



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

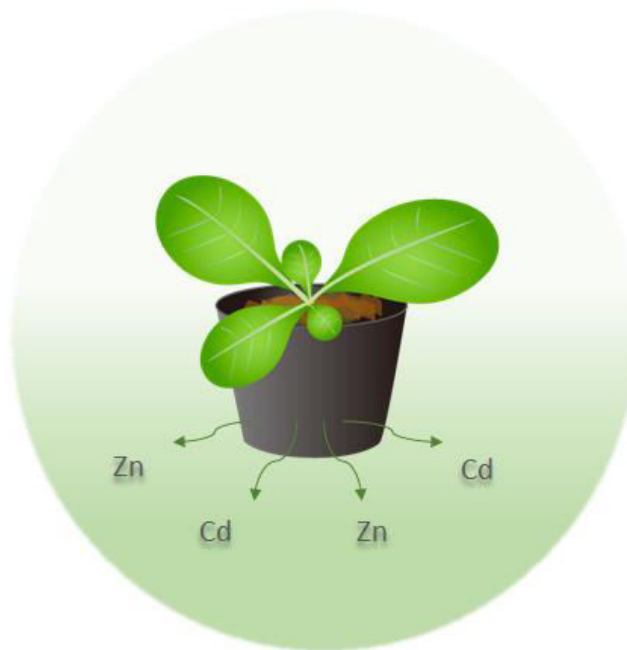
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hprZ_{P_{sph}}* σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα»

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΒΙΣΒΙΚΗΣ



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

ΒΟΛΟΣ 2018

Επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hprZ_{P_{sph}}* σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα

Βασίλειος Βισβίκης

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

Βασίλειος Αντωνιάδης, Αναπλ. Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Εδαφολογία, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής δε θα καθίστατο δυνατή χωρίς τη συμβολή και την καθοδήγηση ορισμένων ανθρώπων τους οποίους νιώθω την ενδόμυχη ανάγκη να ευχαριστήσω. Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, τόσο για την ανάθεση του θέματος όσο για τη στήριξη και την καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, της συγγραφής και της διόρθωσης.

Ακολουθώς, 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 κ. Βασίλειο Αντωνιάδη, Αναπλ. Καθηγητή Εφαρμοσμένης Εδαφολογίας, τόσο για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις όσο και για τη χορήγηση των βαρέων μετάλλων 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, για τη συμβολή τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και για το θερμό κλίμα συνεργασίας κατά τη διάρκεια συμμετοχής μου στο εργαστήριο της Γενετικής Βελτίωσης Φυτών. Τέλος, τη συμφοιτήτρια και φίλη Μαρία Αντωνίου, με την οποία διεκπεραιώσαμε τόσο τα δικά μου πειράματα όσο και τα δικά της.

Κλείνοντας, ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου για την υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια, σε όλα τα επίπεδα, χωρίς την οποία δε θα μπορούσα να έχω επιτύχει τους στόχους μου.

Περίληψη

Είναι κοινώς αποδεκτό πως οι βακτηριακής προέλευσης χαρπίνες, είτε αυτές εκφράζονται ενδογενώς είτε εφαρμόζονται εξωγενώς στα φυτά, επάγουν μηχανισμούς άμυνας που σχετίζονται με την αντοχή των φυτών σε βιοτικούς ή/και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Παλαιότερες έρευνες έχουν αποδείξει πως η χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}, του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, επάγει ανθεκτικότητα στον ιό *Beet necrotic yellow vein virus* που ευθύνεται για την ασθένεια της ριζομανίας των ζαχαροτεύλων. Συγκεκριμένα, η ενδογενής έκφραση της εκκρινόμενης μορφής της χαρπίνης SP/HrpZ_{P_{sph}}, με σκοπό την κατεύθυνση της πρωτεΐνης στον αποπλάστη του κυττάρου, φάνηκε ότι προσδίδει ανθεκτικότητα στον ιό της ριζομανίας τόσο σε διαγονιδιακά φυτά του είδους - μοντέλου *Nicotiana benthamiana* όσο και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου. Υπό το πρίσμα των αβιοτικών καταπονήσεων, τα βαρέα μέταλλα δύνανται να περιορίσουν σημαντικά τις καλλιέργειες τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά, γεγονός το οποίο μεγεθύνεται διαμέσου της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Στο πλαίσιο των ανωτέρω, στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του διαγονιδίου SP/hrpZ_{P_{sph}} σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* ως προς την ανθεκτικότητά τους έναντι της αυξημένης συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων και συγκεκριμένα του καδμίου και ψευδαργύρου. Για το σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος των διαθέσιμων διαγονιδιακών σειρών (T₂) για την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του SP/hrpZ_{P_{sph}}, και οι επιλεγμένες ομοζύγωτες σειρές αποτέλεσαν το γενετικό υλικό για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα. Η αξιολόγηση βασίστηκε στην εκτίμηση του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των hrpZ_{P_{sph}}-σειρών, συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου, παρουσία βαρέων μετάλλων. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν πως τόσο η βλάστηση των σπόρων όσο και η ανάπτυξη των σπορόφυτων επηρεάστηκαν σημαντικά από την παρουσία των βαρέων μετάλλων στο θρεπτικό μέσο βλάστησης, επίδραση η οποία ήταν ανάλογη στο πλείστο των περιπτώσεων με το εφαρμοζόμενο επίπεδο καταπόνησης. Ωστόσο, η 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 απουσία καταπόνησης, κατέστησε πρόδηλη τη δυνατότητα αξιοποίησης των χαρπινών ως

μέσου για τη βελτίωση της αντοχής των φυτών με τη διαμεσολάβηση της γενετικής μηχανικής.

Λέξεις κλειδιά: γενετική μηχανική, *N. benthamiana*, χαρπίνες, *SP/hrpZ_{P_{sph}}*, βελτίωση για ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων, βαρέα μέταλλα, κάδμιο, ψευδάργυρος

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή	1
1.1. Κλιματική αλλαγή και αβιοτικές καταπονήσεις	2
1.2. Αβιοτικές καταπονήσεις– Επιδράσεις σε φυτά	4
1.2.1. Υδατική καταπόνηση	4
1.2.2. Αλατότητα	5
1.2.3. Αύξηση της θερμοκρασίας	6
1.2.4. Αύξηση της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας	7
1.2.5. Μείωση των βροχοπτώσεων και παράλληλη αύξηση της εξάτμισης	7
1.3. Ρύπανση του περιβάλλοντος από βαρέα μέταλλα	8
1.3.1. Καταπόνηση από βαρέα μέταλλα	9
1.3.2. Ψευδάργυρος(Zn)	11
1.3.3. Κάδμιο (Cd)	13
1.3.4. Σχέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ Zn και Cd	16
1.3.5. Φυτοεξυγίανση	16
1.4. Μηχανισμοί άμυνας των φυτών έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων	17
1.5. Βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων	23
1.6. Αξιοποίηση χαρπινών για βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων	26
1.6.1. Οι χαρπίνες (Harpins)	26
1.6.2. Ο ρόλος των χαρπινών στα φυτά	28
1.7. Το φυτό - μοντέλο <i>Nicotiana benthamiana</i>	30
1.8. Σκοπός της μελέτης	32
2. Υλικά και Μέθοδοι	33
2.1. Φυτικό υλικό	33
2.2. Αξιολόγηση των διαγονιδιακών σειρών	34
2.2.1. Επιλογή των διαγονιδιακών σειρών	34
2.2.2 Έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου <i>SP/hrpZ_{psph}</i>	36
2.3. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης	36
2.3.1. Καταπόνηση Τοξικότητας Καδμίου (Cd)	36
2.3.2. Καταπόνηση Τοξικότητας Ψευδαργύρου (Zn)	37
3. Αποτελέσματα	40

3.1. Αξιολόγηση διαγονιδιακών σειρών	40
3.1.1 Επιλογή ομοζύγωτων για το διαγονίδιο <i>hrpZ_{P_{sph}}</i> σειρών	40
3.1.2 Επιβεβαίωση της παρουσίας του διαγονιδίου <i>hrpZ_{P_{sph}}</i>	41
3.2. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του φυτικού υλικού στην καταπόνηση Καδμίου (Cd)	42
3.3. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του φυτικού υλικού στην καταπόνηση Ψευδαργύρου (Zn)	49
4. Συζήτηση	56
5. Βιβλιογραφία	63

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1: Διαγονιδιακές σειρές (T ₀) και αριθμός φυτών (T ₂ γενιά) που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε συνθήκες καταπόνησης λόγω υψηλής περιεκτικότητας καδμίου (Cd).	37
Πίνακας 2.2: Διαγονιδιακές σειρές (T ₀) και αριθμός φυτών T ₂ γενιάς που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε συνθήκες καταπόνησης λόγω υψηλής περιεκτικότητας ψευδαργύρου (Zn).	38
Πίνακας 3.1: Ποσοστό βλάστησης (%) ανά γονότυπο και επίπεδο καταπόνησης καδμίου (Cd), ανά ημέρα της καταπόνησης.	43
Πίνακας 3.2: Ποσοστό βλάστησης (%) ανά γονότυπο και επίπεδο καταπόνησης ψευδαργύρου ανά ημέρα της καταπόνησης.	49

Κατάλογος Διαγραμμάτων

- Διάγραμμα 3.1:** Ποσοστό βλάστησης των σπόρων 5 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ως απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης καδμίου, ανά ημέρα καταπόνησης 44
- Διάγραμμα 3.2:** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης των σπόρων 5 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ανά επίπεδο καταπόνησης καδμίου 44
- Διάγραμμα 3.3:** Ποσοστό βλάστησης των σπόρων 5 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ως απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης ψευδαργύρου, ανά ημέρα καταπόνησης. 50
- Διάγραμμα 3.4:** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης των σπόρων 5 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ανά επίπεδο καταπόνησης ψευδαργύρου. 51

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1: Νόμος ανοχής όπως προτάθηκε από το Victor Ernest Shelford το 1911.	2
Εικόνα 1.2: Τα φυτά ως μέρη του οικοσυστήματος υπόκεινται σε πληθώρα αβιοτικών καταπονήσεων.	3
Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών σταδίων από τα οποία διέρχεται το φυτό προκειμένου να αντεπεξέλθει στην υφιστάμενη καταπόνηση.	5
Εικόνα 1.4: Καμπύλη απεικόνισης της απόκρισης του φυτού σε σχέση με τη δόση των απαραίτητων ιχνοστοιχείων.	10
Εικόνα 1.5: Γενικευμένη απεικόνιση της αντίδρασης του φυτού, σε κυτταρικό επίπεδο, στους παράγοντες καταπόνησης - Ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας.	18
Εικόνα 1.6: Απόκριση των φυτών στις καταπονήσεις.	19
Εικόνα 1.7: Πιθανοί μηχανισμοί απόκρισης των φυτών σε καταπόνηση από βαρέα μέταλλα.	20
Εικόνα 1.8: Υποβοηθούμενη από μοριακούς δείκτες επιλογή (Marker assisted selection – MAS).	26
Εικόνα 1.9: Τα δομικά χαρακτηριστικά του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου 3 (T3SS).	27
Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου των χαρπινών στα φυτά	29
Εικόνα 1.11: Το φυτό μοντέλο <i>Nicotiana benthamiana</i> .	31
Εικόνα 2.1: Απεικόνιση της γονιδιακής κατασκευής που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών του είδους <i>N. benthamiana</i> .	34
Εικόνα 2.2: Σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών σταδίων που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των τριβλίων, βάσει των οποίων έγινε η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας για τον εκάστοτε παράγοντα καταπόνησης.	39
Εικόνα 3.1: Επιλογή σπόρων μετασχηματισμένων σειρών του είδους <i>Nicotiana benthamiana</i> (T ₂ γενιά) σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιέχει το αντιβιοτικό υδρομυκίνη.	40
Εικόνα 3.2: Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής, μέσω βλάστησης σπόρων αγρίου τύπου (wt) του είδους <i>Nicotiana benthamiana</i> παρουσία και απουσία του αντιβιοτικού υδρομυκίνη.	41
Εικόνα 3.3: Προϊόντα ενίσχυσης PCR σε μετασχηματισμένα φυτά του είδους <i>N. benthamiana</i> .	42

- Εικόνα 3.4:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης καδμίου (50 μ M), την 13^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. 45
- Εικόνα 3.5:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο μεσαίο επίπεδο καταπόνησης καδμίου (100 μ M), την 5^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. 46
- Εικόνα 3.6:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης καδμίου (200 μ M), την 18^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. 47
- Εικόνα 3.7:** Θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στην ανάπτυξη των σπορόφυτων των διαγονιδιακών σειρών 166-19-3 και 160-6-2 σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των σπορόφυτων αγρίου τύπου (wt). 48
- Εικόνα 3.8:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης ψευδαργύρου (5 mM), την 9^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. 52
- Εικόνα 3.9:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης ψευδαργύρου (5 mM), την 22^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. 53
- Εικόνα 3.10:** Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο μεσαίο (10 mM Zn) και υψηλό (15 mM Zn) επίπεδο καταπόνησης ψευδαργύρου, την 22^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. 54
- Εικόνα 3.11:** Θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στην ανάπτυξη των σπορόφυτων των διαγονιδιακών σειρών σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των σπορόφυτων αγρίου τύπου (wt). 55

1. Εισαγωγή

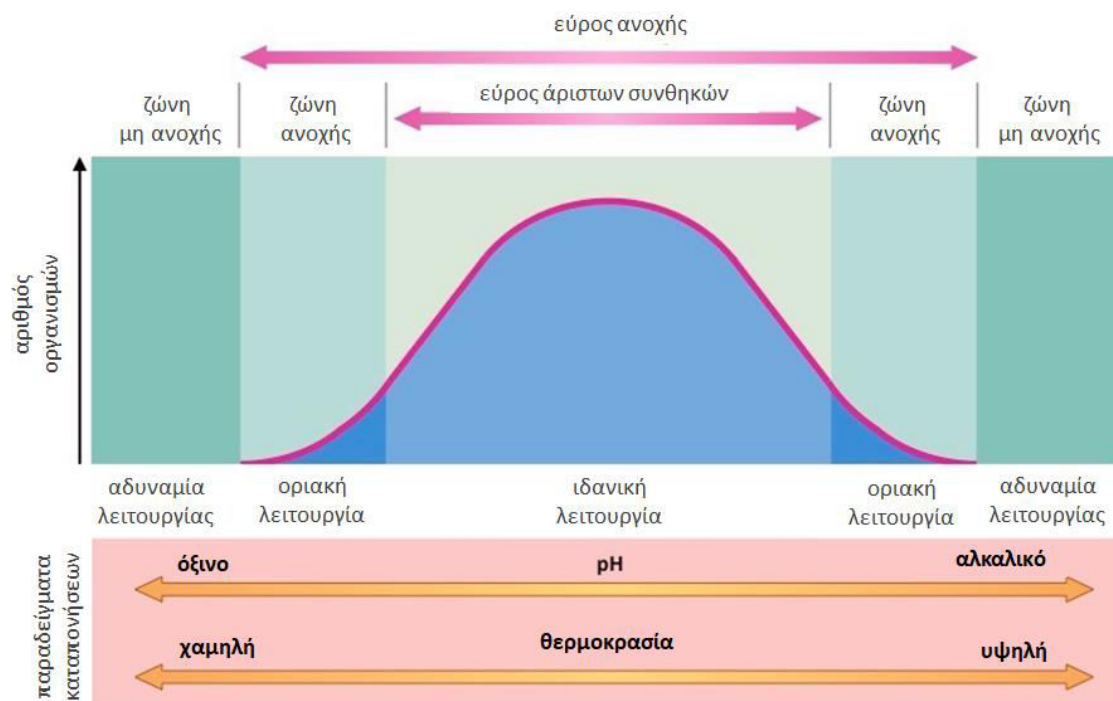
Γενικά

Τα φυτά βρίσκονται σε μία αέναη αλληλεπίδραση με το οικοσύστημα στο οποίο ανήκουν, με αποτέλεσμα να πλήττονται συνεχώς από πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Αυτές οι καταπονήσεις δύνανται να έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην συσσώρευση βιομάζας από μέρους του φυτού, στην παραγωγικότητά του, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και στην αδυναμία επιβίωσής του. Στις βιοτικές καταπονήσεις περιλαμβάνονται οι εντομολογικές προσβολές, οι προσβολές που οφείλονται σε φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς, όπως μύκητες, βακτήρια, ιούς και ιοειδή, καθώς και κάθε καταπόνηση που προέρχεται από οποιονδήποτε άλλο ζωικό οργανισμό. Στις αβιοτικές καταπονήσεις εντάσσονται παράγοντες όπως η ξηρασία, η υψηλή αλατότητα, οι ακραίες υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες, η αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων (είτε αυτά βρίσκονται στην ατμόσφαιρα, είτε στο έδαφος) ή/και άλλων ξενοβιοτικών ουσιών, καθώς και η υπερϊώδης ακτινοβολία.

Από τη μεριά τους τα φυτά, λόγω του ότι στερούνται την ικανότητα κίνησης προς αποφυγή της εκάστοτε καταπόνησης, έχουν αναπτύξει διάφορους εξειδικευμένους μηχανισμούς αντίδρασης - άμυνας μέσω της δράσης της φυσικής επιλογής κατά την εξελικτική τους πορεία στο χρόνο. Βέβαια, σε επίπεδο καλλιέργειας, η εφαρμογή φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων είναι σήμερα άρρηκτα συνδεδεμένη με την αντιμετώπιση των καταπονήσεων και την μείωση των συνδεδεμένων με αυτές απωλειών.

Οι αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης χαρακτηρίζονται από την ένταση και τη διάρκεια επίδρασής τους στα φυτά. Για κάθε παράγοντα, υπάρχει μία περιοχή επίδρασης εντός της οποίας ο φυτικός οργανισμός επιτυγχάνει να επιβιώνει και να εκτελεί κανονικά τις προκαθορισμένες βιολογικές και φυσιολογικές του λειτουργίες. Αυτή η περιοχή επίδρασης ονομάζεται εύρος ανοχής (tolerance range), μέσα στην οποία υπάρχει και ένα σημείο άριστης (optimum) λειτουργίας του φυτού. Εντούτοις, εκτός του εύρους ανοχής - ζώνη μη ανοχής (zone of intolerance) ενός συγκεκριμένου φυτικού οργανισμού, η δράση του εκάστοτε αβιοτικού παράγοντα είναι καθοριστική και οδηγεί σε αδυναμία επιβίωσής του. Εν γένει, όταν ένας παράγοντας συγκλίνει

προς τα όρια του εύρους ανοχής, ή ακόμη όταν τα ξεπερνά, τότε καλείται περιοριστικός παράγοντας ή περιοριστική συνθήκη (Εικόνα 1.1).



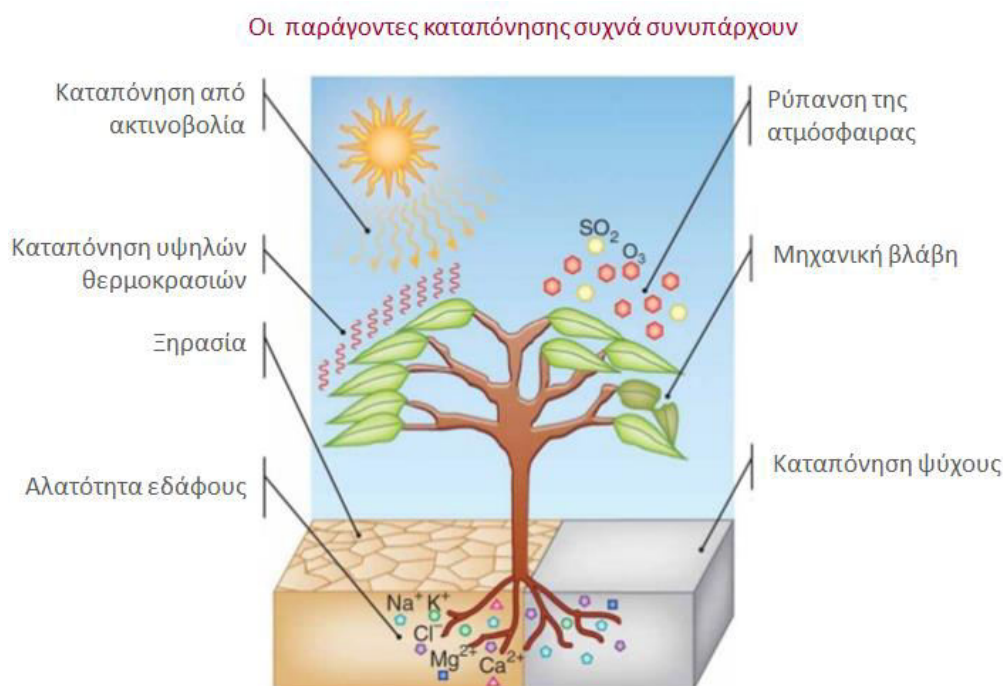
Εικόνα 1.1: Νόμος ανοχής όπως προτάθηκε από το Victor Ernest Shelford το 1911. (Πηγή: <http://ib.bioninja.com.au/options/option-c-ecology-and-conser/c1-species-and-communities/survival-factors.html>)

1.1. Κλιματική αλλαγή και αβιοτικές καταπονήσεις

Είναι γεγονός ότι από τα μέσα - τέλη του 19ου αιώνα έχει ξεκινήσει μια σταδιακή άνοδος της ατμοσφαιρικής θερμοκρασίας, ο ρυθμός της οποίας υπολογίζεται περί τους 0,8 °C ανά 100 χρόνια και η οποία συνεχίζει αδιάλειπτα, με μικρές διακυμάνσεις, μέχρι και σήμερα. Η θερμοκρασία αποτελεί μία μόνο από τις συνιστώσες του κλίματος που μεταβάλλονται εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής, όλες, όμως, είναι συνυφασμένες με την έναρξη και εντατικοποίηση της βιομηχανικής και εν γένει της ανθρώπινης δραστηριότητας, λόγω των αερίων που εκπέμπονται στην ατμόσφαιρα. Άλλες συνιστώσες του κλίματος που επηρεάζονται είναι η ένταση της

ηλιακής ακτινοβολίας, η ταχύτητα του ανέμου, οι βροχοπτώσεις και η εξατμισοϊκανότητα της ατμόσφαιρας (Καραμάνος, 2012) (Εικόνα 1.2).

Οι προκλήσεις των αβιοτικών καταπονήσεων στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών είναι προφανείς στο πλαίσιο των οικολογικών επιδράσεων της κλιματικής αλλαγής (Bellard et al., 2012), ενώ παράλληλα τα προκαλούμενα εμπόδια στη φυτική παραγωγή εντείνονται με το συνεχώς αυξανόμενο πληθυσμό της Γης που ανταγωνίζεται ολοένα και περισσότερο για τις διαθέσιμες περιβαλλοντικές πηγές (Wallace et al., 2003). Δεδομένου ότι η κλιματική αλλαγή αναμένεται να επηρεάσει σημαντικά τη φυτική παραγωγή, η ερευνητική κοινότητα αναζητά λύσεις για το σχεδιασμό και την υιοθέτηση στρατηγικών προσαρμογής στα δεδομένα αυτά (Rosenzweig et al., 2014). Προς την κατεύθυνση αυτή, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την ανάπτυξη των «έξυπνων κλιματικών φυτών» τα οποία θα εμφανίζουν βελτιωμένη φαινοτυπική πλαστικότητα ως απόκριση στα περιβάλλοντα καταπόνησης που επιφέρει η κλιματική αλλαγή (Wheeler and Von Braun, 2013).



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

1.2. Αβιοτικές καταπονήσεις– Επιδράσεις σε φυτά

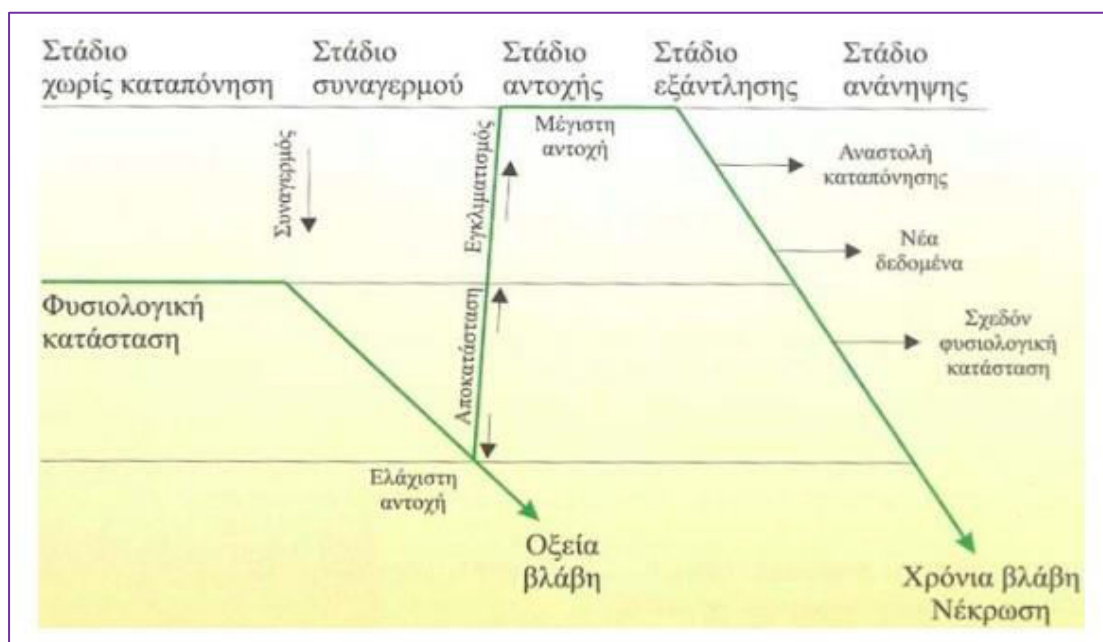
Τα φυτά, κατά την αντίδρασή τους στην εκάστοτε αβιοτική καταπόνηση, δύνανται να διέλθουν από τέσσερα εμπειρικά στάδια, τα οποία όπως προτάθηκαν από τον Lichtenthaler το 1996, συνοψίζονται στα κατωτέρω:

- Το στάδιο του συναγερμού (alarm stage): Το στάδιο αυτό σηματοδοτείται από την εκδήλωση συναγερμού εντός του φυτού, κατά τη διάρκεια του οποίου παρατηρείται μία απόκλιση του μεταβολισμού από τη φυσιολογική του πορεία. Σε περίπτωση αδυναμίας του να περάσει στο επόμενο στάδιο, αυτό της αντοχής/ανθεκτικότητας, το φυτό υπόκειται σε οξεία βλάβη.
- Στάδιο αντοχής/ανθεκτικότητας (resistance): Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, το φυτό υπόκειται σε μεταβολές -σε φυσιολογικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο- προκειμένου να αντεπεξεέλθει επιτυχώς στην καταπόνηση που υφίσταται.
- Στάδιο εξάντλησης ή τελικό στάδιο (exhaustion): Το στάδιο αυτό αναφέρεται στην υπέρβαση του ορίου ικανότητας του φυτού να προσαρμοστεί στην επικρατούσα καταπόνηση, μιας και η υπέρμετρη ένταση της καταπόνησης δύναται να προκαλέσει μόνιμη βλάβη στα κύτταρα ή ακόμη και νέκρωση αυτών.
- Στάδιο ανάνηψης ή αναγέννησης (recovery): Σε αυτό το στάδιο, οι φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων επανέρχονται μερικώς ή ολοκληρωτικώς στα κανονικά επίπεδα, δεδομένου ότι η καταπόνηση έχει παρέλθει και οι βλάβες που πιθανώς έχουν προκληθεί είναι αναστρέψιμες (Εικόνα 1.3).

