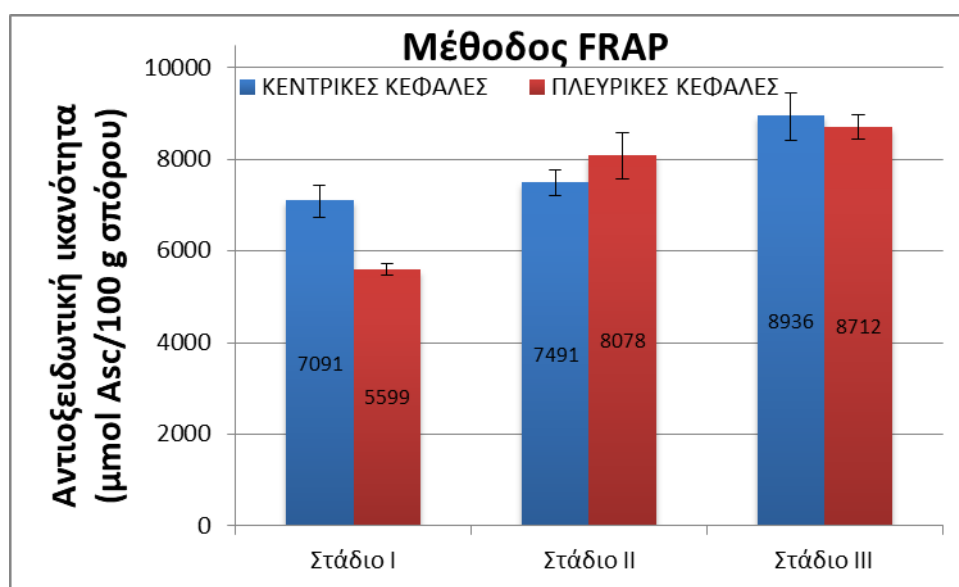


Διάγραμμα 5.22. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλίσματος σπόρων (μmol ασκορβικού οξέος ανά 100 g σπόρου) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος των σπόρων του φυτού στο στάδιο I ήταν 1716 μmol ασκορβικού οξέος ανά 100 g σπόρου ($\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$), ενώ στο στάδιο II ήταν 2316 $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$ και στο στάδιο III ήταν 2893 $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$. Η αύξηση από το στάδιο I στο στάδιο II ήταν 34,97%, από το στάδιο II στο στάδιο III ήταν 24,91%, ενώ από το στάδιο I στο στάδιο III ήταν 68,59% (Διάγραμμα 5.22).

Αντιοξειδωτική ικανότητα – Μέθοδος FRAP

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος των σπόρων του φυτού στο στάδιο I ήταν 6345 $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$ σπόρου, στο στάδιο II ήταν 7785 $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$, ενώ στο στάδιο III ήταν 8824 $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$. Η μεταβολή από το στάδιο I στο στάδιο III ήταν 39,07%, ενώ από το στάδιο I στο στάδιο II ήταν 22,70% και από το στάδιο II στο στάδιο III 13,35% (Διάγραμμα 5.23).

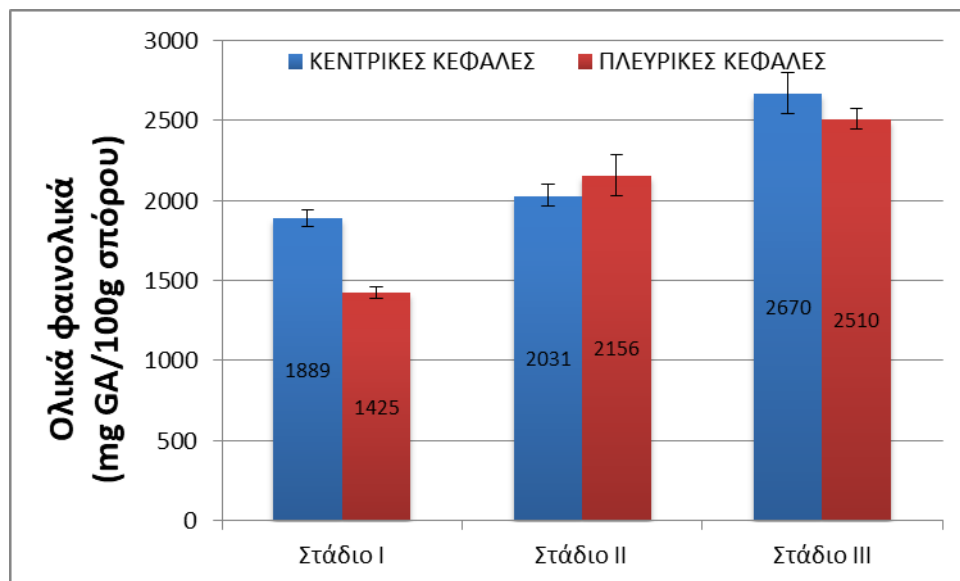


Διάγραμμα 5.23. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλίσματος σπόρων (μmol ασκορβικού οξέος ανά 100 g σπόρου) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

Ολικά φαινολικά – Μέθοδος FOLIN-CIOCALTEU

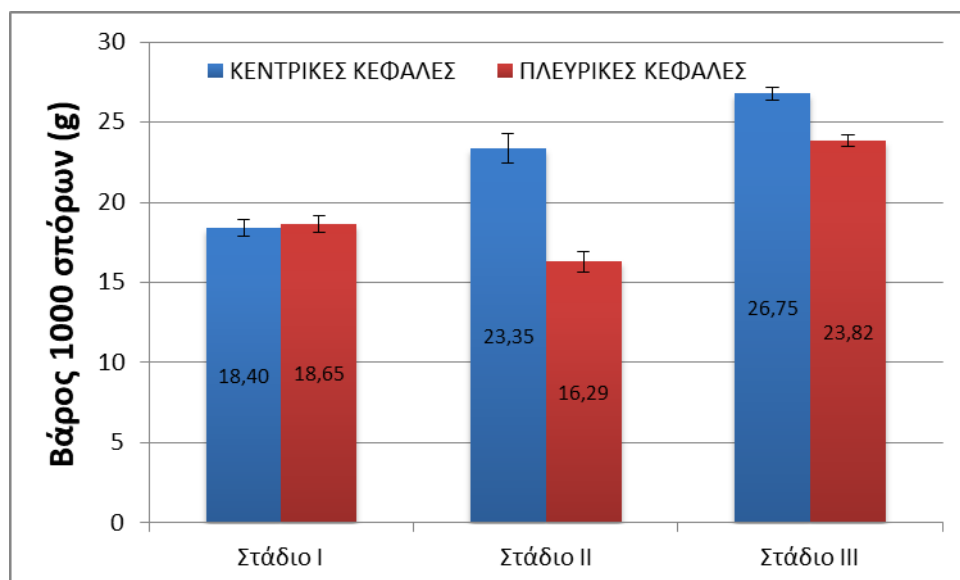
Στο πρώτο στάδιο συγκομιδής τα ολικά φαινολικά ήταν 1657 mg γαλλικού οξέος (GA) ανά 100 g σπόρου, στο δεύτερο στάδιο συγκομιδής ήταν 2093 mg GA/100g, ενώ στο τελικό στάδιο ήταν 2590 mg GA ανά 100 g σπόρου. Η αύξηση από το στάδιο

I στο στάδιο II ήταν 26,31%, από το στάδιο II στο στάδιο III ήταν 23,74%, ενώ από το στάδιο I στο στάδιο III ήταν 56,31% (Διάγραμμα 5.24).



Διάγραμμα 5.24. Ολικά φαινολικά στο εκχύλισμα των σπόρων (mg γαλλικού οξέος (GA) ανά 100 g σπόρου) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

Βάρος 1000 σπόρων



Διάγραμμα 5.25. Βάρος 1000 σπόρων (g) στις κεντρικές και πλευρικές κεφαλές κατά τα στάδια ωρίμανσης I (BBCH 75), II (BBCH 79) και III (BBCH 88). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm SE).

Ο μέσος όρος του βάρους 1000 σπόρων στο στάδιο I ήταν 18,52 g, στο στάδιο II ήταν 19,82 g, ενώ στο τελευταίο στάδιο αυξήθηκε στα 25,29 g. Η μεταβολή από το στάδιο I στο στάδιο III ήταν 36,6%, ενώ από το στάδιο I στο στάδιο II ήταν 7,0% και από το στάδιο II στο στάδιο III 27,6%. Στα δύο τελευταία στάδια ωρίμανσης το βάρος 1000 σπόρων ήταν μεγαλύτερο στις κεντρικές κεφαλές από ότι στις πλευρικές κεφαλές (Διάγραμμα 5.25).

Χρώμα σπόρων

Στο πρώτο στάδιο συγκομιδής οι σπόροι είχαν ρίγες μωβ/καφέ χρώματος. Το χρώμα των σπόρων στο στάδιο II ήταν γυαλιστερό καφέ/μαύρο, ενώ στο στάδιο III ήταν σκούρο καφέ (Εικόνα 5.7). Μετά την ξήρανση το χρώμα των σπόρων ήταν ανοιχτό καφέ, καφέ και σκούρο καφέ στα στάδια I, II και III αντίστοιχα (Εικόνα 5.8).

Πίνακας 5.10. Χαρακτηριστικά χρώματος σε σπόρους διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης: στάδιο I (BBCH 75), στάδιο II (BBCH 79) και στάδιο III (BBCH 88). L*: φωτεινότητα (Lightness), C*: χρωματική πυκνότητα (Chroma), h°: χροιά (hue angle).

	L*	C*	h°
Στάδιο I	36,65±1,05	10,98±0,54	75,64±1,03
Στάδιο II	34,53±0,92	10,56±0,55	76,43±1,52
Στάδιο III	34,07±1,04	10,74±0,21	76,32±1,78



Εικόνα 5.8. Φωτογραφίες σπόρων από κεντρικές κεφαλές διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης (μετά την ξήρανση): στάδιο I (BBCH 75), στάδιο II (BBCH 79) και στάδιο III (BBCH 88).

5.3.4. Καλλιεργητική περίοδος 2017-2018

Διάμετρος ροζέτας

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο πυκνοτήτων σποράς κατά την 1^η μέτρηση. Η επίδραση της πυκνότητας των φυτών ήταν στατιστικά σημαντική στη 2^η μέτρηση, όπου η μεγαλύτερη τιμή καταγράφηκε στην επέμβαση της πυκνότητας Α (Πίνακας 5.11). Η αύξηση από την 1^η στη 2^η μέτρηση για την πυκνότητα Α ήταν 179,0%, ενώ για την πυκνότητα Β ήταν 122,0%.

Πίνακας 5.11. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στη διάμετρο της ροζέτας των φυτών μετά από 98 και 128 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ).

Επέμβαση	Διάμετρος ροζέτας (cm)	
	05/02/2018	07/03/2018
	98 ΗΜΣ	128 ΗΜΣ
Παράγοντας: Πυκνότητα φυτών		
Πυκνότητα Α	16,2	45,2
Πυκνότητα Β	17,3	38,4
Ανάλυση διασποράς		
Τιμές F	1,884 ^{ns}	35,949 ^{***}
LSD_{5%}	-	2,50
<i>Πυκνότητα Α: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα Β: 40 φυτά/m²</i>		
<i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i>		
<i>***: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,001</i>		

Συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD)

Στην 1^η και 2^η μέτρηση, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στην 3^η και την 4^η μέτρηση η μεγαλύτερη τιμή καταγράφηκε στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας Α, με την επίδραση της πυκνότητας της καλλιέργειας να είναι στατιστικά σημαντική. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης στις δύο πυκνότητες διέφερε κατά 6,1% και 8,1% στην 3^η και την 4^η μέτρηση, αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω της εφαρμογής του meriquat chloride στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης και δεν υπήρξε αλληλεπίδραση μεταξύ της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης (Πίνακας 5.12).

Πίνακας 5.12. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στη συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD) μετά από 98 και 128 ημέρες από τη σπορά (HMΣ) και μετά από 24 και 38 ημέρες από την πρώτη εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης (HME).

Επέμβαση	Συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD)			
	05/02	07/03	20/04	04/05
	98 HMΣ	128 HMΣ	24 HME	38 HME
Παράγοντας 1: Πυκνότητα φυτών				
Πυκνότητα Α	40,5	37,5	40,2	38,7
Πυκνότητα Β	41,4	38,6	37,9	35,8
LSD _{5%}	-	-	0,74	0,86
Παράγοντας 2: Meriquat chloride				
Μάρτυρας	-	-	39,2	37,1
MC7,5	-	-	38,4	36,5
MC10	-	-	39,8	37,5
MC11,2	-	-	38,9	38,0
LSD _{5%}	-	-	-	-
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F				
Πυκνότητα φυτών (D)	0,686 ^{ns}	0,779 ^{ns}	43,639 ^{***}	49,944 ^{***}
Meriquat chloride (MC)	-	-	2,561 ^{ns}	2,558 ^{ns}
D x MC	-	-	0,257 ^{ns}	0,655 ^{ns}
<i>Πυκνότητα Α: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα Β: 40 φυτά/m²</i> <i>MC7,5: εφαρμογή MC στη δόση των 7,5 g δ.ο./στρέμμα, MC10: εφαρμογή MC στη δόση των 10 g δ.ο./στρέμμα και MC11,2: εφαρμογή MC σε δύο δόσεις 37,5 g δ.ο./στρέμμα και 75 g δ.ο./στρέμμα με διάστημα 2 εβδομάδων μεταξύ των ψεκασμών.</i> <i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i> <i>***: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,001</i> <i>° Στις 98 και 128 HMΣ δεν είχε εφαρμοστεί ακόμη ο ρυθμιστής ανάπτυξης.</i>				

Ύψος φυτών

Στην 1^η μέτρηση δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στη 2^η, 3^η και 4^η μέτρηση η επίδραση της πυκνότητας της καλλιέργειας ήταν στατιστικά σημαντική, με τις μεγαλύτερες τιμές να καταγράφονται στην καλλιέργεια της

μικρότερης πυκνότητας Α. Στην 4^η μέτρηση οι τιμές του ύψους κυμάνθηκαν από 133,6 cm έως 158,5 cm (Πίνακας 5.13).

Πίνακας 5.13. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στο ύψος των φυτών μετά από 141 ημέρες από τη σπορά (HMS) και μετά από 8, 24 και 38 ημέρες από την πρώτη εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης (HME).

Επέμβαση	Ύψος (cm)			
	20/03	04/04	20/04	04/05
	141HMS	8 HME	24 HME	38 HME
Παράγοντας 1: Πυκνότητα φυτών				
Πυκνότητα Α	22,3	70,4	129,7	156,1
Πυκνότητα Β	24,0	60,3	114,5	133,6
LSD_{5%}		4,20	5,01	9,52
Παράγοντας 2: Meriquat chloride				
Μάρτυρας	-	68,5	135,8 ^a	158,5 ^a
MC7,5	-	62,1	122,5 ^b	145,2 ^{ab}
MC10	-	64,1	114,2 ^c	140,8 ^b
MC11,2	-	66,7	115,9 ^c	135,0 ^b
LSD_{5%}	-	-	7,09	13,46
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F				
Πυκνότητα φυτών (D)	2,327 ^{ns}	25,804 ^{***}	41,189 ^{***}	25,129 ^{***}
Meriquat chloride (MC)	-	2,021 ^{ns}	17,133 ^{***}	4,940 [*]
D x MC	-	0,090 ^{ns}	1,707 ^{ns}	2,256 ^{ns}
<p><i>Πυκνότητα Α: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα Β: 40 φυτά/m²</i></p> <p><i>MC7,5: εφαρμογή MC στη δόση των 7,5 g δ.ο./στρέμμα, MC10: εφαρμογή MC στη δόση των 10 g δ.ο./στρέμμα και MC11,2: εφαρμογή MC σε δύο δόσεις 37,5 g δ.ο./στρέμμα και 75 g δ.ο./στρέμμα με διάστημα 2 εβδομάδων μεταξύ των ψεκασμών.</i></p> <p><i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i></p> <p><i>*, ***: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και 0,001, αντίστοιχα</i></p> <p><i>° Στις 141 HMS δεν είχε εφαρμοστεί ακόμη ο ρυθμιστής ανάπτυξης.</i></p>				

Στατιστικά σημαντικές διαφορές, όσον αφορά την επίδραση του meriquat chloride, παρατηρήθηκαν στις δύο τελευταίες μετρήσεις. Τα μικρότερα ύψη φυτών καταγράφηκαν στην 3^η μέτρηση στην επέμβαση MC10 με τιμή 114,2 cm και στην 4^η

μέτρηση στην επέμβαση MC11,2 με τιμή 135,0 cm, μικρότερες κατά 15,9% και 14,8% από τις αντίστοιχες τιμές για την επέμβαση του αψέκαστου μάρτυρα. Μεταξύ της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης δεν υπήρξε αλληλεπίδραση.

Ξηρό βάρος

Το ξηρό βάρος στην τελευταία μέτρηση κυμάνθηκε από 1908,9 έως 2150,9 kg/στρέμμα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών, λόγω της πυκνότητας καλλιέργειας, με τις μεγαλύτερες τιμές να καταγράφονται στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας (Πίνακες 5.14 και 5.15). Η αύξηση του ξηρού βάρους από την 2^η στην 3^η μέτρηση ήταν για την πυκνότητα Α 46,7% και για την πυκνότητα Β 59,9%, ενώ από την 3^η στην 4^η μέτρηση ήταν 134,2% και 106,6%, αντίστοιχα.

Πίνακας 5.14. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά από 98, 128 και 141 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ).

