



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών  
Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής Και Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη της Έκφρασης των Διαγονιδίων *HraA* και *HraB* σε Φυτά του  
Είδους *N. Benthamiana* σε Σχέση με την Ανθεκτικότητα έναντι Αβιοτικών  
Καταπονήσεων»

ΜΟΥΡΑΤΙΔΟΥ ΚΑΣΣΙΑΝΗ



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

**ΒΟΛΟΣ, 2019**

Μελέτη της Έκφρασης των Διαγονιδίων *HraA* και *HraB* σε Φυτά του Είδους *N. Benthamiana* σε Σχέση με την Ανθεκτικότητα έναντι Αβιοτικών Καταπονήσεων.

Μουρατίδου Κασσιανή

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

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

## Ευχαριστίες

Η επιτυχής ολοκλήρωση της διατριβής μου δε θα είχε επιτευχθεί χωρίς τη συμβολή και την καθοδήγηση ορισμένων ανθρώπων τους οποίους και θέλω να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την τεράστια ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών για τη στήριξη και την καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, της συγγραφής και της διόρθωσης.

Επίσης, θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω τη Νικολέτα Μητσοπούλου, υποψήφια διδάκτορα Γενετικής Βελτίωσης Φυτών για τη διαρκή υποστήριξή της κατά τη διάρκεια της συγγραφής και της διόρθωσης της παρούσας διατριβής. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την πολύτιμη βοήθειά του, τόσο πρακτική όσο και ψυχολογική, τον συνεργάτη και φίλο Giovanni Bertoldo, μέλος της εργαστηριακής ομάδας του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου της Πάντοβας, στην Ιταλία.

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

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πληθώρα μελετών στη διεθνή βιβλιογραφία υποστηρίζουν την αντοχή διαγονιδιακών φυτών, που φέρουν γονίδια φυτικής ή βακτηριακής προέλευσης, έναντι αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων καταπόνησης, μέσω της επαγωγής ποικίλων μηχανισμών άμυνας. Ειδικότερα, το γονίδιο *hraA* έχει προταθεί ως γονίδιο με καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια του βακτηρίου από το οποίο προέρχεται, ενώ αντίθετα το γονίδιο *hraB* έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά με το γονίδιο *hraA*, ενώ παράλληλα ρυθμίζει τη μεταφορά πρωτεϊνών τελεστών στα φυτικά κύτταρα. Σε αυτό το πλαίσιο, σκοπό της παρούσας διατριβής αποτελεί η διερεύνηση της επίδρασης των γονιδίων *hraA* και *hraB* προερχόμενα από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* και *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* αντίστοιχα, σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* ως προς την ανθεκτικότητά τους έναντι των αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης ξηρασίας, υψηλής αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας. Για το σκοπό αυτό, αρχικά έγινε έλεγχος της ένθεσης των διαγονιδίων με τη χρήση PCR. Στη συνέχεια, οι διαθέσιμες διαγονιδιακές σειρές εξετάστηκαν ως προς την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάστασή τους με σκοπό οι ομοζύγωτες σειρές να αποτελέσουν το υλικό των πειραμάτων αξιολόγησης της ανθεκτικότητας. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας βασίστηκε στην εκτίμηση του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των *hraA*- και *hraB*- διαγονιδιακών σειρών συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου σε θρεπτικό μέσο MS παρουσία d-mannitol (0, 100, 200 και 300 mM) και NaCl (0, 100 και 200 mM) για την καταπόνηση ξηρασίας και αλατότητας αντίστοιχα, ενώ η καταπόνηση της υψηλής θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση σπόρων σε θρεπτικό μέσο MS υπό συνθήκες θερμοκρασίας 37 °C. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η βλάστηση των σπόρων, καθώς και η ανάπτυξη των σποροφύτων, επηρεάστηκαν δυσμενώς από τους περιοριστικούς παράγοντες, με την επίδραση να είναι ανάλογη του επιπέδου καταπόνησης. Ωστόσο, παρατηρήθηκε υπεροχή ορισμένων *hraA*- και *hraB*- διαγονιδιακών σειρών έναντι των φυτών αγρίου τύπου παρουσία των αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης, γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα για μετέπειτα αξιοποίηση των εν λόγω γονιδίων ως μέσο βελτίωσης της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	1
1.1 Κλιματική αλλαγή και οι επιπτώσεις της στα φυτά	2
1.2 Αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης και επιδράσεις στα φυτά	4
1.2.1 Φάσεις καταπόνησης	5
1.2.2 Υψηλή αλατότητα	6
1.2.3 Υδατική καταπόνηση	8
1.2.4 Θερμική καταπόνηση	10
1.3 Η εξέλιξη της βελτίωσης φυτών στη δημιουργία ανθεκτικών γονοτύπων στις αβιοτικές καταπονήσεις.	12
1.4 Το βακτήριο <i>Xanthomonas campestris</i>	15
1.5 Πρωτεΐνες τελεστές	16
1.6 Το είδος <i>Nicotiana benthamiana</i>	17
1.7 Σκοπός της μελέτης	19
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	20
2.1 Φυτικό υλικό και επιλογή διαγονιδιακών σειρών	20
2.2 Έλεγχος της διαγονιδιακής φύσης και της ομοζύγωσης/ετεροζύγωσης κατάστασης των διαγονιδίων <i>hraA</i> και <i>hraB</i>	21
2.3 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης	23
2.3.1 Καταπόνηση υπό συνθήκες ξηρασίας	23
2.3.2 Καταπόνηση υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας	24
2.3.3 Καταπόνηση υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας	25
2.3.4 Διαδοχικά στάδια παρασκευής τριβλίων	26

<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	28
3.1 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην καταπόνηση ξηρασίας	28
3.1.1 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των <i>hraB</i> - διαγονιδιακών σειρών	28
3.1.2 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των <i>hraA</i> - διαγονιδιακών σειρών	32
3.2 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας	40
3.2.1 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των <i>hraB</i> - διαγονιδιακών σειρών	40
3.2.2 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των <i>hraA</i> - διαγονιδιακών σειρών	47
3.3 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας	54
3.3.1 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των <i>hraB</i> - διαγονιδιακών σειρών	54
3.3.2 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των <i>hraA</i> διαγονιδιακών σειρών	56
3.3.3 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των φυτών αγρίου τύπου παρουσία και απουσία Καναμυκίνης	61
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	61
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	67
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	68

## Κατάλογος Πινάκων

**Πίνακας 2.1:** Διαγονιδιακές σειρές T1 γενεάς που αξιολογήθηκαν ως προς την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση των διαγονιδίων hpaA και hpaB.

**Πίνακας 2.2:** Ομοζύγωτες διαγονιδιακές σειρές που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα έναντι καταπόνησης ξηρασίας.

**Πίνακας 2.3:** Ομοζύγωτες διαγονιδιακές σειρές που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα έναντι καταπόνησης υψηλής αλατότητας.

**Πίνακας 2.4:** Ομοζύγωτες διαγονιδιακές σειρές που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα έναντι καταπόνησης υψηλής θερμοκρασίας.

**Πίνακας 3.1** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των hpaB - διαγονιδιακών σειρών και σπόρων αγρίου τύπου, ανά επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας, την 7η , 17η, 30η και 41η ημέρα παρατήρησης.

**Πίνακας 3.2:** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των hpaA-διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου, ανά επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας, την 7η , 17η, 30η και 41η ημέρα.

**Πίνακας 3.3:** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των hpaB διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου, ανά επίπεδο καταπόνησης αλατότητας, παρουσία ή μη καναμυκίνης, την 6η , 14η , 24η και 39η ημέρα.

**Πίνακας 3.4:** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων τριών διαγονιδιακών σειρών hpaA και σπόρων αγρίου τύπου, ανά επίπεδο καταπόνησης αλατότητας, παρουσία ή απουσία αντιβιοτικού, την 6η , 14η , 24η και 39η ημέρα.

**Πίνακας 3.5:** Ποσοστό βλάστησης (%) των HpaB διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου παρουσία ή απουσία Km, υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης (37 °C), την 7η , 13η , 21η και 28η ημέρα.

**Πίνακας 3.6:** Ποσοστό βλάστησης (%) των HpaA διαγονιδιακών σειρών που και των φυτών αγρίου τύπου παρουσία ή μη Καναμυκίνης, ως απόκριση στη θερμική καταπόνηση (37 °C), την 7η , 13η , 21η και 28η ημέρα.

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

**Διάγραμμα 3.1:** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των hpaB διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση στα πέντε επίπεδα καταπόνησης ξηρασίας (Control, 5% PEG, 100mM, 200mM, 300mM D-Mannitol), την 7η , 17η , 31η και 41η ημέρα παρατήρησης.

**Διάγραμμα 3.2:** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης (%) σπόρων των hpaB διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση στα πέντε επίπεδα καταπόνησης ξηρασίας (Control, 5% PEG, 100 mM, 200 mM, 300 mM D-Mannitol).

**Διάγραμμα 3.3:** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των HpaA διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση στα πέντε επίπεδα καταπόνησης ξηρασίας (Control, 5 % PEG, 100 mM, 200 mM, 300 mM D-Mannitol), την 7η , 17η , 31η και 41η ημέρα παρατήρησης.

**Διάγραμμα 3.4:** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης (%) σπόρων των HpaA διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση στα πέντε επίπεδα καταπόνησης ξηρασίας (Control, 5 % PEG, 100 mM, 200 mM, 300 mM D-Mannitol).

**Διάγραμμα 3.5:** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των HpaB διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση σε τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (Control, 100 mM, 200 mM NaCl), την 6η , 14η , 24η και 39η ημέρα, παρουσία ή μη του αντιβιοτικού.

**Διάγραμμα 3.6:** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης (%) των σπόρων των HpaB διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση σε τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (Control, 100 mM, 200 mM NaCl), παρουσία ή μη του αντιβιοτικού.

**Διάγραμμα 3.7:** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων τριών διαγονιδιακών σειρών που φέρουν το γονίδιο HpaA και σπόροι αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση σε τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας ( C, 100 mM, 200 mM NaCl ), την 6η , 14η , 24η και 39η ημέρα, παρουσία ή απουσία αντιβιοτικού.

**Διάγραμμα 3.8:** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης (%) σπόρων τριών διαγονιδιακών σειρών που φέρουν το γονίδιο HpaA και σπόρων αγρίου τύπου (WT), ως



απόκριση σε τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (C, 100 mM, 200 mM NaCl ), παρουσία ή απουσία αντιβιοτικού.

**Διάγραμμα 3.9:** Χρονική εξέλιξη ποσοστού βλάστησης (%) των HraB διαγονιδιακών σειρών, και των φυτών αγρίου τύπου παρουσία ή απουσία Km, ως απόκριση στη θερμική καταπόνηση των 37 °C, την 7η, 13η, 21η και 28η ημέρα παρατήρησης.

**Διάγραμμα 3.10:** Χρονική εξέλιξη ποσοστού βλάστησης (%) των σποροφύτων των HraA διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου παρουσία ή μη Καναμυκίνης, ως απόκριση στη θερμική καταπόνηση των 37°C, την 7η , 13η , 21η και 28η ημέρα..

**Διάγραμμα 3.11:** Χρονική εξέλιξη ποσοστού βλάστησης (%) των φυτών αγρίου τύπου παρουσία ή μη Καναμυκίνης, ως απόκριση στη θερμική καταπόνηση των 37°C, την 7η , 13η , 21η και 28η ημέρα.

## Κατάλογος Εικόνων

**Εικόνα 1.1:** Γενική απεικόνιση στην αλληλουχία των φάσεων των παραγόντων καταπόνησης και οι αντιδράσεις των φυτών ως προς την έκθεσή τους σε αυτά.

**Εικόνα 1.2:** Ανάπτυξη φυτών T1 γενιάς για τη δημιουργία σπόρων αυτογονιμοποίησης (T2 γενιά).

**Εικόνα 3.1:** Συγκριτική ανάπτυξη των HraB διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας PEG 5%, την 15η ημέρα παρατήρησης. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς HraB 2-2. Γ Φυτά της σειράς HraB 4-3.

**Εικόνα 3.2:** Συγκριτική ανάπτυξη των HraB διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο μεσαίο επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 100 mM D-Mannitol, την 20η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς HraB 2-2. Γ Φυτά της σειράς HraB 4-3.

**Εικόνα 3.3** Συγκριτική ανάπτυξη των HraB διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 200 mM D-Mannitol, την 20η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς HraB 2-2. Γ Φυτά της σειράς HraB 4-3.

**Εικόνα 3.4:** Συγκριτική ανάπτυξη των HraB διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 300 mM D-Mannitol, την 33η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. Α wt φυτά. Β Φυτά της σειράς HraB 2-2. Γ Φυτά της σειράς HraB 4-3.

**Εικόνα 3.5:** Σύγκριση της επίδρασης του διαγονιδίου HraB στην ανάπτυξη των σπορόφυτων σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των σπορόφυτων αγρίου τύπου (wt). Α wt φυτά. Β Φυτά της σειράς HraB 1-4. Γ Φυτά της σειράς HraB 2-2. Δ Φυτά της σειράς HraB 4-3.

**Εικόνα 3.6:** Συγκριτική ανάπτυξη των HraA διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας PEG 5 %, την 15η ημέρα παρατήρησης. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς HraA T1-5.

**Εικόνα 3.7:** Συγκριτική ανάπτυξη των HraA διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 100 mM D-Mannitol, την 20η ημέρα παρατήρησης. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς HraA T1-5.

**Εικόνα 3.8:** Συγκριτική ανάπτυξη των HraA διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο μεσσαίο επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 200 mM D-Mannitol, την 20η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. Α wt φυτά. Β Φυτά της σειράς HraA T1-5.

**Εικόνα 3.9:** Συγκριτική ανάπτυξη των HraA διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT) στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 300 mM D-Mannitol, την 33η ημέρα του πειράματος. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς HraA T1-5, Γ Φυτά της σειράς HraA 2-4.

**Εικόνα 3.10:** Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (WT) στο επίπεδο καταπόνησης αλατότητας Control, την 11η ημέρα του πειράματος. Α WT φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία αντιβιοτικού. Β WT φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία αντιβιοτικού.

**Εικόνα 3.11:** Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (WT) απουσία του αντιβιοτικού, την 24η ημέρα του πειράματος, στα τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας. Α Control. Β 100 mM NaCl. Γ 200 mM NaCl.

**Εικόνα 3.12:** Συγκριτική ανάπτυξη της HraB 4-3 διαγονιδιακής σειράς, στα τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (Control, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl), που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο παρουσία ή μη αντιβιοτικού (Km), την 24η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. Α HraB 4-3, Control, απουσία Km. Β HraB 4-3, Control, παρουσία Km. Γ HraB 4-3, 100 mM NaCl, απουσία Km. Δ HraB 4-3, 100 mM NaCl, παρουσία Km. Ε HraB 4-3 φυτά, 200 mM NaCl, απουσία Km. Ζ HraB 4-3, 200 mM NaCl, παρουσία Km.

**Εικόνα 3.13:** Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών-μαρτύρων αγρίου τύπου (wt), την 11η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. Α wt φυτά σε θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικό (Km). Β wt φυτά σε θρεπτικό μέσο αντιβιοτικό (Km).

**Εικόνα 3.14:** Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (wt) σε θρεπτικό μέσο απουσία km, την 16η ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης, στα τρία επίπεδα στρες αλατοτητας. Α Control. Β 100 mM NaCl. Γ 200 mM NaCl.

**Εικόνα 3.15:** Συγκριτική ανάπτυξη της HraA T1-5 διαγονιδιακής σειράς, στα τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (Control, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl), που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο παρουσία ή μη Καναμυκίνης (Km), την 20η ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α HraA T1-5, Control, απουσία Km. Β HraA T1-5, Control, παρουσία Km. Γ HraA T1-5, 100 mM NaCl, απουσία Km. Δ HraA T1-5, 100 mM NaCl, παρουσία Km. Ε HraA T1-5, 200 mM NaCl, απουσία Km. Ζ HraA T1-5, 200 mM NaCl, παρουσία Km.

**Εικόνα 3.16:** Συγκριτική ανάπτυξη των διαγονιδιακών σειρών και του αγρίου τύπου παρουσία καναμυκίνης. Α wt φυτά. Β Φυτά της σειράς HraA T1-5. Γ Φυτά της σειράς HraA 2-4. Δ Φυτά της σειράς HraA 1-2.

**Εικόνα 3.17:** Συγκριτική ανάπτυξη της διαγονιδιακής σειράς HraB 4-3 και του αγρίου τύπου στη θερμική καταπόνηση των 37°C (20η ημέρα) παρουσία Km. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς HraB 4-3.

**Εικόνα 3.18:** Συγκριτική ανάπτυξη της διαγονιδιακής σειράς HraA T1-5 και των φυτών αγρίου τύπου (WT) στη θερμική καταπόνηση (37°C), την 13η ημέρα παρατήρησης παρουσία Km. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς HraA T1-5.

**Εικόνα 3.:** Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (WT) στη θερμική καταπόνηση (37 °C), που αναπτύχθηκαν παρουσία ή απουσία Km, την 13η και 26η ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α WT φυτά, απουσία Km, 13η ημέρα. Β WT φυτά, παρουσία Km, 13η ημέρα. Γ WT φυτά απουσία Km, 26η ημέρα. Δ WT φυτά παρουσία Km, 26η ημέρα.





# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Γενικά

Τα φυτά, ως μέρη του οικοσυστήματος, αλληλεπιδρούν συνεχώς με το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται, με αποτέλεσμα να πλήττονται συνεχώς από ποικίλους παράγοντες βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Οι τελευταίοι, συχνά επιφέρουν σημαντική μείωση της απόδοσής τους, υποβάθμιση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων, μεταβολές στην αναπαραγωγική τους ικανότητα αλλά και αδυναμία επιβίωσής τους.

Στους κυριότερους βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης που προσβάλλουν τα φυτά, συγκαταλέγονται τα έντομα, τα ακάρεα, οι νηματώδεις και οι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί, όπως οι μύκητες, τα βακτήρια, οι ιοί και τα ιοειδή. Σε μικρότερη κλίμακα, ζημιές δύνανται να προκαλέσουν και άλλοι ζωικοί οργανισμοί όπως τα τρωκτικά και τα πτηνά. Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι με την πάροδο του χρόνου η συνύπαρξη των φυτών με τα στοιχεία του οικοσυστήματος οδηγεί σε μία προοδευτική συνεξέλιξη αυτών, με αποτέλεσμα η πλειονότητα των φυτών να εμφανίζει διαφόρου βαθμού ανθεκτικότητα έναντι των ποικίλων παραγόντων καταπόνησης και μόνο ένα ποσοστό αυτών να εμφανίζει τελικά ευπάθεια/ευαισθησία. Η επιτευχθείσα ανθεκτικότητα, μέσω της δράσης της φυσικής επιλογής, αποτελεί τη βάση για την προσαρμογή και επιβίωση των φυτικών ειδών.

Προκειμένου να εκδηλωθεί ευπάθεια/ευαισθησία, ο εκάστοτε παράγοντας καταπόνησης πρέπει να υπερβεί τους μηχανισμούς άμυνας του φυτού, να καταστείλει τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες ή να επέμβει στο μεταβολισμό και στο πρόγραμμα ανάπτυξής του. Τα φυτά, δεχόμενα αυτήν την πίεση από το εξωτερικό τους περιβάλλον, και προκειμένου να εξασφαλίσουν την ελαχιστοποίηση των απωλειών και την επιβίωσή τους υπόκεινται σε πληθώρα μεταβολών που αποσκοπούν στην προσαρμογή και στην εξέλιξη των αμυντικών μηχανισμών τους. Από την πλευρά τους, τα παθογόνα, προκειμένου να επανακτήσουν την παθογένεια τους, ωθούνται στην υιοθέτηση εναλλακτικών τρόπων προσβολής, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας παράλληλης εξελικτικής πορείας μεταξύ αυτών και των φυτών.

Πέραν των εχθρών και ασθενειών, οι αβιοτικές καταπονήσεις προκαλούν με τη σειρά τους σημαντική μείωση στην απόδοση των καλλιεργούμενων ειδών, ενώ υπό ακραίες συνθήκες καταπόνησης απειλούν την επιβίωσή τους. Με τον όρο αβιοτική καταπόνηση νοείται το σύνολο των δυσμενών αβιοτικών παραγόντων που επιδρούν στα φυτά παρεμποδίζοντας την

κανονική λειτουργία των φυσιολογικών μηχανισμών τους. Στους παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης εντάσσεται η υψηλή αλατότητα, η ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας ή ξηρασία, οι ακραίες θερμοκρασίες, η αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων, η υπερϊώδης ακτινοβολία και το όζον. Μεταξύ των ανωτέρω αβιοτικών καταπονήσεων, η υψηλή αλατότητα και η ξηρασία συνιστούν τις κυριότερες και πιο συχνά απαντώμενες καταπονήσεις. Σύμφωνα με τη διεθνή οργάνωση τροφίμων και γεωργίας << FAO >> (FAO, 2004), το 22% της παγκόσμιας καλλιεργήσιμης έκτασης πλήττεται από αλατότητα-, ενώ τα προβλήματα που ανακύπτουν ως αποτέλεσμα της υδατικής καταπόνησης εντείνονται συνεχώς. Οι αβιοτικές καταπονήσεις παρουσιάζουν διακυμάνσεις ως προς τη διάρκεια και την ένταση της επίδρασής τους στους φυτικούς οργανισμούς. Η περιοχή της επίδρασής τους μέσα στην οποία είναι εφικτή η επιβίωση των ειδών, αλλά και η εκτέλεση όλων των φυσιολογικών λειτουργιών τους, ονομάζεται εύρος ανοχής ή αντοχής. Μέσα σε αυτό το εύρος, υπάρχει μια περιοχή όπου τα φυτά είναι σε θέση να επιτελέσουν απρόσκοπτα όλες τις φυσιολογικές λειτουργίες τους. Εκτός του εύρους ανοχής, βρίσκεται η ζώνη μη ανοχής όπου η καταπόνηση συνοδεύεται με εκτέλεσης των φυσιολογικών λειτουργιών ή ακόμη και αδυναμία επιβίωσης. Κάθε παράγοντας που πλησιάζει ή υπερβαίνει τα όρια αντοχής ονομάζεται περιοριστικός παράγοντας ή περιοριστική συνθήκη. Η εκτίμηση της επίδρασης της καταπόνησης πραγματοποιείται μέσω των απωλειών απόδοσης των παραγόμενων προϊόντων ή/και της παραγόμενης βιομάζας αλλά και της δυνατότητας ανάπτυξης και επιβίωσης του φυτού. Η εκτίμηση της ανθεκτικότητας/ευπάθειας των φυτών βασίζεται στην αξιοποίηση πληθώρας μορφολογικών, φυσιολογικών, βιοχημικών και μοριακών δεικτών, όπως η φωτοχημική απόδοση του φωτοσυστήματος II, η φωτοσυνθετική ταχύτητα.

Με δεδομένο ότι η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών είναι η πιο οικονομική και συγχρόνως φιλική προς το περιβάλλον λύση για την αντιμετώπιση εχθρών, ασθενειών και δυσμενών αγροκλιματικών συνθηκών, η επιστήμη της Βελτίωσης Φυτών κατέχει κεντρική θέση καθώς προσφέρει τη δυνατότητα δημιουργίας ποικιλιών με αναβαθμισμένη ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων.

### **1.1 Η Κλιματική αλλαγή και οι επιπτώσεις της στα φυτά**

Τα παγκόσμια κλιματικά μοντέλα ή αλλιώς Μοντέλα Παγκόσμιας Κυκλοφορίας (Global Circulation Models, GCM) απεικονίζουν τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις των αερίων του θερμοκηπίου στην ατμόσφαιρα. Οι πρόσφατες προσομοιώσεις προβλέπουν - αύξηση της



θερμοκρασίας του πλανήτη μεταξύ 1,5 και 5,8 °C μέχρι το τέλος του αιώνα, βάσει διαφόρων σεναρίων, όπως αυτό του υπερπληθυσμού, της οικονομικής ανάπτυξης, της αύξησης των αερίων του θερμοκηπίου -κυρίως μέσω της καύσης του άνθρακα-, της αλόγιστης χρήσης ενέργειας και των αλλαγών στη χρήση γης ((Rosenzweig, 2001). Επειδή μια θερμότερη ατμόσφαιρα δύναται να κρατήσει περισσότερους υδρατμούς, προβλέπεται ακόμη η αύξηση του μέσου όρου των παγκόσμιων κατακρημνίσεων σε ποσοστό από 5 έως 15%.