1.2.1. Υδατική καταπόνηση

Η ανεπαρκής διαθεσιμότητα νερού αποτελεί σύνηθες φαινόμενο των περισσότερων φυσικών περιβαλλόντων και καλλιεργειών και είναι αποτέλεσμα της εμφάνισης απρόβλεπτων και μεγάλης διάρκειας περιόδων ανομβρίας. Βέβαια, η υδατική καταπόνηση σχετίζεται και με άλλες παραμέτρους, όπως η υγρασιακή κατάσταση της ατμόσφαιρας και η ύπαρξη αλάτων στο εδαφικό διάλυμα (αλατότητα). Στο πλαίσιο αυτό, είναι πιθανό το έδαφος να έχει επάρκεια υγρασίας, όμως η ύπαρξη υψηλής συγκέντρωσης αλάτων στο εδαφικό διάλυμα να θέτει μία τροχοπέδη στην πρόσληψη νερού. Ελλείψει, λοιπόν, νερού στα φυτά προκαλείται κυτταρική αφυδάτωση, η οποία

έχει αρνητικό αντίκτυπο σε καίριας σημασίας φυσιολογικές και βιοχημικές λειτουργίες, όπως είναι η αναστολή της φωτοσύνθεσης, το κλείσιμο των στομάτων, η μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα και η ελάττωση της επέκτασης των κυττάρων, ενώ παράλληλα μπορεί να επιφέρει τοξικές επιδράσεις εντός του κυττάρου, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης ιόντων (Mickelbart et al., 2015).



Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών σταδίων από τα οποία διέρχεται το φυτό προκειμένου να αντεπεξέλθει στην υφιστάμενη καταπόνηση. (Πηγή: “Φυσιολογία Φυτών: από το μόριο στο περιβάλλον”, επιμέλεια Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003)

1.2.2. Αλατότητα

Με τον όρο αλατότητα αναφέρεται η εκτεταμένη συγκέντρωση αλάτων στο εδαφικό διάλυμα. Η αύξηση της συγκέντρωσης αυτής μπορεί να οφείλεται σε φυσικές παραμέτρους, ωστόσο, μπορεί να αποτελεί απότοκο εσφαλμένων πρακτικών διαχείρισης του νερού ή άλλων γεωργικών πρακτικών. Η καταπόνηση που οφείλεται στην αλατότητα συνίσταται από τη μη εξειδικευμένη ωσμωτική καταπόνηση (osmotic stress), η οποία οδηγεί σε έλλειψη νερού και τις εξειδικευμένες ιοντικές επιδράσεις (specific ion effects) εξαιτίας της συσσώρευσης τοξικών ιόντων τα οποία

υποσκελίζουν τον κανονικό εφοδιασμό των φυτών με θρεπτικά στοιχεία και οδηγούν τελικά στην κυτοτοξικότητα (Munns and Tester, 2008).

Τα φυτικά είδη, ανάλογα με το βαθμό ανοχής τους στα άλατα διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες: τα γλυκόφυτα, τα οποία είναι ευαίσθητα στα άλατα και τα αλόφυτα, τα οποία έχουν αναπτυγμένους μηχανισμούς προσαρμογής στην αλατότητα. Αν και τα αλατούχα εδάφη είναι συνυφασμένα με την ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων NaCl, εντούτοις σε ορισμένες περιπτώσεις η υψηλή αλατότητα ενδέχεται να εναπόκειται και σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Ca^{+2} , Mg^{+2} και SO_4^- (Epstein and Bloom, 2005). Επιπρόσθετα, όταν τα ιόντα εισέλθουν ενδοκυτταρικά στο κυτοδιάλυμα, παρουσιάζουν εξειδικευμένες δράσεις και προκαλούν διαταραχές στη θρεπτική κατάσταση του φυτού (Munns and Tester, 2008). Τέτοιες διαταραχές μπορούν να προέλθουν λόγω μετουσίωσης των πρωτεϊνών και αποσταθεροποίησης των μεμβρανών (Mickelbart et al., 2015).

1.2.3. Αύξηση της θερμοκρασίας

Η αυξητική πορεία της θερμοκρασίας της ατμόσφαιρας θα έχει αρνητικό ή θετικό αντίκτυπο στους φυτικούς οργανισμούς ανάλογα με το φυτικό είδος και τις θερμοκρασιακές του «προτιμήσεις» (θερμόφιλο - ψυχρόφιλο), το στάδιο ανάπτυξης του και την τιμή της θερμοκρασίας. Έτσι, τα θερμόφιλα είδη είναι πιθανό να ευνοηθούν από την θερμοκρασιακή άνοδο ως προς τις φυσιολογικές τους λειτουργίες, ενώ σε δυσμενέστερη θέση θα βρεθούν τα ψυχρόφιλα είδη, στα οποία η επίδραση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση φυσιολογικών ανωμαλιών σε ορισμένα στάδια ανάπτυξης, σε αλλαγές του βιολογικού κύκλου ή στο έσχατο σημείο της αδυναμίας επιβίωσης και διαίωσις του είδους (Καραμάνος, 2012).

Συνεκδοχικά, η θερμοκρασιακή αύξηση εκτρέπει μερικώς την ισορροπία των οικοσυστημάτων καθώς δύναται να επηρεάσει εμμέσως έντομα, ασθένειες και ζιζάνια ως προς τη διασπορά τους, με αποτέλεσμα να μεταβληθούν οι σχέσεις αλληλεπίδρασης παρασίτου - ξενιστή (Karamanos, 2009).

1.2.4. Αύξηση της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας

Κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις, η ηλιακή ακτινοβολία συνιστά ένα σημαντικό παράγοντα καταπόνησης προς τα φυτά. Από το σύνολο της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), με περιοχή φάσματος τα 200 - 400 nm, μπορεί να ζημιώσει τα φυτά και να προκαλέσει σημαντικές χημικές αλλαγές σε βιομόρια. Ιδιαίτερα επιβλαβής περιοχή θεωρείται η UV-B (280 - 320 nm), καθώς προκαλεί καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών και οργανιδίων, συμπεριλαμβανομένων των χλωροπλαστών και μιτοχονδρίων, αλλά και του πυρηνικού DNA. Απόρροια των ανωτέρω είναι η άμεση ή έμμεση μεταβολή βασικών μεταβολικών διεργασιών, όπως η φωτοσύνθεση, η αναπνοή, η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή (Hollósy, 2002).

Λόγω της σταδιακής καταστροφής της στοιβάδας του όζοντος στη στρατόσφαιρα, η ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας που φτάνει στη Γη έχει αυξηθεί και συνεχίζει να αυξάνεται σημαντικά, γεγονός που επισείει ως απειλή για την ομαλή ανάπτυξη των φυτών και κατ' επέκταση της φυτικής παραγωγής.

1.2.5. Μείωση των βροχοπτώσεων και παράλληλη αύξηση της εξάτμισης

Η απόδοση των καλλιεργειών στο πλείστο των περιπτώσεων είναι συνυφασμένη με την επάρκεια του νερού κατά την καλλιεργητική περίοδο. Ωστόσο, η ολοένα αυξανόμενη μείωση της συχνότητας βροχοπτώσεων, σε συνδυασμό με την αύξηση της εξατμισοϊκανότητας της ατμόσφαιρας και της ταχύτητας του ανέμου, οδηγούν σε συνεχή μείωση του υδατικού ισοζυγίου. Έτσι, ελλείπει της ικανότητας άρδευσης, η φυτική παραγωγή υποβαθμίζεται. Επίσης αναφέρεται πως, λόγω της κλιματικής αλλαγής, επηρεάζεται η συχνότητα και ένταση των ακραίων καιρικών φαινομένων, όπως πλημμύρων και περιόδων ξηρασίας, τα οποία έχουν αρνητική επίδραση στην παραγωγή, ενώ ενέχουν κινδύνους διάβρωσης και ερημοποίησης των εδαφών (Καραμάνος, 2012).

1.3. Ρύπανση του περιβάλλοντος από βαρέα μέταλλα

Γενικά, ο όρος ρύπανση του περιβάλλοντος αναφέρεται στην παρουσία κάθε είδους ουσίας, θορύβου, ακτινοβολίας ή άλλης μορφής ενέργειας, ή όπως καλούνται γενικά, ρύπων, σε τέτοια συγκέντρωση, ποσότητα και διάρκεια, ώστε να προκύπτουν δυσμενείς επιδράσεις στα οικοσυστήματα (National Geographic Society, 2013). Αν και κάθε οικοσύστημα έχει την ικανότητα αντίδρασης διαθέτοντας μηχανισμούς αναπαραγωγής, ανακύκλωσης και αυτοκαθαρισμού, ωστόσο εξαιτίας της ανεμπόδιστης εισαγωγής μη επιθυμητών στοιχείων, όπως χημικών ουσιών ή μορφών ενέργειας, αυτοί καταστέλλονται (Αλμπάνης, 1999).

Η ρύπανση του περιβάλλοντος με βαρέα μέταλλα προέρχεται κυρίως από δύο κατηγορίες πηγών, τις φυσικές και τις ανθρωπογενείς. Στις φυσικές πηγές ρύπανσης, συμπεριλαμβάνονται η ηφαιστειακή δραστηριότητα, η αποσάθρωση των μητρικών πετρωμάτων και η γεωχημεία του φλοιού της γης. Αντιστοίχως, στις ανθρωπογενείς συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων η τέλεια ή ατελής καύση ορυκτών ή συνθετικών καυσίμων, η εφαρμογή φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων και βελτιωτικών στο γεωργικό τομέα, η ιλύς που προέρχεται από το βιολογικό καθαρισμό πόλεων, οι ατμοσφαιρικές αποθέσεις, η λειτουργία χημικών ή άλλων βιομηχανιών, τα διάφορα, κατά καιρούς, πυρηνικά ατυχήματα, τα πυρομαχικά που χρησιμοποιούνται σε στρατιωτικές ασκήσεις ή εν καιρώ πολέμου και φέρουν τέτοιου είδους μέταλλα, καθώς φυσικά και η ανεξέλεγκτη απόθεση βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων σωρηδόν σε συγκεκριμένες εστίες, με αποτέλεσμα να εγκυμονεί ο κίνδυνος τα μέταλλα που περιέχουν να διοχετεύονται στα υπόγεια ή επιφανειακά ύδατα (Αλμπάνης, 1999; Μήτσιος, 2004).

Αξίζει να σημειωθεί πως για τις φυσικές πηγές ρύπανσης έχουν αναπτυχθεί από τη φύση μηχανισμοί εξυγίανσης και "αυτοκαθαρισμού", με αποτέλεσμα να μπορεί να αποσοβηθεί ο κίνδυνος ρύπανσης του περιβάλλοντος. Κάτι τέτοιο δεν ισχύει για τις ανθρωπογενείς πηγές εξαιτίας της συσσώρευσης των ρύπων σε συγκεκριμένες περιοχές, καθιστώντας τες πιο επικίνδυνες, και οδηγώντας σε μη αντιστρεπτές επιπτώσεις (Αλμπάνης, 1999).

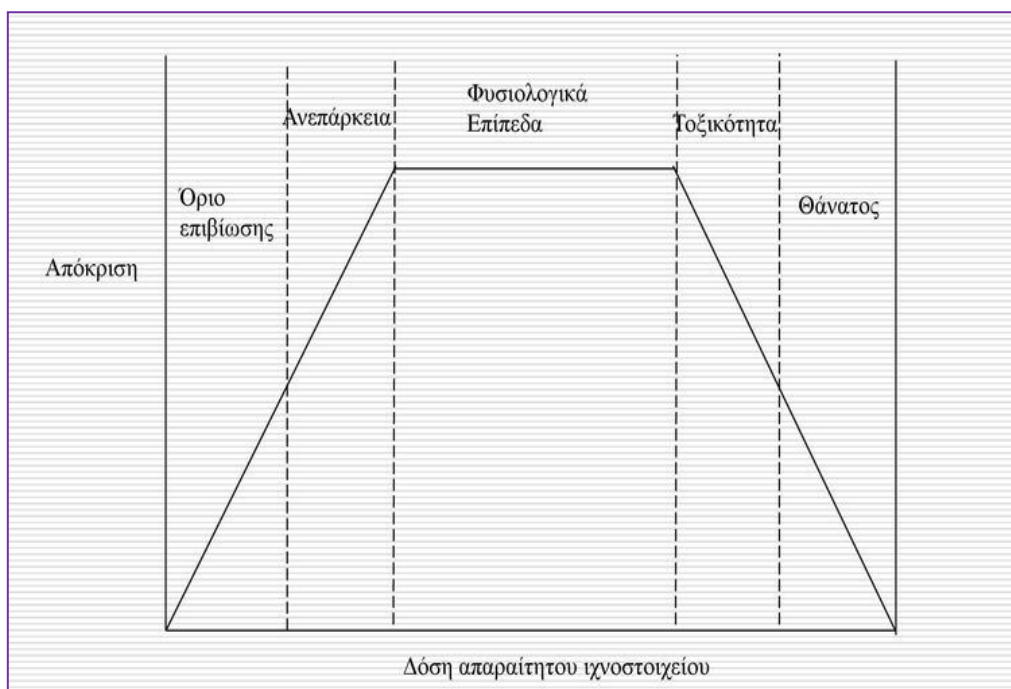
Βιοσυσσώρευση

Ο όρος "βιοσυσσώρευση" (bioaccumulation) ή βιολογική μεγέθυνση (bioamplification) αναφέρεται στο φαινόμενο της συσσώρευσης σε ολόένα και υψηλότερες συγκεντρώσεις επιβλαβών και τοξικών ουσιών στους ζώντες οργανισμούς. Κύρια αιτία που οδηγεί στη βιοσυσσώρευση είναι η ανθρώπινη δραστηριότητα, μέσω της οποίας έχουν απελευθερωθεί στο περιβάλλον διάφοροι ρυπαντές, μεταξύ των οποίων και τα βαρέα μέταλλα. Έτσι, κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας, η εκάστοτε τοξική ουσία δε μπορεί να αποβληθεί από τους οργανισμούς – καταναλωτές, λόγω έλλειψης εξειδικευμένων βιολογικών μηχανισμών, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στους ιστούς. Απόρροια των ανωτέρω είναι ο ιδιαίτερα υψηλός αρνητικός αντίκτυπος στους ανώτερους καταναλωτές, στους οποίους οι συγκεντρώσεις υπερβαίνουν συχνά κατά πολύ τα επιτρεπτά για τον οργανισμό όρια (Αλμπάνης, 1999). Το φαινόμενο αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη, αν αναλογιστεί κανείς πως σε αρκετές τροφικές αλυσίδες ο άνθρωπος αποτελεί συχνά τον ανώτερο καταναλωτή.

1.3.1. Καταπόνηση από βαρέα μέταλλα

Τα βαρέα μέταλλα συνίστανται από μία ομάδα μετάλλων και μεταλλοειδών με ιδιαίτερο βιολογικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Κοινό τους χαρακτηριστικό είναι ότι έχουν ατομική πυκνότητα μεγαλύτερη των 5 ή 6 g/cm³ (Phipps, 1981). Αξίζει να σημειωθεί πως πολλά από τα βαρέα μέταλλα είναι απαραίτητα για την επιτέλεση των αναπτυξιακών λειτουργιών των φυτών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων μεταλλικών κατιόντων αποτελούν το μαγγάνιο (Mn), ο χαλκός (Cu) και ο ψευδάργυρος (Zn). Συχνά, τα βαρέα μέταλλα αναφέρονται και ως «εν δυνάμει τοξικά στοιχεία» (potentially toxic elements, PTE), υποδεικνύοντας τις επιβλαβείς, για τους οργανισμούς, ιδιότητές τους. Είναι ευρύτερα γνωστό ότι τα μικροθρεπτικά στοιχεία, όπως Fe, Mn, Cu, B, Zn, απαιτούνται σε χαμηλές ποσότητες από τα φυτά για την ομαλή λειτουργία τους. Εάν τα φυτά δεν έχουν στη διάθεσή τους αυτές τις ποσότητες μικροθρεπτικών, θα εκδηλώσουν συμπτώματα τροφοπενίας, κυρίως στα φύλλα. Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση των στοιχείων αυτών στο έδαφος ή στο νερό άρδευσης είναι μεγαλύτερη από την επιθυμητή, είναι πιθανό να προκληθούν συμπτώματα τοξικότητας στους φυτικούς οργανισμούς (Εικόνα 1.4).

Ορισμένα βαρέα μέταλλα μεγάλης σημασίας όσον αφορά τις δυσμενείς συνέπειές τους στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον είναι το κάδμιο (Cd), ο μόλυβδος (Pb), το αρσενικό (As), το χρώμιο (Cr), ο υδράργυρος (Hg) και το μολυβδαίνιο (Mo) (Μήτσιος, 2004). Τα βαρέα μέταλλα συγκαταλέγονται στους πολύ επικίνδυνους ρύπους, διότι δεν μπορούν να αποικοδομηθούν, όπως συμβαίνει με τις οργανικές ενώσεις (Αλμπάνης, 1999). Η επιβάρυνση του περιβάλλοντος με αυτού του είδους τα μέταλλα είναι αποκύημα κυρίως της ρύπανσης.



Εικόνα 1.4: Καμπύλη απεικόνισης της απόκρισης του φυτού σε σχέση με τη δόση των απαραίτητων ιχνοστοιχείων. (Πηγή: “Φυσιολογία Φυτών: από το μόριο στο περιβάλλον”, επιμέλεια Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003)

Τα βαρέα μέταλλα δύνανται να περιορίσουν σημαντικά τις αποδόσεις και την παραγωγικότητα των ευαίσθητων, σε αυτά, καλλιεργούμενων φυτικών ειδών. Επιπρόσθετα, η ποιότητα των παραγόμενων αγροτικών προϊόντων βάλλεται από την ύπαρξη βαρέων μετάλλων στο έδαφος, καθιστώντας τα προϊόντα ακατάλληλα για βρώση και διάθεση στην αγορά, μιας και η διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων αποτελεί σήμερα μία εξέχουσα παράμετρο η οποία λαμβάνεται υπόψη κατά τη διαδικασία της συγκομιδής και της διάθεσης. Ένα ακόμη σημείο στο οποίο εστιάζεται το ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η ξηρασία, η

αλατότητα και η ύπαρξη βαρέων μετάλλων, καθιστούν σταδιακά τα καλλιεργούμενα εδάφη ακατάλληλα για την καλλιέργεια των ευαίσθητων φυτικών ειδών. Φαινόμενα όπως η κλιματική αλλαγή και η διαρκής ρύπανση του περιβάλλοντος εντείνουν το πρόβλημα και οδηγούν στην εγκατάλειψη και ερημοποίηση των εδαφών. Αυξανόμενου όμως του πληθυσμού της Γης, η ανάγκη για μεγαλύτερη ποσότητα τροφής είναι εμφανής, ανάγκη η οποία δυσχεραίνεται σημαντικά λόγω της μείωσης των καλλιεργούμενων εκτάσεων.

Συμπεριφορά των βαρέων μετάλλων στο έδαφος

Τα βαρέα μέταλλα του εδάφους, όπως αναφέρεται από το Μήτσιο (2004), μπορούν:

- ❖ Να προσληφθούν από τα καλλιεργούμενα και μη φυτά του εδάφους,
- ❖ Να συγκρατηθούν από τη στερεή φάση του εδάφους με ποικίλες μορφές και ιοντικές καταστάσεις,
- ❖ Να βρίσκονται στο εδαφικό διάλυμα με τη διαλυτή τους μορφή, όπως και στο νερό στράγγισης,
- ❖ Να καταβυθιστούν ως αδιάλυτες ενώσεις,
- ❖ Να παραμείνουν με τη μορφή πτητικών ενώσεων στην αέρια φάση του εδάφους, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του υδραργύρου.

1.3.2. Ψευδάργυρος(Zn)

Ο ψευδάργυρος είναι ένα μεταλλικό στοιχείο που ανήκει στην ΙΙΒ ομάδα του περιοδικού πίνακα, δηλαδή στα στοιχεία μετάπτωσης. Έχει ατομικό αριθμό (Z) 30, ενώ αναφορικά με τα φυσικά χαρακτηριστικά του, έχει σημείο τήξεως τους 419,53°C, πυκνότητα 7,14 g/cm³ και σκληρότητα Mohs 2,5. Ο ψευδάργυρος αποτελεί ένα απαραίτητο θρεπτικό στοιχείο, σε μικρές, όμως, ποσότητες τόσο για τους φυτικούς οργανισμούς όσο για τον άνθρωπο και τα ζώα. Σε επίπεδο οργανισμών, ο ψευδάργυρος δρα ως καταλύτης και ως δομικό συστατικό σε πληθώρα ενζύμων με ενεργό συμβολή στο μεταβολισμό (Μήτσιος, 2004).

Στα φυτά, η σπουδαιότητά του έγκειται στον ιδιαίτερο βιοχημικό του ρόλο να αποτελεί δομικό συστατικό για ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, πεπτιδασών και δεϋδρογονασών. Επιπρόσθετα, λαμβάνει μέρος

στο μεταβολισμό πρωτεϊνών και υδρογονανθράκων, καθώς και στο σχηματισμό του RNA και των ριβοσωμάτων (Price et al., 1972). Όσον αφορά την προέλευση του ψευδαργύρου, ισχύουν όσα προαναφέρθηκαν ήδη στην ενότητα 1.3 σχετικά με τις πηγές ρύπανσης. Από τις διάφορες μορφές με τις οποίες εμφανίζεται ο ψευδάργυρος στο έδαφος, εκείνες οι οποίες μπορούν να προσληφθούν από μέρους των φυτών είναι οι υδατοδιαλυτές. Αξίζει να σημειωθεί πως η συχνότερη μορφή με την οποία βρίσκεται στο έδαφος είναι εκείνη του δισθενούς ιόντος Zn^{2+} (Μήτσιος, 2004). Επιπλέον, εξαιτίας του θετικού φορτίου που φέρει, καθίσταται δυσκίνητος στο έδαφος, ενώ με τη μείωση του pH του εδάφους η διαλυτότητά του αυξάνεται (για κάθε μονάδα pH μπορεί να αυξηθεί κατά 30 – 100 φορές) (Καραμάνος, 2012).

Ο ρυθμός με τον οποίο προσλαμβάνεται ο ψευδάργυρος από τα φυτά επαφίεται στο φυτικό είδος, στον τύπο του εδάφους, έως και στην ύπαρξη του ασβεστίου στο έδαφος (Brown et al., 1995; Ibekwe et al., 1998). Γενικά, εντός του φυτού, ο ψευδάργυρος βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στις ρίζες σε σχέση με το υπέργειο μέρος (Μήτσιος, 2004).

Τροφοπενία ψευδαργύρου

Η τροφοπενία ψευδαργύρου συνιστά μία από τις συχνά εμφανιζόμενες τροφοπενίες σε αρκετά είδη φυτών και απαντάται σε πληθώρα εδαφικών τύπων (Μήτσιος, 2004). Ειδικότερα, τροφοπενία ψευδαργύρου συναντάται στις εξής κατηγορίες εδαφών:

- ❖ Σε αλκαλικά ή ουδέτερα εδάφη. Ανύψωση της τιμής του pH του εδάφους προκαλεί αύξηση της προσρόφησης του ψευδαργύρου στις αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες του εδάφους και επομένως μείωση του διαθέσιμου για τα φυτά ψευδαργύρου,
- ❖ Σε όξινα ή ξεπλυμένα εδάφη
- ❖ Σε εδάφη χαμηλής περιεκτικότητας σε οργανική ουσία, μιας και αυξανόμενης της περιεκτικότητας του εδάφους σε οργανική ουσία, αυξάνεται και το ποσοστό του υδατοδιαλυτού ψευδαργύρου,
- ❖ Σε εδάφη των οποίων η θερμοκρασία είναι χαμηλή, εξαιτίας της περιορισμένης ανάπτυξης της ρίζας και
- ❖ Σε εδάφη υψηλής περιεκτικότητας σε φώσφορο, λόγω του έντονου ανταγωνισμού που αναπτύσσεται μεταξύ αυτών των δύο στοιχείων. Ο ανταγωνισμός αυτός αφορά τις χημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στο

χώρο της ριζόσφαιρας (Olsen, 1972; Smilde et al., 1974). Επίσης, σχέση ανταγωνισμού αναπτύσσει και με τα στοιχεία σίδηρος, άζωτο, χαλκός και ασβέστιο, όταν αυτά βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στο εδαφικό διάλυμα.

Τοξικότητα Ψευδαργύρου

Ο ψευδάργυρος, αν και αποτελεί απαραίτητο μικροθρεπτικό στοιχείο, σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει προβλήματα τοξικότητας στα φυτά. Χαρακτηριστικά συμπτώματα που υποδεικνύουν φυτοτοξικότητα Zn είναι η χλωρωτική εμφάνιση των νεαρών, κυρίως, φύλλων και δυστοκίες που ανακύπτουν κατά τη φυτική ανάπτυξη. Ωστόσο, ανάμεσα στα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα, θεωρείται ένα από τα λιγότερο φυτοτοξικά. Τοξικότητα ψευδαργύρου συναντάται, κυρίως, στις εξής κατηγορίες εδαφών:

- ❖ Σε εδάφη προερχόμενα από τη διαδικασία αποσάθρωσης μητρικών πετρωμάτων πλούσιων σε ψευδάργυρο,
- ❖ Σε εδάφη όξινα, υψηλής περιεκτικότητας σε οργανική ουσία και
- ❖ Σε εδάφη ρυπασμένα με ψευδάργυρο που προέρχεται από επιμεταλλώσεις.

Το είδος και ο γονότυπος του φυτού καθορίζουν και το όριο φυτοτοξικότητας (Μήτσιος, 2004). Σύμφωνα με τους Macnicol και Beckett (1985), για ένα μεγάλο αριθμό φυτών, τα συνηθέστερα όρια φυτοτοξικότητας κυμαίνονται από 100 έως 500mg Zn/L.

1.3.3. Κάδμιο (Cd)

Το κάδμιο είναι ένα μεταλλικό στοιχείο, ελαφρώς ασημο - άσπρου χρώματος, που ανήκει στην ΠΒ ομάδα του περιοδικού πίνακα, δηλαδή στα στοιχεία μετάπτωσης. Έχει ατομικό αριθμό (Z) 48, ενώ όσον αφορά τα φυσικά χαρακτηριστικά του, έχει ατομικό βάρος 112,41, σημείο τήξεως περί τους 320°C και σκληρότητα Mohs 2. Δε συγκαταλέγεται στα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία, ενώ χαρακτηρίζεται για την ισχυρά τοξική δράση του στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς. Στον άνθρωπο, το κάδμιο μπορεί να εισαχθεί τόσο με τη διατροφή του, όσο και με την εισπνοή ατμών CdO από βιομηχανίες ή το κάπνισμα.

Είναι γεγονός ότι η ρύπανση του περιβάλλοντος με κάδμιο παρουσίασε σημαντική αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες λόγω της πρόσφατης αξιοποίησής του, εν αντιθέσει με άλλα μέταλλα, όπως ο χαλκός και ο υδράργυρος, τα οποία χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες (Hutton, 1987). Ορισμένες από τις βιομηχανικές χρήσεις του καδμίου είναι η χρησιμοποίησή του σε αρκετά κράματα, σε χρωστικές ουσίες, όπως πλαστικά και βερνίκια, σαν προστατευτικό κάλυμμα στο ασφάλι, στα φωτοβολταϊκά κύτταρα, σαν σταθεροποιητής πλαστικών και για τον έλεγχο των πυρηνικών αντιδραστήρων (Μήτσιος, 2004). Όσον αφορά την προέλευση του καδμίου στο έδαφος, ισχύουν όσα προαναφέρθηκαν στην ενότητα 1.3. αναφορικά με τις πηγές ρύπανσης.

Το κάδμιο εμφανίζεται στο φυσικό περιβάλλον με αριθμό οξειδωσης +2, ενώ η κίνηση των ιόντων του επηρεάζεται από την οξύτητα (pH) του εδάφους και το δυναμικό οξειδοαναγωγής (Sposito and Page, 1984). Η περιεκτικότητα του εδαφικού διαλύματος σε κάδμιο εναπόκειται α) στην προσρόφησή του από τη στερεή φάση του εδάφους και β) στην καταβύθισή του (Μήτσιος, 2004). Σύμφωνα με τους Tiller et al. (1979) και Soon (1981), η περιεκτικότητα αυτή ελέγχεται σε μεγαλύτερο βαθμό από την προσρόφηση συγκριτικά με την καταβύθιση. Σε αυτό, όμως, καταλυτικό ρόλο διαδραματίζει η τιμή του pH του εδάφους, καθώς όταν αυτή ξεπερνάει μια κρίσιμη τιμή, η καταβύθιση υπερισχύει της προσρόφησης. Συνακόλουθα, αξίζει να σημειωθεί πως αυξανόμενης της τιμής του pH του εδάφους, παρατηρείται μείωση της περιεκτικότητας του εδαφικού διαλύματος σε κάδμιο. Αυτό, σύμφωνα με το Μήτσιο (2004), οφείλεται κυρίως:

- ❖ Στην αυξανόμενη τάση του καδμίου να προσροφάται στη στερεή φάση του εδάφους,
- ❖ Στην αύξηση της υδρόλυσης και
- ❖ Στην αύξηση του αρνητικού φορτίου που παρατηρείται στο έδαφος λόγω της μεταβολής του pH.