Επέμβαση	Ξηρό βάρος (kg/στρέμμα)		
	05/02	07/03	20/03
	98ΗΜΣ	128ΗΜΣ	141ΗΜΣ
Παράγοντας: Πυκνότητα φυτών			
Πυκνότητα Α	52,7	279,8	410,6
Πυκνότητα Β	81,4	323,4	517,1
Ανάλυση Διασποράς			
Τιμές F	31,160 ^{***}	7,914 [*]	94,194 ^{***}
LSD_{5%}	11,32	34,14	24,15
<i>Πυκνότητα Α: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα Β: 40 φυτά/m²</i>			
<i>*, ***: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και 0,001, αντίστοιχα</i>			
<i>° Δεν είχε εφαρμοστεί ακόμη ο ρυθμιστής ανάπτυξης.</i>			

Η εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών (Πίνακας 5.15).

Πίνακας 5.15. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μετά από 8, 24 και 38 ημέρες από την πρώτη εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης (HME).

Επέμβαση	Ξηρό βάρος (kg/στρέμμα)		
	04/04	20/04	04/05
	8HME	24HME	38HME
Παράγοντας 1: Πυκνότητα φυτών			
Πυκνότητα Α	961,5	1620,4	1908,9
Πυκνότητα Β	1068,1	1807,4	2150,9
LSD_{5%}	73,45	92,49	174,31
Παράγοντας 2: Meriquat chloride			
Μάρτυρας	1025,6	1701,2	2028,8
MC7,5	998,2	1706,0	1964,7
MC10	1017,3	1694,1	2048,9
MC11,2	1018,0	1754,4	2077,2
LSD_{5%}	-	-	-
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F			
Πυκνότητα φυτών (D)	9,453 ^{**}	18,365 ^{***}	8,656 [*]
Meriquat chloride (MC)	0,114 ^{ns}	0,395 ^{ns}	0,798 ^{ns}
D x MC	0,336 ^{ns}	0,184 ^{ns}	0,948 ^{ns}
<i>Πυκνότητα Α: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα Β: 40 φυτά/m²</i>			
<i>MC7,5: εφαρμογή MC στη δόση των 7,5 g δ.ο./στρέμμα, MC10: εφαρμογή MC στη δόση των 10 g δ.ο./στρέμμα και MC11,2: εφαρμογή MC σε δύο δόσεις 37,5 g δ.ο./στρέμμα και 75 g δ.ο./στρέμμα με διάστημα 2 εβδομάδων μεταξύ των ψεκασμών.</i>			
<i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i>			
<i>*, **, ***: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05, 0,01 και 0,001, αντίστοιχα</i>			

Αριθμός ταξιανθιών – Βάρος 1000 σπόρων – Απόδοση σε σπόρο

Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω της επίδρασης της πυκνότητας των φυτών και στα τρία χαρακτηριστικά, με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας. Ο αριθμός των ταξιανθιών ανά φυτό ήταν κατά 32,0% μεγαλύτερος στην πυκνότητα Α από ότι στην πυκνότητα Β, ενώ το βάρος 1000 σπόρων διέφερε κατά 4,2% στις δύο πυκνότητες.

Όσον αφορά την απόδοση σε σπόρο, η τιμή στην πυκνότητα καλλιέργειας A ήταν κατά 24,0% μεγαλύτερη από την τιμή της απόδοσης στην πυκνότητα B. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω της εφαρμογής του ρυθμιστή ανάπτυξης για κάποιο από τα παραπάνω χαρακτηριστικά, ενώ δεν υπήρξε αλληλεπίδραση μεταξύ της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης (Πίνακας 5.16).

Πίνακας 5.16. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό, το βάρος των 1000 σπόρων (g) και την απόδοση σε σπόρο (kg/στρέμμα).

Επέμβαση	Αριθμός ταξιανθιών ανά φυτό	Βάρος 1000 σπόρων (g)	Απόδοση σε σπόρο (kg/στρέμμα)
Παράγοντας 1: Πυκνότητα φυτών			
Πυκνότητα A	5,53	22,29	179,0
Πυκνότητα B	4,19	21,40	144,4
LSD _{5%}	0,71	0,77	29,05
Παράγοντας 2: Meriquat chloride			
Μάρτυρας	5,00	21,46	172,3
MC7,5	4,79	21,93	149,7
MC10	4,72	22,26	158,5
MC11,2	4,92	21,73	166,3
LSD _{5%}	-	-	-
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F			
Πυκνότητα φυτών (D)	15,969 ^{**}	6,035 [*]	6,371 [*]
Meriquat chloride (MC)	0,138 ^{ns}	0,864 ^{ns}	0,513 ^{ns}
D x MC	0,326 ^{ns}	1,062 ^{ns}	0,130 ^{ns}
<i>Πυκνότητα A: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα B: 40 φυτά/m²</i> <i>MC7,5: εφαρμογή MC στη δόση των 7,5 g δ.ο./στρέμμα, MC10: εφαρμογή MC στη δόση των 10 g δ.ο./στρέμμα και MC11,2: εφαρμογή MC σε δύο δόσεις 37,5 g δ.ο./στρέμμα και 75 g δ.ο./στρέμμα με διάστημα 2 εβδομάδων μεταξύ των ψεκασμών.</i> <i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i> <i>*, **: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και 0,01, αντίστοιχα</i>			

Περιεκτικότητα και απόδοση σε έλαιο και σιλυμαρίνη

Η περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο κυμάνθηκε από 24,2 έως 25,0%, ενώ η απόδοση σε έλαιο κυμάνθηκε από 35,3 έως 44,4 kg/στρέμμα. Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε από 2,26 έως 2,69%, ενώ η απόδοση σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε από 3,3 έως 4,8 kg/στρέμμα (Πίνακας 5.17).

Πίνακας 5.17. Επίδραση της πυκνότητας καλλιέργειας και του ρυθμιστή ανάπτυξης meriquat chloride (MC) στην περιεκτικότητα του σπόρου σε έλαιο (%), την απόδοση σε έλαιο (kg/στρέμμα), την περιεκτικότητα του σπόρου σε σιλυμαρίνη (%) και την απόδοση σε σιλυμαρίνη (kg/στρέμμα).

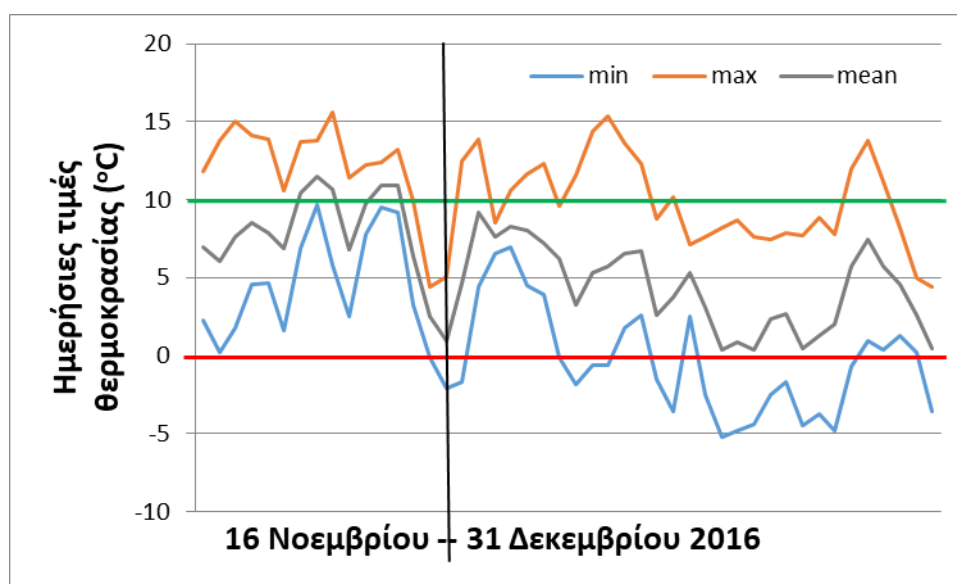
Επέμβαση	Έλαιο (%)	Απόδοση σε έλαιο (kg/στρέμμα)	Σιλυμαρίνη (%)	Απόδοση σε σιλυμαρίνη (kg/στρέμμα)
Παράγοντας 1: Πυκνότητα φυτών				
Πυκνότητα Α	24,8	44,4	2,69	4,8
Πυκνότητα Β	24,5	35,3	2,26	3,3
LSD_{5%}	-	7,13	0,42	1,07
Παράγοντας 2: Meriquat chloride				
Μάρτυρας	25,0	42,8	2,39	4,2
MC7,5	24,2	36,2	2,35	3,6
MC10	24,8	39,2	2,69	4,3
MC11,2	24,6	41,2	2,46	4,2
LSD_{5%}	-	-	-	-
Ανάλυση Διασποράς - Τιμές F				
Πυκνότητα φυτών (D)	0,629 ^{ns}	7,400 [*]	4,587 [*]	8,956 ^{**}
Meriquat chloride (MC)	0,789 ^{ns}	0,710 ^{ns}	0,562 ^{ns}	0,362 ^{ns}
D x MC	2,191 ^{ns}	0,123 ^{ns}	0,052 ^{ns}	0,950 ^{ns}
<p><i>Πυκνότητα Α: 28 φυτά/m² και Πυκνότητα Β: 40 φυτά/m²</i></p> <p><i>MC7,5: εφαρμογή MC στη δόση των 7,5 g δ.ο./στρέμμα, MC10: εφαρμογή MC στη δόση των 10 g δ.ο./στρέμμα και MC11,2: εφαρμογή MC σε δύο δόσεις 37,5 g δ.ο./στρέμμα και 75 g δ.ο./στρέμμα με διάστημα 2 εβδομάδων μεταξύ των ψεκασμών.</i></p> <p><i>ns: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά</i></p> <p><i>*, **: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και 0,01, αντίστοιχα</i></p>				

Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αποστάσεων για την απόδοση σε έλαιο, την απόδοση σε σιλυμαρίνη και για την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη, με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας Α. Η περιεκτικότητα σε έλαιο διέφερε μόνο κατά 1,2% για τις δύο διαφορετικές πυκνότητες, ενώ η απόδοση σε έλαιο στην πυκνότητα Α ήταν κατά 25,8% μεγαλύτερη αυτής στην πυκνότητα Β. Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη διέφερε κατά 19,0% μεταξύ των δύο πυκνοτήτων της καλλιέργειας, ενώ η απόδοση σε σιλυμαρίνη διέφερε κατά 45,4%. Δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω της εφαρμογής του ρυθμιστή ανάπτυξης τόσο στην περιεκτικότητα όσο και στην απόδοση σε έλαιο και σιλυμαρίνη.

5.4 Συζήτηση

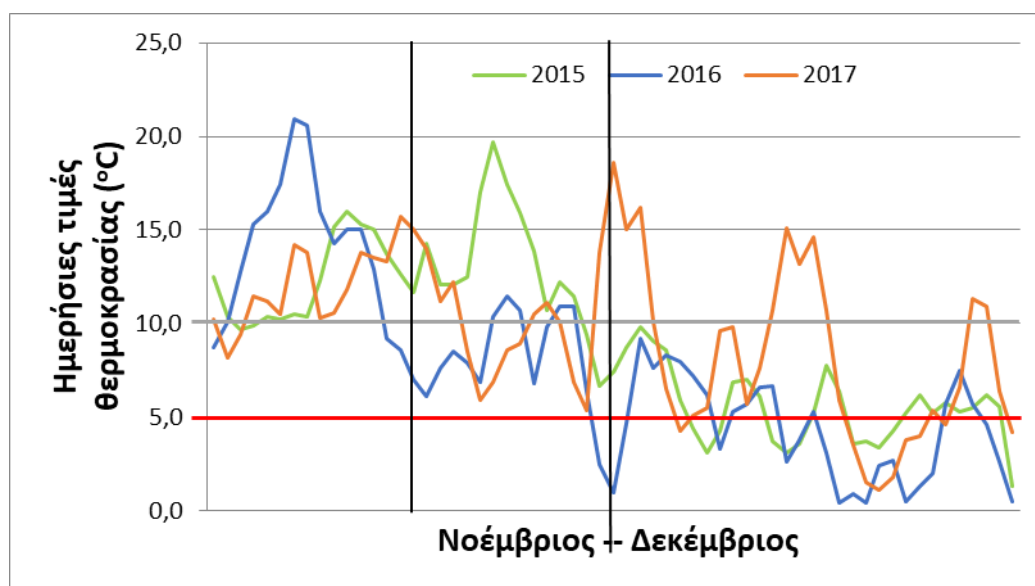
5.4.1 Επίδραση θερμοκρασίας στη βλάστηση των σπόρων

Κατά τη δεύτερη καλλιεργητική περίοδο, 2016-2017, η σπορά πραγματοποιήθηκε στις 16 Νοεμβρίου του 2016, αλλά οι συνθήκες ήταν ιδιαίτερα δυσμενείς για το φύτευμα των σπόρων, οπότε έγινε δεύτερη σπορά στις αρχές Μαρτίου του 2017.



Διάγραμμα 5.26. Ελάχιστες (min), μέγιστες (max) και μέσες (mean) ημερήσιες τιμές θερμοκρασίας από τις 16 Νοεμβρίου έως τις 31 Δεκεμβρίου 2016.

Το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Νοεμβρίου του 2016 η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε από 2,5 έως 11,5 °C, ενώ τον Δεκέμβριο του ίδιου χρόνου η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε από 0,4 έως 9,2 °C (Διάγραμμα 5.26). Αυτό το χρονικό διάστημα (46 ημέρες) η μέγιστη θερμοκρασία ήταν μικρότερη των 10 °C για 19 ημέρες, ενώ η ελάχιστη θερμοκρασία ήταν μικρότερη των 5 °C για 38 ημέρες, με τις 20 από αυτές τις ημέρες να είναι μικρότερη των 0 °C. Την καλλιεργητική περίοδο 2015-2016 η σπορά έγινε στις 5 Νοεμβρίου και τις πρώτες 30 ημέρες μετά τη σπορά η μέση θερμοκρασία ήταν 12,4 °C, με τη μέση ημερήσια θερμοκρασία να είναι μικρότερη των 10 °C μόνο για 7 ημέρες (Διάγραμμα 5.27). Την 2^η καλλιεργητική περίοδο η μέση θερμοκρασία για τις πρώτες 30 ημέρες μετά τη σπορά ήταν 9,4 °C, με τη μέση ημερήσια θερμοκρασία να είναι μικρότερη των 10 °C για 25 ημέρες. Την 3^η καλλιεργητική περίοδο (2017-2018) η σπορά έγινε στις 30 Οκτωβρίου και τις πρώτες 30 ημέρες μετά τη σπορά η μέση θερμοκρασία ήταν 10,9 °C, ενώ η μέση ημερήσια θερμοκρασία ήταν μικρότερη των 10 °C για 9 ημέρες.



Διάγραμμα 5.27. Ημερήσιες μέσες τιμές θερμοκρασίες τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο για τα έτη 2015, 2016 και 2017. Η πρώτη κάθετη μαύρη γραμμή είναι στις 16 Νοεμβρίου, ενώ η δεύτερη στην 1 Δεκεμβρίου.

Σύμφωνα με τους Young *et al.* (1978), σε σταθερή θερμοκρασία 2 °C η βλάστηση των σπερμάτων του γαϊδουράγκαθου ήταν μόνο 2% (5 μήνες μετά τη συγκομιδή), ενώ σε πειράματα με διακύμανση θερμοκρασίας (0 °C για 16 ώρες και 10 °C για 8 ώρες) η βλαστική ικανότητα ήταν 0% και σε διακύμανση 2/5 °C (16h/8h) ήταν 15%. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Groves και Kaye (1989) σύμφωνα με

τους οποίους σε θερμοκρασίες 15/5 °C (ημέρα/νύχτα) το ποσοστό βλάστησης ήταν 20%, ενώ σύμφωνα με τους Martin *et al.* (2000) το φύτρωμα των σπόρων ήταν σχεδόν μηδενικό όταν η θερμοκρασία του εδάφους σε βάθος 10 cm ήταν 6 °C.

5.4.2 Χαρακτηριστικά καλλιέργειας κατά τη βλαστητική φάση ανάπτυξης

Η πυκνότητα της καλλιέργειας είχε σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και τη φυσιολογία των φυτών. Οι μεγαλύτερες τιμές για τη διάμετρο της ροζέτας καταγράφηκαν στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας A κατά την 1^η και 3^η καλλιεργητική περίοδο, ενώ κατά την περίοδο 2016-2017 δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά, λόγω της μικρότερης περιόδου ανάπτυξης των φυτών, με τη διαφορά ανάμεσα στις δύο πυκνότητες της καλλιέργειας να είναι 2% (Εικόνα 5.9).



Εικόνα 5.9. Μέτρηση διαμέτρου ροζέτας (07/03/2018).

Οι μεγαλύτερες τιμές για το ύψος των φυτών καταγράφηκαν στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας A, αν και κατά την 2^η καλλιεργητική περίοδο δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά, με τα ύψη να διαφέρουν μόνο κατά 2% στις δύο πυκνότητες. Σε πειράματα που διεξήχθησαν στην Πολωνία, το μεγαλύτερο ύψος φυτών καταγράφηκε, επίσης, στη μικρότερη πυκνότητα καλλιέργειας, περίπου 40 φυτά/m² (Andrzejewska *et al.*, 2011), όπως και σε πειράματα που έγιναν στην Αίγυπτο (Omer *et al.*, 1993). Αντίθετα, οι Katar *et al.* (2013) ανέφεραν ότι το μεγαλύτερο ύψος φυτών παρατηρήθηκε στη μεγαλύτερη πυκνότητα καλλιέργειας, η οποία ήταν όμως μόνο 4 φυτά/m². Τέλος, οι Martin *et al.* (2002) και οι Tahernia *et al.* (2014) δεν διαπίστωσαν στατιστικά σημαντική επίδραση της πυκνότητας στο ύψος.