-Τα GCM προβλέπουν περαιτέρω ότι:

- Στα μεγάλα γεωγραφικά πλάτη και υψόμετρα, είναι πιθανό να λάβουν χώρα οι μεγαλύτερες αυξήσεις στη θερμοκρασία σε σχέση με τη μέση παγκόσμια άνοδο, ιδιαίτερα κατά την περίοδο του χειμώνα.
- Οι νυχτερινές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του χειμώνα (ελάχιστες θερμοκρασίες) αναμένεται να συνεχίσουν την ανοδική τους πορεία δυσανάλογα.
- Ο υδρολογικός κύκλος είναι πιθανό να ενταθεί περισσότερο, με αποτέλεσμα να προκληθούν περισσότερες πλημμύρες και ξηρασίες.
- Περισσότερες χειμερινές κατακρημνίσεις αναμένεται να έχουν τη μορφή βροχής, παρά τη μορφή χιονιού, μειώνοντας έτσι τα αποθέματα χιονιού και συνεπώς τις ανοιξιάτικες απορροές, με αποτέλεσμα μια ενδεχομένη επιδείνωση στις θερινές ξηρασίες (Rosenzweig, 2001).

Είναι σαφές ότι η ανεξέλεγκτη συσσώρευση των αερίων του θερμοκηπίου στην ατμόσφαιρα αναμένεται να οδηγήσει ταυτόχρονα σε υπερθέρμανση στην επιφάνεια της γης. Τα ανωτέρω, σε συνδυασμό με τις μεταβολές σε επίπεδο βροχοπτώσεων, δύναται να επηρεάσουν σημαντικά τις αποδόσεις των καλλιεργειών, και παράλληλα να υποβαθμίσουν την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων (Porter and Semenov, 2005). Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να διαταραχθούν οι βιοφυσικές διεργασίες της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής, να μεταβληθεί ο γεωγραφικός καταμερισμός των ζιζανίων, των εντόμων και των μικροοργανισμών, και εν τέλει, να επηρεαστεί το σύνολο των θερμικών και υδρολογικών καθεστώτων που διέπουν τα συστήματα φυτικής παραγωγής (Rosenzweig, 2001). Συνεπώς, οι μεταβαλλόμενες κλιματικές συνθήκες σε μια περίοδο όπου η παγκόσμια παραγωγή τροφίμων δέχεται συνεχώς πιέσεις εξαιτίας της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού, καθιστούν επιτακτική ανάγκη τη δημιουργία ποικιλιών που θα παρουσιάζουν ανεκτικότητα

στις κύριες αβιοτικές καταπονήσεις (Takeda and Matsuoka, 2008 Newton et al., 2011;).

## 1.2 Αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης και επιδράσεις στα φυτά

Οι αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης, όπως οι ακραίες θερμοκρασίας (υψηλή /χαμηλή), η ξηρασία, η υψηλή αλατότητα και η -έλλειψη ή περίσσεια θρεπτικών στοιχείων έχουν τεράστιο αντίκτυπο στην παγκόσμια γεωργία. Μάλιστα υποστηρίζεται ότι οι ανωτέρω καταπονήσεις οδηγούν σε μείωση των μέσων αποδόσεων της τάξης του 50 % για τα σημαντικότερα καλλιεργούμενα είδη (Wang et al. 2006). Η εκάστοτε καταπόνηση οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός σύνθετου συστήματος κυτταρικής και μοριακής απόκρισης, προκειμένου να περιοριστούν οι βλάβες και να εξασφαλιστούν κατά το δυνατό περισσότερο η ανάπτυξη και επιβίωσή του. Ωστόσο, η προαναφερθείσα ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας συχνά αποβαίνει εις βάρος της ανάπτυξης και της απόδοσης του φυτού (Herms and Mattson, 1992).

Πρέπει παράλληλα να αναφερθεί ότι υπό την επίδραση αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης επηρεάζεται σημαντικά η δυνατότητα απόκρισης των φυτών έναντι βιοτικών παραγόντων καταπόνησης.-. Στο πλαίσιο αυτό, έρευνες υποστηρίζουν ότι στο σόργο και στο κοινό φασόλι, φυτά που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας παρουσίασαν υψηλότερη ευαισθησία στο μύκητα *Macrophomina phaseolina* (Diourte et al., 1995; Mayek-Perez et al., 2002). Ομοίως, η υδατική καταπόνηση παρατηρήθηκε ότι εντείνει την ανάπτυξη συμπτωμάτων μυκητιακής και βακτηριακής προέλευσης, οδηγώντας σε αυξημένη εξάπλωση των κηλιδώσεων των φύλλων, σε χουρμαδιές αλλά και στην άμπελο του είδους *Parthenocissus quinquefolia* (McElrone et al., 2001; Suleman et al., 2001). Ακόμη, η έκθεση του είδους *Arabidopsis thaliana* σε καταπόνηση ξηρασίας επέτρεψε υψηλότερα επίπεδα μόλυνσης από ένα μη μολυσματικό στέλεχος του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* (Mohr and Cahill, 2003).

Βάσει των ανωτέρω, είναι προφανές ότι η επίτευξη ικανοποιητικών αποδόσεων βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη δημιουργία ποικιλιών με αναβαθμισμένη ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Προς την κατεύθυνση αυτή η βελτίωση των φυτών, πέραν των κλασικών βελτιωτικών μεθόδων, αξιοποιεί πληθώρα διαγονιδιακών προσεγγίσεων, με τις τελευταίες να έχουν πλέον εισχωρήσει σχεδόν σε όλες τις πτυχές της φυτικής επιστήμης.-. Για το σκοπό αυτό, έχει αξιοποιηθεί με επιτυχία η ενσωμάτωση ή υπερέκφραση πληθώρας γονιδίων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η αντοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις έχει επιτευχθεί

σε ποικίλα καλλιεργούμενα είδη μέσω του γενετικού χειρισμού μεταγραφικών παραγόντων (TF), άφθονων πρωτεϊνών όψιμης εμβρυογένεσης (Late Embryogenesis Abundant Proteins, LEA) και αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών (Umezawa et al., 2006; Bhatnagar-Mathur et al., 2008).

Βέβαια, αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι οι αβιοτικές καταπονήσεις μπορούν να αλληλεπιδράσουν και θετικά με τις βιοτικές καταπονήσεις. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση του οσμωτικού στρες επαγόμενου -χαμηλό pH στο κριθάρι, συνδέεται άμεσα με την αντοχή του στο οΐδιο (Wiese et al., 2004), ενώ η καταπόνηση της ξηρασίας μπορεί να ενισχύσει την αντοχή της τομάτας στον μύκητα *Botrytis cinerea* (Achuo et al., 2006)..

### 1.2.1 Φάσεις καταπόνησης

Με βάση την αρχική αντίληψη περί καταπονήσεων του Selye και λαμβάνοντας υπόψη την πρόταση των Larcher και Lichtenthaler (1996), η καταπόνηση των φυτών πραγματοποιείται σε τέσσερις διακριτές φάσεις. Πριν από την έκθεση στην καταπόνηση, τα φυτά βρίσκονται σε μια συγκεκριμένη φυσιολογική κατάσταση, η οποία είναι η βέλτιστη εντός των ορίων που θέτει το στάδιο ανάπτυξης, η διαθεσιμότητα ανόργανων στοιχείων, - η ηλιακή ακτινοβολία και η διαθέσιμη εδαφική υγρασία. Οι καταστολείς ή οι σύνθετοι παράγοντες καταπόνησης οδηγούν στη συνέχεια στις πρώτες τρεις φάσεις απόκρισης (φάση 1-3) στην καταπόνηση και αργότερα στη φάση ανάκαμψης (φάση 4) μετά την απομάκρυνση του παράγοντα καταπόνησης, εφόσον οι βλάβες είναι αντιστρέψιμες. Αυτές οι τέσσερις φάσεις συνοψίζονται στην Εικόνα 1.1 (Lichtenthaler, 1996).

#### 1. Φάση απόκρισης:

Η φάση απόκρισης είναι το στάδιο του συναγερμού στον επερχόμενο κίνδυνο, στο οποίο οι φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού αποκλίνουν από τη φυσιολογική πορεία, η ζωτικότητα μειώνεται και οι καταβολικές διεργασίες υπερβαίνουν αυτές του αναβολισμού. Σε περίπτωση αδυναμίας αυτού να περάσει στο επόμενο στάδιο, το φυτό υπόκειται σε οξεία βλάβη.

#### 2. Φάση αποκατάστασης:

Είναι το στάδιο της αντοχής/ανθεκτικότητας, στο οποίο η πίεση του παράγοντα είναι συνεχής και περιλαμβάνει διάφορες διαδικασίες προσαρμογής και επιδιόρθωσης, καθώς και τη σκληραγώγηση (επανενεργοποίηση) του φυτού. Πιο συγκεκριμένα, προκειμένου να

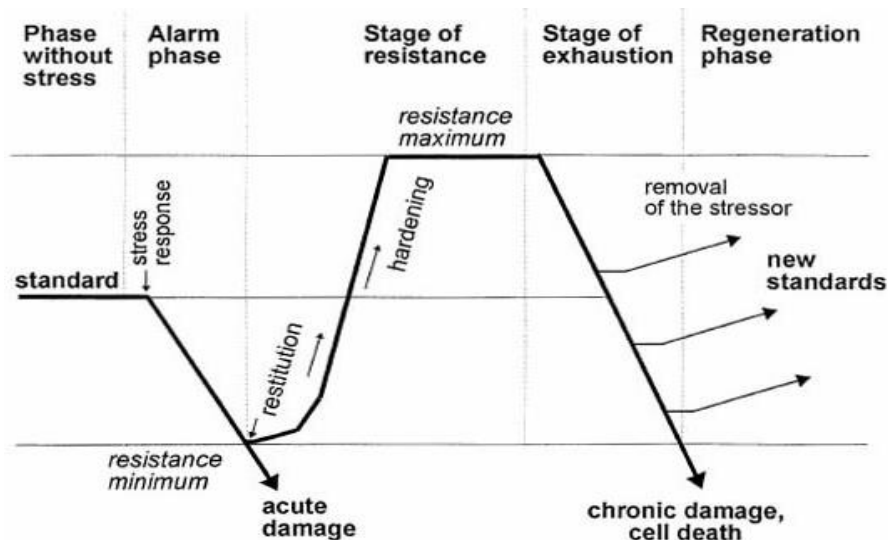
αντεπεξέλθει με επιτυχία στην έκαστοτε καταπόνηση, το φυτό υπόκειται σε φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές μεταβολές.

### 3. Τελική φάση:

Στην τελική φάση ή στάδιο εξάντλησης, η ένταση της καταπόνησης είναι πολύ υψηλή με αποτέλεσμα η ικανότητα του φυτού να προσαρμοστεί στις νέες συνθήκες να περιορίζεται σημαντικά, σε βαθμό που ενδέχεται να προκληθεί κάποια χρόνια βλάβη ή ακόμα και νέκρωση του φυτού.

### 4. Φάση αναγέννησης ή ανάκαμψης:

Στη φάση αυτή, οι φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού αναγεννώνται πλήρως ή μερικώς, εφόσον πρωτίστως έχει απομακρυνθεί ο παράγοντας καταπόνησης και η προκληθείσα βλάβη είναι αναστρέψιμη και μη ζημιογόνα ().



**Εικόνα 1.1** Γενική απεικόνιση στην αλληλουχία των φάσεων των παραγόντων καταπόνησης και οι αντιδράσεις των φυτών ως προς την έκθεσή τους σε αυτά (Bochu Wang et al., 2006)

#### 1.2.2 Υψηλή αλατότητα

Αλατότητα καλείται η αυξημένη συγκέντρωση ιόντων ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) στο εδαφικό διάλυμα. Η εκτεταμένη συγκέντρωση 10-30 mM  $\text{Na}^+$  δύναται να προκαλέσει τοξικότητα στο ριζικό σύστημα των φυτών, καθώς διακόπτει την ενζυμική δραστηριότητα αυτών (Tester & Davenport, 2003), ενώ το αντίστοιχο όριο στις φυλλικές επιφάνειες αγγίζει τα 100 mM

(Wyn and Gorham, 2002). Όσον αφορά το Cl<sup>-</sup>, είναι ένα στοιχείο που δε συσσωρεύεται στο έδαφος, διότι λόγω του ότι είναι ευκίνητο, υπόκειται σε γρήγορη έκπλυση (Σκιάδας, 2014). Το στοιχείο αυτό, τείνει να συγκεντρώνεται σε νεαρούς βλαστούς και φύλλα, επιφέροντας νέκρωση των κυττάρων στις περιοχές αυτές (Flowers and Yeo, 1995). Όταν η περιεκτικότητα του χλωρίου στα φύλλα των ευαίσθητων φυτών αγγίζει το 0,5-2 % της ξηράς ουσίας ή ξεπεράσει το 4 % στα ανθεκτικά φυτά, αρχίζει η μείωση των αποδόσεων και η υποβάθμιση της ποιότητας (Σκιάδας, 2014). Αν και το NaCl θεωρείται κυρίαρχο στοιχείο που υποδηλώνει ένα αλατούχο έδαφος, υπάρχουν και ορισμένα άλλα στοιχεία τα οποία όταν βρεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις επιφέρουν παρόμοιες επιδράσεις. Αυτά είναι τα ιόντα Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup> και SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> (Epstein and Bloom, 2005).

Η αλατότητα του εδάφους εκφράζεται με την ηλεκτρική αγωγιμότητα EC<sub>e</sub>, ενώ η αλατότητα του νερού άρδευσης με την ηλεκτρική αγωγιμότητα EC<sub>w</sub> σε mS/cm, ή με το σύνολο των διαλυμένων αλάτων στο νερό σε mg/l. Οι καλλιέργειες, ανάλογα με την ανθεκτικότητά τους στην αγωγιμότητα, κατατάσσονται στις παρακάτω κατηγορίες: α) Ευαίσθητες: < 1,3 mS/cm, β) Μετρίως ευαίσθητες: 1,3-3,0 mS/cm, γ) Μετρίως ανθεκτικές: 3,0-6,0 mS/cm, δ) Ανθεκτικές: 6,0-10,0 mS/cm, ε) Ακατάλληλες λόγω υπερβολικά υψηλής αλατότητας: > 10 dS x m<sup>-1</sup> (Μήτσιος, 2001). Σε γενικές γραμμές, αρδευόμενο νερό ηλεκτρικής αγωγιμότητας ως και 2 mS/cm και συνολικό ποσό αλάτων 1300mg/l αποτελεί το όριο υγιούς αύξησης των περισσότερων φυτών (Μήτσιος, 2001).

Ως ανθεκτικότητα, ορίζεται η ικανότητα των ειδών να ανταπεξέρχονται στις καταστάσεις περίσσειας άλατος του μέσου ανάπτυξής τους, χωρίς να υπόκεινται σε δυσμενείς μεταβολές. Η ανθεκτικότητα των φυτών επηρεάζεται από παράγοντες όπως η περιεχόμενη ποσότητα των αλάτων, το είδος αυτών, οι αναπτυξιακές συνθήκες του φυτού, το είδος και η ποικιλία αυτού καθώς και το στάδιο ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται. Η ανθεκτικότητα αξιολογείται με βάση την ικανότητα επιβίωσης του φυτού, την απόδοσή του, καθώς επίσης και με βάση τη σχετική απόδοσή του, συγκρινόμενο με φυτό που καλλιεργείται υπό κανονικές συνθήκες (Σκιάδας, 2014). Τα είδη που διαθέτουν ειδικές μορφολογικές προσαρμογές και δεν αναπτύσσονται σε άλλες περιοχές πέραν των αλιπέδων ονομάζονται αλόφυτα, ενώ τα είδη που περιστασιακά δημιουργούν πληθυσμούς προσαρμοσμένους σε υψηλή αλατότητα, ονομάζονται γλυκόφυτα (Μανέτας, 2005).

Οι αρνητικές επιδράσεις της αλατότητας ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι εξειδικευμένες ιοντικές επιδράσεις (specific ion effects), κατά τις οποίες η συσσωρευμένη μάζα των ιόντων είναι τοξική, επιφέρει τοξικότητα στα

κύτταρα και διαταράσσει τις θρεπτικές ισορροπίες, καταστέλλοντας την απορρόφηση άλλων θρεπτικών στοιχείων όπως  $K^+$  και  $Ca^{2+}$ , ή διαταράσσοντας την εσωτερική κατανομή τους (Μανέτας, 2005). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις μη εξειδικευμένες επιδράσεις της οσμωτικής καταπόνησης (osmotic stress), κατά την οποία το οσμωτικό δυναμικό των φυτών μειώνεται σε μεγάλο βαθμό, με συνέπεια να παρατηρείται δυσκολία των ριζών στην άντληση νερού από το εδαφικό διάλυμα, με αποτέλεσμα τα φυτά να οδηγούνται στη μαρανση. Ωστόσο, οι επιζήμιες επιδράσεις της οσμωτικής καταπόνησης δεν περιορίζονται στα ανωτέρω. Η υψηλή τιμή του pH αποσταθεροποιεί τη δομή του εδάφους κατά τη διέλευση του νερού, μειώνοντας συνεπώς την εδαφική διηθητικότητα και το μέγεθος των εδαφικών πόρων (Μήτσιοι, 2001).

Οι φυτικοί οργανισμοί προκειμένου να ελέγξουν την οσμωρύθμισή τους λειτουργούν είτε ως συσσωρευτές, είτε ως αποκλειστές αλάτων. Στην πρώτη περίπτωση, οι οργανισμοί αποθηκεύουν τα άλατα αραιά διαλυμένα στα χυμοτόπια τους, με σκοπό να μειώσουν τη συγκέντρωσή τους στο κυτταρόπλασμα (παχύφυτα), ενώ άλλοι οργανισμοί απομονώνουν τα τοξικά ιόντα αποκλειστικά σε χυμοτόπια γηρασμένων φύλλων που πρόκειται να χάσουν σύντομα. Μια ακόμη στρατηγική είναι με τη χρήση αλατωδών αδένων, οι οποίοι μεταφέρουν τα ιόντα  $Cl^-$  και  $Na^+$  από τα χυμοτόπια στην εξωτερική επιφάνεια των φύλλων τους. Στη δεύτερη περίπτωση, τα φυτά αποκλείουν την παρουσία αλάτων στους ιστούς τους, με τον έλεγχο της απορρόφησης τους στη ρίζα, μειώνοντας τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης του  $K^+$ , καθώς το  $Na^+$  ανταγωνίζεται τις ειδικές αυτές θέσεις των πρωτεϊνών-φορέων του  $K^+$ . Ο θεμελιώδης τρόπος ανθεκτικότητας των ειδών αποδίδεται στην ικανότητα των μεμβρανών τους να μεταφέρουν ιόντα, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο τα ευαίσθητα σημεία τους από τις υψηλές συγκεντρώσεις των αλάτων. Συνεπώς, κατά την ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών, δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην ικανότητα μεταφοράς ιόντων (Μανέτας, 2005). Μέχρι σήμερα, έχει παραχθεί ένας μεγάλος αριθμός διαγονιδιακών φυτών που χαρακτηρίζονται από αυξημένα κυτταρικά επίπεδα πρωτεϊνών που ελέγχουν τις μεταφορικές λειτουργίες. Ως παράδειγμα αναφέρονται διαγονιδιακά φυτά τομάτας (Gisbert et al., 2000) και πεπονιού (Bordàs et al., 1997) που εκφράζουν το γονίδιο *HAL1*, μέχρι ενός συγκεκριμένου επιπέδου αλατότητας, με σκοπό τη διατήρηση περισσότερων ιόντων  $K^+$ .

### 1.2.3 Υδατική καταπόνηση

Η υδατική καταπόνηση αναφέρεται σε περιβαλλοντική παράμετρο οφειλόμενη στη μειωμένη εισροή νερού στο εδαφικό διάλυμα, κυρίως λόγω χαμηλών κατακρημνίσεων και αυξημένων υδατικών απωλειών που συμβαίνουν μέσω της εξατμισοδιαπνοής. Υδατική καταπόνηση γενικότερα, είναι το μειωμένο δυναμικό του νερού των φυτικών κυττάρων και λαμβάνει χώρα όταν ο ρυθμός πρόσληψης ύδατος αδυνατεί να αντισταθμίσει το ρυθμό απωλειών αυτού, που συμβαίνουν εξαιτίας της εξατμισοδιαπνοής.

Η βασικότερη αρνητική επίδραση της υδατικής καταπόνησης αφορά στην κυτταρική ανάπτυξη, δηλαδή στις κυτταροδιαιρέσεις, στη μεγέθυνση των κυττάρων και στη διαφοροποίηση αυτών. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της ξηρασίας ανακόπτεται η διακίνηση του νερού από το ξύλωμα προς τα παρακείμενα κύτταρα, γεγονός που συντελεί στη μείωση της σπαργής των κυττάρων. Συνεπώς, η κυτταρική αύξηση, ως μια φυσιολογική διεργασία των φυτών άμεσα εξαρτώμενη από τη πίεση σπαργής, παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στις ξηροθερμικές συνθήκες. Συνολικά, υπό καθεστώς ξηρασίας, τίθεται μεγάλο πρόβλημα στην ολοκλήρωση της μίτωσης, της μεγέθυνσης και διάτασης των κυττάρων, γεγονός που συμβάλλει αρνητικά στο ύψος του φυτού και στην έκταση του ελάσματος (Farooq et al. 2009).

Παράλληλα, αξίζει να αναφερθεί η σημαντική επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη φωτοσύνθεση, της οποίας ο ρυθμός μειώνεται εξαιτίας της μειωμένης δράσης της Rubisco. Πιο αναλυτικά, υπό συνθήκες ξηρασίας η μειωμένη δραστηριότητα της Rubisco οφείλεται στην αυξημένη σύνδεση με αναστολείς (CAIP), στη μειωμένη διαθεσιμότητα ATP και στον περιορισμό του χλωροπλαστικού όγκου. Ακόμη, τροποποιείται η αναλογία των τελικών προϊόντων της φωτοσύνθεσης, άμυλο/σακχαρόζη και προκαλείται οξειδωτικό στρες στα μακρομόρια των κυττάρων (αμινοξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια) (Farooq et al. 2009). Τέλος, περιορίζονται τα αποθέματα των φωτοσυνθετικών προϊόντων, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλος κίνδυνος να ανακοπεί η πορεία της άνθησης, της επικονίασης και της παραγωγής σπέρματος (Boyer and Westgate, 2004).

Συνεπώς, οι φυτικοί οργανισμοί προκειμένου να ανταπεξέλθουν στην ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας, υπόκεινται σε διάφορες τροποποιήσεις που αποσκοπούν στην προσαρμογή τους (Chaves, 2002). Αυτοί οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν:

- το κλείσιμο των στομάτων και τη μείωση του ρυθμού διαπνοής,
- την επέκταση του ριζικού συστήματος
- τη μείωση του δυναμικού του νερού στους ιστούς των φυτών,

- τη μείωση του φωτοσυνθετικού ρυθμού,
- την επιβράδυνση της ανάπτυξης ως και την είσοδο του οργανισμού σε λήθαργο,
- τη διακίνηση και βιοσύνθεση αμπισικού οξέος αλλά και άλλων ορμονών,
- την παραγωγή νέων πρωτεϊνών και mRNAs,
- τη γήρανση και αποκοπή των γηραιότερων οργάνων και τη δημιουργία νέων με ξηροφυτικά χαρακτηριστικά,
- τη μεταφορά ιόντων μεταξύ των ιστών για οσμωτική εξισορρόπηση.

Μέσω των προαναφερθέντων μορφολογικών αλλαγών, τα φυτά καταφέρνουν να περιορίσουν την αφυδάτωση και τις αρνητικές επιδράσεις που αυτή προκαλεί (Yordanov et al, 2003).

Η άμυνα των φυτικών οργανισμών ωστόσο δεν περιορίζεται σε μορφολογικές τροποποιήσεις αλλά περιλαμβάνει και μία σειρά μοριακών μεταβολών. Σε αυτές περιλαμβάνεται η έκφραση ορισμένων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεϊνικούς διαύλους, όπως οι υδατοπορίνες, οι οποίες ρυθμίζουν την παθητική μεταφορά του νερού μεταξύ των χυμοτοπίων και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Reddy et al. 2004). Ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός άμυνας είναι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών LEAPs (Late Embryogenesis Abundant Proteins) αλλά και των DHNs (Dehydrins ή LEA II proteins) στους ιστούς, συντελώντας στη σταθεροποίηση των μακρομορίων και στην προστασία από την αφυδάτωση (Hanin et al. 2011). Συνεπώς, ο ρόλος της γενετικής μηχανικής στην εύρεση των σχετικών γονιδίων είναι πολύ σημαντικός για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποικιλιών που θα εμφανίζουν γενετική ανθεκτικότητα στην υδατική καταπόνηση.

