



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

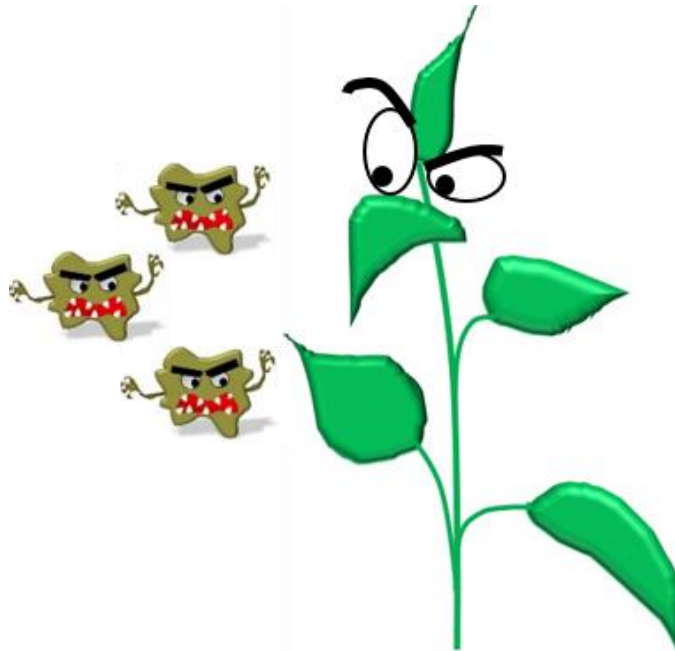
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hprZ<sub>Psph</sub>* σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και αλατότητας»

ΜΑΡΙΑ ΑΝΤΩΝΙΟΥ



Επιβλέπουσα: Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια, Π.Θ.

ΒΟΛΟΣ 2019

Επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hprZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και αλατότητας

Μαρία Αντωνίου

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Παυλή Ουρανία, Επικ. Καθηγήτρια, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα, Καθηγητής, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευθυμία Λεβίζου, Επικ. Καθηγήτρια, Φυσιολογία Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Η παρούσα προπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, στη Σχολή Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2017-2018.

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής δε θα ήταν δυνατή χωρίς τη βοήθεια και την καθοδήγηση ορισμένων ανθρώπων, τους οποίους έχω την επιθυμία να ευχαριστήσω. Αρχικά, τίποτα από τα παρακάτω δε θα είχε έρθει εις πέρας χωρίς την επίβλεψη της καθηγήτριας και μέντοράς μου, κ Ουρανίας Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, στην οποία οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ τόσο για την ανάθεση του θέματος όσο και για την άριστη συνεργασία, τη στήριξη και την καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, της συγγραφής και της διόρθωσης.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους κ. Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα, Καθηγητή Γενετικής Βελτίωσης Φυτών για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις κατά τη διόρθωση της διατριβής και κα. Ευθυμία Λεβίζου, Επικ. Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, τόσο για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις όσο και για τη χορήγηση ορισμένων εργαλείων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Επίσης, θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω τις κυρίες Χρυσάνθη Φώτη και Νικολέτα Μητσοπούλου, υποψήφιες διδάκτορες Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, και την κυρία Ευαγγελία Παναγιωτάκη, μέλος ΕΤΕΠ, για τη συνεισφορά τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και για το θερμό και όμορφο κλίμα συνεργασίας κατά τη διάρκεια συμμετοχής μου στο εργαστήριο της Γενετικής Βελτίωσης Φυτών. Τέλος, το συμφοιτητή και πολύ καλό φίλο Βασίλειο Βισβίκη, με τον οποίο φέραμε εις πέρας τόσο τα δικά μου πειράματα όσο και τα δικά του.

Κλείνοντας, ευχαριστώ θερμά τους γονείς και τα αδέρφια μου για την υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια, σε όλα τα επίπεδα. Αν και η υποστήριξή τους ήταν μακρινή, κατάφερε να με κρατήσει συγκεντρωμένη στους στόχους μου δίνοντάς μου συνεχώς κίνητρα να συνεχίσω και χωρίς την οποία δε θα μπορούσα να τους επιτύχω.

## Περίληψη

Οι βακτηριακής προέλευσης χαρπίνες, κατά την εξωγενή εφαρμογή τους ή την ενδογενή έκφρασή τους σε φυτά, έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα επαγωγής μηχανισμών που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών έναντι βιοτικών αλλά και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Στο πλαίσιο αυτό, η χαρπίνη HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, έχει αποδειχθεί ότι προσδίδει ανθεκτικότητα στον ιό *Beet necrotic yellow vein virus* που προκαλεί την ασθένεια της ριζομανίας των ζαχαροτεύτλων αλλά και σε άλλα παθογόνα όπως ο ιός του μωσαικού του καπνού (TMV) και το βακτήριο *P. syringae* pv. tomato. Με δεδομένο ότι οι αβιοτικές καταπονήσεις γενικά, και οι καταπονήσεις ξηρασίας και υψηλής αλατότητας ειδικότερα, αποτελούν σημαντικότερους περιοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη και απόδοση των καλλιεργειών, στόχο της παρούσας προπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση της δυνατότητας επίτευξης ανθεκτικότητας έναντι των προαναφερθέντων παραγόντων καταπόνησης διαμέσου της ενδογενούς παραγωγής της HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> σε διαγονιδιακά φυτά. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε η απόκριση διαγονιδιακών σειρών του είδους *N. benthamiana*, που εκφράζουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* στην εκκρινόμενη μορφή του (*SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*), ως προς την ανθεκτικότητα έναντι καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος των διαθέσιμων διαγονιδιακών σειρών (T<sub>2</sub>) για την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του *SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* σε θρεπτικό μέσο επιλογής, παρουσία του αντιβιοτικού υγρομυκίνη. Οι επιλεγμένες ομοζύγωτες σειρές αποτέλεσαν το γενετικό υλικό για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Η αξιολόγηση έγινε σε *in vitro* συνθήκες και βασίστηκε στο δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των νεαρών σποροφύτων, συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου, υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν πως τόσο η βλάστηση των σπόρων, όσο και η ανάπτυξη και ευρωστία των σπορόφυτων, επηρεάστηκαν σημαντικά από την καταπόνηση σε *in vitro* συνθήκες, με την επίδραση της καταπόνησης να είναι στο πλείστο των περιπτώσεων ανάλογη με το εφαρμοζόμενο επίπεδο στρες. Τα ευρήματα της μελέτης υπογραμμίζουν την υπεροχή κάποιων *hrpZ*-σειρών έναντι των υπολοίπων αλλά και των φυτών αγρίου τύπου, όχι μόνο σε επίπεδο αντοχής στον εκάστοτε περιοριστικό παράγοντα αλλά και σε επίπεδο ανάπτυξης. Στο σύνολό τους,

τα αποτελέσματα παρέχουν πρόσθετες ενδείξεις σχετικά με τη δυνατότητα αξιοποίησης των χαρπινών, και ειδικότερα της HrpZ<sub>Psph</sub>, ως μία στρατηγική για την επίτευξη ευρείας ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων.

**Λέξεις κλειδιά:** γενετική μηχανική, μηχανισμοί άμυνας, *N. benthamiana*, χαρπίνες, SP/hrpZ<sub>Psph</sub>, βελτίωση για ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, ξηρασία, υψηλή αλατότητα

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>1. Εισαγωγή</b>	12
1.1. Κλιματική αλλαγή	13
1.1.1. Επιδράσεις της κλιματικής αλλαγής στη φυτική παραγωγή	13
1.2. Αβιοτικές καταπονήσεις	15
1.2.1. Υδατική καταπόνηση	18
1.2.1.1. Επιπτώσεις της υδατικής καταπόνησης στα φυτά	18
1.2.2. Καταπόνηση υψηλής αλατότητας	19
1.2.2.1. Επιπτώσεις της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στα φυτά	21
1.2.3. Θερμοκρασιακή καταπόνηση	22
1.2.4. Καταπόνηση ακτινοβολίας	25
1.2.5. Οξειδωτική καταπόνηση	25
1.3. Μηχανισμοί άμυνας	26
1.3.1. Αποκρίσεις στα διάφορες καταπονήσεις	28
1.4. Κλασσική και Μοριακή Βελτίωση	33
1.4.1. Κλασσική Βελτίωση	33
1.4.2. Μοριακή Βελτίωση	34
1.4.2.1. Μοριακοί δείκτες	35
1.4.2.2. Συνεισφορά της Μοριακής Βελτίωσης	36
1.5. Χαρπίνες	38
1.6. Το είδος <i>Nicotiana benthamiana</i> ως φυτό μοντέλο	41
1.7. Σκοπός της μελέτης	44
<b>2. Υλικά και Μέθοδοι</b>	45
2.1. Φυτικό υλικό	45
2.2. Αξιολόγηση των διαγονιδιακών σειρών	46
2.2.1. Επιλογή των ομοζύγων σειρών <i>SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i> —σειρών	
2.2.1.1. Απολύμανση σπόρων	46
2.2.1.2. Έλεγχος της ομοζύγωσης/ετεροζύγωσης κατάστασης του διαγονιδίου <i>SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	47
2.2.2 Έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου <i>SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	48
2.3. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης	48

2.3.1. Καταπόνηση Υψηλής Αλατότητας (NaCl)	48
2.3.2. Υδατική καταπόνηση (PEG, D-Mannitol)	51
<b>3. Αποτελέσματα</b>	<b>53</b>
3.1. Αξιολόγηση διαγονιδιακών σειρών	53
3.1.1 Επιλογή ομοζύγων για το διαγονίδιο <i>hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i> σειρών	53
3.1.2 Επιβεβαίωση της παρουσίας του διαγονιδίου <i>hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	55
3.2. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του φυτικού υλικού στην αλατότητα (NaCl)	56
3.2.1. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (υγρομυκίνη)	56
3.2.2. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας απουσία αντιβιοτικού επιλογής (υγρομυκίνη)	62
3.3. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του φυτικού υλικού στην υδατική καταπόνηση (% PEG, D-Mannitol)	68
<b>4. Συζήτηση</b>	<b>79</b>
<b>5. Βιβλιογραφία</b>	<b>84</b>

## Κατάλογος Πινάκων

**Πίνακας 2.1:** Διαγονιδιακές *hrrZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές (T<sub>0</sub>) και αριθμός φυτών (T<sub>2</sub> γενιά) που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας (NaCl). 49

**Πίνακας 2.2:** Διαγονιδιακές *hrrZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές (T<sub>0</sub>) και αριθμός φυτών (T<sub>2</sub> γενιά) που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης. 52

**Πίνακας 3.1:** Ποσοστό βλάστησης (%) ανά γονότυπο και επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (NaCl), την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 14<sup>η</sup> και 17<sup>η</sup> ημέρα της καταπόνησης. 57

**Πίνακας 3.2:** Ποσοστό βλάστησης (%) ανά γονότυπο και επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (NaCl), την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 14<sup>η</sup> και 17<sup>η</sup> ημέρα της καταπόνησης. 63

**Πίνακας 3.3:** Ποσοστό βλάστησης (%) ανά γονότυπο και επίπεδο υδατικής καταπόνησης (% PEG και D-mannitol) την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup>, 18<sup>η</sup>, 21<sup>η</sup> και 24<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. 69



## Κατάλογος Γραφημάτων

**Γράφημα 3.1:** Ποσοστό βλάστησης των σπόρων 6 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, παρουσίας αντιβιοτικού (υγρομυκίνη), ως απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (C, 100 mM NaCl και 200 mM NaCl), ανά ημέρα καταπόνησης (3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 14<sup>η</sup> και 17<sup>η</sup>). 58

**Γράφημα 3.2:** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης των σπόρων 6 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* με ταυτόχρονη παρουσία αντιβιοτικού (υγρομυκίνη), ανά επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (C, 100 mM NaCl και 200 mM NaCl). 59

**Γράφημα 3.3:** Ποσοστό βλάστησης των σπόρων 7 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* και σπόρων αγρίου τύπου (wt) απουσίας αντιβιοτικού (υγρομυκίνη), ως απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (C, 100 mM NaCl και 200 mM NaCl), ανά ημέρα καταπόνησης (3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 14<sup>η</sup> και 17<sup>η</sup>). 65

**Γράφημα 3.4:** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης των σπόρων 6 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt), απουσίας αντιβιοτικού (υγρομυκίνη) ανά επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (C, 100mM NaCl και 200mM NaCl). 66

**Γράφημα 3.5:** Ποσοστό βλάστησης των σπόρων 7 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ως απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα υδατικής καταπόνησης (C, 50 μM, 100 μM και 200 μM), ανά ημέρα καταπόνησης (3<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup> και 18<sup>η</sup>). 72

**Γράφημα 3.6:** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης των σπόρων 7 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ανά επίπεδο υδατικής καταπόνησης (C, 5% PEG, 100 mM D-mannitol και 200 mM D-mannitol). 72

## Κατάλογος Εικόνων

- Εικόνα 1.1:** Αίτια της κλιματικής αλλαγής: Γραφική απεικόνιση του φαινομένου του θερμοκηπίου. 13
- Εικόνα 1.2:** Τα φυτά ως μέρη του οικοσυστήματος υπόκεινται σε πληθώρα αβιοτικών καταπονήσεων. 16
- Εικόνα 1.3:** Νόμος ανοχής όπως προτάθηκε από το Victor Ernest Shelford το 1911. 17
- Εικόνα 1.4:** Τα στάδια απόκρισης του φυτού στην καταπόνηση. 28
- Εικόνα 1.5:** Απόκριση των φυτών σε παράγοντες καταπόνησης - Ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας. Προϋπόθεση αποτελεί η αντίληψη του ερεθίσματος και η μεταγωγή του σήματος σε επίπεδο φυτού. 29
- Εικόνα 1.6:** Υποβοηθούμενη από μοριακούς δείκτες επιλογή (Marker assisted selection – MAS). Μέθοδος όπου η φαινοτυπική αξιολόγηση βασίζεται στη χρήση μοριακών δεικτών. 37
- Εικόνα 1.7:** Η δομή του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου III (T3SS). 40
- Εικόνα 1.8:** Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου των χαρπινών στα φυτά. 42
- Εικόνα 1.9:** Το είδος *Nicotiana benthamiana*. : 43
- Εικόνα 2.1:** Απεικόνιση της γονιδιακής κατασκευής που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών του είδους *N. benthamiana*. Η υπό μεταφορά περιοχή περιείχε το γονίδιο *hrpZ*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (μεγέθους 995 bp), ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης PR1 καθώς και το γονίδιο *aphIV* (hygromycin B phosphotransferase) που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη. 47

**Εικόνα 2.2:** Σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών σταδίων που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. 51

**Εικόνα 3.1:** Προσδιορισμός της ομοζύγωτης/ετεροζύγωτης κατάστασης του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* σε μετασχηματισμένες σειρές του είδους *N. benthamiana* (T<sub>2</sub> γενιά), μέσω της επιλογής για το γνώρισμα της ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής (υγρομυκίνη). 55

**Εικόνα 3.2:** Επαλήθευση της καταλληλότητας της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής, μέσω βλάστησης σπόρων αγρίου τύπου (wt) παρουσία και απουσία του αντιβιοτικού υγρομυκίνη (30 mg/L). 56

**Εικόνα 3.3:** Προϊόντα ενίσχυσης PCR σε μετασχηματισμένα φυτά του είδους *N. benthamiana*. M: Marker (Gene Ruler Ladder mix, Fermentas). 1, 2, 3, 4, 5: Μετασχηματισμένα φυτά (T<sub>2</sub> γενιά) που φέρουν το διαγονίδιο *SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* (μέγεθος: 995 bp). 56

**Εικόνα 3.4:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (100 mM NaCl), την 10<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. 61

**Εικόνα 3.5:** Αναστολή ανάπτυξης των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών 160-18-1 και 167-7-4 στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl), την 6<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. 61

**Εικόνα 3.6:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl), την 17<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. 62

- Εικόνα 3.7:** Θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* στην ανάπτυξη των σπορόφυτων των διαγονιδιακών *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρών 169-10-1 και 169-7-2 σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των σπορόφυτων αγρίου τύπου (WT). 63
- Εικόνα 3.8:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (100 mM NaCl), την 10<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. 68
- Εικόνα 3.9:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (200 mM NaCl), την 17<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. 68
- Εικόνα 3.10:** Θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* στην ανάπτυξη των σπορόφυτων των διαγονιδιακών σειρών 169-7-2 και 169-10-1 σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των σπορόφυτων αγρίου τύπου. 69
- Εικόνα 3.11:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο χαμηλό επίπεδο υδατικής καταπόνησης με πολυαιθυλενική γλυκόλη (5% PEG), την 3<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. 74
- Εικόνα 3.12:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο μεσαίο επίπεδο υδατικής καταπόνησης (100mM), την 3<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. 76
- Εικόνα 3.13:** Αναστολή ανάπτυξης των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών 166-18-1 και 177-4-4 στο υψηλό επίπεδο υδατικής καταπόνησης (200 mM D-man), την 3<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. 77
- Εικόνα 3.14:** Θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* στην ανάπτυξη των σπορόφυτων των διαγονιδιακών σειρών 167-7-4 και 169-10-1 σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των σπορόφυτων αγρίου τύπου (WT) και της σειράς 177-4-4 κατά την 9<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. 78



# 1. Εισαγωγή

---

## Γενικά

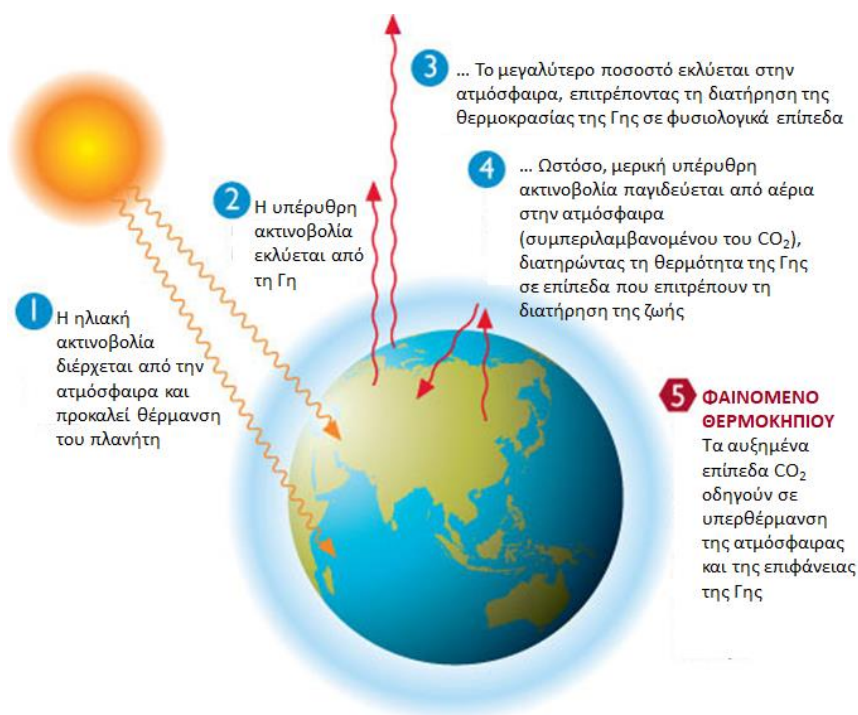
Τα φυτά ως στατικοί οργανισμοί, διαφοροποιούνται από τους άλλους οργανισμούς στη Γη. Το ιδιαίτερο αυτό χαρακτηριστικό έχει ως συνέπεια την έλλειψη ικανότητας αποφυγής του παράγοντα καταπόνησής τους. Οι παράγοντες καταπόνησης των φυτών διακρίνονται στους βιοτικούς και αβιοτικούς (Levit 1980), ενώ η πρόληψη ή/και αντιμετώπιση των αρνητικών συνεπειών που επιφέρουν στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα των καλλιεργούμενων ειδών γίνεται μέσω της χρήσης φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων αλλά και μέσω της ενεργοποίησης εγγενών μηχανισμών άμυνας που αναπτύχθηκαν ως αποτέλεσμα της συνεξέλιξης των φυτών με τα περιβάλλοντα στα οποία αναπτύχθηκαν. Η ενεργοποίηση των μηχανισμών περιλαμβάνει αρχικά την αντίληψη της πηγής ερεθίσματος που δέχονται, την επακόλουθη μεταγωγή του σήματος, η οποία τελικά οδηγεί στην επαγωγή (άμεση ή έμμεση) των βιοχημικών μονοπατιών άμυνας.

Το κλίμα και το έδαφος ασκούν καθοριστικό ρόλο στη δυνατότητα προσαρμογής των φυτών διαμορφώνοντας, από κοινού με το γονότυπο, το φαινότυπο των φυτών σε επίπεδο αύξησης, ανάπτυξης, αναπαραγωγής ή ακόμα και επιβίωσής τους. Στους κλιματικούς παράγοντες, που επιδρούν στη φυσιολογική ομοίωση, κατατάσσονται το ατμοσφαιρικό περιβάλλον, η θερμοκρασία, η εδαφική υγρασία, ο άνεμος, η ηλιακή ακτινοβολία και οι κατακρημνίσεις. Παρουσιάζουν περιοδικές και εποχικές διακυμάνσεις, οι οποίες δύνανται να είναι προβλέψιμες και ομαλές ή απρόβλεπτες και αιφνίδιες (Mickelbart et al. 2015). Οι εδαφικοί παράγοντες συνδέονται με τις συνθήκες του εδάφους που επηρεάζουν αντίστοιχα την αύξηση, ανάπτυξη και επιβίωση των φυτών και αφορούν κυρίως στη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, υγρασίας καθώς και στον αερισμό. Οι ανωτέρω παράγοντες σχετίζονται άμεσα με τη μηχανική σύσταση και δομή του εδάφους, την ηλεκτρική αγωγιμότητα, την ικανότητα ιονταλλαγής, το pH και την πανίδα και χλωρίδα, αμφοτέρωθεν με το κλίμα (Mickelbart et al. 2015). Η απόδοση των καλλιεργούμενων ειδών αγγίζει μόλις το 22 % του δυναμικού παραγωγής τους, με τη μείωση να αποδίδεται στην απόκλιση των

κλιματικών και εδαφικών συνθηκών από τις βέλτιστες για την εκάστοτε καλλιέργεια (Boyer 1982).

## 1.1. Κλιματική Αλλαγή

Ως **Κλιματική αλλαγή** ορίζεται η μεταβολή του κλίματος που οφείλεται άμεσα ή έμμεσα σε ανθρώπινες δραστηριότητες, διακρίνοντας τον όρο από την κλιματική μεταβλητότητα που έχει φυσικά αίτια. Περιλαμβάνεται τόσο η πλανητική θέρμανση, όσο κι άλλες συνιστώσες του κλίματος που σχετίζονται με την αύξηση των αερίων του θερμοκηπίου (Εικόνα 1.1). Οι σημαντικότερες συνιστώσες του κλίματος που επηρεάζονται από την κλιματική αλλαγή είναι η συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub>, η αύξηση της θερμοκρασίας του αέρα, η ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας, οι βροχοπτώσεις, η ταχύτητα του ανέμου και η εξατμισοικανότητα της ατμόσφαιρας. Επίσης, επηρεάζεται και η ένταση αλλά και η συχνότητα εμφάνισης ακραίων φαινομένων, όπως πλημμυρών και περιόδων ξηρασίας (Καραμάνος 2012).



**Εικόνα 1.1** Αίτια της κλιματικής αλλαγής: Γραφική απεικόνιση του φαινομένου του θερμοκηπίου. (Πηγή: CO<sub>2</sub> Cooperative Research Centre)

Σύμφωνα με αναφορές (Ζερεφός κ.ά. 2011), οι μεταβολές που αναμένονται στην Ελλάδα ως το τέλος του αιώνα αφορούν σε:

- ✚ Αύξηση της θερμοκρασίας του αέρα κατά 3-4 °C
- ✚ Μείωση της βροχόπτωσης κατά 5-19 %
- ✚ Αύξηση της προσπίπτουσας ηλιακής ακτινοβολίας από 2,3-4,5 W/m<sup>2</sup>
- ✚ Αύξηση των πλημμυρών κατά 20-30 % λόγω αύξησης των βροχοπτώσεων
- ✚ Αύξηση κατά 40 επιπλέον ημέρες σε ξηρασία ετησίως
- ✚ Αύξηση των ετησίων ανέμων (μελτέμια) κατά 10 %

### **1.1.1. Επιδράσεις της κλιματικής αλλαγής στη φυτική παραγωγή**

Η κλιματική αλλαγή έχει εντείνει τα προβλήματα που ανακύπτουν από τις αβιοτικές καταπονήσεις, και ιδιαίτερα τις καταπονήσεις ξηρασίας και υψηλών θερμοκρασιών, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται σημαντικές μειώσεις στην απόδοση σημαντικών καλλιεργούμενων ειδών, όπως το σιτάρι, το κριθάρι και ο αραβόσιτος (Lobell and Field 2007). Οι παρατηρηθείσες απώλειες αντανακλούν το αποτέλεσμα των αλλαγών στις συνιστώσες του κλίματος που επιδρούν άμεσα ή έμμεσα στη φυσιολογία, αύξηση και ανάπτυξη των φυτών (Καραμάνος 2012).

#### **i. Αύξηση συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub>**

Η αυξημένη συγκέντρωση CO<sub>2</sub> επηρεάζει θετικά τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης κι έτσι, αναμένεται το αποτέλεσμα της αύξησης των αποδόσεων των καλλιεργειών, που διαφέρει ανάλογα με το είδος και το γονότυπο. Ωστόσο, υπάρχει ένα όριο ευνοϊκής επίδρασης της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> που κυμαίνεται περί τα 700 ppm.

#### **ii. Αύξηση της θερμοκρασίας της ατμόσφαιρας**

Το σύνολο των καλλιεργούμενων ειδών έχει ένα άριστο θερμοκρασιακό εύρος, στο οποίο επιτυγχάνεται μεγιστοποίηση της ανάπτυξης και παραγωγικότητας. Η απόκλιση από το συγκεκριμένο εύρος και δει η αυξημένη ατμοσφαιρική θερμοκρασία επηρεάζει τη φυτική παραγωγή, με την επιρροή να διαμορφώνεται ανάλογα με το καλλιεργούμενο είδος και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Υπό συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας, ευνοούνται τα θερμοφιλά φυτά, ενώ στα ψυχρόφιλα προκαλούνται δυσμενείς



επιπτώσεις και μεταβολές που σχετίζονται με το βιολογικό τους κύκλο (πρωίμιση ή οψίμιση). Επιπλέον, η αύξηση της ατμοσφαιρικής θερμοκρασίας συνοδεύεται από μεταβολές στη συχνότητα και ένταση των παγετών, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα καλλιέργειας θερμοφίλων φυτών σε περιοχές που σήμερα είναι ψυχρές. Έμμεσος αντίκτυπος της θερμοκρασιακής αύξησης είναι οι αλλαγές σε επίπεδο βιοποικιλότητας και συγκεκριμένα στη διασπορά εχθρών, ζιζανίων και ασθενειών με επικράτηση των θερμοφίλων ή εισβολή νέων από θερμότερες περιοχές. Ωστόσο, οι επιπτώσεις σε επίπεδο οικοσυστημάτων είναι δύσκολο να εκτιμηθούν (Karamanos 2009).

### iii. Μείωση των βροχοπτώσεων με παράλληλη αύξηση της εξάτμισης

Η μείωση των βροχοπτώσεων έχει σαν άμεση συνέπεια τη μείωση του υδατικού ισοζυγίου με δυσμενείς επιπτώσεις στις καλλιέργειες, οι οποίες αδυνατούν να καλύψουν τις ανάγκες σε νερό. Η μείωση των βροχοπτώσεων, σε συνδυασμό με την αύξηση της ατμοσφαιρικής θερμοκρασίας, οδηγεί σε υψηλότερη εξατμισοδιαπνοή. Στις παραγόμενες περιοχές δημητριακών της ανατολικής Αφρικής για παράδειγμα, η συνηθισμένη περίοδος βροχοπτώσεων ξεκινάει αργότερα και τελειώνει νωρίτερα (Segele and Lamb 2005), με μακρύτερα διαστήματα ξηρασίας ενδιάμεσα (Seleshi and Camberlin 2006).

### iv. Αύξηση της συχνότητας και της έντασης ακραίων καιρικών φαινομένων

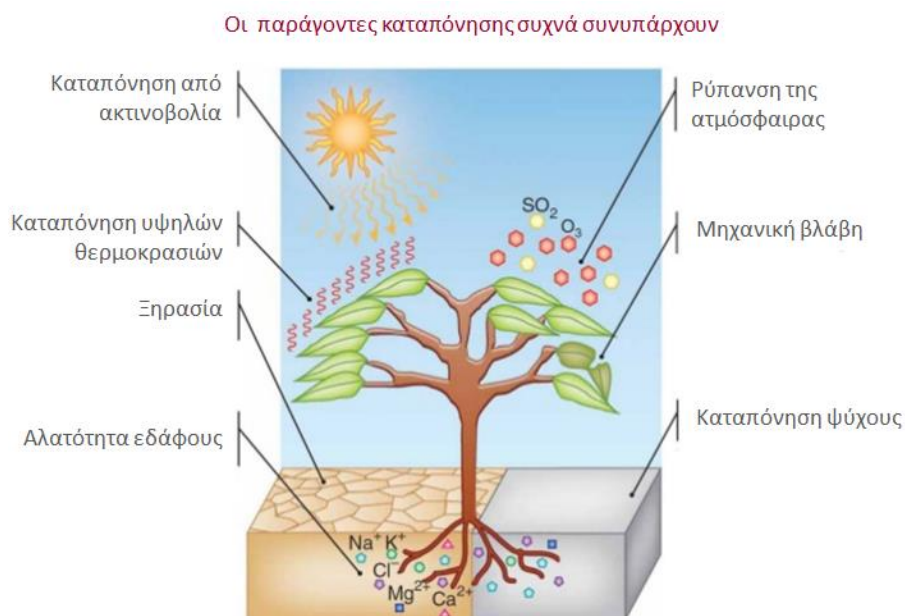
Η αυξημένη συχνότητα και ένταση των ακραίων καιρικών φαινομένων, και ειδικότερα των πλημμυρών και παρατεταμένων περιόδων ξηρασίας, αναμένεται να προκαλέσει δυσμενείς έως και καταστρεπτικές συνέπειες στη φυτική παραγωγή. Η ταυτόχρονη αύξηση της ραγδαιότητας των βροχοπτώσεων αναμένεται να αυξήσει σημαντικά τον κίνδυνο διάβρωσης και ερημοποίησης των εδαφών.