Ωστόσο, οι ερευνητές Chaney και Hornick (1977) και Babich και Stotzky (1978) διατείνονται ότι ακόμη και στην περίπτωση των αλκαλικών εδαφών το κάδμιο εμφανίζεται ευκίνητο, λόγω του σχηματισμού συμπλόκων.

Το κάδμιο του εδαφικού διαλύματος είναι σε θέση να σχηματίζει σύμπλοκα ιόντα και ενώσεις με ένα μεγάλο αριθμό οργανικών υποκαταστατών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάσχεση της πρόσληψής του από τα φυτά, μειώνοντας έτσι την τοξική του

επίδραση σε αυτά. Αρνητικό αντίκτυπο στην προσρόφηση του καδμίου στην στερεή φάση του εδάφους έχει η ύπαρξη άλλων ιόντων στο εδαφικό διάλυμα, όπως για παράδειγμα του χαλκού, του κοβαλτίου, του μολύβδου, του ψευδαργύρου και του ασβεστίου, μιας και παρουσιάζονται φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ αυτών των στοιχείων με το κάδμιο. Ένας ακόμη λόγος μείωσης της προσρόφησης θεωρείται και η αυξημένη παρουσία ιόντων χλωρίου στο εδαφικό διάλυμα. Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ των ιόντων του χλωρίου και του καδμίου είναι αρκετά σταθερά, με αποτέλεσμα την αύξηση της κινητικότητας του καδμίου και την ταυτόχρονη μείωση της προσρόφησης του (Smolders and McLaughlin, 1996). Αυτό το φαινόμενο μπορεί να παρατηρηθεί έντονα στα αλατούχα εδάφη, καθώς και σε εδάφη αρδευόμενα με αλατούχο νερό.

Τέλος, από ευρήματα των ερευνητών Alloway et al. (1988), Papadopoulos και Rowell (1988) και Temminghoff et al. (1995) προκύπτει πως η διαθεσιμότητα του καδμίου στα φυτά είναι μειωμένη σε εδάφη υψηλής περιεκτικότητας σε ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3), εξαιτίας της δέσμευσης του καδμίου από το ανθρακικό ασβέστιο. Βέβαια, η συγκέντρωση του καδμίου αποτελεί περιοριστικό παράγοντα της παραπάνω συνθήκης, δεδομένου του ότι όταν αυτή ξεπερνά μία κρίσιμη τιμή, η διαδικασία που προηγείται είναι η καταβύθιση του καδμίου υπό μορφή CdCO_3 (Μήτσιος, 2004).

Τοξικότητα Καδμίου (Cd)

Η τοξική δράση του καδμίου στα φυτά δύναται να εμφανιστεί με συμπτώματα όπως η καθυστερημένη ανάπτυξη των φυτών, η καταστροφή των ριζών τους και η χλωρωτική εμφάνιση των φύλλων ή και εμφάνιση κόκκινων – καφέ χρωματισμών στα άκρα τους. Κατά τους Cunningham et al. (1975), ως μεγαλύτερης σημαντικότητας τοξικό σύμπτωμα στους φυτικούς οργανισμούς μπορεί να θεωρηθεί η αναστολή της σύνθεσης της χλωροφύλλης και της ανθοκυανίνης. Σε επίπεδο φυσιολογίας, ως αποτελέσματα της φυτοτοξικότητας του καδμίου αναφέρονται η παρεμπόδιση της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής, η ανάσχεση του μεταβολισμού των θρεπτικών στοιχείων και η ελάττωση της διαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Όπως είναι φυσικό, κάθε φυτικό είδος προσλαμβάνει διαφορετικές ποσότητες καδμίου από το περιβάλλον.

Αναφορικά με τα όρια φυτοτοξικότητας, οι Kloke et al. (1984), επισημαίνουν πως σε ευαίσθητα είδη φυτών η συγκέντρωση καδμίου στην οποία παρουσιάζονται τοξικά

συμπτώματα κυμαίνεται από 5 έως 10mg/Kg ξηρής ουσίας, ενώ σύμφωνα με τους Macnicol και Beckett (1985), η αντίστοιχη συγκέντρωση κυμαίνεται από 10 έως 20mg/Kg ξηρής ουσίας (Μήτσιος, 2004).

1.3.4. Σχέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ Zn και Cd

Ως μέταλλα, τόσο ο ψευδάργυρος όσο και το κάδμιο ανήκουν στα στοιχεία μετάπτωσης του περιοδικού πίνακα και άρα κάποιες ιδιότητές τους παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες. Πιο συγκεκριμένα, τα δύο στοιχεία χαρακτηρίζονται από την ίδια τιμή ηλεκτραρνητικότητας, αναλογία όσον αφορά τη δομή του ιόντος τους, καθώς και από την ροπή τους να δεσμεύονται από το ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3) (Μήτσιος, 2004). Σύμφωνα με τον Epstein (1974), ο λόγος Zn:Cd όλων των πετρωμάτων ποικίλει από 27:1 έως 7000:1, με μία μέση τιμή της τάξεως του 400:1. Εξαιτίας της έντονης ανταγωνιστικής δράσης που αναπτύσσεται μεταξύ των δύο μετάλλων, η πρόσληψη του ενός είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη συγκέντρωση του άλλου στο εδαφικό διάλυμα. Έτσι, παρουσία υψηλής συγκέντρωσης Zn στο εδαφικό διάλυμα, δυσχεραίνεται η απορρόφηση Cd από μέρος του φυτού και αντιστρόφως, υποδεικνύοντας πως με τη διασφάλιση της ορθής θρέψης Zn μειώνονται οι τοξικές επιδράσεις του Cd στο φυτό (Foy et al., 1978; Lombi et al., 2000).

1.3.5. Φυτοεξυγίανση

Ο όρος Φυτοεξυγίανση, αναφέρεται σε κάθε σύστημα ή διαδικασία στην οποία χρησιμοποιούνται φυτά για την αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών ή υδάτων παράλληλα ή προς αντικατάσταση των συμβατικών μεθόδων εξυγίανσης. Αφορά σε μία *in situ* ή *ex situ* τεχνολογία η οποία δράτοντας των εγγενών ιδιοτήτων των φυτών, επιτυγχάνει τη μείωση της κινητικότητας, της τοξικότητας ή της συγκέντρωσης του ρύπου, ο οποίος μπορεί να βρίσκεται στο έδαφος, στον υδροφόρο ορίζοντα ή σε κάποιο άλλο ρυπασμένο μέσο (Schnoor et al., 1995; Cunningham et al., 1996; United States Environmental Protection Agency, 2000). Δεδομένης της αδυναμίας αποικοδόμησης των βαρέων μετάλλων από το έδαφος, είναι προφανές ότι η φυτοεξυγίανση συνιστά μία πολλά υποσχόμενη διαδικασία για την αποκατάσταση επιβαρυσμένων εδαφών. Ως πρώτη εφαρμογή φυτοεξυγίανσης αναφέρεται το 1991 η

προσπάθεια εξαγωγής Cd και Zn από το έδαφος, ενώ έκτοτε η εφαρμογή της επεκτάθηκε σε σημαντικό βαθμό (Etim, 2012).

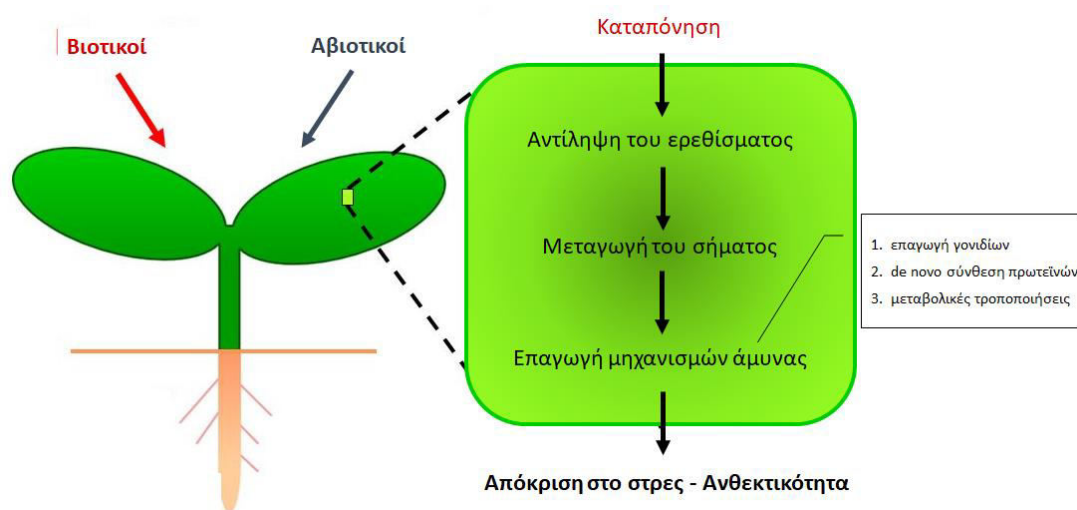
Οι μέθοδοι που συνιστούν την τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: την φυτοαπορρύπανση (phyto-decontamination) και την φυτοσταθεροποίηση (phyto-stabilization) (Cunningham et al., 1996). Η απορρύπανση του εδάφους από βαρέα μέταλλα με τη χρήση της φυτοεξυγίανσης βασίζεται στη χρησιμοποίηση φυτών - υπερσυσσωρευτών, τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν υψηλές ποσότητες μετάλλων έως και 100 φορές περισσότερο συγκριτικά με άλλα φυτά (McCrath, 1998). Χαρακτηριστικό παράδειγμα φυτού - υπερσυσσωρευτή αποτελεί το *Thlaspi caerulescens*, το οποίο έχει την ικανότητα να δεσμεύει έως και 26000 ppmZn χωρίς να εκδηλώνει συμπτώματα φυτοτοξικότητας, όταν για τα περισσότερα φυτικά είδη συγκεντρώσεις περί τα 100 ppm θεωρούνται τοξικές. Το ίδιο φυτό δύναται να συσσωρεύει και υψηλές ποσότητες καδμίου (Brown et al., 1995).

1.4. Μηχανισμοί άμυνας των φυτών έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων

Η άμυνα που προβάλλουν τα φυτά ενάντια στις αβιοτικές καταπονήσεις του περιβάλλοντός τους εναπόκειται τόσο σε δομικούς ή μόνιμους όσο και σε επαγόμενους μηχανισμούς. Στους δομικούς ή μόνιμους μηχανισμούς περιλαμβάνονται επί παραδείγματι το πάχος της εφυμενίδας, της ενδοδερμίδας και του κυτταρικού τοιχώματος, η ύπαρξη ή μη κηρών και η παρουσία τριχών (Τζάμος, 2007). Εντούτοις, εκείνοι που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι οι επαγόμενοι μηχανισμοί άμυνας, μιας και κινητοποιούνται όταν τα φυτά βρίσκονται εκτεθειμένα σε κάποια μορφή καταπόνησης. Επιπλέον, οι μηχανισμοί αυτού του τύπου, παραμένοντας σε λανθάνουσα κατάσταση και δρώντας μόνο όταν αυτό κρίνεται απαραίτητο, αποταμιεύουν πολύτιμη ενέργεια για το φυτό (Karban and Baldwin, 1997).

Η επιτυχής αντιμετώπιση ενός αβιοτικού παράγοντα καταπόνησης πραγματοποιείται μέσω της αντίληψης ενός σχετικού ερεθίσματος, της μεταγωγής του σήματος και της σύνθεσης πρωτεϊνών καταπόνησης από την έκφραση γονιδίων (Εικόνα 1.5). Βέβαια,

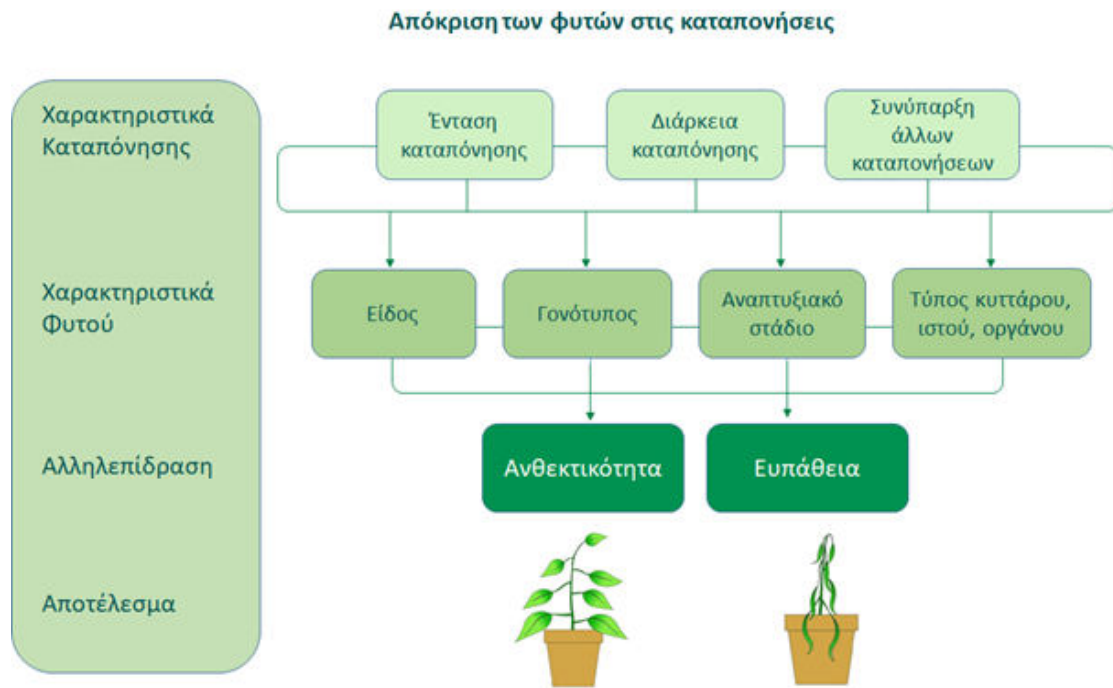
η διάρκεια και η ένταση του ερεθίσματος θα καθορίσουν σε μεγάλο βαθμό τον τρόπο με τον οποίο θα ανταποκριθεί το φυτό.



Εικόνα 1.5: Γενικευμένη απεικόνιση της αντίδρασης του φυτού, σε κυτταρικό επίπεδο, στους παράγοντες καταπόνησης - Ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας. Προϋπόθεση αποτελεί η αντίληψη του ερεθίσματος και η μεταγωγή του σήματος σε επίπεδο φυτού.

Πέραν του γονοτύπου, το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται το φυτό κατά την επίδραση της καταπόνησης διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στην απόκρισή του. Πιο συγκεκριμένα, ένα φυτό το οποίο χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικό σε ένα παράγοντα καταπόνησης σε ένα δεδομένο στάδιο ανάπτυξης, μπορεί να παρουσιάζει ευπάθεια στην ίδια καταπόνηση σε διαφορετικό στάδιο (Εικόνα 1.6). Η ανθεκτικότητα των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις χαρακτηρίζεται ως πολυγονιδιακή, καθιστώντας αναποτελεσματική την οποιαδήποτε προσπάθεια ενσωμάτωσης μονογονιδιακής ανθεκτικότητας.

Όσον αφορά την προστασία έναντι των τοξικών ιόντων που περιέχονται στο περιβάλλον τους, τα φυτά έχουν αναπτύξει δύο βασικές στρατηγικές αντιμετώπισης: τον αποκλεισμό, με βάση τον οποίο η συγκέντρωση των ιόντων στο εσωτερικό του φυτού διατηρείται σε χαμηλότερα επίπεδα από το όριο τοξικότητας και την εσωτερική ανεκτικότητα, η οποία περιλαμβάνει βιοχημικές προσαρμογές που παρέχουν στο φυτό τη δυνατότητα ανοχής, αδρανοποίησης σε υποκυτταρικά διαμερίσματα ή συμπλοκοποίησης αυτών των στοιχείων (Εικόνα 1.7).

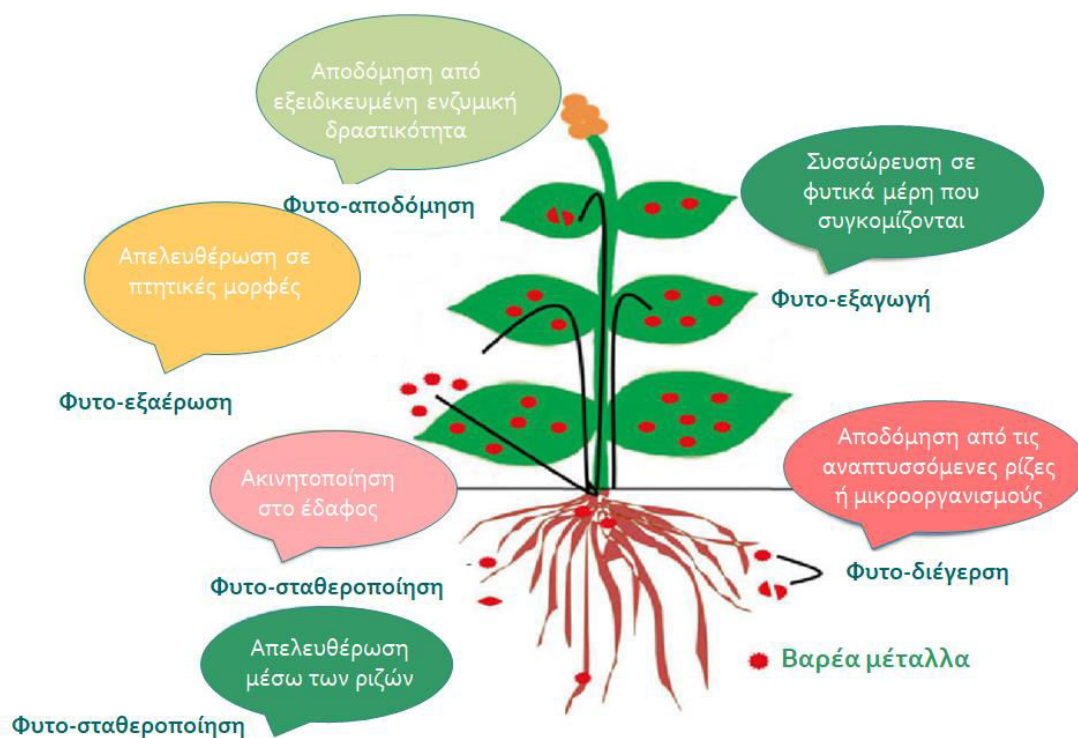


Εικόνα 1.6: Απόκριση των φυτών στις καταπονήσεις. Η αλληλεπίδραση μεταξύ φυτού και παράγοντα καταπόνησης εξαρτάται από πρόσθετους παράγοντες που σχετίζονται τόσο με το φυτό όσο και με την καταπόνηση. (Πηγή: ΜΔΕ Ζιάννα Ε, 2018)

Αποκλεισμός (Exclusion)

Παρουσία υψηλής συγκέντρωσης τοξικών μετάλλων στην περιοχή της ριζόσφαιρας, τα φυτά δύνανται να ελέγχουν την απορρόφηση και συσσώρευση μετάλλων είτε με τη συνδρομή του κυτταρικού τοιχώματος ως φυσικο-χημικού φραγμού και των αλληλεπιδράσεων των μετάλλων με την κυτοπλασματική μεμβράνη, είτε ρυθμίζοντας τις αντιδράσεις που διεξάγονται στη ριζόσφαιρα. Το τελευταίο δύναται να υλοποιηθεί διαμέσου εκκρινόμενων ουσιών από τις ρίζες ή με τη συνεπικούρηση της υπάρχουσας μικροχλωρίδας. Πιο συγκεκριμένα, το μικροβιακό φορτίο στο χώρο της ρίζας επηρεάζει την κινητικότητα και την πρόσληψη των ιχνοστοιχείων από μέρους των φυτών (Zimmer et al., 2009; De Maria et al., 2011), ενώ σύμφωνα με τους Baum et al. (2006), οι μυκοριζικοί μύκητες, μέσω των συμβιωτικών σχέσεών τους με τις ρίζες, ελέγχουν τη συσσώρευση και τον αποκλεισμό προς όφελος των ξενιστών τους. Ορισμένες από τις δράσεις των μυκοριζικών μυκήτων που συνδράμουν στην αποτοξικοποίηση είναι η προαγωγή της αύξησης και της ανάπτυξης των φυτών, ο

αποκλεισμός και η αδυναμία πρόσληψης των τοξικών ιόντων, κυρίως λόγω δέσμευσης και σχηματισμού χηλικών συμπλόκων, καθώς και η απομόνωσή τους στα χυμοτόπια των φυτικών κυττάρων και των μυκήτων (Cabral et al., 2015).



Εικόνα 1.7: Πιθανοί μηχανισμοί απόκρισης των φυτών σε καταπόνηση από βαρέα μέταλλα. (Πηγή: ΜΔΕ Μαγγιώρος Λ, 2018)

Όσον αφορά τις εκκρινόμενες διαμέσου των ριζών ουσίες, αυτές μπορεί να αποτελούνται από χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις (σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, δευτερογενείς μεταβολίτες), από υψηλότερου μοριακού βάρους ενώσεις (πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες) ή ιόντα (H^+ , Cl^- , NH_4^+) (Bais et al., 2006; Badri and Vivanco, 2009; Baetz and Martinoia, 2014). Οι ουσίες αυτές εκκρίνονται στη ριζόσφαιρα είτε με παθητικούς (λόγου χάρη διάχυση) είτε με ενεργητικούς μηχανισμούς μεταφοράς (χρήση μεταφορέων). Οι δεύτεροι απαιτούν την κατανάλωση ενέργειας (ATP) και επομένως η δράση τους συνδέεται άμεσα με την καταπόνηση από τα τοξικά μέταλλα, λόγω της επίδρασής τους στο μεταβολισμό των κυττάρων. Συνεκδοχικά, η έκκριση ουσιών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη

φωτοσυνθετική ικανότητα του φυτού, όμως, επειδή η υψηλή συγκέντρωση τοξικών μετάλλων παρεμποδίζει τη δυναμικότητα της φωτοσύνθεσης, η έκκριση περιορίζεται σημαντικά. Στη πλειονότητά τους, οι ουσίες αυτές εκκρίνονται από την κορυφή της ρίζας και από τη βάση των δευτερογενών ριζών (Walker et al., 2003), καθιστώντας πρόδηλη την ανάγκη των μερών αυτών σε φωτοσυνθετικά προϊόντα. Ως προς το λειτουργικό τους ρόλο, οι εκκρινόμενες ουσίες δύνανται να σχηματίσουν χημικά σύμπλοκα με τα ιχνοστοιχεία ή να αλλάξουν τη χημική συμπεριφορά των μετάλλων, μέσω της μεταβολής της οξύτητας (Ph) του εδαφικού διαλύματος, επηρεάζοντας τη διαθεσιμότητά τους για τα φυτά (Antoniadis et al., 2017).

Εσωτερική ανεκτικότητα

Σε αντίθεση με τη στρατηγική του αποκλεισμού, κατά την οποία τα φυτά στερούνται της δυνατότητας πρόσληψης ή/και μεταφοράς των τοξικών ιόντων εντός του σώματός τους, η στρατηγική της εσωτερικής ανεκτικότητας παρέχει στα φυτά τη δυνατότητα να αντεπεξέλθουν στην πρόσληψη αυτών των ιόντων. Αυτό μπορεί να προκύψει μέσω μιας πληθώρας μηχανισμών που διαθέτουν τα φυτά, οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορές τόσο σε επίπεδο φυτικού είδους όσο και σε επίπεδο γονοτύπου εντός του ίδιου είδους λόγω των αλληλεπιδράσεων γονοτύπου - περιβάλλοντος. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι οι κατωτέρω:

- ❖ Απομόνωση / διαμερισματοποίηση: Οι διαδικασίες αυτές διεκπεραιώνονται εντός του φυτικού κυττάρου (χυμοτόπιο, κυτταρικό τοίχωμα) ή σε ιστούς, όπως σε ωριμότερα φύλλα, στην επιδερμίδα και τις εκφύσεις της, ώστε να αποφευχθεί η αρνητική επίδραση των τοξικών μετάλλων στο μεταβολισμό του κυττάρου (Durand et al., 2011; Kozhevnikova et al., 2014; Parrotta et al., 2015). Το κυτταρικό τοίχωμα, πέραν του φυσικού και φυσιολογικού φραγμού που αποτελεί στην είσοδο των μετάλλων στο συμπλάστη, απαρτίζει και ένα σημαντικό σημείο συσσώρευσης μετάλλων, λόγω της παρουσίας πολυσακχαριτών πλούσιων σε καρβοξυλικές ομάδες και λιγνίνη.
- ❖ Δέσμευση / χήλωση: Ο σχηματισμός χηλικών συμπλόκων συμμετέχει στην ανεκτικότητα των φυτών στα τοξικά μέταλλα. Πιο συγκεκριμένα, το ιόν περιβάλλεται από το χηλικό μόριο κατά τη δημιουργία του συμπλόκου με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαττώνεται η χημική του ενεργότητα και άρα η τοξικότητά του. Το χηλικό σύμπλοκο που δημιουργείται είναι δυνατό να μεταφερθεί σε άλλα

μέρη του φυτού και μάλιστα έως σε μεγάλες αποστάσεις ή να αποθηκευτεί εκτός του κυτοπλάσματος, συνηθέστερα στο χυμοτόπιο (Mickelbart et al., 2015). Ορισμένα χημικά μόρια που δύνανται να χρησιμοποιηθούν από μέρους των φυτών είναι τα οργανικά οξέα, οι φαινολικές ενώσεις και τα πεπτίδια δέσμησης μετάλλων, όπως οι φυτοχηλίνες και οι μεταλλοθειονίνες. Οι φυτοχηλίνες συνιστούν χαμηλού μοριακού βάρους θειόλες αποτελούμενες από τα αμινοξέα γ - Γλουταμικό, κυστεΐνη και γλυκίνη, ενώ η βιοσύνθεσή τους επάγεται από το ένζυμο συνθάση των φυτοχηλινών (Corbett and Goldsbrough, 2002). Έχει αποδειχθεί πως η επαγωγή της σύνθεσης των φυτοχηλινών παρέχει στα φυτά ανθεκτικότητα στο Cd και το As (Mickelbart et al., 2015).

- ❖ Έκκριση από τα υπέργεια μέρη των φυτών: Ορισμένα φυτά έχουν αναπτύξει αυτό το μηχανισμό άμυνας, προκειμένου να αντιμετωπίζουν τις υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων στο εδαφικό τους διάλυμα. Επί παραδείγματι, σε φυτά καπνού βρέθηκε πως σε συνθήκες καταπόνησης Zn προκλήθηκε η παραγωγή κρυσταλλικών κόκκων Ca/Zn στα κορυφαία κύτταρα των τριχών και επομένως η έκκριση ενώσεων του Zn εκτός του φυτού (Saret et al., 2006).
- ❖ Ενζυμικοί και μη - ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες: Η τοξικότητα μετάλλων προκαλεί την ανάπτυξη οξειδωτικής καταπόνησης στους φυτικούς οργανισμούς, μέσω της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την κατανάλωση αυτών των μορφών οξυγόνου (Sytar et al., 2013), ούτως ώστε να υπάρχει μία διαρκής ισορροπία μεταξύ παραγωγής και κατανάλωσης των ROS. Η διατήρηση αυτής της ισορροπίας έχει ως απότοκο την αντοχή των φυτών, την προστασία των απαραίτητων μακρομορίων και τη λειτουργικότητα και ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης.

Οι παραπάνω μηχανισμοί ενδέχεται να δρουν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο ή σε συνδυασμό μεταξύ τους (Antoniadis et al., 2017).

1.5. Βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων

Προκειμένου να ανασχεθούν τα προβλήματα που υφίστανται τα φυτά από τις αβιοτικές καταπονήσεις και να εξασφαλιστεί η οικονομική βιωσιμότητα των καλλιεργειών, γίνεται προσπάθεια από την ερευνητική κοινότητα ανάπτυξης ανθεκτικών γονοτύπων διαμέσου της επιστήμης της γενετικής βελτίωσης. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, αξιοποιούνται προσεγγίσεις κλασσικής βελτίωσης ενώ τις τελευταίες δεκαετίες, προσελκύουν ολοένα και περισσότερο το ενδιαφέρον τα επιτεύγματα της μοριακής βιολογίας καθώς και τα σύγχρονα βιοτεχνολογικά εργαλεία.