#### 1.2.4 Θερμική καταπόνηση

Η θερμοκρασία διαδραματίζει πολύ βασικό ρόλο κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου του φυτού. . Ανάλογα με το είδος και το στάδιο ανάπτυξής του, υπάρχουν διαφορετικές θερμοκρασιακές τιμές που θεωρούνται ευνοϊκές, πέρα των οποίων παρατηρείται δυσκολία στην ανάπτυξη ή/και επιβίωση . Για τα περισσότερα φυτικά είδη, ως ανεκτό όριο στις υψηλές θερμοκρασίες θεωρούνται τιμές περί των 40-45 °C. Οι αρνητικές επιδράσεις, πέρα των ορίων αυτών, αφορούν στο μεταβολισμό, στις φυσιολογικές διεργασίες της αναπνοής, της φωτοσύνθεσης και των υδάτινων σχέσεων καθώς επίσης και στη δομή των κυττάρων, με ιδιαίτερη έμφαση στις κυτταρικές μεμβράνες (Wahid et al., 2007), διότι σημειώνονται



προβλήματα στην περατότητα και στις καταλυτικές ιδιότητες των μεμβρανών των θυλακοειδών των χλωροπλαστών.

Οι οργανισμοί προκειμένου να ανταπεξέλθουν στις ακραίες υψηλές θερμοκρασίες έχουν αναπτύξει μια σειρά μηχανισμών, όπως την είσοδο σε λήθαργο και την ανάπτυξη ορισμένων οργάνων που αντανακλούν την ηλιακή ακτινοβολία, περιορίζοντας έτσι τη διαπνοή. Σε μοριακό επίπεδο, πρόσθετες ενέργειες αφορούν στη διατήρηση της σταθερότητας των κυτταρικών μεμβρανών, την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), τη σύνθεση αντιοξειδωτικών ουσιών, την οσμωρύθμιση, την επαγωγή ορισμένων πρωτεϊνικών κινασών που ανταποκρίνονται στην καταπόνηση, την ενίσχυση της μεταγραφής και της μεταφοράς σήματος των συνοδών πρωτεϊνών (chaperones) και την παραγωγή θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (Wahid et al., 2007).

Η επαγωγή και σύνθεση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (heat shock proteins, (HSPs) υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης, αλλά και άλλων καταπονήσεων, είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, από τα βακτήρια ως και τον άνθρωπο (Parsell και Lindquist, 1993; Vierling, 1991; Gupta et al., 2010). Φαίνεται πως η παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών είναι ενεργειακά μια συμφέρουσα λύση που επιδρά θετικά στην επίδοση των οργανισμών. Υπό την επίδραση της καταπόνησης, η παραγωγή θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών είναι πολύ έντονη, ενώ υπό φυσιολογικές θερμοκρασίες δεν εντοπίζονται καθόλου ή εντοπίζονται σε ελάχιστες ποσότητες. Πιο συγκεκριμένα, η βιοσύνθεσή τους τοποθετείται λίγα λεπτά μετά την έναρξη της καταπόνησης και σταματάει λίγες ώρες μετά την λήξη της, δηλαδή λίγες ώρες αφότου έχουν επέλθει οι φυσιολογικές θερμοκρασίες. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει το θεμελιώδη ρόλο των HSPs στη διαφύλαξη των κυττάρων από τις αιφνίδιες θερμοκρασιακές μεταβολές.

Σύμφωνα με το κατά προσέγγιση μοριακό τους βάρος, οι πρωτεΐνες αυτές κατατάσσονται στις ακόλουθες πέντε ομάδες: 1) Hsp100, 2) Hsp90, 3) Hsp70, 4) Hsp60 και 5) Μικρές θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (sHsps) (Trent, 1996). Στα ανώτερα φυτά περιέχονται τουλάχιστον 20 sHsps, ενώ μπορεί να υπάρχουν ακόμη και 40 είδη αυτών σε ένα μόνο είδος φυτού. Η εξειδίκευση των HSPs, αναφορικά με το αναπτυξιακό στάδιο, είδος ιστού, ένταση και τύπο καταπόνησης κατά το οποίο εκφράζονται, πιθανότατα αποτελεί ένα είδος προσαρμογής που καθιστά τα φυτά ανθεκτικά στη θερμική καταπόνηση. Μια από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες εξ αυτών είναι η ουμπικουϊτίνη, της οποίας ο ρόλος είναι να σημαίνει τα μόρια πρωτεϊνών που έχουν υποστεί ζημιές από τις υψηλές θερμοκρασίες. Η μεταγραφή των γονιδίων που εκφράζουν τις θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες ελέγχεται από ρυθμιστικές

πρωτεΐνες που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες θερμικού στρες (Heat Stress transcription Factors, Hsfs). Τα φυτά παρουσιάζουν τουλάχιστον 21 Hsfs με τον καθένα να έχει τον δικό του ρόλο του στη ρύθμιση, αλλά έχοντας συγχρόνως τη δυνατότητα να συνεργάζονται σε όλες τις φάσεις των περιοδικών αποκρίσεων στη θερμική καταπόνηση (ενεργοποίηση, διατήρηση και ανάκτηση) (Al-Whaibi, 2010).

### **1.3 Η εξέλιξη της βελτίωσης φυτών στη δημιουργία ανθεκτικών γονοτύπων στις αβιοτικές καταπονήσεις**

Δεδομένου ότι οι αβιοτικές καταπονήσεις συνιστούν τους σημαντικότερους περιοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη και επιβίωση των καλλιεργούμενων ειδών, βασικό στόχο της βελτίωσης φυτών παραδοσιακά αποτελεί η αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων. Ειδικότερα, βασικό στόχο των προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης αποτελεί η δημιουργία ανθεκτικών γονοτύπων, η οποία επιδιώκεται τόσο μέσω μεθόδων κλασσικής βελτίωσης όσο και σύγχρονων βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων . .

Στο πλαίσιο της κλασσικής βελτίωσης, η αναβάθμιση της ανθεκτικότητας επιδιώκεται μέσω διασταυρώσεων, μεταξύ γονέων που φέρουν επιθυμητά γνωρίσματα και εμφανίζουν καλή συνδυαστική ικανότητα, και στη συνέχεια επιλογών των επιθυμητών ανθεκτικών γονοτύπων. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας του γενετικού υπόβαθρου του γνωρίσματος της ανθεκτικότητας (πολυγονιδιακή κληρονομία), η διαδικασία αυτή αποτελεί μια ιδιαίτερα δύσκολη, χρονοβόρα και με περιορισμένα αποτελέσματα προσπάθεια, η οποία εξαρτάται απόλυτα από τη διαθεσιμότητα κατάλληλων μεθόδων επιλογής των ανθεκτικών γονοτύπων. Παραδοσιακά, η γονοτυπική επιλογή γίνεται σε πειράματα αγρού κατά το κρίσιμο για την καταπόνηση στάδιο. Προτού η επιστημονική γνώση προσφέρει τη δυνατότητα άμεσης επιλογής των ανθεκτικών φυτών με βάση τον γονότυπό τους, η επιλογή έμμεσα καθώς βασίζονταν στο φαινότυπο των φυτών, που ως γνωστόν διαμορφώνεται από το γενετικό αποτύπωμα του οργανισμού και τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Selective Cross Breeding). Παρά το γεγονός ότι με χρήση μορφολογικών δεικτών έχουν δημιουργηθεί πολλές επιτυχημένες νέες ποικιλίες, υπάρχουν αρκετές αστοχίες. Καταρχήν, τα αποτελέσματα είναι απρόβλεπτα εξαιτίας του τυχαίου ανασυνδυασμού του DNA, προσδίδοντας ταυτόχρονα μαζί με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και ανεπιθύμητα γνωρίσματα. Ένας πρόσθετος περιοριστικός παράγοντας είναι ότι στις διασταυρώσεις αξιοποιούνται κατά κύριο λόγο στενά συγγενικά είδη, προκειμένου να παραχθούν γόνιμοι

απόγονοι, γεγονός που περιορίζει σημαντικά το αξιοποιήσιμο γονιδιακό απόθεμα. Όπως προαναφέρθηκε, η βελτιωτική διαδικασία δυσχεραίνεται σημαντικά από την έλλειψη κατάλληλων μεθόδων επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων, που με τη σειρά της ενέχει τον κίνδυνο απώλειας πιθανά ωφέλιμων γονιδιακών συνδυασμών που απορρίφθηκαν καθώς δεν μπόρεσαν να καταδείξουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά κατά την πρώιμη επιλογή (Wieczorek et al., 2012).

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν συντελεστεί σημαντικά επιτεύγματα στον τομέα της βελτίωσης φυτών με σκοπό την απόκτηση ποικιλιών με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Σημαντικό ορόσημο αποτέλεσε η ανάπτυξη και αξιοποίηση των τεχνικών ιστοκαλλιέργειας (Micropropagation techniques) με πλήθος εφαρμογών στη βελτίωση φυτών (Thorpe, 2007). Η ιστοκαλλιέργεια καταρχάς επέτρεψε την αναγέννηση ολόκληρων φυτών, με την αποκοπή τμήματος του φυτού ενδιαφέροντος και την ανάπτυξή του σε θρεπτικό μέσο μέχρι την πλήρη διαμόρφωση του ως ένα νέο φυτό που φέρει αυτούσια τη γενετική πληροφορία. Μία ακόμη λαμπρή ανακάλυψη είναι η εμβρυοδιάσωση (Embryo rescue) κατά την οποία προσφέρεται η δυνατότητα υβριδισμού ειδών με μακρινή συγγένεια, που φυσιολογικά αδυνατούν να παράξουν γονιμοποιημένα έμβρυα, μέσω διάσωσης, μεταφοράς και αναπαραγωγής των εμβρύων υπό συνθήκες ιστοκαλλιέργειας. Μέσα σε όλες τις καινοτομίες, αξίζει να αναφερθεί και η σύντηξη πρωτοπλαστών (Protoplast fusion), η οποία αφορά σε υβριδισμό κυττάρων που έχει αφαιρεθεί το κυτταρικό τοίχωμα και περιβάλλονται μόνο από πλασματική μεμβράνη. Οι πρωτοπλάστες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αναπαραγωγή φυτών με πολλούς τρόπους, όπως με την παραγωγή υβριδικών κυττάρων μέσω της σύντηξης αυτών και με τη χρήση των πρωτοπλαστών για την εισαγωγή νέων γονιδίων στα φυτικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να αναπτυχθούν με τεχνικές ιστοκαλλιέργειας (Thorpe, 2007).

Σύγχρονες μοριακές τεχνικές περιλαμβάνουν την αναγνώριση και αξιοποίηση μοριακών δεικτών που συμβάλλουν σημαντικά στην ουσιαστική αναβάθμιση και επιτάχυνση της βελτιωτικής διαδικασίας (Marker-Assisted Breeding, MAB), μέσω της υποβοηθούμενης από μοριακούς δείκτες επιλογής. Ύστερα από εκτεταμένες μελέτες, οι μοριακοί δείκτες έχουν κατορθώσει σήμερα να χρησιμοποιούνται ευρέως, καθώς μπορούν να συνδράμουν στην κατανόηση της λειτουργίας γονιδίων ενδιαφέροντος, μπορούν να εξοικονομήσουν χρόνο στη διαδικασία επιλογής και έχουν πολλαπλές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένου της εκτίμησης της γενετικής παραλλακτικότητας καθώς και του απογονικού ελέγχου όπου αξιοποιούνται κατά τη διαδικασία επιλογής επιθυμητών γονοτύπων σε διασπώμενους

πληθυσμούς (MAS, Marker-Assisted Selection). Επιπρόσθετα, οι μοριακοί δείκτες παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι είναι άφθονοι, αντικειμενικοί, εύκολοι στην ανάλυση και δεν υπόκεινται στην επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων (Peleman and van der Voort, 2003). Ωστόσο, η έμμεση βασιζόμενη σε μοριακούς δείκτες επιλογή ενέχει τον κίνδυνο μεταφοράς γονιδίων που ελέγχουν ανεπιθύμητα γνωρίσματα λόγω στενής γενετικής σύνδεσης με τα γονίδια που κωδικοποιούν τους ποσοτικούς χαρακτήρες (QTLs) που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων φυτών μέσω της εισαγωγής ή/και υπερέκφρασης γονιδίων-στόχων αναμένεται να επιταχύνει σημαντικά τη διαδικασία δημιουργίας βελτιωμένων ποικιλιών με γενετική ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων (Wani, 2014).

Στο κλίμα της συνεχούς επιστημονικής εξέλιξης, κατά τη δεκαετία του 1980, σε μια περίοδο όπου το ερευνητικό ενδιαφέρον για την αναζήτηση νέων πηγών ανθεκτικότητας υπήρξε πολύ έντονο και αναγκαίο, γεννήθηκε η τεχνολογία της Γενετικής Μηχανικής (Genetic engineering). Η πρόοδος στον τομέα της Μοριακής Βιολογίας, έδωσε τη δυνατότητα της στοχευμένης μεταφοράς DNA μεταξύ των διαφόρων οργανισμών, ανεξαρτήτου κοντινής ή μακρινής συγγένειας, παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο τεράστια οφέλη στη διαθέσιμη γενετική παραλλακτικότητα που αποτελεί τη βάση της βελτίωσης φυτών (Wieczorek et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA (recombinant DNA technology) είναι εφικτή η εισαγωγή γονιδίων φυτικής, ζωικής, βακτηριακής ή ιικής προέλευσης στο γονιδίωμα ενός άλλου οργανισμού, προσδίδοντάς του έτσι αυξημένη ανθεκτικότητα (Watson et al, 1992).

Η χρήση της Μοριακής Βιολογίας για την κατανόηση των μηχανισμών που ελέγχουν την αντοχή των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις, βασίζεται στην έκφραση ορισμένων γονιδίων, σχετιζόμενων με την καταπόνηση. Όλοι οι οργανισμοί έχουν μηχανισμούς αποφυγής ή αντοχής σε έναν ή και περισσότερους παράγοντες καταπόνησης. Κατά την επίδραση ενός τέτοιου παράγοντα, γονίδια που συντελούν στην αύξηση κάποιων μεταβολιτών και πρωτεϊνών, όπως ενζύμων υπεύθυνων για την παραγωγή συμβατών οσμολυτών, ενεργοποιούνται, κλωνοποιούνται και χρησιμοποιούνται για τον γενετικό μετασχηματισμό ευαίσθητων στην καταπόνηση γονότυπων. Ακόμη, η φυτοορμόνη ABA (Abscisic acid) έχει εμπλακεί στη μεταγωγή σήματος για την ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις (Wani, 2014).

Τα γονίδια που επάγονται υπό συνθήκες καταπόνησης ταξινομούνται σε τρεις κύριες ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται τα ονίδια που κωδικοποιούν: α) πρωτεΐνες με

γνωστές ενζυμικές και δομικές λειτουργίες, β) πρωτεΐνες με άγνωστες ως τώρα λειτουργίες, γ) ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Οι αρχικές προσπάθειες για την ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών (κυρίως καπνού) ανθεκτικών στα αβιοτικά στρες, περιελάμβανε γονίδια απλής δράσης, όπως για παράδειγμα γονίδια υπεύθυνα για την τροποποίηση ενός απλού μεταβολίτη που παρέχει προηγμένη ανθεκτικότητα σε συνθήκες υψηλής αλατότητας ή ξηρασίας. Δεδομένου ωστόσο ότι η ρύθμιση της αντοχής στις καταπονήσεις αποτελεί γνώρισμα με σύνθετη γενετική βάση (πολυγονιδιακός έλεγχος), η προσέγγιση αυτή δεν είναι η πλέον αποτελεσματική. Για το λόγο αυτό, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την αξιοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Ο έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες οδηγεί στη ρύθμιση μιας σειράς γονιδίων που επάγονται υπό συνθήκες καταπόνησης. Έτσι πρόσφατες έρευνες καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα αξιοποίησης γονιδίων που κωδικοποιούν επαγωγίσιμους από το στρες μεταγραφικούς παράγοντες (Kasuga et al., 1999), προσφέροντας έτσι τη δυνατότητα βελτίωσης της αντοχής για πολλαπλές καταπονήσεις, όπως η ξηρασία, η υψηλή αλατότητα και το ψύχος (Wani, 2014).

Για την ταυτοποίηση των γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στην ξηρασία, καθώς και τον τρόπο μεταβίβασής τους στις επόμενες γενεές, έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλων τεχνικών γονιδιακού μετασχηματισμού που βασίζονται σε μεθόδους είτε στοχευμένης (target) είτε «shortgun» προσέγγισης. Η στοχευμένη προσέγγιση βασίζεται στην διαθεσιμότητα των πληροφοριών που αφορούν τις βιοχημικές αντιδράσεις της σύνθεσης μεταβολιτών με ρυθμιστικό ρόλο και αξιοποιεί τα σχετικά γονίδια. Παράδειγμα αποτελεί η ενσωμάτωση του γονιδίου *SacB*, προερχόμενου από το βακτήριο *Bacillus subtilis*, που εμπλέκεται στη σύνθεση σουκρόζης σε φυτά καπνού, τα οποία εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα φρουκτόζης και καλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με τους μάρτυρες, υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης με PEG. Στην «shortgun» προσέγγιση εφαρμόζεται μια τυχαία ανάλυση της σχετιζόμενης με την καταπόνηση κυτταρικής αλλαγής καθώς και γονιδιακή έκφραση. Η προσέγγιση αυτή είναι λιγότερη ακριβής και λιγότερο αποτελεσματική από την στοχευμένη (Mitra, 2001).

#### **1.4 Το βακτήριο *Xanthomonas campestris***

Το βακτήριο *Xanthomonas campestris* είναι ένα φυτοπαθογόνο βακτήριο που προκαλεί μαύρη σήψη στην οικογένεια των σταυρανθών φυτών με σημαντικές απώλειες στην

παραγωγή σε παγκόσμιο επίπεδο. Η μόλυνση με το βακτήριο *Xanthomonas campestris* ευνοείται σε θερμά και υγρά κλίματα, ενώ η μετάδοσή του γίνεται μέσω του προσβεβλημένου σπόρου. Το βακτήριο εισέρχεται στο αγγειακό σύστημα των φυτών μέσω των πόρων του ελάσματος, προκαλώντας κακώσεις σχήματος V, μαύρισμα των αγγείων και νέκρωση των ιστών του ελάσματος. Αποτελεσματική στρατηγική για τον έλεγχο της ασθένειας αποτελεί η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών (Bolot, 2013; Liu et al., 2015, ). Το βακτήριο *Xanthomonas campestris*, όπως και πολλά άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια, εγχύει στα φυτικά κύτταρα μολυσματικές πρωτεΐνες, ή αλλιώς πρωτεΐνες-τελεστές, μέσω του Hrp εκκριτικού συστήματος τύπου III (Type Three Secretion System, TTSS). Έρευνες πάνω στο γονιδίωμα των βακτηρίων των ειδών *Pseudomonas*, *Xanthomonas* και *Ralstonia* spp. δείχνουν ότι τα βακτήρια αυτά έχουν στη διάθεσή τους ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών-τελεστών.

### 1.5 Πρωτεΐνες τελεστές

Τα παθογόνα βακτήρια, στη μακροχρόνια πορεία της εξέλιξής τους, ανέπτυξαν διάφορες ειδικές προσαρμογές προκειμένου να επιβιώσουν αλλά και να αναπαραχθούν εντός των κυττάρων-ξενιστών. Κεντρικό σημείο της παθογένειας πολλών βακτηρίων αποτελεί ένα εκλεπτυσμένο εκκριτικό σύστημα, ρόλος του οποίου είναι η μεταφορά νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στα ευκαρυωτικά κύτταρα-στόχους. Οι μεταφερόμενες αυτές πρωτεΐνες, ονομάζονται πρωτεΐνες τελεστές (effector proteins). Ο ρόλος τους σχετίζεται με την ικανότητα εισβολής του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή και την καταστολή του αμυντικού συστήματος του τελευταίου, τη δημιουργία αντιγράφων και την πρόκληση ασθένειας, τροποποιώντας ένα σύνολο οδών του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένων αυτών της κυτταροσκελετικής δυναμικής, της γονιδιακής έκφρασης, και της αντιμικροβιακής άμυνας. Ωστόσο, η γενετική πολυπλοκότητα ορισμένων βακτηρίων, σε συνδυασμό με τον λειτουργικό πλεονασμό, την αλληλοεξάρτηση μεταξύ των πρωτεϊνών τελεστών, την έλλειψη ομοιότητας στην αλληλουχία μεταξύ των τελεστών και των μαρκαρισμένων πρωτεϊνικών περιοχών, τη χωροχρονική πολυπλοκότητα της έκφρασής τους κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, εμποδίζουν τον ακριβή προσδιορισμό του μοριακού μηχανισμού της δράσης των τελεστών (Patrick et al., 2018).

Υπάρχουν 6 τύποι εκκριτικών συστημάτων στα παθογόνα βακτήρια, μεταξύ των οποίων, ο τύπος III (TTSS/T3SS), ο τύπος IV (TFSS/T4SS) και ο τύπος VI (T6SS). Μερικά βακτήρια

εισάγουν ελάχιστες πρωτεΐνες τελεστές στα κύτταρα των ξενιστών τους, ενώ άλλα μέχρι και εκατοντάδες. Η παρουσία των τελεστών είναι καίριας σημασίας στη διάδοση λοιμώξεων, καθώς για παράδειγμα, στον παράγοντα που προκαλεί την πανώλη (*Yersinia pestis*), η απώλεια του T3SS είναι αρκετή ώστε να καταστήσει τα βακτήρια μη μολυσματικά, ακόμη και αν εισαχθούν απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος. Ακόμη, στα αρνητικά κατά Gram<sup>-</sup> βακτήρια αποδίδεται ο ρόλος ανάπτυξης βακτηριακών κυστιδίων με καινοτόμες εξωτερικές μεμβράνες οι οποίες έχουν ως σκοπό τη μεταφορά των πρωτεϊνών τελεστών και των λοιμογόνων παραγόντων διαμέσου της εκκριτικής οδού, για να τροποποιήσουν το περιβάλλον τους ή για να εισβάλλουν σε κύτταρα στόχους (Wikipedia).

### 1.6 Το είδος *Nicotiana benthamiana*

Το είδος *Nicotiana benthamiana* αποτελεί ένα άγριο είδος καπνού με Αυστραλιανή ιθαγένεια. Λόγω της ευρείας προσαρμογής του σε διάφορα περιβάλλοντα, παρουσιάζει μεγάλη μορφολογική, φυσιολογική και γενετική παραλλακτικότητα. Από γενετική άποψη, το είδος αυτό διαθέτει  $n = 19$  ζεύγη χρωμοσωμάτων, ενώ το γονιδίωμά του θεωρείται σχετικά περίπλοκο με μέγεθος που υπολογίζεται στα 3,136Mbp. Ταξινομικώς, είναι ένα αρχαίο αμφιδιπλειδές που σχηματίστηκε από διπλοειδείς γονείς, με την ένωση των γονιδιωμάτων *Sylvestres* και *Noctiflorae* (Wiley, 2004). Παρ' ότι είναι ένα πολύ χρήσιμο πειραματικό μοντέλο, οι πληροφορίες σχετικά με την προέλευσή του, τη γενετική του ποικιλομορφία και το γονιδίωμά του είναι ακόμα ελλιπείς (Goodin et al., 2015; Bally et al., 2018). Η συστηματική του κατάταξη είναι η ακόλουθη:

- Βασίλειο: Φυτά
- Κλάση: Αγγειόσπερμα
- Ομοταξία: Μονοκότυλα
- Τάξη: (Solanales)
- Οικογένεια: (Solanaceae)
- Γένος: (*Nicotiana*)
- Είδος: *benthamiana*

. Το είδος *Nicotiana benthamiana* σήμερα αποτελεί ερευνητικά ένα από τα περισσότερο

ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτά - μοντέλα στον κλάδο της φυτοπαθολογίας, και ειδικότερα της φυτοϊολογίας, καθώς δύναται να προσβληθεί από μια ευρεία γκάμα παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των ιών, μυκήτων και βακτηρίων, καθιστώντας το κατάλληλο για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φυτών και παθογόνων μικροοργανισμών. Είναι επίσης αξιοσημείωτο, ότι αποτελεί ξενιστή παθογόνων που δεν προσβάλλουν το πλέον χρησιμοποιούμενο φυτό - μοντέλο *Arabidopsis thaliana*, προσδίδοντας έτσι τη δυνατότητα εξαγωγής συμπερασμάτων για συγγενικά του *N. benthamiana* είδη. Παράλληλα, ο σύντομος βιολογικός του κύκλος επιταχύνει την όλη ερευνητική διαδικασία.,

Επιπλέον, το είδος αυτό παρέχει στους ερευνητές τη δυνατότητα σταθερού (π.χ. με τη χρήση του φορέα *Agrobacterium tumefaciens*) (Horsch et al, 1985a) και παροδικού γενετικού μετασχηματισμού με σκοπό την έκφραση διαγονιδίων με άγνωστες λειτουργίες με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Όσον αφορά τον παροδικό γενετικό μετασχηματισμό, αυτός μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση της μεθόδου του αγροεμποτισμού (agroinfiltration), μια μέθοδος κατά την οποία η φυλλική επιφάνεια εμποτίζεται με κύτταρα φορέα, βακτηριακής ή ιικής προέλευσης, που εκφράζουν τα υπό μελέτη γονίδια. Κατά συνέπεια, το είδος *N. benthamiana* παρέχει τη δυνατότητα έκφρασης και μελέτης της λειτουργίας πληθώρας διαγονιδίων.