Τις καλλιεργητικές περιόδους 2016-2017 και 2017-2018 η διάμετρος της ροζέτας είχε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με το ύψος των φυτών και τον αριθμό των κεφαλών, ενώ και το ύψος των φυτών είχε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με τον αριθμό των κεφαλών (Πίνακες 5.19 και 5.20).

Η πυκνότητα της καλλιέργειας είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών και στις τρεις περιόδους, με τη μεγαλύτερη τιμή να καταγράφεται στην καλλιέργεια της μεγαλύτερης πυκνότητας Β. Ο σπόρος που χρησιμοποιήθηκε την 1^η και την 3^η καλλιεργητική περίοδο, από πληθυσμό του φυτού από την περιοχή Άγιος Γεώργιος Φθιώτιδας, παρήγαγε ποσότητα βιομάζας που κυμαινόταν από 1908,9 έως 2544,0 kg/στρέμμα (Εικόνα 5.10). Αυτό δείχνει ότι η καλλιέργεια γαϊδουράγκαθου μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παραγωγή ενέργειας από βιομάζα. Στο συμπέρασμα ότι το γαϊδουράγκαθο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ενεργειακό φυτό κατέληξαν και οι Ledda *et al.* (2013) που διεξήγαγαν πειράματα στην Ιταλία και κατέγραψαν παραγωγή βιομάζας που κυμάνθηκε μεταξύ 1370 και 1830 kg/στρέμμα. Το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών την 2^η περίοδο κυμάνθηκε από 1074,1 έως 1332,4 kg/στρέμμα, αν και το χρονικό διάστημα ανάμεσα στη σπορά και τη συγκομιδή ήταν μόνο 4 μήνες. Ο σπόρος που χρησιμοποιήθηκε κατά την περίοδο αυτή ήταν διαφορετικός από τις άλλες περιόδους.



Εικόνα 5.10. Φωτογραφίες ξηρών φυτών (BBCH 99).

Είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι όλες οι παράμετροι καλλιέργειας είχαν μεγαλύτερες τιμές το 2016 σε σχέση με το 2018. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στη μεγαλύτερη ποσότητα βροχοπτώσεων από τον Μάρτιο έως τον Μάιο του 2016 (146,9 mm) σε σύγκριση με το αντίστοιχο χρονικό διάστημα του 2018 (62,0 mm) (Διάγραμμα 5.4). Ακόμη, η βροχόπτωση τον Φεβρουάριο του 2018 ήταν υψηλότερη (123,7 mm) σε σύγκριση με εκείνη του 2016 (14,3 mm), ενώ η μέση θερμοκρασία τον ίδιο μήνα ήταν χαμηλότερη το 2018 (8,7 °C) σε σύγκριση με το 2016 (12,0 °C) (Διάγραμμα 5.3). Οι συνθήκες αυτές καθυστέρησαν την ανάπτυξη των φυτών στην 3^η καλλιεργητική περίοδο. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζονται από μελέτες που έδειξαν ισχυρή επίδραση των καιρικών συνθηκών στην ανάπτυξη του γαϊδουράγκαθου (Andrzejewska *et al.*, 2011; Ledda *et al.*, 2013).

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών, όπως το meriquat chloride, το prohexadione-Ca και το chlormequat chloride επιβραδύνουν την ανάπτυξη (π.χ. μείωση ύψους) σε διάφορες καλλιέργειες, όπως κριθάρι, βαμβάκι, ηλίανθος και σιτάρι, λόγω της παρεμπόδισης της βιοσύνθεσης των γιββερελλινών (Rajala & Peltonen-Sainio, 2001; Choudhary, Sharma & Sumeriya, 2014; Suzuki *et al.*, 2018; Tung *et al.*, 2019). Τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν ότι το meriquat chloride (MC) είχε μέτρια επίδραση στο ύψος των φυτών, ενώ δεν επηρέασε τη φυτική βιομάζα. Η μεγαλύτερη μείωση του ύψους καταγράφηκε το 2016 στην επέμβαση MC10, με ύψος μικρότερο κατά 10,7% σε σχέση με την επέμβαση του απέκαστου μάρτυρα, ενώ το 2018 η μεγαλύτερη μείωση του ύψους καταγράφηκε στην επέμβαση MC11,2, με τη μείωση του ύψους να είναι 14,8%.

Καμία από τις επεμβάσεις του meriquat chloride δεν παρουσίασε κάποια φυτοτοξική επίδραση στην καλλιέργεια του γαϊδουράγκαθου, ενώ η εφαρμογή του MC δεν επηρέασε τη συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD) και το ξηρό βάρος (Εικόνα 5.11). Επομένως, η εφαρμογή του MC σε καλλιέργεια γαϊδουράγκαθου μπορεί να βελτιώσει την απόδοση αυτής της καλλιέργειας μέσω της μείωσης της διασποράς των σπόρων κατά τη συγκομιδή. Σε μελέτες σχετικά με την εφαρμογή του meriquat chloride σε καλλιέργειες βαμβακιού, οι Tung *et al.* (2018) παρατήρησαν ότι ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης μειώθηκε από 1% έως 28% όσο αυξάνονταν η δόση του MC, οι Ferrari *et al.* (2014) διαπίστωσαν ότι αυξήθηκε η συγκέντρωση χλωροφύλλης (τιμές SPAD) στις επεμβάσεις του MC, ενώ οι Suzuki *et al.* (2018) παρατήρησαν

μείωση στη συγκέντρωση χλωροφύλλης σε επεμβάσεις στις οποίες η δόση του MC ήταν μέχρι $5 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$ και αύξηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης σε μεγαλύτερες δόσεις του MC. Ακόμη, οι Ramesh και Ramprasad (2015) διαπίστωσαν ότι η εφαρμογή του MC σε καλλιέργεια σόγιας (soybean) αύξησε τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης.



Εικόνα 5.11. Δύο εβδομάδες μετά την εφαρμογή του ρυθμιστή ανάπτυξης (Απρίλιος 2016).

Η μείωση του ύψους των φυτών το 2018 κυμάνθηκε μεταξύ 8,4% και 14,8% και ήταν υψηλότερη από το 2016 (7,9-10,7%). Στα πειράματα που πραγματοποίησαν οι Martin *et al.* (2002) με εφαρμογή ρυθμιστή ανάπτυξης σε δύο καλλιεργητικές περιόδους το ύψος των φυτών μειώθηκε κατά 17,1% και 15,1% την 1^η και 2^η περίοδο, αντίστοιχα, ενώ η απόδοση σε σπόρο αυξήθηκε κατά 8,7% την 1^η περίοδο και κατά 19,1% την 2^η καλλιεργητική περίοδο. Η επίδραση του ρυθμιστή ανάπτυξης στην απόδοση σε σπόρο ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) μόνο κατά τη 2^η καλλιεργητική περίοδο. Ακόμη, οι ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών χρησιμοποιούνται ευρέως σε καλλιέργειες βαμβακιού. Σε πρόσφατη μελέτη, οι Choudhary *et al.* (2014) παρατήρησαν ότι η εφαρμογή ρυθμιστών ανάπτυξης, όπως το mepiquat chloride, το μίγμα mepiquat chloride και cyclanilide, το chlormequat chloride και το cyclanilide, σε καλλιέργειες βαμβακιού μείωσε τα ύψη των φυτών κατά 3,6 έως 18,4%, ενώ σύμφωνα με τους Tung *et al.*, (2019) τα ύψη των φυτών μειώθηκαν κατά 9 έως 40%, με τη μείωση να είναι εξαρτώμενη από τη δόση και το χρόνο εφαρμογής του

ρυθμιστή ανάπτυξης. Η εφαρμογή του MC έγινε σε διαφορετικές δόσεις (συνολικά 30, 60, 90 και 120 g ha⁻¹) με ψεκάσμό στα στάδια των 6, 11 και 16 φύλλων (37, 63 και 79 ημέρες μετά το φύτευμα, αντίστοιχα).

5.4.3 Απόδοση σε σπόρο και συστατικά της απόδοσης

Η πυκνότητα των φυτών είχε σημαντική επίδραση στην απόδοση σε σπόρο στις καλλιέργειες γαϊδουράγκαθου. Η υψηλότερη απόδοση σε σπόρο καταγράφηκε στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας Β κατά την καλλιεργητική περίοδο 2015-2016 και ήταν 15,1% μεγαλύτερη σε σύγκριση με εκείνη της πυκνότητας Α. Και κατά τη 2^η περίοδο η μεγαλύτερη τιμή της απόδοσης σε σπόρο καταγράφηκε στην πυκνότητα Β και ήταν κατά 47,5% μεγαλύτερη από αυτή στην πυκνότητα Α. Κατά την περίοδο 2017-2018, η υψηλότερη απόδοση σε σπόρο παρατηρήθηκε στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας Α. Σε παρόμοια μελέτη, οι Omer *et al.* (1993) κατέγραψαν τη μεγαλύτερη απόδοση σε σπόρο στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας, όπως και οι Katar *et al.* (2013) σε πειράματά τους για δύο συνεχόμενες περιόδους. Αντίθετα, οι Andrzejewska *et al.* (2011) ανέφεραν ότι η απόδοση των σπόρων δεν επηρεάστηκε από την πυκνότητα της καλλιέργειας, όπως και οι Martin *et al.* (2002) και οι Tahernia *et al.* (2014).

Η απόδοση σε σπόρο την 1^η καλλιεργητική περίοδο κυμάνθηκε από 192,9 έως 222,0 kg/στρέμμα, την 2^η περίοδο από 95,3 έως 140,6 kg/στρέμμα και την 3^η περίοδο από 144,4 έως 179,0 kg/στρέμμα. Σύμφωνα με τους Andrzejewska *et al.* (2011), η μέση απόδοση σε σπόρο στην Πολωνία είναι 123 kg/στρέμμα, ενώ σε γόνιμα εδάφη μπορεί να φτάσει τα 200 kg/στρέμμα, ενώ στο Ιράν η απόδοση σε σπόρο κυμαίνεται από 80,0 έως 241,7 kg/στρέμμα (Shokrpour *et al.*, 2011; Tahernia *et al.*, 2014). Η απόδοση σε σπόρο και τις τρεις καλλιεργητικές περιόδους παρουσίασε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την απόδοση σε έλαιο και σε σιλυμαρίνη (Πίνακες 5.18, 5.19 και 5.20).

Η απόδοση σε σπόρο ήταν υψηλότερη την περίοδο 2015-2016, σε σχέση με τη περίοδο 2017-2018, λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας βροχοπτώσεων κατά τη διάρκεια του σταδίου άνθισης και της ανάπτυξης των σπόρων, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω. Ομοίως, οι Andrzejewska *et al.* (2011) ανέφεραν ότι η

απόδοση των σπόρων εξαρτάται από τις καιρικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Συγκεκριμένα, σε μία από τις τρεις καλλιεργητικές περιόδους οι έντονες βροχοπτώσεις στις αρχές Απριλίου καθυστέρησαν τη σπορά, ενώ μετά οι υψηλές θερμοκρασίες και η έλλειψη βροχόπτωσης κατά τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο μείωσαν την απόδοση σε σπόρο κατά περίπου 60-65%. Ακόμη, οι Afshar *et al.* (2014) παρατήρησαν ότι η έντονη ξηρασία μείωσε την απόδοση σε σπόρο κατά 27%.

Την καλλιεργητική περίοδο 2017-2018 παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω της επίδρασης της πυκνότητας των φυτών και στον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό και στο βάρος 1000 σπόρων, με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στα πειράματα των Omer *et al.* (1993) και των Andrzejewska *et al.* (2011).

Ο ρυθμιστής ανάπτυξης δεν επηρέασε την απόδοση σε σπόρο, τον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό και το βάρος 1000 σπόρων κατά την 1^η και 3^η καλλιεργητική περίοδο. Σε μελέτη τους οι Geneva *et al.* (2007) παρατήρησαν ότι το prohexadione-Ca και το meriquat chloride όταν εφαρμόστηκαν σε συνδυασμό με λίπανση στο έδαφος ή διαφυλλική εφαρμογή αύξησαν τόσο τον αριθμό των ταξιανθιών ανά φυτό όσο και την απόδοση σε σπόρο σε καλλιέργειες γαϊδουράγκαθου. Οι Stancheva *et al.* (2010) όταν εφάρμοσαν διαφυλλική λίπανση σε συνδυασμό με ρυθμιστή ανάπτυξης παρατήρησαν την 1^η καλλιεργητική περίοδο αύξηση της απόδοσης, ενώ τη 2^η περίοδο υπήρξε μικρή μείωση της απόδοσης σε σπόρο. Σε καλλιέργεια βαμβακιού οι Choudhary *et al.* (2014) παρατήρησαν ότι η εφαρμογή του meriquat chloride, του μίγματος meriquat chloride και cyclanilide, του chlormequat chloride και του cyclanilide meriquat είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση στην απόδοση του σπόρου.

5.4.4 Περιεκτικότητα και απόδοση σε έλαιο

Το γαϊδουράγκαθο μπορεί να καλλιεργηθεί είτε για την παραγωγή ελαίου είτε για την παραγωγή βιοντίζελ (Takase *et al.*, 2018; Fathi-Achachlouei *et al.*, 2019), δεδομένου ότι οι σπόροι του φυτού περιέχουν σημαντική ποσότητα ελαίου (Alemardan *et al.*, 2013).

Κατά την 1^η και 3^η καλλιεργητική περίοδο δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αποστάσεων για την περιεκτικότητα σε έλαιο, οι τιμές της οποίας κυμαίνονταν μεταξύ 24,2 και 27,3%. Η επίδραση της πυκνότητας της καλλιέργειας την περίοδο 2016-2017 ήταν στατιστικά σημαντική, με τη μεγαλύτερη τιμή να καταγράφεται στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας (23,7%). Οι τιμές αυτές είναι συγκρίσιμες με εκείνες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Abenavoli *et al.*, 2010; Alemardan *et al.*, 2013; Martinelli *et al.*, 2016). Η πυκνότητα των φυτών είχε σημαντική επίδραση στην απόδοση σε έλαιο, με τις μεγαλύτερες τιμές να καταγράφονται στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας την 1^η και 2^η καλλιεργητική περίοδο, ενώ την 3^η καλλιεργητική περίοδο στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας. Το ίδιο παρατήρησαν και οι Omer *et al.* (1993), όμως η μεγαλύτερη απόδοση σε έλαιο στην επέμβαση της μεγαλύτερης πυκνότητας οφειλόταν στην μεγαλύτερη απόδοση σε σπόρο.

Η απόδοση σε έλαιο κυμάνθηκε από 35,3 έως 59,1 kg/στρέμμα την 1^η και 3^η καλλιεργητική περίοδο, χαμηλότερα από αυτό που έχει αναφερθεί για άλλες καλλιέργειες ελαιούχων σπόρων. Για παράδειγμα, οι Zheljzkon *et al.* (2008) ανέφεραν ότι η απόδοση σε έλαιο σε καλλιέργεια ηλίανθου στις ΗΠΑ κυμαίνεται μεταξύ 40,6 και 116,6 kg/στρέμμα. Τέλος, δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω της εφαρμογής του meriquat chloride στην περιεκτικότητα και απόδοση σε έλαιο.

5.4.5 Περιεκτικότητα και απόδοση σε σιλυμαρίνη

Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε μεταξύ 2,26 και 3,01% του βάρους ξηρού σπόρου για τον πληθυσμό 'Άγιος Γεώργιος', ενώ για τον πληθυσμό 'Σπάτα' μεταξύ 4,42 και 4,57%. Η πυκνότητα των φυτών είχε σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη μόνο κατά την 3^η καλλιεργητική περίοδο, με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται στην επέμβαση της μικρότερης πυκνότητας Α, ενώ οι τιμές αυτές ήταν χαμηλότερες σε σύγκριση με αυτές του 2016. Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη το 2018 ήταν 4,95% και 21,25% χαμηλότερη σε σχέση με το 2016 για τις πυκνότητες φυτών Α και Β, αντίστοιχα.

Είναι γνωστό ότι η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη εξαρτάται κυρίως από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τον γονότυπο (Carrier *et al.*, 2003; Andrzejewska & Sadowska, 2008; Andrzejewska *et al.*, 2011). Έτσι, τα αποτελέσματά μας μπορεί να αποδοθούν στις καιρικές συνθήκες κατά την περίοδο Μαρτίου - Μαΐου. Η συνολική κατακρήμνιση κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου ήταν χαμηλότερη το 2018 από ότι το 2016. Επιπλέον, η βροχόπτωση τον Φεβρουάριο του 2018 ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνη του 2016. Αυτές οι συνθήκες την 3^η πειραματική περίοδο καθυστέρησαν την ανάπτυξη των φυτών ιδιαίτερα στα τεμάχια με υψηλή πυκνότητα φυτών και κατά συνέπεια μείωσαν την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών το 2018 ήταν 18,90% και 15,45% χαμηλότερο από το 2016, για τις πυκνότητες Α και Β των φυτών, αντίστοιχα. Σε πρόσφατη μελέτη, οι Afshar *et al.* (2015) παρατήρησαν ότι η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη αυξήθηκε σε συνθήκες στρες νερού, ενώ οι Andrzejewska *et al.* (2011) υποστηρίζουν ότι τόσο η έλλειψη όσο και η υπερεπάρκεια νερού μειώνουν την περιεκτικότητα της σιλυμαρίνης. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η απόδοση σε σιλυμαρίνη μειώθηκε στην 3^η καλλιεργητική περίοδο λόγω της χαμηλότερης παραγωγικότητας που σχετίζεται με τις συνθήκες ξηρασίας.