Πρόοδος στον τομέα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας έχει προέλθει διαμέσου της αποσαφήνισης των φυσιολογικών, βιοχημικών και μοριακών μηχανισμών αντοχής των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις, καθώς και μέσω της ανάπτυξης ανθεκτικών γονοτύπων αξιοποιώντας τις διαδικασίες της γενετικής τροποποίησης ή της μοριακής βελτίωσης, που επικουρείται κυρίως από την υποβοηθούμενη από μοριακούς δείκτες επιλογή (MAS) (Ashraf, 2010; Patade et al., 2011a, b, c; Niu et al., 2012). Στον κλάδο της βιοτεχνολογίας φυτών, κεντρική θέση καταλαμβάνει η τεχνολογία της γενετικής μηχανικής καθώς προσφέρει τη δυνατότητα της στοχευμένης τροποποίησης της γενετικής σύστασης για την αποτελεσματική αναβάθμιση της ανθεκτικότητας των φυτών σε καταπονήσεις. Προς την κατεύθυνση αυτή, σημαντικό ερευνητικό στόχο αποτελεί η αναγνώριση και αξιοποίηση γονιδίων που συμβάλουν προς την επίτευξη ευρείας και σταθερής στο χρόνο ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων.

Η δυσκολία που χαρακτηρίζει τη βελτίωση της ανθεκτικότητας σε αβιοτικές καταπονήσεις έγκειται στην πολυπλοκότητα του γενετικού υπόβαθρου των γνωρισμάτων αυτών (πολυγονιδιακός έλεγχος), στη σημαντική αλληλεπίδραση γονοτύπου και περιβάλλοντος καθώς και στην έλλειψη κατάλληλων μεθόδων επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων. Στο παρελθόν, η γονοτυπική αξιολόγηση σε επίπεδο αγρού για ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις στηριζόταν στο φαινότυπο (μακροσκοπικά συμπτώματα) καθώς και στην εκατοστιαία απώλεια απόδοσης (μείωση της παραγόμενης χρήσιμης βιομάζας) κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες καταπόνησης σε κρίσιμα για το φυτό στάδια. Για την ποσοτικοποίηση του

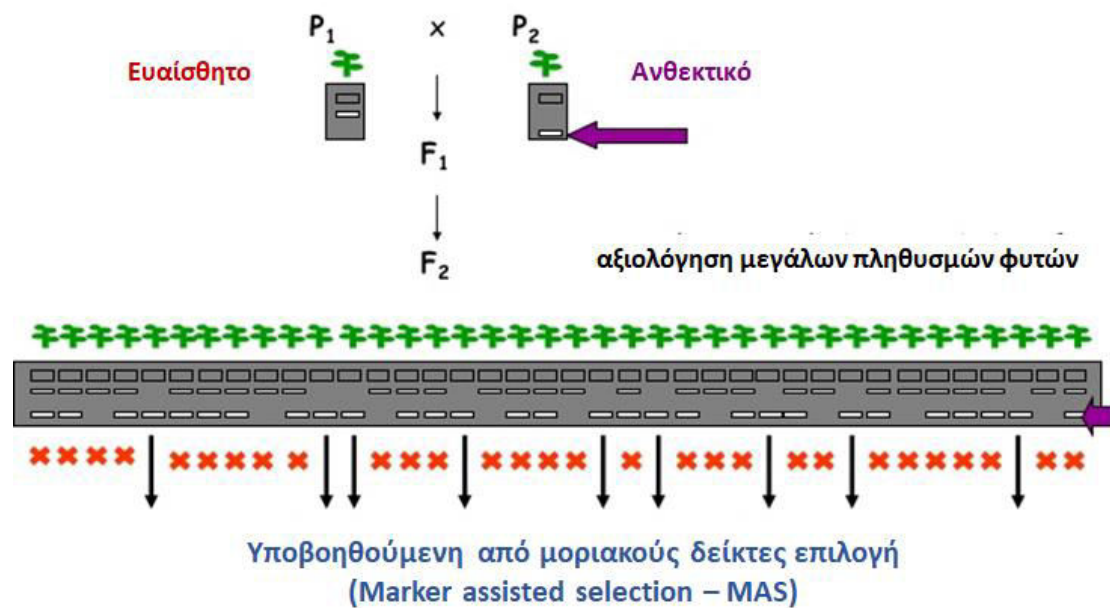
επιπέδου ανθεκτικότητας και την αξιολόγηση αυτής, προτάθηκε η καταγραφή του αριθμού των φυτών που νεκρώθηκαν κατά την έκθεσή τους στον παράγοντα καταπόνησης συγκριτικά με τα φυτά - μάρτυρες που δεν εκτέθηκαν σε αυτόν (Coram et al., 2007; Mantri et al., 2010). Εντούτοις, η αξιολόγηση γονοτύπων υπό περιοριστικές συνθήκες στον αγρό είναι μία διαδικασία επίπονη, εξαιρετικά χρονοβόρα, καταστροφική για το εξεταζόμενο φυτικό υλικό και συχνά με περιορισμένα αποτελέσματα. Για να υπερνικηθούν αυτά τα προβλήματα, έχουν αναπτυχθεί μη «καταστροφικές» μέθοδοι υπολογισμού της βιομάζας, οι οποίες βασίζονται στη δορυφορική τηλεανίχνευση (Heiskanen, 2006; Masuka et al., 2012). Ωστόσο, σε πρακτικό επίπεδο, οι περιορισμοί που συνοδεύουν τις αξιολογήσεις υπό συνθήκες αγρού σχετίζονται με i) το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση γονοτύπου-περιβάλλοντος καθιστά αναγκαία την αξιολόγηση μεγάλου αριθμού γονοτύπων και επαναλήψεων, ii) τη δυσκολία επίτευξης ομοιόμορφων συνθηκών καταπόνησης σε εκτεταμένα πειράματα αγρού, iii) τη δυσκολία αξιολόγησης της ανθεκτικότητας λόγω της σύνθετης γενετικής βάσης του γνωρίσματος και iv) στη συνύπαρξη της υπό μελέτη καταπόνησης με άλλους παράγοντες βιοτικής ή/και αβιοτικής καταπόνησης.

Προκειμένου να ενισχυθεί η εγκυρότητα των επιλογών ανθεκτικού υλικού, μέσω πρώιμων ή/και όψιμων επιλογών, έχει αναπτυχθεί πληθώρα φυσιο - βιοχημικών δεικτών για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας (Chen et al., 2007; Smethurst et al., 2009). Ειδικότερα, η έμμεση επιλογή ανθεκτικών γονοτύπων σε αβιοτικές καταπονήσεις δύναται να διεκπεραιωθεί τόσο σε εργαστηριακό επίπεδο, με *in vitro* καλλιέργεια ή στο θερμοκήπιο, όσο και στον αγρό. Για την αξιολόγηση χρησιμοποιείται ένα σύνολο δεικτών, όπως ο ρυθμός φωτοσύνθεσης που εναπόκειται στην αφομοίωση του CO₂, η στοματική αγωγιμότητα, ο φθορισμός της χλωροφύλλης, καθώς και πλήθος ηλεκτροφυσιολογικών χαρακτηριστικών (Munns and James, 2003; Chen et al., 2007; Smethurst et al., 2009). Η φαινοτυπική αξιολόγηση των φυτών συνεπικουρεί στη γενετική ανάλυση της ανθεκτικότητας, αποσαφηνίζοντας τον τρόπο λειτουργίας των μηχανισμών άμυνας. Λόγω των προβλημάτων που αναφέρονται με τις κλασικές μεθόδους αξιολόγησης, έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια καινοτόμες μέθοδοι απεικόνισης, υψηλής διεκπεραιωτικότητας (Roy et al., 2011; Yang et al., 2013), οι οποίες παρέχουν ποσοτικά δεδομένα σχετικά με τη φυτική ανάπτυξη, τη φυτοϋγεία και την αποτελεσματικότητα χρήσης εισροών, υπό συνθήκες καταπόνησης. Αυτό υλοποιείται με τη λήψη ενός επαρκούς αριθμού φωτογραφιών

του ίδιου φυτού σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και μήκη κύματος (Morison et al., 2008; Jones et al., 2009).

Αναφορικά με την *in vitro* επιλογή, αυτή πλεονεκτεί ως προς τις ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος που επιτυγχάνονται, τον υψηλό αριθμό γονοτύπων που δύνανται να αξιολογηθεί σε περιορισμένο χώρο και σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, καθώς και την απαλλαγή τους από ασθένειες (Patade and Suprasanna, 2008; Patade et al., 2008). Οι Patade και Suprasanna (2009), αξιολόγησαν *in vitro* την ανθεκτικότητα γενετικά τροποποιημένων φυτών ζαχαροκάλαμου στην αλατότητα, εκθέτοντας εμβρυογενετικούς κάλλους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl και εξετάζοντας το σχετικό ρυθμό ανάπτυξης, τη ζωτικότητα του κυττάρου και την ενδεχόμενη βλάβη της μεμβράνης. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν την *in vitro* επιλογή ως ένα πολύτιμο εργαλείο για την αποτελεσματική αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του ζαχαροκάλαμου στην αλατότητα, γεγονός που δύναται να επιτρέψει την καλλιέργεια του είδους σε περιοχές με προβλήματα αλατότητας. Τέλος, η αξιολόγηση για ανθεκτικότητα στην τοξικότητα αργιλίου (Al) με υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας είναι η πιο κοινή μέθοδος, διότι δεν είναι «καταστροφική» για τα φυτά και επιπλέον επιτρέπει την εύκολη πρόσβαση στο ριζικό σύστημα, τον έλεγχο του pH και της διαθεσιμότητας των στοιχείων (Wang et al., 2006; Arenhart et al., 2013). Κύρια κριτήρια αξιολόγησης αποτελούν το μήκος και η ύπαρξη στιγμάτων στη ρίζα.

Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί προσεγγίσεις πρώιμων επιλογών με αξιοποίηση μοριακών δεικτών οι οποίοι είναι στενά συνδεδεμένοι με το επιθυμητό γνώρισμα και καθιστούν εφικτή την έμμεση επιλογή (MAS). Πέραν της δυνατότητας πρώιμης επιλογής που οδηγεί σε σημαντική επιτάχυνση της βελτιωτικής διαδικασίας, οι δείκτες αυτοί ενισχύουν την αποτελεσματικότητα των επιλογών καθώς η αξιολόγηση γίνεται σε μοριακό επίπεδο και είναι απαλλαγμένη από την αλληλεπίδραση γονοτύπου-περιβάλλοντος (Ribaut and Ragot, 2007; Wei et al., 2009; Ashraf and Foolad, 2013) (Εικόνα 1.8).



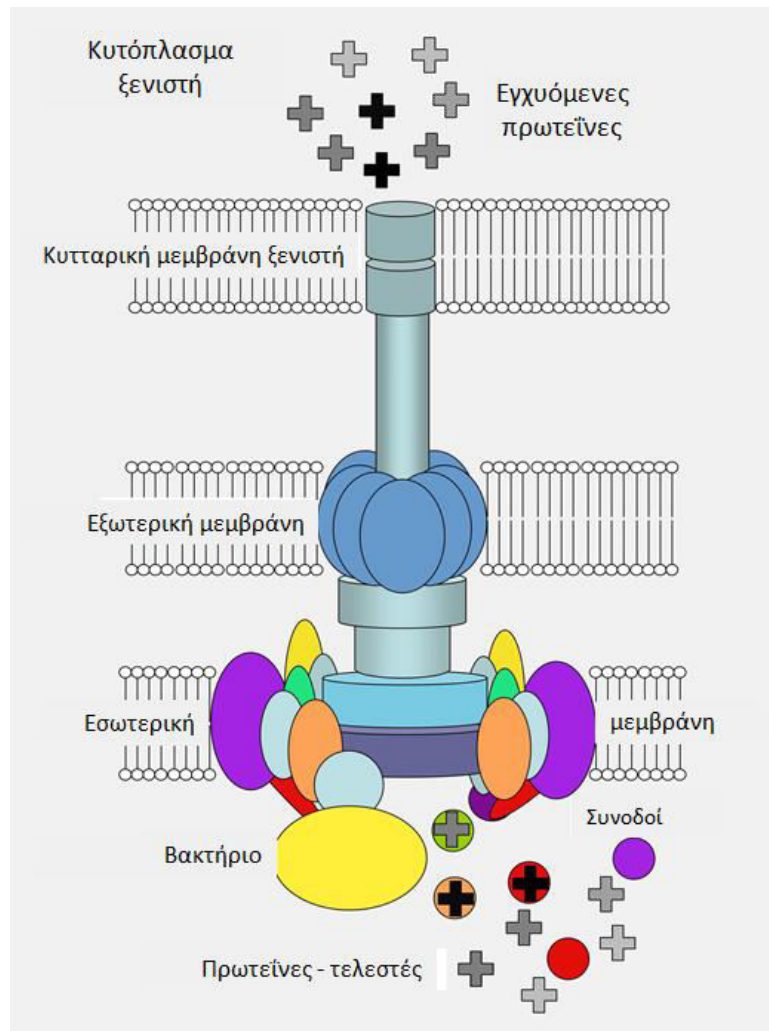
Εικόνα 1.8: Υποβοηθούμενη από μοριακούς δείκτες επιλογή (Marker assisted selection – MAS). Μέθοδος όπου η φαινοτυπική αξιολόγηση βασίζεται στη χρήση μοριακών δεικτών. (Πηγή: <https://www.slideshare.net/FAOoftheUN/marker-assisted-selection-55689355>)

1.6. Αξιοποίηση χαρπινών για βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων

1.6.1. Οι χαρπίνες (Harpins)

Οι χαρπίνες (ή πρωτεΐνες τελεστές) συνιστούν μία ομάδα υδρόφιλων πρωτεϊνών που συγκροτούν το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS) των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, το οποίο με τη σειρά του παρέχει τη δυνατότητα μεταφοράς των πρωτεϊνών - τελεστών των βακτηρίων εντός των κυττάρων του φυτού - ξενιστή τους (Εικόνα 1.9). Ως πρωτεΐνες, είναι πλούσιες σε γλυκίνη, δε διαθέτουν κυστεΐνες, ενώ διακρίνονται για τη θερμική τους σταθερότητα και την ικανότητα έκκρισής τους σε βακτηριακό θρεπτικό μέσο. Επιπλέον, έχουν όξινο χαρακτήρα, παρουσιάζουν ευαισθησία στην πρωτεάση και σύμφωνα με τον Li (2007), εκφραζόμενου του συστήματος Hrp δύνανται να εκκριθούν σε θρεπτικό μέσο. Η επαγωγή τους εναπόκειται στην κατάλληλη ρύθμιση των γονιδίων *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity genes - *hrp*), ενώ ως προς τη δράση τους, οι πρωτεΐνες αυτές επιτυγχάνουν να

διεγείρουν την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) (Ταμπακάκη, 1999), αν και για τα διάφορα είδη χαρπίνης που υπάρχουν, η ικανότητα διέγερσης ποικίλλει σημαντικά.



Εικόνα 1.9: Τα δομικά χαρακτηριστικά του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου 3 (T3SS). Τα κύρια συστατικά του αφορούν σε δομικές πρωτεΐνες (structural proteins), πρωτεΐνες-τελεστές (effectors) και συνοδούς (chaperons). (Πηγή: <http://webdeptos.uma.es/genetica/tipoiiii/Research.html>)

Η ανακάλυψη των γονιδίων *hrp* προήλθε από την παρατήρηση ότι κατά την έγχυση βακτηρίων *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, των οποίων το εκκριτικό σύστημα τύπου III είχε υποστεί δομικές μεταβολές, στον κυτταρικό αποπλάστη διαπιστώθηκε η αδυναμία πρόκλησης συμπτωμάτων ασθένειας σε φυτά - ξενιστές ή αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά - μη ξενιστές (Lindgren et al., 1986). Οι

χαρπίνες προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά στο βακτηριακό γένος *Erwinia spp.*, το οποίο διαθέτει τις HrpN και HrpW, ωστόσο, μέχρι σήμερα, έχει εντοπιστεί και σε άλλα γένη βακτηρίων, όπως τα *Xanthomonas spp.*, με τις χαρπίνες HraGe, HraI και XorA, *Ralstonia spp.* με τη PopA1 και *Pseudomonas spp.* με τις HrpZ1, HrpW1 και HrpAK1 (Wei et al., 1992; He et al., 1993; Li et al., 2010; Tampakaki et al., 2010).

Τα γονίδια (*hrp*) που κωδικοποιούν χαρπίνες συγκροτούν ομάδες (γονιδιακές νησίδες) των 20 - 27 γονιδίων (*hrp*-gene clusters) χαρακτηριστικού μεγέθους (23 - 40kb) και οργάνωσης, οι οποίες ανιχνεύονται είτε σε χρωμοσώματα είτε σε μεγαπλασμίδια (Alfano and Colmer, 1997; He et al., 1998). Ανάλογα με τα γονίδια που διαθέτουν και το βαθμό ομολογίας τους, οι ομάδες αυτές δύνανται να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες. Η μεν πρώτη περιλαμβάνει τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και *Erwinia*, ενώ η δεύτερη τα γένη *Xanthomonas* και *Ralstonia* (Alfano and Colmer, 1997).

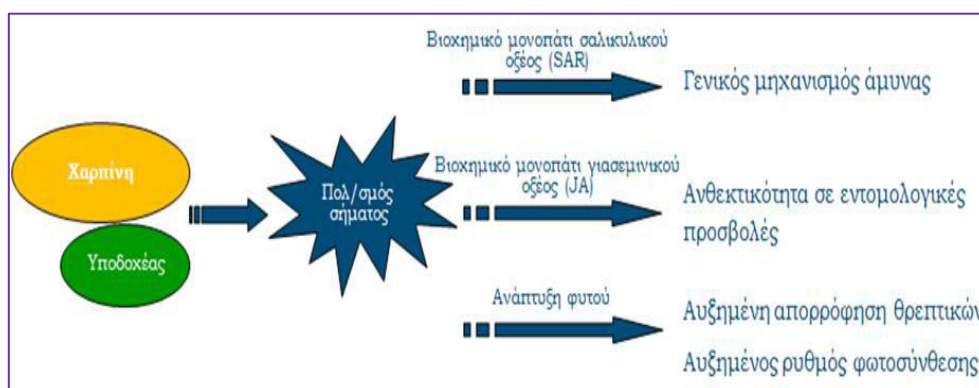
Είναι άξιο αναφοράς το γεγονός ότι οι χαρπίνες ορισμένων βακτηρίων δύνανται να μιμηθούν τον τρόπο δράσης ορισμένων ορμονών που διαθέτουν τα φυτά. Επί παραδείγματι, οι χαρπίνες του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* είναι σε θέση να μιμηθούν το ιασμονικό οξύ (JA) και να προκαλέσουν άνοιγμα των στομάτων των φύλλων, διευκολύνοντας έτσι την είσοδο του παθογόνου στον αποπλάσματικό χώρο των φυτικών κυττάρων. Επιπλέον, τόσο τα παθογόνα όσο και τα φυτά - ξενιστές τους διακρίνονται από μία παράλληλη αλλά ταυτόχρονα ανεξάρτητη εξελικτική πορεία μέσα στο χρόνο, γεγονός το οποίο διαφαίνεται μέσα από την αδυναμία των χαρπινών ενός παθογόνου να δράσουν αποτελεσματικά εναντίον ενός ξενιστή ο οποίος διαφέρει εξελικτικά με τους ήδη υπάρχοντες, οδηγώντας σε αδυναμία εξάπλωσης του παθογόνου (Jones and Dangl, 2006).

1.6.2. Ο ρόλος των χαρπινών στα φυτά

Η ύπαρξη των χαρπινών στα φυτά, είτε μέσω της έκφρασης διαγονιδίων *hrp*, τα οποία ενσωματώθηκαν στο φυτικό γονιδίωμα διαμέσου παροδικού ή σταθερού γενετικού μετασχηματισμού, είτε μέσω της εξωγενούς εφαρμογής τους σε αυτά, επάγει μία σειρά αντιδράσεων σε κυτταρικό επίπεδο που σχετίζονται με τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών (τοπικών ή διασυστηματικών). Η ενεργοποίηση των μηχανισμών

άμυνας οδηγεί στην εκδήλωση ανθεκτικότητας τόσο σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Strobel et al., 1996; Dong et al., 1999; Peng et al., 2003) όσο και σε αβιοτικές καταπονήσεις, όπως είναι η ξηρασία (Dong et al., 2005; Tampakaki et al., 2010) (Εικόνα 1.10). Εντούτοις, ο ακριβής ρόλος των πρωτεϊνών τελεστών στα φυτά δεν έχει πλήρως αποσαφηνισθεί.

Το ενδιαφέρον προς τις χαρπίνες δεν περιορίζεται μόνο στην κινητοποίηση των αμυντικών μηχανισμών των φυτών, αλλά και στη θετική επίδραση που ασκούν στη ανάπτυξή τους. Ειδικότερα, δύνανται να βελτιώσουν παραμέτρους όπως η ευρωστία, η φωτοσυνθετική ικανότητα, η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και ο αναπτυξιακός τους ρυθμός (Kim and Beer, 2000; Oh and Beer, 2007; Pavli et al., 2011). Συνεπώς, μπορεί να επιτευχθεί βελτίωση του ποσοστού φυτρώματος των σπόρων, εκτενέστερη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και του υπέργειου φυτικού μέρους. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τους Jang et al. (2006), οι χαρπίνες επιδρούν και επί των μορφολογικών γνωρισμάτων των φυτών, λόγω χάρη περιορίζοντας το μέγεθος των κυττάρων της επιδερμίδας ή τον αριθμό των καμβιακών κυττάρων.



Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου των χαρπινών στα φυτά. (Πηγή: Pavli et al., 2008)

Η πληροφορία για την ενδεχόμενη ύπαρξη εξειδικευμένου υποδοχέα (receptor) χαρπινών στους φυτικούς οργανισμούς εκλείπει μέχρι στιγμής, εντούτοις σε φυτά καπνού έχει προσδιοριστεί ένα γονίδιο κινάσης το οποίο ενδέχεται να διαδραματίζει το ρόλο του υποδοχέα (Schreiber and Desveaux, 2008). Η μελέτη των χαρπινών, εν γένει, είναι ήδη εκτεταμένη και συνεχίζει αδιάλειπτα σε σχέση τόσο με πεδία που αφορούν το λειτουργικό τους ρόλο στα φυτοπαθογόνα βακτήρια και τους

αντίστοιχους ξενιστές τους, όσο και με τη δυνατότητά τους να συνεπικουρήσουν στην επαγωγή ανθεκτικότητας στα φυτά, έναντι βιοτικών ή/και αβιοτικών περιοριστικών παραγόντων. Παράδειγμα αποτελεί η ενδογενής έκφραση της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}} του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* σε φυτά καπνού του είδους *Nicotiana benthamiana* και διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου για επαγωγή ανθεκτικότητας στον ιό της ριζομανίας των ζαχαρότευτλων (*Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV), η οποία οδήγησε σε επίτευξη ανθεκτικότητας αλλά και προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (Pavli et al., 2011).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως οι χαρπίνες δύνανται πλέον να εφαρμοστούν εξωγενώς στα φυτά, είτε με διαφυλλικούς ψεκασμούς, είτε με ριζοπότισμα αυτών, μέσω διαφόρων εμπορικών σκευασμάτων. Το πρώτο και ευρύτερα γνωστό εμπορικό σκεύασμα που δημιουργήθηκε είναι το Messenger, αποτελούμενο από τη χαρπίνη HrpEa του *Erwinia amylovora*, το οποίο κατά την εφαρμογή του στα φυτά προκαλεί την κινητοποίηση ενζύμων προκειμένου να παράγουν πρωτεΐνες, οι οποίες με τη σειρά τους επάγουν γνωστά βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών. Σύμφωνα με μελέτες που διεξήχθησαν σχετικά με την εφαρμογή του Messenger, προτείνεται ότι προσδίδει ανθεκτικότητα σε μία πληθώρα φυτικών ειδών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων, ενώ παράλληλα οδηγεί σε αυξημένη ευρωστία, υψηλότερη φωτοσυνθετική ικανότητα και βελτίωση της απορρόφησης θρεπτικών συστατικών από το έδαφος (<http://www.triachem.com/Products>).

1.7. Το φυτό - μοντέλο *Nicotiana benthamiana*

Το φυτικό είδος *Nicotiana benthamiana* συνιστά ένα ημεδαπό της Αυστραλίας άγριο είδος καπνού, το οποίο διαθέτει 19 ζεύγη χρωμοσωμάτων και γονιδιωματικό μέγεθος περί τα 3,136 Mbp (Εικόνα 1.11). Διακρίνεται από μεγάλη ποικιλομορφία αναφορικά με τους γενετικούς, μορφολογικούς και φυσιολογικούς του χαρακτήρες, εξαιτίας της προσαρμογής του σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Ο λόγος για τον οποίο το φυτό αυτό ξεκίνησε τα τελευταία χρόνια να αναρριχάται στους κόλπους της επιστημονικής κοινότητας είναι η δυνατότητα χρήσης του ως φυτό - μοντέλο, καθώς κατέχει μερικά εξέχοντα χαρακτηριστικά. Ειδικότερα, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι δύναται να μετασχηματιστεί και να αναγεννηθεί με σχετική ευχέρεια, παρέχοντας τη δυνατότητα έκφρασης πλήθους διαγονιδίων και συνάμα της αξιολόγησης του λειτουργικού τους

ρόλου. Αξίζει να σημειωθεί πως η διεθνής βιβλιογραφία βρίθει μεθοδολογιών που αφορούν τόσο το σταθερό όσο και τον παροδικό μετασχηματισμό του φυτικού είδους. Επιπρόσθετα, λόγω του σχετικά σύντομου βιολογικού του κύκλου, οι διαδικασίες του γενετικού μετασχηματισμού, της αναγέννησης και της αξιολόγησης της ανθεκτικότητας ή του λειτουργικού ρόλου του κατά περίπτωση εξεταζόμενου διαγονιδίου διεκπεραιώνονται με ταχύτερους ρυθμούς. Τέλος, η δυνατότητα εύκολης και γρήγορης ανάπτυξής του (Li et al., 2012), καθώς και το γεγονός ότι αποτελεί ξενιστή για μία πλειάδα παθογόνων που δεν προσβάλλουν το *Arabidopsis thaliana*, ένα εξίσου ευρέως χρησιμοποιούμενο φυτό - μοντέλο, καθιστούν δυνατή τη συναγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τα καλλιεργούμενα είδη της ίδιας οικογένειας (Solanaceae) και με τις σχέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ φυτών και παθογόνων.



Εικόνα 1.11: Το φυτό μοντέλο *Nicotiana benthamiana*. (Πηγή: https://www.google.gr/search?q=nicotiana+benthamiana&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiU6seh4trdAhXQYVAKHSeYBYUQ_AUICigB&biw=1366&bih=613#imgrc=_CkZ3F_3UinpKM:)

1.8. Σκοπός της μελέτης

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι βακτηριακής προέλευσης χαρπίνες διαθέτουν την ικανότητα να επάγουν μηχανισμούς άμυνας σε μια πληθώρα φυτικών οργανισμών, τόσο έναντι βιοτικών όσο και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Έχοντας αυτό ως δεδομένο, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της ενδεχόμενης δυνατότητας της χαρπίνης HrpZ_{P_{sp}} να επάγει την ανθεκτικότητα φυτών σε συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα.

Στο πλαίσιο αυτό, γενετικό υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν διαγονιδιακές σειρές του άγριου είδους καπνού *Nicotiana benthamiana*, οι οποίες εκφράζουν τη χαρπίνη HrpZ_{P_{sp}} από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{P_{sp}}), ώστε η πρωτεϊνική έκφραση να κατευθύνεται στον αποπλάστη των κυττάρων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος των διαθέσιμων διαγονιδιακών σειρών (T₂) για την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του SP/hrpZ_{P_{sp}}, και οι επιλεγμένες ομοζύγωτες σειρές αποτέλεσαν το υλικό για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης από κάδμιο και ψευδάργυρο. Η απόκριση των SP/hrpZ_{P_{sp}}-σειρών αξιολογήθηκε συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου και βασίστηκε στον προσδιορισμό του δυναμικού βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των νεαρών σπορόφυτων υπό συνθήκες καταπόνησης καδμίου και ψευδαργύρου. Τα αποτελέσματα προσδοκείται να ενισχύσουν τα μέχρι τώρα δεδομένα για την δυνατότητα αξιοποίησης των χαρπινών ως μέσου για την επίτευξη ευρείας ανθεκτικότητας και ειδικότερα της αντιμετώπισης των αβιοτικών καταπονήσεων και συγκεκριμένα της αυξημένης συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων.