Επιπρόσθετα, το φυτικό αυτό είδος επιλέγεται για την ενεργοποίηση πλασμιδίων που κωδικοποιούνται από ιούς και την εξέταση των γονιδιακών λειτουργιών με την επαγόμενη από ιούς γονιδιακή σίγηση (Virus Induced Gene Silencing, VIGS). Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι το είδος *Nicotiana benthamiana* να κερδίζει συνεχώς έδαφος στην Βιολογία φυτών και συγκεκριμένα σε έρευνες που απαιτούν τον εντοπισμό και την έκφραση των πρωτεϊνών καθώς και τον κατανόηση των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων (Goodin et al., 2015; Bally et al., 2018,). Η απεικόνιση της ακολουθίας του *N. benthamiana* θα επιτρέψει τον καλύτερο σχεδιασμό συστημάτων VIGS, προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα γονιδιακής σίγησης σε γονίδια μη στόχους (Wiley, 2004).



## 1.7 Σκοπός της μελέτης

Η αποκάλυψη του διττού ρόλου των πρωτεϊνών-τελεστών στην παθογένεια και στην αμολυσματικότητα, με βασικότερη όμως τη λειτουργία επαγωγής της μόλυνσης σε φυτά ξενιστές, έχει στρέψει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην κατανόηση της αλληλεπίδρασής τους με τις πρωτεΐνες των φυτών, με σκοπό την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας των τελευταίων υπό συνθήκες βιοτικών ή αβιοτικών καταπονήσεων. Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες-τελεστές προέρχονται από παθογόνα βακτήρια και ότι εγχύονται στο εσωτερικό των κυττάρων-ξενιστών τους μέσω του συστήματος έκκρισης πρωτεϊνών τύπου III (TTSS), συμβάλλοντας έτσι στην επαγόμενη απόκριση των φυτών, που εν τέλει θα εκδηλωθεί είτε ως ασθένεια είτε ως ανθεκτικότητα. Στο πλαίσιο αυτό, το γονίδιο *hraA* του βακτηρίου *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* έχει προταθεί για επαγωγή της σύνθεσης πρωτεϊνών – τελεστών, αποτελώντας έτσι παράγοντα παθογένειας και ότι το γονίδιο *hraB* του βακτηρίου *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* είναι απαραίτητο για την ολοκληρωμένη παθογένεια του βακτηριακού φορέα του (Lonjon et al., 2017). Βάσει των ανωτέρω, στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της δυνατότητας επαγωγής της άμυνας των φυτών υπό συνθήκες αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης αμυντικών μηχανισμών μέσω της διαγονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *hraA* και *hraB*.

Για το σκοπό αυτό, γενετικό υλικό αποτέλεσαν διαγονιδιακές σειρές του φυτού-μοντέλου *Nicotiana benthamiana*, στο οποίο εκφράστηκαν τα γονίδια *hraA* και *hraB*. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε η ενσωμάτωση των διαγονιδίων με τη χρήση της PCR, καθώς και η έκφραση αυτών μέσω της RT-PCR, σε όλες τις μετασχηματισμένες σειρές και τους απόγονους αυτογονιμοποίησης (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των υπό μελέτη διαγονιδιακών σειρών (T<sub>1</sub> γενεά) ως προς την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση των διαγονιδίων *hraA* και *hraB*, προκειμένου οι ομοζύγωτες σειρές να αποτελέσουν το υλικό των πειραμάτων για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι των αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Η ανθεκτικότητα των διαγονιδιακών σειρών αξιολογήθηκε υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας, ξηρασίας και υψηλής θερμοκρασίας. Ακολούθησε η αξιολόγηση της απόκρισης των *hraA* και *hraB* διαγονιδιακών σειρών, σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου, ενώ οι παρατηρήσεις που λαμβάνονταν αφορούσαν στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων και το δυναμικό ανάπτυξης των νεαρών σποροφύτων κάτω από τις συνθήκες καταπόνησης.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Φυτικό υλικό και επιλογή διαγονιδιακών σειρών

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων ξηρασίας, υψηλής αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας, συνιστά διαγονιδιακές σειρές φυτών του είδους *Nicotiana Benthamiana*, στις οποίες έχουν ενσωματωθεί τα γονίδια *hraA* και *hraB*, προερχόμενα από τα βακτήρια *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* και *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* αντίστοιχα.

Οι διαγονιδιακές σειρές που υπεβλήθησαν σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, καθώς και η επακόλουθη αξιολόγηση της ανθεκτικότητάς τους, αφορούσαν σε φυτά T<sub>2</sub> γενιάς. Σειρές της T<sub>1</sub> γενιάς που έδειξαν καλή βλαστική ικανότητα, ελέγχθηκαν για την διαγονιδιακή τους φύση και αξιοποιήθηκαν για την παραγωγή σπόρων T<sub>2</sub> γενιάς. Τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας σε *in vitro* συνθήκες διεξήχθησαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπερίοδου (Θερμοκρασία 25 °C, φωτοπερίοδος 16h φως /8h σκοτάδι) και διήρκησαν περίπου 20 ημέρες.

Για τη δημιουργία της T<sub>2</sub> γενιάς, διαγονιδιακές σειρές T<sub>1</sub> αλλά και φυτά αγρίου τύπου (wt) αναπτύχθηκαν σε γλάστρες με αναλογία τύρφης : περλίτη, 3 : 1. Σε κάθε γλάστρα έγινε σπορά 30 σπόρων της κάθε διαγονιδιακής σειράς, και περίπου 2 μήνες μετά, ακολούθησε μεταφύτευση των νεαρών σποροφύτων σε νέες γλάστρες, ώστε κάθε γλάστρα να περιέχει ένα φυτό. Έπειτα, λαμβάνονταν παρατηρήσεις για τη βιωσιμότητα την ανάπτυξη, την ανθοφορία και καρποφορία των φυτών και συλλέχθηκαν σπόροι αυτογονιμοποίησης για το κάθε φυτό χωριστά.



**Εικόνα 2.1** Ανάπτυξη φυτών T<sub>1</sub> γενιάς για τη δημιουργία σπόρων αυτογονιμοποίησης (T<sub>2</sub> γενιά).

Το φυτικό υλικό των σπόρων T<sub>2</sub> γενιάς υποβλήθηκε σε έλεγχο ομοζυγωτίας , και οι ομοζύγωτες για τα διαγονίδια *hraA* και *hraB* σειρές χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα.

## 2.2 Έλεγχος της διαγονιδιακής φύσης και της ομοζύγωτης/ετεροζύγωτης κατάστασης των διαγονιδίων *hraA* και *hraB*

Ο έλεγχος της διαγονιδιακής φύσης των φυτών, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση θρεπτικού μέσου επιλογής, παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνη (Km). Ειδικότερα, σπόροι από επτά επιλεγμένες διαγονιδιακές σειρές τοποθετήθηκαν σε τριβλία. Κάθε τριβλίο περιείχε 20 σπόρους, ενώ στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν φυτά αγρίου τύπου, αλλά και σειρές που αναπτύχθηκαν απουσία του αντιβιοτικού, που χρησίμευσαν ως μάρτυρες. Οι σειρές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.

**Πίνακας 2.1** Διαγονιδιακές σειρές T<sub>1</sub> γενιάς που αξιολογήθηκαν ως προς την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση των διαγονιδίων *hraA* και *hraB*.

Διαγονιδιακή σειρά	Προέλευση διαγονιδίου
<i>HraB</i> T1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>

<i>HraB 1</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
<i>HraB 2</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
<i>HraB 4</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
<i>HraA 1</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
<i>HraA 3</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
D1 161-15	<i>SP/HrpZ<sub>Psph</sub> - Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
<b>WT</b>	-

➤ Απολύμανση σπόρων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απολύμανση των σπόρων της T<sub>1</sub> γενεάς με τη χρήση διαλύματος καθαρής αιθανόλης για 1 min. Έπειτα, οι σπόροι τοποθετήθηκαν στα τριβλία που περιείχαν το θρεπτικό υπόστρωμα.

➤ Βλάστηση διαγονιδιακών σειρών σε θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής

Μετά την απολύμανση των σπόρων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ομοζύγωτης/ετεροζύγωτης κατάστασης των υπό μελέτη σειρών μέσω βλάστησης σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε το αντιβιοτικό επιλογής καναμυκίνη. Συγκεκριμένα η σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος ήταν: 2,2g/lit MS (Murashige and Skoog), 30g/lit σουκρόζης και 5g/lit άγαρ, καθώς και το αντιβιοτικό καναμυκίνη ( $1,5 \cdot 10^{-3}$  M) (με αραιώση 1mg/10ml H<sub>2</sub>O micronfiltred) σε pH: 5,6-5,8. . .

Το είδος και η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου αντιβιοτικού επιλογής, εκτιμήθηκε μέσω της βλάστησης σπόρων αγρίου τύπου στο θρεπτικό υπόστρωμα. Εξαιτίας του γεγονότος ότι σπόροι αγρίου τύπου δε φέρουν το γονίδιο ανθεκτικότητας ως προς το αντιβιοτικό, αναμένεται να παρατηρηθεί αδυναμία βλάστησης υπό τις δεδομένες συνθήκες πίεσης επιλογής.

Ο έλεγχος της ομοζύγωτης /ετεροζύγωτης κατάστασης των διαγονιδίων διεξήχθη με την καταμέτρηση των ανθεκτικών και ευαίσθητων στην Km σπορόφυτων,. Σειρές με φαινοτυπική αναλογία που τείνει στο 3 : 1, βρίσκονται σε ετεροζύγωτη κατάσταση ως προς την έκφραση των διαγονιδίων. Αντίθετα, σειρές με ποσοστό βλάστησης και ικανότητα ανάπτυξης 100% υπό τις δεδομένες συνθήκες πίεσης επιλογής, θεωρήθηκαν ομοζύγωτες για τα διαγονίδια *hraA* και *hraB*. Από τις αρχικές επτά σειρές που αξιολογήθηκαν, οι πέντε εξ αυτών χαρακτηρίστηκαν ως ομοζύγωτες. Αυτές είναι οι ακόλουθες: HraA 1, HraB 1, HraB 2, HraB 4 και Double D1 161-15.

## 2.3 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης

### 2.3.1 Καταπόνηση υπό συνθήκες ξηρασίας

Με σκοπό την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των υπό μελέτη σειρών έναντι συνθηκών υδατικής καταπόνησης, χρησιμοποιήθηκαν 5 διαγονιδιακές σειρές T<sub>2</sub> γενιάς, στις οποίες είχε προηγηθεί η επιβεβαίωση της ομοζύγωτης κατάστασης των διαγονιδίων *hpaA* και *hpaB* (ενότητα 2.1.2).

Αφού πραγματοποιήθηκε απολύμανση των σπόρων των διαγονιδιακών σειρών με τη χρήση καθαρής αιθανόλης, ακολούθησε τοποθέτηση των σπόρων σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα με πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις του παράγοντα καταπόνησης. Το θρεπτικό υπόστρωμα περιείχε 2,2g/lit MS (Murashige and Skoog), 5g/lit σουκρόζης και 5g/lit άγαρ. Οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις είναι οι εξής: d-mannitol (0, 100, 200 και 300 mM), καθώς και Polyethylene Glycol (PEG 5%,). Στο πείραμα πέραν των διαγονιδιακών σειρών, χρησιμοποιήθηκαν και σπόροι αγρίου τύπου που χρησίμευσαν ως μάρτυρες. Τα αναλυτικά στάδια της διαδικασίας προετοιμασίας του θρεπτικού υποστρώματος περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα 2.3.4.

Κάθε τριβλίο περιείχε 20 σπόρους T<sub>2</sub> γενιάς, ενώ οι διαγονιδιακές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2 Ομοζύγωτες διαγονιδιακές σειρές που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα έναντι καταπόνησης ξηρασίας.

Διαγονιδιακή σειρά T <sub>2</sub> / WT	Αριθμός T <sub>2</sub> σπόρων				
	PEG 5%	100mM D-Man	200mM D-Man	300mM D-Man	Control
<i>HpaB</i> 1-4	20	20	20	20	40
<i>HpaB</i> 2-1	20	20	20	20	40
<i>HpaB</i> 4-3	20	20	20	20	40
<i>HpaA</i> 1-2	20	20	20	20	40
<i>HpaA</i> 2-4	20	20	20	40	40

<i>HraA</i> T <sub>1</sub> -5	40	40	20	40	40
WT	40	40	40	40	40

Τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (Θερμοκρασία 25° C, Φωτοπερίοδος 16h φως/8h σκοτάδι) για 47 ημέρες, κατά τη διάρκεια των οποίων, οι παρατηρήσεις που λαμβάνονταν αφορούσαν το ποσοστό βλάστησης των σπόρων, αλλά και την ανάπτυξη των νεαρών σποροφύτων. Στις παρατηρήσεις καταμετρούνταν όσοι σπόροι είχαν μήκος ριζιδίου μεγαλύτερο από 2 mm, ενώ το ποσοστό βλάστησης υπολογίζονταν βάσει του τύπου: GP = (Αριθμός βλαστημένων σπόρων/Συνολικό αριθμό σπόρων)\*100.

### 2.3.2 Καταπόνηση υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας

Για την διεξαγωγή του πειράματος, αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι συνθηκών υψηλής αλατότητας, χρησιμοποιήθηκαν 5 διαγονιδιακές σειρές T<sub>2</sub> γενιάς, στις οποίες είχε προηγουμένως επιβεβαιωθεί η ομοζύγωτη κατάσταση των διαγονιδίων *hraA* και *hraB* (ενότητα 2.1.2)..

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απολύμανση των σπόρων με τη χρήση καθαρής αιθανόλης, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.3.1. Έπειτα, με σκοπό την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των φυτών στην υψηλή αλατότητα, οι διαγονιδιακές σειρές υποβλήθηκαν σε καταπόνηση με προσθήκη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl: 0, 100 και 200 mM. Σπόροι των διαγονιδιακών σειρών καθώς και φυτών αγρίου τύπου τοποθετήθηκαν στα τριβλία τα οποία περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο περιείχε: 2,2g/lit MS (Murashige and Skoog), 30g/lit σουκρόζης και 5g/lit άγαρ. Θα πρέπει να σημειωθεί πως έγινε παρασκευή και δεύτερου θρεπτικού υποστρώματος με τις ίδιες αναλογίες συστατικών, το οποίο περιείχε το αντιβιοτικό καναμυκίνη σε συγκέντρωση (1,5\*10<sup>-3</sup> M) (με αραιώση 1mg/10ml H<sub>2</sub>O micronfiltred).

Κάθε τριβλίο περιείχε από 20 σπόρους T<sub>2</sub> γενιάς. Οι σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και ο συνολικός αριθμός των σπόρων της κάθε μίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3 Ομοζύγωτες διαγονιδιακές σειρές που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα έναντι καταπόνησης υψηλής αλατότητας.

Διαγονιδιακή σειρά T <sub>2</sub> / WT	Αριθμός T <sub>2</sub> σπόρων
---	-------------------------------

	100mM NaCl		200mM NaCl		Control	
	Km	-	Km	-	Km	-
<i>HraB</i> 1-4	40	20	40	20	20	20
<i>HraB</i> 2-1	40	20	40	20	20	20
<i>HraB</i> 4-3	40	20	40	20	20	20
<i>HraA</i> 1-2	40	20	40	20	20	20
<i>HraA</i> 2-4	40	20	40	20	20	20
<i>HraA</i> T <sub>1-5</sub>	40	20	40	20	20	20
WT	--	80	--	60	80	80

Τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου (Θερμοκρασία 25°C, Φωτοπερίοδος 16h φως/8h σκοτάδι) για 40 ημέρες, κατά τη διάρκεια των οποίων, λήφθηκαν παρατηρήσεις που αφορούσαν τη βλαστικότητα των σπόρων παρουσία του παράγοντα καταπόνησης και την ανάπτυξη των νεαρών σπορόφυτων. Στις καταμετρήσεις των βλαστημένων σπόρων, λήφθηκαν υπόψη όσοι σπόροι είχαν μήκος ριζιδίου μεγαλύτερο από 2 mm. Για τον υπολογισμό της βλαστικότητας, εφαρμόστηκε ο τύπος  $GP = (\text{Αριθμός βλαστημένων σπόρων} / \text{Συνολικό αριθμό σπόρων}) * 100$ .

### 2.3.3 Καταπόνηση υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας

Για την διεξαγωγή του πειράματος, με σκοπό την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι συνθηκών υψηλής θερμοκρασίας, χρησιμοποιήθηκαν 5 διαγονιδιακές σειρές T<sub>2</sub> γενιάς, για τις οποίες είχε προηγουμένως επιβεβαιωθεί η ομοζύγωτη κατάσταση των διαγονιδίων *hraA* και *hraB* (ενότητα 2.1.2).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απολύμανση των σπόρων με τη χρήση καθαρής αιθανόλης, όπως περιγράφεται παραπάνω. Στη συνέχεια, οι σπόροι των διαγονιδιακών σειρών τοποθετήθηκαν στα τριβλία τα οποία περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα. Συγκεκριμένα το θρεπτικό υπόστρωμα περιείχε: 2,2g/lit MS (Murashige and Skoog), 30g/lit σουκρόζης και 5g/lit άγαρ. Θα πρέπει να σημειωθεί πως παράλληλα με αυτό το θρεπτικό υπόστρωμα παρασκευάστηκε ένα επιπλέον με τις ίδιες αναλογίες συστατικών, το οποίο περιείχε το αντιβιοτικό καναμυκίνη σε συγκέντρωση ( $1,5 * 10^{-3}$  M) (με αραιώση 1mg/10ml H<sub>2</sub>O micronfiltered), Κάθε τριβλίο

περιείχε 20 σπόρους T<sub>2</sub> γενιάς, ενώ στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν και φυτά αγρίου τύπου. Οι σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και ο συνολικός αριθμός των σπόρων της κάθε μίας απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.4).

Πίνακας 2.4 Ομοζύγωτες διαγονιδιακές σειρές που αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα έναντι καταπόνησης υψηλής θερμοκρασίας.

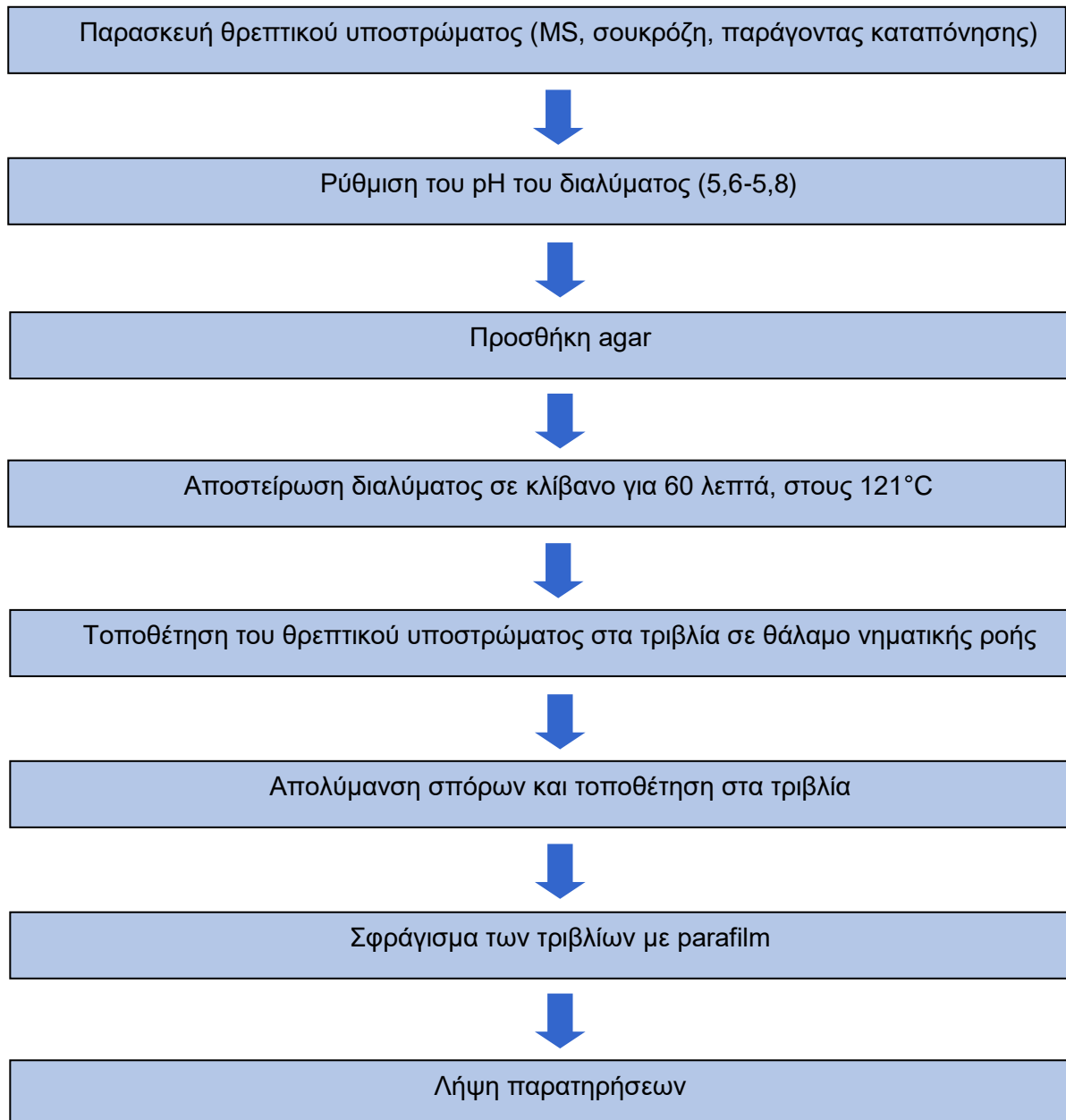
<b>Διαγονιδιακή σειρά T<sub>2</sub> / WT</b>	<b>Αριθμός T<sub>2</sub> σπόρων</b>
<i>hpaB</i> 1-4	40
<i>hpaB</i> 2-1	40
<i>hpaB</i> 4-3	40
<i>hpaA</i> 1-2	40
<i>hpaA</i> 2-4	40
<i>hpaA</i> T <sub>1</sub> -5	40
<b>WT Km</b>	80
<b>WT</b>	160

Μετά από δύο εβδομάδες, όταν οι σπόροι είχαν πλέον βλαστήσει, εισήχθησαν σε επωαστήρα θερμοκρασίας 37 °C για διάστημα μιας εβδομάδας. Έπειτα, μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (Θερμοκρασία 25°C, Φωτοπερίοδος 16h φως/8 h σκοτάδι) για 7 ημέρες, κατά τη διάρκεια των οποίων, λήφθηκαν παρατηρήσεις που αφορούσαν το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και την ανάπτυξη των νεαρών σπορόφυτων. Στις καταμετρήσεις των βλαστημένων σπόρων, λήφθηκαν υπόψιν όσοι σπόροι είχαν μήκος ριζιδίου μεγαλύτερο από 2 mm. Για τον υπολογισμό της βλαστικότητας, εφαρμόστηκε ο τύπος GP = (Αριθμός βλαστημένων σπόρων/Συνολικό αριθμό σπόρων)\*100.