## **1.2. Αβιοτικές Καταπονήσεις**

Τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά των φυτών συνδιαμορφώνονται από το γονότυπο και το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται. Η απόκλιση από τις άριστες περιβαλλοντικές συνθήκες, οι περιβαλλοντικές αλλαγές, λόγω κλιματικής αλλαγής, αλλά και η ταυτόχρονη επικράτηση διαφορετικών αβιοτικών παραγόντων οδηγούν σε πληθώρα διαταραχών στη λειτουργία των φυτών τόσο σε μεταβολικό/βιοχημικό όσο και σε

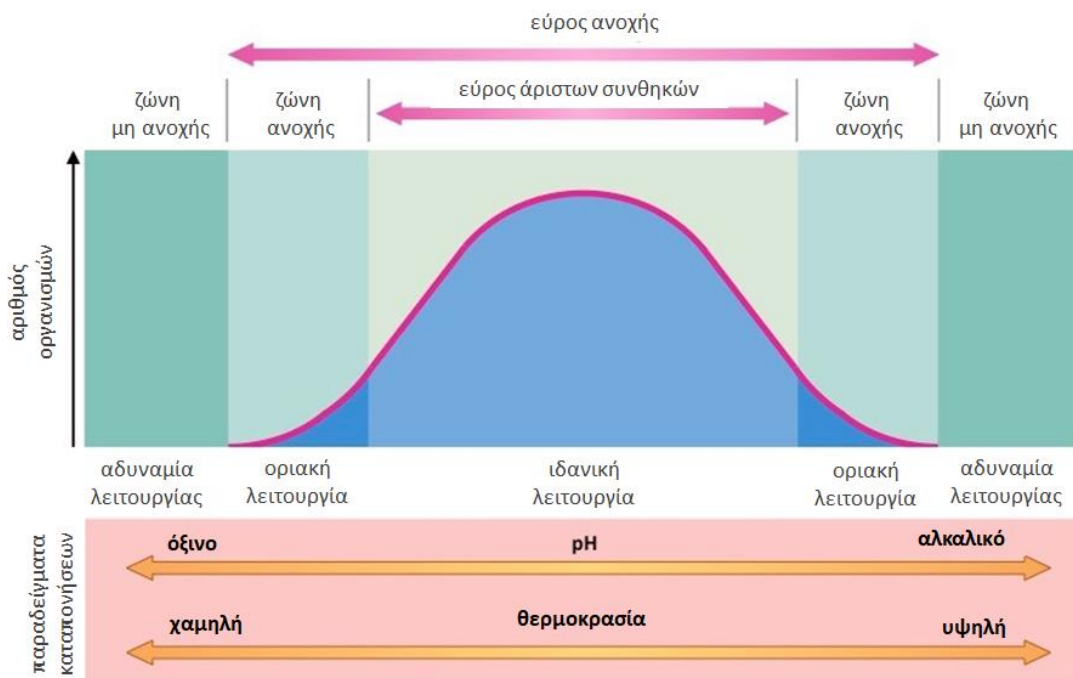
φυσιολογικό και αναπτυξιακό επίπεδο (Mickelbart et al. 2015). Οι κυριότεροι περιβαλλοντικοί αβιοτικοί παράγοντες που επιδρούν στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών είναι η επάρκεια εδαφικής υγρασίας, η διαθεσιμότητα ανόργανων θρεπτικών στοιχείων στο εδαφικό διάλυμα, το φως και η θερμοκρασία (Mickelbart et al. 2015).

**Αβιοτική καταπόνηση** ορίζεται ως η δυσμενής επίδραση των αβιοτικών παραγόντων, εξαιτίας των οποίων η κανονική λειτουργία των μηχανισμών των φυτών διαταράσσεται. Στις σημαντικότερες αβιοτικές καταπονήσεις των φυτών εντάσσονται η ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας ή ξηρασία, η υψηλή αλατότητα, οι ακραίες θερμοκρασίες (υψηλές ή χαμηλές), η ανοξία ή υποξία (περίσσεια νερού), η αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων (στην ατμόσφαιρα ή στο έδαφος) αλλά και ατμοσφαιρικής προέλευσης παράγοντες όπως το όζον και η υπεριώδης ακτινοβολία (Εικόνα 1.2). Το σύνολο των ανωτέρω καταπονήσεων προκαλεί πληθώρα αλλαγών σε μορφολογικό, φυσιολογικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο. Είναι ενδεικτικό ότι σε παγκόσμιο επίπεδο, περίπου το 22 % της γεωργικής γης πλήττεται από υψηλή αλατότητα, ενώ οι περιοχές που υποφέρουν από ξηρασία αυξάνονται ολοένα και περισσότερο (FAO 2004).



**Εικόνα 1.2** Τα φυτά ως μέρη του οικοσυστήματος υπόκεινται σε πληθώρα αβιοτικών καταπονήσεων. (Πηγή: Vickers et al. 2009, Nature)

Οι αβιοτικοί παράγοντες διαφέρουν στην ένταση και τη διάρκεια επικράτησής τους. **Εύρος ανοχής** (tolerance range) ορίζεται ως η περιοχή επίδρασης του παράγοντα στην οποία ένα είδος δύναται να επιβιώσει και να επιτελέσει τις βασικές βιολογικές και φυσιολογικές λειτουργίες του. Εκτός του εύρους ανοχής, λαμβάνει χώρα παρεμπόδιση ή αναστολή των λειτουργιών του είδους. Σε **περιοχές μη ανοχής** (zone of intolerance) οι οργανισμοί δεν επιβιώνουν. Οι παράγοντες που προσεγγίζουν ή υπερβαίνουν τα όρια ανοχής καλούνται **περιοριστικοί ή περιοριστικές συνθήκες** (Εικόνα 1.3).



**Εικόνα 1.3** Νόμος ανοχής όπως προτάθηκε από το Victor Ernest Shelford το 1911.

(Πηγή: <http://ib.bioninja.com.au/options/option-c-ecology-and-conser/c1-species-and-communities/survival-factors.html>)

Όπως προαναφέρθηκε, η καταπόνηση λαμβάνει χώρα όταν ένας αβιοτικός παράγοντας βρίσκεται σε περίσσεια ή σε έλλειψη. Ως αποτέλεσμα των ανωτέρω καταστάσεων προκύπτουν άμεσες και έμμεσες επιδράσεις στα φυτά. Στις άμεσες (πρωτογενείς) επιδράσεις περιλαμβάνονται η αφυδάτωση των κυττάρων και η πτώση του υδατικού δυναμικού. Οι έμμεσες επιδράσεις σχετίζονται με μεταβολές των φυσικών και βιοχημικών ιδιοτήτων των κυττάρων και αφορούν σε ελάττωση της μεταβολικής δραστηριότητας, τοξικότητα, οξειδωτικό στρες, απώλεια της ακεραιότητας του κυττάρου που τελικά οδηγεί στη θανάτωση. Ακραίες τιμές ενός παράγοντα

καταπόνησης προκαλούν αδυναμία αύξησης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αναστολή της φωτοσύνθεσης, αδυναμία διατήρησης της σταθερότητας των πρωτεϊνών και αλλοίωση της ακεραιότητας των μεμβρανών, παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οξειδωτικές ζημιές και κυτταρικό θάνατο (Mickelbart et al. 2015). Έχει εκτιμηθεί ότι περίπου το 70 % του δυναμικού παραγωγής μειώνεται λόγω αβιοτικών καταπονήσεων (Acquaah 2007) και ότι περισσότερο από το 10 % της καλλιεργούμενης γης σε παγκόσμιο επίπεδο έχει καταστεί ακατάλληλο προς καλλιέργεια λόγω της ξηρασίας και της αυξημένης συγκέντρωσης αλάτων (Wang et al. 2003).

### 1.2.1. Υδατική καταπόνηση

Το νερό στα φυτά, όπως και στους περισσότερους οργανισμούς, αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του όγκου των κυττάρων και τον κυριότερο πόρο, του οποίου τα αποθέματα περιορίζονται ολοένα και περισσότερο. Η ανάπτυξη των φυτών δυσχεραίνεται τόσο από έλλειψη όσο και από περίσσεια νερού, ωστόσο η ανεπαρκής διαθεσιμότητα νερού απαντάται σε περισσότερα περιβάλλοντα και καλλιέργειες λόγω έλλειψης βροχής. Η **ξηρασία**, μετεωρολογικά, ορίζεται ως μια περίοδος ανεπαρκούς βροχόπτωσης που έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη νερού από τα φυτά (Mickelbart et al. 2015). Η ξηρασία μπορεί να είναι χωρικά και προσωρινά μεταβλητή, θανατηφόρα, βραχυπρόθεσμη ή σποραδική, σοβαρή, μέτρια ή ασήμαντη και μπορεί να κυμανθεί σε βαθμιαίους έως αιφνίδιους ρυθμούς.

Η υδατική καταπόνηση αποτελεί τον πλέον σημαντικό περιοριστικό παράγοντα της ανάπτυξης και αποδοτικότητας των καλλιεργειών. Διακρίνεται σε: i) **αφυδάτωση** και ii) **ωσμωτική καταπόνηση**. Το χαμηλό υδατικό δυναμικό αποτελεί ένα κοινό χαρακτηριστικό για τις δύο ανωτέρω μορφές καταπόνησης. Μικρή διαθεσιμότητα νερού στο έδαφος λόγω ξηρασίας προκαλεί πτώση του ωσμωτικού δυναμικού του εδάφους, που όταν οι τιμές του είναι αρνητικές για το φυτό, οδηγεί τα κύτταρα σε ωσμωτική καταπόνηση, δηλαδή δυσχέρεια απορρόφησης νερού από το έδαφος και αύξηση της συγκέντρωσης ανόργανων ιόντων σε τοξικά πλέον όρια για το κύτταρο.

### **1.2.1.1. Επιπτώσεις της υδατικής καταπόνησης στα φυτά**

Προκειμένου να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους, τα φυτά απαιτούν μεγάλη ποσότητα νερού (> 70 %). Υπό συνθήκες ανεπάρκειας νερού, η υδατική κατάσταση των φυτών διαταράσσεται και οδηγεί σε ανισορροπίες στην οσμωτική και ιοντική ομοιόσταση, μείωση πάχους των κυττάρων και βλάβη σε δομικά και λειτουργικά κύτταρα και μεμβράνες. Οι επιδράσεις μπορεί να είναι άμεσες (πρωτογενείς) και έμμεσες (δευτερογενείς). Στις άμεσες επιδράσεις συμπεριλαμβάνονται η μείωση υδατικού δυναμικού ( $\Psi_p$ ), η αφυδάτωση των κυττάρων και η υδραυλική αντίσταση. Οι επιδράσεις αυτές με τη σειρά τους προκαλούν μεταβολή των φυσικών και βιοχημικών ιδιοτήτων των κυττάρων, οδηγώντας σε έμμεσες επιδράσεις, οι οποίες αφορούν σε μειωμένη μεταβολική και κυτταρική δραστηριότητα, κλείσιμο των στοματίων, αναστολή της φωτοσύνθεσης, αποκοπή των φύλλων και κυτοτοξικότητα των ιόντων. Το σύνολο των επιδράσεων έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της ακεραιότητας του κυττάρου, στη συνέχεια το μαρασμό των φυτών, τη μείωση του δυναμικού παραγωγής και πιθανόν την αδυναμία επιβίωσης του φυτού.

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η ξηρασία αποτελεί το σημαντικότερο περιβαλλοντικό στρες (Tuberosa and Salvi 2006; Cattivelli et al. 2008) και περιορίζει συχνά δραστικά τη γεωργική παραγωγή. Με δεδομένο ότι έως το 2050 προβλέπεται σημαντική αύξηση του πληθυσμού της γης, εκτιμάται ότι σε περιοχές που θα έχει επακολουθήσει ξηρασία από το 2025, πρέπει να προηγηθεί αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών σε ποσοστό 49% (Pennisi 2008). Κάθε χρόνο πολλές περιοχές πλήττονται από την ξηρασία, με αποτέλεσμα τη μείωση της γεωργικής παραγωγής και την αδυναμία εξασφάλισης της οικονομικής βιωσιμότητας των καλλιεργειών.

### **1.2.2. Καταπόνηση υψηλής αλατότητας**

Η υψηλή αλατότητα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές καταπονήσεις που επιδρά σοβαρά στη γεωργική παραγωγή σε μεγάλη ζώνη της καλλιεργήσιμης έκτασης σε παγκόσμιο επίπεδο, ιδιαίτερα σε ξηρές και ημίξηρες περιοχές. Περισσότερο από 6% της παγκόσμιας έκτασης γης έχει επηρεαστεί από την αλατότητα (FAO 2009c), ιδίως σε παραθαλάσσια αλατούχα έλη ή ενδοχώριες ερημιές.

Αρχικά, η υψηλή αλατότητα ανέκυψε φυσικά μέσω της αποσάθρωσης των ορυκτών (το οποίο οδηγεί στην απελευθέρωση διαλυτών αλάτων όπως χλωρίδια ασβεστίου, μαγνησίου και νατρίου και, σε μικρότερο βαθμό, θειικά και ανθρακικά άλατα) ή μέσω εναπόθεσης ανέμου και βροχής του νερού του ωκεανού (Szabolcs 1989; Munns and Tester 2008; FAO 2009b). Δευτερογενώς, το φαινόμενο της υψηλής αλατότητας εντείνεται όταν η άρδευση και η εκκαθάριση των δέντρων αυξάνουν την υδατική επιφάνεια και το ποσοστό των αλάτων στη ζώνη του ριζικού συστήματος (Rengasamy 2006). Περίπου το 20% της αρδευόμενης γης στον κόσμο, όπου το 1/3 των τροφίμων παράγεται, επηρεάζεται από την αυξημένη συγκέντρωση αλάτων (Ghassemi et al. 1995). Αυτή έχει αρνητική επίδραση στην αύξηση, την ανάπτυξη και το μεταβολισμό του φυτού, μέσω μεταβολών που λαμβάνουν χώρα σε βασικές φυσιολογικές και βιοχημικές διαδικασίες, όπως η φωτοσύνθεση, η σύνθεση των πρωτεϊνών κ.ά. (Ehret and Plant 1999; Hasegawa et al. 2000; Zhu 2002; Ashraf 2004; Parida and Das 2005).

Η αλατότητα παράγει υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων, σε μεγαλύτερο ποσοστό  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$ , κυρίως στην περιοχή της ριζόσφαιρας, με άμεση συνέπεια την εκδήλωση υδατικής ανεπάρκειας. Επομένως, η αλατότητα έχει διττό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών: i) λειτουργεί ως αναστολέας στην πρόσληψη νερού, μέσω ωσμωτικής επίδρασης και ii) δρα ως παράγοντας τοξικότητας, λόγω της αυξημένης συσσώρευσης ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$  (Bewley and Black 1982). Κατά τη φάση της βλάστησης, περιορίζει την απορρόφηση του νερού, δρώντας ως αναστολέας της βλάστησης, και παράλληλα, επιδρά τοξικά στους βλαστάνοντες σπόρους και στην ανάπτυξη των νεαρών σποροφύτων (Murillo et al. 2002; Khajeh et al. 2003). Οι ανωτέρω επιδράσεις οδηγούν σε μείωση της μετατροπής των ενζυμικών αποθεμάτων σε σάκχαρα, αναστολή της ανάπτυξης των φυτών και αδυναμία μεταφύτευσης καθώς και μικρούς πληθυσμούς φυτών (Khan and Gulzar 2003). Στο έδαφος, η υψηλότερη συγκέντρωση διαλυτών αλάτων απαντάται στα ανώτερα εδαφικά στρώματα (Almansouri et al. 2001), ενώ το μέγεθος των αρνητικών επιπτώσεων εξαρτάται από το είδος και το γονότυπο του φυτού (Lutts et al. 1995; Ungar 1996; Almansouri et al. 2001). Είναι αξιοσημείωτο ότι σύμφωνα με αναφορές, η ανεκτικότητα στην αλατότητα στο στάδιο της βλάστησης αποτελεί κληρονομήσιμο γνώρισμα των φυτών (Ashraf et al. 1987).

Τα φυτά, ανάλογα με την ανθεκτικότητά τους στα άλατα, κατατάσσονται σε 2 κατηγορίες: τα **αλόφυτα (halophytes)** που παρουσιάζουν καλή προσαρμοστικότητα στην υψηλή αλατότητα και τα **γλυκόφυτα (glycophytes)** που χαρακτηρίζονται από

ευαισθησία στην αυξημένη συγκέντρωση αλάτων (Mickelbart et al. 2015). Η ύπαρξη των ανθεκτικών στην αλατότητα φυτών (αλόφυτα) και οι διαφορές στην ανοχή μεταξύ γονοτύπων στα ευαίσθητα είδη φυτών, καταδεικνύει ότι η ανοχή στην αλατότητα έχει γενετική βάση (Yamaguchi and Blumwald 2005).

Οι ζημιές στις ρίζες είναι μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές που εκδηλώνονται στο υπέργειο μέρος των φυτών (ακόμη και σε χαμηλή συγκέντρωση  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$ ), γεγονός που οφείλεται κυρίως στο ότι οι ρίζες έρχονται σε άμεση επαφή με τα άλατα (Ouji et al. 2015). Ενδεικτικά αναφέρεται, ότι για το κυτταρικό διάλυμα των ριζών τοξική είναι η συγκέντρωση 10-30 mM  $\text{Na}^+$ , λόγω αναστολής/ανακοπής της ενζυμικής δραστηριότητας (Tester and Davenport 2003), ενώ στα φύλλα τοξική αποβαίνει η συγκέντρωση  $\text{Na}^+$  περί τα 100 mM (Wyn and Gorham 2002). Τα  $\text{Cl}^-$  συσσωρεύονται κυρίως σε νεαρούς βλαστούς και φύλλα, προκαλώντας κυτταρική νέκρωση (Flowers and Yeo 1995). Οι τοξικές συγκεντρώσεις του  $\text{Cl}^-$  κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα με τα ιόντα  $\text{Na}^+$  (Munns 2005).

Όπως προαναφέρθηκε, η αλατότητα οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στις αρδεύσεις, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που το νερό άρδευσης παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση διαλυτών αλάτων, οι οποίες συνιστούν συνήθη πρακτική στην προσπάθεια μεγιστοποίησης της φυτικής παραγωγής. Σήμερα, η υψηλή αλατότητα αποτελεί μία σημαντικότερη απειλή για τη φυτική παραγωγή καθώς οδηγεί σε ραγδαία μείωση των εκτάσεων καλλιεργήσιμης γης. Στην Ινδία έχουν χαθεί 7 εκατομμύρια εκτάρια καλλιέργειας (Martinez-Beltran and Manzur 2005), ενώ στην Αυστραλία, σχεδόν 8 εκατομμύρια εκτάρια γης βρίσκονται υπό την απειλή υποβάθμισης λόγω υψηλής αλατότητας (Munns et al. 2002).

#### **1.2.2.1. Επιπτώσεις της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στα φυτά**

Η υψηλή αλατότητα επιβάλλει μια ποικιλία καταπονήσεων στους ιστούς των φυτών. Οι σημαντικότερες επιδράσεις αφορούν στο οσμωτικό στρες, το οποίο είναι αποτέλεσμα των σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων των διαλυτών αλάτων στο έδαφος, και στην κυτταροτοξικότητα των ιόντων. Η μειωμένη ικανότητα αύξησης και ανάπτυξης του υπέργειου μέρους των φυτών υπό συνθήκες αυξημένης εδαφικής αλατότητας, αποτελεί απόρροια της οσμωτικής επίδρασης των αλάτων γύρω από τη

ρίζα, η οποία αναστέλλει την πρόσληψη νερού και προκαλεί υδατική ανεπάρκεια στα κύτταρα των φύλλων. Η διαφορά υδατικού δυναμικού ανάμεσα στο έδαφος και τα φυτά, επιφέρει αλλαγή στο οσμωτικό δυναμικό του φυτού, ώστε να διατηρείται η πίεση σπαραγγής των κυττάρων σε ανεκτά επίπεδα, που όμως είναι προσωρινή, με αποτέλεσμα τελικά να παρατηρούνται περιορισμοί στην επιμήκυνση και διαίρεση των κυττάρων που οδηγούν στην καθυστέρηση εμφάνισης των φύλλων και σε μικρότερο τελικό μέγεθος (Bartels and Sunkar 2005; Munns and Tester 2008).

Υπό παρατεταμένο στρες αλατότητας, η αναστολή ανάπτυξης των πλευρικών βλαστών γίνεται εμφανής σε διάστημα εντός λίγων εβδομάδων, ενώ σε διάστημα μηνών υπάρχουν επιδράσεις στην αναπαραγωγική ανάπτυξη, όπως πρόωμη άνθιση και μειωμένος αριθμός ανθέων. Παλαιότερα φύλλα μπορεί να θανατωθούν με ταυτόχρονη συνέχεια παραγωγής των νεότερων φύλλων. Οι κυτταρικές και μεταβολικές διαδικασίες που επιτελούνται παρουσιάζουν ομοιότητα με αυτές που συμβαίνουν κατά την υδατική καταπόνηση, γεγονός που οφείλεται στην από κοινού οσμωτική επίδραση των αλάτων (Yeo et al. 1991; Munns and Tester 2008).

Ιοντική κυτταροτοξικότητα προκύπτει όταν τα άλατα βρίσκονται σε τοξικές συγκεντρώσεις σε πλήρως αναπτυσσόμενα φύλλα, προκαλώντας την αδυναμία επιβίωσής τους. Αντικατάσταση του  $K^+$  από  $Na^+$  στις βιοχημικές αντιδράσεις οδηγεί σε διαμορφωτικές αλλαγές και απώλεια λειτουργιών πρωτεϊνών, αφού τα ιόντα  $Na^+$  και  $Cl^-$  διεισδύουν στα περιβλήματα ενυδάτωσης και παρεμβαίνουν στις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μετουσίωση των πρωτεϊνών και αποδιάταξη των μεμβρανών, μειώνοντας την ενυδάτωση των μακρομορίων (Mickelbart et al. 2015). Στην περίπτωση που ο ρυθμός ανάπτυξης των νεαρών φύλλων, συνδεδεμένος από την ιοντική κυτταροτοξικότητα, είναι μεγαλύτερος από αυτόν των νεοαναπτυσσόμενων φύλλων, η φωτοσυνθετική χωρητικότητα του φυτού δεν μπορεί να τροφοδοτήσει τους απαιτούμενους υδατάνθρακες στα νεότερα φύλλα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης (Munns and Tester 2008).



### 1.2.3. Θερμοκρασιακή Καταπόνηση

Η θερμοκρασία παίζει πολύ βασικό ρόλο σε βασικές φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών, όπως η φωτοσύνθεση, η απορρόφηση του νερού, η πρόσληψη και μεταφορά θρεπτικών στοιχείων, η αναπνοή, η διαπνοή και η σύνθεση χλωροφύλλης και άλλων χρωστικών. Οι ευνοϊκές θερμοκρασίες για τη σωστή εκτέλεση των λειτουργιών αυτών ποικίλουν ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και είδος του φυτού. Διαφορετικές είναι οι θερμοκρασιακές απαιτήσεις κατά τη φάση του φυτρώματος, της διαφοροποίησης των οφθαλμών, της άνθησης και της ωρίμανσης των καρπών. Το κάθε φυτό, ανάλογα με το είδος και το γονότυπο, εμφανίζει διαφορετικά θερμοκρασιακά όρια ανάπτυξης, εκτός των οποίων παρατηρείται αδυναμία επιβίωσης. Τα φυτά καταπονούνται σε 3 περιοχές ακραίων θερμοκρασιών: υψηλές θερμοκρασίες, χαμηλές θερμοκρασίες (ψύχος) και παγετός (Mickelbart et al. 2015).

Τα θερμοκρασιακά όρια για τα είδη καλλιέργειας ορίζονται γεωγραφικά από περιπτώσεις χαμηλών θερμοκρασιών και παγετού, τα οποία προκαλούν σοβαρές απώλειες απόδοσης. Περίπου τα 2/3 της γης στον κόσμο υποβάλλονται ετησίως σε θερμοκρασίες κάτω του παγώματος και το ήμισυ σε θερμοκρασίες μικρότερες από -20 °C. Οι περισσότερες τροπικές καλλιέργειες, καθώς και πολλές υποτροπικές, είναι ευαίσθητες σε θερμοκρασίες ψύχους. Μεταξύ των σημαντικότερων καλλιεργειών παγκοσμίως για παραγωγή τροφίμων, το καλαμπόκι είναι ευαίσθητο σε θερμοκρασίες ψύχους, με αποτέλεσμα να σημειώνονται απώλειες σοδειάς ή αποτυχία καλλιέργειας σε θερμοκρασίες κάτω των 10 °C. Επίσης, πολλές καλλιέργειες, όπως η σόγια, η τομάτα και η μπανάνα, ζημιώνονται σε θερμοκρασίες κάτω των 10-15 °C (Lynch 1990). Η θερμοκρασία κάτω από την οποία μπορεί να προκληθεί ζημιά από το ψύχος ποικίλλει μεταξύ των ειδών και των περιοχών προέλευσης και το εύρος είναι 0-4°C για είδη που ευδοκιμούν στην εύκρατη ζώνη, 8 °C για είδη της υποτροπικής ζώνης και γύρω στους 12 °C για είδη της τροπικής ζώνης (Lyons 1973).

#### Ακραίες υψηλές θερμοκρασίες

Περισσότερες ζημιές από υψηλές θερμοκρασίες προκαλούνται στους ενυδατωμένους, αναπτυσσόμενους ιστούς. Οι περισσότεροι ιστοί επιβιώνουν δύσκολα σε συνεχή έκθεση σε θερμοκρασίες πάνω από 45 °C ή σε σύντομη έκθεση σε θερμοκρασίες πάνω από 55°C. Αφυδατωμένοι ή μη αναπτυσσόμενοι ιστοί (σπέρματα, γύρη) επιβιώνουν σε

υψηλότερες θερμοκρασίες (70-120 °C). Στα φύλλα, ο συνδυασμός των υψηλών θερμοκρασιών με τη χαμηλή ψύξη μέσω διαπνοής οδηγεί σε θερμική καταπόνηση, η οποία προκαλεί βλάβες στη λειτουργική δομή και δραστηριότητα των ενζύμων, λόγω απώλειας της τρισδιάστατης δομής τους, στην ακεραιότητα των μεμβρανών και αναστολή της φωτοσύνθεσης (Mickelbart et al. 2015).

### **Ψύχος (ακραίες χαμηλές θερμοκρασίες)**

Σε χαμηλές θερμοκρασίες, μη ευνοϊκές για την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών, παρατηρούνται οι **ζημιογόνες επιδράσεις του ψύχους (chilling injury)**. Το ψύχος αποτελεί παράγοντα καταπόνησης για άφθονα φυτικά είδη (π.χ. καλαμπόκι, φασόλι, ρύζι, τομάτα, αγγούρι, γλυκοπατάτα, βαμβάκι). Τα μεσόφιλα και θερμόφιλα φυτά επηρεάζονται δυσχερώς με την απότομη πτώση της θερμοκρασίας στους 10-15 °C (Mickelbart et al. 2015).

Τα συμπτώματα που προκαλούνται από το ψύχος σε ευαίσθητα φυτά είναι μεταβλητά και γενικά εκδηλώνονται εντός 48 και 72 ωρών υπό συνθήκες έκθεσης σε καταπόνηση. Στα συμπτώματα περιλαμβάνονται η μειωμένη αύξηση, οι κηλιδώσεις και ο αποχρωματισμός των φύλλων, καθώς και ο μαρασμός και η νέκρωση των φύλλων, λόγω διαταραχών στους μηχανισμούς πρόσληψης νερού (με τη ψύξη των ριζών) (Mahajan and Tuteja 2005; Mickelbart et al. 2015). Η εκδήλωση συμπτωμάτων εξαρτάται άμεσα από το είδος, την ηλικία του φυτού και τη διάρκεια έκθεσης και την ένταση του στρες, τα ποσοστά ψύξης (και αναθέρμανσης) και εάν ο σχηματισμός πάγου λαμβάνει χώρα εντός ή εκτός κυττάρου (Beck et al. 2004). Η έκφραση συμπτωμάτων σχετίζεται με τον περιορισμό των λειτουργιών της αναπνοής, της φωτοσύνθεσης, της πρωτεϊνοσύνθεσης και της πρόσληψης νερού και θρεπτικών συστατικών. Η μείωση ρευστότητας οδηγεί στην αποσταθεροποίηση των μεμβρανών λόγω ψύχους και το αποτέλεσμα είναι η αναστολή πολυάριθμων βιολογικών διαδικασιών (Mickelbart et al. 2015). Το ψύχος επίσης αναστέλλει σοβαρά την αναπαραγωγική ανάπτυξη των φυτών, με είδη όπως το ρύζι που εμφανίζει στειρότητα όταν εκτεθεί σε θερμοκρασίες ψύχους κατά τη διάρκεια της άνθισης (Jiang et al. 2002).