Η απόδοση σε σιλυμαρίνη κυμάνθηκε μεταξύ 3,3 και 6,4 kg/στρέμμα και σε όλες τις περιόδους είχε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την απόδοση σε έλαιο και με την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη. Η μεγαλύτερη απόδοση σε σιλυμαρίνη καταγράφηκε το 2017 (6,4 kg/στρέμμα), ενώ το 2016 ήταν 6,3 kg/στρέμμα. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική περιεκτικότητα του σπόρου σε σιλυμαρίνη, λόγω του διαφορετικού βιοτύπου, αν και η μέγιστη απόδοση σε σπόρο το 2016 ήταν 222,0 kg/στρέμμα, ενώ το 2017 ήταν 140,6 kg/στρέμμα. Η μέση απόδοση σε σιλυμαρίνη στην Πολωνία σε καλλιέργειες εμπορικής ποικιλίας είναι 2,6 kg/στρέμμα (Andrzejewska *et al.*, 2011), στη Σλοβακία η απόδοση κυμάνθηκε από 0,8 έως 2,5 kg/στρέμμα (Habán *et al.*, 2009), ενώ στο Ιράν από 1,4 έως 2,3 kg/στρέμμα (Shokrpour *et al.*, 2008).

Όσον αφορά την επίδραση του ρυθμιστή ανάπτυξης στην περιεκτικότητα και την απόδοση σε σιλυμαρίνη, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η εφαρμογή του periquat chloride δεν είχε καμία επίδραση και τις δύο καλλιεργητικές περιόδους. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι παρά τη μείωση του ύψους των φυτών λόγω των επεμβάσεων με τον ρυθμιστή ανάπτυξης, ο αριθμός των ταξιανθιών ανά

φυτό, το βάρος 1000 σπόρων και η συγκέντρωση χλωροφύλλης δεν επηρεάστηκαν. Αντίθετα, οι Geneva *et al.* (2007) παρατήρησαν ότι η εφαρμογή ρυθμιστών ανάπτυξης των φυτών όταν εφαρμόστηκαν σε συνδυασμό με λίπανση στο έδαφος ή διαφυλλική εφαρμογή αύξησε την απόδοση σε σιλυμαρίνη, λόγω της αύξησης της παραγωγής σπόρων. Ακόμη, οι Stancheva *et al.* (2008) ανέφεραν ότι ο ρυθμιστής ανάπτυξης thidiazuron σε συνδυασμό με διαφυλλική λίπανση αύξησε την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κατά περίπου 10% κατά την 1^η καλλιεργητική περίοδο, ενώ τη δεύτερη περίοδο τη μείωσε ελαφρά (4%).

5.4.6. Περιεκτικότητα σε έλαιο σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης

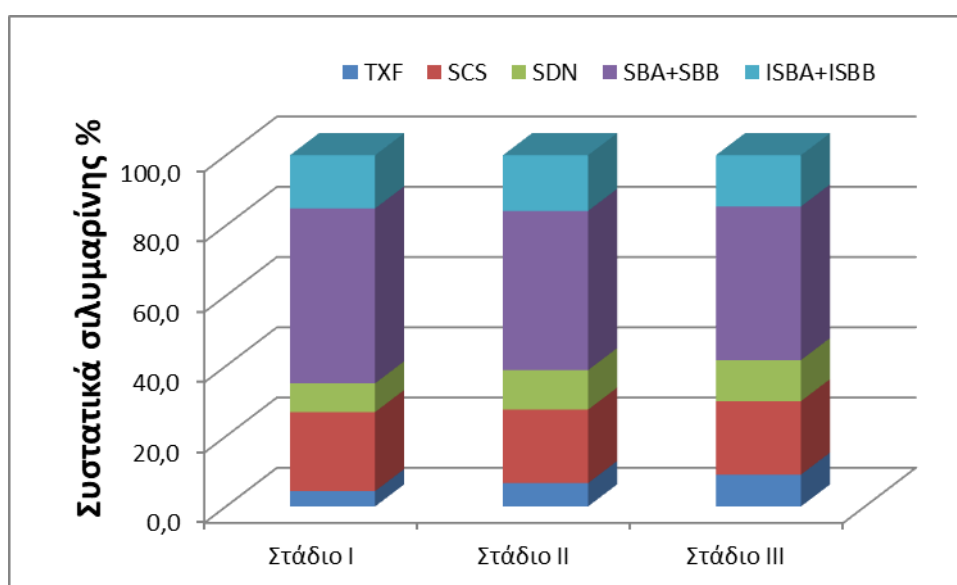
Η μέτρηση της περιεκτικότητας των σπόρων σε έλαιο στα τρία διαφορετικά στάδια ωρίμανσης έδειξε ότι η περιεκτικότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται ο βαθμός ωρίμανσης των σπόρων. Στα στάδια ανάπτυξης 75 (Στάδιο I), 79 (Στάδιο II) και 88 (Στάδιο III) της κλίμακας BBCH (Martinelli *et al.*, 2015) η περιεκτικότητα σε έλαιο ήταν 12,96%, 16,81% και 23,33% αντίστοιχα. Σε όλα τα στάδια οι κεντρικές κεφαλές είχαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα από ότι οι πλευρικές, με το ποσοστό της διαφοράς να μικραίνει σημαντικά όταν οι σπόροι είχαν σχεδόν πλήρως ωριμάσει. Στα στάδια I και II η διαφορά ήταν 25,2% και 35,2%, ενώ στο στάδιο ωρίμανσης III οι κεντρικές κεφαλές είχαν μόνο 1,4% περισσότερο έλαιο από τις πλευρικές κεφαλές. Αυτό οφείλεται στο ότι οι σπόροι των κεντρικών κεφαλών ωριμάζουν νωρίτερα από τους σπόρους των πλευρικών κεφαλών, όπως αναφέρεται και στην έρευνα των Shadowska και Andrzejewska (2009). Σε πειράματα που έκαναν οι Carrier *et al.* (2002) στον Καναδά υπολόγισαν την περιεκτικότητα σε έλαιο για το στάδιο II σε 16,74% και για το στάδιο III σε 25,16%.

5.4.7. Περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη και στα συστατικά της σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης

Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη αυξήθηκε από 2,82% σε 3,21% και τελικά σε 4,50% στα τρία στάδια ωρίμανσης των σπόρων. Η μεταβολή από το στάδιο I στο στάδιο II ήταν 13,85%, ενώ από το II στο τελικό στάδιο ήταν 40,06%. Οι Carrier *et al.* (2002) σε μελέτη τους υπολόγισαν την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη για το

στάδιο II σε 1,37% και για το στάδιο III σε 2,37%. Οι σπόροι των κεντρικών κεφαλών είχαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα από ότι αυτοί των πλευρικών, με τη διαφορά να είναι στο στάδιο I 12,4%, στο II 15,5% και στο στάδιο III 2,2%. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι σπόροι των κεντρικών κεφαλών ωριμάζουν νωρίτερα από τους σπόρους των πλευρικών κεφαλών και αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα των Shadowska και Andrzejewska (2009).

Η περιεκτικότητα των κύριων βιοδραστικών συστατικών της σιλυμαρίνης αυξήθηκε όσο μεγάλωνε ο βαθμός ωρίμανσης των σπόρων, αλλά όχι το ίδιο για κάθε συστατικό. Η αύξηση της σιλυβίνης από το στάδιο I στο στάδιο II ήταν 3,6%, από το στάδιο II στο στάδιο III ήταν 35,2%, ενώ από το στάδιο I στο III ήταν 40,0%. Το ποσοστό αύξησης από το στάδιο I στο στάδιο III ήταν 53,3% για την ισοσιλυβίνη, 48,2% για τη σιλυχριστίνη, 128,3% για τη σιλυδιανίνη και 231,7% για την ταξιφολίνη. Με την αύξηση του βαθμού ωρίμανσης των σπόρων μεταβλήθηκε και το ποσοστό των κύριων συστατικών της σιλυμαρίνης (Διάγραμμα 5.28). Η ταξιφολίνη αυξήθηκε από 4,4% σε 9,1%, ενώ η σιλυβίνη (A και B) μειώθηκε από 49,8% σε 43,8%. Δεδομένου ότι η σιλυβίνη θεωρείται το κύριο βιοδραστικό συστατικό της σιλυμαρίνης η μείωση που παρατηρήθηκε στο ποσοστό της δεν σημαίνει ότι πρέπει να συλλέγονται οι σπόροι στο στάδιο I της ωρίμανσης, γιατί στο στάδιο αυτό το βάρος των 1000 σπόρων ήταν 18,52 g, ενώ στο τελικό στάδιο το βάρος ήταν 25,29 g.



Διάγραμμα 5.28. Περιεκτικότητα κύριων συστατικών στη σιλυμαρίνη στο στάδιο I (BBCH 75), στο στάδιο II (BBCH 79) και στο στάδιο III (BBCH 88). TXF: ταξιφολίνη, SCS: σιλυχριστίνη, SDN: σιλυδιανίνη, SBA: σιλυβίνη A, SBB: σιλυβίνη B, ISBA: ισοσιλυβίνη A και ISBB: ισοσιλυβίνη B.

5.4.8. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλίσματος σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος των σπόρων στα τρία στάδια ωρίμανσης εκτιμήθηκε με τις μεθόδους DPPH, FRAP και FOLIN-CIOCALTEU. Και στις τρεις μεθόδους η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε με την αύξηση του βαθμού ωρίμανσης των σπόρων, ενώ στο τελικό στάδιο οι σπόροι από τις κεντρικές κεφαλές παρουσίαζαν μεγαλύτερες τιμές από αυτούς από τις πλευρικές κεφαλές (2,6% – 6,0%). Η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος των σπόρων με τη μέθοδο DPPH στο τελικό στάδιο ήταν 2893 μmol ασκορβικού οξέος (Asc) ανά 100 g σπόρου, ενώ με τη μέθοδο FRAP ήταν 8824 μmol Asc/100g σπόρου. Τα ολικά φαινολικά με τη μέθοδο FOLIN-CIOCALTEU στο τελικό στάδιο συγκομιδής ήταν 2590 mg γαλλικού οξέος ανά 100 g σπόρου. Σε πρόσφατη μελέτη (Lucini *et al.*, 2016) έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε διάφορους γονοτύπους του γαϊδουράγκαθου από την Ευρώπη και οι τιμές με τη μέθοδο DPPH ήταν από 1763 έως 5303 μmol Trolox/100g σπόρου, ενώ ο μέσος όρος των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο FOLIN-CIOCALTEU ήταν 2477 mg γαλλικού οξέος ανά 100 g σπόρου.

5.4.9. Βάρος 1000 σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης

Το βάρος 1000 σπόρων στο στάδιο III ήταν 25,29 g, αυξημένο κατά 36,6% από το στάδιο I. Στο τελικό στάδιο ωρίμανσης το βάρος 1000 σπόρων των κεντρικών κεφαλών ήταν κατά 12,3% μεγαλύτερο από ότι το βάρος 1000 σπόρων πλευρικών κεφαλών. Αν συνδυάσουμε τα ευρήματα για την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη και για το βάρος των σπόρων καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι όσο μεγαλύτερο είναι το βάρος των σπόρων τόσο μεγαλύτερο είναι και το περιεχόμενό τους σε σιλυμαρίνη, προφανώς γιατί έχουν συλλεχθεί σε υψηλότερο στάδιο ωρίμανσης. Σε παρόμοια ευρήματα κατέληξε και η έρευνα των Sadowska και Andrzejewska (2009).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η συγκομιδή της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου στο κατάλληλο στάδιο είναι κρίσιμος παράγοντας για τη βελτιστοποίηση της ποιότητας του συγκομισθέντος προϊόντος και για να καταστεί οικονομικά βιώσιμη η παραγωγή γαϊδουράγκαθου. Όπως διαπιστώνεται όσο ο βαθμός ωρίμανσης μεγαλώνει τόσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε έλαιο και σε σιλυμαρίνη και τόσο αυξάνεται το

βάρος των σπόρων. Όμως, η καθυστέρηση της συγκομιδής έχει ως αποτέλεσμα να γίνεται δυσκολότερη η συγκομιδή γιατί οι κεφαλές ανοίγουν και έχουμε διασπορά των σπόρων. Πρέπει ακόμη να ληφθεί υπόψη ότι οι κεφαλές των φυτών δεν ωριμάζουν ταυτόχρονα, με τις κεντρικές κεφαλές να ωριμάζουν νωρίτερα από τις πλευρικές, ενώ σημαντικό ρόλο παίζουν και οι καιρικές συνθήκες. Όταν οι θερμοκρασίες είναι σχετικά χαμηλές και έχουμε αρκετές βροχοπτώσεις παρατείνεται το στάδιο βλαστικής ανάπτυξης του φυτού με αποτέλεσμα να έχουμε λιγότερες κεφαλές στο κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης (Στάδιο III – 88 BBCH) κατά τη συγκομιδή (Carrier *et al.*, 2002, Martinelli *et al.*, 2015). Οι Hevia *et al.* (2007) σε μελέτη τους συμπέραναν ότι ο κατάλληλος χρόνος συγκομιδής είναι όταν τα φυτά έχουν 4 πλήρως ώριμες κεφαλές, ενώ οι Curioni *et al.* (2002) πρότειναν η συγκομιδή να γίνεται 18 και 14 ημέρες μετά από την ημέρα που το 20% ή το 50%, αντίστοιχα, των κεφαλών είναι ξερές. Τέλος οι Shadowska και Andrzejewska (2009) διαπίστωσαν ότι στην Πολωνία η μεγαλύτερη απόδοση σε σπόρο επιτεύχθηκε όταν η συγκομιδή έγινε σε ένα στάδιο με το 30% των κεφαλών να είναι ώριμο.

Πίνακας 5.18. Συντελεστές συσχέτισης (Pearson, r) ανάμεσα στα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου που μελετήθηκαν την περίοδο 2015-2016.

	ΔΡ	SPAD	Υ	ΞΒ	ΑΚ	ΒΣΠ	ΑΣΠ	ΠΣΛ	ΑΣΛ	ΠΕ	ΑΕ
Διάμετρος ροζέτας (ΔΡ)	1	0,497*	0,127	-0,257	0,363	0,102	-0,231	-0,247	-0,414*	0,125	-0,193
Συγκέντρωση χλωροφύλλης (SPAD)	0,497*	1	0,595**	-0,214	0,450*	-0,356	-0,368	-0,313	-0,634***	-0,184	-0,447*
Ύψος (Υ)	0,127	0,595**	1	-0,198	0,340	-0,321	-0,127	-0,476*	-0,574**	-0,064	-0,144
Ξηρό Βάρος (ΞΒ)	-0,257	-0,214	-0,198	1	-0,138	-0,139	0,430*	-0,217	0,185	-0,319	0,317
Αριθμός κεφαλών (ΑΚ)	0,363	0,450*	0,340	-0,138	1	-0,025	-0,226	-0,221	-0,402	-0,015	-0,228
Βάρος 1000 σπόρων (ΒΣΠ)	0,102	-0,356	-0,321	-0,139	-0,025	1	-0,024	0,288	0,277	0,373	0,116
Απόδοση σε σπόρο (ΑΣΠ)	-0,231	-0,368	-0,127	0,430*	-0,226	-0,024	1	-0,414*	0,535**	-0,192	0,935***
Περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (ΠΣΛ)	-0,247	-0,313	-0,476*	-0,217	-0,221	0,288	-0,414*	1	0,545**	-0,163	-0,466*
Απόδοση σε σιλυμαρίνη (ΑΣΛ)	-0,414*	-0,634***	-0,574**	0,185	-0,402	0,277	0,535**	0,545**	1	-0,305	0,434*
Περιεκτικότητα σε έλαιο (ΠΕ)	0,125	-0,184	-0,064	-0,319	-0,015	0,373	-0,192	-0,163	-0,305	1	0,164
Απόδοση σε έλαιο (ΑΕ)	-0,193	-0,447*	-0,144	0,317	-0,228	0,116	0,935***	-0,466*	0,434*	0,164	1

*, **, ***: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05, 0,01 και 0,001, αντίστοιχα. Όπου δεν υπάρχει * η συσχέτιση δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Πίνακας 5.19. Συντελεστές συσχέτισης (Pearson, r) ανάμεσα στα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου που μελετήθηκαν την περίοδο 2016-2017.

	ΔΡ	SPAD	Υ	ΞΒ	ΑΚ	ΒΣΠ	ΑΣΠ	ΠΣΛ	ΑΣΛ	ΠΕ	ΑΕ
Διάμετρος ροζέτας (ΔΡ)	1	0,255	0,508*	0,248	0,469*	0,451*	0,152	0,083	0,165	0,101	0,187
Συγκέντρωση χλωροφύλλης (SPAD)	0,255	1	-0,099	0,267	0,023	-0,377	0,053	0,322	0,120	0,068	0,079
Ύψος (Υ)	0,508*	-0,099	1	0,080	0,496*	0,397	-0,072	0,062	-0,051	0,107	-0,063
Ξηρό Βάρος (ΞΒ)	0,248	0,267	0,080	1	-0,046	-0,102	0,777***	0,414	0,793***	-0,544**	0,779***
Αριθμός κεφαλών (ΑΚ)	0,469*	0,023	0,496*	-0,046	1	0,315	-0,247	-0,042	-0,226	0,522**	-0,184
Βάρος 1000 σπόρων (ΒΣΠ)	0,451*	-0,377	0,397	-0,102	0,315	1	0,005	-0,061	-0,010	0,074	0,008
Απόδοση σε σπόρο (ΑΣΠ)	0,152	0,053	-0,072	0,777***	-0,247	0,005	1	0,382	0,981***	-0,682***	0,993***
Περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (ΠΣΛ)	0,083	0,322	0,062	0,414*	-0,042	-0,061	0,382	1	0,548**	-0,170	0,397
Απόδοση σε σιλυμαρίνη (ΑΣΛ)	0,165	0,120	-0,051	0,793***	-0,226	-0,010	0,981***	0,548**	1	-0,651***	0,978***
Περιεκτικότητα σε έλαιο (ΠΕ)	0,101	0,068	0,107	-0,544**	0,522**	0,074	-0,682***	-0,170	-0,651***	1	-0,591**
Απόδοση σε έλαιο (ΑΕ)	0,187	0,079	-0,063	0,779***	-0,184	0,008	0,993***	0,397	0,978***	-0,591**	1

*, **, ***: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05, 0,01 και 0,001, αντίστοιχα. Όπου δεν υπάρχει * η συσχέτιση δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Πίνακας 5.20. Συντελεστές συσχέτισης (Pearson, r) ανάμεσα στα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου που μελετήθηκαν την περίοδο 2017-2018.