#### 2.3.4 Διαδοχικά στάδια παρασκευής τριβλίων

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των δειγμάτων για όλα τα παραπάνω πειράματα καταπονήσεων είχε την ακόλουθη ροή :





### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην καταπόνηση ξηρασίας

##### 3.1.1 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των *hpaB* - διαγονιδιακών σειρών

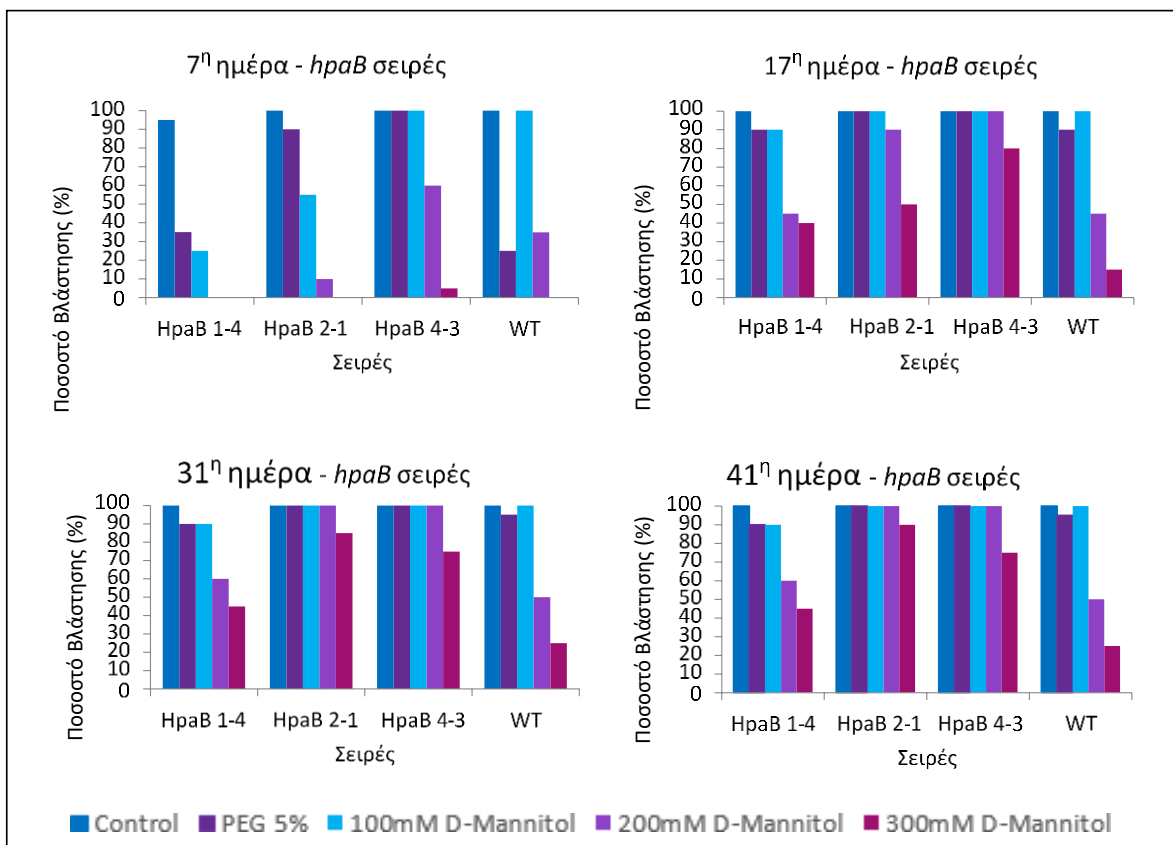
Από τα αποτελέσματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας, προκύπτει ότι η βλάστηση των *hpaB*-διαγονιδιακών σειρών επηρεάστηκε σημαντικά από τον παράγοντα καταπόνησης, και μάλιστα η επίδραση στις περισσότερες περιπτώσεις υπήρξε ανάλογη με την ένταση της εφαρμοζόμενης καταπόνησης (Πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των *hpaB* - διαγονιδιακών σειρών και σπόρων αγρίου τύπου, ανά επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας, την 7η , 17η, 30η και 41η ημέρα παρατήρησης.

Ημέρα παρατήρησης/ Ημερομηνία	Σειρά	Ποσοστό Βλάστησης (%)				
		<i>Control</i>	<i>PEG 5%</i>	<i>100mM D-Mannitol</i>	<i>200mM D-Mannitol</i>	<i>300mM D-Mannitol</i>
7 <sup>η</sup> ημέρα 14/12/2017	<i>HpaB</i> 1-4	90.0	35.0	25.0	0.0	0.0
	<i>HpaB</i> 2-1	100.0	90.0	55.0	10.0	0.0
	<i>HpaB</i> 4-3	100.0	100.0	100.0	60.0	5.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>25.0</b>	<b>100.0</b>	<b>35.0</b>	<b>0.0</b>
17 <sup>η</sup> ημέρα 24/12/2017	<i>HpaB</i> 1-4	100.0	90.0	90.0	45.0	40.0
	<i>HpaB</i> 2-1	100.0	100.0	100.0	90.0	50.0
	<i>HpaB</i> 4-3	100.0	100.0	100.0	100.0	80.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>90.0</b>	<b>100.0</b>	<b>45.0</b>	<b>15.0</b>
30 <sup>η</sup> ημέρα 7/1/2018	<i>HpaB</i> 1-4	100.0	90.0	90.0	60.0	45.0
	<i>HpaB</i> 2-1	100.0	100.0	100.0	100.0	85.0
	<i>HpaB</i> 4-3	100.0	100.0	100.0	100.0	75.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>95.0</b>	<b>100.0</b>	<b>50.0</b>	<b>25.0</b>
41 <sup>η</sup> ημέρα 17/1/2018	<i>HpaB</i> 1-4	100.0	90.0	90.0	60.0	45.0
	<i>HpaB</i> 2-1	100.0	100.0	100.0	100.0	90.0
	<i>HpaB</i> 4-3	100.0	100.0	100.0	100.0	75.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>95.0</b>	<b>100.0</b>	<b>50.0</b>	<b>25.0</b>

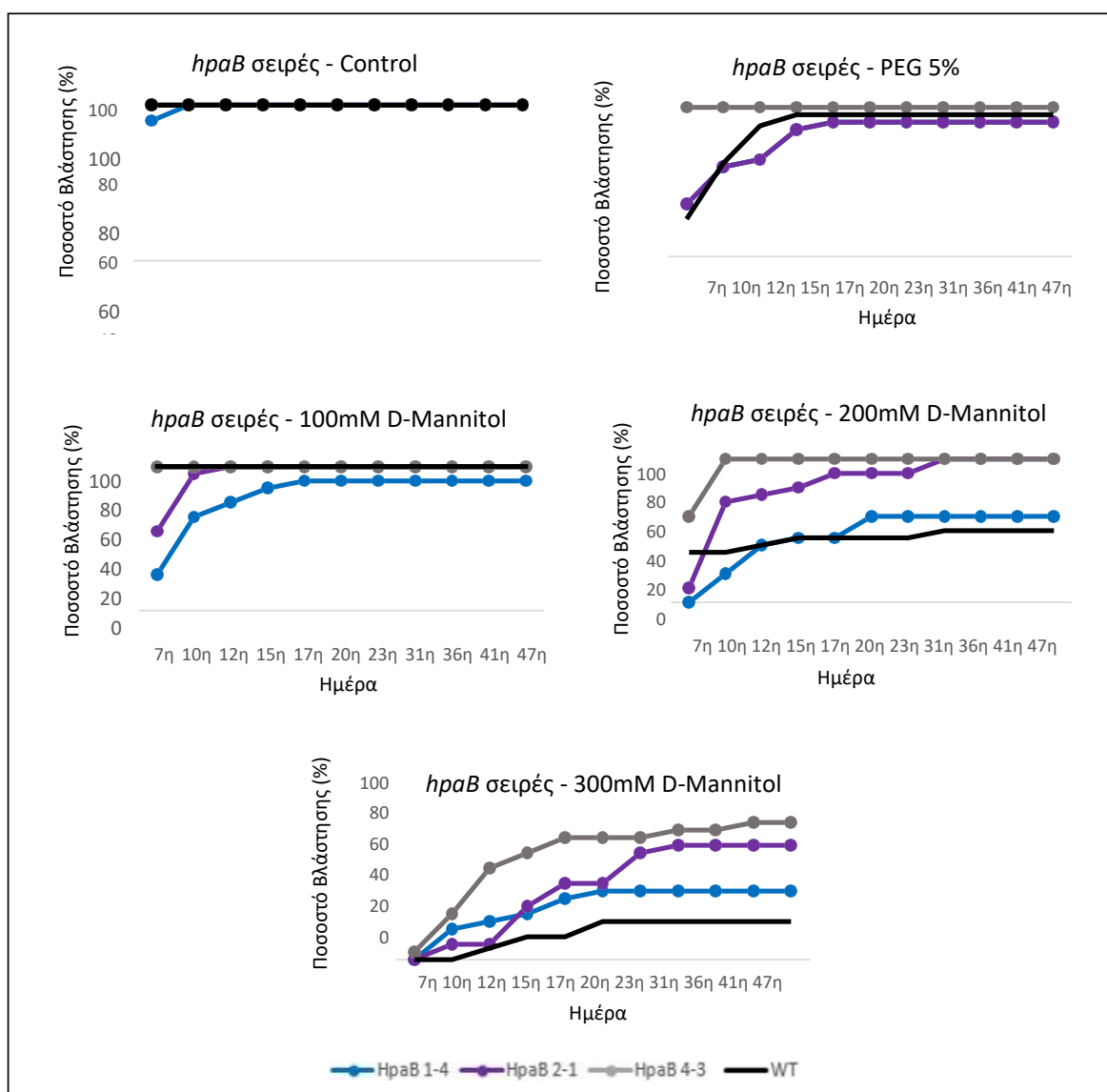
Αναλυτικότερα, απουσία του παράγοντα καταπόνησης (μάρτυρες), από την πρώτη μέρα παρατήρησης, οι περισσότερες διαγονιδιακές σειρές εμφάνισαν αυξημένα ποσοστά βλάστησης συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Μάλιστα ως πιο ‘εύρωστες’ αναδείχθηκαν οι σειρές *HraB* 2-1, *HraB* 4-3, τα ποσοστά βλάστησης των οποίων έφτασαν το 100 %. Κατά την 10<sup>η</sup> ημέρα παρατήρησης, το σύνολο των σειρών εμφάνισε ποσοστό βλάστησης 100 % (Διάγραμμα 3.1 και 3.2).

Παράλληλα, στα χαμηλά επίπεδα καταπόνησης των 5% PEG και 100 mM D- Mannitol, οι περισσότερες διαγονιδιακές σειρές παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό βλάστησης συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου, ήδη από την 7<sup>η</sup> ημέρα παρατήρησης. Στο επίπεδο αυτό, η σειρά *HraB* 4-3, ενώ η σειρά *HraB* 1-4 σημείωσε επίδοση παρόμοια με αυτή των φυτών αγρίου τύπου (Πίνακας 3.1).



**Διάγραμμα 3.1** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των *hraB* διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση στα πέντε επίπεδα καταπόνησης ξηρασίας (Control, 5% PEG, 100mM, 200mM, 300mM D-Mannitol), την 7η , 17η , 31η και 41η ημέρα παρατήρησης.

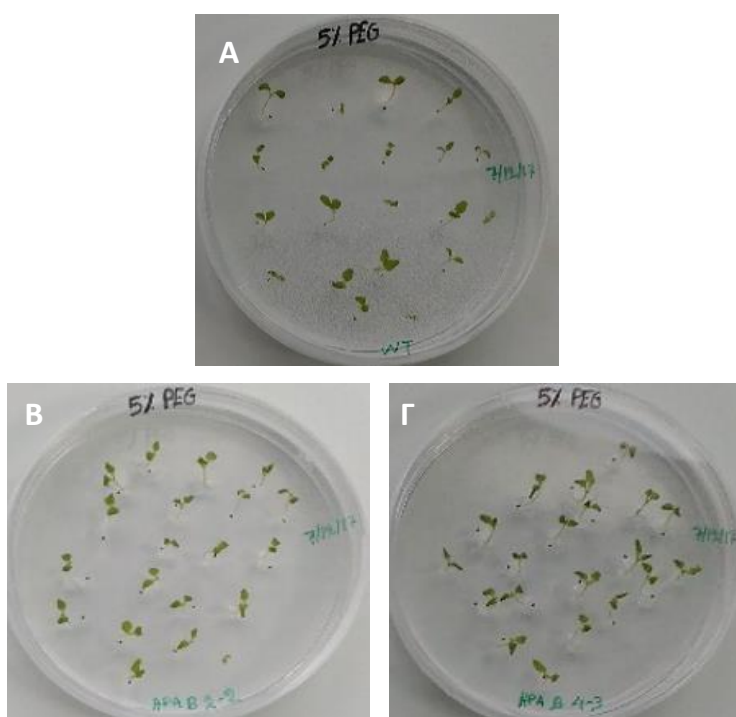
Με την αύξηση του επιπέδου καταπόνησης, παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων. Στο επίπεδο 200 mM D- Mannitol, το ποσοστό βλάστησης των φυτών αγρίου τύπου είναι αρκετά χαμηλό (50 %), ενώ αντίθετα οι σειρές *HraB* 2-1 και *HraB* 4-3 εμφάνισαν ποσοστά βλάστησης 100%. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την υπεροχή των διαγονιδιακών σειρών στο συγκεκριμένο παράγοντα καταπόνησης. Στο επίπεδο 300 mM D- Mannitol, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές στο επίπεδο 200 mM D- Mannitol, με τις σειρές *HraB* 2-1 και *HraB* 4-3 να εμφανίζονται υψηλότερα ποσοστά βλάστησης (Πίνακας 3.1).



**Διάγραμμα 3.2** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης (%) σπόρων των *hraB* διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση στα πέντε επίπεδα καταπόνησης ξηρασίας (Control, 5% PEG, 100 mM, 200 mM, 300 mM D-Mannitol).

Περαιτέρω, η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του φυτικού υλικού στην καταπόνηση ξηρασίας βασίστηκε στον αναπτυξιακό φαινότυπο των σπορόφυτων των διαγονιδιακών σειρών συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου υπό συνθήκες καταπόνησης. Ενώ απουσία του παράγοντα καταπόνησης, τόσο οι διαγονιδιακές σειρές όσο και τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν αυξημένο ρυθμό βλάστησης και φυσιολογικό φαινότυπο, η αύξηση του επιπέδου καταπόνησης οδήγησε σε ανασχεση ανάπτυξης και εμφάνιση συμπτωμάτων καταπόνησης, τα οποία κατά κύριο λόγο περιλάμβαναν μείωση της φυλλικής επιφάνειας μέσω αδυναμίας έκπτυξης πραγματικών φύλλων και κύρτωσης του ελάσματος των φύλλων.

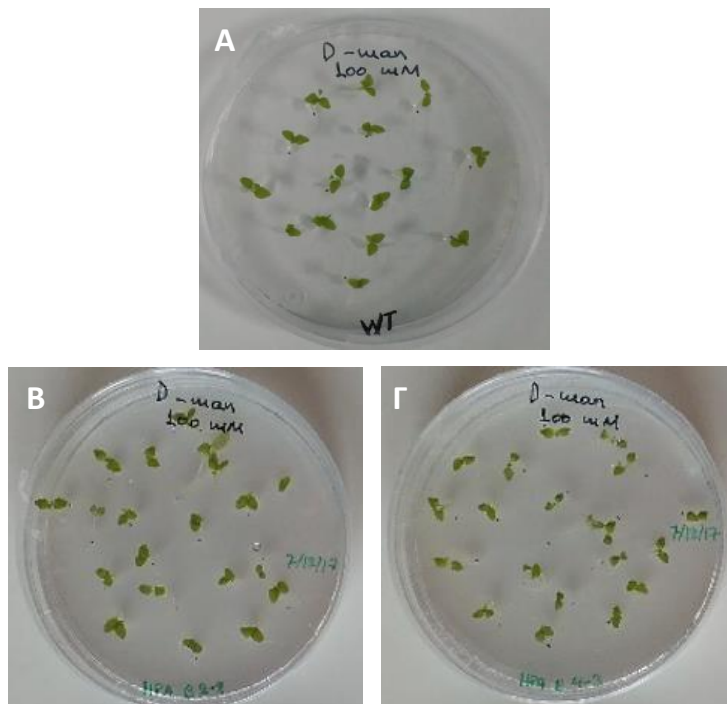
Ειδικότερα, στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (5% PEG), οι διαγονιδιακές σειρές *HraB* 2-2, *HraB* 2-1 και *HraB* 4-3 εμφάνισαν σαφή υπεροχή στην ανάπτυξη έναντι των φυτών αγρίου τύπου από τη 15η ημέρα παρατήρησης.



**Εικόνα 3.1** Συγκριτική ανάπτυξη των *HraB* διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας PEG 5%, την 15η ημέρα παρατήρησης. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς *HraB* 2-2. Γ Φυτά της σειράς *HraB* 4-3.

Την 20η ημέρα και στο επίπεδο καταπόνησης των 100 mM D-Mannitol, ο αναπτυξιακός φαινότυπος των φυτών δεν παρουσίασε σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με το επίπεδο

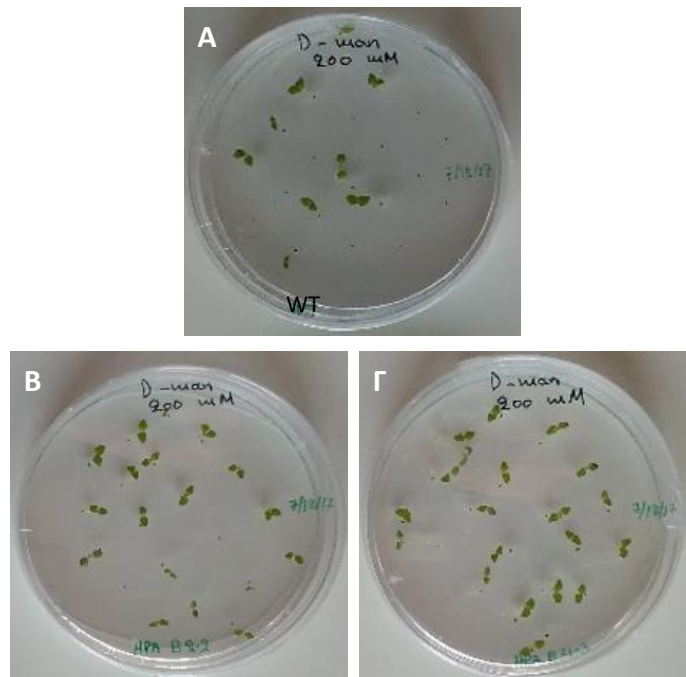
5 % PEG, με τις σειρές *HraB* 2-2 και *HraB* 4-3 να έχουν εμφανή υπεροχή στην ανάπτυξη έναντι των υπολοίπων διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (Εικόνα 3.2).



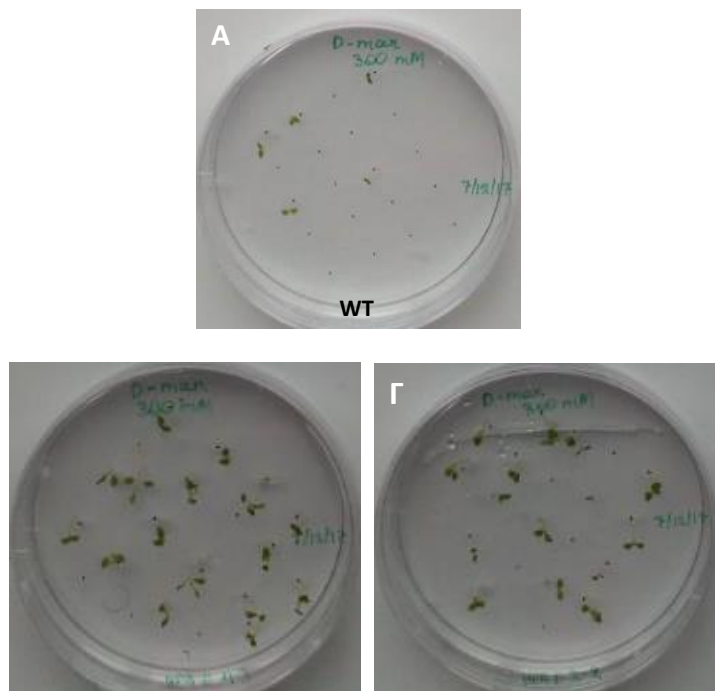
**Εικόνα 3.2** Συγκριτική ανάπτυξη των *HraB* διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο μεσαίο επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 100 mM D-Mannitol, την 20η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς *HraB* 2-2. Γ Φυτά της σειράς *HraB* 4-3.

Στο επίπεδο καταπόνησης 200 mM D-Mannitol στην 20η ημέρα παρατήρησης, είναι εμφανής η υπεροχή στην ανάπτυξη των σειρών *HraB* 2-2 και *HraB* 4-3 (Εικόνα 3.3). Συγκεκριμένα, τα φυτά των εν λόγω διαγονιδιακών σειρών παρουσιάζουν ηπιότερα συμπτώματα κύρτωσης του ελάσματος των φύλλων συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Επιπρόσθετα, η υπεροχή των *HraB* 2-2 και *HraB* 4-3 διαγονιδιακών σειρών, όπως έχει σημειωθεί, αντανακλάται και στο υψηλότερο ποσοστό βλάστησης συγκεκριμένων διαγονιδιακών σειρών (Πίνακας 3.1).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι προς το τέλος του πειράματος (33η ημέρα παρατήρησης), στο υψηλότερο επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας (300 mM D-Mannitol), η ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου υπήρξε σαφώς περιορισμένη, ενώ αντίθετα οι σειρές *HraB* 2-2 και *HraB* 4-3 παρουσίασαν σημαντική ευρωστία, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανή ανθεκτικότητά τους στην καταπόνηση της ξηρασίας (Εικόνα 3.4).



**Εικόνα 3.3** Συγκριτική ανάπτυξη των *HraB* διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 200 mM D-Mannitol, την 20η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς *HraB* 2-2. Γ Φυτά της σειράς *HraB* 4-3.



**Εικόνα 3.4** Συγκριτική ανάπτυξη των *HraB* διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 300 mM D-Mannitol, την 33η ημέρα από

την τοποθέτηση των σπόρων. Α wt φυτά. Β Φυτά της σειράς *HraB* 2-2. Γ Φυτά της σειράς *HraB* 4-3.

### 3.1.2 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των *hraA* - διαγονιδιακών σειρών

Από τα αποτελέσματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας των *hraA* διαγονιδιακών σειρών υπό συνθήκες ξηρασίας, είναι σαφές ότι η βλάστηση των φυτών επηρεάστηκε σημαντικά από τον παράγοντα της ξηρασίας και μάλιστα, ως επί των πλείστων, η επίδραση υπήρξε ανάλογη του επιπέδου καταπόνησης (Πίνακας 3.2).

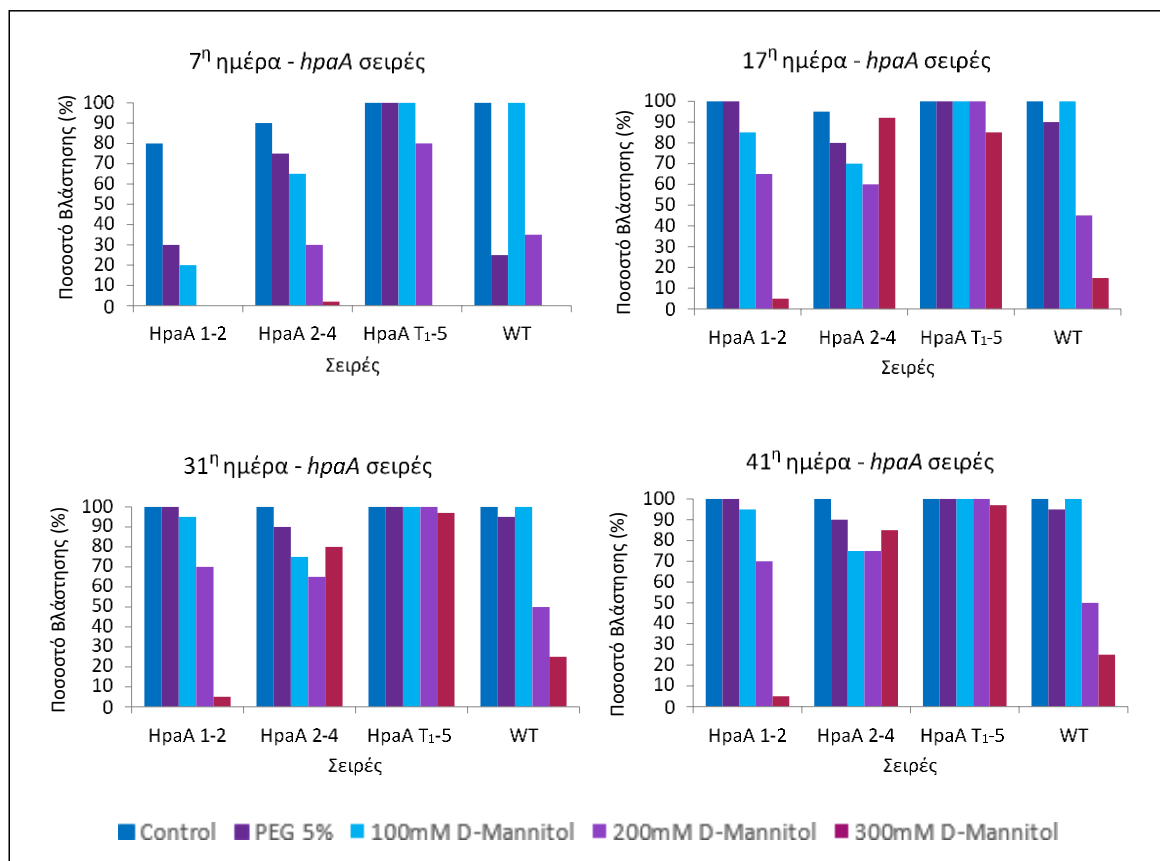
**Πίνακας 3.2** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των *hraA*-διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου, ανά επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας, την 7η , 17η, 30η και 41η ημέρα.