Το στρες ψύχους (< 20 °C) είναι ένα άμεσο αποτέλεσμα των επιδράσεων χαμηλής θερμοκρασίας στα κυτταρικά μακρομόρια, γεγονός που οδηγεί σε επιβράδυνση του μεταβολισμού, στερεοποίηση κυτταρικών μεμβρανών και απώλεια λειτουργιών

μεμβράνης. Αυτός ο τύπος βλαβών έχει ως κύριο αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας βιομεμβρανών που σχετίζονται με μειωμένη ρευστότητα και απενεργοποίηση ή επιβράδυνση αντλίων ιόντων μεμβράνης. Απώλεια φωτεινής ενέργειας, η οποία συμβαίνει ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία, οδηγεί σε οξειδωτικό στρες εάν ο μεταβολισμός δεν μπορεί να συμβαδίσει με τη διέγερση των φωτοσυνθετικών συστατικών. Η καταπόνηση του στρες ( $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), η οποία προκαλεί σχηματισμό εξωκυτταρικού κρυσταλλικού πάγου, προκαλούμενη από το ψύχος αφυδάτωση και συγκέντρωση του κυτταρικού χυμού, έχει σημαντικές μηχανικές επιπτώσεις στα κυτταρικά τοιχώματα και στις πλασματομεμβράνες και ρήξη των μεμβρανών (Margesin et al. 2007).

Η ακεραιότητα των ενδοκυτταρικών οργανιδίων διαταράσσεται επίσης από το στρες ψύχους και οδηγεί στην απώλεια διαμερισματοποίησης και τροποποίηση στις γενικές μεταβολικές διεργασίες.

### **Παγετός**

Οι χαμηλές θερμοκρασίες του παγετού σχηματίζουν κρυστάλλους πάγου εσωτερικά και εξωτερικά του κυττάρου. Εντός του κυττάρου, οι μεμβράνες και τα οργανίδια βλάπτονται μηχανικά. Εκτός του κυττάρου, προκαλείται η αφυδάτωσή του (Mickelbart et al. 2015). Οι βλάβες στις μεμβράνες από την εν λόγω αφυδάτωση είναι μη αναστρέψιμες (Uemura et al. 2006).

### **1.2.4. Καταπόνηση Ακτινοβολίας**

Η ύπαρξη ηλιακής ακτινοβολίας στο ορατό φάσμα επιτρέπει στα φυτά τη διατήρηση του θετικού ισοζυγίου άνθρακα μέσω της φωτοσύνθεσης. Όμως, η περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) μεταξύ 200-400 nm προκαλεί την αναστολή ζωτικών λειτουργιών του κυττάρου προκαλώντας βλάβες σε μεμβράνες, πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Στο ορατό φως, εντάσεις υψηλότερες από αυτές του κορεσμού της φωτοσύνθεσης προκαλούν καταπόνηση από υψηλή ένταση ακτινοβολίας, αλλοιώνοντας τη δομή των χλωροπλαστών και μειώνοντας τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (**φωτοαναστολή**) (Mickelbart et al. 2015).

### 1.2.5. Οξειδωτική Καταπόνηση

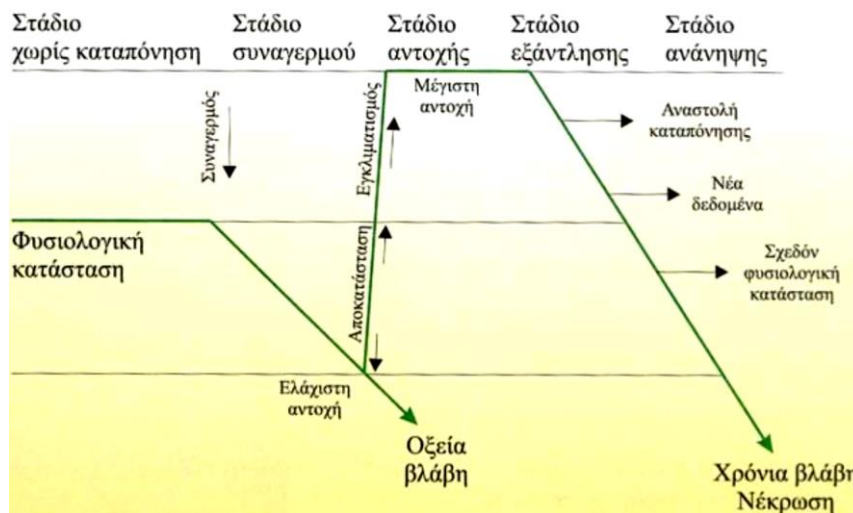
Το σύνολο των προαναφερθέντων αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης συνιστούν αίτια επαγωγής του φαινομένου της οξειδωτικής καταπόνησης. **Οξειδωτική καταπόνηση** ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία ο ρυθμός σχηματισμού ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) υπερβαίνει το ρυθμό εξουδετέρωσής τους από τα κύτταρα. Η αύξηση της συγκέντρωσης των ROS βλάπτει οξειδωτικά τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA, διασπά χρωστικές, ελαττώνει τη φωτοσυνθετική και αναπνευστική δραστηριότητα και επάγει γήρανση.

### 1.3. Μηχανισμοί Άμυνας

Τα αβιοτικά στρες οδηγούν σε μορφολογικές, φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές αλλαγές που επηρεάζουν δυσμενώς την ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών (Wang et al. 2001), ενώ παράλληλα συντελούν στην ανάπτυξη μηχανισμών που αποσκοπούν στην προσαρμογή και επιβίωση των φυτών υπό δυσμενείς συνθήκες. Η **προσαρμογή (adaptation)** των φυτών αφορά σε μηχανισμούς που προσδίδουν στα φυτά την ικανότητα να προσλαμβάνουν και να μεταφέρουν τα περιβαλλοντικά σήματα και έπειτα να μεταβάλλονται προκειμένου να ανταπεξέλθουν στις επικρατούσες καταπονήσεις. Οι μεταβολές αυτές, είτε είναι μορφολογικές είτε λειτουργικές, συμβάλουν προς την αποτελεσματικότερη και αμεσότερη προσαρμογή στο νέο περιβάλλον (Mickelbart et al. 2015). Όταν δεν απαιτούνται νέες γενετικές τροποποιήσεις, τότε η μεταβολή καλείται **εγκλιματισμός (acclimation)**. Οι αποκρίσεις που περιλαμβάνουν το σύνολο των φαινοτύπων που δύναται να παρουσιάσει ένας γονότυπος σε διαφορετικά περιβάλλοντα αναφέρεται ως **φαινοτυπική πλαστικότητα (phenotypic plasticity)** (Debat and David 2001). Η τελευταία, εμφανίζει δύο διαφορετικές εκφράσεις: την ανθεκτικότητα στην καταπόνηση (stress resistance) και την ανεκτικότητα στην καταπόνηση (stress tolerance). Με τη φαινοτυπική πλαστικότητα, οι φυτικοί οργανισμοί τροποποιούνται απευθείας σε μορφολογικό και φυσιολογικό επίπεδο, με τρόπο που ωστόσο είναι αναστρέψιμος. Η συνολική ανεκτικότητα του φυτού μπορεί να συντείνεται από τη γενετική προσαρμογή και τη φαινοτυπική πλαστικότητα αμφότερα (Mickelbart et al. 2015).

Η απόκριση των φυτών στην καταπόνηση χωρίζεται σε τέσσερα στάδια (Lichtenthaler 1996) (Εικόνα 1.4):

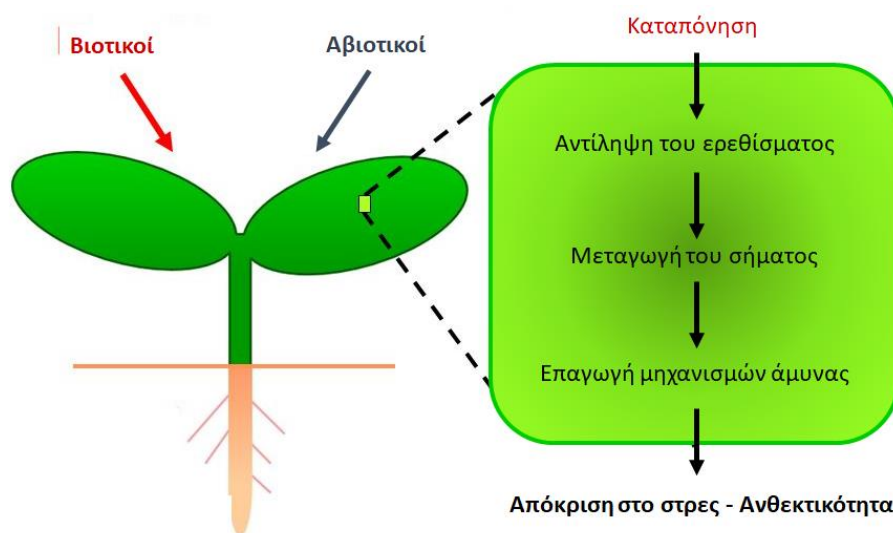
- i. Το **στάδιο συναγερμού (alarm stage)**. Χαρακτηρίζεται από εκδήλωση συναγερμού. Η κανονική πορεία του μεταβολισμού αποκλίνει και το φυτό οδηγείται σε οξεία βλάβη, εάν δεν έχει την ικανότητα να περάσει στο επόμενο στάδιο της αντοχής.
- ii. Το **στάδιο της αντοχής (resistance)**. Χαρακτηρίζεται από μια γενική αναδιάταξη με διάφορες συνιστώσες.
- iii. Το **στάδιο εξάντλησης ή τελικό (exhaustion)**. Το στάδιο αυτό είναι αποτέλεσμα της υπερφόρτισης της ικανότητας προσαρμογής, καθώς η υπερβολική ένταση της καταπόνησης προκαλεί χρόνια βλάβη και τελικά κυτταρικό θάνατο.
- iv. Το **στάδιο της ανάνηψης ή αναγέννησης (regeneration)**. Περιλαμβάνει τη μερική ή ολική επαναφορά των φυσιολογικών λειτουργιών σε επίπεδα φυσιολογικών διακυμάνσεων, εφόσον επέλθει αναστολή της καταπόνησης και οι βλάβες είναι αναστρέψιμες.



**Εικόνα 1.4** Τα στάδια απόκρισης του φυτού στην καταπόνηση. (Πηγή: “Φυσιολογία Φυτών – από το μόριο στο περιβάλλον”, επιμέλεια Κ.Α. Ρουμπελάκη- Αγγελάκη, 2003)

Για την άμυνά τους, τα φυτά διαθέτουν μόνιμους και επαγόμενους μηχανισμούς. Στους επαγόμενους γίνεται μια εξοικονόμηση ενέργειας, καθώς καταστέλλονται σε περιόδους μη κινδύνου και ενεργοποιούνται ως στρατηγική επαγωγής ανθεκτικότητας υπό συνθήκες καταπόνησης. Η δράση της αβιοτικής καταπόνησης και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού συνιστούν ιδιαίτερα σημαντικές παραμέτρους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα φυτά παρουσιάζουν ευπάθεια σε ορισμένα αναπτυξιακά στάδια και ανθεκτικότητα

σε άλλα στάδια ανάπτυξης. Η αντιμετώπιση του παράγοντα καταπόνησης περιλαμβάνει μία σειρά αντιδράσεων σε μοριακό επίπεδο που αποσκοπούν στην αντίληψη του ερεθίσματος, τη μεταφορά του σήματος και την επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση πρωτεϊνών ή άλλων μορίων άμυνας (Εικόνα 1.5). Η ένταση και διάρκεια του ερεθίσματος παίζουν καθοριστικό ρόλο στην απόκριση του φυτού.



**Εικόνα 1.5** Απόκριση των φυτών σε παράγοντες καταπόνησης - Ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας. Προϋπόθεση αποτελεί η αντίληψη του ερεθίσματος και η μεταγωγή του σήματος σε επίπεδο φυτού.

Τα φυτά μπορούν να τροποποιούν το βιολογικό τους κύκλο ή ακόμη και να αλλάζουν τη φυλλική επιφάνεια, τον προσανατολισμό, την εφυμενίδα και το τρίχωμα του φύλλου προκειμένου να αποφύγουν την επικρατούσα καταπόνηση (Mickelbart et al. 2015). Είναι αξιοσημείωτο επίσης, ότι τα ποικίλα περιβαλλοντικά στρες, συχνά ενεργοποιούν όμοια κυτταρικά μονοπάτια-σήματα (Knight 2000; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000; Zhu 2001; 2002) και επάγουν όμοιες κυτταρικές αντιδράσεις, όπως παραγωγή πρωτεϊνών άμυνας σε καταπονήσεις, αύξηση των αντιοξειδωτικών και συσσώρευση διαλυτών ουσιών που παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους (Vierling and Kimpel 1992; Zhu et al. 1997; Cushman and Bohnert 2000; Wang et al. 2003b).

### 1.3.1. Αποκρίσεις στις αβιοτικές καταπονήσεις

#### Υδατική Καταπόνηση

Τα φυτά αντιμετωπίζουν την υδατική καταπόνηση κυρίως μέσω της ενεργοποίησης μηχανισμών αποφυγής ή ανοχής. Η αποφυγή οφείλεται σε μεταβολές σε επίπεδο φυσιολογίας, όπως μείωση της φυλλικής επιφάνειας -που οδηγεί σε μείωση της προσρόφησης ακτινοβολίας και της διαπνοής- και αντοχή φυλλώματος, κλείσιμο των στοματίων, σχηματισμό κηρών -που οδηγεί σε μείωση των απωλειών νερού- καθώς και προσαρμογές στις απορροές μέσω αλλαγής βάθους και πάχους των ριζών, της πυκνότητας, με ανάπτυξη ριζικών τριχιδίων και αγωγιμότητα της ρίζας (Beard and Sifers 1997; Rivero et al. 2007). Οι μηχανισμοί ανοχής προκύπτουν σε κυτταρικό και μεταβολικό επίπεδο. Σ' αυτούς συμπεριλαμβάνονται η διατήρηση της πίεσης σπαργής σε ανεκτά επίπεδα, η πρωτοπλασματική αντοχή και η αδράνεια (Beard and Sifers 1997). Τα φυτά αντιδρούν με αλλαγές σε επίπεδο έκφρασης μίας σειράς συμπλόκων γονιδίων που εμπλέκονται με μονοπάτια άμυνας έναντι καταπονήσεων.

Πλέον των ανωτέρω, τα φυτά διαθέτουν ορισμένους πρόσθετους παράγοντες προσαρμογής στην υδατική καταπόνηση, οι οποίοι αφορούν στα ακόλουθα (Mickelbart et al. 2015):

- ✚ λόγος αύξησης ρίζας-βλαστού
- ✚ μείωση απόδοσης φωτοσυνθετικού μηχανισμού
- ✚ απόπτωση οργάνων
- ✚ δημιουργία νέων οργάνων με ξηροφυτικά χαρακτηριστικά
- ✚ είσοδος του οργανισμού σε λήθαργο (π.χ. το καλοκαίρι)
- ✚ διακίνηση ιόντων για οσμωτική εξισορρόπηση
- ✚ διακίνηση/βιοσύνθεση ABA
- ✚ ανάπτυξη αερεγχύματος από καταβυθισμένα κύτταρα

Σύμφωνα με αναφορές σχετικών ερευνών, τα γονίδια που σχετίζονται με την ανοχή στην ξηρασία κατατάσσονται σε 3 κύριες κατηγορίες (Vierling 1991; Ingram and Bartels 1996; Smirnoff 1998; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000):

- i. γονίδια σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος και ελέγχου μεταγραφής (STPs)

- ii. γονίδια με προστατευτικές λειτουργίες σε επίπεδο μεμβρανών ή/και πρωτεϊνών
- iii. γονίδια που σχετίζονται με τον έλεγχο της πρόσληψης και μεταφοράς νερού και ιόντων.

Υπό συνθήκες ξηρασίας, η απόκριση των φυτών στα σήματα καταπόνησης περιλαμβάνει τη ρύθμιση της έκφρασης των σχετικών γονιδίων, η οποία διαμορφώνεται ανάλογα με την ένταση και διάρκεια της καταπόνησης και το είδος/γονότυπο του φυτού (Wang et al. 2003b).

### Αλατότητα

Η αντοχή στην υψηλή αλατότητα αποτελεί γνώρισμα με πολυγονιδιακό έλεγχο, ενώ έχουν εντοπισθεί οι σχετικές γονιδιακές θέσεις ποσοτικών γνωρισμάτων (QTL), που εξηγούν σημαντικό μέρος της γενετικής παραλλακτικότητας, σε πληθώρα καλλιεργούμενων ειδών όπως κριθάρι, σιτάρι, σόγια, εσπεριδοειδή, ρύζι και τομάτα (Flowers and Flowers 2005; Jenks et al. 2007). Στις γενετικές προσεγγίσεις που αξιοποιούνται για τη βελτίωση της αντοχής στην αλατότητα περιλαμβάνεται η φυσική γενετική παραλλακτικότητα και φαινοτυπική πλαστικότητα, μέσω απευθείας επιλογής σε περιβάλλοντα καταπόνησης ή μέσω του καθορισμού των QTLs και της υποβοηθούμενης από μοριακούς δείκτες επιλογής ανθεκτικών γονοτύπων (Yamaguchi and Blumwald 2005), η εκμετάλλευση της γονιδιωματικής λειτουργίας, η βιοπληροφορική και οι ποικίλες στρατηγικές ανάπτυξης ανθεκτικότητας διαμέσου γενετικής μηχανικής (Vij and Tyagi 2007).

Όπως προαναφέρθηκε, η αλατότητα συνιστά ένα αίτιο της οσμωτικής καταπόνησης. Τα φυτά για την οσμωρύθμισή τους κινούνται με δύο κύριες στρατηγικές: α) αποφυγή της εισόδου ιόντων στο εσωτερικό των κυττάρων (**αποκλεισμός**) και β) κατεύθυνση των αλάτων στο χυμοτόπιο, μέσω του αντιμεταφορέα  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , που δρά μέσω κατάλληλα προσαρμοσμένου μεταβολισμού, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις τους στο κυτταρόπλασμα να διατηρούνται σε ανεκτά επίπεδα (**εσωτερική ανεκτικότητα**) (Mickelbart et al. 2015). Στην ανεκτικότητα, εμπλέκεται επίσης η δημιουργία χηλικών συμπλόκων καθώς και η ενεργητική μεταφορά (Mickelbart et al. 2015).

Η αφαίρεση των αλάτων από τις ρίζες (αποστράγγιση) είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος να αποφευχθούν οι επιζήμιες επιπτώσεις της αλατότητας, αλλά συνιστά μία διαδικασία χρονοβόρα και ακριβή.



Τα ανθοφόρα φυτά σπάνια είναι αλόφυτα, αν και ταξινομικά διαδεδομένα, και σχεδόν όλα τα καλλιεργούμενα φυτά είναι γλυκόφυτα (Flowers and Flowers 2005). Σημαντική είναι η μεταβλητότητα στην ανοχή των γλυκοφύτων στην αλατότητα. Κατηγοριοποιείται σε τρεις κατηγορίες (Munns and Tester 2008):

1. ανοχή στο οσμωτικό στρες, η οποία μειώνει αμέσως την επέκταση των κυττάρων στις ρίζες και τα νεαρά φύλλα και προκαλεί το κλείσιμο των στοματίων,
2. αποκλεισμός  $\text{Na}^+$  από τα φύλλα, γεγονός που εξασφαλίζει ότι το  $\text{Na}^+$  παραμένει σε μη τοξικές συγκεντρώσεις στα φύλλα και
3. ανοχή ιστού σε  $\text{Na}^+$  ή  $\text{Cl}^-$ , η οποία απαιτεί κατηγοριοποίηση των  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$  σε κυτταρικό και ενδοκυτταρικό επίπεδο για να αποφευχθεί η συσσώρευση τοξικών συγκεντρώσεων μέσα στο κυτταρόπλασμα.

#### Θερμοκρασιακή Καταπόνηση

Ο εγκλιματισμός στο ψύχος οδηγεί σε αυξημένη αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες με την πάροδο του χρόνου και σε κυτταρική αφυδάτωση, αποκρίσεις οι οποίες προκύπτουν μέσω αλλαγών στην έκφραση γονιδίων και στη φυσιολογία του φυτού και λαμβάνουν χώρα υπό δυσμενείς συνθήκες, όπως χαμηλή θερμοκρασία, μικρή φωτοπερίοδος και ήπια υδατική καταπόνηση (Xin and Browse 2000; Kalberer et al. 2006). Τα περισσότερα φυτά εύκρατης ζώνης μπορούν να εγκλιματιστούν και να αποκτήσουν αντοχή στο σχηματισμό εξωκυτταρικού πάγου στους βλαστικούς ιστούς τους. Τα συνηθισμένα χειμερινά φυτά όπως το χειμερινό σιτάρι, το κριθάρι, η βρώμη, η σίκαλη και η ελαιοκράμβη έχουν την απαίτηση της εαρινοποίησης, η οποία τους επιτρέπει να επιβιώσουν στο στρες του ψύχους κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Ωστόσο, μετά την εαρινοποίηση και στο τέλος της βλαστικής φάσης, η ικανότητα εγκλιματισμού των χειμερινών σιτηρών μειώνεται σταδιακά, καθιστώντας τα ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες (Fowler et al. 1996; Chinnusamy et al. 2007). Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες να βελτιωθεί η αντοχή στο κρύο σε σημαντικές καλλιέργειες. Ωστόσο, η πρόοδος στην επίτευξη της ανθεκτικότητας στον παγετό των φυτών, είτε με κλασσική βελτίωση είτε με μεθόδους γενετικής μηχανικής, είναι δύσκολη λόγω του γεγονότος ότι η αντίσταση στο ψύχος, όπως και οι περισσότεροι μηχανισμοί άμυνας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, είναι ποσοτικό γνώρισμα που

εμφανίζει πολυγονιδιακό έλεγχο και σημαντική αλληλεπίδραση γονοτύπου-περιβάλλοντος (Mahajan and Tuteja 2005).

Η ανοχή στον παγετό μπορεί να επιτευχθεί με δύο κύριους μηχανισμούς:

1. αποφυγή σχηματισμού πάγου στους ιστούς ή
2. ανοχή του αποπλαστικού εξωκυτταρικού πάγου.

Ένα φυτό μπορεί να χρησιμοποιήσει και τους δυο μηχανισμούς ανοχής παγετού σε διαφορετικούς ιστούς (Sakai and Larcher 1987; Margesin et al. 2007). Μια βασική λειτουργία του εγκλιματισμού στο ψύχος είναι η σταθεροποίηση των μεμβρανών στον τραυματισμό λόγω παγετού, μέσω μηχανισμών όπως η ρύθμιση της λιπιδιακής σύνθεσης και της συσσώρευσης προστατευτικών σακχάρων, υδρόφιλων, πρωτεϊνών LEA και αντιοξειδωτικών ουσιών (Thomashow 1999).

Για την αντιμετώπιση των ακραίων θερμοκρασιών, τα φυτά υπόκεινται σε τροποποιήσεις σε μορφολογικό, φυσιολογικό και μεταβολικό επίπεδο. Στους προσαρμοστικούς μηχανισμούς των φυτών έναντι της επίδρασης ακραίων υψηλών/χαμηλών θερμοκρασιών περιλαμβάνονται:

- ✚ απόπτωση οργάνων
- ✚ φαινόμενο της υπέρψυξης
- ✚ σταθεροποίηση μεμβρανών (λιπιδιακή σύσταση)
- ✚ ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών συστημάτων
- ✚ μετατροπή του αμύλου σε σάκχαρα
- ✚ αύξηση της συγκέντρωσης φωσφορυλιωμένων μεταβολιτών
- ✚ συσσώρευση πρωτεϊνών αφυδάτωσης (Close et al. 1993) και οσμωλυτών
- ✚ είσοδος σε λήθαργο
- ✚ δημιουργία και μορφολογία οργάνων για την αντανάκλαση της ακτινοβολίας και τον περιορισμό της διαπνοής
- ✚ παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών - ισοπρενίου
- ✚ παραγωγή θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (heat shock proteins, HSPs)
- ✚ εγκλιματισμός σε χαμηλές θερμοκρασίες (Mickelbart et al. 2015)
- ✚ περιορισμός σχηματισμού πάγου σε συνθήκες παγετού (Mickelbart et al. 2015)

## Υπεριώδης ακτινοβολία (UV)

Στους προσαρμοστικούς μηχανισμούς των φυτών έναντι της επίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας περιλαμβάνονται:

- ✚ για την απορρόφησή της, παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (φλαβονοειδή) στο χυμοτόπιο
- ✚ για τη συγκράτησή, δημιουργία και μορφολογία οργάνων

## **1.4. Κλασική και Μοριακή Βελτίωση**

Για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι καταπονήσεων, βιοτικών και αβιοτικών, αξιοποιείται το σύνολο των διαθέσιμων μεθόδων/διαδικασιών αξιοποίησης της υπάρχουσας ή/και δημιουργίας νέας γενετικής παραλλακτικότητας αλλά και μετέπειτα επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων. Οι μέθοδοι αυτοί διακρίνονται σε 3 κύριες προσεγγίσεις:

- 1) Κλασική Βελτίωση
- 2) Μοριακή Βελτίωση και
- 3) Τεχνολογίες Γενετικής Μηχανικής

### **1.4.1. Κλασική Βελτίωση**

Στην κλασική βελτίωση περιλαμβάνεται η επιλογή των υπέρτερων γονοτύπων και η δημιουργία νέων γονιδιακών συνδυασμών με τη χρήση τεχνολογιών υβριδισμού. Έχει ως σκοπό την αποτίμηση και αξιοποίηση της κληρονομικότητας των ποσοτικών γνωρισμάτων και την αξιολόγηση ή των υβριδικών γονοτύπων που προκύπτουν έπειτα από διασταυρώσεις. Μέσω της κλασικής γενετικής βελτίωσης, παράχθηκαν βελτιωμένες ποικιλίες με υψηλή απόδοση σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης με τη μέγιστη αξιοποίηση εισροών για αύξηση της απόδοσης. Η διαμέσου κλασικής βελτίωσης δημιουργία ανθεκτικών γονοτύπων οφείλεται στη γενετική πρόοδο που επιτυγχάνεται σταδιακά μέσω των μεθοδολογιών πληθυσμιακής και ποσοτικής γενετικής. Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί, οι αβιοτικές καταπονήσεις εξακολουθούν να προκαλούν απώλειες απόδοσης σε παγκόσμιο επίπεδο, ενώ η

βελτίωση του γνωρίσματος της ανθεκτικότητας εξακολουθεί να είναι μια ιδιαίτερα απαιτητική, χρονοβόρα και συχνά αναποτελεσματική προσπάθεια. Αυτό οφείλεται i) στην ανεπαρκή κατανόηση των φυσιολογικών μηχανισμών που διέπουν το γνώρισμα της ανθεκτικότητας καθώς και στην πολυπλοκότητα του γενετικού υπόβαθρου τους (πολυγονιδιακή κληρονομία), ii) στη σημαντική αλληλεπίδραση γονοτύπου–περιβάλλοντος, iii) στο μεγάλο αριθμό γονοτύπων που απαιτείται για την αξιολόγηση και επιλογή ανθεκτικών γονοτύπων, iv) στη συνύπαρξη της υπό μελέτη καταπόνησης με άλλους παράγοντες βιοτικής ή/και αβιοτικής καταπόνησης, και v) στην έλλειψη κατάλληλων μεθόδων επιλογής των ανθεκτικών γονοτύπων. Τα ανωτέρω καθιστούν αναγκαία την εύρεση εναλλακτικών μεθόδων για την αξιόπιστη επιλογή των επιθυμητών γονοτύπων.

Προκειμένου να επιταχυνθεί αλλά και να ενισχυθεί η αξιοπιστία των διαδικασιών επιλογής επιθυμητών γονοτύπων, έχει αναπτυχθεί μία πληθώρα δεικτών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως εργαλεία για την υποβοηθούμενη από δείκτες επιλογή (MAS, marker-assisted selection). Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό κατατάσσονται σε 3 κύριες κατηγορίες:

- Μορφολογικοί: βασίζονται στις διαφορές σε επίπεδο φαινοτύπου (αριθμός αδελφιών, σπαδικών, κ.α.). Παρέχουν το πλεονέκτημα ότι συνήθως απαιτούν απλό εξοπλισμό και αποτελούν τον πιο άμεσο τρόπο μέτρησης του φαινοτύπου, ωστόσο μειονεκτούν στο ότι υπόκεινται σε περιβαλλοντικές επιδράσεις και ο αριθμός τους είναι περιορισμένος.
- Βιοχημικοί: βασίζονται στον πολυμορφισμό ισοενζύμων. Μειονέκτημα αποτελεί η πιθανή μη έκφραση και η επίδραση από περιβαλλοντικούς παράγοντες.
- Γενετικοί δείκτες: εργαλεία που ανιχνεύουν διαφορές στη DNA αλληλουχία (πολυμορφισμοί) μεταξύ δύο ή περισσότερων ατόμων. Οι μοριακοί δείκτες υπόκεινται σε γενετική ανάλυση, χαρτογράφηση και σήμανση γενετικών τόπων ποιοτικών και ποσοτικών γνωρισμάτων.

## **1.4.2. Μοριακή Βελτίωση**

Ο όρος ‘Μοριακή Βελτίωση’ περιγράφει ένα πεδίο της σύγχρονης Βελτίωσης των φυτών που συνδυάζει μοριακές τεχνικές και μεθόδους με συμβατικές βελτιωτικές διαδικασίες για τη δημιουργία νέων βελτιωμένων ποικιλιών φυτών με μεγαλύτερη ταχύτητα και αναβαθμισμένη αποτελεσματικότητα. Προς την κατεύθυνση αυτή, σημαντικότατο ρόλο έπαιξε η ανακάλυψη των περιοριστικών ενζύμων και της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) κατά τις τελευταίες δεκαετίες.