2. Υλικά και Μέθοδοι

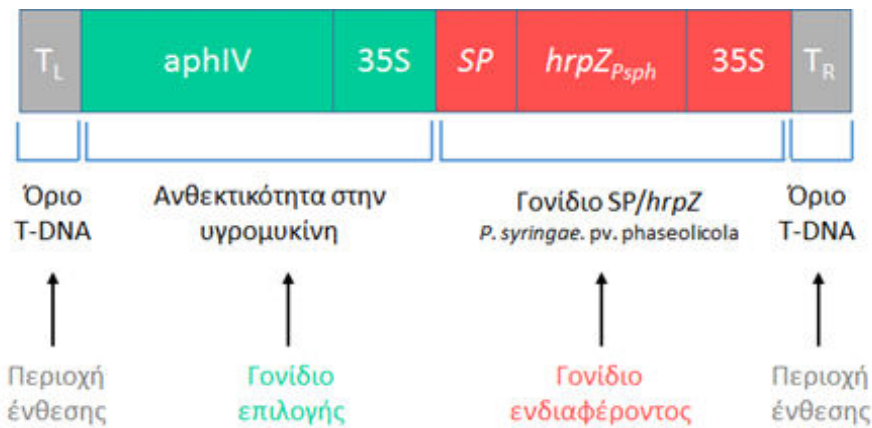
2.1. Φυτικό υλικό

Στην παρούσα διατριβή, το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα προέρχεται από προγενέστερη έρευνα, κατά την οποία αναπτύχθηκαν διαγονιδιακά φυτά του άγριου είδους καπνού *Nicotiana benthamiana* που εκφράζουν το διαγονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}* (Pavli et al., 2011; 2012).

Το είδος *Nicotiana benthamiana*, όπως έχει προαναφερθεί, αποτελεί σημαντικό φυτό - μοντέλο στο πλαίσιο της βελτίωσης των φυτών, με ευρεία χρήση σε μελέτες που αφορούν τη λειτουργία διαγονιδίων καθώς και σε έρευνες σχετικές με την αλληλεπίδραση φυτών-παθογόνων. Η έκθεση σε συνθήκες καταπόνησης και η μετέπειτα αξιολόγηση ανάπτυξης διαγονιδιακής ανθεκτικότητας αφορούν φυτά T₂ γενιάς.

Ο σταθερός μετασχηματισμός των φυτών έγινε με τη χρήση του στελέχους C58C1 του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*, ενώ ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω του πλασμιδίου pBin.Hyg.Tx-SP/*hrpZ_{P_{sph}}* (Tampakaki and Panopoulos, 2000). Το γονίδιο *hrpZ*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121, μεγέθους 995 bp, εκφράστηκε στο πλασμίδιο ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης της πρωτεΐνης παθογένειας του καπνού PR1.

Η σύντηξη με το SP έγινε προκειμένου να κατευθυνθεί η έκκριση της πρωτεΐνης στον αποπλάσματικό χώρο των φυτών (Tampakaki and Panopoulos, 2000; Pavli et al., 2011; 2012). Στην Εικόνα 2.1 απεικονίζεται η γονιδιακή κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό 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

2.2.1 Επιλογή των διαγονιδιακών σειρών

Όπως προαναφέρθηκε, το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή του πειράματος αποτελούταν από διαγονιδιακά φυτά του άγριου είδους καπνού *Nicotiana benthamiana*, τα οποία εκφράζουν το διαγονίδιο SP/*hrpZ_{Psph}* (Pavli et al., 2011; 2012). Ειδικότερα, έγινε χρήση σπόρων T₂ γενιάς οι οποίοι ελέγχθηκαν για τη διαγονιδιακή τους φύση και την ομοζύγωτη ή ετεροζύγωτη έκφραση του διαγονιδίου SP/*hrpZ_{Psph}*.

Ο έλεγχος της διαγονιδιακής φύσης των φυτών (T₂ γενιά) υλοποιήθηκε μέσω της βλάστησης των σπόρων σε θρεπτικό μέσο επιλογής, το οποίο περιείχε το αντιβιοτικό επιλογής υγρομυκίνη (30mg/L). Στο πλαίσιο αυτό, ελέγχθηκαν 12 διαγονιδιακές σειρές, ενώ για κάθε σειρά αξιολογήθηκαν 30 σπόροι στο σύνολο (15 σπόροι/τριβλίο). Προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της χρησιμοποιούμενης

πίεσης επιλογής, κατά την εφαρμογή της διαδικασίας, συμπεριλήφθηκαν σπόροι άγριου τύπου (wt) ως μάρτυρες.

Απολύμανση σπόρων

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η απολύμανση των σπόρων T₂ γενιάς μέσω της εμβάπτισής τους για 5 λεπτά σε διάλυμα χλωρίνης 15% που περιέχει Tween-20, υπό συνεχή ανάδευση, και κατόπιν έκπλυση (4 φορές) με αποστειρωμένο dH₂O.

Βλάστηση σπόρων σε θρεπτικό μέσο επιλογής

Μετά την απολύμανση, οι σπόροι αξιολογήθηκαν ως προς την ομοζύγωτη ή ετεροζύγωτη έκφραση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* μέσω της βλάστησής τους σε θρεπτικό μέσο επιλογής. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου επιλογής αφορούσε σε ½ MS με βιταμίνες, 1 % ζαχαρόζη και 5 gr/L agar καθώς και το αντιβιοτικό επιλογής υγρομυκίνη (30mg/L).

Η αποτελεσματικότητα της πίεσης επιλογής που ασκήθηκε, δηλαδή το είδος και η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση του αντιβιοτικού, ελέγχθηκε μέσω της βλάστησης σπόρων αγρίου τύπου στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα. Λόγω της απουσίας του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη, οι εν λόγω σπόροι αναμένεται να εμφανίσουν αδυναμία βλάστησης ή/και ανάπτυξης υπό τις χρησιμοποιούμενες συνθήκες πίεσης επιλογής.

Έλεγχος της διαγονιδιακής φύσης και της ομοζύγωτης/ετεροζύγωτης κατάστασης του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}*

Η βλάστηση των σπόρων και η ανάπτυξη των σπορόφυτων στο θρεπτικό υπόστρωμα πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 25°C, φωτοπερίοδος: 16 h φως/8 h σκοτάδι) και διήρκησε 2 – 3 εβδομάδες. Εντός αυτού του διαστήματος, γινόταν τακτική λήψη μετρήσεων αναφορικά με το ποσοστό βλαστικότητας των σπόρων. Ειδικότερα, καταμετρήθηκαν τα ευαίσθητα και ανθεκτικά στην υγρομυκίνη σπορόφυτα. Ως προς την αξιολόγηση των διαγονιδιακών σειρών, αυτή στηρίχθηκε στην ύπαρξη διάσπασης για το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής. Πιο συγκεκριμένα, σειρές στις οποίες η φαινοτυπική αναλογία ισούται με 3 : 1 χαρακτηρίζονται ως ετεροζύγωτες, ενώ σειρές στις οποίες το

ποσοστό βλάστησης και ικανότητας ανάπτυξης, υπό συνθήκες πίεσης επιλογής, ισούται με 100 % χαρακτηρίζονται ως ομοζύγωτες για το διαγονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*.

2.2.2 Έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}*

Τα διαγονιδιακά φυτά T₂ εξετάστηκαν για την ένθεση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}*, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), με τη χρήση εξειδικευμένων για το διαγονίδιο εκκινητών (Pavli et al., 2011).

Το μίγμα της PCR περιείχε 2μl DNA ως μήτρα, 0.25μM από κάθε εκκινητή, 200μM dNTPs, 1.25mM MgCl₂, 1x *Taq* buffer, 1.25u *Taq* polymerase (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega) σε τελικό όγκο 20μl. Το πρόγραμμα ενίσχυσης περιελάμβανε ένα αρχικό κύκλο στους 94 °C για 3 λεπτά και στη συνέχεια 30 κύκλους των 30 δευτερολέπτων στους 94 °C, 1 λεπτού στους 50 °C, 1 λεπτού στους 72 °C και ένα τελικό κύκλο επιμήκυνσης στους 72 °C για 5 λεπτά. Τα προϊόντα ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X) με βρωμιούχο αιθίδιο.

2.3. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης

2.3.1. Καταπόνηση Τοξικότητας Καδμίου (Cd)

Στο πλαίσιο αξιολόγησης της ανθεκτικότητας σε συνθήκες υψηλής περιεκτικότητας σε κάδμιο, επιλέχθηκαν 5 διαγονιδιακές σειρές, των οποίων έχει προηγουμένως διαπιστωθεί η ομοζύγωτη κατάσταση ως προς το διαγονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}* (ενότητα 2.2.1). Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες και φυτά αγρίου τύπου. Οι σειρές που αξιολογήθηκαν καθώς και ο αριθμός σπόρων ανά σειρά περιγράφονται στον Πίνακα 2.1.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απολύμανση των σπόρων διαγονιδιακών σειρών και αγρίου τύπου με εμβάπτιση σε διάλυμα χλωρίνης, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.1. Έπειτα, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τριβλία που περιείχαν

θρεπτικό μέσο με τέσσερα (4) διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης καδμίου, μέσω προσθήκης διαφορετικών συγκεντρώσεων Cd. Το θρεπτικό υπόστρωμα περιείχε: ½ MS με βιταμίνες, 1 % ζαχαρόζη και 5 gr/L agar, καθώς και Cd σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις: 0, 50, 100 και 200μM. Τα διαδοχικά βήματα που ακολουθήθηκαν για την προετοιμασία των τριβλίων παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.2.

Πίνακας 2.1: Διαγονιδιακές σειρές (T₀) και αριθμός φυτών (T₂ γενιά) που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε συνθήκες καταπόνησης λόγω υψηλής περιεκτικότητας καδμίου (Cd).

Διαγονιδιακή σειρά T ₁ / wt	Είδος φυτών	Αριθμός T ₂ σπόρων
167-7-4		120
169-6-4		118
166-19-3	<i>SP/HrpZ_{PspH}</i>	120
160-6-2	Εξωκυτταρική έκκριση	120
169-7-5		120
WT	---	119
Συνολικός αριθμός		717

Η επώαση των σπόρων στο θρεπτικό μέσο επιλογής έγινε σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22-25°C, φωτοπερίοδος: 16 h φως/8 h σκοτάδι) και διήρκησε περίπου 20 ημέρες. Κατά το διάστημα αυτό, λαμβάνονταν παρατηρήσεις αναφορικά με το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και την ανάπτυξη των νεαρών σπορόφυτων υπό συνθήκες καταπόνησης καδμίου.

Η έναρξη των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε όταν το ελάχιστο μήκος του ριζιδίου ήταν 2mm. Το ποσοστό βλάστησης εκτιμήθηκε σύμφωνα με το τύπο: GP= (αριθμός σπόρων που βλάστησαν/ συνολικός αριθμός σπόρων) x 100.

2.3.2. Καταπόνηση Τοξικότητας Ψευδαργύρου (Zn)

Στο πλαίσιο αξιολόγησης της ανθεκτικότητας σε συνθήκες υψηλής περιεκτικότητας ψευδαργύρου, επιλέχθηκαν 5 διαγονιδιακές σειρές, των οποίων έχει προηγουμένως διαπιστωθεί η ομοζύγωτη κατάσταση ως προς το διαγονίδιο *SP/hrpZ_{PspH}* (ενότητα

2.2.1). Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες και φυτά αγρίου τύπου. Οι σειρές που αξιολογήθηκαν καθώς και ο αριθμός σπόρων ανά σειρά περιγράφονται στον Πίνακα 2.2.

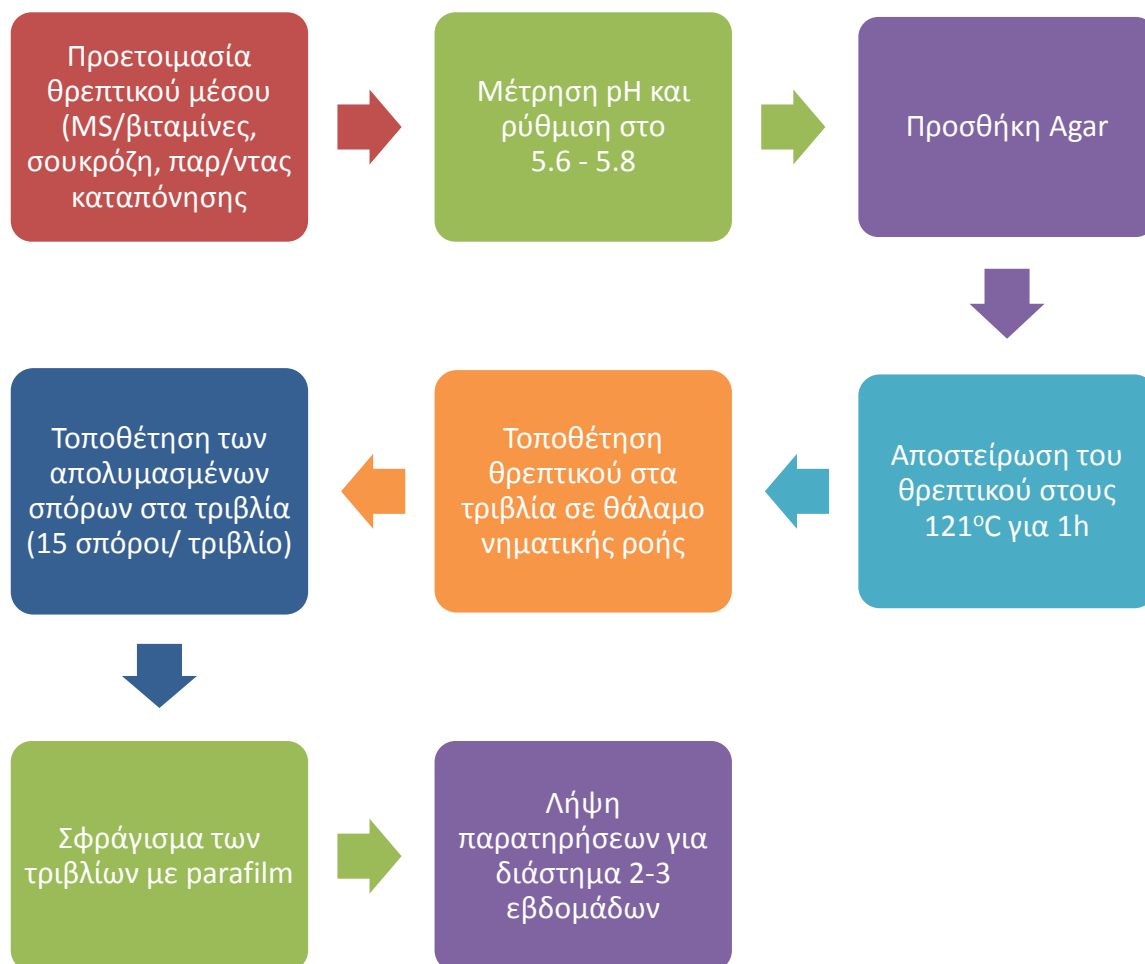
Αρχικά πραγματοποιήθηκε απολύμανση των σπόρων διαγονιδιακών σειρών και αγρίου τύπου με εμβάπτιση σε διάλυμα χλωρίνης, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.1. Έπειτα, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό μέσο με τέσσερα (4) διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης ψευδαργύρου, μέσω προσθήκης διαφορετικών συγκεντρώσεων Zn. Το θρεπτικό υπόστρωμα περιείχε: ½ MS με βιταμίνες, 1 % ζαχαρόζη και 5 gr/L agar, καθώς και Zn σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις: 0, 5, 10 και 15mM. Τα διαδοχικά βήματα που ακολουθήθηκαν για την προετοιμασία των τριβλίων διαφαίνονται στην Εικόνα 2.2.

Πίνακας 2.2: Διαγονιδιακές σειρές (T₀) και αριθμός φυτών T₂ γενιάς που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε συνθήκες καταπόνησης λόγω υψηλής περιεκτικότητας ψευδαργύρου (Zn).

Διαγονιδιακή σειρά T ₁ / wt	Είδος φυτών	Αριθμός T ₂ σπόρων
167-7-4		122
169-6-4		120
166-19-3	<i>SP/HrpZ_{PspH}</i>	120
169-7-2	Εξωκυτταρική έκκριση	120
169-7-5		120
WT	---	120
Συνολικός αριθμός		722

Η επώαση των σπόρων στο θρεπτικό μέσο επιλογής έγινε σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22-25°C, φωτοπερίοδος: 16 h φως/8 h σκοτάδι) και διήρκησε περίπου 20 ημέρες. Κατά το διάστημα αυτό, λαμβάνονταν παρατηρήσεις αναφορικά με το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και την ανάπτυξη των νεαρών σπορόφυτων υπό συνθήκες καταπόνησης ψευδαργύρου.

Η έναρξη των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε όταν το ελάχιστο μήκος του ριζιδίου ήταν 2mm. Το ποσοστό βλάστησης εκτιμήθηκε σύμφωνα με το τύπο: $GP = (\text{αριθμός σπόρων που βλάστησαν} / \text{συνολικός αριθμός σπόρων}) \times 100$.



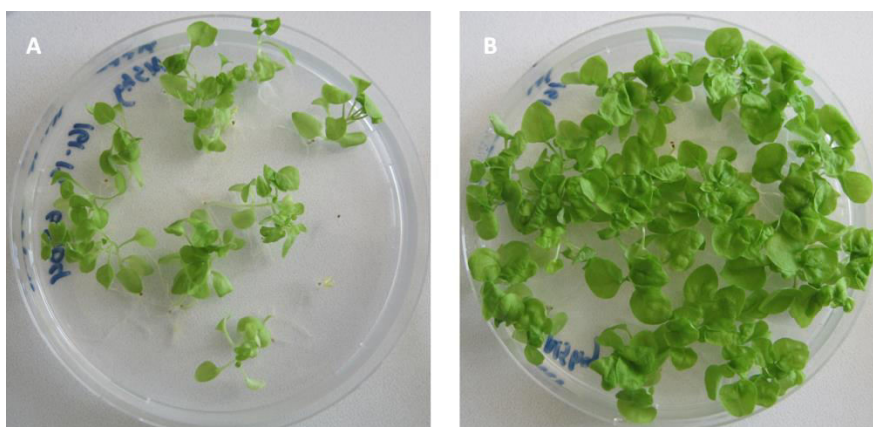
Εικόνα 2.2: Σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών σταδίων που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των τριβλίων, βάσει των οποίων έγινε η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας για τον εκάστοτε παράγοντα καταπόνησης.

3. Αποτελέσματα

3.1. Αξιολόγηση διαγονιδιακών σειρών

3.1.1 Επιλογή ομοζύγωτων για το διαγονίδιο *hrpZ_{P_{SpH}}* σειρών

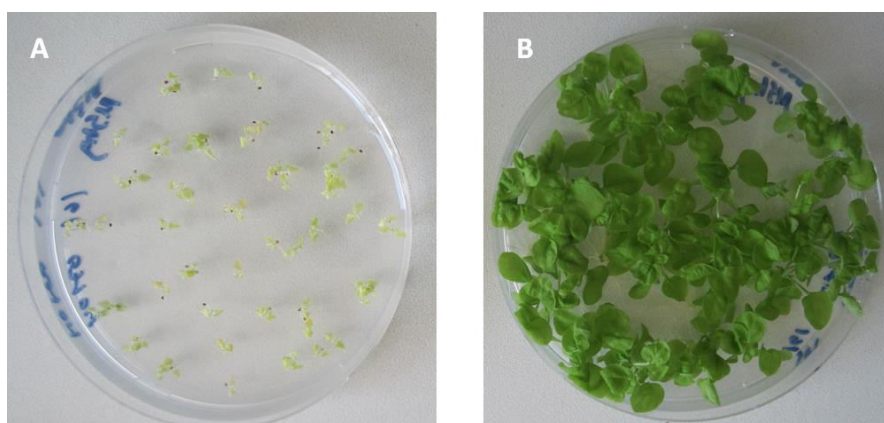
Για τον έλεγχο της ομοζύγωτης/ετεροζύγωτης κατάστασης του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{SpH}}* έγινε βλάστηση των σπόρων σε θρεπτικό μέσο που περιείχε το αντιβιοτικό επιλογής υγρομυκίνη προκειμένου να προσδιοριστούν οι σειρές που εκφράζουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη (hygromycin B phosphotransferase). Σύμφωνα με το σχεδιασμό της γονιδιακής κατασκευής που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό των φυτών, η υπό μεταφορά περιοχή περιείχε το γονίδιο *hrpZ* καθώς και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη (*aphIV*) (Εικόνα 2.1). Συνεπώς, η επιτυχής ένθεση του γονιδίου *aphIV* συνεπάγεται την ενσωμάτωση του *hrpZ* στο φυτικό γονιδίωμα. Στο πλαίσιο αυτό, έγινε καταμέτρηση των ανθεκτικών στο αντιβιοτικό φυταρίων και επιλέχθηκαν οι σειρές που εμφάνισαν βλάστηση σε ποσοστό 100 % και απουσία διάσπασης ως προς το γνώρισμα της ανθεκτικότητας (Εικόνα 3.1).



Εικόνα. 3.1: Επιλογή σπόρων μετασχηματισμένων σειρών του είδους *Nicotiana benthamiana* (T₂ γενιά) σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιέχει το αντιβιοτικό υγρομυκίνη. **A** Ετεροζύγωτη σειρά (ποσοστό βλάστησης < 100 %). Η ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη επιβεβαιώνει τη διαγονιδιακή φύση των T₂ σειρών. **B** Ομοζύγωτη για το διαγονίδιο σειρά (ποσοστό βλάστησης = 100 %).

Από τις 12 γενετικά μετασχηματισμένες σειρές που συνολικά αξιολογήθηκαν, προσδιορίστηκαν 7 σειρές που παρουσίασαν ομοζυγωτία για το διαγονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*. Οι σειρές που χαρακτηρίστηκαν ως ετεροζύγωτες εμφάνισαν την αναμενόμενη αναλογία διάσπασης 3:1 που διέπει την κληρονομικότητα των μονογονιδιακών γνωρισμάτων (Εικόνα 3.1).

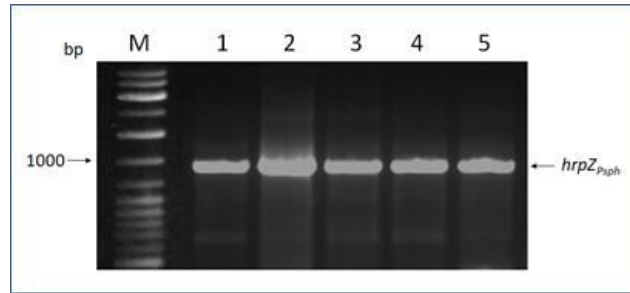
Η αποτελεσματικότητα της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής επιβεβαιώθηκε μέσω βλάστησης σπόρων αγρίου τύπου (wt) σε θρεπτικό μέσο που περιείχε αντιβιοτικό επιλογής (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής, μέσω βλάστησης σπόρων αγρίου τύπου (wt) του είδους *Nicotiana benthamiana* παρουσία και απουσία του αντιβιοτικού υδρομυκίνη. **A** Αδυναμία βλάστησης και ανάπτυξης των φυτών αγρίου τύπου υπό συνθήκες πίεσης επιλογής. **B** Απρόσκοπτη βλάστηση και ανάπτυξη των wt φυτών υπό συνθήκες απουσίας πίεσης επιλογής.

3.1.2 Επιβεβαίωση της παρουσίας του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}*

Οι επιλεγμένες διαγονιδιακές σειρές εξετάστηκαν, μέσω αντίδρασης PCR, για την παρουσία του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}*. Η επιτυχής ένθεση του διαγονιδίου επιβεβαιώθηκε στα φυτά που εξετάστηκαν, με την ενίσχυση προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους (995 bp) (Εικόνα 3.3).



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 (T₂ γενιά) που φέρουν το διαγονίδιο *SP/hrpZ_{PspH}* (μέγεθος: 995 bp).

3.2. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του φυτικού υλικού στην καταπόνηση Καδμίου (Cd)

Η βλάστηση των σπόρων επηρεάστηκε σημαντικά από τη παρουσία του Cd στο θρεπτικό μέσο βλάστησης, με την επίδραση να είναι στο πλείστο των περιπτώσεων ανάλογη με το επίπεδο καταπόνησης στο οποίο υποβλήθηκαν (Πίνακας 3.1). Απουσία καταπόνησης, η έναρξη της βλάστησης για το σύνολο των σειρών (wt και *hrpZ_{PspH}*) σημειώθηκε την 3^η ημέρα, ενώ το τελικό ποσοστό βλάστησης έφτασε το 100%, με εξαίρεση τη σειρά 169-6-4 που παρουσίασε ποσοστό βλάστησης 93 % (18^η ημέρα) (Διάγραμμα 3.1).

Παράλληλα, στο χαμηλό επίπεδο τοξικότητας (50μM Cd), το ποσοστό βλάστησης των σπόρων όλων των εξεταζόμενων σειρών ήταν υψηλό, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σειρών (Διαγράμματα 3.1 και 3.2).

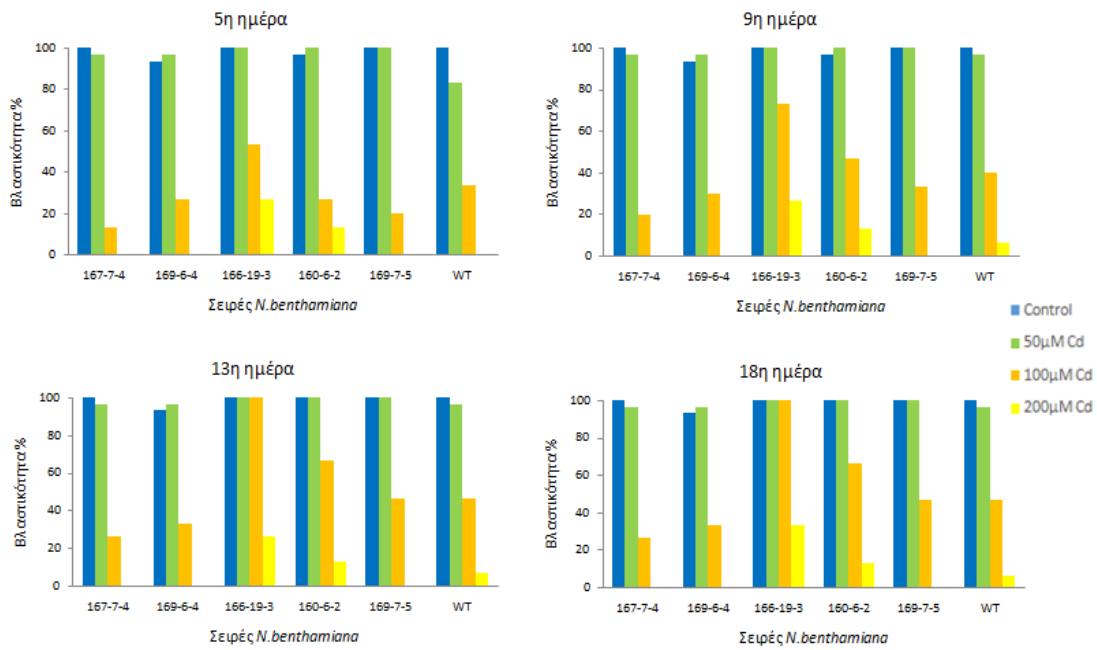
Εντούτοις, αυξανόμενου του επιπέδου καταπόνησης (100μM Cd και 200μM Cd), σημειώθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων, με πιο πρόδηλα τα συμπτώματα τοξικότητας στο υψηλότερο επίπεδο στρες (200μM Cd). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η διαγονιδιακή σειρά 166-19-3, στη συγκέντρωση των 100μM Cd, έφτασε σε ποσοστό βλάστησης 100% την 13^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων στα τριβλία. Υψηλό δυναμικό βλάστησης, στο ίδιο επίπεδο καταπόνησης, επέδειξε και η σειρά 160-6-2, ενώ οι διαγονιδιακές σειρές 167-7-4 και

169-6-4 σημείωσαν το χαμηλότερο ποσοστό βλάστησης, μικρότερο ακόμα και από αυτό των σπόρων αγρίου τύπου.