Ημέρα παρατήρησης/ Ημερομηνία	Σειρά	Ποσοστό Βλάστησης (%)				
		<i>Control</i>	<i>PEG</i> 5%	<i>100mM</i> <i>D-</i> <i>Mannitol</i>	<i>200mM</i> <i>D-Mannitol</i>	<i>300mM</i> <i>D-Mannitol</i>
7 <sup>η</sup> ημέρα 14/12/2017	<i>HraA</i> 1-2	52.5	30.0	20.0	0.0	0.0
	<i>HraA</i> 2-4	77.5	75.0	65.0	30.0	2.5
	<i>HraAT1</i> -5	100.0	100.0	100.0	80.0	0.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>25.0</b>	<b>100.0</b>	<b>35.0</b>	<b>0.0</b>
17 <sup>η</sup> ημέρα 24/12/2017	<i>HraA</i> 1-2	100.0	100.0	85.0	65.0	5.0
	<i>HraA</i> 2-4	85.0	80.0	70.0	60.0	92.5
	<i>HraAT1</i> -5	100.0	100.0	100.0	100.0	85.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>90.0</b>	<b>100.0</b>	<b>45.0</b>	<b>15.0</b>
30 <sup>η</sup> ημέρα 7/1/2018	<i>HraA</i> 1-2	100.0	100.0	95.0	70.0	5.0
	<i>HraA</i> 2-4	87.5	90.0	75.0	65.0	80.0
	<i>HraAT1</i> -5	100.0	100.0	100.0	100.0	97.5
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>95.0</b>	<b>100.0</b>	<b>50.0</b>	<b>25.0</b>
41 <sup>η</sup> ημέρα 17/1/2018	<i>HraA</i> 1-2	100.0	100.0	95.0	70.0	5.0
	<i>HraA</i> 2-4	87.5	90.0	75.0	75.0	85.0
	<i>HraAT1</i> -5	100.0	100.0	100.0	100.0	97.5
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>95.0</b>	<b>100.0</b>	<b>50.0</b>	<b>25.0</b>



Αναλυτικότερα, απουσία καταπόνησης, φαίνεται ότι η σειρά *HraA* T1-5, καθώς και τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν αυξημένα ποσοστά βλάστησης που έφτασαν το 100 %, ήδη από την 1η ημέρα λήψης παρατηρήσεων. Στη συνέχεια, κατά τη 17η ημέρα παρατήρησης παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά βλάστησης που άγγιξαν το 100 % για την πλειονότητα των διαγονιδιακών σειρών. Εξάιρεση αποτέλεσε η σειρά *HraA* 2-4, το ποσοστό βλάστησης της οποίας δεν ξεπέρασε το 85 % (Διάγραμμα 3.3).

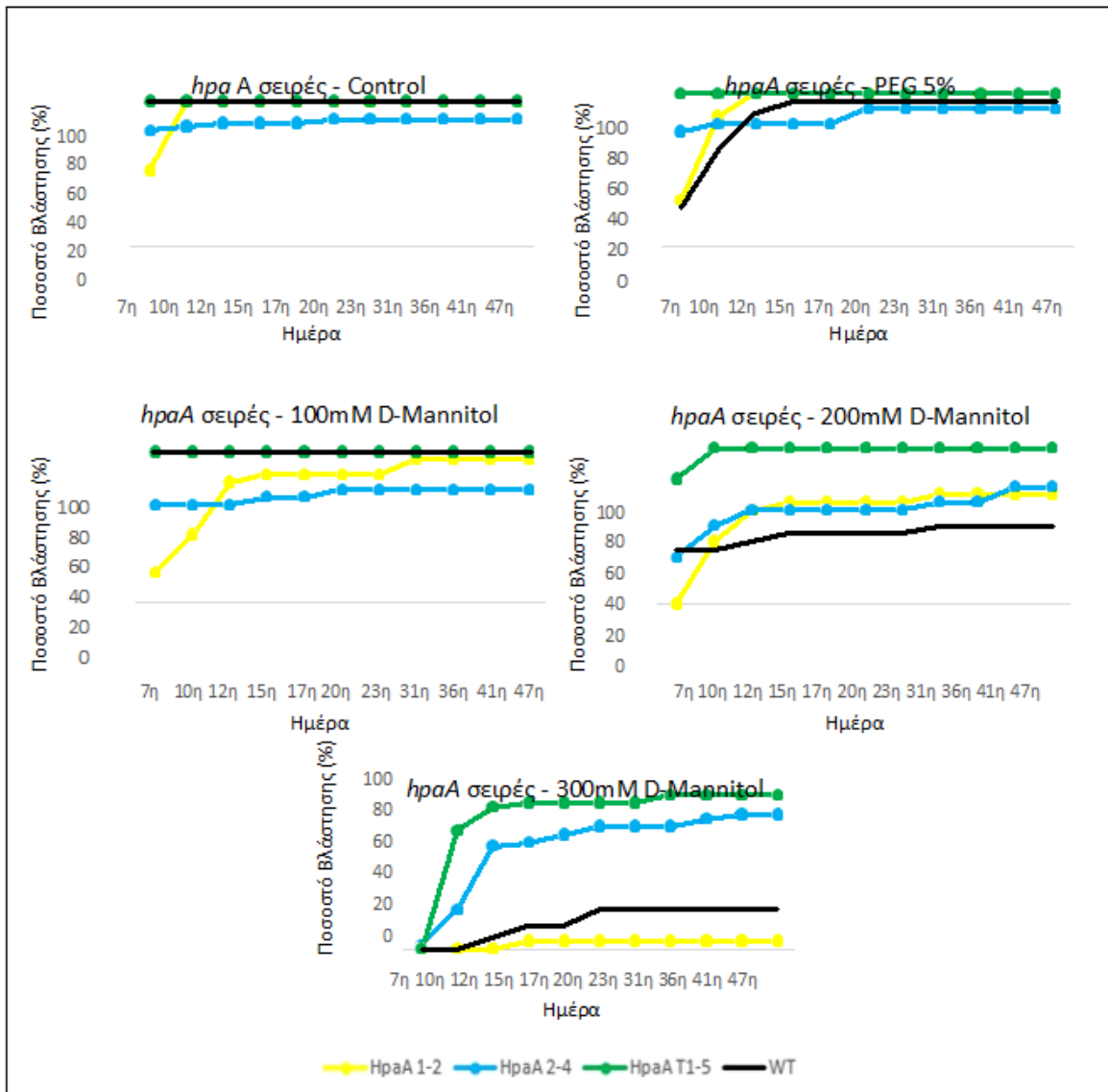
Παράλληλα, στα χαμηλά επίπεδα καταπόνησης των 5 % PEG και 100 mM D- Mannitol οι διαγονιδιακές σειρές εμφανίζουν υψηλά ποσοστά βλάστησης από τις πρώτες ημέρες λήψης παρατηρήσεων, ενώ αντίθετα το ποσοστό βλάστησης των φυτών αγρίου τύπου αυξάνεται από τη 17η ημέρα παρατήρησης. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως η σειρά *HraA* T1-5, παρουσιάζει ποσοστό βλάστησης 100 % από την 7η ημέρα παρατήρησης, ενώ η σειρά με τα χαμηλότερα ποσοστά βλάστησης σε όλη τη διάρκεια του πειράματος φαίνεται πως είναι η *HraA* 2-4 (ποσοστό βλάστησης 90 %) (Διάγραμμα 3.3).



**Διάγραμμα 3.3** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των *HraA* διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση στα πέντε επίπεδα καταπόνησης ξηρασίας (Control, 5 % PEG, 100 mM, 200 mM, 300 mM D-Mannitol), την 7η , 17η , 31η και 41η ημέρα παρατήρησης.

Όπως αναμενόταν, η αύξηση του επιπέδου του παράγοντα καταπόνησης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων. Συγκεκριμένα, στο επίπεδο 200 mM D-Mannitol σημειώθηκε καθυστέρηση στην έναρξη της βλάστησης τόσο των διαγονιδιακών σειρών όσο και των φυτών αγρίου τύπου. Εξαιρεση αποτέλεσε η σειρά *HraA* T1-5, η οποία εμφάνισε ποσοστό βλάστησης 100 % ήδη από την 10η ημέρα παρατήρησης, ενώ αντίθετα στα φυτά αγρίου τύπου το ποσοστό κυμάνθηκε στο 50 % (Διάγραμμα 3.4).

Όσον αφορά το υψηλότερο επίπεδο καταπόνησης (300 mM D- Mannitol), και πάλι η υπεροχή της σειράς *HraA* T1-5 υπήρξε εμφανής, με το ποσοστό βλάστησής της να υπερβαίνει το 95 %. Ικανοποιητική εικόνα παρουσίασε και η σειρά *HraA* 2-4, το ποσοστό βλάστησης της οποίας έφτασε το 85 %. Τέλος, η σειρά *HraA* 1-2 εμφάνισε τα χαμηλότερα ποσοστά βλάστησης (5 %) συγκριτικά με όλες τις διαγονιδιακές σειρές και τα φυτά αγρίου τύπου (Πίνακας 3.2).



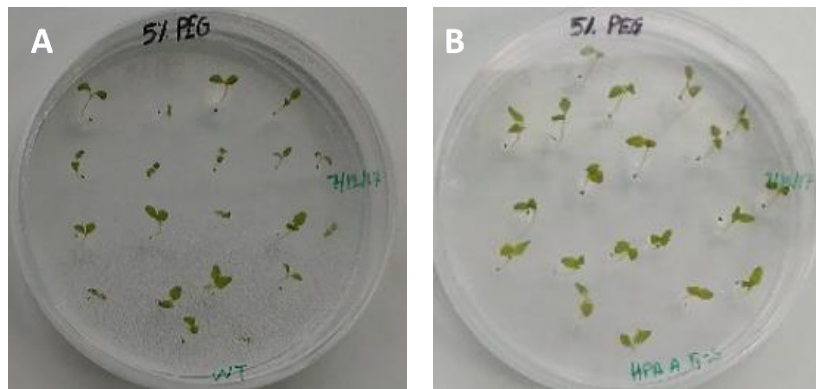
**Διάγραμμα 3.4** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης (%) σπόρων των *HraA* διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση στα πέντε επίπεδα καταπόνησης ξηρασίας (Control, 5 % PEG, 100 mM, 200 mM, 300 mM D-Mannitol).

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του φυτικού υλικού στην καταπόνηση της ξηρασίας, δε βασίστηκε αποκλειστικά στην παρατήρηση του περιοδικού και του τελικού ποσοστού βλάστησης των διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου, αλλά περιελάμβανε και παρατηρήσεις που αφορούσαν το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών και την ύπαρξη ή μη συμπτωμάτων ως αιτία του παράγοντα καταπόνησης.

Απουσία καταπόνησης, παρατηρήθηκε ταχύς ρυθμός ανάπτυξης των νεαρών φυτών και κανονικός φαινότυπος, ενώ η αύξηση του επιπέδου καταπόνησης είχε ως αποτέλεσμα

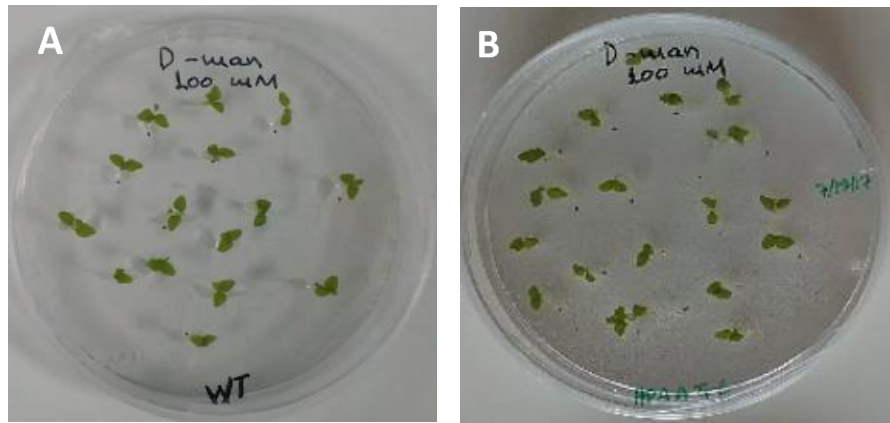
ανάσχεση ανάπτυξης καθώς επίσης και εμφάνιση μειωμένης φυλλικής επιφάνειας και συρρίκνωση των φύλλων, συμπτώματα τυπικά της καταπόνησης ξηρασίας.

Στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (5 % PEG), το σύνολο των *HraA* διαγονιδιακών σειρών παρουσίασαν βελτιωμένη ανάπτυξη συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Ωστόσο, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.6, τη 15η ημέρα τα φυτά της σειράς *HraA* T1- 5 εμφάνισαν καλύτερη απόκριση καθώς ο ρυθμός ανάπτυξης και η φυλλική επιφάνεια υπερτερούσαν συγκριτικά με τις υπόλοιπες διαγονιδιακές σειρές καθώς και τα φυτά αγρίου τύπου.



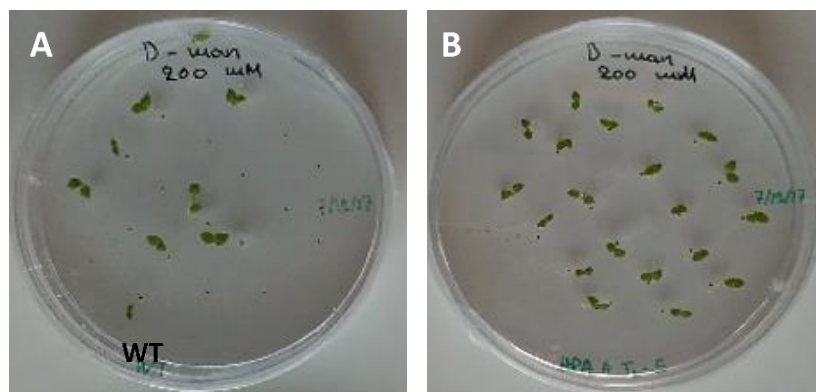
**Εικόνα 3.6** Συγκριτική ανάπτυξη των *HraA* διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας PEG 5 %, την 15η ημέρα παρατήρησης. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς *HraA* T1-5.

Την 20η ημέρα της παρατήρησης και στο επίπεδο καταπόνησης 100 mM D-Mannitol, ο φαινότυπος των φυτών δε διέφερε σημαντικά. Σε αυτό το επίπεδο επίσης, η σειρά *HraA* T1-5 εμφάνισε ευρωστία και υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης συγκριτικά με τις υπόλοιπες *hraA* διαγονιδιακές σειρές. Η εικόνα αυτή όμως ομοιάζει εκείνη των φυτών αγρίου τύπου, συνεπώς το συγκεκριμένο επίπεδο καταπόνησης δεν μπορεί να θεωρηθεί ως κατάλληλο για την αξιολόγηση των απόκρισης των διαγονιδιακών φυτών στην καταπόνηση της ξηρασίας (Εικόνα 3.7).



**Εικόνα 3.7** Συγκριτική ανάπτυξη των *HraA* διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (WT) στο επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 100 mM D-Mannitol, την 20η ημέρα παρατήρησης. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς *HraA* T1-5.

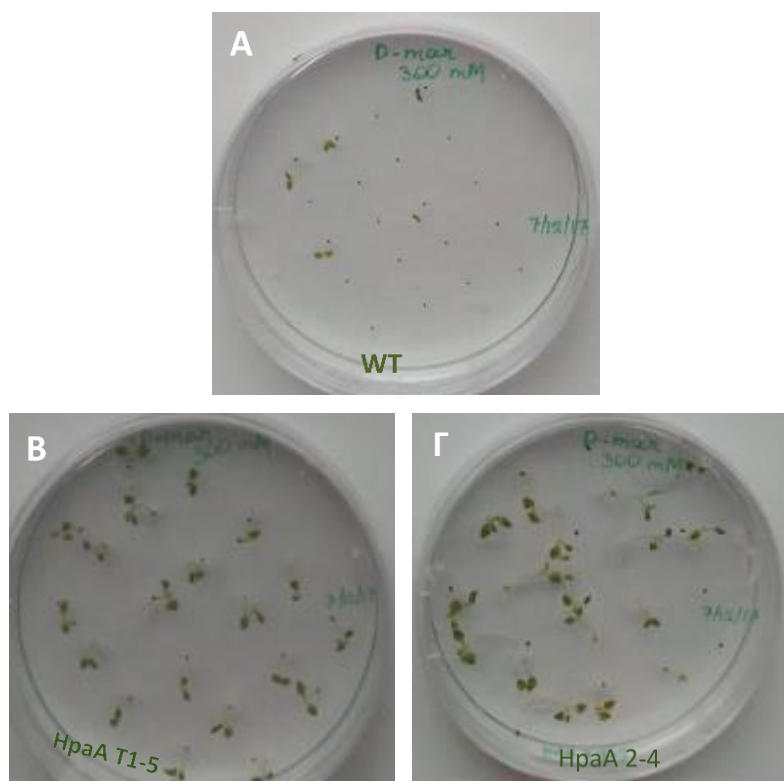
Παράλληλα στο επίπεδο καταπόνησης των 200 mM D-Mannitol, την 20η ημέρα παρατήρησης τα φυτά της σειράς *HraA* T1-5 δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από το επίπεδο καταπόνησης, παρουσιάζουν ικανοποιητική ευρωστία, αυξημένη φυλλική επιφάνεια και μηδενική συρρίκνωση. Αντίθετα, ο φαινότυπος των φυτών αγρίου τύπου φάνηκε να υστερεί, με τα φυτά να εμφανίζουν συμπτώματα κύρτωσης των φύλλων (Εικόνα 3.8).



**Εικόνα 3.8** Συγκριτική ανάπτυξη των *HraA* διαγονιδιακών σειρών και φυτών αγρίου τύπου (wt) στο μεσσαίο επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 200 mM D-Mannitol, την 20η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. Α wt φυτά. Β Φυτά της σειράς *HraA* T1-5.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, την 33η ημέρα του πειράματος, στο υψηλότερο επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας (300 mM D-Mannitol), τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν σαφώς

περιορισμένη ευρωστία καθώς και εκτεταμένα συμπτώματα μάρανσης και κύρτωσης των φύλλων. Αντίθετα, οι σειρές *HraA* T1-5 και *HraA* 2-4 ανταποκρίθηκαν καλύτερα στην καταπόνηση καθώς χαρακτηρίστηκαν από απουσία συμπτωμάτων μάρανσης και μείωσης της φυλλικής επιφάνειας (Εικόνα 3.9).



**Εικόνα 3.9** Συγκριτική ανάπτυξη των *HraA* διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT) στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας 300 mM D-Mannitol, την 33η ημέρα του πειράματος. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς *HraA* T1-5, Γ Φυτά της σειράς *HraA* 2-4.

### 3.2 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας

#### 3.2.1 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των *hraB* - διαγονιδιακών σειρών

Η βλάστηση των σπόρων επηρεάστηκε σημαντικά από τον παράγοντα καταπόνησης, ενώ η επίδραση αυτή ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις ανάλογη της έντασης της καταπόνησης (Πίνακας 3.3).

Συγκεκριμένα, απουσία καταπόνησης και απουσία αντιβιοτικού, η έναρξη βλάστησης έλαβε

χώρα από την πρώτη ημέρα παρατήρησης, με τις διαγονιδιακές σειρές *HraB* 1-4 και *HraB* 2-1 να εμφανίζουν ποσοστά βλάστησης 100 % και 70 % αντίστοιχα, ενώ και για τα φυτά αγρίου τύπου το ποσοστό βλάστησης άγγιξε το 85 %. Όσον αφορά τα ποσοστά βλάστησης απουσία καταπόνησης αλλά παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνη, για τη σειρά *HraB* 1-4 αυτά παρέμειναν υψηλά αγγίζοντας το 100 %, ενώ αντίθετα για τα φυτά αγρίου τύπου ήταν σημαντικά μειωμένα, της τάξεως του 22,5 %.

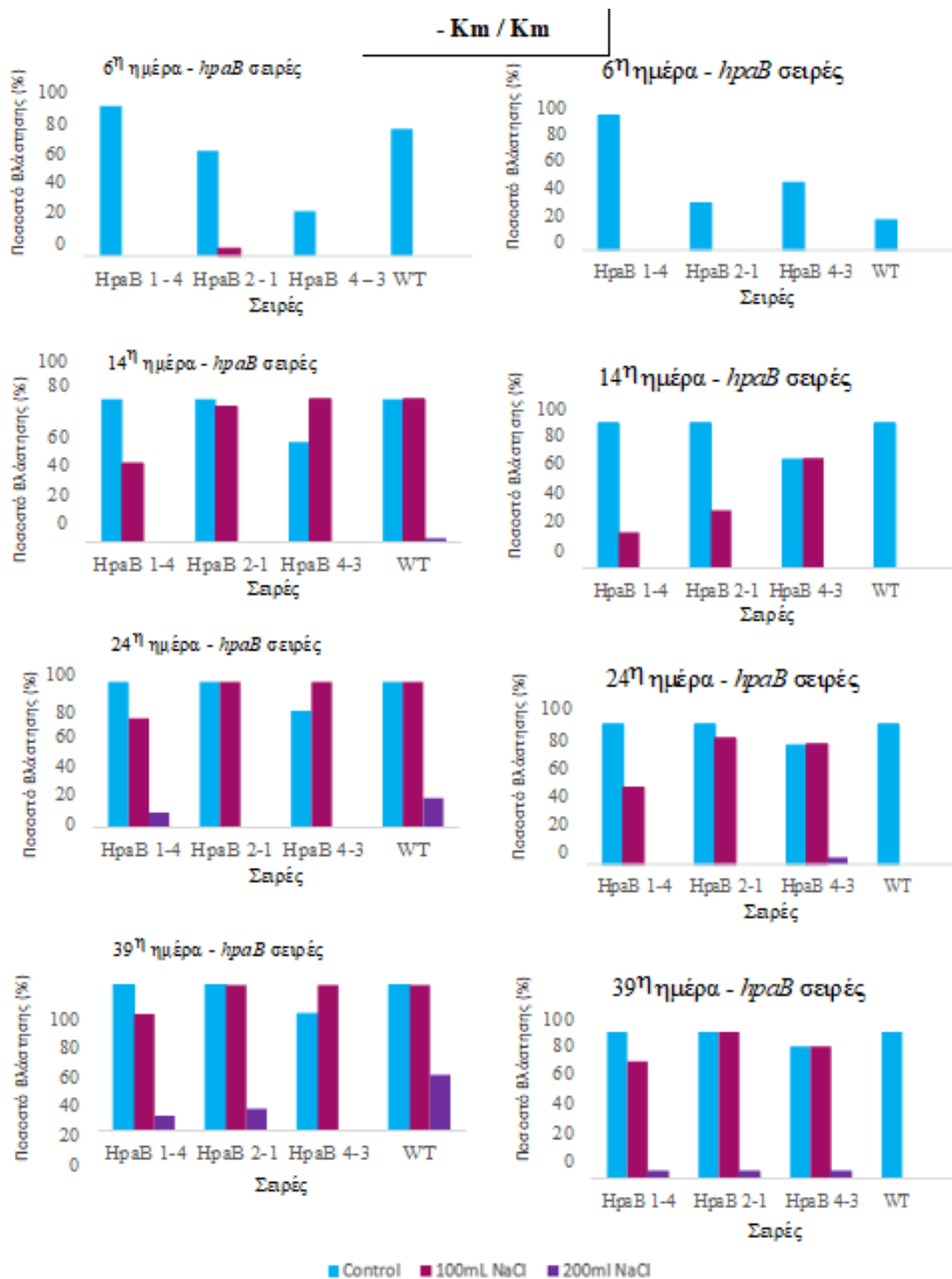
Αναφορικά με το επίπεδο καταπόνησης των 100 mM NaCl, παρατηρήθηκε καθυστέρηση στην έναρξη βλάστησης των σπόρων (Διάγραμμα 3.5). Απουσία αντιβιοτικού, τη 14η ημέρα παρατήρησης, τόσο οι διαγονιδιακές σειρές όσο και τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά βλάστησης. Ειδικότερα, η σειρά *HraB* 4-3, αλλά και τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν ποσοστό βλάστησης 100 %, με τις υπόλοιπες διαγονιδιακές σειρές να ακολουθούν. Παρουσία αντιβιοτικού την ίδια ημέρα παρατήρησης, στο επίπεδο καταπόνησης 100 mM NaCl, τα ποσοστά βλάστησης όλων των διαγονιδιακών σειρών καθώς και των φυτών αγρίου τύπου ήταν αρκετά μειωμένα (Πίνακας 3.3, Διάγραμμα 3.6).

Όσον αφορά το υψηλό επίπεδο καταπόνησης των 200mM NaCl, παρατηρήθηκε σημαντική καθυστέρηση στην έναρξη βλάστησης των σπόρων (Διαγράμματα 3.5, 3.6). Συγκεκριμένα απουσία του αντιβιοτικού, η βλάστηση τόσο των διαγονιδιακών σειρών όσο και των φυτών αγρίου τύπου έλαβε χώρα την 20η ημέρα παρατήρησης, ενώ παρουσία του αντιβιοτικού η βλάστηση και των δύο κατηγοριών φυτών είναι σημαντικά μειωμένη και δεν ξεπερνά το 5 %.