Η μοριακή βελτίωση περιγράφει μια σειρά γονιδιωματικών εφαρμογών (εξαιρουμένης της γενετικής μηχανικής) χειρισμού του γενετικού υλικού για τη στοχευμένη βελτίωσή του. Κεντρική θέση στις εφαρμογές μοριακής βελτίωσης καταλαμβάνει η ανάπτυξη και αξιοποίηση μοριακών δεικτών, δηλαδή διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση πολυμορφισμών στην αλληλουχία του DNA. Κύρια εφαρμογή των μοριακών δεικτών στη βελτιωτική διαδικασία είναι η σήμανση γενετικών τόπων ποιοτικών και ποσοτικών γνωρισμάτων. Ωστόσο, ο όρος μοριακή βελτίωση συχνά αναφέρεται και στην αξιοποίηση του συνόλου των γονιδιωματικών εργαλείων (με ή χωρίς τεχνικές γενετικής μηχανικής) για την επίτευξη των ανωτέρω στόχων (Χατζόπουλος 2001).

### **1.4.2.1. Μοριακοί δείκτες**

Η ανάπτυξη των μοριακών δεικτών χρονολογείται κατά τη δεκαετία του '80 και η φύση τους εξαρτάται από τις εξειδικευμένες ανάγκες αλλά και δυνατότητες των προγραμμάτων βελτίωσης. Οι διαφορές στην αλληλουχία του DNA μεταξύ των αλληλόμορφων γονιδίων αποτελούν την αφετηρία ανάπτυξης των μοριακών δεικτών. Οι περισσότεροι δείκτες που εφαρμόζονται σήμερα στη βελτίωση των φυτών βασίζονται στην ενίσχυση εξειδικευμένων αλληλουχιών μέσω αντιδράσεων PCR.

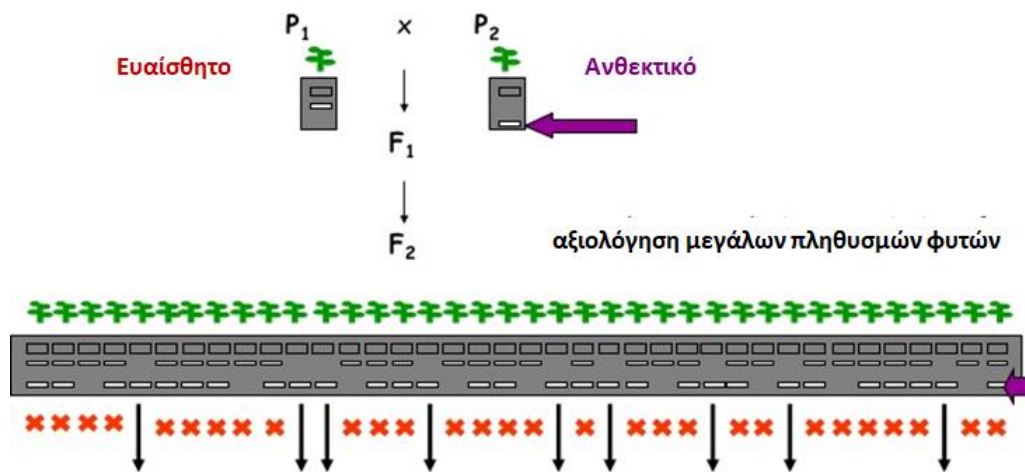
Οι μοριακοί δείκτες μπορεί να κατηγοριοποιηθούν με βάση το είδος των μοριακών διαφορών σε μια αλληλουχία που βασίζονται:

- 1) στην ανίχνευση μεταλλάξεων στη θέση πρόσδεσης των εκκινητών της PCR ή των θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων,

- 2) στην εισαγωγή ή την εξάλειψη μιας αλληλουχίας μεταξύ των εκκινητών ή των θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων,
- 3) στην αλλαγή του αριθμού επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μεταξύ δύο εκκινητών ή των θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων
- 4) στην ανίχνευση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs)

Είναι σημαντικό οι μοριακοί δείκτες να είναι άφθονοι σε αριθμό ώστε να καλύπτουν πυκνά το σύνολο του γονιδιώματος. Σημαντική επίσης είναι η σταθερή και ευχερής τους ανίχνευση σε δείγματα που προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς, όργανα, αναπτυξιακά στάδια ή περιβάλλοντα. Με βάση τα γενετικά χαρακτηριστικά τους, οι δείκτες μπορεί να ανιχνεύουν πολλαπλά συγκυρίαρχα αλληλομόρφα ή απλά κυρίαρχα αλληλομόρφα. Πλεονέκτημα της αξιοποίησης δεικτών είναι ότι η επιλογή μπορεί να γίνει με ικανοποιητική ακρίβεια σε αρχικά στάδια ανάπτυξης των φυτών.

Η μοριακή βελτίωση επιτυγχάνει την αναβάθμιση της αποτελεσματικότητας των βελτιωτικών προγραμμάτων κυρίως με την διαδικασία έμμεσης επιλογής επιθυμητών γνωρισμάτων με μοριακούς δείκτες που είναι στενά συνδεδεμένοι με τα γονίδια που ελέγχουν τα γνωρίσματα ενδιαφέροντος (marker assisted selection – MAS) (Εικόνα 1.6). Στο επίπεδο αυτό, η βελτίωση με τη χρήση μοριακών δεικτών που είναι στενά συνδεδεμένοι με γονίδια ανθεκτικότητας (R) αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο για τη συγκέντρωση διαφορετικών γονιδίων R σε μια καλλιεργούμενη ποικιλία (πυραμίδωση). Η διαδικασία αυτή αποτελεί μία προσέγγιση που αξιοποιείται για την επίτευξη σταθερής στο χρόνο ανθεκτικότητας. Επίσης, οι δείκτες επιτρέπουν τη δραστική επιτάχυνση ενσωμάτωσης επιθυμητών γνωρισμάτων σε elite γενετικό υλικό φυτών, ενώ παράλληλα είναι χρήσιμοι στην ταυτοποίηση (fingerprinting) του γενετικού υλικού για την καταγραφή και προστασία των ποικιλιών καθώς και για τον έλεγχο πιστότητας κατά τον έλεγχο σπορομερίδων ποικιλιών φυτών. Περαιτέρω, οι μοριακοί δείκτες αξιοποιούνται για την εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας και την επιλογή γονέων υβριδίων με υψηλό δυναμικό ετέρωσης.



**Εικόνα 1.6** Υποβοηθούμενη από μοριακούς δείκτες επιλογή (Marker assisted selection – MAS). Μέθοδος όπου η φαινοτυπική αξιολόγηση βασίζεται στη χρήση μοριακών δεικτών. (Πηγή: <https://www.slideshare.net/FAOoftheUN/marker-assisted-selection-55689355>)

#### 1.4.2.2. Συνεισφορά της Μοριακής Βελτίωσης

Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών απόκρισης των φυτών σε αβιοτικά στρες και η ενσωμάτωση γονιδίων ανθεκτικότητας σε διαγονιδιακά φυτά, που η έκφρασή τους επάγεται υπό συνθήκες καταπόνησης, στηρίχθηκαν στην εξέλιξη της μοριακής βιολογίας.

Με την αξιοποίηση των μεθόδων Γενετικής Μηχανικής επιτυγχάνεται ενσωμάτωση γονιδίων ποικίλης προέλευσης με σκοπό την προηγμένη ανθεκτικότητα, ευρεία ή εξειδικευμένη, έναντι καταπονήσεων. Για την ενσωμάτωση ανθεκτικότητας στα φυτά έχουν αναπτυχθεί άφθονες διαγονιδιακές τεχνολογίες (Allen 1995). Σε αυτές περιλαμβάνεται η αξιοποίηση i) γονιδίων του είδους, ii) μακρινά συγγενικών ειδών ή άλλων γονιδίων φυτικής προέλευσης, iii) γονιδίων ή αλληλουχιών που προέρχονται από άλλους οργανισμούς, με κύρια προσέγγιση την χρήση γονιδίων που προέρχονται από παθογόνα για την επίτευξη ανθεκτικότητας σε βιοτικούς κυρίως παράγοντες καταπόνησης (PDR, pathogen derived resistance), iv) αλληλουχιών που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, v) αντισωμάτων κ.α. Η εστίασή των τεχνολογιών γενετικής μηχανικής κινείται σε δύο κύριους άξονες:

1. Την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών που συνδέονται με την άμυνα των φυτών και
2. Την ενίσχυση των υπάρχοντων ή νεοεισαχθέντων μηχανισμών άμυνας

Στο πλείστο των περιπτώσεων, η διαγονιδιακή ανθεκτικότητα έγκειται στην επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται σε κύρια βιοχημικά μονοπάτια άμυνας, όπως αυτά του σαλικυλικού οξέος, ιασεμινικού οξέος, αιθυλενίου, ABA ή/και στην υπερσυσσώρευση ή *de novo* σύνθεση πρωτεϊνών ή μεταβολιτών άμυνας υπό συνθήκες καταπόνησης. Τα γονίδια ή/και μόρια που συνδέονται με την αμυντική απόκριση των φυτών παρουσιάζουν ποικίλα επίπεδα εξειδίκευσης που διαμορφώνονται σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά σε επίπεδο είδους/γονοτύπου, καταπόνησης αλλά και την αλληλεπίδρασή τους. Η αντιμετώπιση ωστόσο ενός παράγοντα καταπόνησης απαιτεί την ταυτόχρονη λειτουργική δράση πολλών διαφορετικών γονιδίων, που η έκφρασή τους επηρεάζεται από διαφορετικούς εσωτερικούς κυτταρικούς και εξωτερικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό, η αποτελεσματικότητα μίας συγκεκριμένης προσέγγισης και η δυνατότητα επίτευξης ανθεκτικότητας πρέπει να αξιολογείται, πέραν των φυτών-μοντέλων, σε επίπεδο καλλιεργούμενου είδους. Ειδικότερα, η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων προϋποθέτει τον έλεγχο της ενσωμάτωσης και προσαρμογής του γονιδίου στο καλλιεργούμενο είδος υπό φυσιολογικές συνθήκες διότι σε συνδυασμό αβιοτικών καταπονήσεων πιθανόν να υπάρξουν ανταγωνιστικές αποκρίσεις στα ερεθίσματα. Ως παράδειγμα αναφέρεται η απόκριση των φυτών στη θερμική καταπόνηση με το κλείσιμο των στοματίων, ως στρατηγική μείωσης της διαπνοής. Στην περίπτωση όμως που η θερμική καταπόνηση συνοδεύεται από ξηρασία, το κλείσιμο των στοματίων επιφέρει αύξηση της θερμοκρασίας των φύλλων (Rizhsky et al. 2002). Επίσης, ο συνδυασμός ψύχους ή ξηρασίας με υψηλή ένταση φωτός οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) στο φωτοσύστημα και περιορισμό της διαθεσιμότητας CO<sub>2</sub> για την αναπνοή στο σκοτάδι, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ελεύθερου O<sub>2</sub> ως κύριου αναγωγικού προϊόντος της φωτοσύνθεσης (Mittler 2002).

## 1.5. Χαρπίνες

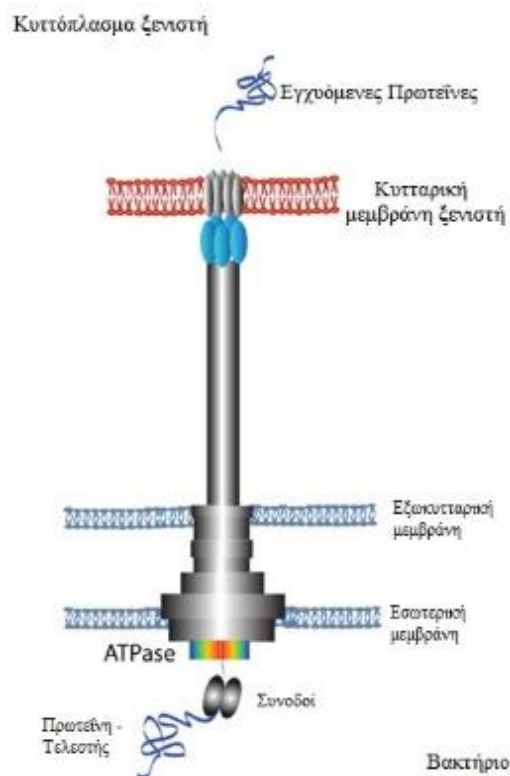
Οι χαρπίνες συνιστούν μια κατηγορία πρωτεϊνών τελεστών που συγκροτούν το εκκριτικό σύστημα III (T3SS) των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, το οποίο διευκολύνει την έκκριση πρωτεϊνών τελεστών στο εσωτερικό των κυττάρων-ξενιστών (Εικόνα 1.7). Οι χαρπίνες εμφανίστηκαν πρώτα στο γένος βακτηρίου *Erwinia spp.* (HrpN και HrpW), αλλά έχουν ταυτοποιηθεί σε όλα τα γένη φυτοπαθογόνων βακτηρίων,



συμπεριλαμβανομένου των *Pseudomonas spp.*, *Ralstonia spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Acidovorax*, *Burkholderia* και *Pantoea* (Wei et al. 1992; He et al. 1993; Li et al. 2010; Tampakaki et al. 2010). Κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των χαρπινών είναι ότι είναι υδρόφιλες, πλούσιες σε γλυκίνες, χωρίς κυστεΐνες, θερμικά σταθερές και είναι δυνατή η έκκρισή τους σε μέσο καλλιέργειας των βακτηρίων. Επίσης, είναι όξινες και ευαίσθητες στην πρωτεάση (Li 2007, pp.31).

Οι χαρπίνες χαρακτηρίζονται από την ικανότητα μίμησης της λειτουργίας φυτικών ορμονών και την ταχύτατη νέκρωση των κυττάρων κατά τη διάχυσή τους στον αποπλάστη των φυτών (Ταμπακάκη 1999, σελ 55). Εν τούτοις, κάθε είδος χαρπίνης αποτελείται από διαφορετική ικανότητα επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR). Η συμβολή τους στην πρόκληση μιας σειράς αντιδράσεων σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο που συνδέονται με τις λειτουργίες άμυνας των φυτών, τοπικά ή διασυστηματικά, είναι πολυμερής. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι η εξωγενής εφαρμογή τους ή η ενδογενής έκφρασή τους σε διαγονιδιακά φυτά συμβάλλει στην προώθηση της ανάπτυξης (Dong et al. 2004; Wu et al. 2007; Chen et al. 2008a,b), στην εκδήλωση ανθεκτικότητας σε ένα πλήθος παθογόνων (Strobel et al. 1996; Dong et al. 1999; Peng et al. 2003; Liu et al. 2006; Ren et al. 2006), εντόμων (Dong et al. 2004), αλλά και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης, όπως η ξηρασία (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2007; Tampakaki et al. 2010) και η αλατότητα (Ren et al. 2006).

Σημαντικός είναι ο ρόλος των χαρπινών στη βιολογία ανάπτυξης των φυτών καθώς η εφαρμογή ή έκφρασή τους αναφέρεται ότι συνδέεται με προηγμένη φωτοσύνθεση, καλύτερη απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων, αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης και ευρωστία (Kim and Beer 2000; Oh and Beer 2007; Pavli et al. 2011). Τα ανωτέρω επιφέρουν βελτίωση της φυτρωτικότητας, προώθηση της ανάπτυξης υπόγειου και υπέργειου τμήματος του φυτού, βελτίωση, σε ποσοτικό και ποιοτικό επίπεδο, της παραγωγής. Αναφέρεται επίσης ότι οι χαρπίνες επηρεάζουν και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών, μέσω της μείωσης του αριθμού κυττάρων του καμβίου ή της μείωσης του μεγέθους επιδερμικών κυττάρων (Jang et al. 2006).

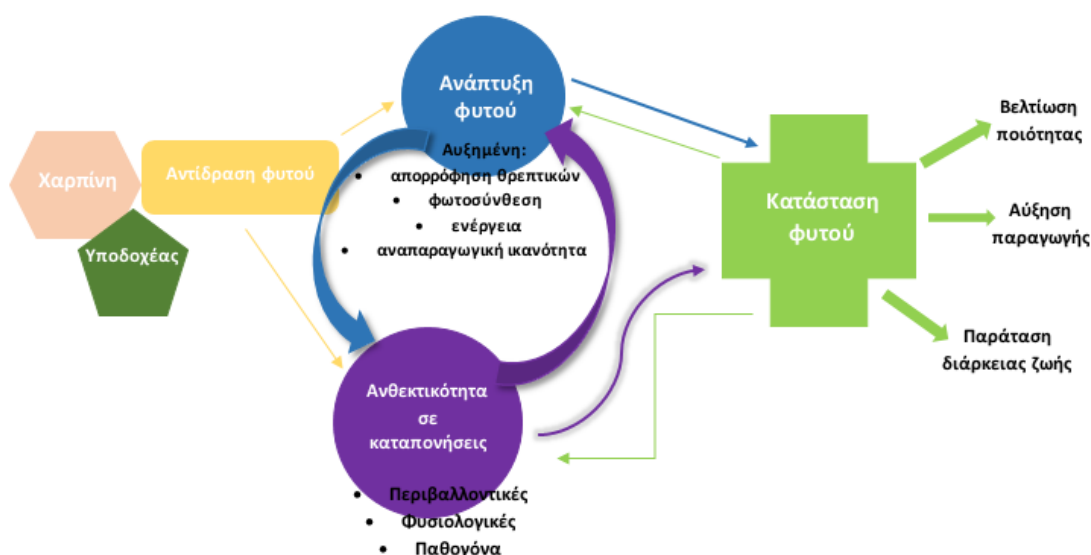


**Εικόνα 1.7** Η δομή του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου III (T3SS). (Πηγή: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00142/full>)

Η ρύθμιση των γονιδίων *hrp*, τα οποία συνιστούν διεγέρτες της αντίδρασης της υπερευαισθησίας (Ταμπακάκη 1999), καθορίζει την παραγωγή των χαρπινών. Η ανακάλυψη των γονιδίων *hrp* έγινε όταν διαπιστώθηκε ότι βακτήρια *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, με δομικές μεταλλάξεις στο εκκριτικό σύστημα τύπου III, στερούνταν την ικανότητα πρόκλησης ασθένειας σε φυτά-ξενιστές ή αντίδρασης HR σε φυτά-μη ξενιστές (Lindgren et al. 1986), κατά την έγχυσή τους στον αποπλαστικό χώρο των κυττάρων. Τα *hrp* γονίδια βρίσκονται σε γονιδιακές ομάδες (*hrp*-gene clusters) συγκεκριμένου μεγέθους (23-40kb) και οργάνωσης, αποτελούμενες από 20-27 γονίδια που εντοπίζονται είτε σε χρωμοσώματα είτε σε μεγα-πλασμίδια (Alfano and Colmer 1997; He 1998). Υπάρχουν δυο κατηγορίες *hrp* γονιδίων (Alfano and Colmer 1997):

1. *hrp/hrc* 1, που προέρχονται από τα γένη *Pseudomonas* και *Erwinia* και
2. *hrp/hrc* 2, που προέρχονται από τα γένη *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Acidovorax* και *Burkholderia* (Tampakaki 2014).

Οι αναφορές αξιοποίησης των *hpr* γονιδίων για την επίτευξη ανθεκτικότητας σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης αλλά και προηγμένης ανάπτυξης και ευρωστίας οδήγησε στην εμπορική αξιοποίηση των χαρπινών, μέσω της χρήσης σκευασμάτων που εφαρμόζονται με ψεκασμό ή ριζοπότισμα. Ειδικότερα, στις Η.Π.Α. κυκλοφόρησε το πρώτο σκεύασμα χαρπίνης ονόματι Messenger, το οποίο δρα ως διεγέρτης των αμυντικών μηχανισμών των φυτών. Η δραστική του ουσία είναι η χαρπίνη HrpNEa, προερχόμενη από το βακτήριο *Erwinia amylovora*, και χρησιμοποιείται ενάντια των μυκήτων, βακτηρίων, ιών, νηματωδών, εντόμων αλλά και της επίδρασης αβιοτικών καταπονήσεων. Επίσης, η εφαρμογή του συνεισφέρει στην ταχύτερη και καλύτερη ανάπτυξη των φυτών, σε ευρωστία καθώς και πρωίμηση και αύξηση της παραγωγής (Βακαλουνάκης και Φραγκιαδάκης 2003) (Εικόνα 1.8).



**Εικόνα 1.8** Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου των χαρπινών στα φυτά. (Πηγή: <http://www.planthealthcare.com/technology/harpin/>)

## 1.6. Το είδος *Nicotiana benthamiana* ως φυτό μοντέλο

Παρόλο που υπάρχουν εκατομμύρια είδη στη Γη, ελάχιστα από αυτά αποτελούν αντικείμενο εντατικής βιολογικής έρευνας. Ένα από αυτά είναι το άγριο είδος καπνού *Nicotiana benthamiana*, όπου ανήκει στην οικογένεια των Σολανωδών και είναι ιθαγενές της Αυστραλίας (Εικόνα 1.9). Είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος ξενιστής σε πειράματα στην ιολογία, εξαιτίας στο ότι μπορεί να μολυνθεί με επιτυχία από διάφορους φυτικούς ιούς (Goodin et al. 2008). Το πυρηνικό DNA του απαρτίζεται από

19 ζεύγη χρωμοσωμάτων, ενώ το μέγεθος του απλοειδούς γονιδιώματος του (τιμή 1C) εκτιμάται ότι είναι 3.2 pg (=3.136 Mbp) (Narayan 1987; Bennett and Leitch 1995). Είναι φυτό ευαίσθητο σε πληθώρα φυτοπαθογόνων οργανισμών (βακτηρίδια, ωομύκητες, μύκητες κλπ), καθιστώντας το ως ιδανικό φυτό μοντέλο για μελέτες που αφορούν σε αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων καθώς και σε στρατηγικές ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων (Goodin et al. 2008).



**Εικόνα 1.9** Το είδος *Nicotiana benthamiana*. (Πηγή: [https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotiana\\_benthamiana](https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotiana_benthamiana))

Το *N. benthamiana* έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος βιοτεχνολογικών εφαρμογών καθώς παρουσιάζει σημαντικά συγκριτικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλα είδη: i) εμφανίζει καλή συμπεριφορά σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας, ii) επιτρέπει την ευχερή καλλιέργεια κυττάρων και αναγέννηση φυταρίων από κυτταροκαλλιέργειες, iii) είναι ιδιαίτερα επιδεκτικό σε διαδικασίες σωματικής εμβρυογένεσης, σωματικού υβριδισμού και γενετικής τροποποίησης τόσο του πυρηνικού όσο και του χλωροπλαστιδιακού γονιδιώματος (Svab and Maliga 1993; Klaus et al. 2003; Hasunuma et al. 2008) και iv) παρουσιάζει μικρό βιολογικό κύκλο, γνώρισμα που είναι ιδιαίτερα σημαντικό για μελέτες λειτουργίας γονιδίων αλλά και για τις διαδικασίες μετασχηματισμού και αναγέννησης ολόκληρου φυτού. Κεντρική θέση στα πλεονεκτήματα αξιοποίησής του ως φυτό-μοντέλο καταλαμβάνει η ευκολία γενετικού μετασχηματισμού του και η

διαθεσιμότητα πληθώρας πρωτόκολλων για το σκοπό αυτό. Επακολούθως, αξιοποιείται ως μοντέλο για τη μελέτη της λειτουργίας πολλών γονιδίων που προέρχονται από διάφορους οργανισμούς, τα οποία ενσωματώνονται ή/και υπερεκφράζονται στον καπνό (Werner et al. 2001; Wright et al. 2005). Η κύρια μέθοδος που αξιοποιείται για το μετασχηματισμό του είναι μέσω της χρήσης διαφόρων στελεχών του *Agrobacterium tumefaciens*, αλλά έχουν αξιοποιηθεί και άλλες μέθοδοι μετασχηματισμού όπως η βιολιστική.

## 1.7. Σκοπός της μελέτης

---

Με δεδομένο ότι οι χαρπίνες, που προέρχονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια, χαρακτηρίζονται από την ικανότητα επαγωγής μηχανισμών άμυνας έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων σε φυτά, στόχο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης της χαρπίνης HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> έναντι αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Για το σκοπό αυτό, διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, από το βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola*, υπεβλήθησαν σε καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας και ακολούθησε η *in vitro* αξιολόγηση της ανθεκτικότητάς τους σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου.

Στο πλαίσιο αυτό, γενετικό υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν διαγονιδιακές σειρές *N. benthamiana*, οι οποίες εκφράζουν τη χαρπίνη HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>), ώστε να κατευθύνεται η έκφραση της πρωτεΐνης εξωκυτταρικά. Αφού έγινε έλεγχος των διαθέσιμων διαγονιδιακών σειρών (T<sub>2</sub>) προκειμένου να διαπιστωθεί η ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του διαγονιδίου SP/*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, ομοζύγωτες SP/*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές αξιοποιήθηκαν σε πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. Η αξιολόγηση έγινε συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου, ενώ ως παράμετροι αξιολόγησης χρησιμοποιήθηκαν το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των νεαρών σπορόφυτων υπό συνθήκες καταπόνησης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναμένεται να παρέχουν πρόσθετες ενδείξεις σχετικά με τη δυνατότητα αξιοποίησης της χαρπίνης HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> ως διαγονιδιακής προσέγγισης για την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

---

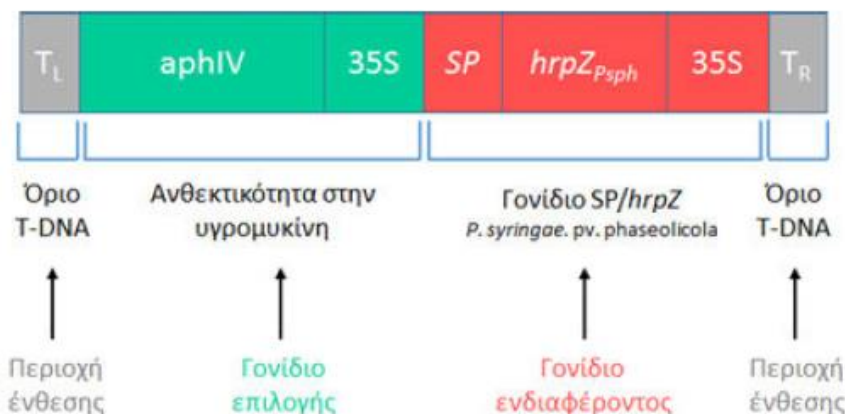
### 2.1. Φυτικό υλικό

Το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, και συγκεκριμένα ξηρασίας και υψηλής αλατότητας, προέρχεται από προηγούμενη έρευνα, κατά την οποία αναπτύχθηκαν διαγονιδιακά φυτά του άγριου είδους καπνού *Nicotiana benthamiana* που εκφράζουν το διαγονίδιο *SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* (Pavli et al. 2011; 2012).

Το άγριο είδος *N. benthamiana* έχει χαρακτηριστεί ως φυτό-μοντέλο και χρησιμοποιείται ευρέως σε ερευνητικές μελέτες που αφορούν τη λειτουργία γονιδίων ποικίλης προέλευσης, καθώς και τις σχέσεις αλληλεπίδρασης φυτών-παθογόνων μικροοργανισμών. Στην παρούσα μελέτη, η υποβολή καταπονήσεων και η μετέπειτα η αξιολόγηση της διαγονιδιακής ανθεκτικότητας αφορούν σε φυτά T<sub>2</sub> γενιάς.

Για το σταθερό μετασχηματισμό φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, ενώ ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων έγινε με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub> (Tampakaki and Panopoulos 2000). Το γονίδιο *hrpZ* που ενσωματώθηκε στο πλασμίδιο, προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (μεγέθους 995bp) και εκφράστηκε ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης PR1, ώστε να κατευθύνεται η παραγωγή της πρωτεΐνης HrpZ<sub>P<sub>sph</sub> εξωκυτταρικά (Tampakaki and Panopoulos 2000; Pavli et al. 2011; 2012).</sub></sub>

Στην Εικόνα 2.1 απεικονίζεται η γονιδιακή κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό των φυτών.



**Εικόνα 2.1** Απεικόνιση της γονιδιακής κατασκευής που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών του είδους *N. benthamiana*. Η υπό μεταφορά περιοχή περιείχε το γονίδιο *hrpZ*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (μεγέθους 995 bp), ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης PR1 καθώς και το γονίδιο *aphIV* (hygromycin B phosphotransferase) που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη. (Πηγή: ΜΔΕ Μητσοπούλου Ν, 2016)

## 2.2. Αξιολόγηση των διαγονιδιακών σειρών

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων καταπόνησης, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που εκφράζουν το διαγονίδιο *SP/hrpZ<sub>Psph</sub>* (Pavli et al. 2011; 2012). Ως αρχικό φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν σπόροι T<sub>2</sub> γενιάς, στους οποίους προηγήθηκε έλεγχος για τη διαγονιδιακή φύση τους και την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του διαγονιδίου *SP/hrpZ<sub>Psph</sub>*.

### 2.2.1 Επιλογή των ομοζύγωτων *SP/hrpZ<sub>Psph</sub>*-σειρών

Ο έλεγχος της διαγονιδιακής φύσης των φυτών (T<sub>2</sub> γενιά) και ο προσδιορισμός της ομοζύγωτης/ετεροζύγωτης κατάστασης του διαγονιδίου υλοποιήθηκε μέσω της βλάστησης των σπόρων σε θρεπτικό μέσο επιλογής, το οποίο περιείχε το αντιβιοτικό επιλογής υγρομυκίνη. Συνολικά, ελέγχθηκαν 13 διαγονιδιακές σειρές, ενώ για κάθε σειρά αξιολογήθηκαν 30 σπόροι στο σύνολο (15 σπόροι/τριβλίο).

Προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα, τόσο ποιοτικά (είδος αντιβιοτικού) όσο και ποσοτικά (συγκέντρωση αντιβιοτικού), της χρησιμοποιούμενης πίεσης



επιλογής, στα πειράματα αξιολόγησης συμπεριλήφθηκαν και σπόροι άγριου τύπου (wt) ως μάρτυρες.

### **2.2.1.1 Απολύμανση σπόρων**

Για την απολύμανση των σπόρων T2 γενιάς, έγινε εμβάπτισή τους για 5 min σε διάλυμα χλωρίνης που περιέχει Tween-20, υπό συνεχή ανάδευση, και ακολούθησε έκπλυση (4 φορές) με αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O.