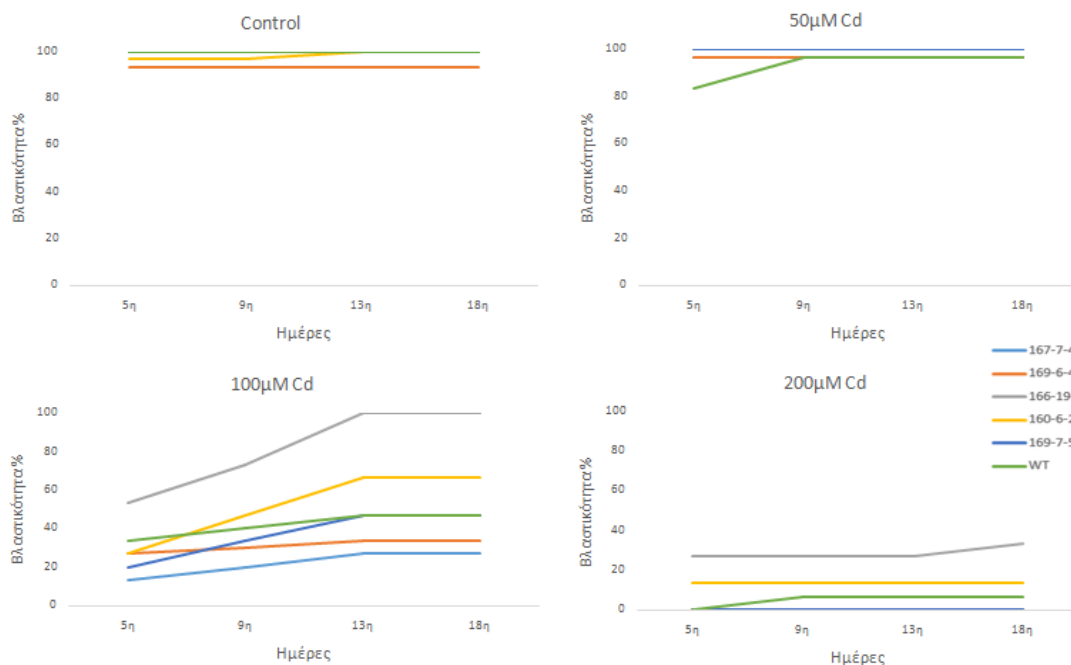
Πίνακας 3.1: Ποσοστό βλάστησης (%) ανά γονότυπο και επίπεδο καταπόνησης καδμίου (Cd), την 5^η, 9^η, 13^η και 18^η ημέρα της καταπόνησης.

Ημερομηνία	Σειρά	Ποσοστό βλάστησης (%)			
		C	50 μM	100 μM	200 μM
29-Μαΐ-18	167-7-4	100,00	96,67	13,33	0,00
	169-6-4	93,33	96,67	26,67	0,00
	166-19-3	100,00	100,00	53,33	26,67
	160-6-2	96,67	100,00	26,67	13,33
	169-7-5	100,00	100,00	20,00	0,00
	WT	100,00	83,33	33,33	0,00
1-Ιουν-18	167-7-4	100,00	96,67	20,00	0,00
	169-6-4	93,33	96,67	30,00	0,00
	166-19-3	100,00	100,00	73,33	26,67
	160-6-2	96,67	100,00	46,67	13,33
	169-7-5	100,00	100,00	33,33	0,00
	WT	100,00	96,67	40,00	6,67
6-Ιουν-18	167-7-4	100,00	96,67	26,67	0,00
	169-6-4	93,33	96,67	33,33	0,00
	166-19-3	100,00	100,00	100,00	26,67
	160-6-2	100,00	100,00	66,67	13,33
	169-7-5	100,00	100,00	46,67	0,00
	WT	100,00	96,67	46,67	6,67
11-Ιουν-18	167-7-4	100,00	96,67	26,67	0,00
	169-6-4	93,33	96,67	33,33	0,00
	166-19-3	100,00	100,00	100,00	33,33
	160-6-2	100,00	100,00	66,67	13,33
	169-7-5	100,00	100,00	46,67	0,00
	WT	100,00	96,67	46,67	6,67

Αναφορικά με το μέγιστο επίπεδο καταπόνησης (200μM Cd), είναι κατάφορη η δραστικότητα του περιοριστικού παράγοντα, αφού ακόμα και στη σειρά 166-19-3, παρατηρείται κατακόρυφη πτώση του ποσοστού βλάστησης (Διαγράμματα 3.1 και 3.2).



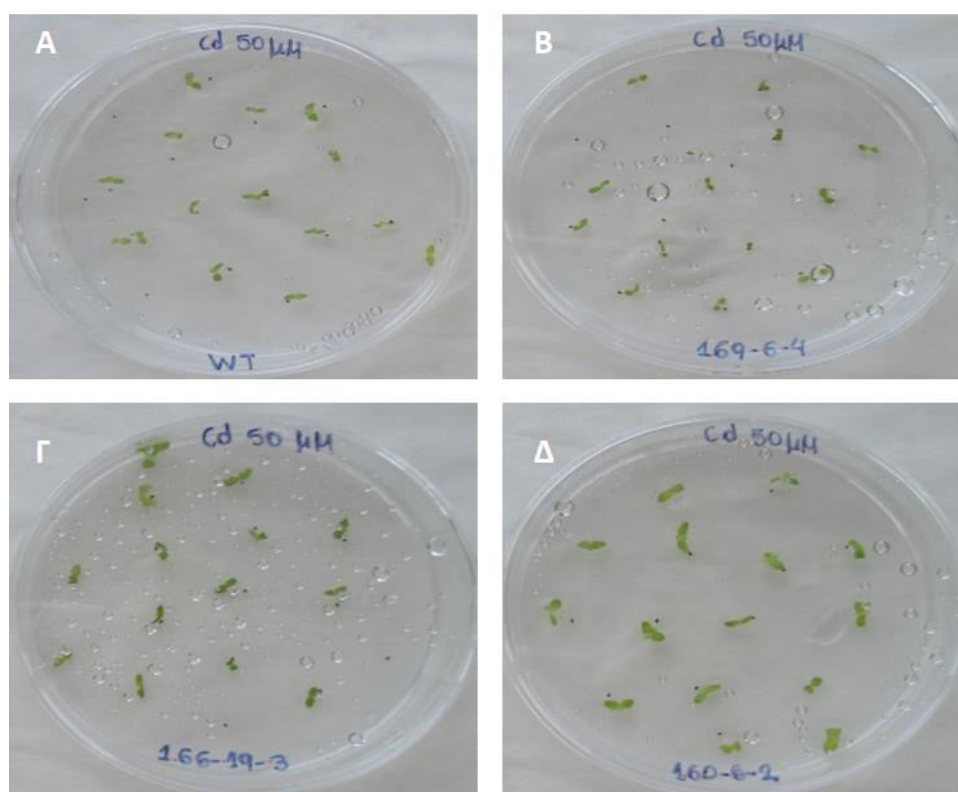
Διάγραμμα 3.1: Ποσοστό βλάστησης των σπόρων 5 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ως απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης καδμίου (C, 50μM, 100μM και 200μM), ανά ημέρα καταπόνησης (5^η, 9^η, 13^η και 18^η).



Διάγραμμα 3.2: Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης των σπόρων 5 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ανά επίπεδο καταπόνησης καδμίου (C, 50μM, 100μM και 200μM).

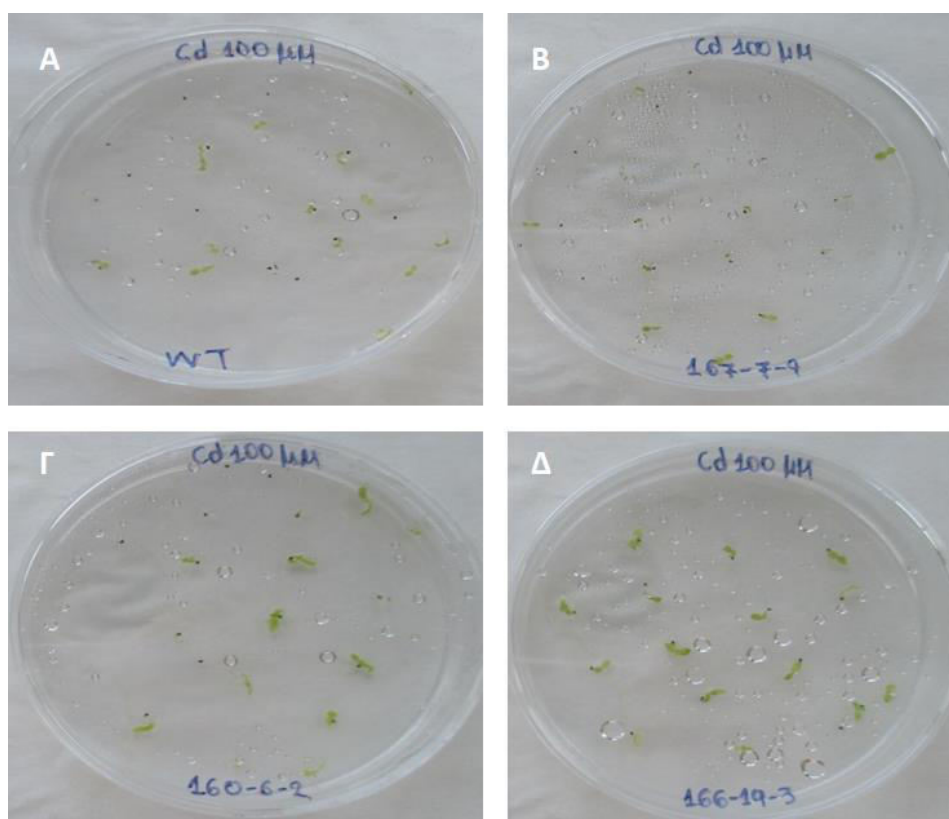
Συνεκδοχικά, αναφορικά με την ανάπτυξη των σπορόφυτων, οι παρατηρήσεις που λήφθηκαν συμπληρώνουν τις αντίστοιχες παρατηρήσεις σχετικά με το δυναμικό βλάστησης των σπόρων, όπως αυτό περιγράφηκε ανωτέρω. Με την πάροδο του χρόνου, αξιολογήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης των σπορόφυτων και η απόκρισή τους στην επίδραση του περιοριστικού παράγοντα. Έτσι, ενώ στα τριβλία με τη μηδενική συγκέντρωση Cd (Control) σημειώθηκε απρόσκοπτα ανάπτυξη και τα φυτάρια παρουσίαζαν αυξημένη ευρωστία, με την αύξηση του επιπέδου καταπόνησης, κατέστη σαφής η ανάσχεση της ανάπτυξης και η μείωση της ευρωστίας.

Αναφορικά με το χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (50μM Cd), οι *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακές σειρές 166-19-3 και 160-6-2 εμφάνισαν σαφή υπεροχή στην ανάπτυξη, που ήταν έκδηλη από την 13^η ημέρα, τόσο σε σχέση με τα wt φυτά όσο και σε σχέση με τις υπόλοιπες *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές (Εικόνα 3.4).



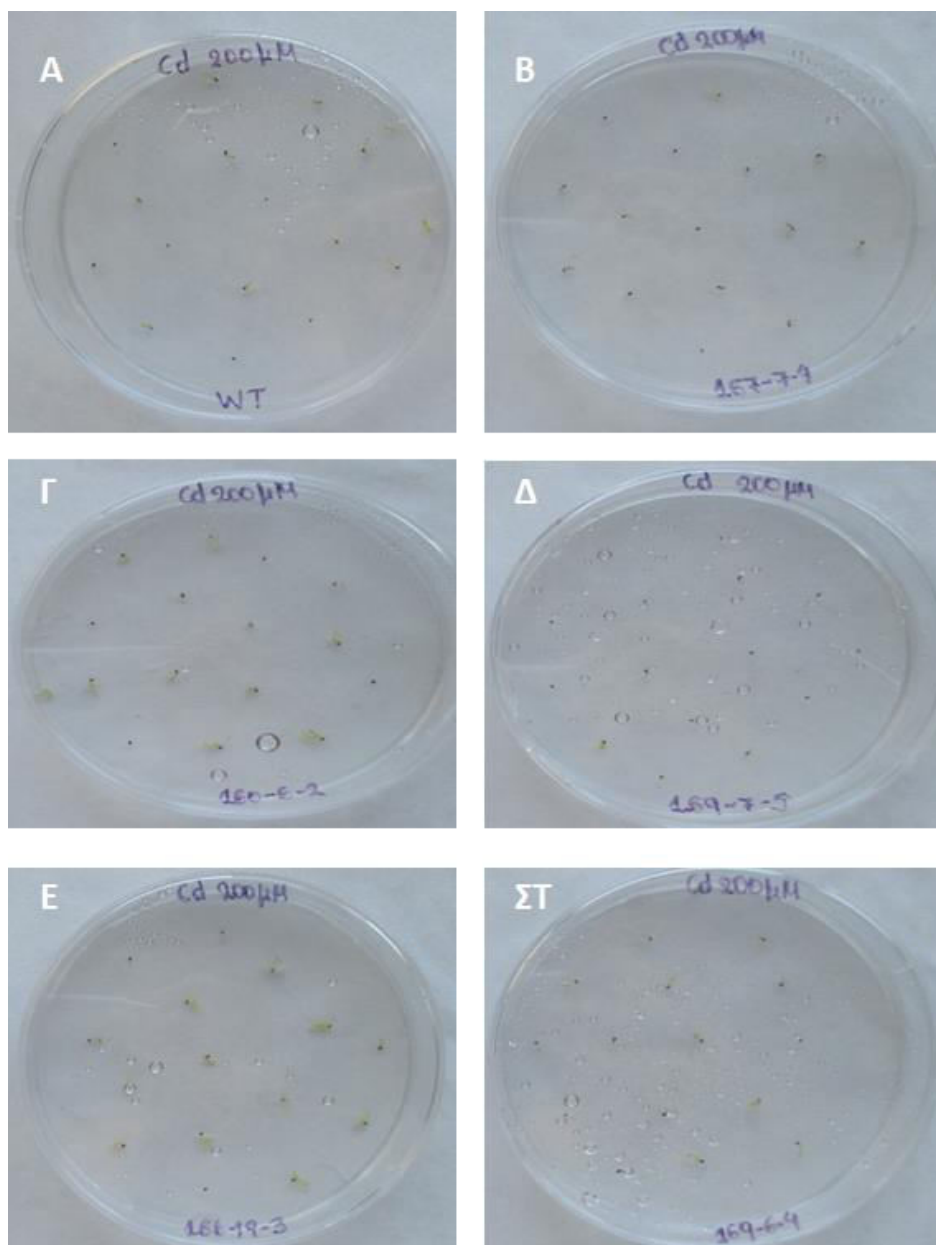
Εικόνα 3.4: Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης καδμίου (50μM), την 13^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. **A** wt φυτά. **B** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 169-6-4. **Γ** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 166-19-3. **Δ** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 160-6-2.

Ωστόσο, στο μέτριο επίπεδο καταπόνησης (100μM Cd), από την πρώτη κιόλας παρατήρηση (5^η ημέρα), η σειρά 166-19-3 παρουσίασε υπεροχή ανάπτυξης συγκριτικά με τα wt αλλά και με τις υπόλοιπες *hrpZ_{psph}*-σειρές (Εικόνα 3.5). Η εικόνα αυτή της ικανότητας ανάπτυξης των *hrpZ_{psph}*-σειρών 166-19-3 και 160-6-2, παρουσία καδμίου (50 και 100μM Cd), 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 100μM Cd η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη παρουσιάζει μία μικρή μείωση. Αναφορικά με τις υπόλοιπες σειρές που εξετάστηκαν, η ανάπτυξη τους κρίθηκε σαφώς μειωμένη από εκείνη των δύο εξεχουσών *hrpZ_{psph}*-σειρών (166-19-3 και 160-6-2) στα αντίστοιχα επίπεδα καταπόνησης.



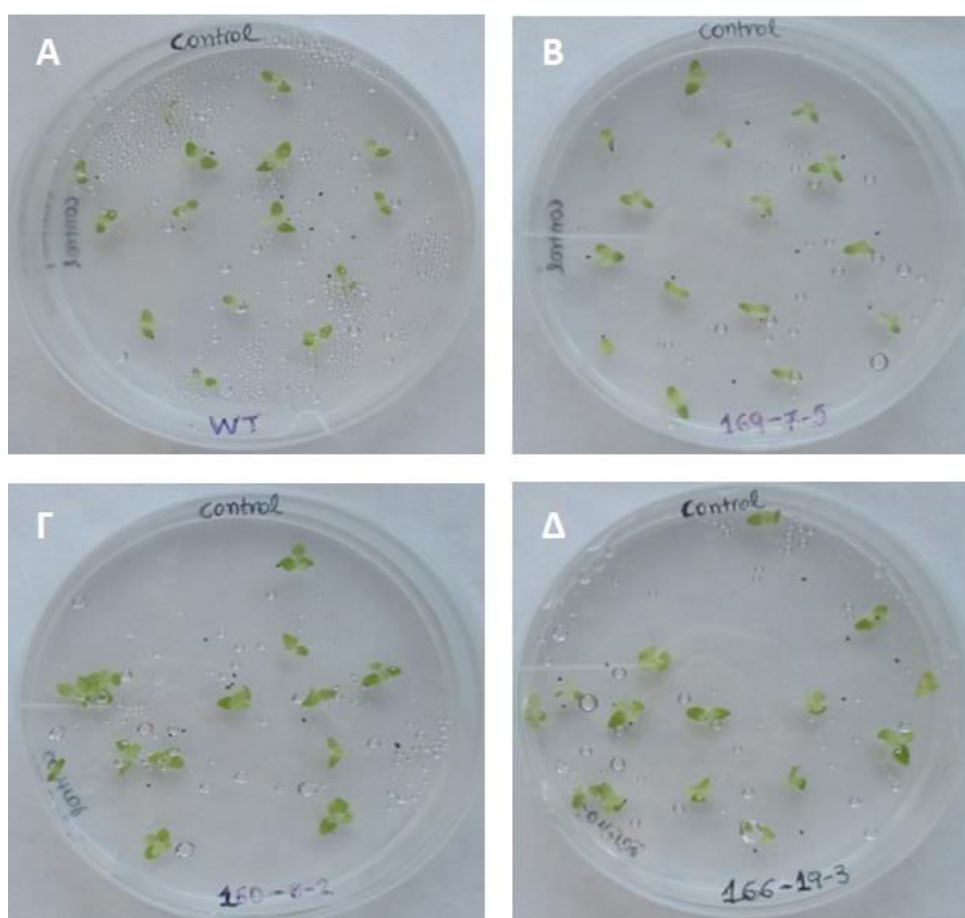
Εικόνα 3.5: Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{psph}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο μεσαίο επίπεδο καταπόνησης καδμίου (100μM), την 5^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. Α wt φυτά. Β Φυτά της *hrpZ_{psph}*-σειράς 167-7-4. Γ Φυτά της *hrpZ_{psph}*-σειράς 160-6-2. Δ Φυτά της *hrpZ_{psph}*-σειράς 166-19-3.

Τέλος, στη συγκέντρωση των 200 μ M Cd η ανάπτυξη είναι σαφώς περιορισμένη, με κύριο χαρακτηριστικό των φυταρίων τη χλώρωση, ενώ σε ορισμένες σειρές η παρουσία καδμίου σε αυτή τη συγκέντρωση υπήρξε πλήρως ανασταλτική της ανάπτυξής τους (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης καδμίου (200 μ M), την 18^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. **A** wt φυτά. **B** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 167-7-4. **Γ** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 160-6-2. **Δ** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 169-7-5. **Ε** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 166-19-3. **ΣΤ** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 169-6-4.

Είναι σημαντικό ωστόσο να υπογραμμιστεί ότι η έκφραση της χαρπίνης $HrpZ_{P_{sph}}$ στα διαγονιδιακά φυτά οδήγησε σε προαγωγή της ανάπτυξης των φυταρίων. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι οι $hrpZ_{P_{sph}}$ -σειρές 166-19-3 και 160-6-2, πέραν του φαινοτύπου ανθεκτικότητας, χαρακτηρίζονταν από αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και βελτιωμένη ευρωστία συγκριτικά τόσο με τα wt φυτά όσο και με τις υπόλοιπες $hrpZ_{P_{sph}}$ -σειρές. Ο φαινότυπος αυτός αναδεικνύεται σε συνθήκες απουσίας καταπόνησης (Control), και σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου, υποδεικνύοντας τη θετική επίδραση του διαγονιδίου $hrpZ$ στην ανάπτυξη των φυτών (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7: Θετική επίδραση του διαγονιδίου $hrpZ_{P_{sph}}$ στην ανάπτυξη των sporόφυτων των διαγονιδιακών σειρών 166-19-3 και 160-6-2 σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των sporόφυτων αγρίου τύπου (wt). **A** wt φυτά. **B** Φυτά της $hrpZ_{P_{sph}}$ -σειράς 169-7-5. **Γ** Φυτά της $hrpZ_{P_{sph}}$ -σειράς 160-6-2. **Δ** Φυτά της $hrpZ_{P_{sph}}$ -σειράς 166-19-3.

3.3. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του φυτικού υλικού στην καταπόνηση Ψευδαργύρου (Zn)

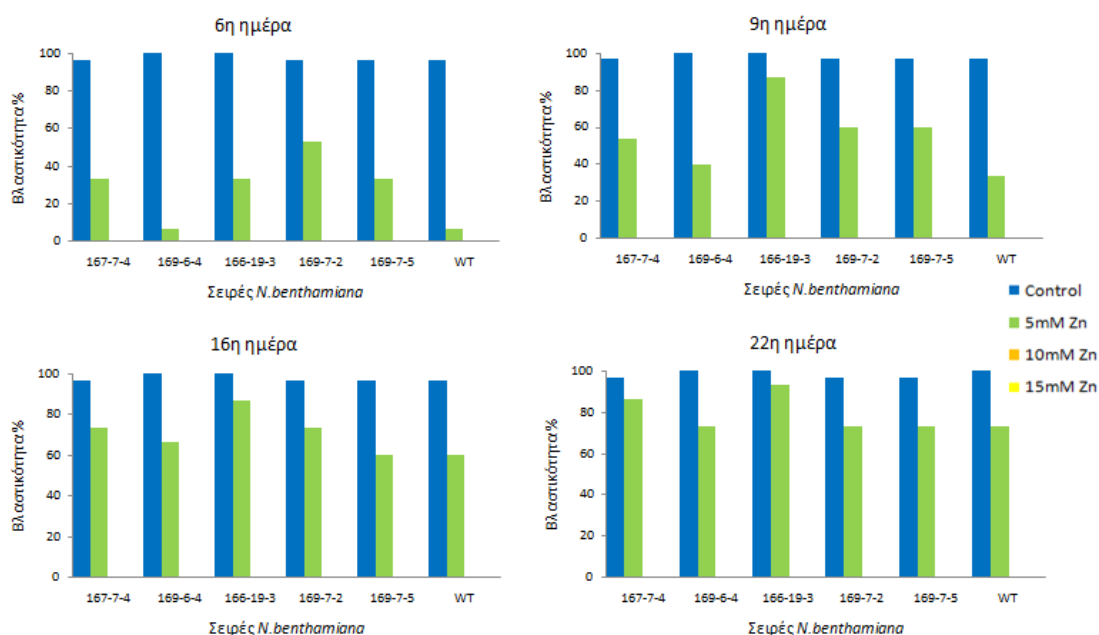
Η βλάστηση των σπόρων επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία του Zn στο θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης, με την επίδραση να είναι στο πλείστο των περιπτώσεων ανάλογη του επιπέδου καταπόνησης στο οποίο υποβλήθηκαν (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2: Ποσοστό βλάστησης (%) ανά γονότυπο και επίπεδο καταπόνησης ψευδαργύρου (Zn), την 6^η, 9^η, 16^η και 22^η ημέρα της καταπόνησης.

Ημερομηνία	Σειρά	Ποσοστό βλάστησης (%)			
		C	5 mM	10 mM	15 mM
19-Δεκ-17	167-7-4	96,67	33,33	0,00	0,00
	169-6-4	100,00	6,67	0,00	0,00
	166-19-3	100,00	33,33	0,00	0,00
	169-7-2	96,67	53,33	0,00	0,00
	169-7-5	96,67	33,33	0,00	0,00
	WT	96,67	6,67	0,00	0,00
22-Δεκ-17	167-7-4	96,67	53,33	0,00	0,00
	169-6-4	100,00	40,00	0,00	0,00
	166-19-3	100,00	86,67	0,00	0,00
	169-7-2	96,67	60,00	0,00	0,00
	169-7-5	96,67	60,00	0,00	0,00
	WT	96,67	33,33	0,00	0,00
29-Δεκ-17	167-7-4	96,67	73,33	0,00	0,00
	169-6-4	100,00	66,67	0,00	0,00
	166-19-3	100,00	86,67	0,00	0,00
	169-7-2	96,67	73,33	0,00	0,00
	169-7-5	96,67	60,00	0,00	0,00
	WT	96,67	60,00	0,00	0,00
4-Ιαν-18	167-7-4	96,67	86,67	0,00	0,00
	169-6-4	100,00	73,33	0,00	0,00
	166-19-3	100,00	93,33	0,00	0,00
	169-7-2	96,67	73,33	0,00	0,00
	169-7-5	96,67	73,33	0,00	0,00
	WT	100,00	73,33	0,00	0,00

Απουσία καταπόνησης, η έναρξη της βλάστησης για το σύνολο των σειρών (wt και *hrpZ_{P_{sph}}*) σημειώθηκε την 3^η ημέρα, ενώ το τελικό ποσοστό βλάστησης έφτασε το 100%, με εξαίρεση τις σειρές 167-7-4, 169-7-2 και 169-7-5 που παρουσίασαν ποσοστό βλάστησης περίπου 97 % (22^η ημέρα) (Διάγραμμα 3.3).

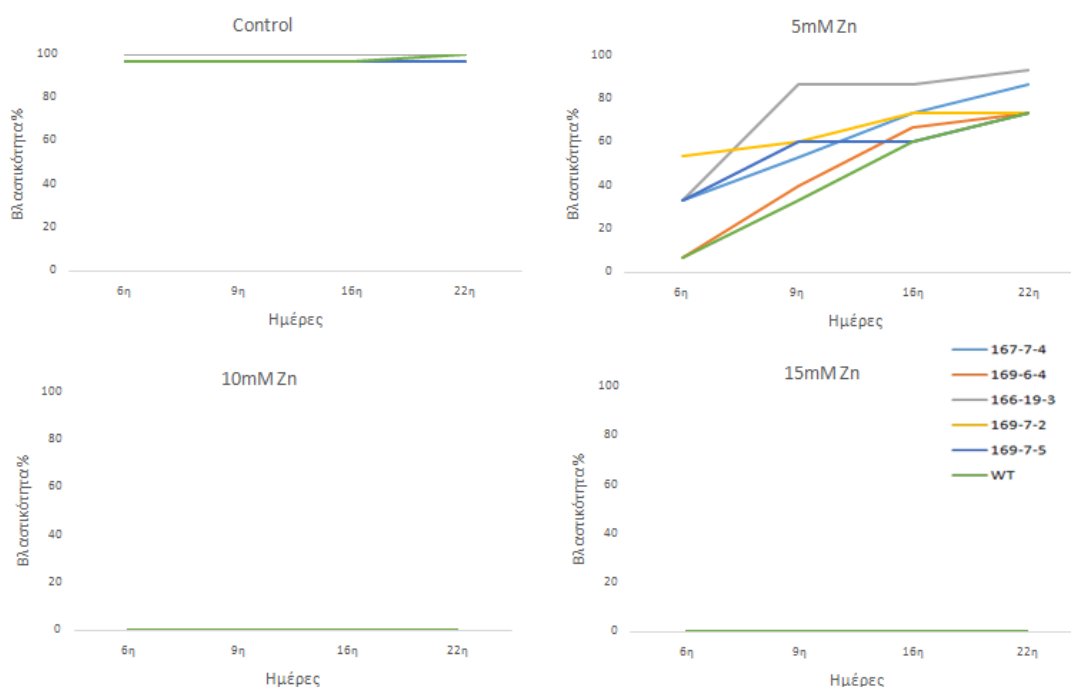
Αναφορικά με το χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (5mM Zn), κατά την πρώτη παρατήρηση (6^η ημέρα) το ποσοστό βλάστησης των σπόρων όλων των σειρών χαρακτηρίστηκε χαμηλό, με εξαίρεση τη *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρά 169-7-2, η οποία παρουσίασε ποσοστό βλάστησης περίπου 50%. Ωστόσο με την πάροδο του χρόνου, τα ποσοστά σημείωσαν σημαντική άνοδο, με τη διαγονιδιακή σειρά 166-19-3 να καταγράφει το υψηλότερο ποσοστό, της τάξεως του 93%, ακολουθούμενη από τη σειρά 167-7-4, με ποσοστό 86% (Διαγράμματα 3.3 και 3.4).