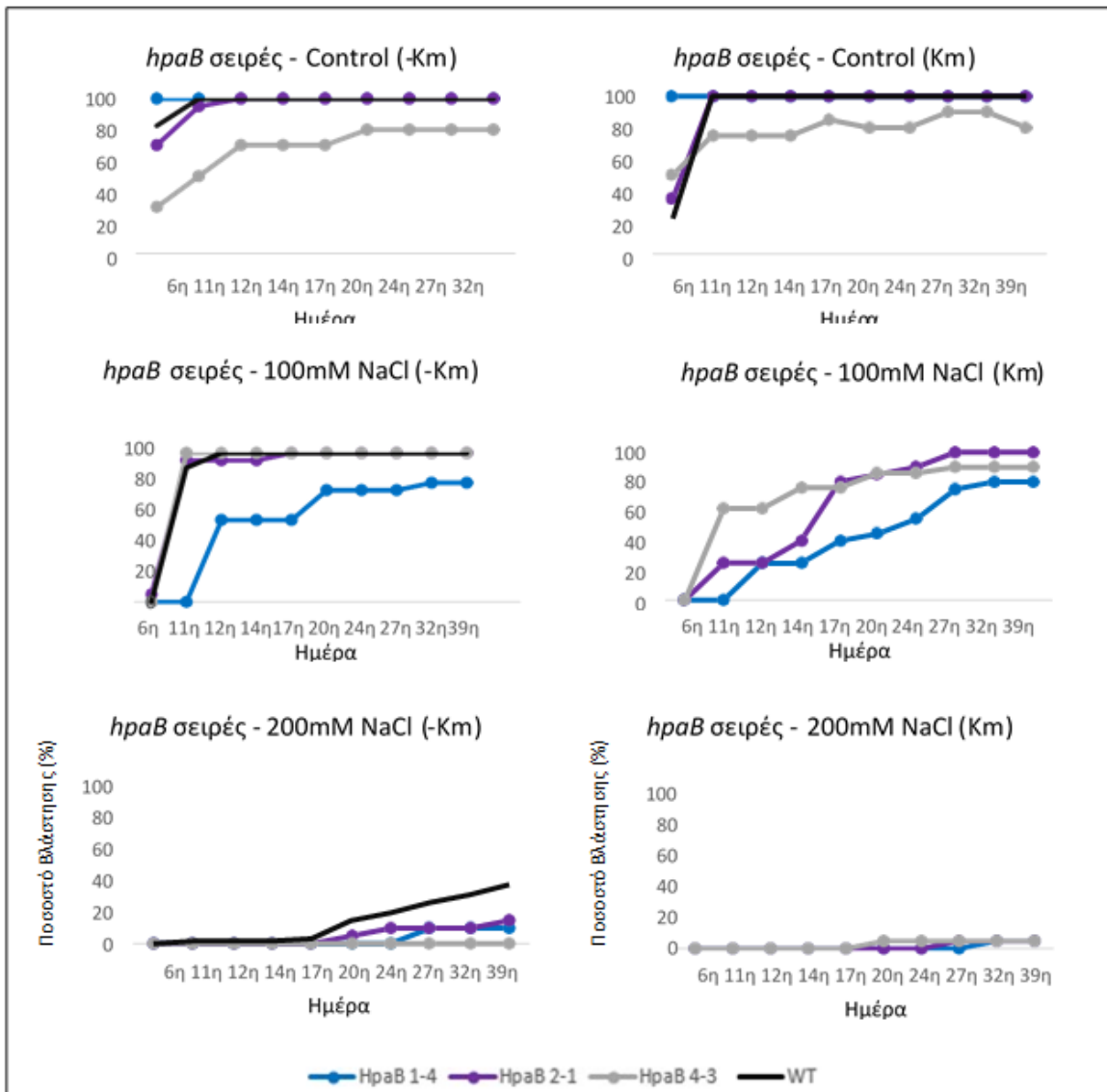
**Πίνακας 3.3** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των *hraB* διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου, ανά επίπεδο καταπόνησης αλατότητας, παρουσία ή μη καναμυκίνης, την 6η , 14η , 24η και 39η ημέρα.

Ποσοστό Βλάστησης (%)							
Ημέρα Παρατήρησης/ Ημερομηνία	Σειρά	Απουσία Καναμυκίνης			Παρουσία Καναμυκίνης		
		Control	100mL NaCl	200ml NaCl	Control	100mL NaCl	200ml NaCl
6 <sup>η</sup> ημέρα 2/11/2017	HpaB 1-4	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	HpaB 2-1	70.0	5.0	0.0	35.0	0.0	0.0
	HpaB 4-3	30.0	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0
	<b>WT</b>	<b>85.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>22.5</b>		
14 <sup>η</sup> ημέρα 10/11/2017	HpaB 1-4	100.0	55.0	0.0	100.0	25.0	0.0
	HpaB 2-1	100.0	95.0	0.0	100.0	40.0	0.0
	HpaB 4-3	70.0	100.0	0.0	75.0	76.0	0.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>2.5</b>	<b>100.0</b>		
24 <sup>η</sup> ημέρα 20/11/2017	HpaB 1-4	100.0	75.0	10.0	100.0	55.0	0.0
	HpaB 2-1	100.0	100.0	0.0	100.0	90.0	0.0
	HpaB 4-3	80.0	100.0	0.0	85.5	86.0	5.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>20.0</b>	<b>100.0</b>		
39 <sup>η</sup> ημέρα 5/12/2017	HpaB 1-4	100.0	80.0	10.0	100.0	80.0	5.0
	HpaB 2-1	100.0	100.0	15.0	100.0	100.0	5.0
	HpaB 4-3	80.0	100.0	0.0	90.0	90.0	5.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>38.3</b>	<b>100.0</b>		





**Διάγραμμα 3.5** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων των *HraB* διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση σε τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (Control, 100 mM, 200 mM NaCl), την 6η, 14η, 24η και 39η ημέρα, παρουσία ή μη του αντιβιοτικού.

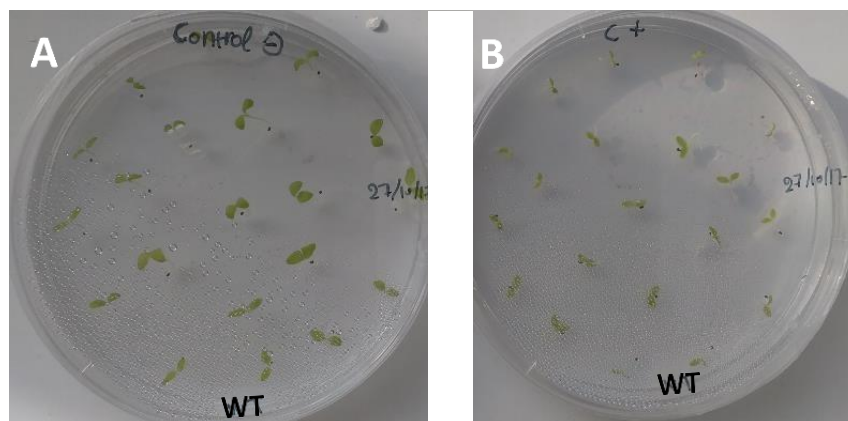


**Διάγραμμα 3.6** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης (%) των σπόρων των *HraB* διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση σε τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (Control, 100 mM, 200 mM NaCl), παρουσία ή μη του αντιβιοτικού.

Πέραν του ποσοστού βλάστησης των σπόρων και του ρυθμού ανάπτυξης των φυτών, η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας βασίστηκε και στο φαινότυπο των φυτών, που περιλαμβάνει την ανάπτυξη συμπτωμάτων εξαιτίας της επικρατούσας καταπόνησης.

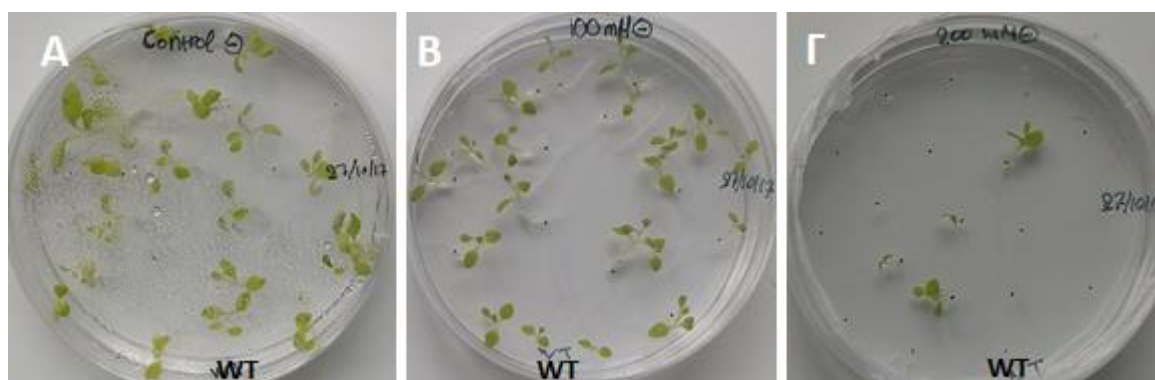
Στην Εικόνα 3.10 απεικονίζεται η ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνη συγκριτικά με την ανάπτυξη των φυτών απουσία του αντιβιοτικού. Και στις δύο περιπτώσεις, τα φυτά αναπτύσσονται απουσία του παράγοντα καταπόνησης.

Συγκεκριμένα την 11η ημέρα του πειράματος, είναι εμφανής η διαφορά στην ανάπτυξη των φυτών μεταξύ των μεταχειρίσεων, με τα φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού να εμφανίζουν μειωμένη φυλλική επιφάνεια, κύρτωση των φύλλων, καθώς επίσης και συμπτώματα χλώρωσης.



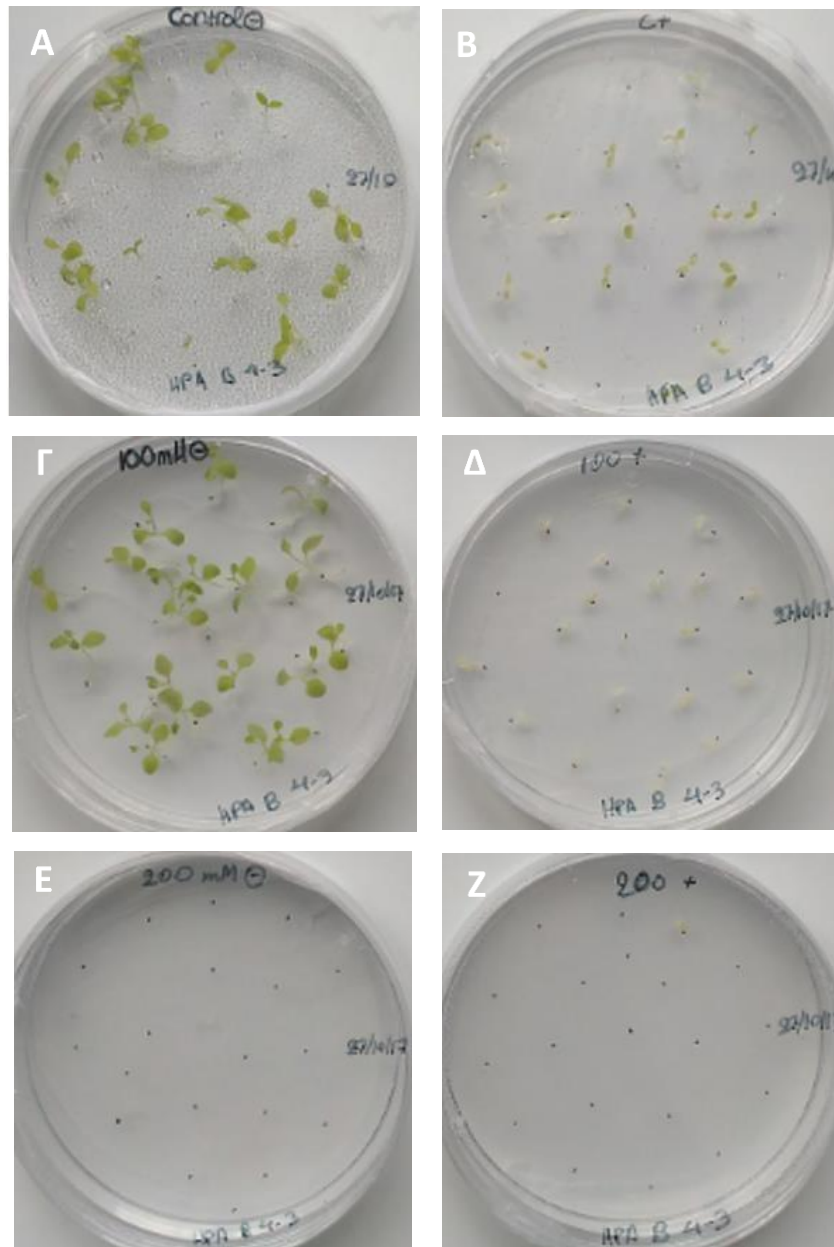
**Εικόνα 3.10** Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (WT) στο επίπεδο καταπόνησης αλατότητας Control, την 11η ημέρα του πειράματος. A WT φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία αντιβιοτικού. B WT φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία αντιβιοτικού.

Στην Εικόνα 3.11 απεικονίζεται η ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου στα τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας. Συγκεκριμένα την 24η ημέρα, η αύξηση του επιπέδου καταπόνησης οδήγησε σε σημαντική μείωση τόσο στη βλάστηση όσο και στο ρυθμό ανάπτυξης των φυτών.



**Εικόνα 3.11** Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (WT) απουσία του αντιβιοτικού, την 24η ημέρα του πειράματος, στα τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας. A Control. B 100 mM NaCl. Γ 200 mM NaCl.

Έτσι, στους μάρτυρες απουσία αντιβιοτικού, τόσο οι διαγονιδιακές σειρές *HraB* όσο και τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν ταχύ ρυθμό ανάπτυξης των φυταρίων και υγιή εμφάνιση της φυλλικής στοιβάδας τους (Εικόνα 3.11 A, 3.12 A), η αύξηση του επιπέδου καταπόνησης οδήγησε σε ανάσχεση της ανάπτυξης και μείωση της ευρωστίας. Παρουσία αντιβιοτικού, παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού αύξησης σε όλες τις κατηγορίες φυτών.



**Εικόνα 3.12** Συγκριτική ανάπτυξη της *HraB* 4-3 διαγονιδιακής σειράς, στα τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (Control, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl), που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο παρουσία ή μη αντιβιοτικού (Km), την 24η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. A *HraB* 4-3, Control, απουσία Km. B *HraB* 4-3, Control, παρουσία Km. Γ *HraB*

4-3, 100 mM NaCl, απουσία Km. Δ *HraB* 4-3, 100 mM NaCl, παρουσία Km. Ε *HraB* 4-3 φυτά, 200 mM NaCl, απουσία Km. Ζ *HraB* 4-3, 200 mM NaCl, παρουσία Km.

Στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (100 mM NaCl) απουσία αντιβιοτικού, όλες οι διαγονιδιακές σειρές *HraB* παρουσίασαν αυξημένη ανάπτυξη, ενδεικτική της αντοχής στο συγκεκριμένο επίπεδο στρες. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.12 Γ, την 24η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων στα τριβλία, η σειρά *HraB* 4-3 φαίνεται να παρουσιάζει βελτιωμένη επίδοση καθώς ο ρυθμός ανάπτυξής της υπερέχει από αυτόν του αγρίου τύπου (Εικόνα 3.11 Β, 3.12 Γ). Από την άλλη πλευρά, παρουσία καναμυκίνης, η ανάπτυξη της σειράς *HraB* 4-3 είναι εξαιρετικά περιορισμένη, με το φύλλωμά της να στερείται ολοκληρωτικά χλωροφύλλης (Εικόνα 3.12 Δ).

Στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl), όλες οι διαγονιδιακές σειρές *HraB*, παρουσία ή απουσία καναμυκίνης, παρουσίασαν αμελητέα ανάπτυξη ή ακόμη και πλήρη αναστολή ανάπτυξης (Εικόνα 3.12 Ε, Ζ).

### 3.2.2 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των *hraA* - διαγονιδιακών σειρών

Υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας, η βλάστηση των σπόρων επηρεάστηκε σημαντικά και μάλιστα, ως επί των πλείστων, η επίδραση της καταπόνησης υπήρξε ανάλογη της έντασής της (Πίνακας 3.4).

Αναλυτικότερα, όσον αφορά τους μάρτυρες, από την 1η μέρα παρατηρήσεων, παρουσίασαν αυξημένο δυναμικό βλάστησης, που υπήρξε έκδηλο και στις δύο πειραματικές εκδοχές, απουσία και παρουσία καναμυκίνης. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα φυτά αγρίου τύπου, όπου παρουσία αντιβιοτικού, το ποσοστό βλάστησης δεν ξεπέρασε το 22,5 %. Η παρουσία αντιβιοτικού στους μάρτυρες φάνηκε να μην επηρεάζει τη βλάστηση των σπόρων, καθώς τόσο οι διαγονιδιακές όσο και τα φυτά αγρίου τύπου, δε διέφεραν σημαντικά στις δύο μεταχειρίσεις (απουσία/παρουσία Km). Με το πέρας του πειράματος, η σειρά *HraA* 2-4 δεν κατάφερε να επιτύχει 100 % ποσοστό βλάστησης (Διάγραμμα 3.7).

Αναφορικά με το χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (100 mM NaCl), παρατηρήθηκε καθυστέρηση στο ρυθμό βλάστησης των σπόρων, αφού κατά την πρώτη παρατήρηση το ποσοστό βλάστησης κυμάνθηκε στο 0% για το σύνολο των σειρών (Διάγραμμα 3.7).

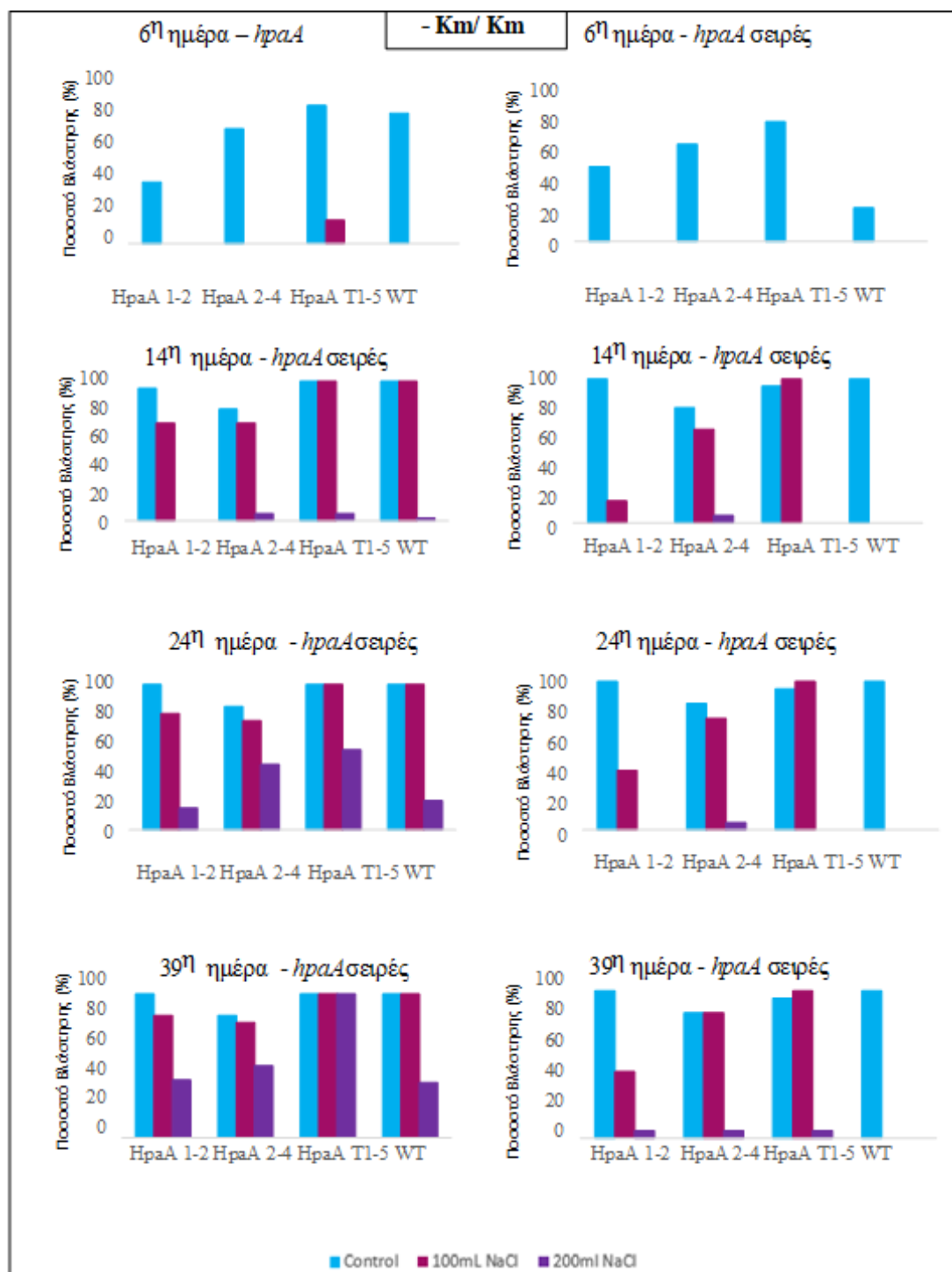
Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου (14η ημέρα), απουσία αντιβιοτικού, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού βλάστησης (Πίνακας 3.4). Στη φάση αυτή, ήταν εμφανής η υπεροχή της σειράς *HraA* T1-5 καθώς και του αγρίου τύπου που εμφάνισαν δυναμικό βλάστησης περί το 100 % (Διάγραμμα 3.8). Παρουσία αντιβιοτικού, σημειώθηκε μειωμένος ρυθμός βλάστησης των σπόρων στο σύνολο σχεδόν των σειρών, με εξαίρεση τη σειρά *HraA* T1-5, η οποία πέτυχε ποσοστό βλάστησης 100 % ήδη από την 11η ημέρα (Διάγραμμα 3.8).

**Πίνακας 3.4** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων τριών διαγονιδιακών σειρών *hraA* και σπόρων αγρίου τύπου, ανά επίπεδο καταπόνησης αλατότητας, παρουσία ή απουσία αντιβιοτικού, την 6η , 14η , 24η και 39η ημέρα.