### **2.2.1.2 Έλεγχος της ομοζύγωσης/ετεροζύγωσης κατάστασης του διαγονιδίου *SP/hrpZ<sub>Psph</sub>***

Έπειτα από την απολύμανση, ακολούθησε αξιολόγηση των σπόρων ως προς την ομοζύγωση ή ετεροζύγωση κατάσταση του διαγονιδίου *SP/hrpZ<sub>Psph</sub>*, μέσω βλάστησής τους σε θρεπτικό μέσο επιλογής. Το θρεπτικό μέσο επιλογής περιελάμβανε: ½ θρεπτικό υπόστρωμα MS με βιταμίνες, 1 % ζαχαρόζη και 5 g/L agar, καθώς και το αντιβιοτικό επιλογής υγρομυκίνη (30mg/L).

Ο έλεγχος για τη συγκέντρωση και το είδος του αντιβιοτικού που χρησιμοποιήθηκε πραγματοποιήθηκε μέσω της βλάστησης σπόρων αγρίου τύπου στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα. Οι σπόροι αγρίου τύπου αναμένεται είτε να μη βλαστήσουν είτε να βλαστήσουν αλλά να μην καθίσταται εφικτή η ανάπτυξή τους, εξαιτίας της απουσίας του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη.

Έπειτά από την τοποθέτησή τους σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής, τα τριβλία επώαστηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία: 25 °C, φωτοπερίοδος: 16 h φως/8 h σκοτάδι) για διάστημα περίπου 2-3 εβδομάδων. Στο διάστημα αυτό, λαμβάνονταν τακτικά παρατηρήσεις αναφορικά με το ποσοστό βλάστησης των σπόρων (%) και την ανάπτυξη των νεαρών σπορόφυτων.

Ο προσδιορισμός της ετεροζύγωσης/ομοζύγωσης κατάστασης του διαγονιδίου *SP/hrpZ<sub>Psph</sub>* βασίστηκε σε καταμέτρηση των σπόρων που βλάστησαν και των σπορόφυτων που εμφάνισαν απρόσκοπτη ανάπτυξη παρουσία του αντιβιοτικού

επιλογής. Ειδικότερα, η αναλογία των ευαίσθητων και ανθεκτικών σποροφύτων στην υγρομυκίνη είναι ενδεικτική της αναλογίας διάσπασης για το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής και αντανακλά την ύπαρξη του σχετικού γονιδίου σε ένα (ετεροζύγωτη σειρά) ή δύο αντίγραφα (ομοζύγωτη σειρά). Συνεπώς, ως ετεροζύγωτες σειρές χαρακτηρίζονται οι σειρές που παρουσιάζουν φαινοτυπική αναλογία 3:1, ενώ ως ομοζύγωτες για το διαγονίδιο εκείνες που υπό συνθήκες πίεσης επιλογής εμφανίζουν ποσοστό βλάστησης και ικανότητα ανάπτυξης που ισούται με 100 %.

### **2.2.2 Έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου *SP/hrpZ<sub>PspH</sub>***

Ακολούθησε ο έλεγχος των μετασηματισμένων φυτών T<sub>2</sub> γενιάς για την επιτυχή ενσωμάτωση του διαγονιδίου *SP/hrpZ<sub>PspH</sub>*. Η ένθεση του διαγονιδίου εξετάστηκε με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές για το *SP/hrpZ<sub>PspH</sub>* (Pavli et al. 2011).

Το μείγμα της PCR περιείχε 2 μl DNA ως μήτρα. Στο μείγμα επίσης προστέθηκαν 0.25 μM από κάθε εκκινητή, 200 μM dNTPs, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x *Taq* buffer, 1.25 u *Taq* polymerase (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega) σε τελικό όγκο 20 μl.

Το πρόγραμμα ενίσχυσης αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94 °C για 5 min και στη συνέχεια 30 κύκλους των 30 sec στους 94 °C (αποδιάταξη), 1 min στους 50 °C (πρόσδεση εκκινητών), 1 min στους 72 °C (επιμήκυνση των PCR προϊόντων) και έναν τελικό κύκλο επιμήκυνσης στους 72 °C για 5 min. Στη συνέχεια, τα προϊόντα ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1 % με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X) με βρωμιούχο αιθίδιο.

## **2.3 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης**

### **2.3.1 Καταπόνηση υψηλής αλατότητας (NaCl)**

Για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας, επιλέχθηκαν 6 διαγονιδιακές σειρές, στις οποίες είχε προηγουμένως

επιβεβαιωθεί η ομοζύγωτη κατάσταση του διαγονιδίου *SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*. Η αξιολόγηση έγινε με δύο διαφορετικούς τρόπους: i) παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής (υγρομυκίνη, 30mg/L) και ii) απουσία του αντιβιοτικού επιλογής.

Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες και φυτά αγρίου τύπου. Οι σειρές που αξιολογήθηκαν, καθώς και ο αριθμός σπόρων ανά σειρά περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.1.

**Πίνακας 2.1** Διαγονιδιακές *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές (T<sub>0</sub>) και αριθμός φυτών (T<sub>2</sub> γενιά) που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας (NaCl).

Διαγονιδιακή σειρά / WT	Είδος φυτών	Αριθμός T2 σπόρων*
<b>177-4-4</b>		180
<b>169-7-2</b>		180
<b>160-18-1</b>	<i>SP/HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	180
<b>167-7-4</b>	Εξωκυτταρική έκκριση	180
<b>166-18-1</b>		180
<b>169-10-1</b>		180
<b>177-4-7**</b>	<i>HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	180
	Ενδοκυτταρική έκκριση	
<b>WT</b>	---	180
<b>Σύνολο</b>		1.440

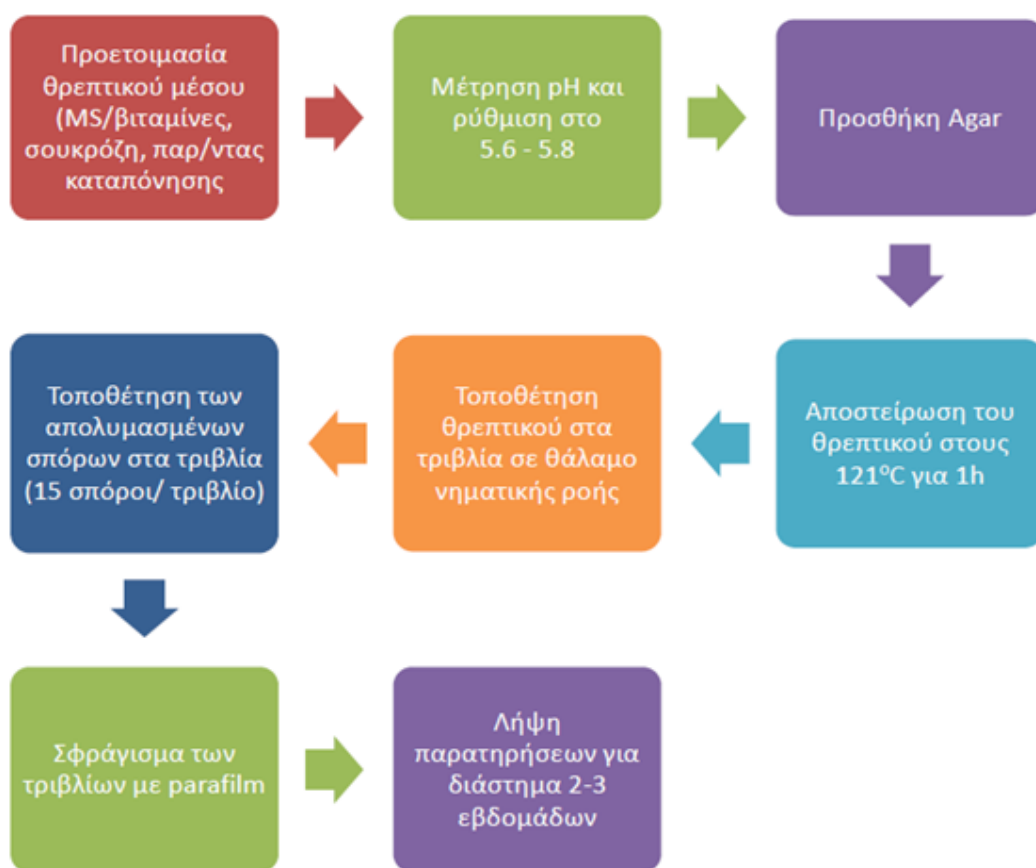
\*Οι μισοί σπόροι τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό επιλογής (υγρομυκίνη) και οι άλλοι μισοί σε θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικό επιλογής.

\*\*Η σειρά 177-4-7 εμφάνισε επιμόλυνση και δεν αξιολογήθηκε λόγω αδυναμία εξαγωγής ασφαλών συμπερασμάτων.

Αρχικά, έγινε απολύμανση των σπόρων των διαγονιδιακών σειρών και αγρίου τύπου με εμβάπτιση σε διάλυμα χλωρίνης που περιέχει Tween-20, υπό συνεχή ανάδευση για 5 min, και ακολούθησε έκπλυση, 4 φορές, με αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό μέσο με τρία (3) διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης αλατότητας: i) 0 mM NaCl (control), ii) 100 mM NaCl και iii) 200 mM NaCl.

Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος περιελάμβανε: ½ MS με βιταμίνες, 1% ζαχαρόζη και 5 g/L agar και NaCl στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις. Επίσης, τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν διέφεραν αναφορικά με την ύπαρξη ή όχι αντιβιοτικού επιλογής (υγρομυκίνη) για το διαγονιδίο *hprZ<sub>PspH</sub>*. Τα διαδοχικά βήματα που ακολουθήθηκαν για την προετοιμασία των τριβλίων παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.2.

Τα τριβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία: 22-25°C, φωτοπερίοδος: 16 h φως/8 h σκοτάδι), όπου επώαστηκαν για χρονικό διάστημα περίπου 20 ημερών. Κατά το διάστημα αυτό, λαμβάνονταν παρατηρήσεις όσον αφορά το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και την ανάπτυξη των νεαρών σπορόφυτων υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας.



**Εικόνα 2.2** Σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών σταδίων που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. (Πηγή: ΠΕ Βιβίσκης Β, 2018)

Ως βλαστήσαντες θεωρήθηκαν οι σπόροι με ελάχιστο μήκος του ριζιδίου, 2mm. Η εκτίμηση του ποσοστού βλάστησης έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$GP = \frac{(\text{αριθμός σπόρων που βλάστησαν})}{(\text{συνολικός αριθμός σπόρων})} \times 100.$$

### 2.3.2 Υδατική καταπόνηση (PEG, D-Mannitol)

Για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, επιλέχθηκαν 7 διαγονιδιακές σειρές, των οποίων έχει προηγουμένως διαπιστωθεί η ομοζυγωτία ως προς το διαγονίδιο *SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες και φυτά αγρίου τύπου. Οι σειρές που αξιολογήθηκαν, καθώς και ο αριθμός σπόρων ανά σειρά παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2.

**Πίνακας 2.2** Διαγονιδιακές *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές (T<sub>0</sub>) και αριθμός φυτών (T<sub>2</sub> γενιά) που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης.

Διαγονιδιακή σειρά / WT	Είδος φυτών	Αριθμός T <sub>2</sub> σπόρων
<b>177-4-4</b>	<i>HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i> Ενδοκυτταρική έκκριση	120
<b>169-10-1</b>		120
<b>166-18-1</b>		120
<b>167-7-4</b>		120
<b>169-6-4</b>	<i>SP/HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i> Εξωκυτταρική έκκριση	120
<b>160-18-1*</b>		120
<b>169-7-5</b>		120
<b>169-7-2</b>		120
<b>WT</b>	---	120
<b>Σύνολο</b>		1.080

\*Η σειρά 160-18-1 εμφάνισε επιμόλυνση και δεν αξιολογήθηκε λόγω αδυναμία εξαγωγής ασφαλών συμπερασμάτων.

Σε πρώτη φάση, έγινε απολύμανση των σπόρων των *HrpZ<sub>Psph</sub>*-σειρών και αγρίου τύπου με εμβάπτιση σε διάλυμα χλωρίνης που περιέχει Tween-20, υπό συνεχή ανάδευση για 5 min, και ακολούθησε έκπλυση, 4 φορές, με αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό μέσο με τέσσερα (4) διαφορετικά επίπεδα υδατικής καταπόνησης με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων % PEG και D-Mannitol: i) 0 (control), ii) 5 % πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG 6000), iii) 100 mM D-Mannitol και iv) 200 mM D-Mannitol.

Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος περιελάμβανε: ½ MS με βιταμίνες, 1% ζαχαρόζη και 5 g/L agar και PEG / D-Mannitol στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις. Τα διαδοχικά βήματα που ακολούθηθηκαν για την προετοιμασία των τριβλίων παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.2.

Τα τριβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία: 22-25°C, φωτοπερίοδος: 16 h φως/8 h σκοτάδι), όπου επώαστηκαν για χρονικό διάστημα περίπου 20 ημερών. Κατά το διάστημα αυτό, λαμβάνονταν παρατηρήσεις όσον αφορά το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και την ανάπτυξη των νεαρών σπορόφυτων υπό συνθήκες καταπόνησης αλατότητας.

Οι μετρήσεις ξεκίνησαν στο ελάχιστο μήκος του ριζιδίου, 2mm. Η εκτίμηση του ποσοστού βλάστησης έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$GP = \frac{(\text{αριθμός σπόρων που βλάστησαν})}{(\text{συνολικός αριθμός σπόρων})} \times 100.$$

## 3. Αποτελέσματα

---

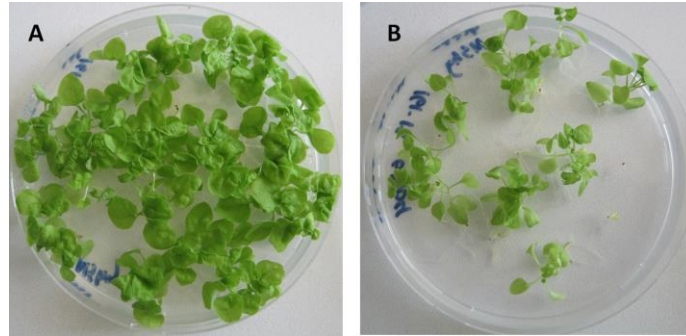
### 3.1. Αξιολόγηση διαγονιδιακών σειρών

#### 3.1.1. Επιλογή ομοζύγωτων για το διαγονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* σειρών

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του διαγονιδίου *SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των διαθέσιμων μετασχηματισμένων σειρών *N. benthamiana* ώστε να επιλεγούν οι ομοζύγωτες σειρές που θα λάβουν μέρος στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Η επιλογή για ομοζυγωτία έγινε έμμεσα, μέσω της ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής υγρομυκίνη, καθώς -σύμφωνα με τη γονιδιακή κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό (Εικόνα 2.1)- οι σειρές που εκφράζουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* αναμένεται να φέρουν επίσης και το γονίδιο *aphIV* (hygromycin B phosphotransferase) που προσδίδει ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη. Κατά συνέπεια, η επιτυχής εισαγωγή του γονιδίου *aphIV* έχει ως επακόλουθο την ενσωμάτωση του *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* στο γονιδίωμα του φυτού.

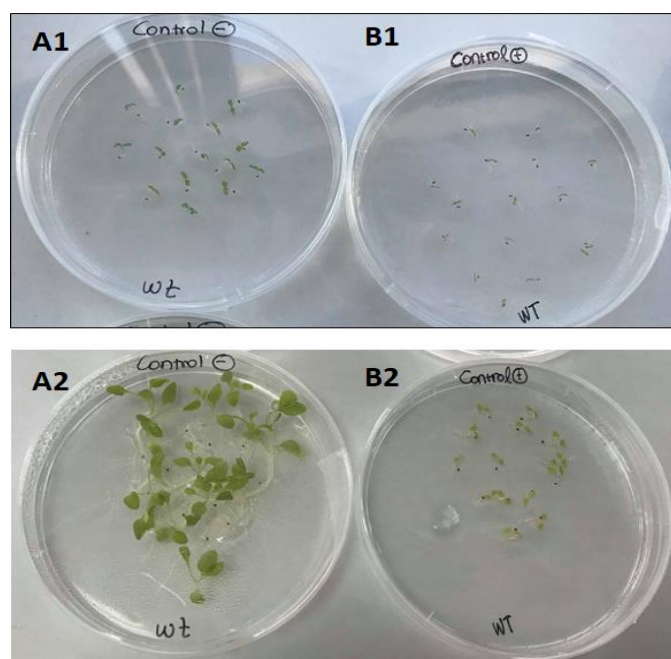
Στο πλαίσιο αυτό, έγινε βλάστηση των σπόρων σε θρεπτικό μέσο που περιείχε το αντιβιοτικό υγρομυκίνη. Για τον έλεγχο της ομοζυγωτίας έγινε καταμέτρηση των σπόρων που βλάστησαν και των σπορόφυτων που καθίστανται ικανά να αναπτυχθούν παρουσία υγρομυκίνης. Ως ομοζύγωτες λήφθηκαν οι σειρές που παρουσίασαν απουσία διάσπασης για το γονίδιο *aphIV*, εκφρασμένη ως ποσοστό βλάστησης της τάξης του 100 % και ανθεκτικά σπορόφυτα που δύνανται να αναπτυχθούν υπό συνθήκες πίεσης επιλογής.

Από τις 13 γενετικά μετασχηματισμένες σειρές που συνολικά αξιολογήθηκαν, προσδιορίστηκαν 7 σειρές που εμφάνισαν απουσία διάσπασης για το γνώρισμα της ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη, λόγω της ένθεσης του γονιδίου *aphIV*, και συνεπώς χαρακτηρίζονται από ομοζυγωτία για το διαγονίδιο *SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*. Αντίθετα, οι ετεροζύγωτες σειρές παρουσίασαν την αναμενόμενη αναλογία διάσπασης 3:1 που διέπει τη Μενδελική κληρονομηση των μονογονιδιακών γνωρισμάτων (Εικόνα 3.1).



**Εικόνα 3.1** Προσδιορισμός της ομοζύγωτης/ετεροζύγωτης κατάστασης του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* σε μετασχηματισμένες σειρές του είδους *N. benthamiana* (T<sub>2</sub> γενιά), μέσω της επιλογής για το γνώρισμα της ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής (υγρομυκίνη). Α Ομοζύγωτη *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρά, με ποσοστό βλάστησης = 100 %. Β Ετεροζύγωτη *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρά, με ποσοστό βλάστησης < 100 %.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής, έγινε βλάστηση σπόρων αγρίου τύπου (WT) σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιείχε το αντιβιοτικό υγρομυκίνη (30 mg/L). Η καταλληλότητα της ασκούμενης πίεσης επιλογής, τόσο σε ποιοτικό (είδος αντιβιοτικού) όσο και ποσοτικό επίπεδο (συγκέντρωσης αντιβιοτικού), επαληθεύτηκε με την αδυναμία βλάστησης των σπόρων ή/και την αναστολή ανάπτυξης των σπορόφυτων αγρίου τύπου (WT) σε θρεπτικό μέσο επιλογής παρουσία υγρομυκίνης (Εικόνα 3.2).



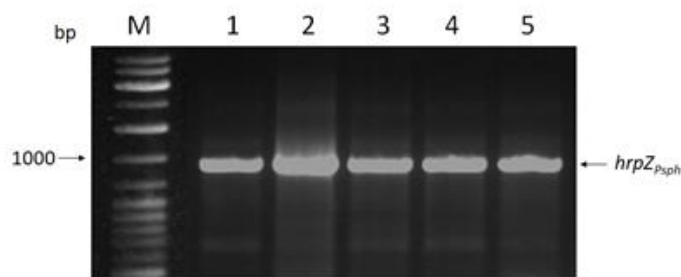


**Εικόνα 3.2** Επαλήθευση της καταλληλότητας της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής, μέσω βλάστησης σπόρων αγρίου τύπου (wt) παρουσία και απουσία του αντιβιοτικού υγρομυκίνη (30 mg/L). A1, B1. Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (WT) απουσία και παρουσία υγρομυκίνης, κατά την 3<sup>η</sup> ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων (1<sup>η</sup> παρατήρηση, 02/11/2017). A2, B2. Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (WT) απουσία και παρουσία υγρομυκίνης, κατά την 18<sup>η</sup> ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων (τελευταία παρατήρηση, 16/11/2017). **A1, A2** Απρόσκοπτη βλάστηση και ανάπτυξη των wt φυτών υπό συνθήκες απουσίας πίεσης επιλογής. **B1, B2** Αδυναμία βλάστησης και ανάπτυξης των φυτών αγρίου τύπου υπό συνθήκες πίεσης επιλογής.

### 3.1.2. Επιβεβαίωση της παρουσίας του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*

Οι διαγονιδιακές σειρές που επιλέχθηκαν για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, εξετάστηκαν για την παρουσία του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* μέσω αντίδρασης PCR.

Η επιτυχής εισαγωγή του διαγονιδίου επιβεβαιώθηκε σε όλα τα φυτά που εξετάστηκαν, με την επιλεγμένη ενίσχυση προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους για το διαγονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* (995 bp) (Εικόνα 3.3).



**Εικόνα. 3.3** Προϊόντα ενίσχυσης PCR σε μετασηματισμένα φυτά του είδους *N. benthamiana*. M: Marker (Gene Ruler Ladder mix, Fermentas). 1, 2, 3, 4, 5: Μετασηματισμένα φυτά (T<sub>2</sub> γενιά) που φέρουν το διαγονίδιο *SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* (μέγεθος: 995 bp).

## **3.2. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του φυτικού υλικού στην αλατότητα (NaCl)**

Η βλάστηση των σπόρων επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία του NaCl στο θρεπτικό μέσο βλάστησης. Όπως αναμενόταν, στις περισσότερες περιπτώσεις, η επίδραση του εφαρμοζόμενου επιπέδου καταπόνησης υπήρξε ανάλογη της αναστολής βλάστησης και ανάπτυξης (Πίνακες 3.1 και 3.2). Παρά τη διαγονιδιακή φύση των *hrrZ<sub>Psph</sub>*-σειρών (Ενότητα 3.1), η ανάπτυξη των σπορόφυτων επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία ή όχι του αντιβιοτικού επιλογής (υγρομυκίνη).

### **3.2.1. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (υγρομυκίνη)**

Σε συνθήκες απουσίας καταπόνησης, η έναρξη της βλάστησης για το σύνολο των *hrrZ<sub>Psph</sub>*-σειρών σημειώθηκε την 3<sup>η</sup> ημέρα, ενώ το τελικό ποσοστό βλάστησης έφτασε το 100% (17<sup>η</sup> ημέρα) (Πίνακας 3.1). Σημειώνεται ότι κατά την αξιολόγηση παρουσία υγρομυκίνης, στα φυτά αγρίου τύπου σημειώθηκε αναστολή ανάπτυξης.

Ταυτοχρόνως, στο χαμηλότερο επίπεδο καταπόνησης της αλατότητας (100 mM NaCl), το ποσοστό βλάστησης όλων των εξεταζόμενων σειρών στην 1<sup>η</sup> παρατήρηση ήταν χαμηλό, με την 169-10-1 να παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό 46.6 %. Αντίθετα, με την πάροδο του χρόνου αμβλύνθηκαν οι διαφορές στο ποσοστό βλάστησης των διαφορετικών σειρών, με τα τελικά ποσοστά βλάστησης (τελευταία παρατήρηση) να μη διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των σειρών (Πίνακας 3.1) (Γράφημα 3.1, 3.2).

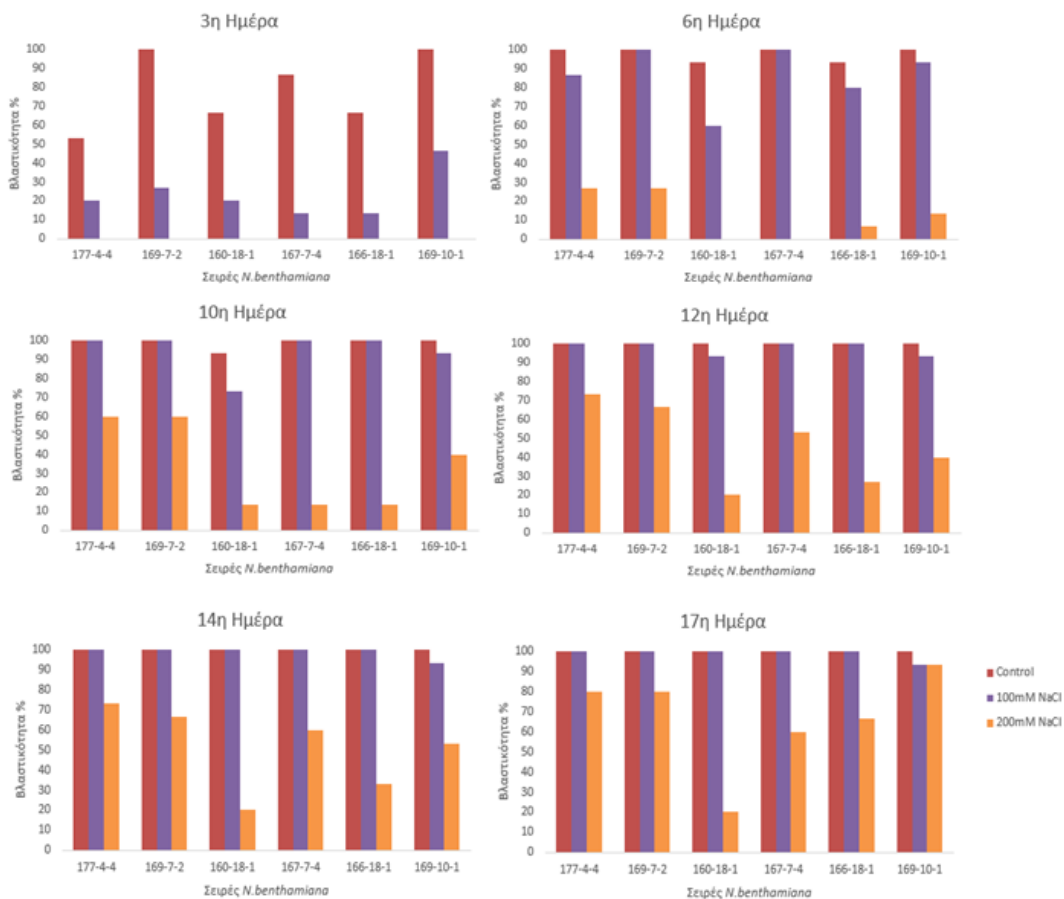
Ωστόσο, στο υψηλότερο επίπεδο καταπόνησης υψηλής αλατότητας (200 mM NaCl), σημειώθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων. Την 3<sup>η</sup> ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων (1<sup>η</sup> παρατήρηση), σημειώθηκε πλήρης αδυναμία βλάστησης στο σύνολο των σειρών. Κατά την 12<sup>η</sup> ημέρα, το σύνολο των σειρών εμφάνισε ικανοποιητικό ποσοστό βλάστησης, με την σειρά 177-4-4 (73.3 %) να υπερέχει έναντι των υπολοίπων. Με το πέρας της περιόδου λήψης παρατηρήσεων (17<sup>η</sup> ημέρα), το υψηλότερο ποσοστό βλάστησης παρουσίασε η σειρά 169-10-1, ακολουθούμενη από τις 177-4-4 και 169-7-2 ενώ τη χαμηλότερη επίδοση εμφάνισε η σειρά 160-18-1 (20 %) (Πίνακας 3.1) (Γράφημα 3.1, 3.2).

Στο μέγιστο επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl), φαίνεται η έντονη επίδραση του περιοριστικού παράγοντα, αφού παρατηρείται αργή αύξηση του ποσοστού βλάστησης και χαμηλότερα τελικά ποσοστά με εμφανείς διαφορές τη 17<sup>η</sup> ημέρα συγκριτικά με τις άλλες δύο επεμβάσεις καταπόνησης (Πίνακας 3.1) (Γράφημα 3.1, 3.2).

**Πίνακας 3.1** Ποσοστό βλάστησης (%) ανά γονότυπο και επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (NaCl), την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 14<sup>η</sup> και 17<sup>η</sup> ημέρα της καταπόνησης.