Διάγραμμα 3.3: Ποσοστό βλάστησης των σπόρων 5 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ως απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης ψευδαργύρου (C, 5mM, 10mM και 15mM), ανά ημέρα καταπόνησης (6^η, 9^η, 16^η και 22^η).

Εντούτοις, είναι αξιοσημείωτο ότι στο μεσαίο και στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (10mM και 15mM Zn), δεν παρατηρήθηκε βλάστηση των σπόρων σε καμία από τις έξι εξεταζόμενες σειρές. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τη δραστηριότητα της τοξικής

επίδρασης του Zn, υποδεικνύοντας πως δύναται να προκαλέσει αναστολή της βλάστησης των σπόρων ακόμα και στη συγκέντρωση των 10mM (Διαγράμματα 3.3 και 3.4).

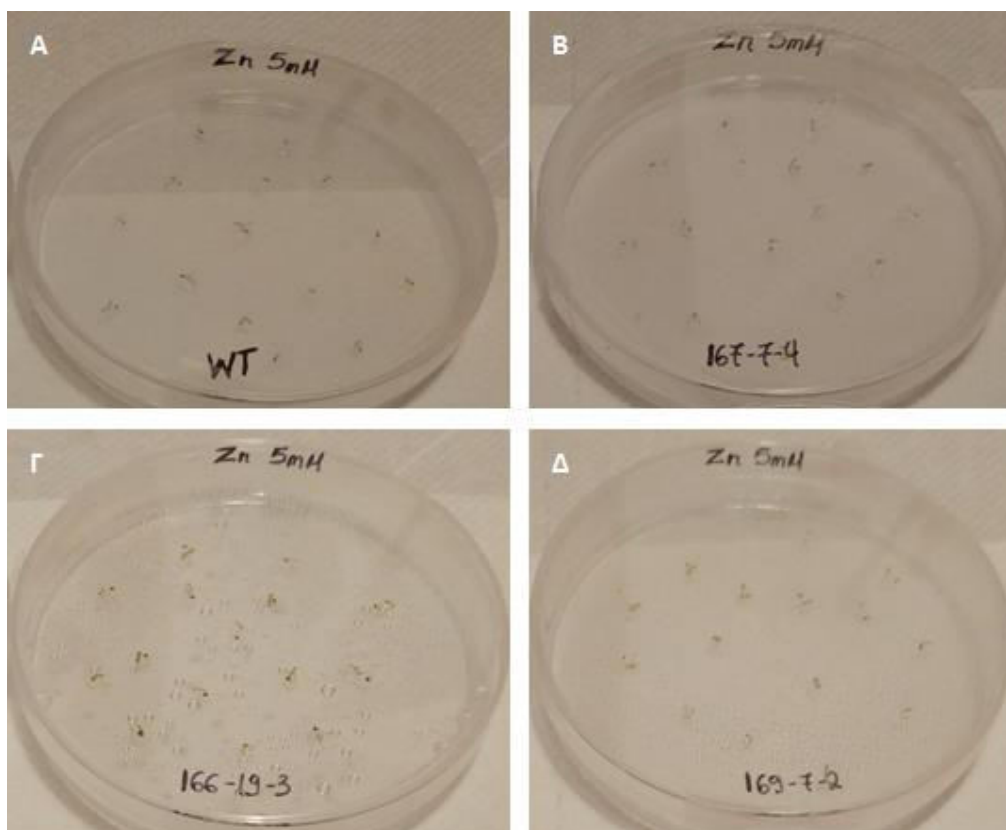


Διάγραμμα 3.4: Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης των σπόρων 5 διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{Sph}}*, και σπόρων αγρίου τύπου (wt) ανά επίπεδο καταπόνησης ψευδαργύρου (C, 5mM, 10mM και 15mM).

Συνακόλουθα, αναφορικά με την ανάπτυξη των σπορόφυτων, οι παρατηρήσεις που λήφθηκαν συμπληρώνουν τις αντίστοιχες παρατηρήσεις σχετικά με το δυναμικό βλάστηση των σπόρων, όπως αυτό περιγράφηκε ανωτέρω. Με την παρέλευση του χρόνου, αξιολογήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης των φυταρίων και η απόκρισή τους στην επίδραση του περιοριστικού παράγοντα. Έτσι, απουσία καταπόνησης (Control) τα σπορόφυτα αναπτύχθηκαν κανονικά και παρουσίασαν αυξημένη ευρωστία καθ' όλη τη διάρκεια λήψεως των παρατηρήσεων. Με την αύξηση, όμως, του επιπέδου καταπόνησης, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη ανάσχεση της ανάπτυξης και της ευρωστίας των φυταρίων, συνοδευόμενη από συμπτώματα τοξικότητας.

Στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (5mM Zn), ο περιορισμός της ανάπτυξης είναι εμφανής, επισημαίνοντας τη δραστηριότητα της τοξικότητας του ψευδαργύρου ήδη

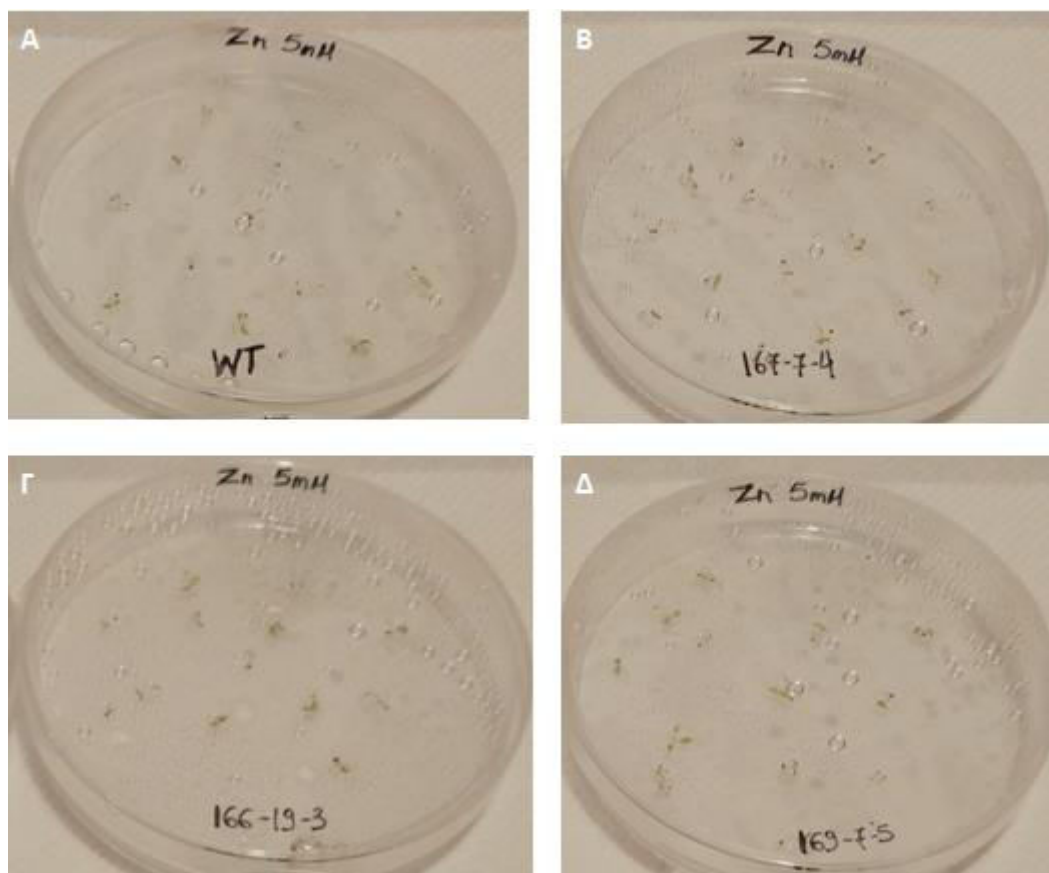
από αυτή τη συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα, την 9^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων στα τριβλία, η σειρά η οποία φαίνεται να αντεπεξέρχεται καλύτερα στην επίδραση του στρες είναι η 166-19-3, ακολουθούμενη από τη σειρά 169-7-2, ενώ η ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (wt) είναι σαφώς πιο περιορισμένη (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8: Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης ψευδαργύρου (5mM), την 9^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. **A** wt φυτά. **B** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 167-7-4. **Γ** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 166-19-3. **Δ** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 169-7-2.

Η ίδια εικόνα ανάπτυξης των σπορόφυτων παρατηρήθηκε έως και την τελευταία μέτρηση (22^η ημέρα), κατά την οποία η *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρά 166-19-3 υπερεβούσε τόσο σε σχέση με το (wt) όσο έναντι των υπόλοιπων διαγονιδιακών σειρών. Υπεροχή συγκριτικά με το (wt) παρουσίασαν και οι σειρές 169-7-2, 169-7-5 και 169-6-4, κάτι το οποίο δε φαίνεται να ισχύει και για τη σειρά 167-7-4, η οποία σημειώνει παραπλήσια ανάπτυξη με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 3.9). Επίσης, είναι

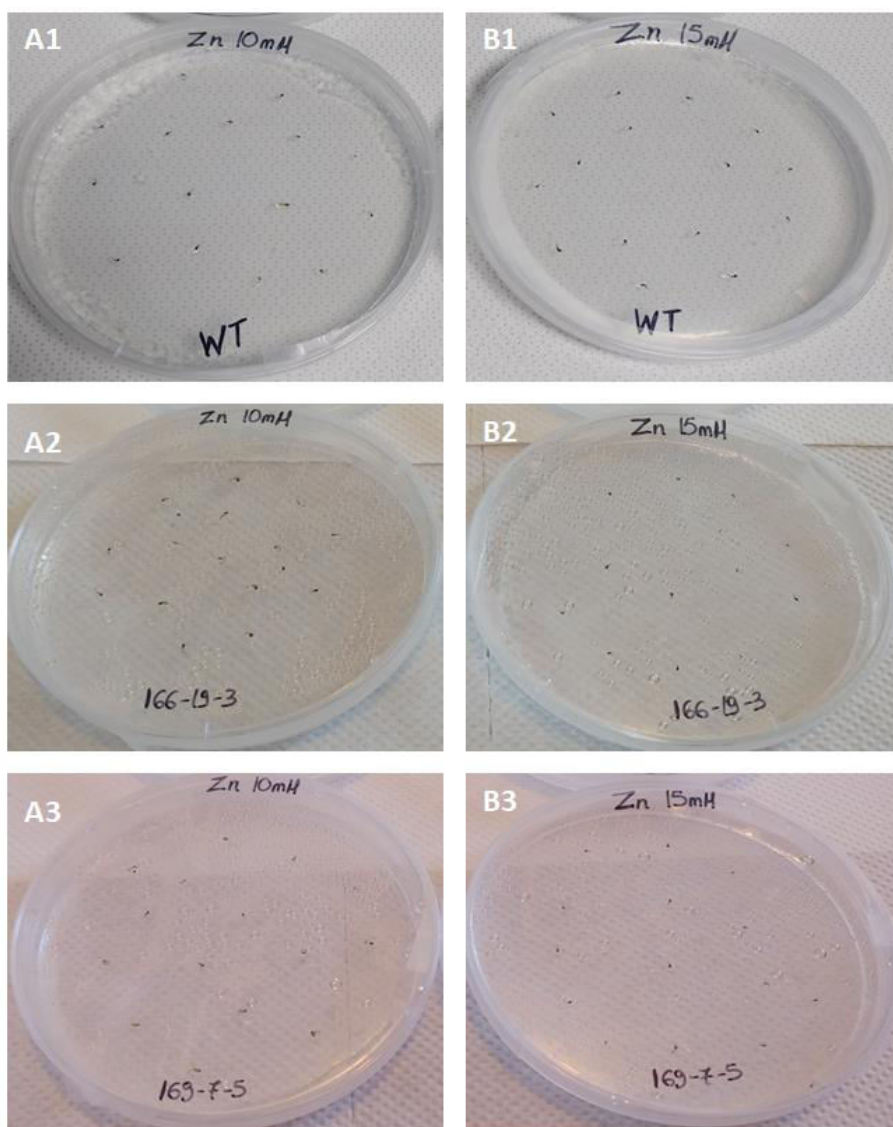
σημαντικό να αναφερθεί πως η περιεκτικότητα των φυταρίων σε χλωροφύλλη διατηρείται σε μεγαλύτερο βαθμό στις υπερέχουσες *hrpZ*-σειρές σε σχέση με τα (wt).



Εικόνα 3.9: Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης ψευδαργύρου (5mM), την 22^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. **A** wt φυτά. **B** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 167-7-4. **Γ** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 166-19-3. **Δ** Φυτά της *hrpZ_{P_{sph}}*-σειράς 169-7-5.

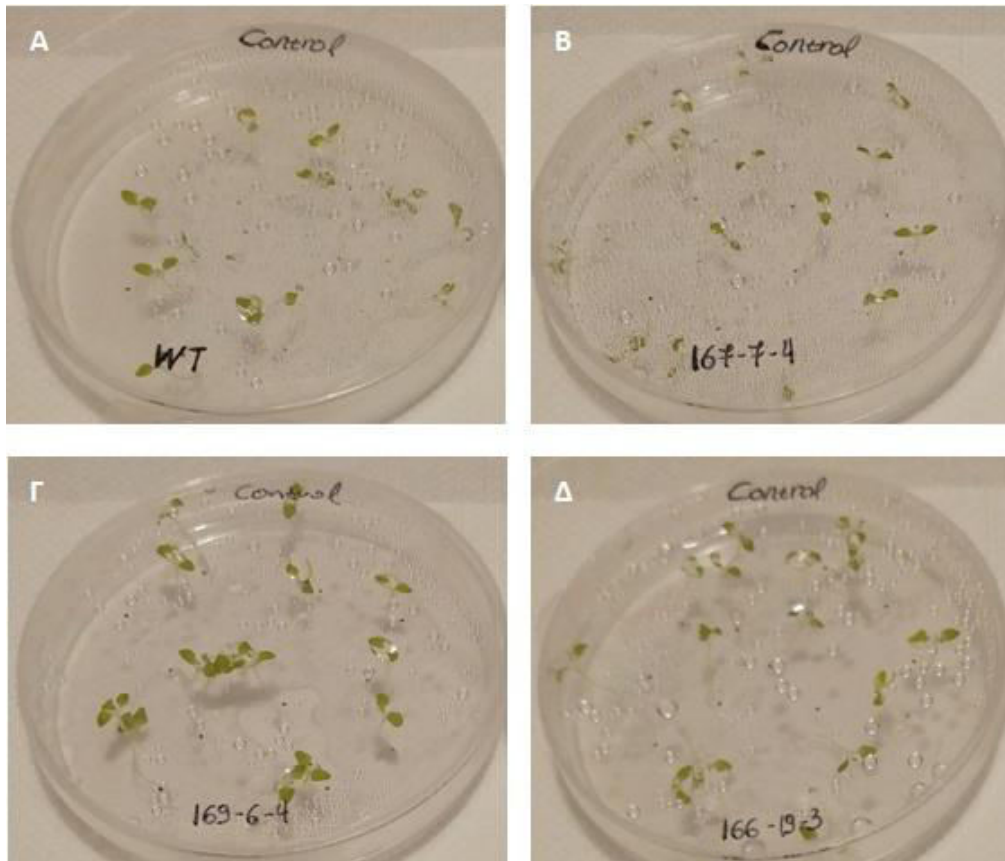
Παράλληλα, στο μεσαίο και στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (10mM και 15mM Zn) η επίδραση του Zn ήταν τόσο δριμεία, ώστε να επέρχεται νέκρωση του ριζιδίου κατά την έκπτυξή του ή αδυναμία περαιτέρω ανάπτυξης αυτού (Εικόνα 3.10).

Όπως προαναφέρθηκε (ενότητα 3.2), η έκφραση της χαρπίνης *HrpZ_{P_{sph}}* στα διαγονιδιακά φυτά οδήγησε σε προαγωγή της ανάπτυξης των φυταρίων. Στο πλαίσιο αυτό, οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές 166-19-3, 169-6-4 και 169-7-2, πέραν του φαινοτύπου ανθεκτικότητας, χαρακτηρίζονταν από αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και βελτιωμένη ευρωστία συγκριτικά τόσο με τα wt φυτά όσο και με τις υπόλοιπες *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές.



Εικόνα 3.10: Συγκριτική ανάπτυξη των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο μεσαίο (10mM Zn) και υψηλό (15mM Zn) επίπεδο καταπόνησης ψευδαργύρου, την 22^η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. **A1, A2, A3** Μεσαίο επίπεδο καταπόνησης (10mM Zn): wt, 166-19-3, 169-7-5. **B1, B2, B3** Υψηλό επίπεδο καταπόνησης (15mM Zn): wt, 166-19-3, 169-7-5.

Ο φαινότυπος αυξημένης ανάπτυξης και ευρωστίας δεν επαληθεύτηκε και για τη διαγονιδιακή σειρά 167-7-4, της οποίας η ανάπτυξη προσέγγιζε εκείνη του (wt), πιθανώς εξαιτίας της διαφορετικής θέσης ένθεσης του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}*. Ο φαινότυπος αυτός αναδεικνύεται σε συνθήκες απουσίας καταπόνησης (Control), και σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου, υποδεικνύοντας τη θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ* στην ανάπτυξη των φυτών (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11: Θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ_{psph}* στην ανάπτυξη των σπορόφυτων των διαγονιδιακών σειρών σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των σπορόφυτων αγρίου τύπου (wt). **A** wt φυτά. **B** Φυτά της *hrpZ_{psph}*-σειράς 167-7-4. **Γ** Φυτά της *hrpZ_{psph}*-σειράς 169-6-4. **Δ** Φυτά της *hrpZ_{psph}*-σειράς 166-19-3.

4. Συζήτηση

Η ανακάλυψη ότι οι βακτηριακής προέλευσης χαρπίνες, κατά την ενδογενή έκφρασή τους ή την εξωγενή εφαρμογή τους σε φυτά, οδηγούν σε επαγωγή της άμυνας, συχνά διαμέσου ενεργοποίησης της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), αποτέλεσε το εφαλτήριο για την αξιοποίησή τους ως μέσο προστασίας των φυτών έναντι μυκήτων, βακτηρίων και ιών (Strobel et al., 1996; Dong et al., 1999; Li and Fan, 1999; Peng et al., 2003; 2004; Takamura et al., 2004; Ren et al., 2006a; 2006b; Shao et al., 2008; Wang et al., 2008; Pavli et al., 2011), εντόμων (Dong et al., 2004), αλλά και αβιοτικών καταπονήσεων (Dong et al., 2005; Zhang et al., 2007; 2011).

Στο πλαίσιο αυτό, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την αξιοποίηση της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}}, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι στον ιό *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), ο οποίος αποτελεί το παθογόνο αίτιο της ριζομανίας των ζαχαροτεύτλων (Pavli et al., 2011; 2012). Για την επίτευξη του στόχου αυτού, πραγματοποιήθηκε ενσωμάτωση του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}*, ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης από την πρωτεΐνη παθογένειας PR1 του καπνού ώστε να κατευθύνεται η έκφραση της πρωτεΐνης εξωκυτταρικά (SP/HrpZ_{P_{sph}}) (Tampakaki and Panopoulos, 2000; Pavli et al., 2011), στο γονιδίωμα φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana* καθώς και διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου. Τα ευρήματα υπογραμμίζουν την ικανότητα της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}} να επάγει υψηλή ανθεκτικότητα έναντι BNYVV. Περαιτέρω, περισσότερο πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν τη δυνατότητα της SP/HrpZ_{P_{sph}} να οδηγεί σε ανθεκτικότητα έναντι του ιού του μωσαϊκού του καπνού (TMV) και του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato* στο είδος *N. benthamiana* (Μητσοπούλου, 2016). Τα ανωτέρω ευρήματα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η ενδογενής έκφραση της SP/HrpZ_{P_{sph}} σχετίστηκε με αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και ευρωστία (Pavli et al., 2011; 2012), παρέχουν σημαντικές ενδείξεις για τη δυνατότητα αξιοποίησής της ως προσέγγιση επίτευξης ευρείας ανθεκτικότητας και βελτιωμένης ανάπτυξης.

Με βάση τα ανωτέρω, στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του διαγονιδίου SP/*hrpZ_{P_{sph}}* σε διαγονιδιακά φυτά του είδους - μοντέλου

N. benthamiana αναφορικά με την ανθεκτικότητά τους σε καταπόνηση από αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων, και συγκεκριμένα του καδμίου και ψευδαργύρου, η οποία δύναται να περιορίσει σημαντικά τις αποδόσεις και την παραγωγικότητα των ευαίσθητων, σε αυτά, καλλιεργούμενων φυτικών ειδών. Στον παράγοντα της επίδρασης στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα των καλλιεργειών προστίθεται και η συνιστώσα της ποιότητας των παραγόμενων αγροτικών προϊόντων, η οποία υποβαθμίζεται από την ύπαρξη βαρέων μετάλλων στο έδαφος, καθιστώντας τα προϊόντα ακατάλληλα για βρώση και διάθεση στην αγορά. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα αναδύομενα προβλήματα αυξάνουν συνεχώς σε ένταση και συχνότητα λόγω της ραγδαία εξελισσόμενης ρύπανσης του περιβάλλοντος (με καταλυτικό παράγοντα την ανθρώπινη δραστηριότητα), καθιστούν αδήριτη την ανάγκη εύρεσης ή/και δημιουργίας γονοτύπων με προηγμένη αντοχή στην τοξική επίδραση των βαρέων μετάλλων. Η προσέγγιση αυτή αναμένεται να επιτρέψει την καλλιέργεια ανθεκτικών γονοτύπων σε επιβαρυμένα με βαρέα μέταλλα εδάφη, αυξάνοντας έτσι την έκταση καλλιεργήσιμης γης και ενισχύοντας την οικονομική βιωσιμότητα των καλλιεργειών.

Προς την κατεύθυνση αξιολόγησης της ανθεκτικότητας των *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών στην καταπόνηση από αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων, αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος των διαθέσιμων διαγονιδιακών σειρών (T₂) για την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του *SP/hrpZ_{P_{sph}}*, και οι επιλεγμένες ομοζύγωτες σειρές αποτέλεσαν το γενετικό υλικό για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα. Η αξιολόγηση βασίστηκε στην εκτίμηση του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των νεαρών σποροφύτων σε θρεπτικό μέσο που περιείχε αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων. Στο πλαίσιο αυτό, οι σπόροι των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών αξιολογήθηκαν συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου.

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν πως η βλάστηση των σπόρων επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία τόσο του Cd όσο και του Zn, με την επίδραση να είναι στο πλείστο των περιπτώσεων ανάλογη του επιπέδου καταπόνησης. Ειδικότερα, στην περίπτωση του Cd, το ποσοστό βλάστησης των σπόρων στο χαμηλό επίπεδο στρες (50μM) ήταν υψηλό, χωρίς να σημειώνονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των σειρών. Η εικόνα αυτή ανατρέπεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης του περιοριστικού παράγοντα (100μM και 200μM Cd), όπου παρατηρείται σημαντική μείωση του ποσοστού

βλάστησης, ιδίως στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης. Αξιοσημείωτη είναι η υπεροχή της *hrpZ_{Psph}*-σειράς 166-19-3 έναντι των υπολοίπων, φτάνοντας σε ποσοστό βλάστησης 100% στα 100μM. Υψηλό δυναμικό βλάστησης, στο ίδιο επίπεδο καταπόνησης, επέδειξε και η σειρά 160-6-2.

Σχετικά με την ανάπτυξη των φυταρίων και τη συμπτωματολογία της καταπόνησης, η δυσμενής επίδραση του Cd υπήρξε εμφανής. Έτσι, ενώ απουσία καταπόνησης (Control) τα σπορόφυτα παρουσίασαν απρόσκοπτη ανάπτυξη και ευρωστία, με την αύξηση του στρες έγινε πρόδηλη η ανάσχεση της ανάπτυξης, ιδίως στο υψηλότερο επίπεδο (200μM). Στα 50μM Cd, οι *hrpZ*-σειρές 166-19-3 και 160-6-2 σημείωσαν σαφή υπεροχή ανάπτυξης έναντι των υπόλοιπων σειρών, ενώ στα 100μM η σειρά 166-19-3 κρίθηκε ως υπερέχουσα όλων των υπολοίπων. Είναι άξιο αναφοράς πως οι δύο προαναφερθείσες σειρές διατήρησαν σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα χλωροφύλλης τόσο στο χαμηλό όσο και στο μέτριο επίπεδο καταπόνησης, καθιστώντας δυνατή την εξέλιξη της ανάπτυξής τους. Τα ευρήματα αυτά είναι σε πλήρη συμφωνία με σχετικές έρευνες, όπου αναφέρεται η επίδραση του Cd στην διαταραχή της λειτουργίας των υποκυτταρικών οργανιδίων, όπως των χλωροπλαστών (Lee and Back, 2017).

Αναφορικά με την καταπόνηση Zn, κατά την έναρξη της καταπόνησης στο χαμηλό επίπεδο στρες (5mM), το ποσοστό βλάστησης των σπόρων ήταν χαμηλό, με τη *hrpZ*-σειρά 169-7-2 ωστόσο να παρουσιάζει το μέγιστο ποσοστό βλάστησης (περίπου 50%). Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου σημειώθηκε σημαντική άνοδος στα ποσοστά βλάστησης, με τη διαγονιδιακή σειρά 166-19-3 να σημειώνει τελικά το υψηλότερο ποσοστό (93%), ακολουθούμενη από την 167-7-4, με ποσοστό βλάστησης 86%. Επιπλέον, στο μέτριο και υψηλό επίπεδο καταπόνησης (10mM και 15mM Zn), η παρατηρούμενη αναστολή της βλάστησης υπογραμμίζει την τοξικότητα αυτών των συγκεντρώσεων στο εξεταζόμενο φυτικό είδος. Στο σύνολό τους, τα ευρήματα υποδεικνύουν την κατάφορη δυσμενή επίδραση του Zn στο ρυθμό βλάστησης των σπόρων.

Σε παρόμοιο επίπεδο κυμάνθηκε και η ανάπτυξη των σπορόφυτων καθώς και η συμπτωματολογία της καταπόνησης Zn, υποδεικνύοντας τη δυσμενή επίδραση του συγκεκριμένου βαρέως μετάλλου. Παρόλο που απουσία καταπόνησης (Control) τα σπορόφυτα παρουσίασαν κανονική ανάπτυξη και ευρωστία, ακόμη και το χαμηλό

επίπεδο στρες επέφερε σαφή αναστολή της ανάπτυξης, συνοδευόμενη από συμπτώματα χλώρωσης στα φύλλα. Ωστόσο, καλύτερη απόκριση στον περιοριστικό παράγοντα επέδειξε η *hrpZ*-σειρά 166-19-3, ακολουθούμενη από τις σειρές 169-7-2, 169-7-5 και 169-6-4. Επισημαίνεται πως, παρά το γεγονός ότι στη βιβλιογραφία ενδείκνυται η χρήση των συγκεντρώσεων 10mM και 15mM Zn, τα ευρήματα της παρούσας διατριβής υποδεικνύουν ότι η ανάδειξη των διαφορών στην απόκριση του είδους *N. benthamiana* υπό συνθήκες καταπόνησης Zn απαιτεί την εφαρμογή χαμηλότερων επιπέδων στρες.