	ΔΡ	SPAD	Υ	ΞΒ	ΑΚ	ΒΣΠ	ΑΣΠ	ΠΣΛ	ΑΣΛ	ΠΕ	ΑΕ
Διάμετρος ροζέτας (ΔΡ)	1	0,630 ^{***}	0,630 ^{***}	-0,299	0,630 ^{***}	0,374	0,554 ^{**}	0,477 [*]	0,629 ^{***}	0,095	0,561 ^{**}
Συγκέντρωση χλωροφύλλης (SPAD)	0,630 ^{***}	1	0,406 [*]	-0,315	0,547 ^{**}	0,346	0,290	0,355	0,387	0,123	0,312
Ύψος (Υ)	0,630 ^{***}	0,406 [*]	1	-0,451 [*]	0,521 ^{**}	0,110	0,450 [*]	0,314	0,439 [*]	-0,169	0,398
Ξηρό Βάρος (ΞΒ)	-0,299	-0,315	-0,451 [*]	1	-0,493 [*]	-0,056	-0,480 [*]	-0,198	-0,427 [*]	0,023	-0,463 [*]
Αριθμός κεφαλών (ΑΚ)	0,630 ^{***}	0,547 ^{**}	0,521 ^{**}	-0,493 [*]	1	0,219	0,769 ^{***}	0,322	0,650 ^{***}	0,054	0,767 ^{***}
Βάρος 1000 σπόρων (ΒΣΠ)	0,374	0,346	0,110	-0,056	0,219	1	0,084	0,254	0,190	0,367	0,149
Απόδοση σε σπόρο (ΑΣΠ)	0,554 ^{**}	0,290	0,450 [*]	-0,480 [*]	0,769 ^{***}	0,084	1	0,375	0,831 ^{***}	-0,017	0,982 ^{***}
Περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη (ΠΣΛ)	0,477 [*]	0,355	0,314	-0,198	0,322	0,254	0,375	1	0,817 ^{***}	-0,248	0,324
Απόδοση σε σιλυμαρίνη (ΑΣΛ)	0,629 ^{***}	0,387	0,439 [*]	-0,427 [*]	0,650 ^{***}	0,190	0,831 ^{***}	0,817 ^{***}	1	-0,136	0,795 ^{***}
Περιεκτικότητα σε έλαιο (ΠΕ)	0,095	0,123	-0,169	0,023	0,054	0,367	-0,017	-0,248	-0,136	1	0,427 [*]
Απόδοση σε έλαιο (ΑΕ)	0,561 ^{**}	0,312	0,398	-0,463 [*]	0,767 ^{***}	0,149	0,982 ^{***}	0,324	0,795 ^{***}	0,427 [*]	1

*, **, ***: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05, 0,01 και 0,001, αντίστοιχα. Όπου δεν υπάρχει * η συσχέτιση δεν είναι στατιστικά σημαντική.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή έγινε αξιολόγηση γηγενών πληθυσμών γαϊδουράγκαθου κυρίως ως προς την περιεκτικότητά τους σε σιλυμαρίνη και στα βιοδραστικά συστατικά της, ενώ έγινε και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων των σπόρων τους. Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη μελέτη της επίδρασης της πυκνότητας της καλλιέργειας και των ρυθμιστών ανάπτυξης στην ανάπτυξη, την ποιότητα και την απόδοση του φυτού σε σιλυμαρίνη, ενώ έγινε και αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη σπόρων του φυτού σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης. Τέλος, διεξήχθησαν πειράματα απομόνωσης της σιλυμαρίνης και των συστατικών της με καινοτόμες τεχνικές απομόνωσης, όπως η μη-ομοιοπολική μοριακή αποτύπωση και η ηλεκτροστατική ινοποίηση. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα κύρια συμπεράσματα των αποτελεσμάτων των παραπάνω πειραμάτων.

Κύρια συμπεράσματα των πειραμάτων αξιολόγησης των γηγενών πληθυσμών γαϊδουράγκαθου

- ✓ Παρατηρήθηκε **μικρή παραλλακτικότητα στα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά**. Όλοι οι πληθυσμοί είχαν μωβ άνθη.
- ✓ Το χρώμα των σπόρων των φυτών στους πληθυσμούς ήταν καφέ, με εξαίρεση τους πληθυσμούς ‘Μεσοποταμία 1’ και ‘Σπάτα’ που είχαν σπόρους μαύρου χρώματος.
- ✓ Η **περιεκτικότητα των σπόρων σε σιλυμαρίνη**, μέσος όρος 3,29%, είναι ικανοποιητική, σε σχέση με άλλες χώρες, αν και μόνο 4 πληθυσμοί είχαν περιεκτικότητα μεγαλύτερη του 4%. Η διάμεσος τιμή ήταν 3,22%.
- ✓ Υπήρξε **μεγάλη διακύμανση μεταξύ των πληθυσμών** όσον αφορά στην **περιεκτικότητα των κύριων συστατικών της σιλυμαρίνης** στους σπόρους.

- ✓ Η **αναλογία των φλαβονολιγνάνων** στη σιλυμαρίνη σε διαφορετικά έτη **δεν άλλαξε σημαντικά**, υποδεικνύοντας ότι η **σύνθεση της σιλυμαρίνης** είναι σε μεγάλο βαθμό υπό **γενετικό έλεγχο**.
- ✓ Η **περιεκτικότητα σε έλαιο (24,45 - 31,1%)**, είναι σε ικανοποιητικά επίπεδα σε σχέση με την απόδοση σε άλλες χώρες.
- ✓ Τα **πιο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά συστατικά** της σιλυμαρίνης βρέθηκε να είναι είναι η **ταξιφολίνη** και η **σιλυδιανίνη**.
- ✓ Μέσω της ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες οι πληθυσμοί ταξινομήθηκαν σε **τρεις ομάδες** (5 συστάδες), βάση της κατανομής των συστατικών της σιλυμαρίνης.
- ✓ Το κύριο χαρακτηριστικό όλων των πληθυσμών, εκτός εκείνων από τα Σπάτα και την Καστοριά, ήταν η **σημαντική ποσότητα ισοσιλυβίνης** (A και B), με τιμές μεταξύ **25 και 40%** της συνολικής περιεκτικότητας σε φλαβονολιγνάνες στη σιλυμαρίνη.
- ✓ Οι πληθυσμοί **‘Σπάτα’** και **‘Καστοριά’**, λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη και σιλυβίνη A και B, μπορούν να ενταχθούν σε **προγράμματα βελτίωσης** του γαϊδουράγκαθου για τη δημιουργία νέων ποικιλιών.

Κύρια συμπεράσματα των πειραμάτων αξιολόγησης της επίδρασης επιλεγμένων καλλιεργητικών τεχνικών στην ανάπτυξη, την ποιότητα και την απόδοση του γαϊδουράγκαθου

- ✓ Η **πυκνότητα της καλλιέργειας** είχε σημαντική **επίδραση στην ανάπτυξη και την απόδοση της καλλιέργειας**.
- ✓ Η καλλιέργεια γαϊδουράγκαθου μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την **παραγωγή ενέργειας από βιομάζα** (ξηρό βάρος 1909–2544 kg/στρέμμα).
- ✓ Η **απόδοση σε σπόρο** (144-222 kg/στρέμμα) είναι σε **πολύ ικανοποιητικά επίπεδα** σε σχέση με την απόδοση σε άλλες χώρες.

- ✓ Η μείωση του ύψους των φυτών λόγω της εφαρμογής του **meriquat chloride** μπορεί να μειώσει τις απώλειες του τινάγματος των σπόρων κατά τη μηχανική συγκομιδή της καλλιέργειας.
- ✓ Οι **καιρικές συνθήκες επηρέασαν** την **απόδοση** και την **ποιότητα** της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου.
- ✓ Η **απόδοση σε σιλυμαρίνη** (3,3-6,3 kg/στρέμμα) βρέθηκε να είναι **πολύ υψηλότερη** σε σχέση με την απόδοση σε άλλες χώρες.
- ✓ Οι σπόροι των κεντρικών κεφαλών ωριμάζουν νωρίτερα από τους σπόρους των πλευρικών κεφαλών (**μη συγχρονισμένη ωρίμανση**).
- ✓ Η σπορά της καλλιέργειας του γαϊδουράγκαθου συστήνεται να πραγματοποιείται στο διάστημα τέλη Οκτωβρίου-αρχές Νοεμβρίου.

Κύρια συμπεράσματα των πειραμάτων απομόνωσης της σιλυμαρίνης και των συστατικών της

- ✓ Η **παρουσία της σιλυβίνης στο προς πολυμερισμό διάλυμα αναστέλλει τον πολυμερισμό** είτε αναστέλλοντας την παραγωγή ελεύθερων ριζών από τον εκκινητή του πολυμερισμού είτε εξουδετερώνοντας τη δράση των ελεύθερων ριζών.
- ✓ Το **πολυμερές αναφοράς** που δημιουργήθηκε με τη διαδικασία της **ηλεκτροστατικής ινοποίησης** θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον εμπλουτισμό σε σιλυβίνη και ισοσιλυβίνη ενός διαλύματος σιλυμαρίνης, δεδομένου ότι δεσμεύει ποσότητες σιλυδιανίνης κυρίως, αλλά και ταξιφολίνης και σιλυχριστίνης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Moniem, A. S. H. (2002). The seed-head weevil, *Larinus latus* Herbst (Coleoptera: Curculionidae) as a new record in Egypt on the milk thistle, *Silybum marianum* (L.)(Asteraceae: Compositae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 35(2), 157-160.
- Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., & Capasso, F. (2010). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1423-1432.
- Abenavoli, L., Izzo, A. A., Milić, N., Cicala, C., Santini, A., & Capasso, R. (2018). Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytotherapy Research*, 32(11), 2202-2213.
- AbouZid, S. (2014). Yield improvement strategies for the production of secondary metabolites in plant tissue culture: silymarin from *Silybum marianum* tissue culture. *Natural Product Research*, 28(23), 2102-2110.
- AbouZid, S. F., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2016a). Silymarin content in *Silybum marianum* populations growing in Egypt. *Industrial Crops and Products*, 83, 729-737.
- AbouZid, S. F., Chen, S.-N., McAlpine, J. B., Friesen, J. B., & Pauli, G. F. (2016b). *Silybum marianum* pericarp yields enhanced silymarin products. *Fitoterapia*, 112, 136-143.
- Afshar, R. K., Chaichi, M. R., Assareh, M. H., Hashemi, M., & Liaghat, A. (2014). Interactive effect of deficit irrigation and soil organic amendments on seed yield and flavonolignan production of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.). *Industrial Crops and Products*, 58, 166-172.
- Afshar, R. K., Chaichi, M. R., Jovini, M. A., Jahanzad, E., & Hashemi, M. (2015). Accumulation of silymarin in milk thistle seeds under drought stress. *Planta*, 242(3), 539-543.

- Agarwal, R., Agarwal, C., Ichikawa, H., Singh, R. P., & Aggarwal, B. B. (2006). Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Research*, 26(6), 4457-4498.
- Alemardan, A., Karkanis, A., & Salehi, R. (2013). Breeding objectives and selection criteria for milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] improvement. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(2), 340-347.
- Alexander, C., Andersson, H. S., Andersson, L. I., Ansell, R. J., Kirsch, N., Nicholls, I. A., O'Mahony, J., & Whitcombe, M. J. (2006). Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition*, 19(2), 106-180.
- Alikaridis, F., Papadakis, D., Pantelia, K., & Kephelas, T. (2000). Flavonolignan production from *Silybum marianum* transformed and untransformed root cultures. *Fitoterapia*, 71(4), 379-384.
- Althagafy, H. S., Meza-Aviña, M. E., Oberlies, N. H., & Croatt, M. P. (2013). Mechanistic study of the biomimetic synthesis of flavonolignan diastereoisomers in milk thistle. *The Journal of Organic Chemistry*, 78(15), 7594-7600.
- Andrzejewska, J., & Skinder, Z. (2006). Yield and quality of raw material of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) grown in monoculture and in crop rotation. Part I. Reaction of milk thistle to the sowing date. *Herba Polonica*, 52(4), 11-17.
- Andrzejewska, J., & Sadowska, K. (2008). Effect of cultivation conditions on the variability and interrelation of yield and raw material quality in milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). *Acta Scientiarum Polonorum, Agricultura*, 7(3), 3-11.
- Andrzejewska, J., Sadowska, K., & Mielcarek, S. (2011). Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 462-468.
- Andrzejewska, J., Martinelli, T., & Sadowska, K. (2015). *Silybum marianum*: non-medical exploitation of the species. *Annals of Applied Biology*, 167(3), 285-297.

- Andrzejewska, J., Ignaczak, S., & Martinelli, T. (2017). Effect of seed material preparation on plant emergence and yield of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) in a moderate climate. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 16(2), 139-147.
- Anthony, K., & Saleh, M. (2013). Free radical scavenging and antioxidant activities of silymarin components. *Antioxidants*, 2(4), 398-407.
- Arcari, M., Brambilla, A., Brandt, A., Caponi, R., Corsi, G., Di Rella, M., Solinas, F., & Wachter, W. P. (1992). A new inclusion complex of silibinin and beta-cyclodextrins: in vitro dissolution kinetics and in vivo absorption in comparison with traditional formulations. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 131(5), 205-209.
- Arnone, A., Merlini, L., & Zanarotti, A. (1979). Constituents of *Silybum marianum*. Structure of isosilybin and stereochemistry of silybin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 16, 696-697.
- Arshady, R., & Mosbach, K. (1981). Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 182(2), 687-692.
- Ashtiani, S. R., Hasanloo, T., & Bihamta, M. R. (2010). Enhanced production of silymarin by Ag⁺ elicitor in cell suspension cultures of *Silybum marianum*. *Pharmaceutical Biology*, 48(6), 708-715.
- Bahl, J. R., Bansal, R. P., Goel, R., & Kumar, S. (2015). Properties of the seed oil of a dwarf cultivar of the pharmaceutical silymarin producing plant *Silybum marianum* (L.) Gaertn. developed in India. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 6(2), 127-133.
- Barreto, J. F. A., Wallace, S. N., Carrier, D. J., & Clausen, E. C. (2003). Extraction of nutraceuticals from milk thistle: I. Hot water Extraction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 108(1-3), 881-889.
- Barzaghi, N., Crema, F., Gatti, G., Pifferi, G., & Perucca, E. (1990). Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 15(4), 333-338.

- Benthin, B., Danz, H., & Hamburger, M. (1999). Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 837(1-2), 211-219.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Berner, D. K., Paxson, L. K., Bruckart, W. L., Luster, D. G., McMahon, M., & Michael, J. L. (2002). First report of *Silybum marianum* as a host of *Puccinia punctiformis*. *Plant Disease*, 86(11), 1271.
- Biedermann, D., Vavříková, E., Cvak, L., & Křen, V. (2014). Chemistry of silybin. *Natural Product Reports*, 31(9), 1138-1157.
- Bijak, M., Szelenberger, R., Saluk, J., & Nowak, P. (2017). Flavonolignans inhibit ADP induced blood platelets activation and aggregation in whole blood. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 682-688.
- Bilia, A. R., Salvini, D., Mazzi, G., & Vincieri, F. F. (2000). Characterization of calendula flower, milk-thistle fruit, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Chromatographia*, 53(3-4), 210-215.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bosch-Barrera, J., Queralt, B., & Menendez, J. A. (2017). Targeting STAT3 with silibinin to improve cancer therapeutics. *Cancer Treatment Reviews*, 58, 61-69.
- Brunetti, G., Soler-Rovira, P., Farrag, K., & Senesi, N. (2009). Tolerance and accumulation of heavy metals by wild plant species grown in contaminated soils in Apulia region, Southern Italy. *Plant and Soil*, 318(1-2), 285-298.
- Bunnell, K. A., Wallace, S. N., Clausen, E. C., Penney, W. R., & Carrier, D. J. (2010). Comparison of silymarin extraction from *Silybum marianum* using a soxhlet apparatus, batch parr, and countercurrent pressurized hot water reactors. *Transactions of the ASABE*, 53(6), 1935-1940.