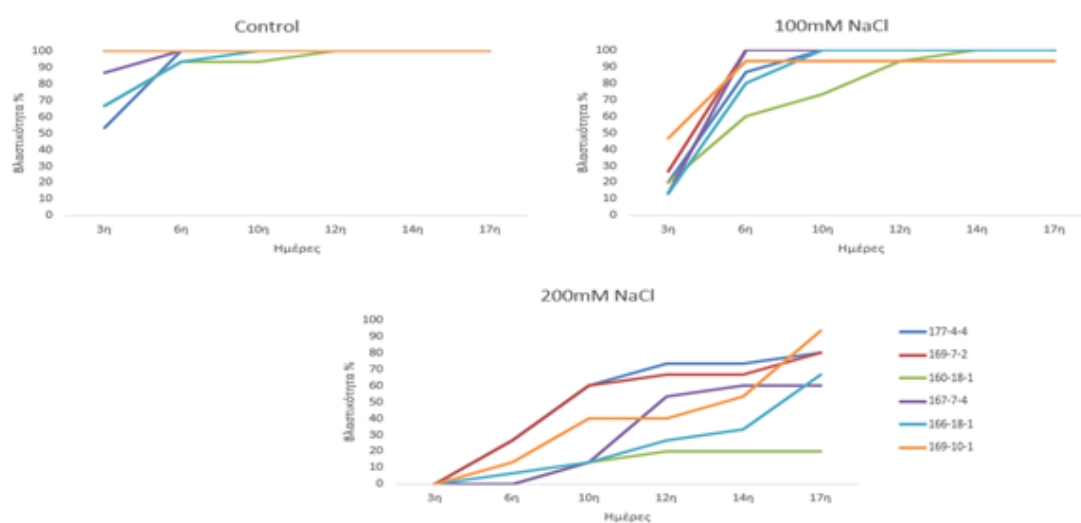
Σειρά	Επίπεδο Καταπόνησης - Αλατότητα (NaCl) [+]		
	C	100mM	200mM
<i>02/11/2017</i>			
177-4-4	53.3%	20%	0%
169-7-2	100%	26.6%	0%
160-18-1	66.6%	20%	0%
167-7-4	86.6%	13.3%	0%
166-18-1	66.6%	13.3%	0%
169-10-1	100%	46.6%	0%
<i>05/11/2017</i>			
177-4-4	100%	86.6%	26.6%
169-7-2	100%	100%	26.6%
160-18-1	93.3%	60%	0%
167-7-4	100%	100%	0%
166-18-1	93.3%	80%	6.6%
169-10-1	100%	93.3%	13.3%
<i>09/11/2017</i>			
177-4-4	100%	100%	60%
169-7-2	100%	100%	60%
160-18-1	93.3%	73.3%	13.3%
167-7-4	100%	100%	13.3%
166-18-1	100%	100%	13.3%
169-10-1	100%	93.3%	40%
<i>11/11/2017</i>			
177-4-4	100%	100%	73.3%
169-7-2	100%	100%	66.6%
160-18-1	100%	93.3%	20%
167-7-4	100%	100%	53.3%
166-18-1	100%	100%	26.6%
169-10-1	100%	93.3%	40%
<i>13/11/2017</i>			

177-4-4	100%	100%	73.3%
169-7-2	100%	100%	66.6%
160-18-1	100%	100%	20%
167-7-4	100%	100%	60%
166-18-1	100%	100%	33.3%
169-10-1	100%	93.3%	53.3%
<i>16/11/2017</i>			
177-4-4	100%	100%	80%
169-7-2	100%	100%	80%
160-18-1	100%	100%	20%
167-7-4	100%	100%	60%
166-18-1	100%	100%	66.6%
169-10-1	100%	93.3%	93.3%



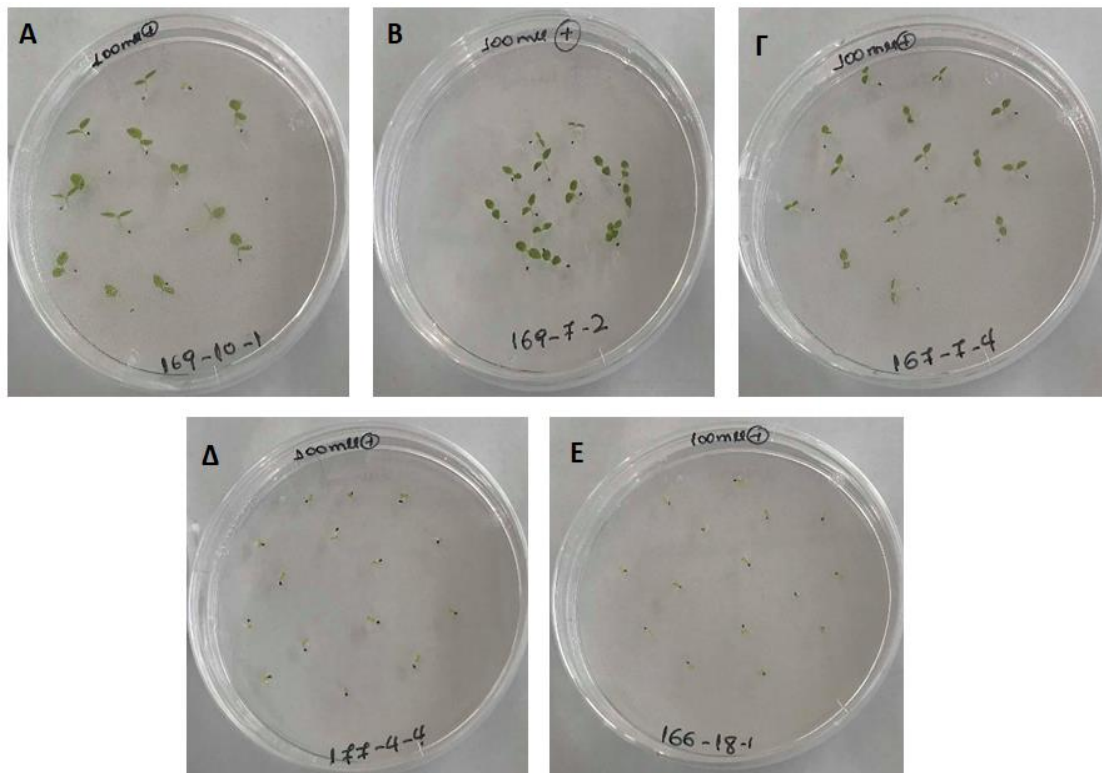
**Γράφημα 3.1** Ποσοστό βλάστησης των σπόρων 6 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, παρουσίας αντιβιοτικού (υγρομυκίνη), ως απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (C, 100 mM NaCl και 200 mM NaCl), ανά ημέρα καταπόνησης (3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 14<sup>η</sup> και 17<sup>η</sup>).

Πέρα από το ποσοστό βλάστησης των σειρών, αξιολογήθηκε παράλληλα και ο ρυθμός ανάπτυξης των σποροφύτων και η γενικότερη απόκρισή τους στην επίδραση του περιοριστικού παράγοντα. Έτσι, ενώ στα τριβλία με τη μηδενική συγκέντρωση NaCl (Control) σημειώθηκε απρόσκοπτη ανάπτυξη και τα σπορόφυτα παρουσίαζαν υψηλή ευρωστία, με την αύξηση του επιπέδου καταπόνησης, έγινε ευδιάκριτη η αναστολή της ανάπτυξης και η μείωση της ευρωστίας.



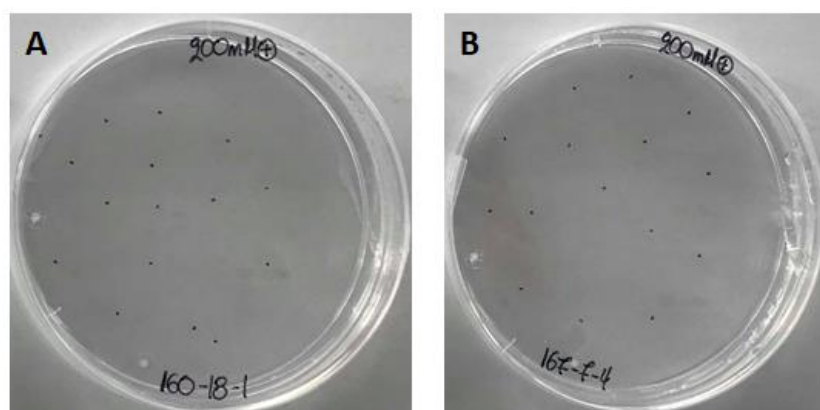
**Γράφημα 3.2** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης των σπόρων 6 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* με ταυτόχρονη παρουσία αντιβιοτικού (υγρομυκίνη), ανά επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (C, 100 mM NaCl και 200 mM NaCl).

Αναφορικά με το χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (100 mM NaCl), οι *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*- σειρές 169-7-2, 167-7-4 και 169-10-1 παρουσίασαν σαφή υπεροχή στην ανάπτυξη, που ήταν εμφανής από την 10<sup>η</sup> ημέρα, συγκριτικά με τις υπόλοιπες *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές (Εικόνα 3.4).



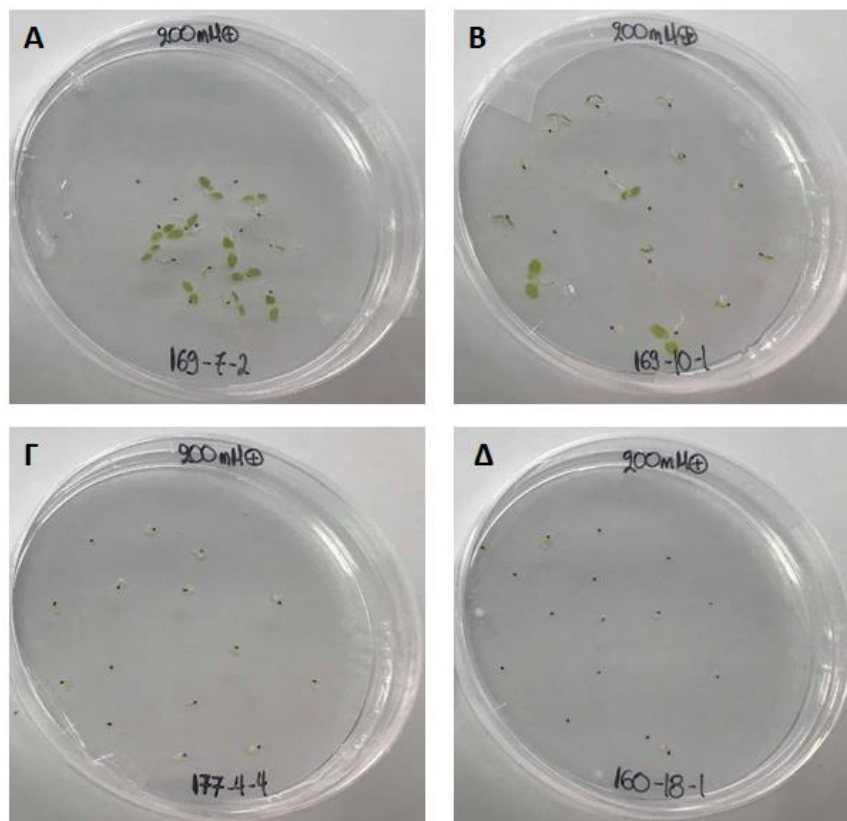
**Εικόνα 3.4** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>Psph</sub>*-διαγονιδιακών σειρών στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (100 mM NaCl), την 10<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α. 169-10-1, Β. 169-7-2, Γ. 167-7-4, Δ. 177-4-4, Ε. 166-18-1.

Τέλος, η συγκέντρωση των 200 mM NaCl σε ορισμένες σειρές υπήρξε πλήρως ανασταλτική της ανάπτυξής τους έως και την 6<sup>η</sup> μέρα από την τοποθέτηση των σπόρων (Εικόνα 3.5).



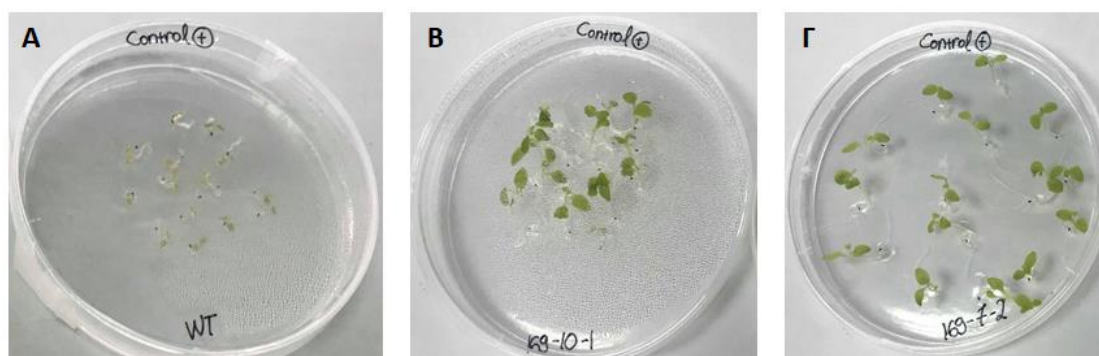
**Εικόνα 3.5** Αναστολή ανάπτυξης των *hrpZ<sub>Psph</sub>*-διαγονιδιακών σειρών 160-18-1 και 167-7-4 στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl), την 6<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α. 160-18-1, Β. 167-7-4.

Παράλληλα, κατά τη 17<sup>η</sup> μέρα (τελευταία παρατήρηση) η ανάπτυξη υπήρξε σαφώς περιορισμένη, με κύριο χαρακτηριστικό των φυταρίων την έλλειψη ευρωστίας (Εικόνα 3.6).



**Εικόνα 3.6** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>Psph</sub>*-διαγονιδιακών σειρών στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl), την 17<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α. 169-7-2, Β. 169-10-1, Γ. 177-4-4, Δ. 160-18-1.

Είναι σημαντικό ωστόσο να υπογραμμιστεί ότι η έκφραση της χαρπίνης *HrpZ<sub>Psph</sub>* στα διαγονιδιακά φυτά οδήγησε σε προαγωγή της ανάπτυξης των φυταρίων, η οποία, όπως αναμενόταν, διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών *HrpZ<sub>Psph</sub>*-σειρών. Στο πλαίσιο αυτό, οι *hrpZ<sub>Psph</sub>*-σειρές 169-7-2 και 169-10-1, πέραν του φαινοτύπου ανθεκτικότητας, χαρακτηρίζονταν από αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και βελτιωμένη ευρωστία συγκριτικά με τις υπόλοιπες *hrpZ<sub>Psph</sub>*-σειρές. Ο φαινότυπος αυτός αναδεικνύεται σε συνθήκες απουσίας καταπόνησης (Control), και είναι ενδεικτικός της θετικής επίδρασης του διαγονιδίου *hrpZ* στην ανάπτυξη των φυτών (Εικόνα 3.7).



**Εικόνα 3.7** Θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* στην ανάπτυξη των σπορόφυτων των διαγονιδιακών *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρών 169-10-1 και 169-7-2 σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των σπορόφυτων αγρίου τύπου (WT). Α. WT, Β. 169-10-1, Γ. 169-7-2.

### 3.2.2. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας απουσία αντιβιοτικού επιλογής (υγρομυκίνη)

Απουσία καταπόνησης, η έναρξη της βλάστησης για το σύνολο των σειρών (WT και *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*) σημειώθηκε την 3<sup>η</sup> ημέρα, ενώ το τελικό ποσοστό βλάστησης έφτασε το 100 % (17<sup>η</sup> ημέρα) (Πίνακας 3.2).

Στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (100 mM NaCl), το ποσοστό βλάστησης των σπόρων όλων των εξεταζόμενων σειρών ήταν υψηλό, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σειρών. Ωστόσο, οι υπό μελέτη σειρές παρουσίασαν διαφορές αναφορικά με το ρυθμό βλάστησης των σπόρων, διαφορές οι οποίες μεγιστοποιήθηκαν στα αρχικά στάδια της καταπόνησης (3<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ημέρα). Κατά τα στάδια αυτά, την καλύτερη επίδοση σε σχέση με το ρυθμό βλάστησης παρουσίασαν οι σειρές 169-7-2, 167-7-4, 166-18-1 και 169-10-1 καθώς και οι μάρτυρες. Αντίθετα, τη χειρότερη επίδοση, καθόλο το διάστημα λήψης παρατηρήσεων, επέδειξε η σειρά 160-18-1 (Πίνακας 3.2) (Γράφημα 3.3, 3.4).

Εντούτοις, καθώς αυξάνεται το επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl), παρατηρήθηκε εμφανής μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων. Στο επίπεδο αυτό, φάνηκε να υπερέχει η διαγονιδιακή σειρά 169-10-1 (ποσοστό βλάστησης 100 % την 17<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης), ακολουθούμενη από τη σειρά 166-18-1 (ποσοστό βλάστησης 73.3 % την 17<sup>η</sup> ημέρα). Αντίθετα, οι διαγονιδιακές σειρές 177-4-4, 169-7-2 και 160-18-1 σημείωσαν το χαμηλότερο ποσοστό βλάστησης, το οποίο ήταν



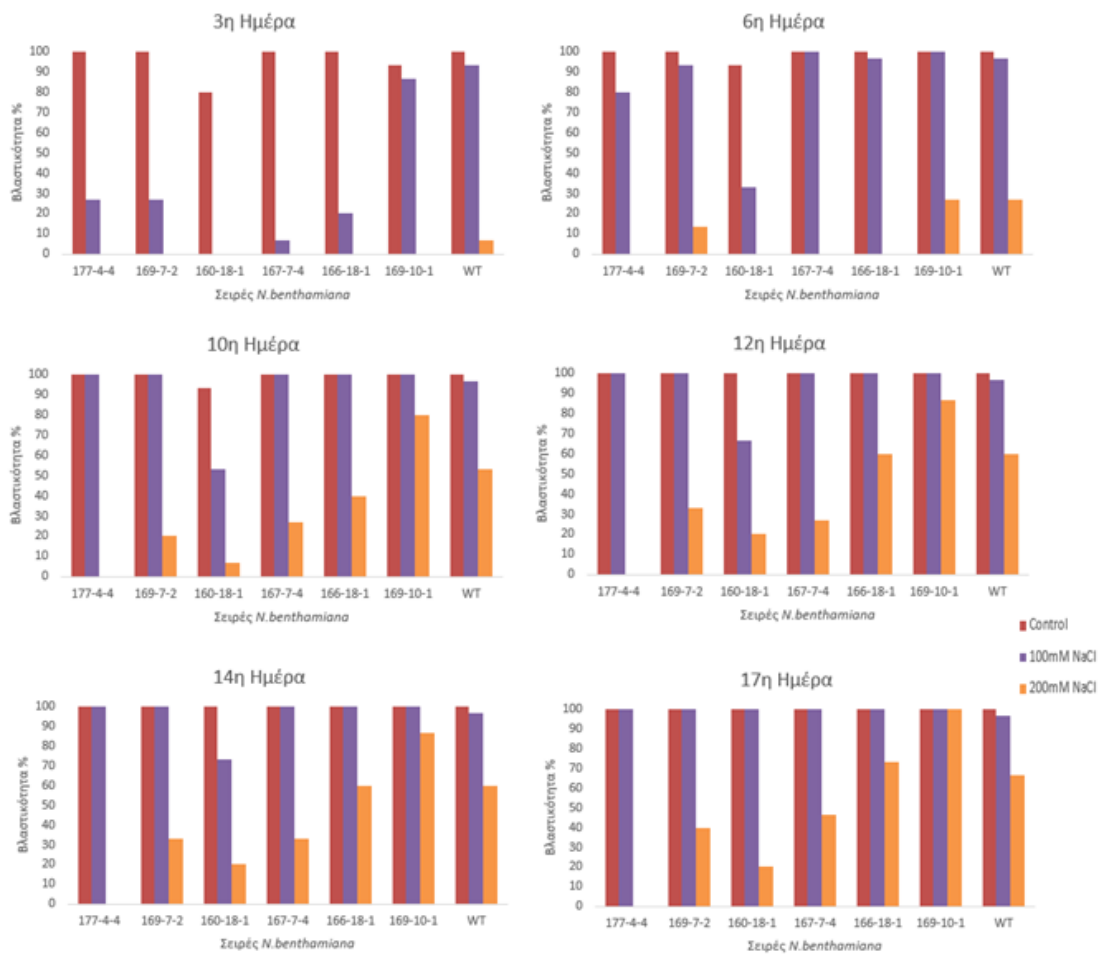
σημαντικά μικρότερο και από αυτό των σπόρων αγρίου τύπου (66.6 %) (Πίνακας 3.2) (Γράφημα 3.3, 3.4).

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι στο μέγιστο επίπεδο καταπόνησης υψηλής αλατότητας (200 mM NaCl), είναι κατάφορη η επίδραση του περιοριστικού παράγοντα.

**Πίνακας 3.2** Ποσοστό βλάστησης (%) ανά γονότυπο και επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (NaCl), την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 14<sup>η</sup> και 17<sup>η</sup> ημέρα της καταπόνησης.

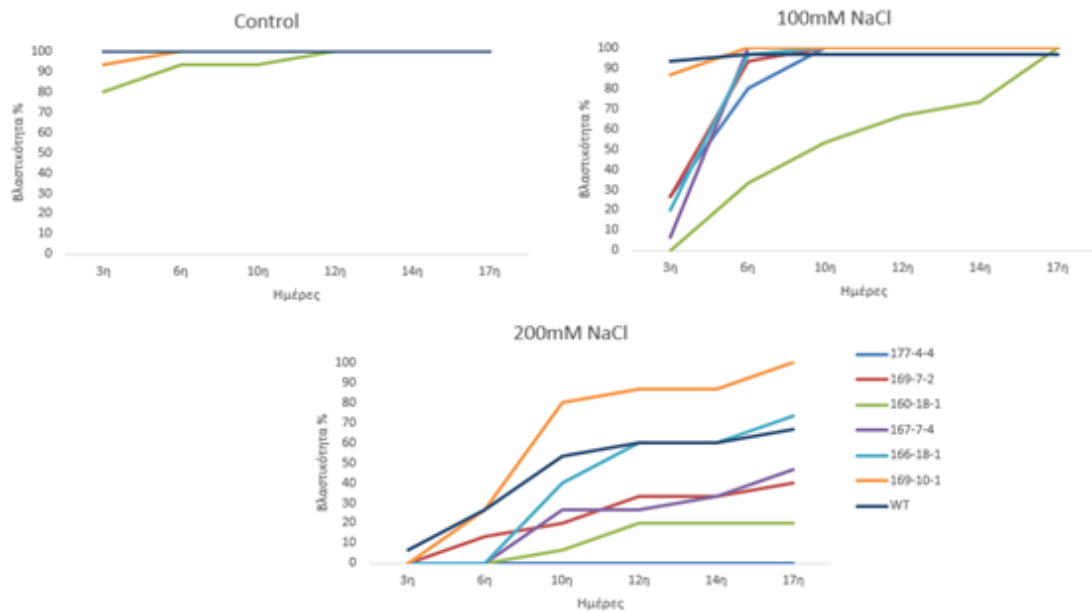
Σειρά	Επίπεδο Καταπόνησης - Αλατότητα (NaCl) [-]		
	C	100mM	200mM
<i>02/11/2017</i>			
177-4-4	100%	26.6%	0%
169-7-2	100%	26.6%	0%
160-18-1	80%	0%	0%
167-7-4	100%	6.6%	0%
166-18-1	100%	20%	0%
169-10-1	93.3%	86.6%	0%
WT	100%	93.3%	6.6%
<i>05/11/2017</i>			
177-4-4	100%	80%	0%
169-7-2	100%	93.3%	13.3%
160-18-1	93.3%	33.3%	0%
167-7-4	100%	100%	0%
166-18-1	100%	96.6%	0%
169-10-1	100%	100%	26.6%
WT	100%	96.6%	26.6%
<i>09/11/2017</i>			
177-4-4	100%	100%	0%
169-7-2	100%	100%	20%
160-18-1	93.3%	53.3%	6.6%
167-7-4	100%	100%	26.6%
166-18-1	100%	100%	40%
169-10-1	100%	100%	80%
WT	100%	96.6%	53.3%
<i>11/11/2017</i>			
177-4-4	100%	100%	0%
169-7-2	100%	100%	33.3%

160-18-1	100%	66.6%	20%
167-7-4	100%	100%	26.6%
166-18-1	100%	100%	60%
169-10-1	100%	100%	86.6%
WT	100%	96.6%	60%
<i>13/11/2017</i>			
177-4-4	100%	100%	0%
169-7-2	100%	100%	33.3%
160-18-1	100%	73.3%	20%
167-7-4	100%	100%	33.3%
166-18-1	100%	100%	60%
169-10-1	100%	100%	86.6%
WT	100%	96.6%	60%
<i>16/11/2017</i>			
177-4-4	100%	100%	0%
169-7-2	100%	100%	40%
160-18-1	100%	100%	20%
167-7-4	100%	100%	46.6%
166-18-1	100%	100%	73.3%
169-10-1	100%	100%	100%
WT	100%	96.6%	66.6%



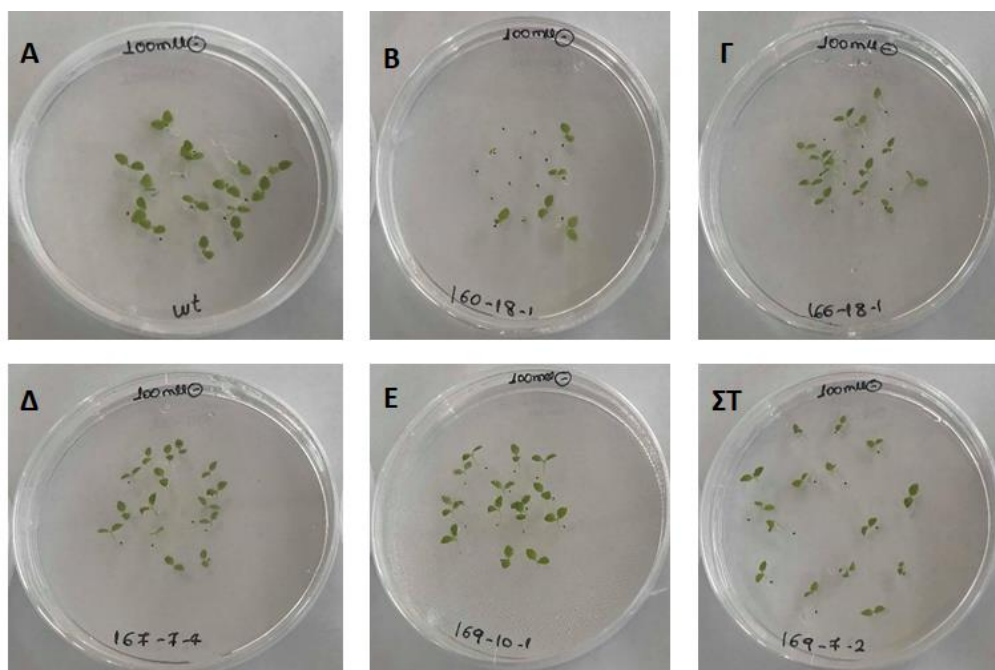
**Γράφημα 3.3** Ποσοστό βλάστησης των σπόρων 7 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hprZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* και σπόρων αγρίου τύπου (wt) απουσίας αντιβιοτικού (υγρομυκίνη), ως απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (C, 100 mM NaCl και 200 mM NaCl), ανά ημέρα καταπόνησης (3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 14<sup>η</sup> και 17<sup>η</sup>).

Όσον αφορά την ανάπτυξη των σπορόφυτων, η λήψη των παρατηρήσεων συμπληρώνουν τις αντίστοιχες παρατηρήσεις σχετικά με το δυναμικό βλάστησης των σπόρων, όπως αυτό περιγράφηκε ανωτέρω. Με την πάροδο του χρόνου, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του ρυθμού ανάπτυξης των σπορόφυτων και της απόκρισής τους στην επίδραση του περιοριστικού παράγοντα. Έτσι, ενώ στα τριβλία με τη μηδενική συγκέντρωση NaCl (Control) σημειώθηκε η αναμενόμενη ανάπτυξη και τα φυτάρια παρουσίαζαν αυξημένη ευρωστία, με την αύξηση του επιπέδου καταπόνησης, κατέστη σαφής η παρεμπόδιση της ανάπτυξης και η μείωση της ευρωστίας.



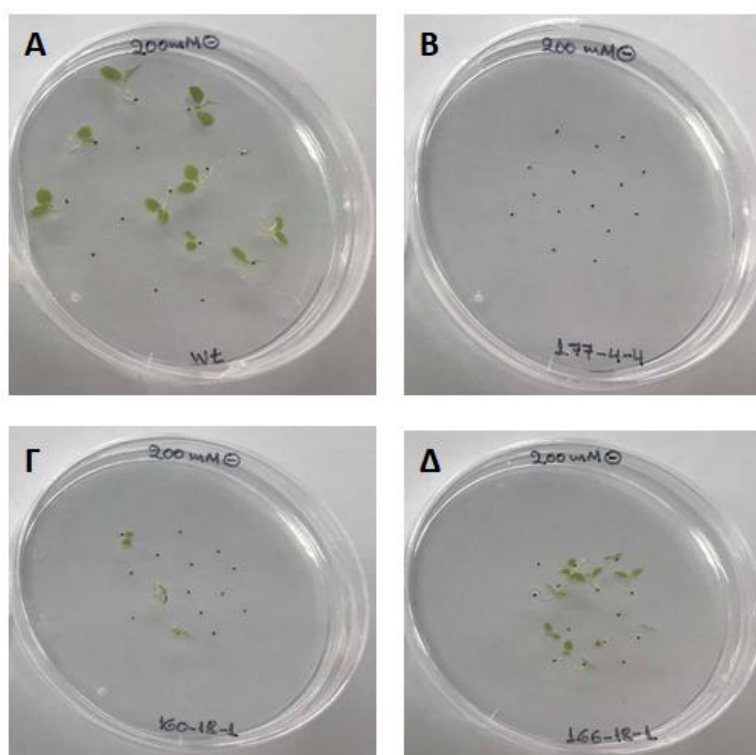
**Γράφημα 3.4** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης των σπόρων 6 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt), απουσίας αντιβιοτικού (υγρομυκίνη) ανά επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (C, 100mM NaCl και 200mM NaCl).

Στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (100 mM NaCl), σχεδόν όλες οι *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακές σειρές εμφάνισαν σαφή υπεροχή στην ανάπτυξη, που εκδηλώθηκε από την 10<sup>η</sup> ημέρα σε σχέση με τα WT φυτά, με εξαίρεση τη διαγονιδιακή σειρά 160-18-1 (Εικόνα 3.8).



**Εικόνα 3.8** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (100 mM NaCl), την 10<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α. WT, Β. 160-18-1, Γ. 166-18-1, Δ. 167-7-4, Ε. 169-10-1, ΣΤ. 169-7-2.