Τα αποτελέσματα της δυσμενούς επίδρασης των βαρέων μετάλλων αναφορικά με τη βλάστηση των σπόρων έρχονται σε συμφωνία με τα ευρήματα σχετικών μελετών σε άλλα είδη, συμπεριλαμβανομένων της φακής, του ραπανακίου, του σιναπιού και του ρυζιού (Fargasova, 1994; Ayaz and Kadioglu, 1997; Espen et al., 1997; Mishra and Choudhuri, 1998). Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί, η θετική επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στην ανάπτυξη ορισμένων διαγονιδιακών σειρών παρουσία των Cd και Zn. Συγκεκριμένα, στην καταπόνηση Cd, οι σειρές 166-19-3 και 160-6-2 παρουσίασαν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και βελτιωμένη ευρωστία συγκριτικά με wt φυτά και τις υπόλοιπες *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές, γεγονός το οποίο επαληθεύτηκε και στην καταπόνηση Zn από τις σειρές 166-19-3, 169-6-4 και 169-7-2. Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι ο διαφορετικός φαινότυπος των φυτών τόσο σε επίπεδο ανθεκτικότητας όσο και σε επίπεδο ανάπτυξης πιθανότητα αντανακλά το αποτέλεσμα της διαφορετικής θέσης ένθεσης του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}*, καθώς οι σειρές 160, 166, 167 και 169 συνιστούν διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού. Στο επίπεδο αυτό, σημειώνεται ότι, σύμφωνα με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, έχει αποδειχθεί ότι οι διαφορετικές σειρές εμφανίζουν διαφορεική έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε 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 έκθεσή ενός φυτού σε συνθήκες τοξικότητας μετάλλων, παρατηρείται τροποποίηση των φυσιο-βιοχημικών και μεταβολικών διαδικασιών, επιτρέποντας μόνο στους ανεκτικούς γονότυπους την ικανότητα επιβίωσης ή/και ανάσχεσης των απωλειών. Η αντοχή των φυτών στην παρουσία βαρέων μετάλλων στο άμεσο περιβάλλον τους επαφίεται σε μία πληθώρα παραγόντων, όπως είναι το στάδιο

ανάπτυξης, η σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ γονοτύπου και περιβάλλοντος, καθώς και οι διαθέσιμοι, από μέρους του φυτού, μηχανισμοί άμυνας. Οι τελευταίοι διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με τη ικανότητα του φυτού να προσλαμβάνει τους τοξικούς παράγοντες - η περίπτωση της εσωτερικής ανεκτικότητας -, ή την αδυναμία πρόσληψής τους - η περίπτωση του αποκλεισμού. Με την αντίληψη του ερεθίσματος - σήματος της καταπόνησης από τα φυτά, πραγματοποιείται μεταγωγή του σήματος σε σχετικά με το στρες κέντρα και επάγεται η έκφραση γονιδίων για την παραγωγή των κατάλληλων πρωτεϊνών καταπόνησης. Φυτικά είδη στα οποία η έκφραση των γονιδίων είναι υψηλότερη, συχνά εμφανίζουν μεγαλύτερη αντοχή στην τοξική επίδραση των μετάλλων. Σε αυτό το πλαίσιο κινούνται οι προσπάθειες των βελτιωτικών προγραμμάτων, κατά τα οποία επιδιώκεται η επιλογή γονοτύπων που αντεπεξέρχονται καλύτερα στην καταπόνηση συγκριτικά με άλλους γονότυπους.

Υπό το πρίσμα της γενετικής μηχανικής, η βελτίωση των φυτών επαφίεται στην ενσωμάτωση γονιδίων, προερχόμενων από άλλους οργανισμούς -φυτικούς ή μη-, τα οποία είτε εμπλέκονται σε μοριακά μονοπάτια άμυνας είτε επάγουν την παραγωγή πρωτεϊνών ή/και δευτερογενών μεταβολιτών με ρόλους που σχετίζονται με την άμυνα. Παρά το γεγονός ότι οι αναφορές για τη θετική επίδραση των χαρπινών έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων είναι περιορισμένες συγκριτικά με τις αντίστοιχες αναφορές για τις βιοτικές καταπονήσεις, εντούτοις έχει παρατηρηθεί πως βιοχημικοί μηχανισμοί άμυνας που επάγονται στην περίπτωση βιοτικών παραγόντων καταπόνησης, επιδρούν ευμενώς και σε αβιοτικά στρες. Για παράδειγμα, η επαγωγή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *SIERF5* σε φυτά του είδους *Arabidopsis thaliana* μέσω της ένθεσης χαρπίνης, οδήγησε σε υπερέκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το βιοχημικό μονοπάτι του αιθυλενίου καθώς και γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης αμψισικού οξέος (ABA), μόριο το οποίο συνδέεται με την απόκριση σε αβιοτικές καταπονήσεις. Με τη ρύθμιση της απόκρισης στο ABA, παρατηρήθηκε αύξηση της αντοχής στην υψηλή αλατότητα, υποδεικνύοντας ότι πιθανώς να υπάρχει θετική αλληλεπίδραση μεταξύ των βιοχημικών μονοπατιών του αιθυλενίου και του ABA για τη ρύθμιση της άμυνας των φυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Chuang et al., 2010). Κατά αντιστοιχία, η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *hrf1* σε φυτά ρυζιού, αύξησε την αντοχή των φυτών στην ξηρασία διαμέσου του βιοχημικού μονοπατιού του ABA

(Zhang et al., 2011). Παράλληλα, μελέτες αναφέρουν την αξιοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν συνθάσες των φυτοχληλινών (*PCS*) ως μέσο για την βελτίωση ανθεκτικότητας ευαίσθητων σε βαρέα μέταλλα ειδών. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αποδειχθεί ότι η ενσωμάτωση *PCS* γονιδίων, από την αγριάδα (*Cynodon dactylon*) (*CdPCS1*) και το σιτάρι (*TaPCS1*), σε φυτά καπνού οδηγεί σε ικανότητα αυξημένης συσσώρευσης Cd και άλλων μετάλλων στα φύλλα (Li et al., 2006; Martinez et al., 2006). Τα μετασχηματισμένα με το γονίδιο *TaPCS1* φυτά καπνού αναπτύχθηκαν σε πειράματα αγρού, ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα συσσώρευσης Cd, και διαπιστώθηκε η ικανότητα υπερσυσσώρευσης περισσότερων του ενός μετάλλων χωρίς σημαντική μείωση της βιομάζας. Ειδικότερα, τα φυτά παρουσίασαν εκατό φορές μεγαλύτερη βιομάζα κατά την ανάπτυξή τους σε μολυσμένα εδάφη συγκριτικά με το φυτό υπερσυσσωρευτή *Thlaspi caerulescens* (Martinez et al., 2006). Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν τη δυνατότητα της έκφρασης ετερόλογων γονιδίων, μέσω γενετικής μηχανικής, ως μία υποσχόμενη στρατηγική φυτοεξυγίανσης προβληματικών εδαφών.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν ενδείξεις ότι η ενδογενής έκφραση της *HrpZ_{P_{sph}}* μπορεί να αξιοποιηθεί για την αναβάθμιση της ανθεκτικότητας σε καταπόνηση από βαρέα μέταλλα και παράλληλα υπογραμμίζουν τη δυνατότητα αξιοποίησής της, και ενδεχομένως και άλλων πρωτεϊνών που ανήκουν στην κατηγορία των χαρπινών, ως μία εξαιρετικά πολύτιμη προσέγγιση για την επίτευξη ευρείας ανθεκτικότητας αλλά και προηγμένης ανάπτυξης και ευρωστίας. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί, ότι η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων αναφορικά με την παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα ορισμένων *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών προϋποθέτει την αξιολόγησή τους σε πειράματα που προσομοιάζουν τις συνθήκες αγρού. Η αξιολόγηση του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης υπό συνθήκες καταπόνησης αποτελεί μία συχνά χρησιμοποιούμενη πρακτική σε πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας καθώς προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης της απόκρισης ενός μεγάλου αριθμού γονοτύπων στην ελεγχόμενη καταπόνηση από τον περιοριστικό παράγοντα ενδιαφέροντος. Ωστόσο, σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι δε λαμβάνονται υπόψη οι σχέσεις αλληλεπίδρασης των μετάλλων με άλλα ιόντα που βρίσκονται στο έδαφος. Δεδομένου ότι η επίδραση ενός μετάλλου καθορίζεται σημαντικά από τη συνεργιστική ή ανταγωνιστική του δράση με άλλα μεταλλικά κατιόντα και τα σχετιζόμενα με αυτά ανιόντα, κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω

αξιολόγηση των υπερεχουσών *hrrZ_{P_{sph}}*-σειρών σε πειράματα με έδαφος από επιβαρυμένες περιοχές.

5. Βιβλιογραφία

Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

- Alfano JR, Collmer A (1997). The type III (hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J. Bacteriol.* 179: 5655-5662.
- Alloway BJ, Thornton I, Smart GA, Sherlock J, Quinn MJ (1988). *Sci. Total Environ.* 75: 41-69.
- Antoniadis V, Levizou E, Shaheen SM, Ok YS, Sebastian A, Baum C, Prasad MNV, Wenzel WW, Rinklebe J (2017). Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. *Earth-Science Reviews.* 171: 621-645.
- Arenhart RA, Lima JC, Pedron M, Carvalho FE, Silveira JA, Rosa SB, Caverzan A, Andrade CM, Schünemann M, Margis R, Margis-Pinheiro M (2013). Involvement of ASR genes in aluminium tolerance mechanisms in rice. *Plant Cell Environ.* 36(1): 52–67.
- Ashraf M (2010). Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnol. Adv.* 28: 169–183.
- Ashraf M, Foolad MR (2013). Crop breeding for salt tolerance in the era of molecular markers and marker-assisted selection. *Plant Breeding.* 132(1): 10–20.
- Ayaz FA, Kadioglu A (1997). Effects of metals (Zn, Cd, Cu, Hg) on the soluble protein bands of germinating *Lens esculenta* L. seeds. *Tr. J. Bot.* 21: 85–88.
- Babich H, Stotzky G (1978). Effects of Cadmium on the Biota: Influence of Environmental Factors. *Adv. Appl. Microbiol.* 23: 55.
- Badri DV, Vivanco JM (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* 32: 666–681.
- Baetz U, Martinoia E (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends Plant Sci.* 19: 90–98.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 233–266.

- Baum C, Hryniewicz K, Leinweber P, Meissner R (2006). Heavy metal mobilization and uptake by mycorrhizal and non-mycorrhizal willows (*Salix ×dasyclados*). J. Plant Nutr. Soil Sci. 169: 516–522.
- Bellard C, Bertelsmeier C, Leadley P, Thuiller W, Courchamp F (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. Ecol. Lett. 15: 365–377.
- Brown SL, Chaney RL, Angle JS, Baker AJ (1995). Zinc and Cadmium Uptake by Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* Grown in Nutrient Solution. Soil Sci. Soc. Am. J. 59: 125-133.
- Cabral L, Soares CR, Giachini AJ, Siqueira JO (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. World J. Microbiol. Biotechnol. 31: 1655–1664.
- Chaney RL, Hornick SB (1977). Accumulation and Effects of Cadmium on Crops. Int. Cadmium Conf., San Francisco. pp 125.
- Chen ZH, Zhou MX, Newman IA, Mendham NJ, Zhang GP, Shabala S (2007). Potassium and sodium relations in salinised barley tissues as a basis of differential salt tolerance. Funct. Plant Biol. 34: 150–162.
- Chuang H-W, Harnrak A, Chen Y-C, Hsu C-M (2010). A harpin-induced ethylene-responsive factor regulates plant growth and responses to biotic and abiotic stresses. Biochemical and Biophysical Research Communications. 402: 414-420.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu. Rev. Plant Biol. 53: 159-182.
- Coram TE, Mantri N, Ford R, Pang ECK (2007). Evans Review No. 4: functional genomics in chickpea: an emerging frontier for molecular-assisted breeding. Funct. Plant Biol. 34: 861–873.
- Cunningham LM, Collins FW, Hutchinson TC (1975). Physiological and Biochemical Aspects of Cadmium Toxicity in Soybean. Int. Conf. On Heavy Metals in the Environment. Toronto. October 27. pp 97.
- Cunningham SD, Anderson TA, Schwab AP, Hsu FC (1996). Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants. Advances in Agronomy. 56: 55-114.

- De Maria S, Rivelli AR, Kuffner M, Sessitsch A, Wenzel WW, Gorfer M, Strauss J, Puschenreiter M (2011). Interactions between accumulation of trace elements and major nutrients in *Salix caprea* after inoculation with rhizosphere microorganisms. *Chemosphere*. 84: 1256–1261.
- Dong H-S, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV (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 HP, Peng J, Bao Z, Meng X, Bonasera JM, Chen G, Beer SV, 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 HP, 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.
- Durand TC, Baillif P, Alberic P, Carpin S, Label P, Hausman J-F, Morabito F (2011). Cadmium and zinc are differentially distributed in *Populus tremula* × *P. alba* exposed to metal excess. *Plant Biosyst*. 145: 397–405.
- Epstein S (1974). Heavy metals in soils. *Environ. Health Perspect*. 7: 253-323.
- Epstein E, Bloom AJ (2005). *Mineral Nutrition of Plants. Principles and Perspectives*, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. pp 390.
- Espen L, Pirovano L, Cocucci SM (1997). Effects of Ni²⁺ during the early phases of radish (*Raphanus sativus*) seed germination. *Environ. Exp. Bot*. 38: 187–197.
- Etim E (2012). Phytoremediation and Its Mechanisms: A Review. *International Journal of Environment and Bioenergy*. 2(3): 120-136.
- Fargasova A (1994). Effect of Pb, Cd, Hg, As and Cr on germination and root growth of *Sinapsis alba* seeds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 52: 452–456.
- Foy CD, Chaney RL, White MC (1978). Physiology of metal toxicity in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Molec. Biol*. 29: 511-566.
- He SY, Huang HC, 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 SY, 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.
- Heiskanen J (2006). Estimated aboveground tree biomass and leaf area index in a mountain birch forest using ASTER satellite data. *Int. J. Remote Sens.* 27: 1135–1158.
 - Hollósy F (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron.* 33(2): 179-197.
 - Hutton M (1987). In: Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment. SCOPE 31. (eds. Hutchinson TC, Meema KM), John Wiley and Sons, Inc. Chistester. pp 35-41.
 - Ibekwe AM, Angle JS, Chaney RL, Van Berkum P (1998). Zinc and Cadmium Effects on Rhizobia and White Clover using Chelator-Buffered Nutrient Solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62: 204-211.
 - 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.
 - Jones JDG, Dangl JL (2006). The plant immune system. *Nature.* 444(16): 323-329.
 - Jones HG, Serraj R, Loveys BR, Xiong L, Wheaton A, Price AH (2009). Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Funct. Plant Bio.* 36: 978–989.
 - Karamanos A (2009). Possible effects of climate change on crop-weed interactions. 2nd International Conference on “Novel and Sustainable Weed Management in Arid and Semi-arid Agroecosystems”, Santorini, Greece, www.ewrs.org/arid/Santorini.asp.
 - Karban R, Baldwin IT (1997). *Induced Responses to Herbivory*. University of Chicago Press, Chicago.
 - Kim JF, Beer SV (2000). *hrp genes and harpins of Erwinia amylovora: a decade of discovery*. In: Fire Blight and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. (ed. Vanneste, JL). CAB International. UK. Wallingford. pp 141–162.
 - Kloke A, Sauerbeck DR, Vetter H (1984). The Contamination of Plants and Soils with Heavy Metals and the Transport of Metals in Terrestrial Food

- Chains. In: Changing Metal Cycles and Human Health. (ed. Nriagu JO), Dahlem. Konferenzen. Springer-Verlag. Berlin. pp 113.
- Kozhevnikova AD, Erlikh NT, Zhukovskaya NV, Obroucheva NV, Ivanov VB, Belinskaya AA, Khutoryanskaya MY, Seregin IV (2014). Nickel and zinc effects, accumulation and distribution in ruderal plants *Lepidium ruderale* and *Capsella bursapastoris*. *Acta Physiol. Plant.* 36: 3291–3305.
 - Lee H-Y, Back K (2017). Cadmium Disrupts Subcellular Organelles, Including Chloroplasts, Resulting in Melatonin Induction in Plants. *Mol.* 22(10): 1791.
 - Li MC (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. pp 31.
 - Li R, Fan Y (1999). Reduction of lesion growth rate of blight plant disease in transgenic potato expressing harpin protein. *Sci. China C. Life Sci.* 42(1): 96-101.
 - Li J, Guo J, Xu W, Ma M (2006). Enhanced cadmium accumulation in transgenic tobacco expressing the phytochelatin synthase gene of *Cynodon dactylon* L. *J. Integr. Plant Biol.* 48: 928–937.
 - Li JG, Liu HX, Chen LF, 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.
 - Li W, Xu Y-P, Zhang Z-X, Cao W-Y, Li F, Zhou X, Chen G-Y, Cai X-Z (2012). Identification of Genes Required for Nonhost Resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Reveals Novel Signaling Components. *PLoS ONE.* 7(8): e42796.
 - Lichtenthaler HK (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148: 4-14.
 - Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J. Bacteriol.* 168(2): 512-522.

- Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, Mc Grath SP, (2000). Cadmium accumulation in population of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*, New Phytol. 145: 11-20.
- Macnicol RD, Beckett PHT (1985). Critical Tissue Concentrations of Potentially Toxic Elements. Plant Soil. 85: 107.
- Mantri N, Ford R, Coram TE, Pang ECK (2010). Evidence of unique and shared responses to major biotic and abiotic stresses in chickpea. Environ. Exp. Bot. 69(3): 286–292.
- Martinez M, Bernal P, Almela C, Velez D, Garcia-Agustin P, Serrano R, Navarro-Avino J (2006). An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. Chemosphere. 64: 478–485.
- Masuka B, Araus JL, Das B, Sonder K, Cairns JE (2012). Phenotyping for abiotic stress tolerance in maize. J. Integr. Plant Biol. 54(4): 238–249.
- McCrath, SP (1998). Phytoextraction for soil remediation. In: Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals: their role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining. (ed. Brooks RR), (New York: CAB International), pp 261-287.
- Mickelbart MV, Hasegawa PM, Salt DE (2015). Αποκρίσεις και Προσαρμογές σε Αβιοτικές Καταπονήσεις. Απόδοση από: PLANT PHYSIOLOGY (eds. Taiz L, Zeiger E). Utopia. pp 914-915, 916-922, 936-938.
- Mishra A, Choudhuri MA (1998). Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants. Biol. Planta. 41: 469–473.
- Morison JIL, Baker NR, Mullineaux PM, Davies WJ (2008). Improving water use in crop production. Philos. Trans. R. Soc. B. Bio. Sci. 363: 639–658.
- Munns R, James RA (2003). Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. Plant Soil. 253: 201–218.
- Munns R, Tester M (2008). Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 651-681.
- Niu CF, Wei W, Zhou QY, Tian AG, Hao YJ, Zhang WK, Ma B, Lin Q, Zhang ZB, Zhang JS, Chen SY (2012). Wheat WRKY genes TaWRKY2 and TaWRKY19 regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. Plant Cell Environ. 35(6): 1156–1170.

- Oh CS, Beer SV (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.
- Olsen SR (1972). Micronutrient Interactions. In: *Micronutrients in Agriculture* (eds. Mortvedt JJ, Giordano PM, Lindsay WL), Soil Sci. Soc. Am. Madison, Wis. pp 243.
- Papadopoulos P, Rowell DL (1988). The Reactions of Copper and Zinc with Calcium Carbonate Surfaces. *J. Soil Sci.* 39: 39-48.
- Parrotta L, Guerriero G, Sergeant K, Cai G, Hausman J-F (2015). Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Front. Plant Sci.* 6: 133.
- Patade VY, Suprasanna P (2008). Radiation induced *in vitro* mutagenesis for sugarcane improvement. *Sugar Tech.* 10(1): 14–19.
- Patade VY, Suprasanna P, Bapat VA (2008). Gamma irradiation of embryogenic callus cultures and *in vitro* selection for salt tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Agril. Sci. China.* 7(9): 101–105.
- Patade VY, Suprasanna P (2009). An *in vitro* radiation induced mutagenesis-selection system for salinity tolerance in sugarcane. *Sugar Tech.* 11(3): 246–251.
- Patade VY, Bhargava S, Suprasanna P (2011a). Transcript expression profiling of stress responsive genes in response to short-term salt or PEG stress in sugarcane leaves. *Mol. Biol. Rep.* doi:10.1007/s11033-011-1100-z.
- Patade VY, Bhargava S, Suprasanna P (2011b). Effects of NaCl and iso-osmotic PEG stress on growth, osmolytes accumulation and antioxidant defense in cultured sugarcane cells. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* doi:10.1007/s11240-011-0041-5.
- Patade VY, Bhargava S, Suprasanna P (2011c). Salt and drought tolerance of sugarcane under isoosmotic salt and water stress: growth, osmolytes accumulation and antioxidant defense. *J. Plant Interact.* doi:10.1080/17429145.2011.557513.
- Pavli OI, Kelaidi GI, Tampakaki AP, Skaracis GN (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 OI, Tampakaki AP, Skaracis GN (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 TP, Bonasera JM, Beer SV (2003). Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance requires the NDR1 and EDS1 genes. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 62: 317-326.
- Peng J-L, Bao Z-L, Ren H-Y, Wang J-S, Dong H-S (2004). Expression of Harpin_{Xoo} in Transgenic Tobacco Induces Pathogen Defense in the Absence of Hypersensitive Cell Death. *Phytopathology*. 94(10): 1048-1055.
- Phipps DA (1981). In: *Effects of Heavy Metal Pollution on Plants*. (Ed. Lepp NW) Applied Science Publishers. London. 1-54.
- Price CA, Clark HE, Funkhouser EA (1972). Functions of Micronutrients in Plants. In: *Micronutrients in Agriculture* (eds. Mortvedt JJ, Giordano PM, Lindsay WL). pp 231. Soil Science Society of America Inc. Madison. Wisconsin. USA.
- Ren H, Gu G, Long J, Yin Q, Wu T, Song T, Zhang S, Chen Z, Dong H (2006a). Combinative effects of a bacterial type-III effector and a biocontrol bacterium on rice growth and disease resistance. *J. Biosci.* 31(5): 617-627.
- Ren H, Song T, Wu T, Sun L, Liu Y, Yang F, Chen Z, Dong H (2006b). Effects of a biocontrol bacterium on growth and defence of transgenic rice plants expressing a bacterial type-III effector. *Ann. Microbiol.* 56: 281–287.
- Ribaut JM, Ragot M (2007). Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. *J. Exp. Bot.* 58(2): 351–360.
- Rosenzweig C, Elliott J, Deryng D, Ruane AC, Müller C, Arneth A, et al (2014). Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: 3268–3273.
- Roy SJ, Tucker EJ, Tester M (2011). Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Current Opinion in Plant Biology.* 14(3): 232–239.
- Sarret G, Harada E, Choi Y-E, Isaure M-P, Geoffroy N, Fakra S, Marcus MA, Birschwilks M, Clemens S, Manceau A (2006). Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiol.* 141: 1021–1034.

- Schnoor JL, Licht LA, McCutcheon SC, Wolfe NL, Carreira LH (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. & Technol.* 29: 318A-323A.
- Schreiber K, Desveaux D (2008). Message in a Bottle: Chemical Biology of Induced Disease Resistance in Plants. *Plant Pathol. J.* 24(3): 245-268.
- Shao M, Wang J, Dean RA, Lin Y, Gao X, Hu S (2008). Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthe grisea*. *Plant Biotechnol. J.* 6(1): 73-81.
- Smethurst CF, Gill WM, Shabala S (2009). Using excised leaves to screen Lucerne for salt tolerance: Physiological and cytological evidence. *Plant Signal Behav.* 4(1): 39–41.
- Smilde KW, Koukoulakis P, Van Luit B (1974). Crop Response to Phosphate and Lime on Acid Sandy Soils High in Zinc. *Plant Soil.* 41: 445.
- Smolders E, McLaughlin MJ (1996). Chlorine Increases Cadmium Uptake in Swiss Chard in a Resin-Buffered Nutrient Solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60: 1443-1447.
- Soon YK (1981). Solubility and Sorption of Cadmium in Soils Amended with Sewage Sludge. *J. Soil Sci.* 32: 85-95.
- Sposito G, Page AL (1984). In: *Circulation of Metal Ions in the Environment. Metal Ions in Biological Systems.* 18. (ed. Sigel H) Marcel Dekker. New York. pp 39.
- Strobel NE, Ji C, Gopalan S, Kuc JA, He SY (1996). Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZPss protein. *Plant J.* 9: 431-439.
- Sytar O, Kumar A, Latowski D, Kuczynska P, Strzałka K, Prasad MNV (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiol. Plant.* 35: 985–999.
- Takamura Y, Ishida Y, Inoue Y, Tsutsumi F, Kuwata S (2004). Induction of a hypersensitive response-like reaction in transgenic tobacco expressing harpin_{PSS}. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 64: 83-89.
- Tampakaki AP, Panopoulos NJ (2000). Elicitation of Hypersensitive Cell Death by Extracellularly Targeted HrpZP_{sph} Produced In Planta. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13(12): 1366–1374.

- Tampakaki AP, Skandalis N, Gazi A, Bastaki MN, Sarris PF, Charova SN, Kokkinidis M, Panopoulos NJ (2010). Playing the “Harp”: Evolution of our Understanding of *hrp/hrc* Genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 347–370.
- Temminghoff EJM., Van Der Zee SEATM., DeHaan FAM. (1995). Speciation and calcium competition on cadmium sorption by sandy soil at various pHs. *Eur. J. Soil Sci.* 46: 649-655.
- Tiller KG, Nayyar VK, Clayton PM (1979). Specific and Non- Specific Sorption of Cadmium by Soil Clays as Influenced by Zinc and Calcium. *Aust. J. Soil Res.* 17:17.
- Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132: 144–151.
- Wallace JS, Acreman MC, Sullivan CA (2003). The sharing of water between society and ecosystems: from conflict to catchment–based co–management. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 358: 2011–2026.
- Wang JP, Raman H, Zhang GP, Mendham N, Zhou MX (2006). Aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms, genetics and screening methods. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 7(10): 769–787.
- Wang XY, Song CF, Miao WG, Ji ZL, Wang X, Zhang Y, Zhang JH, Hu JS, Borth W, Wang JS (2008). Mutations in the N-terminal coding region of the harpin protein Hpa1 from *Xanthomonas oryzae* cause loss of hypersensitive reaction induction in tobacco. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81(2): 359-369.
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257: 85-88.
- Wei B, Jing R, Wang Ch, Chen J, Mao X, Chang X, Jia J (2009). Dreb1 genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): development of functional markers and gene mapping based on SNPs. *Mol. Breed.* 23: 13–22.
- Wheeler T, Von Braun J (2013). Climate change impacts on global food security. *Science.* 341: 508–513.
- Yang W, Duan L, Chen G, Xiong L, Liu Q (2013). Plant phenomics and high-throughput phenotyping: accelerating rice functional genomics using multidisciplinary technologies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16(2): 180–187.

- Zhang C, Qian J, Bao Z, Hong X, Dong H (2007). The Induction of Abscisic-Acid-Mediated Drought Tolerance is Independent of Ethylene Signaling in *Arabidopsis* Plants Responding to a Harpin Protein. *Plant Mol. Biol. Rep.* 25: 98–114.
- Zhang L, Xiao S, Li W, Feng W, Li J, Wu Z, Gao X, Liu F, Shao M (2011). Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *Journal of Experimental Botany.* 62(12): 4229-4238.
- Zimmer D, Baum C, Leinweber P, Hrynkiewicz K, Meissner R (2009). Associated bacteria increase the phytoextraction of cadmium and zinc from a metal-contaminated soil by mycorrhizal willows. *Int. J. Phytorem.* 11: 200–213.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Αλμπάνης Τ (1999). “Ρύπανση και Τεχνολογία Προστασίας Περιβάλλοντος”. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα. σελ. 6, 10.
- Καραμάνος Α (2012). ΓΕΝΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ. ΑΡΧΕΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΙΣ ΑΡΟΤΡΑΙΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ. Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα. σελ. 344, 531-534.
- Μήτσιος Ι (2004). Γονιμότητα Εδαφών. Θρεπτικά στοιχεία φυτών (μακροθρεπτικά, μικροθρεπτικά) και Βαρέα Μέταλλα. Μέθοδοι και Εφαρμογές. Εκδόσεις Zymel, Αθήνα. σελ. 259-269, 317, 320, 321, 327-331, 384-385, 388, 390-392, 394-395.
- Μητσοπούλου Ν (2016). Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε παθογόνους μικροοργανισμούς σε φυτά *N. benthamiana* που εκφράζουν ενδογενώς τη χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}. Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Βόλος.
- Ταμπακάκη ΑΠ (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.

- Τζάμος ΕΚ (2007). Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλη Α, Β' Έκδοση, Αθήνα. σελ. 383-385.

Διαδικτυακή Βιβλιογραφία

- United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development (2000). Introduction to Phytoremediation.
- <https://www.inedivim.gr/images/ng-egkykpolaideia/ng-egkykpolaideia-perivalon-5-ripansi.pdf>.
- <http://www.triachem.com/Products/SeedDressing/Messenger%20ST.pdf>.