- Cacho, M., Morán, M., Corchete, P., & Fernández-Tárrago, J. (1999). Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Plant Science*, 144(2), 63-68.
- Calani, L., Brighenti, F., Bruni, R., & Del Rio, D. (2012). Absorption and metabolism of milk thistle flavanolignans in humans. *Phytomedicine*, 20(1), 40-46.
- Cai, X.-L., Li, D.-N., Qiao, J.-Q., Lian, H.-Z., & Wang, S.-K. (2009). Determination of silymarin flavonoids by HPLC and LC-MS and investigation of extraction rate of silymarin in *Silybum marianum* fruits by boiling water. *Asian Journal of Chemistry*, 21(1), 63-74.
- Cappelletti, E. M., & Caniato, R. (1984). Silymarin localization in the fruit and seed of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Herba Hungarica*, 23, 53-62.
- Carrier, D. J., Crowe, T., Sokhansanj, S., Wahab, J., & Barl, B. (2003). Milk thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., flower head development and associated marker compound profile. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 10(1), 65-74.
- Chakraborty, S., Liao, I. C., Adler, A., & Leong, K. W. (2009). Electrohydrodynamics: a facile technique to fabricate drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(12), 1043-1054.
- Chambers, C. S., Valentová, K., & Křen, V. (2015). “Non-taxifolin” derived flavonolignans: phytochemistry and biology. *Current pharmaceutical design*, 21(38), 5489-5500.
- Chambers, C. S., Holečková, V., Petrásková, L., Biedermann, D., Valentová, K., Buchta, M., & Křen, V. (2017). The silymarin composition... and why does it matter???. *Food Research International*, 100, 339-353.
- Chen, L., Xu, S., & Li, J. (2011). Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, 40(5), 2922-2942.
- Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., & Li, J. (2016). Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chemical Society Reviews*, 45(8), 2137-2211.

- Cheong, W. J., Yang, S. H., & Ali, F. (2013). Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews. *Journal of Separation Science*, 36(3), 609-628.
- Chianella, I., Guerreiro, A., Moczko, E., Caygill, J. S., Piletska, E. V., De Vargas Sansalvador, I. M. P., Whitcombe, M. J., & Piletsky, S. A. (2013). Direct replacement of antibodies with molecularly imprinted polymer (MIP) nanoparticles in ELISA – development of a novel assay for vancomycin. *Analytical Chemistry*, 85(17), 8462-8468.
- Chlopčíková, Š., Psotová, J., Miketová, P., & Šimánek, V. (2004). Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part I. Silymarin and its flavonolignans. *Phytotherapy Research*, 18(2), 107-110.
- Choudhary, J., Sharma, M. K., & Sumeriya, H. K. (2014). Growth and yield of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) influenced by plant growth regulators. *Annals of Biology*, 30(3), 498-502.
- Chronakis, I. S., Milosevic, B., Frenot, A., & Ye, L. (2006). Generation of molecular recognition sites in electrospun polymer nanofibers via molecular imprinting. *Macromolecules*, 39(1), 357-361.
- Cormack, P. A., & Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 173-182.
- Csupor, D., Csorba, A., & Hohmann, J. (2016). Recent advances in the analysis of flavonolignans of *Silybum marianum*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 301-317.
- Curioni, A., Carcía, M., Alfonso, W., & Arizio, O. (2002). Predicción de la cosecha de cardo mariano a través de las características externas que presentan los capítulos. *Acta Horticulturae*, 569, 257-261.
- Das, S. K., Mukherjee, S., & Vasudevan, D. M. (2008). Medicinal properties of milk thistle with special reference to silymarin-An overview. *Natural Product Radiance*, 7(2), 182-192.

- Davis-Searles, P. R., Nakanishi, Y., Kim, N. C., Graf, T. N., Oberlies, N. H., Wani, M. C., Wall, M. E., & Kroll, D. J. (2005). Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells. *Cancer Research*, 65(10), 4448-4457.
- Deep, G., Raina, K., Singh, R. P., Oberlies, N. H., Kroll, D. J., & Agarwal, R. (2008a). Isosilibinin inhibits advanced human prostate cancer growth in athymic nude mice: comparison with silymarin and silibinin. *International Journal of Cancer*, 123(12), 2750-2758.
- Deep, G., Oberlies, N. H., Kroll, D. J., & Agarwal, R. (2008b). Identifying the differential effects of silymarin constituents on cell growth and cell cycle regulatory molecules in human prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*, 123(1), 41-50.
- Deep, G., Gangar, S. C., Oberlies, N. H., Kroll, D. J., & Agarwal, R. (2010). Isosilybin A induces apoptosis in human prostate cancer cells via targeting Akt, NF- κ B, and androgen receptor signaling. *Molecular Carcinogenesis*, 49(10), 902-912.
- Di Costanzo, A., & Angelico, R. (2019). Formulation Strategies for Enhancing the Bioavailability of Silymarin: The State of the Art. *Molecules*, 24(11), 2155.
- Dias, A. C. B., Figueiredo, E. C., Grassi, V., Zagatto, E. A. G., & Arruda, M. A. Z. (2008). Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis. *Talanta*, 76(5), 988-996.
- Dickey, F. H. (1949). The preparation of specific adsorbents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 35(5), 227-229.
- Dodd, J. (1989). Phenology and seed production of variegated thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., in Australia in relation to mechanical and biological control. *Weed Research*, 29(4), 255-263.
- Domínguez, M. T., Madejón, P., Madejón, E., & Diaz, M. J. (2017). Novel energy crops for Mediterranean contaminated lands: Valorization of *Dittrichia viscosa* and *Silybum marianum* biomass by pyrolysis. *Chemosphere*, 186, 968-976.

- Drapalova, I., & Pluhackova, H. (2014). Effect of herbicide treatment on milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) germination. In: O. Polák, R. Cerkal & P. Škarpa, eds. *Proceedings of International PhD Students Conference*. Brno, Czech Republic, 19-20 November, MendelNet, 33-38.
- Duan, L., Carrier, D. J., & Clausen, E. C. (2004). Silymarin extraction from milk thistle using hot water. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113-116, 559-68.
- El-Mallah, M. H., El-Shami, S. M., & Hassanein, M. M. (2003). Detailed studies on some lipids of *Silybum marianum* (L.) seed oil. *Grasas y Aceites*, 54(4), 397-402.
- Elwekeel, A., Elfishway, A., & AbouZid, S. (2012). Enhanced accumulation of flavonolignans in *Silybum marianum* cultured roots by methyl jasmonate. *Phytochemistry Letters*, 5(2), 393-396.
- Elwekeel, A., Elfishawy, A., & AbouZid, S. (2013). Silymarin content in *Silybum marianum* fruits at different maturity stages. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(23), 1665-1669.
- Esmail, N., Anaraki, S. B., Gharagozloo, M., & Moayedi, B. (2017). Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. *International Immunopharmacology*, 50, 194-201.
- Fathi-Achachlouei, B., & Azadmard-Damirchi, S. (2009). Milk thistle seed oil constituents from different varieties grown in Iran. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(7), 643-649.
- Fathi-Achachlouei, B., Azadmard-Damirchi, S., Zahedi, Y., & Shaddel, R. (2019). Microwave pretreatment as a promising strategy for increment of nutraceutical content and extraction yield of oil from milk thistle seed. *Industrial Crops and Products*, 128(6), 527-533.
- Federico, A., Dallio, M., & Loguercio, C. (2017). Silymarin/silybin and chronic liver disease: a marriage of many years. *Molecules*, 22(2), 191.

- Feher, J., & Lengyel, G. (2012). Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(1), 210-217.
- Ferrari, J. V., Junior, E. F., Ferrari, S., & Luques, A. P. P. G. (2014). Nutritional status and cotton yield under different row spacings and growth regulator application. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(5), 2285-2296.
- Flora, K., Hahn, M., Rosen, H., & Benner, K. (1998). Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 93(2), 139-143.
- Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Björk, L., & Trajkovski, V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1485-1490.
- García-Calzón, J. A., & Díaz-García, M. E. (2007). Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B*, 123(2), 1180-1194.
- García-Herrera, P., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Díez-Marqués, C., Molina, M., & Tardío, J. (2014). Nutrient composition of six wild edible Mediterranean Asteraceae plants of dietary interest. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(2), 163-170.
- Gašo-Sokač, D., Kovač, S., & Bušić, V. (2011). Isolation of active substances from the seeds of the milk thistle plant (*Silybum marianum*) and determination of antioxidant activity. *Kemija u Industriji*, 60(9), 441-445.
- Gažák, R., Svobodová, A., Psotová, J., Sedmera, P., Přikrylová, V., Walterová, D., & Křen, V. (2004). Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(21), 5677-5687.
- Gažák, R., Walterová, D., & Křen, V. (2007). Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Current Medicinal Chemistry*, 14(3), 315-338.

- Gažák, R., Fuksová, K., Marhol, P., Kuzma, M., Agarwal, R., & Křen, V. (2013). Preparative method for isosilybin isolation based on enzymatic kinetic resolution of silymarin mixture. *Process Biochemistry*, 48(1), 184-189.
- Geneva, M., Zehirov, G., Stancheva, I., Iliev, L., & Georgiev, G. (2007). Effect of soil fertilizer, foliar fertilizer, and growth regulator application on milk thistle development, seed yield, and silymarin content. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39(1-2), 17-24.
- Ghavami, N., & Ramin, A. A. (2008). Grain yield and active substances of milk thistle as affected by soil salinity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39(17-18), 2608-2618.
- Ghorani, B., & Tucker, N. (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*, 51, 227-240.
- Ghorani, B., Tucker, N., & Yoshikawa, M. (2015). Approaches for the assembly of molecularly imprinted electrospun nanofibre membranes and consequent use in selected target recognition. *Food Research International*, 78, 448-464.
- Giuliani, C., Tani, C., Bini, L. M., Fico, G., Colombo, R., & Martinelli, T. (2018). Localization of phenolic compounds in the fruits of *Silybum marianum* characterized by different silymarin chemotype and altered colour. *Fitoterapia*, 130, 210-218.
- Graf, T. N., Wani, M. C., Agarwal, R., Kroll, D. J., & Oberlies, N. H. (2007). Gram-scale purification of flavonolignan diastereoisomers from *Silybum marianum* (Milk Thistle) extract in support of preclinical in vivo studies for prostate cancer chemoprevention. *Planta Medica*, 73(14), 1495-1501.
- Graf, T. N., Cech, N. B., Polyak, S. J., & Oberlies, N. H. (2016). A validated UHPLC-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum*) extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 126, 26-33.
- Greenlee, H., Abascal, K., Yarnell, E., & Ladas, E. (2007). Clinical applications of *Silybum marianum* in oncology. *Integrative Cancer Therapies*, 6(2), 158-165.

- Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2007). Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(30), 5670-5703.
- Groves, R. H., & Kaye, P. E. (1989). Germination and phenology of seven introduced thistle species in southern Australia. *Australian Journal of Botany*, 37(4), 351-359.
- Habán, M., Otepka, P., Kobida, L., & Habánová, M. (2009). Production and quality of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) cultivated in cultural conditions of warm agri-climatic macroregion. *Horticultural Science*, 36(2), 69-74.
- Hammouda, F. M., Ismail, S. I., Hassan, N. M., Zaki, A. K., Kamel, A., & Rimpler, H. (1993). Evaluation of the silymarin content in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. cultivated under different agricultural conditions. *Phytotherapy Research*, 7(1), 90-91.
- Harrabi, S., Romdhane, H., Daassa, M., & Fellah, H. (2015). Fatty acid and triacylglycerol compositions of milk thistle seeds growing wild in Tunisia (*Silybum marianum* L.). *Acta Alimentaria*, 44(2), 304-310.
- Hasanloo, T., Khavari-Nejad, R. A., Majidi, E., & Shams Ardakani, M. R. (2005). Analysis of flavonolignans in dried fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn from Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(12), 1778-1782.
- Haupt, K. (2001). Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *Analyst*, 126(6), 747-756.
- Hänsel, R., Schulz, J., & Pelter, A. (1975). Struktur des silybins, II. Synthese des dehydrosilybin-pentamethyläthers und verwandter verbindungen. *Chemische Berichte*, 108(5), 1482-1501.
- Hetz, E., Liersch, R., & Schieder, O. (1995). Genetic investigations on *Silybum marianum* and *S. eburneum* with respect to leaf colour, outcrossing ratio, and flavonolignan composition. *Planta Medica*, 61(1), 54-57.

- Hevia, F., Wilckens, R. L., Berti, M. T., & Fischer, S. U. (2007). Calidad de *Cardo mariano* (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) cosechado en diferentes estados fenológicos. *Información Tecnológica*, 18(5), 69-74.
- Hlangothia, D., Abdel-Rahman, F., Nguyen, T., Anthony, K., & Saleh, M.A. (2016). Distribution of silymarin in the fruit of *Silybum marianum* L. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 7(11), 511.
- Hoh, C. S., Boocock, D. J., Marczylo, T. H., Brown, V. A., Cai, H., Steward, W. P., Berry, D. P., & Gescher, A. J. (2007). Quantitation of silibinin, a putative cancer chemopreventive agent derived from milk thistle (*Silybum marianum*), in human plasma by high-performance liquid chromatography and identification of possible metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), 2532-2535.
- Jahanafrooz, Z., Motamed, N., Rinner, B., Mokhtarzadeh, A., & Baradaran, B. (2018). Silibinin to improve cancer therapeutic, as an apoptotic inducer, autophagy modulator, cell cycle inhibitor, and microRNAs regulator. *Life Sciences*, 213, 236-247.
- Javed, S., Kohli, K., & Ali, M. (2011). Reassessing bioavailability of silymarin. *Alternative Medicine Review*, 16(3), 239.
- Kahol, A. P., Singh, K. L., Tandon, S., & Kumar, S. (2001). *U.S. Patent No. 6,309,678*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Kaloga, M. (1981). Isosilychristin, ein neues flayonolignan aus *Silybum marianum* L. Gaertn./Isosilychristin, a new flavonolignan from *Silybum marianum* L. Gaertn. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 36(2), 262-265.
- Kandimalla, V. B., & Ju, H. (2004). Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(4), 587-605.
- Karkanis, A., Bilalis, D., & Efthimiadou, A. (2011). Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 825-830.

- Katar, D., Arslan, Y., & Subasi, I. (2013). Effect of different plant densities on growth and yield of milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] grown under ecological conditions of Ankara, Turkey. *Research on Crops*, 14(1), 304-310.
- Khan, I., Khattak, H. U., Ullah, I., & Bangash, F. K. (2007). Study of the physicochemical properties of *Silybum marianum* seed oil. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 29(6), 545.
- Khan, M. A., Blackshaw, R. E., & Marwat, K. B. (2009). Biology of milk thistle (*Silybum marianum*) and the management options for growers in north-western Pakistan. *Weed Biology and Management*, 9(2), 99-105.
- Kim, H., & Spivak, D. A. (2003). New insight into modeling non-covalently imprinted polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 125(37), 11269-11275.
- Kim, N.-C., Graf, T. N., Sparacino, C. M., Wani, M. C., & Wall, M. E. (2003). Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). *Organic & Biomolecular Chemistry*, 1(10), 1684-1689.
- Kirsch, N., Alexander, C., Davies, S., & Whitcombe, M. J. (2004). Sacrificial spacer and non-covalent routes toward the molecular imprinting of “poorly-functionalized” N-heterocycles. *Analytica Chimica Acta*, 504(1), 63-71.
- Köksal, E., Gülçin, İ., Beyza, S., Sarikaya, Ö., & Bursal, E. (2009). In vitro antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(2), 395-405.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., & Asanuma, H. (2003). *Molecular Imprinting – From Fundamentals to Applications*. Weinheim:Wiley-VCH. pp. 16-17.
- Koohpaei, A. R., Shahtaheri, S. J., Ganjali, M. R., Forushani, A. R., & Golbabaie, F. (2008). Application of multivariate analysis to the screening of molecularly imprinted polymers (MIPs) for ametryn. *Talanta*, 75(4), 978-986.

- Křen, V., Kubisch, J., Sedmera, P., Halada, P., Přikrylová, V., Jegorov, A., Cvak, L., Gebhardt, R., Ulrichová, G., Šimánek, V. (1997). Glycosylation of silybin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (17), 2467-2474.
- Křen, V., & Walterová, D. (2005). Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomed Papers*, 149(1), 29-41.
- Křen, V., Gažák, R., Purchartová, K., Marhol, P., Biedermann, D., & Sedmera, P. (2009). Chemoenzymatic preparative separation of silybins A and B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61(3-4), 247-251.
- Křenek, K., Marhol, P., Peikerová, Ž., Křen, V., & Biedermann, D. (2014). Preparatory separation of the silymarin flavonolignans by Sephadex LH-20 gel. *Food Research International*, 65, 115-120.
- Kroll, D. J., Shaw, H. S., & Oberlies, N. H. (2007). Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies. *Integrative Cancer Therapies*, 6(2), 110-119.
- Kuki, Á., Nagy, L., Deák, G., Nagy, M., Zsuga, M., & Kéki, S. (2012). Identification of silymarin constituents: an improved HPLC–MS method. *Chromatographia*, 75(3-4), 175-180.
- Kumar, N., Rai, A., Reddy, N. D., Shenoy, R. R., Mudgal, J., Bansal, P., Mudgal P., Arumugam, K., Udupa, N., Sharma, N., & Rao, C. M. (2019). Improved in vitro and in vivo hepatoprotective effects of liposomal silymarin in alcohol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Pharmacological Reports*.
- Kvasnička, F., Bíba, B., Ševčík, R., Voldřich, M., & Krátká, J. (2003). Analysis of the active components of silymarin. *Journal of Chromatography A*, 990(1-2), 239-245.
- Ledda, L., Deligios, P. A., Farci, R., & Sulas, L. (2013). Biomass supply for energetic purposes from some *Cardueae* species grown in Mediterranean farming systems. *Industrial Crops and Products*, 47, 218-226.