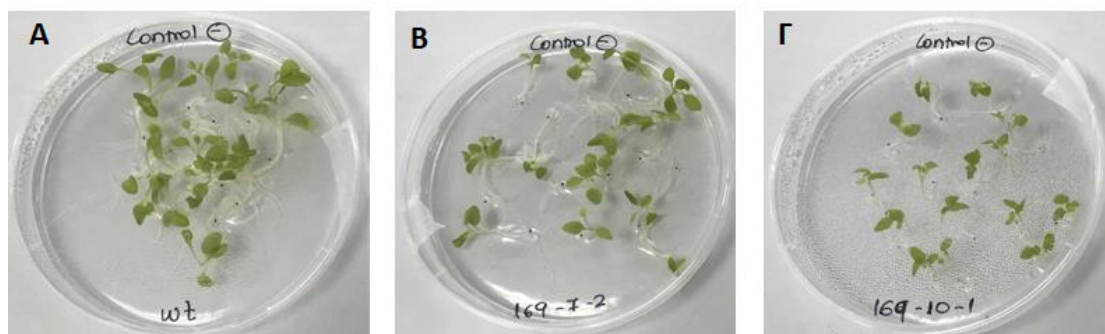
Τέλος, το υψηλό επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (200 mM NaCl) υπήρξε πλήρως ανασταλτικό της ανάπτυξης ορισμένων σειρών, όπως η 177-4-4 και 160-18-1, καθώς και με το πέρας της περιόδου λήψης παρατηρήσεων (17<sup>η</sup> μέρα) η ανάπτυξη υπήρξε σαφώς περιορισμένη, με κύριο χαρακτηριστικό των φυταρίων την έλλειψη ευρωστίας (Εικόνα 3.9).



**Εικόνα 3.9** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης αλατότητας (200 mM NaCl), την 17<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α. WT, Β. 177-4-4, Γ. 160-18-1, Δ. 166-18-1.

Παράλληλα, είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι η έκφραση της χαρπίνης *HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* στα διαγονιδιακά φυτά οδήγησε σε προαγωγή της ανάπτυξης των φυταρίων. Έτσι, οι *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές 169-7-2 και 169-10-1, πέραν του φαινοτύπου ανθεκτικότητας,

χαρακτηρίζονταν από αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και βελτιωμένη ευρωστία συγκριτικά τόσο με τα WT φυτά όσο και με τις υπόλοιπες *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές. Ο φαινότυπος αυτός αναδεικνύεται σε συνθήκες απουσίας καταπόνησης (Control), υποδεικνύοντας τη θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ* στην ανάπτυξη των φυτών (Εικόνα 3.10).



**Εικόνα 3.10** Θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* στην ανάπτυξη των σπορόφυτων των διαγονιδιακών σειρών 169-7-2 και 169-10-1 σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των σπορόφυτων αγρίου τύπου. Α. WT, Β. 169-7-2, Γ. 169-10-1.

### **3.3. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του φυτικού υλικού στην υδατική καταπόνηση (% PEG, D-mannitol)**

Η βλάστηση των σπόρων επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία των PEG και D-mannitol στο θρεπτικό μέσο βλάστησης, όπου στις περισσότερες περιπτώσεις η επίδραση της καταπόνησης υπήρξε ανάλογη με το εφαρμοζόμενο επίπεδο στρες (Πίνακας 3.3) (Γράφημα 3.5, 3.6).

Απουσία καταπόνησης, η έναρξη βλάστησης για το σύνολο των σειρών (WT και *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*) σημειώθηκε την 3<sup>η</sup> ημέρα, με τη σειρά 169-10-1 να φτάνει το 100%. Αντίστοιχα, το τελικό ποσοστό βλάστησης έφτασε το 100% για τις περισσότερες *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές, με εξαίρεση τις σειρές 166-18-1 και 169-6-4 που παρουσίασαν ποσοστό βλάστησης 96.7% (24<sup>η</sup> ημέρα) (Πίνακας 3.3) (Γράφημα 3.5, 3.6).

Αναφορικά με το χαμηλό επίπεδο υδατικής καταπόνησης με πολυαιθυλενική γλυκόλη (5 % PEG), το ποσοστό βλάστησης όλων των εξεταζόμενων σειρών κατά την 1<sup>η</sup> παρατήρηση ήταν υψηλό, με εξαίρεση τη σειρά 177-4-4 που εμφάνισε αδυναμία βλάστησης (ποσοστό 0 %). Ωστόσο, τα τελικά ποσοστά βλάστησης κατά την τελευταία

παρατήρηση δε διέφεραν μεταξύ των σειρών, καθώς παρουσίασαν όλες ποσοστό 100 % (Πίνακας 3.3) (Γράφημα 3.5, 3.6).

Εντούτοις, αυξανόμενου του επιπέδου καταπόνησης (100 mM και 200 mM D-man) σημειώθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων, με τις διαφορές που αφορούν κυρίως στο ρυθμό βλάστησης να μεγιστοποιούνται κατά τα αρχικά στάδια της καταπόνησης. Στα στάδια αυτά, περισσότερο πρόδηλα ήταν τα συμπτώματα καταπόνησης στο υψηλό επίπεδο στρες (200 mM D-man).

**Πίνακας 3.3** Ποσοστό βλάστησης (%) ανά γονότυπο και επίπεδο υδατικής καταπόνησης (% PEG και D-mannitol) την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup>, 18<sup>η</sup>, 21<sup>η</sup> και 24<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης.

Σειρά	Επίπεδο Υδατικής Καταπόνησης (% PEG, D-mannitol)			
	C	5% PEG	100mM D-man	200mM D-man
<i>04/12/2017</i>				
169-10-1	100%	100%	100%	100%
166-18-1	96.7%	86.7%	40%	0%
167-7-4	100%	93.3%	100%	13.3%
169-6-4	66.7%	100%	53.3%	13.3%
169-7-2	93.3%	100%	86.7%	73.3%
177-4-4	0%	0%	0%	0%
169-7-5	93.3%	86.7%	86.7%	26.7%
WT	100%	100%	100%	20%
<i>07/12/2017</i>				
169-10-1	100%	100%	100%	100%
166-18-1	96.7%	100%	100%	93.3%
167-7-4	100%	100%	100%	100%
169-6-4	96.7%	100%	66.7%	93.3%
169-7-2	100%	100%	100%	100%
177-4-4	80%	86.7%	60%	6,7%
169-7-5	86.7%	93.3%	100%	100%
WT	100%	100%	100%	100%
<i>10/12/2017</i>				
169-10-1	100%	100%	100%	100%
166-18-1	96.7%	100%	100%	100%
167-7-4	100%	100%	100%	100%
169-6-4	96.7%	100%	73.3%	93.3%
169-7-2	100%	100%	100%	100%

177-4-4	86.7%	86.7%	80%	60%
169-7-5	100%	100%	100%	100%
WT	100%	100%	100%	100%
<i>13/12/2017</i>				
169-10-1	100%	100%	100%	100%
166-18-1	96.7%	100%	100%	100%
167-7-4	100%	100%	100%	100%
169-6-4	96.7%	100%	80%	93.3%
169-7-2	100%	100%	100%	100%
177-4-4	86.7%	90%	80%	93.3%
169-7-5	100%	100%	100%	100%
WT	100%	100%	100%	100%
<i>16/12/2017</i>				
169-10-1	100%	100%	100%	100%
166-18-1	96.7%	100%	100%	100%
167-7-4	100%	100%	100%	100%
169-6-4	96.7%	100%	80%	100%
169-7-2	100%	100%	100%	100%
177-4-4	100%	100%	80%	93.3%
169-7-5	100%	100%	100%	100%
WT	100%	100%	100%	100%
<i>19/12/2017</i>				
169-10-1	100%	100%	100%	100%
166-18-1	96.6%	100%	100%	100%
167-7-4	100%	100%	100%	100%
169-6-4	96.6%	100%	80%	100%
169-7-2	100%	100%	100%	100%
177-4-4	100%	100%	80%	93.3%
169-7-5	100%	100%	100%	100%
WT	100%	100%	100%	100%
<i>22/12/2017</i>				
169-10-1	100%	100%	100%	100%
166-18-1	96.7%	100%	100%	100%
167-7-4	100%	100%	100%	100%
169-6-4	96.7%	100%	80%	100%
169-7-2	100%	100%	100%	100%
177-4-4	100%	100%	80%	100%
169-7-5	100%	100%	100%	100%
WT	100%	100%	100%	100%
<i>25/12/2017</i>				
169-10-1	100%	100%	100%	100%

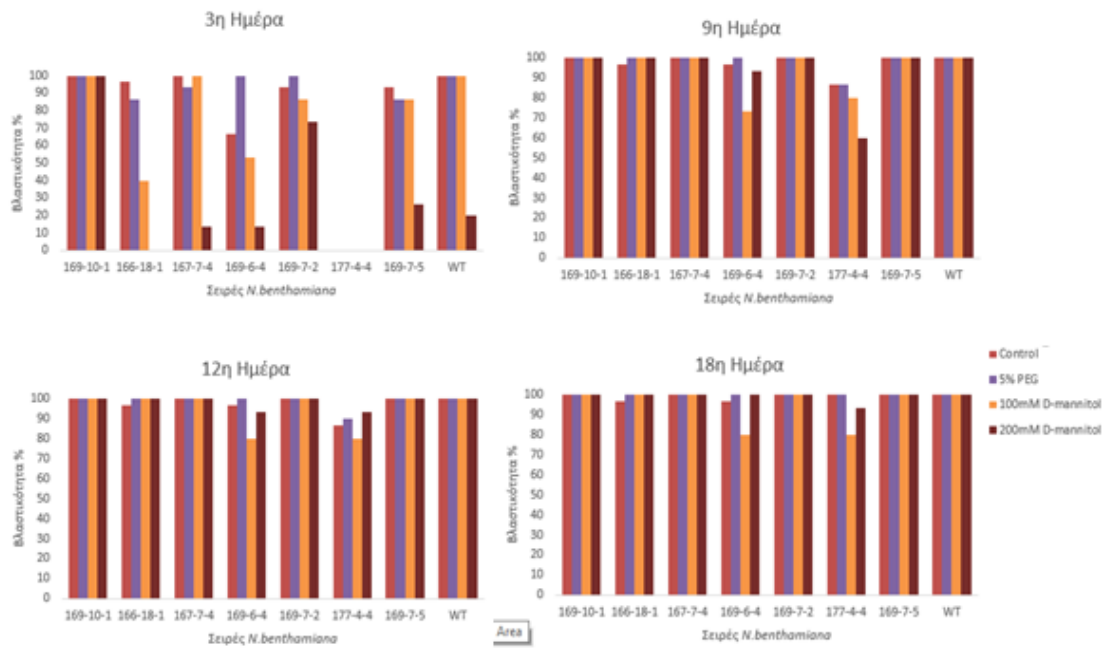


166-18-1	96.7%	100%	100%	100%
167-7-4	100%	100%	100%	100%
169-6-4	96.7%	100%	80%	100%
169-7-2	100%	100%	100%	100%
177-4-4	100%	100%	80%	100%
169-7-5	100%	100%	100%	100%
WT	100%	100%	100%	100%

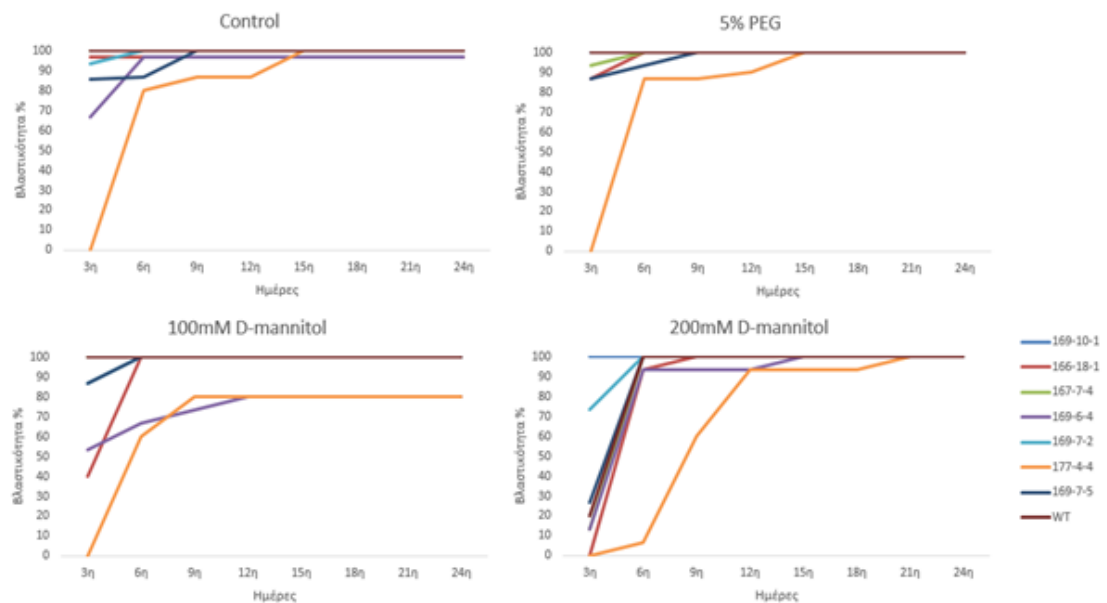
Στο μεσαίο επίπεδο καταπόνησης (100 mM D-man), το ποσοστό βλάστησης των διαγονιδιακών σειρών 169-10-1 και 167-7-4 έφτασε το 100 % την 3<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης (1<sup>η</sup> παρατήρηση). Κατά το στάδιο αυτό, υψηλό δυναμικό βλάστησης, στο ίδιο επίπεδο καταπόνησης, επέδειξαν και οι σειρές 169-7-2 και 169-7-5, ενώ οι διαγονιδιακές σειρές 166-18-1 και 177-4-4 σημείωσαν το χαμηλότερο ποσοστό βλάστησης (ποσοστό 40 % και 0 %, αντίστοιχα). Με την πάροδο του χρόνου, οι διαφορές στο ποσοστό βλάστησης αμβλύθηκαν, με τις σειρές 169-6-4 και 177-4-4 να παρουσιάζουν τη χαμηλότερη επίδοση καθόλη της διάρκεια λήψης παρατηρήσεων (Πίνακας 3.3) (Γράφημα 3.5, 3.6).

Αναφορικά με το μέγιστο επίπεδο καταπόνησης (200mM D-man), είναι εμφανώς έκδηλη η δραστηκότητα του περιοριστικού παράγοντα, ειδικά κατά τα πρώτα στάδια της καταπόνησης. Στα στάδια αυτά, ήταν σαφής η υπεροχή της σειράς 169-10-1, η οποία στη συγκέντρωση και των 200 mM D-man, επέδειξε ποσοστό βλάστησης 100% την 3<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης (1<sup>η</sup> παρατήρηση).

Αντίθετα, τη χειρότερη επίδοση κατά τα πρώτα στάδια της καταπόνησης εμφάνισε η σειρά 177-4-4, η οποία ωστόσο με την πάροδο του χρόνου έφτασε σε ποσοστό βλάστησης 100 %. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η υδατική καταπόνηση στα υπό μελέτη επίπεδα στρες επηρεάζει σημαντικά το ρυθμό βλάστησης των σπόρων, χωρίς ωστόσο να επιφέρει σημαντικές διαφορές στο τελικό ποσοστό βλάστησης (Γράφημα 3.5, 3.6).



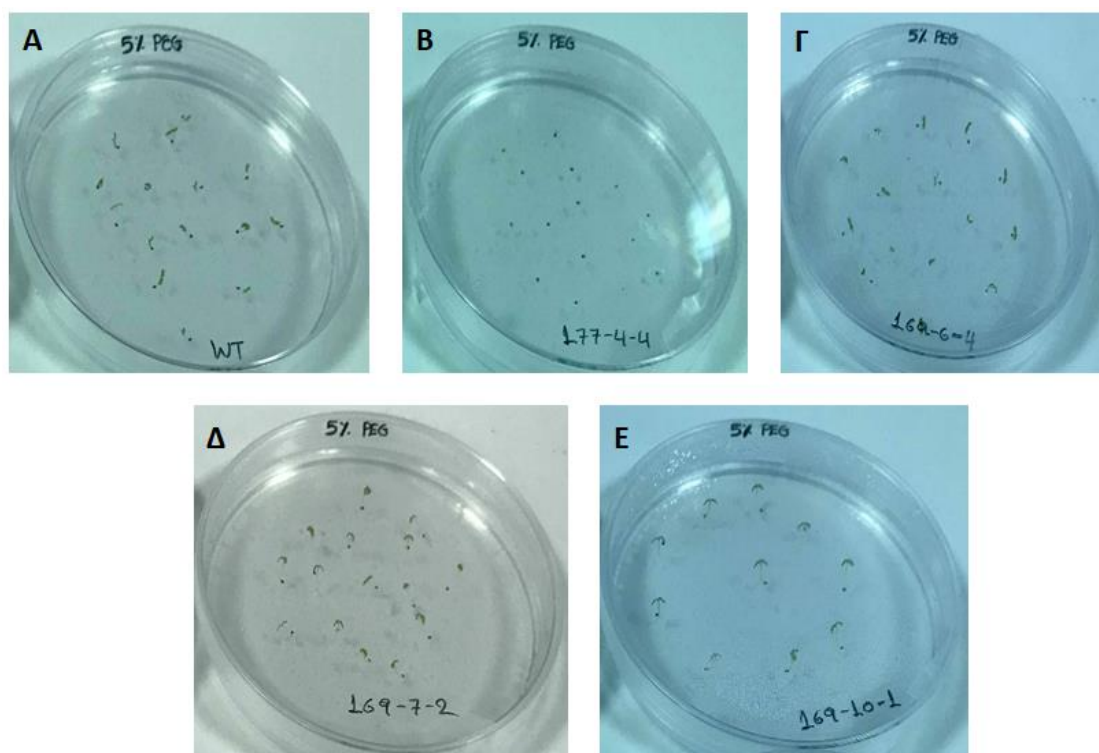
**Γράφημα 3.5** Ποσοστό βλάστησης των σπόρων 7 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ως απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα υδατικής καταπόνησης (C, 50 μM, 100 μM και 200 μM), ανά ημέρα καταπόνησης (3<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup> και 18<sup>η</sup>).



**Γράφημα 3.6** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης των σπόρων 7 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ανά επίπεδο υδατικής καταπόνησης (C, 5% PEG, 100 mM D-mannitol και 200 mM D-mannitol).

Πέρα από το ποσοστό βλάστησης των σειρών, αξιολογήθηκε παράλληλα και ο ρυθμός ανάπτυξης των σποροφύτων και η αντίδρασή τους στην επίδραση του περιοριστικού παράγοντα. Έτσι, ενώ στα τριβλία με τη μηδενική συγκέντρωση (Control) σημειώθηκε απρόσκοπτη ανάπτυξη και τα φυτάρια παρουσίαζαν υψηλή ευρωστία, με την αύξηση του επιπέδου καταπόνησης, έγινε ευδιάκριτη η αναστολή της ανάπτυξης και η μείωση της ευρωστίας.

Αναφορικά με το χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (5% PEG), οι *hrpZ<sub>psph</sub>*-διαγονιδιακές σειρές 169-10-1, 169-6-4 και 169-7-2 εμφάνισαν σαφή υπεροχή στην ανάπτυξη, που ήταν έκδηλη από την 3<sup>η</sup> ημέρα, σε σχέση με τις υπόλοιπες *hrpZ<sub>psph</sub>*-σειρές (Εικόνα 3.11).

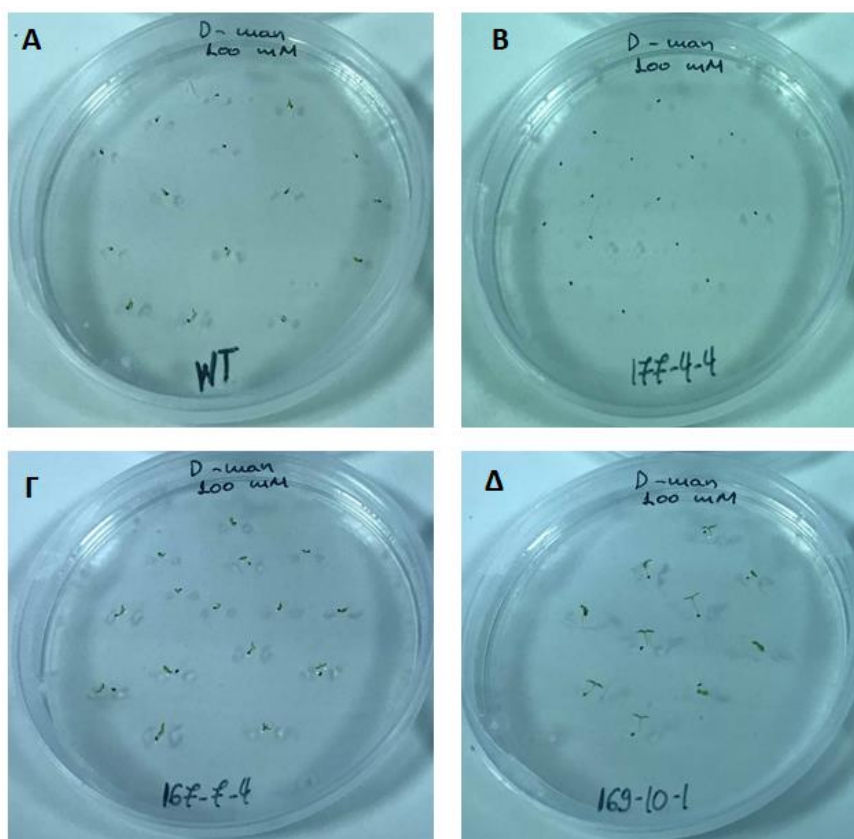


**Εικόνα 3.11** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>psph</sub>*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο χαμηλό επίπεδο υδατικής καταπόνησης με πολυαιθυλενική γλυκόλη (5% PEG), την 3<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α. WT, Β. 177-4-4, Γ. 169-6-4, Δ. 169-7-2, Ε. 169-10-1.

Ωστόσο, στο μέτριο επίπεδο καταπόνησης (100mM D-man), από την πρώτη κιόλας παρατήρηση (3<sup>η</sup> ημέρα), οι σειρές 169-10-1 και 167-7-4 παρουσίασαν υπεροχή ανάπτυξης συγκριτικά με τα WT αλλά και με τις υπόλοιπες *hrpZ<sub>psph</sub>*-σειρές (Εικόνα

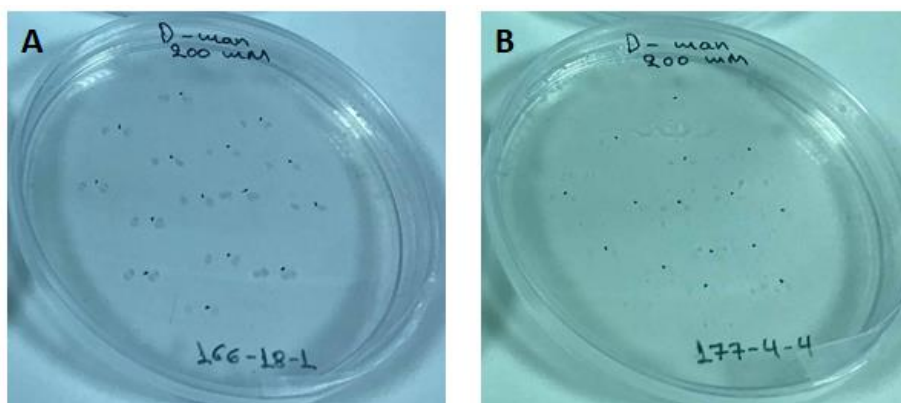
3.12). Η παρατηρηθείσα ικανότητα ανάπτυξης των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρών 169-10-1 και 167-7-4, σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης (5% PEG και 100 mM D-man), παρατηρείται έως και τη λήξη λήψεως των παρατηρήσεων.

Αξιοσημείωτη είναι η ικανότητα και των δύο σειρών σχετικά με τη διατήρηση της χλωροφύλλης και στα δύο προαναφερθέντα επίπεδα καταπόνησης, αν και στα 100 mM D-man η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη παρουσιάζει μία μικρή μείωση. Αναφορικά με τις υπόλοιπες σειρές που εξετάστηκαν, η ανάπτυξη τους κρίθηκε μειωμένη από εκείνη των δύο προαναφερθέντων *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρών στα αντίστοιχα επίπεδα καταπόνησης κατά τα πρώτα στάδια της καταπόνησης. Αντίθετα, στα τελικά ποσοστά βλάστησης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπό μελέτη σειρών.



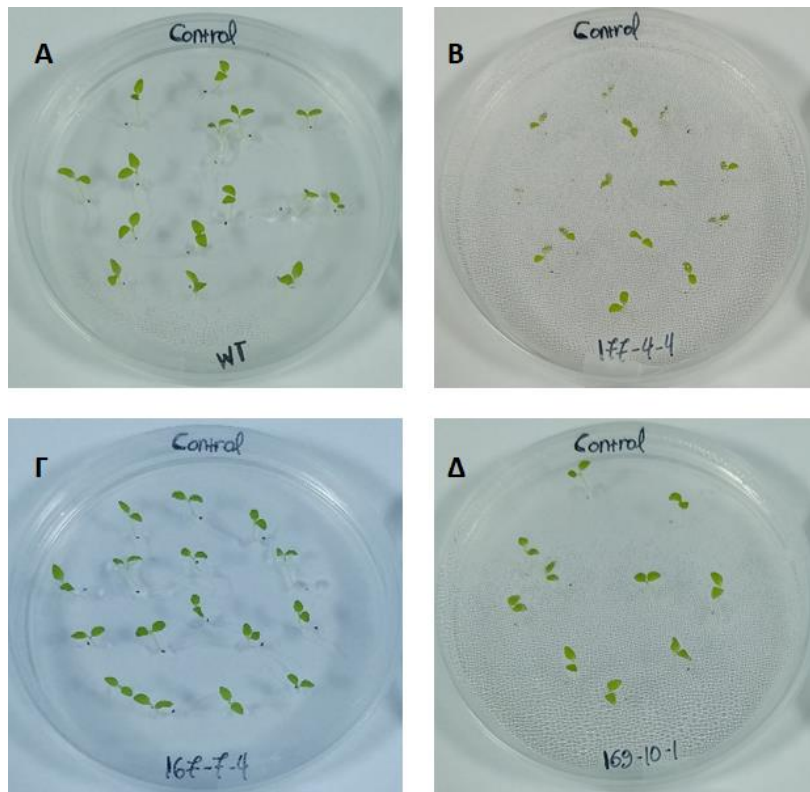
**Εικόνα 3.12** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο μεσαίο επίπεδο υδατικής καταπόνησης (100mM), την 3<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α. WT, Β. 177-4-4, Γ. 167-7-4, Δ. 169-10-1.

Τέλος, η συγκέντρωση των 200mM D-man σε ορισμένες σειρές υπήρξε πλήρως ανασταλτική της ανάπτυξής τους κατά την 3<sup>η</sup> μέρα από την έναρξη της καταπόνησης (Εικόνα 3.13).



**Εικόνα 3.13** Αναστολή ανάπτυξης των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-διαγονιδιακών σειρών 166-18-1 και 177-4-4 στο υψηλό επίπεδο υδατικής καταπόνησης (200 mM D-man), την 3<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. A. 166-18-1, B. 177-4-4.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων καταπόνησης υψηλής αλατότητας, η έκφραση της χαρπίνης *HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* στα διαγονιδιακά φυτά οδήγησε σε προαγωγή της ανάπτυξης των φυταρίων. Έτσι, οι *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές 167-7-4 και 169-10-1, πέραν του φαινότυπου ανθεκτικότητας, χαρακτηρίζονταν από αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και βελτιωμένη ευρωστία συγκριτικά τόσο με τα WT φυτά όσο και με τις υπόλοιπες *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές. Ο φαινότυπος αυτός αναδεικνύεται σε συνθήκες απουσίας καταπόνησης (Control), υποδεικνύοντας τη θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ* στην ανάπτυξη των φυτών (Εικόνα 3.14).



**Εικόνα 3.14** Θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* στην ανάπτυξη των σπορόφυτων των διαγονιδιακών σειρών 167-7-4 και 169-10-1 σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των σπορόφυτων αγρίου τύπου (WT) και της σειράς 177-4-4 κατά την 9<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α. WT, Β. 177-4-4, Γ. 167-7-4, Δ. 169-10-1.

## 4. Συζήτηση

---

Είναι πλέον γνωστό ότι οι χαρπίνες, που προέρχονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια, κατά την ενδογενή έκφρασή τους ή την εξωγενή εφαρμογή τους σε φυτά, έχουν την ικανότητα επαγωγής μηχανισμών άμυνας, προσδίδοντας ποικίλου βαθμού ανθεκτικότητα σε βιοτικούς ή/και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Η επιτευχθείσα ανθεκτικότητα συχνά συνδέεται με την ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευασθησίας (HR, Hypersensitive Response). Η ανακάλυψη αυτή έχει οδηγήσει στην αξιοποίησή τους ως φυτοπροστατευτικές ουσίες έναντι πληθώρας παθογόνων (Strobel et al. 1996; Dong et al. 1999; Peng et al. 2003; Liu et al. 2006; Ren et al. 2006), εντόμων (Dong et al. 2004), αλλά και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης, όπως η ξηρασία (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2007; Tampakaki et al. 2010) και η αλατότητα (Ren et al. 2006).

Σε προηγούμενες μελέτες, αναφέρεται ότι η χαρπίνη HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, που προέρχεται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, προσδίδει ανθεκτικότητα στον ιό *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), ο οποίος ευθύνεται για την ασθένεια της ριζομανίας των ζαχαροτεύτλων (Pavli et al. 2011; 2012). Συγκεκριμένα, πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι η ενδογενής έκφραση της HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>) ώστε να κατευθύνεται η συσσώρευση της πρωτεΐνης εξωκυτταρικά (Tampakaki and Panopoulos 2000), οδηγεί σε επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι της ριζομανίας τόσο σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* όσο και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλων (Pavli et al. 2011). Επιπλέον, άλλες μελέτες υπογραμμίζουν τη δυνατότητα της SP/HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> να επάγει ανθεκτικότητα στον ιό του μωσαικού του καπνού (TMV) και του βακτηρίου *P. syringae* pv. tomato στο είδος *N. benthamiana* (Μητσοπούλου 2016).