- Lee, D. Y. W., & Liu, Y. (2003). Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, and isosilybin B, isolated from *Silybum marianum* (milk thistle). *Journal of Natural Products*, 66(9), 1171-1174.
- Lee, J. I., Hsu, B. H., Wu, D., & Barrett, J. S. (2006). Separation and characterization of silybin, isosilybin, silydianin and silychristin in milk thistle extract by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 57-68.
- Lee, J. I., Narayan, M., & Barrett, J. S. (2007). Analysis and comparison of active constituents in commercial standardized silymarin extracts by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 845(1), 95-103.
- Li, F.-Q., & Hu, J.-H. (2004). Improvement of the dissolution rate of silymarin by means of solid dispersions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(8), 972-973.
- Li, W., Han, J., Li, Z., Li, X., Zhou, S., & Liu, C. (2008). Preparative chromatographic purification of diastereomers of silybin and their quantification in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 862(1-2), 51-57.
- Ligeret, H., Brault, A., Vallerand, D., Haddad, Y., & Haddad, P. S. (2008). Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation–warm reperfusion liver injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(3), 507-514.
- Lisichkin, G. V., & Krutyakov, Y. A. (2006). Molecularly imprinted materials: synthesis, properties, applications. *Russian Chemical Reviews*, 75(10), 901-918.
- Liu, C.-H., Lin, C.-C., Hsu, W.-C., Chung, C.-Y., Lin, C.-C., Jassey, A., Chang, S.-P., Tai, C.-J., Tai, C.-J., Shields, J., Richardson, C. D., Yen, M.-H., Tyrrell, D. L. J., & Lin, L.-T. (2017). Highly bioavailable silibinin nanoparticles inhibit HCV infection. *Gut*, 66(10), 1853-1861.
- Liu, H., Du, Z., & Yuan, Q. (2009a). A novel rapid method for simultaneous determination of eight active compounds in silymarin using a reversed-phase UPLC-UV detector. *Journal of Chromatography B*, 877(32), 4159-4163.

- Liu, H., Du, X., Yuan, Q., & Zhu, L. (2009b). Optimisation of enzyme assisted extraction of silybin from the seeds of *Silybum marianum* by Box–Behnken experimental design. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 20(6), 475-483.
- Liu, H., Yuan, Q., Li, C. F., & Huang, T. X. (2010). Isolation and purification of silychristin, silydianin and taxifolin in the co-products of the silybin refined process from the silymarin by high-speed counter-current chromatography. *Process Biochemistry*, 45(5), 799-804.
- Lofgreen, J. E., & Ozin, G. A. (2014). Controlling morphology and porosity to improve performance of molecularly imprinted sol–gel silica. *Chemical Society Reviews*, 43(3), 911-933.
- Loguercio, C., & Festi, D. (2011). Silybin and the liver: from basic research to clinical practice. *World Journal of Gastroenterology*, 17(18), 2288.
- Lucini, L., Kane, D., Pellizzoni, M., Ferrari, A., Trevisi, E., Ruzickova, G., & Arslan, D. (2016). Phenolic profile and in vitro antioxidant power of different milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] cultivars. *Industrial Crops and Products*, 83, 11-16.
- Madaus, R., Gorler, K., & Molls, W. (1983). *U.S. Patent No. 4,368,195*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Malekzadeh, M., Mirmazloum, Anguorani, H. R., Mortazavi, S. N., & Panahi, M. (2011). The physicochemical properties and oil constituents of milk thistle (*Silybum marianum* Gaertn. cv. Budakalászi) under drought stress. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(8), 1485-1488.
- Marhol, P., Bednář, P., Kolářová, P., Večeřa, R., Ulrichová, J., Tesařová, E., Vavříková, E., Kuzma, M., & Křen, V. (2015). Pharmacokinetics of pure silybin diastereoisomers and identification of their metabolites in rat plasma. *Journal of Functional Foods*, 14, 570-580.
- Martin, R. J., Deo, B., & Douglas, J. A. (2000). Effect of time of sowing on reproductive development of variegated thistle. *Agronomy New Zealand*, 30, 1-5.

- Martin, R. J., Deo, B., Lauren, D. R., Jensen, D. J., & Smith, W. A. (2002). Domesticating variegated thistle. *Agronomy New Zealand*, 32, 35-39.
- Martin, R. J., Lauren, D. R., Smith, W. A., Jensen, D. J., Deo, B., & Douglas, J. A. (2006). Factors influencing silymarin content and composition in variegated thistle (*Silybum marianum*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 34(3), 239-245.
- Martinelli, T., Andrzejewska, J., Salis, M., & Sulas, L. (2015). Phenological growth stages of *Silybum marianum* according to the extended BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, 166(1), 53-66.
- Martinelli, T., Potenza, E., Moschella, A., Zaccheria, F., Benedettelli, S., & Andrzejewska, J. (2016). Phenotypic evaluation of a milk thistle germplasm collection: fruit morphology and chemical composition. *Crop Science*, 56(6), 3160-3172.
- Mascher, H., Kikuta, C., & Weyhenmeyer, R. (1993). Diastereomeric separation of free and conjugated silibinin in plasma by reversed phase HPLC after specific extraction. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 16(13), 2777-2789.
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27(12), 1254-1255.
- Meddeb, W., Rezig, L., Abderrabba, M., Lizard, G., & Mejri, M. (2017). Tunisian milk thistle: An investigation of the chemical composition and the characterization of its cold-pressed seed oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2582.
- Mhamdi, B., Abbassi, F., Smaoui, A., Abdelly, C., & Marzouk, B. (2016). Fatty acids, essential oil and phenolics composition of *Silybum marianum* seeds and their antioxidant activities. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(3), 953-959.
- Mira, L., Silva, M., & Manso, C. F. (1994). Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochemical Pharmacology*, 48(4), 753-759.

- Mohammadi, V., Saraji, M., & Jafari, M. T. (2019). Direct molecular imprinting technique to synthesize coated electrospun nanofibers for selective solid-phase microextraction of chlorpyrifos. *Microchimica Acta*, 186, 524.
- Mohan, S., Dhanalakshmi, S., Mallikarjuna, G. U., Singh, R. P., & Agarwal, R. (2004). Silibinin modulates UVB-induced apoptosis via mitochondrial proteins, caspases activation, and mitogen-activated protein kinase signaling in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(1), 183-189.
- Montemurro, P., Fracchiolla, M., & Lonigro, A. (2007). Effects of some environmental factors on seed germination and spreading potentials of *Silybum marianum* Gaertner. *Italian Journal of Agronomy*, 2(3), 315-320.
- Morazzoni P., & Bombardelli E. (1995). *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia*, 66, 3-42.
- Murakami, Y., Kawata, A., Ito, S., Katayama, T., & Fujisawa, S. (2015). Radical-scavenging and anti-inflammatory activity of quercetin and related compounds and their combinations against RAW264.7 cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. Relationships between anti-inflammatory activity and quantum chemical parameters. *In Vivo*, 29(6), 701-710.
- Nikolaichenko, N. V., Eskov, I. D., Druzhkin, A. F., Kishnikatina, A. N., Strizhkov, N. I., & Shyurova, N. A. (2018). Yield, oil content and biochemical composition of seeds of milk thistle, depending on the methods of soil cultivation in the Volga region steppe zone. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(1), 223-227.
- Nichols, S. P., Snipes, C. E., & Jones, M. A. (2003). Evaluation of Row Spacing and Mepiquat Chloride in Cotton. *The Journal of Cotton Science*, 7(4), 148-155.
- O'Mahony, J., Molinelli, A., Nolan, K., Smyth, M. R., & Mizaikoff, B. (2006). Anatomy of a successful imprint: Analysing the recognition mechanisms of a molecularly imprinted polymer for quercetin. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7), 1383-1392.

- Omar, A. A., Hadad, G. M., & Badr, J. M. (2012). First detailed quantification of silymarin components in the leaves of *Silybum marianum* cultivated in Egypt during different growth stages. *Acta Chromatographica*, 24(3), 463-474.
- Omer, E. A., Refaat, A. M., Ahmed, S. S., Kamel, A., & Hammouda, F. M. (1993). Effect of spacing and fertilization on the yield and active constituents of milk thistle, *Silybum marianum*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 1(4), 17-23.
- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J., Vicha, R., & Mlcek, J. (2015). Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 12871-12890.
- Pardo, A., Mespouille, L., Dubois, P., Duez, P., & Blankert, B. (2012). Targeted extraction of active compounds from natural products by molecularly imprinted polymers. *Central European Journal of Chemistry*, 10(3), 751-765.
- Parmoon, G., Moosavi, S. A., Akbari, H., & Ebadi, A. (2015). Quantifying cardinal temperatures and thermal time required for germination of *Silybum marianum* seed. *The Crop Journal*, 3(2), 145-151.
- Pauling, L., & Campbell, D. H. (1942). The manufacture of antibodies in vitro. *Journal of Experimental Medicine*, 76(2), 211-220.
- Pauling, L. (1940). A theory of the structure and process of formation of antibodies. *Journal of the American Chemical Society*, 62(10), 2643-2657.
- Pei, Y. P., Chen, J., & Li, W. L. (2009). Progress in research and application of silymarin. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 1-8.
- Pelter, A., & Hänsel, R. (1968). The structure of silybin (silybum substance E₆), the first flavanolignan. *Tetrahedron Letters*, 9(25), 2911-2916.
- Pelter, A., & Hänsel, R. (1975). Struktur des Silybins: I. Abbauversuche. *Chemische Berichte*, 108(3), 790-802.
- Pelter, A., Hänsel, R., & Kaloga, M. (1977). The structure of silychristin. *Tetrahedron Letters*, 18(51), 4547-4548.

- Pferschy-Wenzig, E. M., Atanasov, A. G., Malainer, C., Noha, S. M., Kunert, O., Schuster, D., Heiss, E. H., Oberlies, H., Wagner, H., Bauer, R., & Dirsch, V. M. (2014). Identification of isosilybin A from milk thistle seeds as an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Journal of Natural Products*, 77(4), 842-847.
- Pifferi, G., Pace, R., & Conti, M. (1994). Synthesis and antihepatotoxic activity of silybin 11-O-phosphate. *Farmaco*, 49(1), 75-76.
- Polachi, N., Bai, G., Li, T., Chu, Y., Wang, X., Li, S., Gu, N., Wu, J., Li, W., Zhang, Y., Zhou, S., Sun, H., & Liou, C. (2016). Modulatory effects of silibinin in various cell signaling pathways against liver disorders and cancer—A comprehensive review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 123, 577-595.
- Polyak, S. J., Morishima, C., Lohmann, V., Pal, S., Lee, D. Y. W., Liu, Y., Graf, T. N., & Oberlies, N. H. (2010). Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(13), 5995-5999.
- Polyak, S. J., Ferenci, P., & Pawlotsky, J. M. (2013). Hepatoprotective and antiviral functions of silymarin components in hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 57(3), 1262-1271.
- Polyakov, M. V. (1931). Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhurnal Fizieskoj Khimii*, 2, 799-805.
- Poppe, L., & Petersen, M. (2016). Variation in the flavonolignan composition of fruits from different *Silybum marianum* chemotypes and suspension cultures derived therefrom. *Phytochemistry*, 131, 68-75.
- Post-White, J., Ladas, E. J., & Kelly, K. M. (2007). Advances in the use of milk thistle (*Silybum marianum*). *Integrative Cancer Therapies*, 6(2), 104-109.
- Prescha, A., Grajzer, M., Dedyk, M., & Grajeta, H. (2014). The antioxidant activity and oxidative stability of cold-pressed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(8), 1291-1301.

- Quaglia, M. G., Bossù, E., Donati, E., Mazzanti, G., & Brandt, A. (1999). Determination of silymarine in the extract from the dried silybum marianum fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19(3-4), 435-442.
- Radjabian, T., Rezazadeh, S. H., & Fallah Huseini, H. (2008). Analysis of silymarin components in the seed extracts of some milk thistle ecotypes from Iran by HPLC. *Iranian Journal of Science and Technology*, 32(2), 141-146.
- Rahimi, A., & Kamali, M. (2012). Different planting date and fertilizing system effects on the seed yield, essential oil and nutrition uptake of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). *Advances in Environmental Biology*, 6(5), 1789-96.
- Rahman, N., Khan, N. A., & Azmi, S. N. H. (2004). Kinetic spectrophotometric method for the determination of silymarin in pharmaceutical formulations using potassium permanganate as oxidant. *Pharmazie*, 59(2), 112-116.
- Rajala, A., & Peltonen-Sainio, P. (2001). Plant growth regulator effects on spring cereal root and shoot growth. *Agronomy Journal*, 93(4), 936-943.
- Ram, G., Bhan, M. K., Gupta, K. K., Thaker, B., Jamwal, U., & Pal, S. (2005). Variability pattern and correlation studies in *Silybum marianum* Gaertn. *Fitoterapia*, 76(2), 143-147.
- Ramesh, R., & Ramprasad, E. (2015). Effect of plant growth regulators on morphological, physiological and biochemical parameters of soybean (*Glycine max* L. Merrill). In *Biotechnology and Bioforensics* (pp. 61-71). Springer, Singapore.
- Ramstroem, O., Andersson, L. I., & Mosbach, K. (1993). Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(26), 7562-7564.
- Rosińska, A., Dorna, H., Szopińska, D., Irzykowska, L., & Seidler-Łożykowska, K. (2018). Evaluation of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) seed germination in relation to seed health and seedling emergence. *Herba Polonica*, 64(3), 1-10.

- Ruggieri, F., D'Archivio, A. A., Di Camillo, D., Lozzi, L., Maggi, M. A., Mercurio, R., & Santucci, S. (2015). Development of molecularly imprinted polymeric nanofibers by electrospinning and applications to pesticide adsorption. *Journal of Separation Science*, 38(8), 1402-1410.
- Růžičková, G., Fojtová, J., & Součková, M. (2011). The yield and quality of milk thistle [*Silybum marianum* (L). Gaertn.] seed oil from the perspective of environment and genotype-a pilot study. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 14(1), 9-12.
- Sadowska, K., & Andrzejewska, J. (2009). Effect of the date and harvest method on the yield and quality of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) cultivated on light soil. *Herba Polonica*, 55(3), 47-54.
- Sala, F., Albares, P., Colovic, M., Persiani, S., & Rovati, L. C. (2014). Development and validation of two liquid chromatography–tandem mass spectrometry methods for the determination of silibinin and silibinin hemisuccinate in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 945, 1-9.
- Saleh, I. A., Kamal, S. A., Shams, K. A., Abdel-Azim, N. S., Aboutabl, E. A., & Hammouda, F. M. (2015a). Effect of particle size on total extraction yield and silymarin content of *Silybum marianum* L. seeds. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(2), 803-809.
- Saleh, I. A., Vinatoru, M., Mason, T. J., Abdel-Azim, N. S., Aboutabl, E. A., & Hammouda, F. M. (2015b). Ultrasonic-assisted extraction and conventional extraction of Silymarin from *Silybum marianum* seeds; a comparison. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 6(2), 709-717.
- Saleh, I. A., Vinatoru, M., Mason, T. J., Abdel-Azim, N. S., Shams, K. A., Aboutabl, E., & Hammouda, F. M. (2017). Extraction of silymarin from milk thistle (*Silybum marianum*) seeds – a comparison of conventional and microwave-assisted extraction methods. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 51(2), 124-133.

- Saller, R., Brignoli, R., Melzer, J., & Meier, R. (2008). An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Complementary Medicine Research*, 15(1), 9-20.
- Sánchez-Sampedro, M. A., Fernández-Tárrago, J., & Corchete, P. (2005). Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Journal of Biotechnology*, 119(1), 60-69.
- Sánchez-Sampedro, M. A., Fernández-Tárrago, J., & Corchete, P. (2009). Elicitation of silymarin in cell cultures of *Silybum marianum*: effect of subculture and repeated addition of methyl jasmonate. *Biotechnology Letters*, 31(10), 1633-1637.
- Schirhagl, R. (2013). Bioapplications for molecularly imprinted polymers. *Analytical Chemistry*, 86(1), 250-261.
- Schrall, R., & Becker, H. (1977). Tissue and suspension of *Silybum marianum*. II. Communication: the formation of flavonolignans by feeding suspension cultures with flavonoids and coniferyl alcohol. *Planta Medica*, 32(05), 27-32.
- Schuppan, D., Jia, J. D., Brinkhaus, B., & Hahn, E. G. (1999). Herbal products for liver diseases: a therapeutic challenge for the new millennium. *Hepatology*, 30(4), 1099-1104.
- Seeff, L. B., Curto, T. M., Szabo, G., Everson, G. T., Bonkovsky, H. L., Dienstag, J. L., Shiffman, M.L., Lindsay, K. L., Lok, A. S., Di Bisceglie, A. M., Lee, W. M., Ghany, M. G., & the HALT-C Trial Group. (2008). Herbal product use by persons enrolled in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis (HALT-C) trial. *Hepatology*, 47(2), 605-612.
- Sellergren, B., Lepistö, M., & Mosbach, K. (1988). Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition. *Journal of the American Chemical Society*, 110(17), 5853-5860.
- Sellergren, B. (1989). Molecular imprinting by noncovalent interactions. Enantioselectivity and binding capacity of polymers prepared under conditions

- favoring the formation of template complexes. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 190(11), 2703-2711.
- Sellergren, B., & Andersson, L. I. (2000). Application of imprinted synthetic polymers in binding assay development. *Methods*, 22(1), 92-106.
- Shakeel, F., Anwer, M. K., Shazly, G. A., & Jamil, S. (2014). Measurement and correlation of solubility of bioactive compound silymarin in five different green solvents at 298.15 K to 333.15 K. *Journal of Molecular Liquids*, 195, 255-258.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- Shea, K. J., & Thompson, E. A. (1985). Site isolation in macroreticular divinylbenzene polymers. *Macromolecules*, 18(4), 814-817.
- Shibano, M., Lin, A.-S., Itokawa, H., & Lee, K.-H. (2007). Separation and characterization of active flavonolignans of *Silybum marianum* by Liquid Chromatography connected with Hybrid Ion-Trap and Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC-MS/IT-TOF). *Journal of Natural Products*, 70(9), 1424-1428.
- Shimi, P., Poorazar, R., Jamali, M., & Bagherani-Torshiz, N. (2006). Evaluating clopyralid as a broad leaf herbicide in canola fields of Iran. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, 12(4), 307-311.
- Shokrpour, M., Mohammadi, S. A., Moghaddam, M., Ziai, S. A., & Javanshir, A. (2008). Variation in flavonolignan concentration of milk thistle (*Silybum marianum*) fruits grown in Iran. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal plants*, 13(4), 55-69.
- Shokrpour, M., Gigloo, M. T., Asghari, A., & Bahrapour, S. (2011). Study of some agronomic attributes in milk thistle (*Silybum marianum* Gaertn.) ecotypes from Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(11), 2169-2174.
- Šimánek, V. , Kren, V. , Ulrichová, J. , Vicar, J. & Cvak, L. (2000). Silymarin: what is in the name ...? an appeal for a change of editorial policy. *Hepatology*, 32, 442-444.