Δεδομένης της ικανότητας της HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> να προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι ποικίλων παραγόντων βιοτικής καταπόνησης, όπως ιοί και βακτήρια, στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* σε διαγονιδιακά φυτά του φυτού-μοντέλου *N. benthamiana* αναφορικά με την ανθεκτικότητά τους σε αβιοτικές καταπονήσεις. Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα εργασία πραγματεύτηκε την μελέτη της απόκρισης *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και

υψηλής αλατότητας, καταπονήσεις οι οποίες συνιστούν βασικούς περιοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των ευαίσθητων καλλιεργούμενων φυτικών ειδών.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά αξιολογήθηκαν οι διαθέσιμες διαγονιδιακές σειρές (T<sub>2</sub>) ως προς την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* και οι ομοζύγωτες σειρές που επιλέχθηκαν, αποτέλεσαν το γενετικό υλικό για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. Η αξιολόγηση βασίστηκε στην εκτίμηση του δυναμικού βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των νεαρών σποροφύτων σε θρεπτικό μέσο που περιείχε τους κατά περίπτωση κατάλληλους παράγοντες καταπόνησης ξηρασίας και αλατότητας. Ειδικότερα, η απόκριση των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρών μελετήθηκε σε τρία επίπεδα καταπόνησης υψηλής αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl) και τέσσερα επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (0, 5 % PEG, 100, 200 mM D-mannitol). Σε όλες τις περιπτώσεις, οι *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές αξιολογήθηκαν συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου (WT).

Κατά την καταπόνηση υψηλής αλατότητας, η βλάστηση των σπόρων επηρεάστηκε σημαντικά από το εφαρμοζόμενο στρες, με την επίδραση στις περισσότερες περιπτώσεις να είναι ανάλογη του επιπέδου καταπόνησης. Στην περίπτωση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας, η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έγινε με δύο τρόπους: παρουσία και απουσία του αντιβιοτικού επιλογής (υγρομυκίνη) για το διαγονίδιο *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*. Παρά το γεγονός ότι στις υπό αξιολόγηση σειρές είχε προηγουμένως επιβεβαιωθεί τόσο η διαγονιδιακή τους φύση όσο και η ομοζυγωτία για το *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, είναι αξιοσημείωτο ότι το αντιβιοτικό αποτέλεσε περιοριστικό παράγοντα για τη βλάστηση των σπόρων καθώς και την ανάπτυξη των σποροφύτων. Συγκεκριμένα, η πίεση επιλογής, λόγω του αντιβιοτικού, φάνηκε να επιδρά αρνητικά στο ρυθμό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων.

Παρουσία του αντιβιοτικού, το ποσοστό βλάστησης των σπόρων στο χαμηλό επίπεδο στρες αλατότητας (100 mM NaCl) ήταν υψηλό, χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρών. Ωστόσο, στο υψηλό επίπεδο στρες αλατότητας (200 mM NaCl) σημειώθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων. Στο επίπεδο αυτό, η *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρά 169-10-1 υπερέιχε έναντι των άλλων, φτάνοντας σε ποσοστό βλάστησης 93.3 %. Ικανοποιητικό δυναμικό βλάστησης στο



ίδιο επίπεδο καταπόνησης παρουσίασαν επίσης οι σειρές 177-4-4 και 169-7-2. Σχετικά με το ρυθμό ανάπτυξης των σποροφύτων και τη γενικότερη απόκρισή τους στην επίδραση του περιοριστικού παράγοντα, ήταν εμφανής η δυσμενής επίδραση του NaCl (παρουσία υγραμκίνης). Έτσι, ενώ στους μάρτυρες (0 mM NaCl) σημειώθηκε απρόσκοπτη ανάπτυξη και υψηλή ευρωστία, με την αύξηση του επιπέδου καταπόνησης έγινε ευδιάκριτη η παρεμπόδιση της ανάπτυξης, η οποία, όπως αναμενόταν, ήταν περισσότερο έντονη στο υψηλό επίπεδο στρες (200 mM NaCl). Συγκεκριμένα, οι σειρές που επέδειξαν σαφή υπεροχή στην ανάπτυξη έναντι των υπολοίπων ήταν οι 169-10-1, 169-7-2 και 167-7-4 και η σειρά 169-10-1 στο χαμηλό (100 mM NaCl) και υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl) αντίστοιχα.

Αντιστοίχως, κατά την καταπόνηση υψηλής αλατότητας απουσία του αντιβιοτικού επιλογής, το ποσοστό βλάστησης των σπόρων στο χαμηλό επίπεδο στρες (100 mM NaCl) όλων των εξεταζόμενων σειρών υπήρξε υψηλό, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σειρών. Στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης αντιθέτως (200 mM NaCl), παρατηρήθηκε εμφανής μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής, υπεροχή εμφάνισε η διαγονιδιακή σειρά 169-10-1 με ποσοστό βλάστησης 100 % και ακολούθησε η 166-18-1 με ποσοστό βλάστησης 73.3 %. Αναφορικά με την ανάπτυξη των φυταρίων και τη γενικότερη συμπτωματολογία της καταπόνησης, η δυσμενής επίδραση του NaCl υπήρξε εμφανής. Έτσι, ενώ τα φυτά-μάρτυρες παρουσίασαν απρόσκοπτη ανάπτυξη και χαρακτηρίζονταν από αυξημένη ευρωστία, η αυξανόμενη συγκέντρωση του στρες συνοδεύτηκε από σαφή περιορισμό στην ανάπτυξη. Στο χαμηλό επίπεδο στρες (100 mM NaCl), την καλύτερη επίδοση παρουσίασαν οι διαγονιδιακές σειρές 169-10-1, 169-7-2, 167-7-4, 166-18-1 καθώς και τα αγρίου τύπου φυτά, ενώ στο υψηλό επίπεδο στρες (200 mM NaCl) υπεροχή έναντι των υπολοίπων εμφάνισε η σειρά 169-10-1.

Αναφορικά με την υδατική καταπόνηση, η βλάστηση των σπόρων επηρεάστηκε σημαντικά από το εφαρμοζόμενο στρες, με την επίδραση στις περισσότερες περιπτώσεις να είναι ανάλογη του επιπέδου καταπόνησης. Ειδικότερα, στο χαμηλό επίπεδο στρες με πολυαιθυλενική γλυκόλη (5 % PEG), το ποσοστό βλάστησης των σπόρων ήταν υψηλό χωρίς να παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των σειρών, με ποσοστό βλάστησης σε όλες τις υπό μελέτη σειρές να είναι της τάξης του 100 %. Επιπλέον, στο μέτριο και υψηλό επίπεδο καταπόνησης με μαννιτόλη (100 mM και 200

mM D-man) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων, με εμφανείς διαφορές στο ρυθμό βλάστησης και περισσότερα πρόδηλα συμπτώματα στο υψηλό επίπεδο στρες. Στο σύνολό τους, τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η καταπόνηση της ξηρασίας στα εν λόγω επίπεδα στρες επηρεάζει σημαντικά το ρυθμό βλάστησης των σπόρων.

Σε παρόμοιο επίπεδο κυμάνθηκε και η ανάπτυξη των σπορόφυτων καθώς και η συμπτωματολογία της υδατικής καταπόνησης, επιβεβαιώνοντας τη δυσμενή επίδραση των συγκεκριμένων επιπέδων στρες. Αν και στους μάρτυρες (0 mM D-man) τα φυτάρια παρουσίασαν ομαλή ανάπτυξη και υψηλή ευρωστία, με την αύξηση του επιπέδου καταπόνησης σημειώθηκε αναστολή της ανάπτυξης και μείωση της ευρωστίας, συνοδευόμενη με διαταραχή στη διατήρηση της χλωροφύλλης. Συνολικά, καλύτερη απόκριση στην υδατική καταπόνηση υπέδειξε η διαγονιδιακή σειρά 169-10-1.

Αξιοσημείωτη είναι η θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* στην ανάπτυξη ορισμένων διαγονιδιακών σειρών σε συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. Συγκεκριμένα, στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας, οι σειρές 169-10-1, 169-7-2 και 167-7-4 παρουσίασαν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και βελτιωμένη ευρωστία συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου και τις υπόλοιπες *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σειρές. Ανάλογη υπεροχή επαληθεύτηκε και στην υδατική καταπόνηση από στις σειρές 169-10-1 και 167-7-4. Ο διαφορετικός φαινότυπος των φυτών τόσο σε επίπεδο ανθεκτικότητας όσο και σε επίπεδο ανάπτυξης πιθανότατα αποτυπώνεται στο αποτέλεσμα της διαφορετικής θέσης ένθεσης του διαγονιδίου *hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, καθώς οι σειρές 167 και 169 συγκροτούν διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού. Σύμφωνα με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, στο επίπεδο αυτό, σημειώνεται ότι, έχει αποδειχθεί ότι οι διαφορετικές σειρές εκφράζουν διαφορετικά γονίδια που σχετίζονται με μονοπάτια άμυνας έναντι καταπονήσεων, όπως αυτά της αντίδρασης υπερευαισθησίας, της σύνθεσης ενεργών μορφών οξυγόνου (AOS), του ιασμονικού οξέος (JA), του σαλικυλικού οξέος (SA) και πρωτεϊνών παθογένεσης (PR) (Pavli et al. 2011).

Κατά την έκθεση ενός φυτού σε αβιοτικές καταπονήσεις, παρατηρείται διαταραχή της κανονικής λειτουργίας των μηχανισμών των φυτών. Υπό τις συνθήκες αυτές, τα φυτά υπόκεινται σε αλλαγές σε μορφολογικό, φυσιολογικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο. Η απόκριση των φυτών στις καταπονήσεις γενικά εναπόκειται σε πλήθος παραγόντων,

όπως είναι το περιβάλλον, ο γονότυπος, το στάδιο ανάπτυξης, η σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ γονοτύπου και περιβάλλοντος καθώς και οι υπάρχοντες στο φυτό μηχανισμοί άμυνας, είτε αυτοί είναι δομικοί είτε είναι επαγόμενοι από τις επικρατούσες καταπονήσεις. Η αντιμετώπιση του παράγοντα καταπόνησης περιλαμβάνει μία σειρά αντιδράσεων σε μοριακό επίπεδο που αποσκοπούν στην αντίληψη του ερεθίσματος, τη μεταφορά του σήματος και την επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση πρωτεϊνών ή άλλων μορίων άμυνας. Στο πλαίσιο αυτό, οι βελτιωτικές προσπάθειες επικεντρώνονται στην επιλογή γονοτύπων που υπερέχουν ως προς την απόκρισή τους στις καταπονήσεις. Στη βάση αυτή, οι τεχνολογίες της γενετικής μηχανικής, μέσω της ενσωμάτωσης γονιδίων ποικίλης προέλευσης αποσκοπούν στην παραγωγή πρωτεϊνών ή/και δευτερογενών μεταβολιτών με ρόλους που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών. Προς αυτή την κατεύθυνση, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν πρόσθετες ενδείξεις ότι η ενδογενής έκφραση της *HrpZ<sub>PspH</sub>* μπορεί να αξιοποιηθεί για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας σε παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης, και συγκεκριμένα ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν τη δυνατότητα αξιοποίησής της, και πιθανότατα και άλλων πρωτεϊνών που ανήκουν στην κατηγορία των χαρπινών, ως μία αξιολογη στρατηγική για την επίτευξη ευρείας ανθεκτικότητας αλλά και προηγμένης ανάπτυξης και ευρωστίας.

Παρά το γεγονός ότι τα μέχρι τώρα δεδομένα υποδεικνύουν τη θετική επίδραση της *HrpZ<sub>PspH</sub>* σε σχέση με την άμυνα των φυτών, πρέπει να σημειωθεί ότι η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων απαιτεί την αξιολόγηση των *hrpZ<sub>PspH</sub>*-σειρών σε πειράματα που προσομοιάζουν τις συνθήκες αγρού. Η αξιολόγηση του δυναμικού βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σπορόφυτων υπό συνθήκες καταπόνησης αποτελεί μία πρακτική που χρησιμοποιείται ευρέως σε πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας, καθώς προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης της απόκρισης ενός μεγάλου αριθμού γονοτύπων σε περιοριστικούς παράγοντες ενδιαφέροντος υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Ωστόσο, σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι δε λαμβάνονται υπόψη οι σχέσεις αλληλεπίδρασης των συγκεκριμένων καταπονήσεων με άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

## 5. Βιβλιογραφία

---

### Ξένη βιβλιογραφία

- ✚ Acquaah, G. (2007). Principles of plant genetics and breeding. Blackwell, Oxford, UK.
- ✚ Alfano, J.R., Collmer, A. (1997). The type III (hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J. Bacteriol.* 179: 5655-5662.
- ✚ Allen, R.D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107:1049–1054.
- ✚ Almansouri, M., Kinet, J.M., Lutts, S. (2001). Effect of salt osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil*, 231, 243–254.
- ✚ Ashraf, M., McNeilly, T., Bradshaw, A.D. (1987). Selection and heritability of tolerance to sodium chloride in four forage species. *Crop Science*, 227, 232–234.
- ✚ Ashraf, M. (2004). Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora*, 199, 361–376.
- ✚ Bartels, D., Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 24:23–58.
- ✚ Beard, J.B., Sifers, S.I. (1997). Genetic diversity in dehydration avoidance and drought resistance within the *Cynodon* and *Zoysia* species. *Int Turfgrass Soc Res J* 8:603–610.
- ✚ Beck, E.H., Heim, R., Hansen, J. (2004). Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *J Biosci* 29:449–459.
- ✚ Bennett, M. D., and Leitch, I. J. (1995). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.* 76:113-176.
- ✚ Bewley, J.D., Black, M. (1982). Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination, Vol 2. Springer, Berlin, Germany, pp 1399–1401.
- ✚ Boyer, J.S. (1982). Plant Productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- ✚ Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F-W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Francia, E., Mare, C., Tondelli, A., Stanca, A.M. (2008). Drought tolerance

improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res* 105:1–14.

- ✚ Chen, L., Zhang, S.-J., Zhang, S.-S., Qu, S., Ren, X., Long, J., Yin, Q., Qian, J., Sun, F., Zhang, C., Wang, L., Wu, X., Wu, T., Zhang, Z., Cheng, Z., Hayes, M., Beer, S. V. and Dong, H. (2008). A fragment of the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* harpin HpaGXooc reduces disease and increases yield of rice in extensive grower plantings. *Phytopathology* 98, 792-802.
- ✚ Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci* 12:444–451.
- ✚ Close, T.J., R.D. Fenton, A., Yang, R., Asghar, D.A., DeMason, D.E., Crone, N.C., Meyer, F., Moonan (1993). Dehydrin: The protein. *Current Topics in Plant Physiol* 10:104-118.
- ✚ Cushman, J.C., Bohnert, H.J. (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol* 3:117–124.
- ✚ Debat, V., and David, P. (2001). Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends Ecol. Evol.* 16:555-561.
- ✚ Dong, H.-S., Delaney, T.P., Bauer, D.W., and Beer, S.V. (1999). Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *Plant J.* 20, 207-215.
- ✚ Dong, H.P., Peng, J., Bao, Z., Meng, X., Bonasera, J.M., Chen, G., Beer, S.V. and Dong, H. (2004). Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated *Arabidopsis* growth and insect defense. *Plant Physiol.* 136, 3, 3628-38.
- ✚ Dong, H.P., Yu, H., Bao, Z., Guo, X., Peng, J., Yao, Z., Chen, G., Qu, S., Dong, H. (2005). The ABI2-dependent abscisic acid signaling controls HrpN-induced drought tolerance in *Arabidopsis*. *Planta.* 221: 313–27.
- ✚ Ehret, D.L., Plant, A.L. (1999). Salt tolerance in crop plants. In: Dhaliwal G. S., Arora R. (Eds), *Environmental stress in crop plants*. Commonwealth Publishers, New Delhi, India, pp 69–120.
- ✚ FAO (Food, Agriculture Organization of the United Nations) (2004). *FAO production yearbook*. FAO, Rome.
- ✚ FAO (2009b). *FAO land and plant nutrition management service*. [www.fao.org/ag/agl/agll/spush/](http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/).

- ✚ FAO (2009c). Food and Agriculture Organisation of the United Nations. [www.fao.org/askfao/topicsList.do?mainAreaId=20263](http://www.fao.org/askfao/topicsList.do?mainAreaId=20263).
- ✚ Flowers, T.J., Yeo, A.R. (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants—where next? *Austr J Plant Physiol* 22:875–884.
- ✚ Flowers, T.J., Flowers, S.A. (2005). Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agr Water Manag* 78:15–24.
- ✚ Fowler, D.B., Limin, A.E., Wang, S.Y., Ward, R.W. (1996). Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. *Can J Plant Sci* 76:37–42.
- ✚ Ghassemi, F., Jakeman, A.J., Nix, H.A. (1995). Salinisation of land and water resources. Human causes, extent management & case studies. University of New South Wales, Sydney, Australia.
- ✚ Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A. and Lommel, S. A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* 21, 8, 1015–1026.
- ✚ Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 463–499.
- ✚ Hasunuma, T., Miyazawa, S., Yoshimura, S., Shinzaki, Y., Tomizawa, K., Shindo, K., Choi, S.K., Misawa, N. and Miyake, C. (2008). Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. *Plant J.*, 55, 857-868.
- ✚ He, S.Y., Huang, H.C., Collmer, A. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpins: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73: 1255-1266.
- ✚ He, S.Y., Yoshiaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Salkano, K. (1998). Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension- cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitoheptaose. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 1167-1174.
- ✚ Ingram, J., Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:377–403.
- ✚ Jang, Y-S., Sohn, S-I., Wang, M-H. (2006). The hrpN gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Planta.* 223: 449-456.

- ✚ Jenks, M.A., Hasegawa, I., Mohan, P.M., Jain, S. (eds) (2007). Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- ✚ Jiang, Q.W., Kiyoharu, O., Ryoza, I. (2002). Two novel mitogen-activated protein signalling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in rice. *Plant Physiol* 129:1880–1891.
- ✚ Kalberer, S.R., Wisniewski, M., Arora, R. (2006). Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: current understanding and emerging concepts. *Plant Sci* 171:3–16.
- ✚ Karamanos, A. (2009). Possible effects of climate change on crop-weed interactions, 2<sup>nd</sup> International Conference on “Novel and Sustainable Weed Management in Arid and Semi-arid Agroecosystems” (Santorini, Greece), [www.ewrs.org/arid/Santorini.asp](http://www.ewrs.org/arid/Santorini.asp).
- ✚ Khajeh, H.M., Powell, A.A., Bingham, I.J. (2003). The interaction between salinity stress and seed vigor during germination of soya bean seeds. *Seed Science Technology*, 31, 715–725.
- ✚ Khan, M.A., Gulzar, S. (2003). Germination responses of *Sporobolus ioclados*: a saline desert grass. *Journal of Arid Environments*, 53, 387–394.
- ✚ Kim, J.F. and Beer, S.V. (2000). *hrp genes and harpins of Erwinia amylovora: a decade of discovery*. In: Vanneste, J.L. (Ed.) *Fire Blight and its Causative Agent, Erwinia amylovora*. CAB International, UK, Wallingford, pp. 141–162.
- ✚ Klaus, S. M. J., Huang, F-C, Eibl, C., Koop, H-U, Golds, T.J. (2003). Rapid and Proven Production of Transplastomic Tobacco Plants by Restoration of Pigmentation and Photosynthesis. *Plant J.* 35(6), 811-821.
- ✚ Knight, H. (2000). Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol* 195:269–324.
- ✚ Levitt, J. (1980). *Responses of Plants to Environmental Stresses*, Vol. 1, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, New York.
- ✚ Li, M.C. (2007). Type III Secretion System of Phytopathogenic Bacterium *Pseudomonas syringae*: From Gene to Function. Academic Dissertation. Department of Biological and Environmental Sciences. Division of General Microbiology. Faculty of Biosciences and Graduate School in Biotechnology and Molecular Biology (GSBM) University of Helsinki. (pg. 31).

- ✚ Li, J.G., Liu, H.X., Chen, L.F., Gu, C., Allen, C., Guo, J-H. (2010). PopW of *Ralstonia solanacearum*, a new two-domain harpin targeting the plant cell wall. *Mol. Plant. Pathol.* 11(3): 371-381.
- ✚ Lichtenthaler I, H.K. (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol* 148: 4-14.
- ✚ Lindgren, P.B., Peet, R.C., Panopoulos, N.J. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J. Bacteriol.* 168(2): 512-522.
- ✚ Liu, F., Liu, H., Jia, Q., Wu, X., Guo, X., Zhang, S., Song, F., Dong, H. (2006). The internal glycine-rich motif and cysteine suppress several effects of the HpaGXooc protein in plants. *Phytopathology* 96:1052–9.
- ✚ Lobell, D.B., Field C.B. (2007). Global scale climate – crop yield relationships and the impacts of recent warming. *Environ Res Lett* 2:014002.
- ✚ Lutts, S., Kinet, J.M., Bouharmont, J. (1995). Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany*, 46, 1843–1852.
- ✚ Lynch, D.V. (1990). Chilling injury in plants: the relevance of membrane lipids. In: Katterman F (ed) *Environmental injury to plants*. Academic, New York, pp 17–34.
- ✚ Lyons, J.M. (1973). Chilling injury in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 24:445–466.
- ✚ Mahajan, S., Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* 444:139–158.
- ✚ Margesin, R., Neuner, G., Storey, K.B. (2007). Cold-loving microbes, plants, and animals – fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften* 94:77–99.
- ✚ Martinez-Beltran, J, Manzur, C.L. (2005). Overview of salinity problems in the world and FAO strategies to address the problem. In: *Proceedings of International Salinity Forum*, Riverside, CA, USA, pp 311–313.
- ✚ Mickelbart M.V., Hasegawa P.M., Salt D.E. (2015). Αποκρίσεις και Προσαρμοχές σε Αβιοτικές Καταπονήσεις. Απόδοση από: *PLANT PHYSIOLOGY* (eds. Taiz L, Zeiger E). *Utopia*. pp 913-938.
- ✚ Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410.
- ✚ Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytologist*, 167(3):645-663.



- ✚ Munns, R., Husain, S., Rivelli, A.R., James, R.A., Condon, A.G., Lindsay, M.P., Lagudah, E.S., Schachtman, D.P., Hare, R.A. (2002). Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant Soil* 247:93–105.
- ✚ Munns, R., Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59:651–681.
- ✚ Murillo, A.B., López, A.R., Kaya, C., Larrinaga, M.J., Flores, H.A. (2002). Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188, 235–247.
- ✚ Narayan, R. K. J. (1987). Nuclear DNA changes, genome differentiation and evolution in *Nicotiana* (Solanaceae). *Plant Syst. Evol.* 157:161-180.
- ✚ Oh, C.S., and Beer, S.V. (2007). AtHIPM, an Ortholog of the apple HrpN-Interacting Protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth-enhancing effect of HrpN in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 145: 426-436.
- ✚ Ouji, A., El-Bok, S., Mouelhi, M., Younes, M.B., Kharrat, M. (2015). Effect of salinity stress on germination of five Tunisian lentil (*Lens culinaris* L.) genotypes. *European Scientific Journal*, 11, 63–75.
- ✚ Parida, A.K., Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324–349.
- ✚ Pavli, O.I., Kelaidi, G.I., Tampakaki, A.P., Skaracis, G.N. (2011). The hrpZ Gene of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Enhances Resistance to Rhizomania Disease in Transgenic *Nicotiana benthamiana* and Sugar Beet. *PLoS ONE*. 6(3).
- ✚ Pavli, O.I., Tampakaki, A.P., Skaracis, G.N. (2012). High Level Resistance against Rhizomania Disease by Simultaneously Integrating Two Distinct Defense Mechanisms. *PLoS ONE*. 7(12): e51414.
- ✚ Peng, J-L., Dong, H-S., Dong, H-P., Delaney, T.P., Bonasera, J.M., Beer, S.V. (2003). Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance requires the NDR1 and EDS1 genes. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 62: 317-326.
- ✚ Pennisi, E. (2008). Plant genetics. The blue revolution, drop by drop, gene by gene. *Science* 320, 171–173.
- ✚ Ren, H., Song, T., Wu, T., Sun, L., Liu, Y., Yang, F., Chen, Z.Y., Dong, H. (2006). Effects of a biocontrol bacterium on growth and defence of transgenic rice plants expressing a bacterial type-III effector. *Ann Microbiol* 56:281–287.

- ✚ Rengasamy, P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot* 57:1017–1023.
- ✚ Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., Blumwald, E. (2007). Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19631–19636.
- ✚ Rizhsky, L. et al. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* 130: 1143–1151.
- ✚ Sakai, A., Larcher, W. (1987). Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag, Berlin.
- ✚ Segele Z.T., Lamb P.J. (2005). Characterization and variability of Kiremt rainy season over Ethiopia. *Meteorol Atmos Phys* 89:153–180.
- ✚ Seleshi, Y., Camberlin, P. (2006). Recent changes in dry spell and extreme rainfall events in Ethiopia. *Theor Appl Clim* 83:181–191.
- ✚ Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross talk between two stress signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3:217–233.
- ✚ Smirnoff, N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotechnol* 9:214–219.
- ✚ Strobel, N.E., Ji, C., Gopalan, S., Kuc, J.A., and He, S.Y. (1996). Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZPss protein. *Plant J.*, 9, 431-439.
- ✚ Svab, Z., Maliga, P. (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- ✚ Szabolcs, I. (1989). Salt-affected soils. CRC, Boca Raton, FL.
- ✚ Tampakaki, A.P., Panopoulos, N.J. (2000). Elicitation of Hypersensitive Cell Death by Extracellularly Targeted HrpZPss Produced In Planta. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13(12): 1366–1374.
- ✚ Tampakaki, A.P., Skandalis, N., Gazi, A., Bastaki, M.N., Sarris, P.F., Charova, S.N., Kokkinidis, M., Panopoulos, N.J. (2010). Playing the “Harp”: Evolution of our Understanding of *hrp/hrc* Genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 347–370.
- ✚ Tampakaki, A.P. (2014). Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Frontiers in Plant Science* 5, 114.
- ✚ Tester, M. and Davenport, R. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann Bot* 91(5):503-527.

- ✚ Thomashow, M.F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 50:571–599.
- ✚ Tuberosa, R., Salvi, S. (2006). Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends Plant Sci* 11:405–412.
- ✚ Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., and Minami, A. (2006). Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiol. Plant.* 126:81-89.
- ✚ Ungar, I.A. (1996). Effects of salinity on seed germination, growth, and ion accumulation of *Atriplex patula* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany*, 83, 62–67.
- ✚ Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:579–620.
- ✚ Vierling, E., Kimpel, J.A. (1992). Plant responses to environmental stress. *Curr Opin Biotechnol* 3:164–170.
- ✚ Vij, S., Tyagi, A.K. (2007). Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants: review article. *Plant Biotechnol J* 5:361–380.
- ✚ Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2001). Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort* 560:285–292.
- ✚ Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003b). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1–14.
- ✚ Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., Beer, S.V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257: 85-88.
- ✚ Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(18):10487-92.
- ✚ Wright, M., Hoskisson, R.E., Peng, M.W. (2005). Strategy Research in Emerging Economies: Challenging the Conventional Wisdom. *Journal of Management Studies* 42(1):1-33.
- ✚ Wu, X., Wu, T., Long, J., Yin, Q., Zhang, Y., Chen, L., Liu, R., Gao, T. and Dong, H. (2007). Productivity and biochemical properties of green tea in response to full-length and functional fragments of HpaG XooC, a harpin protein from the bacterial

rice leaf streak pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. J. Biosci. 32, 6, 1119-1131.

- ✚ Wyn, J.R. and Gorham, J. (2002). Intra- and inter-cellular compartmentation of ions. In Lauchli, A., & Lutttge, U. eds. Salinity: Environment-Plants-Molecules. Springer, Netherlands, 159-180.
- ✚ Xin, Z., Browse, J. (2000). Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. Plant Cell Environ 23:893–902.
- ✚ Yamaguchi, T., Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. Trends Plant Sci 10:615–620.
- ✚ Yeo, A.R., Lee, K.S., Izard, P., Boursier, P.J., Flowers, T.J. (1991). Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). J Exp Bot 42:881–889.
- ✚ Zhang, C., Qian, J., Bao, Z., Hong, X., Dong, H. (2007). Abscisic acid mediates *Arabidopsis* drought tolerance induced by HrpNEa in the absence of ethylene signaling. Plant Mol Biol Rep 25:98–114.
- ✚ Zhu, J.K. (2001). Cell signaling under salt, water and cold stresses. Curr Opin Plant Biol 4:401–406.
- ✚ Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Biology, 53, 247–273.
- ✚ Zhu, J.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plants. Crit Rev Plant Sci 16:253–277.

### Ελληνικές Πηγές

- ✚ Βακαλουνάκης, Δ.Ι. και Φραγκιαδάκης, Γ.Α. (2003). Φυτοπαθοβελτίωση με έμφαση στην τομάτα και τα κολοκυνθοειδή. Εκδόσεις Τυποκρέτα Α.Ε., σελ 518.
- ✚ Ζερεφός, Χ. κ.ά. (2011). Το κλίμα της Ανατολικής Μεσογείου και της Ελλάδος: παρελθόν, παρόν και μέλλον. Εις: Οι περιβαλλοντικές, οικονομικές και κοινωνικές επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής στην Ελλάδα (ΕΜΕΚΑ), σσ. 1-135, Τράπεζα της Ελλάδος.
- ✚ Καραμάνος, Α. (2012). ΓΕΝΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ. ΑΡΧΕΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΙΣ ΑΡΟΤΡΑΙΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ. Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα. σελ. 532-535.
- ✚ Ταμπακάκη, Α.Π. (1999). Μοριακή και Βιοχημική Μελέτη Πρωτεϊνών του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου III στο Φυτοπαθογόνο Βακτήριο *Pseudomonas*

*syringae* pv. *phaseolicola* και Διερεύνηση του Ρόλου τους στην Αντίδραση Υπερευαισθησίας των Φυτών. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Ηράκλειο. (σελ. 55).

✚ Χατζόπουλος, Π. (2001). «Βιοτεχνολογία Φυτών». Εκδόσεις Έμβρυο.