- Sindel, B. M. (1991). A review of the ecology and control of thistles in Australia. *Weed Research*, 31(4), 189-201.
- Školníková, M., Škarpa, P., & Ryant P. (2019). Effect of nitrogen fertilization on yield and quality of milk thistle [*Silybum marianum* L. (Gaertn.)] achenes. *Journal of Elementology*, 24(2), 701-710.
- Škottová, N., Krečman, V., & Šimánek, V. (1999). Activities of silymarin and its flavonolignans upon low density lipoprotein oxidizability in vitro. *Phytotherapy Research*, 13(6), 535-537.
- Smith, T., Kawa, K., Eckl, V., Morton, C., & Stredney, R. (2018). Herbal Supplement Sales in US Increase 8.5% in 2017, Topping \$8 Billion. Strongest sales growth in more than 15 years bolstered by continued popularity of Ayurvedic herbs and new formulations of botanicals with general health and nutrition benefits. *HerbalGram*, 119, 62-71.
- Smith, W. A., Lauren, D. R., Burgess, E. J., Perry, N. B., & Martin, R. J. (2005). A silychristin isomer and variation of flavonolignan levels in milk thistle (*Silybum marianum*) fruits. *Planta Medica*, 71(09), 877-880.
- Souissi, T., Berner, D. K., & Smallwood, E. L. (2005). First report of smut caused by *Microbotryum silybum* on ivory thistle. *Plant Disease*, 89(11), 1242.
- Stancheva, I., Georgiev, G., Geneva, M., Ivanova, A., Dolezal, M., & Tumova, L. (2010). Influence of foliar fertilization and growth regulator on milk thistle seed yield and quality. *Journal of Plant Nutrition*, 33(6), 818-830.
- Subramaniam, S., Vaughn, K., Carrier, D. J., & Clausen, E. C. (2008). Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yield: an alternative to petroleum ether defatting. *Bioresource Technology*, 99(7), 2501-2506.
- Sulas, L., Re, G. A., Bullitta, S., & Piluzza, G. (2016). Chemical and productive properties of two Sardinian milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) populations as sources of nutrients and antioxidants. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(2), 315-326.

- Surai, P. (2015). Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, 4(1), 204-247.
- Suzuki, A. B. P., Alves, G. A. C., Junior, D. B., Stulzer, G. C. G., Osawa, M. S., & de Faria, R. T. (2018). Growth regulators for reduction of height in potted red-yellow sunflower *Helianthus annuus* cv.'Florenza'. *Australian Journal of Crop Science*, 12(3), 393-399.
- Svenson, J., & Nicholls, I. A. (2001). On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 435(1), 19-24.
- Sy-Cordero, A., Graf, T. N., Nakanishi, Y., Wani, M. C., Agarwal, R., Kroll, D. J., & Oberlies, N. H. (2010). Large-scale isolation of flavonolignans from *Silybum marianum* extract affords new minor constituents and preliminary structure-activity relationships. *Planta Medica*, 76(06), 644-647.
- Taha, M. N., Krawinkel, M. B., & Morlock, G. E. (2015). High-performance thin-layer chromatography linked with (bio) assays and mass spectrometry – A suited method for discovery and quantification of bioactive components? Exemplarily shown for turmeric and milk thistle extracts. *Journal of Chromatography A*, 1394, 137-147.
- Tahernia, S., Esfahani, M., Bakhshi, D., & Rabiei, B. (2014). Changes of plant characteristics and silibin content of milk thistle at different planting dates and plant density. *Biharean Biologist*, 8(2), 109-112.
- Takase, M., Pappoe, A. N. M., Afrifa, E. A., & Miyittah, M. (2018). High performance heterogeneous catalyst for biodiesel production from non-edible oil. *Renewable Energy Focus*, 25, 24-30.
- Tang, S., & Willey, N. J. (2003). Uptake of ¹³⁴Cs by four species from the Asteraceae and two varieties from the Chenopodiaceae grown in two types of Chinese soil. *Plant and Soil*, 250(1), 75-81.
- Thomé O.W. (1885). Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz. *Tafeln*, 4, 596. Διαθέσιμο στο http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=149426 [Προσπελάστηκε 3 Σεπτέμ. 2019].

- Tittel, G., & Wagner, H. (1977). High-performance liquid chromatographic separation of silymarins and their determination in a raw extract of *Silybum marianum* Gaertn. *Journal of Chromatography A*, 135(2), 499-501.
- Tiwari, P., & Mishra, K. P. (2015). Silibinin in cancer therapy: A promising prospect. *Cancer Research Frontiers*, 1(3), 303-318.
- Toklu, H. Z., Tunalı-Akbay, T., Erkanlı, G., Yüksel, M., Ercan, F., & Şener, G. (2007). Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, protects against burn-induced oxidative skin injury. *Burns*, 33(7), 908-916.
- Tong, W. W., Zhang, C., Hong, T., Liu, D. H., Wang, C., Li, J., He, X. K., & Xu, W. D. (2018). Silibinin alleviates inflammation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and has a therapeutic effect on arthritis in rats. *Scientific Reports*, 8(1), 3241.
- Torres, M., & Corchete, P. (2016). Gene expression and flavonolignan production in fruits and cell cultures of *Silybum marianum*. *Journal of Plant Physiology*, 192, 111-117.
- Trouillas, P., Marsal, P., Svobodová, A., Vostálová, J., Gažák, R., Hrbáč, J., Sedmera, P., Křen, V., Lazzaroni, R., Duroux, J.-L., & Walterova, D. (2008). Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2, 3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry A*, 112(5), 1054-1063.
- Tučkar, D., Vrsalović c, M., & Kuštrak, D. (2003). Thin-layer chromatography analysis of milk thistle preparations (*Silybum marianum* (L.) Gaertn). *Farmaceutski Glasnik*, 59(7/8), 303-310.
- Tukan, S. K., Takruri, H. R., & Al-Eisawi, D. M. (1998). The use of wild edible plants in the Jordanian diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 49(3), 225-235.
- Tung, S. A., Huang, Y., Ali, S., Hafeez, A., Shah, A. N., Song, X., Ma, X., Luo, D., & Yang, G. (2018). Mepiquat chloride application does not favor leaf photosynthesis and carbohydrate metabolism as well as lint yield in late-planted cotton at high plant density. *Field Crops Research*, 221, 108-118.

- Tung, S. A., Huang, Y., Ali, S., Hafeez, A., Shah, A. N., Ma, X., Ahmad, S., Chattha, M. S., Liu, A., Liu, J., Zhang, Z. & Yang, G. (2019). Mepiquat chloride effects on potassium acquisition and functional leaf physiology as well as lint yield in highly dense late-sown cotton. *Industrial Crops and Products*, 129, 142-155.
- Umpleby II, R. J., Bode, M., & Shimizu, K. D. (2000). Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Analyst*, 125(7), 1261-1265.
- Vaknin, Y., Hadas, R., Schafferman, D., Murkhovsky, L., & Bashan, N. (2008). The potential of milk thistle (*Silybum marianum* L.), an Israeli native, as a source of edible sprouts rich in antioxidants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(4), 339-346.
- Vasapollo, G., Sole, R. D., Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., & Mele, G. (2011). Molecularly imprinted polymers: present and future prospective. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 5908-5945.
- Vlatakis, G., Andersson, L. I., Müller, R., & Mosbach, K. (1993). Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature*, 361(6413), 645-647.
- Voinovich, D., Perissutti, B., Grassi, M., Passerini, N., & Bigotto, A. (2009). Solid state mechanochemical activation of *Silybum marianum* dry extract with betacyclodextrins: Characterization and bioavailability of the coground systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(11), 4119-4129.
- Wagner, H., Hörhammer, L., & Münster, R. (1968a). On the chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.). *Arzneimittel-Forschung*, 18(6), 688-696.
- Wagner, H., Hörhammer, L., & Münster, R. (1968b). Chemical evaluation of a silymarin-containing flavonoid concentrate from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Arzneimittelforschung*, 18(6), 696-698.
- Wagner, H., Seligmann, O., Hörhammer, L., Seitz, M., & Sonnenbichler, J. (1971). Zur Struktur von silychristin, einem zweiten silymarin-isomeren aus *Silybum marianum*. *Tetrahedron Letters*, 12(22), 1895-1899.

- Wagner, H., Diesel, P., & Seitz, M. (1974). The chemistry and analysis of silymarin from *Silybum marianum* Gaertn. *Arzneimittel-Forschung*, 24(4), 466-471.
- Wagner, H., & Bladt, S. (2001). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2nd ed. 2nd printing. New York: Springer. pp. 234-235
- Wallace, S., Carrier, D. J., Beitle, R. R., Clausen, E. C., & Griffis, C. L. (2003a). HPLC-UV and LC-MS-MS characterization of silymarin in milk thistle seeds and corresponding products. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, 4(2), 37-48.
- Wallace, S. N., Carrier, D. J., & Clausen, E. C. (2003b). Extraction of nutraceuticals from milk thistle: part II. Extraction with organic solvents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 108(1-3), 891-903.
- Wallace, S. N., Carrier, D. J., & Clausen, E. C. (2005). Batch solvent extraction of flavanolignans from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertner). *Phytochemical Analysis*, 16(1), 7-16.
- Wang, K., Zhang, H., Shen, L., Du, Q., & Li, J. (2010). Rapid separation and characterization of active flavanolignans of *Silybum marianum* by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(4), 1053-1057.
- Wen, P., Zong, M. H., Linhardt, R. J., Feng, K., & Wu, H. (2017). Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 70, 56-68.
- Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P., & Vulfson, E. N. (1995). A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *Journal of the American Chemical Society*, 117(27), 7105-7111.
- Wianowska, D., & Wiśniewski, M. (2015). Simplified procedure of silymarin extraction from *Silybum marianum* L. Gaertner. *Journal of Chromatographic Science*, 53(2), 366-372.

- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940-949.
- Woo, J. S., Kim, T.-S., Park, J.-H., & Chi, S.-C. (2007). Formulation and biopharmaceutical evaluation of silymarin using SMEDDS. *Archives of Pharmacal Research*, 30(1), 82-89.
- Wu, J.-W., Lin, L.-C., Hung, S.-C., Chi, C.-W., & Tsai, T.-H. (2007). Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(4), 635-641.
- Wu, J.-W., Lin, L.-C., & Tsai, T.-H. (2009). Drug–drug interactions of silymarin on the perspective of pharmacokinetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(2), 185-193.
- Wulff, G., Sarhan, A., & Zabrocki, K. (1973). Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates. *Tetrahedron Letters*, 14(44), 4329-4332.
- Wulff, G., Vesper, W., Grobe-Einsler, R., & Sarhan, A. (1977). Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates. *Die Makromolekulare Chemie*, 178(10), 2799-2816.
- Wulff, G. (1982). Selective binding to polymers via covalent bonds. The construction of chiral cavities as specific receptor sites. *Pure and Applied Chemistry*, 54(11), 2093-2102.
- Yan, H., & Row, K. (2006). Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *International Journal of Molecular Sciences*, 7(5), 155-178.
- Yanyu, X., Yunmei, S., Zhipeng, C., & Qineng, P. (2006). The preparation of silybin–phospholipid complex and the study on its pharmacokinetics in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(1), 77-82.
- Yan-yu, X., Yun-mei, S., Zhi-peng, C., & Qi-neng, P. (2006). Preparation of silymarin proliposome: a new way to increase oral bioavailability of silymarin in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics*, 319(1-2), 162-168.

- Younas, M., Drouet, S., Nadeem, M., Giglioli-Guivarc'h, N., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2018). Differential accumulation of silymarin induced by exposure of *Silybum marianum* L. callus cultures to several spectres of monochromatic lights. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 184, 61-70.
- Young, J., Evans, R., & Hawkes, R. (1978). Milk thistle (*Silybum marianum*) seed germination. *Weed Science*, 26(4), 395-398.
- Yousaf, A. M., Malik, U. R., Shahzad, Y., Mahmood, T., & Hussain, T. (2019). Silymarin-laden PVP-PEG polymeric composite for enhanced aqueous solubility and dissolution rate: Preparation and in vitro characterization. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(1), 34-39.
- Zangani, E., Zehtab-Salmasi, S., Andalibi, B., & Zamani, A.-A. (2018). Protective effects of nitric oxide on photosynthetic stability and performance of *Silybum marianum* under water deficit conditions. *Agronomy Journal*, 110(2), 555-564.
- Zhang, H., Ye, L., & Mosbach, K. (2006). Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development. *Journal of Molecular Recognition*, 19(4), 248-259.
- Zhang, H., Song, T., Zong, F., Chen, T., & Pan, C. (2008). Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for phenoxyacetic acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(1), 98-106.
- Zhang, P., Ye, H., Min, T., & Zhang, C. (2008). Water soluble poly (ethylene glycol) prodrug of silybin: design, synthesis, and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(5), 3230-3235.
- Zhelev, I., Merdzhanov, P., Angelova-Romova, M., Zlatanov, M., Antova, G., Dimitrova-Dyulgerova, I., & Stoyanova, A. (2014). Lipid Composition of *Carduus thoermeri* Weinm., *Onopordum acanthium* L. and *Silybum marianum* L., growing in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(3), 622-627.
- Zheljazkov, V. D., Yankuloff, Y., Raev, R., Stanev, S., Margina, A., & Kovatcheva, N. (1996). Achievements in breeding on medicinal and aromatic plants in Bulgaria. In: F. Pank, ed. *Proceedings of the International Symposium: Breeding*

Research on Aromatic and Medicinal Plants. Quedlinburg, Germany, 30 June-4 July 1996, 142-146.

Zheljazkov, V. D., Zhalnov, I., & Nedkov, N. K. (2006). Herbicides for weed control in blessed thistle (*Silybum marianum*). *Weed Technology*, 20(4), 1030-1034.

Zheljazkov, V. D., Vick, B. A., Ebelhar, M. W., Buehring, N., Baldwin, B. S., Astatkie, T., & Miller, J. F. (2008). Yield, oil content, and composition of sunflower grown at multiple locations in Mississippi. *Agronomy Journal*, 100(3), 635-642.

Zhuang, X., Dong, X., Ma, S., & Zhang, T. (2008). Selective on-line extraction of trans-resveratrol and emodin from *Polygonum cuspidatum* using molecularly imprinted polymer. *Journal of Chromatographic Science*, 46(8), 739-742.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

A. Δημοσιεύσεις σε Έγκριτα Διεθνή Περιοδικά του SCI με συντελεστή απήγησης

1. **Arampatzis D.A.**, Karkanis A.C., Tsiropoulos N.G., **2019**. Silymarin content and antioxidant activity of seeds of wild *Silybum marianum* populations growing in Greece. *Annals of Applied Biology*. 174:61-73. **Impact Factor (2018): 1,611**.
2. **Arampatzis, D.A.**, Karkanis A.C., Tsiropoulos, N.G., **2019**. Impact of plant density and meperquat chloride on growth, yield, and silymarin content of *Silybum marianum* grown under Mediterranean semi-arid conditions. *Agronomy*. 9, 669: 1-14, doi:10.3390/agronomy9110669. **Impact Factor (2018): 2,259**.

B. Ανακοινώσεις σε Πρακτικά Συνεδρίων

1. **Αραμπατζής Δ.**, Τσιρόπουλος Ν., Καρκάνης Α., **2017**. Αξιολόγηση βιοτύπων του φυτού *Silybum marianum* L. Gaertn ως προς την περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη. *Πρακτικά 19^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας*. Ορεστιάδα, 29-31 Μαρτίου 2017. σελ.35-37.
2. **Arampatzis D.A.**, Karkanis A.C., Tsiropoulos N.G., **2018**. Evaluation of silymarin content and flavonolignans composition in *Silybum marianum* populations growing in Greece. *Proceedings of 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products*, 25-29 November, 2018, Athens, Greece. PS1-K-005.
3. **Αραμπατζής Δ.**, Τσιρόπουλος Ν., Καρκάνης Α., **2019**. Επίδραση του ρυθμιστή ανάπτυξης meperquat chloride και της πυκνότητας της καλλιέργειας στην ανάπτυξη και την απόδοση του φαρμακευτικού φυτού *Silybum marianum*. *Πρακτικά 20^{ου} Συνεδρίου της Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας*. Αγρίνιο, 4-6 Απριλίου 2019. σελ: 62-63.
4. **Αραμπατζής Δ.**, Τζώρτζης Α., Γιάτσιου Ε., Τσιρόπουλος Ν., Καρκάνης Α., **2019**. Αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε σιλυμαρίνη και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος σπόρων διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης του φαρμακευτικού φυτού *Silybum marianum*. *Πρακτικά 20^{ου} Συνεδρίου της Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας*. Αγρίνιο, 4-6 Απριλίου 2019. σελ: 114-115.