		Ποσοστό Βλάστησης (%)					
Ημερομηνία	Σειρά	No Canamycin			With Canamycin		
		Control	100mL NaCl	200ml NaCl	Control	100mL NaCl	200ml NaCl
2 Νοε 2017	<i>HraA</i> 1-2	40.0	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0
	<i>HraA</i> 2-4	75.0	0.0	0.0	65.0	0.0	0.0
	<i>HraA</i> T1-5	90.0	15.0	0.0	80.0	0.0	0.0
	<b>WT</b>	<b>85.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>22.5</b>		
10 Νοε 2017	<i>HraA</i> 1-2	95.0	70.0	0.0	100.0	15.0	0.0
	<i>HraA</i> 2-4	80.0	70.0	5.0	80.0	65.0	5.0
	<i>HraA</i> T1-5	100.0	100.0	5.0	95.0	100.0	0.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>2.5</b>	<b>100.0</b>		
20 Νοε 2017	<i>HraA</i> 1-2	100.0	80.0	15.0	100.0	40.0	0.0
	<i>HraA</i> 2-4	85.0	75.0	45.0	85.0	75.0	5.0
	<i>HraA</i> T1-5	100.0	100.0	55.0	95.0	100.0	0.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>20.0</b>	<b>100.0</b>		
5 Δεκ 2017	<i>HraA</i> 1-2	100.0	85.0	40.0	100.0	45.0	5.0
	<i>HraA</i> 2-4	85.0	80.0	50.0	85.0	85.0	5.0
	<i>HraA</i> T1-5	100.0	100.0	100.0	95.0	100.0	5.0
	<b>WT</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>38.3</b>	<b>100.0</b>		

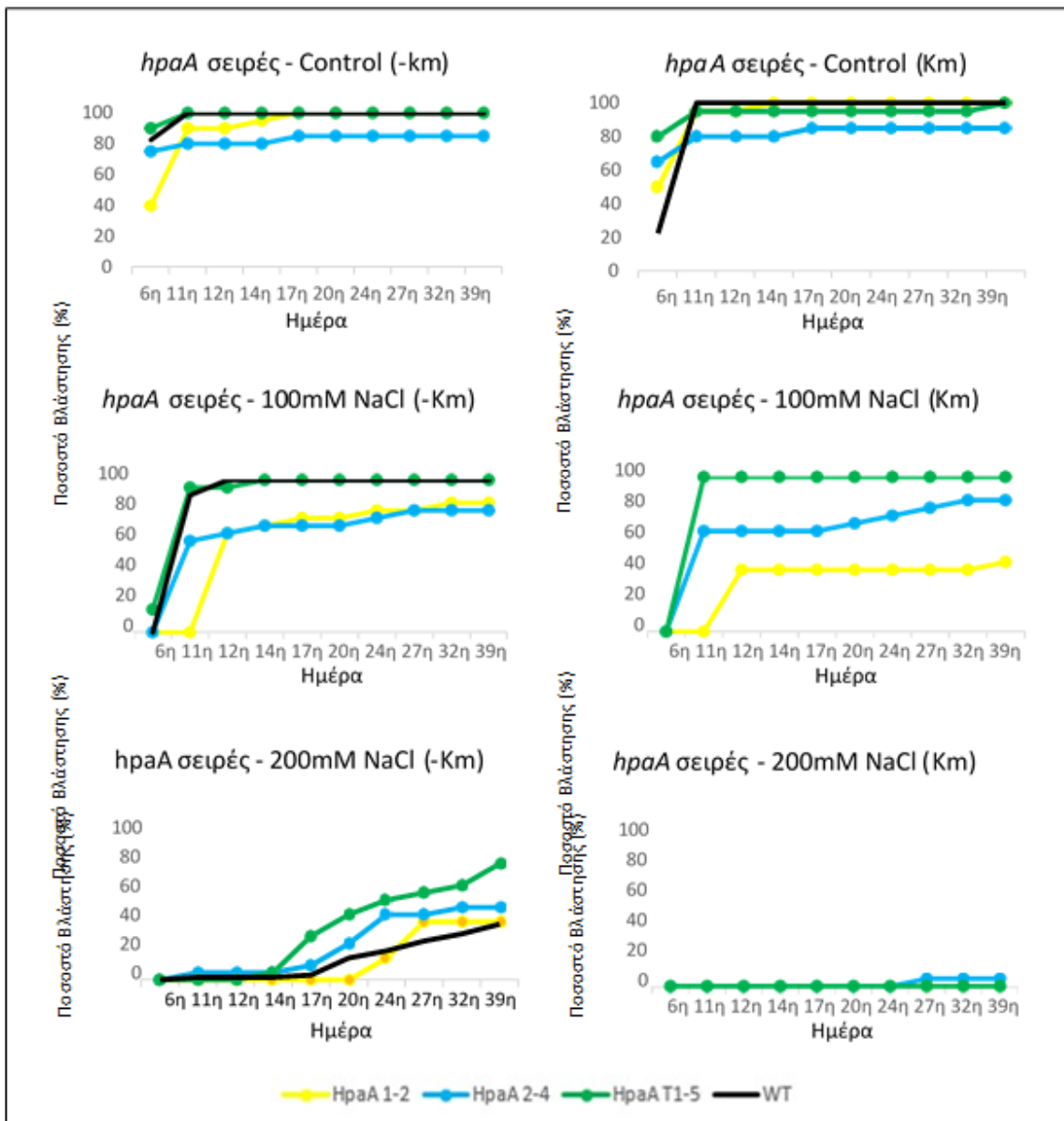
Στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl), το σύνολο των σειρών εμφάνισε μείωση και σαφή καθυστέρηση στη βλάστηση των σπόρων (Διάγραμμα 3.7). Αναλυτικότερα, απουσία αντιβιοτικού, η έναρξη της βλάστησης χρονολογείται την 24η ημέρα, ενώ αντίθετα

η παρουσία αντιβιοτικού η έναρξη της βλάστησης ήταν σαφώς καθυστερημένη και κυμάνθηκε σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα (> 5 %). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι απουσία αντιβιοτικού, το σύνολο των *HraA*-σειρών εμφάνισε υψηλότερο δυναμικό βλάστησης συγκριτικά με του αγρίου τύπου (38,3%) (Διάγραμμα 3.8), ενώ η διαγονιδιακή σειρά *HraA* T1-5 πέτυχε τελική βλαστικότητα 100 % (Πίνακας 3.4).



**Διάγραμμα 3.7** Ποσοστό βλάστησης (%) σπόρων τριών διαγονιδιακών σειρών που φέρουν το γονίδιο *HraA* και σπόροι αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση σε τρία επίπεδα καταπόνησης

αλατότητας ( C, 100 mM, 200 mM NaCl ), την 6η , 14η , 24η και 39η ημέρα, παρουσία ή απουσία αντιβιοτικού.

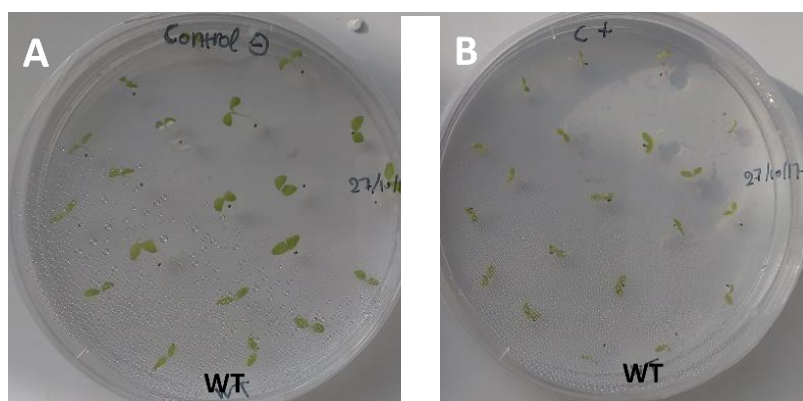


**Διάγραμμα 3.8** Χρονική εξέλιξη του ποσοστού βλάστησης (%) σπόρων τριών διαγονιδιακών σειρών που φέρουν το γονίδιο *HraA* και σπόρων αγρίου τύπου (WT), ως απόκριση σε τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (C, 100 mM, 200 mM NaCl ), παρουσία ή απουσία αντιβιοτικού.

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας, βασίστηκε περαιτέρω σε παρατηρήσεις που αφορούν το ρυθμό ανάπτυξης καθώς και στη γενικότερη συμπτωματολογία των σπορόφυτων.

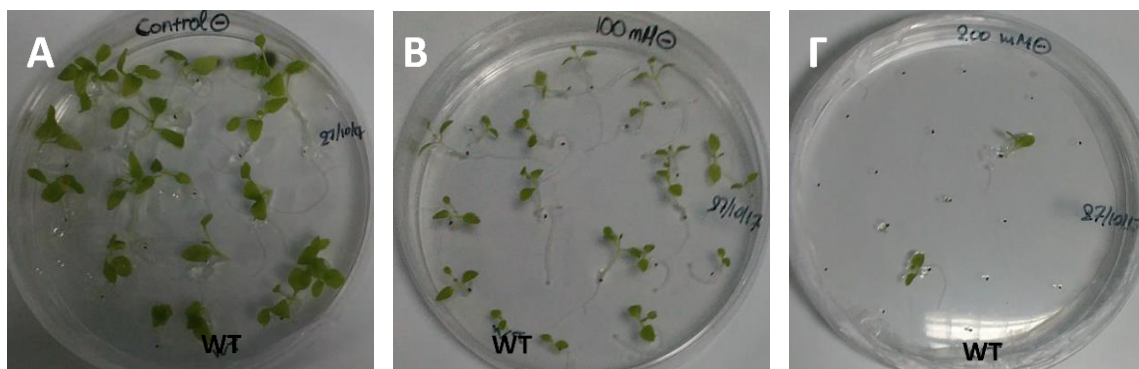


Στην Εικόνα 3.13 απεικονίζεται συγκριτικά η ανάπτυξη των μαρτύρων αγρίου τύπου που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία και απουσία αντιβιοτικού (Km). Έντεκα ημέρες μετά την τοποθέτηση των σπόρων στα τριβλία, είναι ευδιάκριτη η διαφορά στην ανάπτυξη των σπορόφυτων στις δύο μεταχειρίσεις, με τα φυτά που αναπτύσσονται απουσία αντιβιοτικού να εμφανίζουν σαφώς μεγαλύτερη ανάπτυξη έναντι αυτών που αναπτύσσονται παρουσία αντιβιοτικού. Διαφορές εντοπίζονται επιπρόσθετα στη φυλλική επιφάνεια των σπορόφυτων, με τα τελευταία να χαρακτηρίζονται από ελαφρώς μειωμένη χλωροφύλλη.



**Εικόνα 3.13** Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών-μαρτύρων αγρίου τύπου (wt), την 11η ημέρα από την τοποθέτηση των σπόρων. A wt φυτά σε θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικό (Km). B wt φυτά σε θρεπτικό μέσο αντιβιοτικό (Km).

Στην Εικόνα 3.14 απεικονίζεται η σύγκριση της ανάπτυξης φυτών αγρίου τύπου τα οποία έχουν υποβληθεί σε τρία διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης αλατότητας, Control, 100 και 200 mM NaCl. Δεκαέξι ημέρες από την έναρξη της καταπόνησης, είναι εμφανής η διαφορά μεταξύ των τριών μεταχειρίσεων, με τους μάρτυρες να εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και ευρωστία. Στο μεσαίο επίπεδο στρες (100 mM), παρά την υψηλή βλαστικότητα τα σπορόφυτα είναι μικρότερης διαμέτρου, ενώ στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl), ο άγριος τύπος αδυνατεί να βλαστήσει, αλλά τα ελάχιστα σπορόφυτα παρουσιάζουν ικανοποιητική ανάπτυξη.



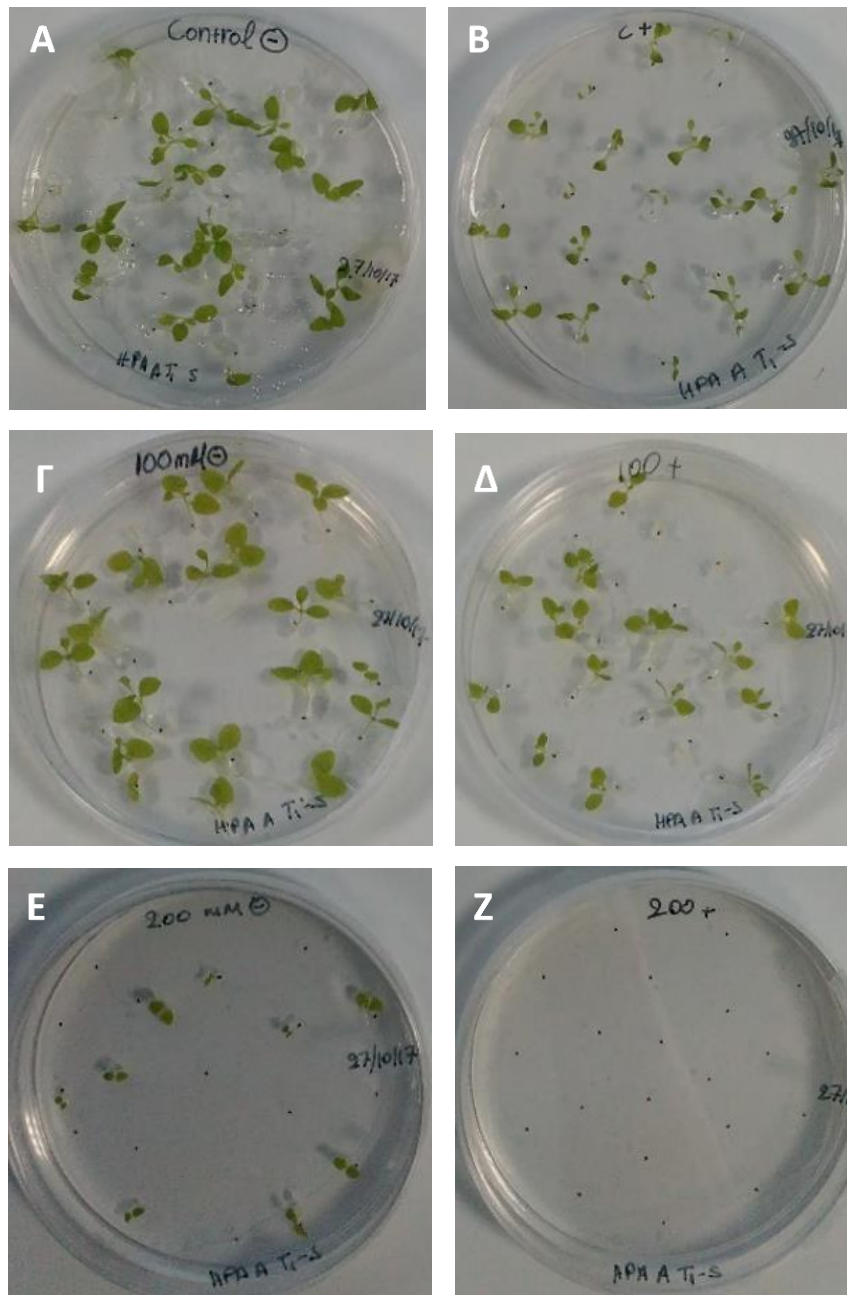
**Εικόνα 3.14** Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (wt) σε θρεπτικό μέσο απουσία km, την 16η ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης, στα τρία επίπεδα στρες αλατοτητας. A Control. B 100 mM NaCl. Γ 200 mM NaCl.

Έτσι, ενώ στους μάρτυρες απουσία Km, τόσο οι διαγονιδιακές σειρές *HraA* όσο και τα φυτά αγρίου τύπου, παρουσιάζουν γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης των φυταρίων και υγιής εμφάνιση της φυλλικής στοιβάδας τους (Εικόνα 3.14 A, 3.15 A), όσο αυξάνεται το επίπεδο της καταπόνησης, τόσο ανακόπτεται ο ρυθμός ανάπτυξης και περιορίζεται η ευρωστία αυτών. Έπειτα, με την προσθήκη αντιβιοτικού, οι μάρτυρες των *HraA* σειρών εμφανίζουν βελτιωμένη ανάπτυξη και ευρωστία συγκριτικά με τους μάρτυρες αγρίου τύπου (Εικόνα 3.15).

Στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (100 mM NaCl), απουσία km, όλες οι διαγονιδιακές σειρές *HraA* παρουσιάζουν έντονο ρυθμό ανάπτυξης, σε σημείο που η έκταση της φυλλικής επιφάνειας ξεπερνάει αυτήν των μαρτύρων, υποδεικνύοντας αντοχή των *HraA* σειρών στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας στο επίπεδο 100 mM NaCl. Στο επίπεδο αυτό, την καλύτερη επίδοση επέδειξε η σειρά *HraA* T1-5, 24 ημέρες μετά την έναρξη της καταπόνησης (Εικόνα 3.15 Γ). Η συγκεκριμένη σειρά φάνηκε να ανταπεξέρχεται επιτυχώς στην επίδραση του περιοριστικού παράγοντα, με το ρυθμό ανάπτυξής της να υπερέχει κατά πολύ από αυτόν του αγρίου τύπου (Εικόνα 3.14 B, 3.15 Γ). Αξιοσημείωτη είναι η επίδοση της σειράς *HraA* T1-5 στο επίπεδο 100 mM NaCl, παρουσία αντιβιοτικού, όπου εμφανίζει υψηλό ρυθμό ανάπτυξης ο οποίος υπερέχει αυτόν του μάρτυρα (Εικόνα 3.15 Δ).

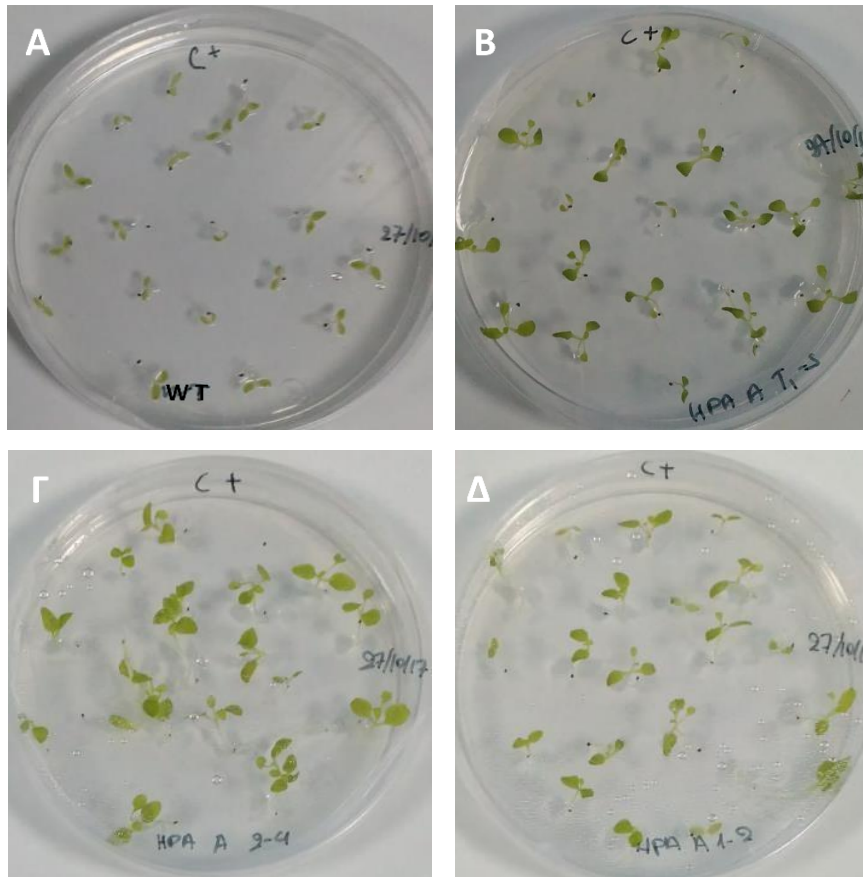
Στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl), όλες οι διαγονιδιακές σειρές *HraA*, παρουσία Km, παρουσιάζουν αμελητέα ή ακόμη και πλήρη αναστολή ανάπτυξης (Εικόνα 3.15 Z). Απουσία Km, η σειρά *HraA* T1-5 εμφανίζει σαφή υπεροχή συγκριτικά τόσο με τις υπόλοιπες *HraA* σειρές όσο και με τον άγριο τύπο, υπεροχή η οποία εκδηλώθηκε από

αυξημένο δυναμικό βλάστησης και ανάπτυξης των σπορόφυτων.



**Εικόνα 3.15** Συγκριτική ανάπτυξη της *HraA* T1-5 διαγονιδιακής σειράς, στα τρία επίπεδα καταπόνησης αλατότητας (Control, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl), που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο παρουσία ή μη Καναμυκίνης (Km), την 20η ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α *HraA* T1-5, Control, απουσία Km. Β *HraA* T1-5, Control, παρουσία Km. Γ *HraA* T1-5, 100 mM NaCl, απουσία Km. Δ *HraA* T1-5, 100 mM NaCl, παρουσία Km. Ε *HraA* T1-5, 200 mM NaCl, απουσία Km. Ζ *HraA* T1-5, 200 mM NaCl, παρουσία Km.

Στην Εικόνα 3.16, παρουσιάζονται τα φυτά-μάρτυρες των *HraA* σειρών καθώς και του αγρίου τύπου, παρουσία Km. Είναι σαφές ότι η παρουσία του γονιδίου ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη οδηγεί σε αυξημένο δυναμικό ανάπτυξης συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου.



**Εικόνα 3.16** Συγκριτική ανάπτυξη των διαγονιδιακών σειρών και του αγρίου τύπου παρουσία καναμυκίνης. Α wt φυτά. Β Φυτά της σειράς *HraA* T1-5. Γ Φυτά της σειράς *HraA* 2-4. Δ Φυτά της σειράς *HraA* 1-2.

### 3.3 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας

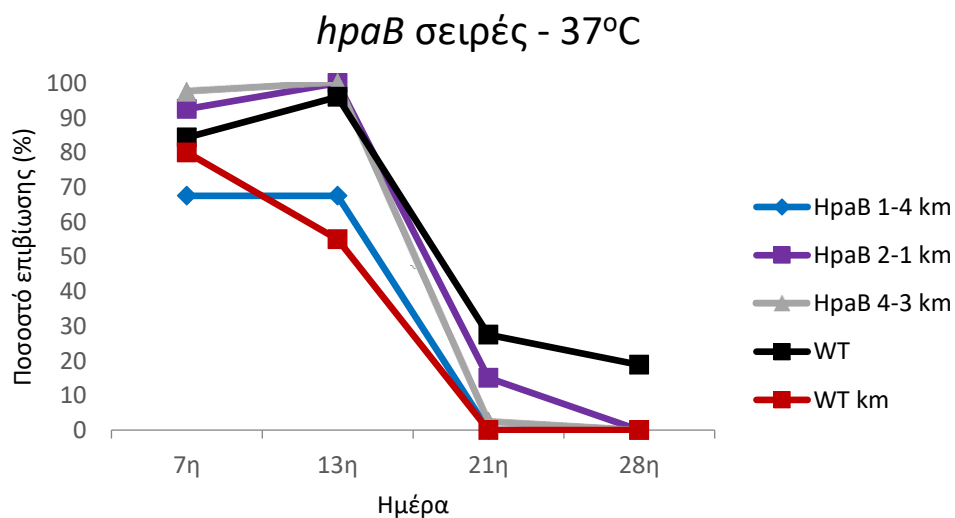
#### 3.3.1 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των *hraB* - διαγονιδιακών σειρών

Από την έναρξη της καταπόνησης, παρατηρήθηκε αυξημένος ρυθμός βλάστησης στο σύνολο των σειρών αλλά και του αγρίου τύπου. Ειδικότερα, την 13η ημέρα επετεύχθη το μέγιστο επίπεδο βλάστησης για όλες τις σειρές, με τις *HraB* 2-1 και *HraB* 4-3 να εμφανίζουν ποσοστά βλάστησης 100 %, ενώ και το αντίστοιχο ποσοστό του αγρίου τύπου ξεπέρασε το 95 % (Διάγραμμα 3.9, Πίνακας 3.5). Αντίθετα, παρουσία Km, τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν, όπως αναμενόταν χαμηλά ποσοστά βλάστησης, ενώ με την πάροδο του χρόνου

τα σπορόφυτα αγρίου τύπου εμφάνισαν εκτεταμένα συμπτώματα μάρανσης.

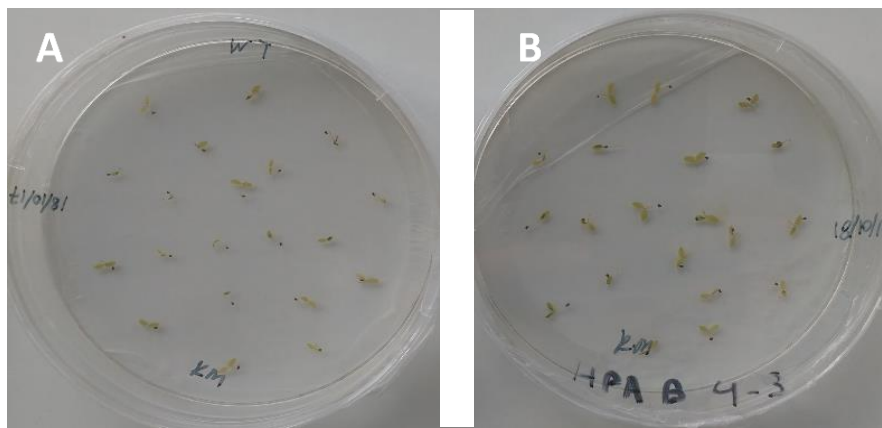
**Πίνακας 3.5** Ποσοστό βλάστησης (%) των *HraB* διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου παρουσία ή απουσία Km, υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης (37 °C), την 7η, 13η, 21η και 28η ημέρα.

Ημέρα παρατήρησης/ Ημερομηνία	Σειρά	Ποσοστό Βλάστησης (%)
37°C		
7 <sup>η</sup> ημέρα 25/10/2017	<i>HraB</i> 1-4	67.5
	<i>HraB</i> 2-1	92.5
	<i>HraB</i> 4-3	97.5
	<b>WT</b>	<b>84.3</b>
	<b>WT Km</b>	<b>80.0</b>
13 <sup>η</sup> ημέρα 31/10/2017	<i>HraB</i> 1-4	67.5
	<i>HraB</i> 2-1	100.0
	<i>HraB</i> 4-3	100.0
	<b>WT</b>	<b>96.0</b>
	<b>WT Km</b>	<b>55.0</b>
21 <sup>η</sup> ημέρα 8/11/2017	<i>HraB</i> 1-4	0.0
	<i>HraB</i> 2-1	15.0
	<i>HraB</i> 4-3	2.5
	<b>WT</b>	<b>27.5</b>
	<b>WT Km</b>	<b>0.0</b>
28 <sup>η</sup> ημέρα 13/11/2017	<i>HraB</i> 1-4	0.0
	<i>HraB</i> 2-1	0.0
	<i>HraB</i> 4-3	0.0
	<b>WT</b>	<b>18.8</b>
	<b>WT Km</b>	<b>0.0</b>



**Διάγραμμα 3.9** Χρονική εξέλιξη ποσοστού βλάστησης (%) των *HraB* διαγονιδιακών σειρών, και των φυτών αγρίου τύπου παρουσία ή απουσία Km, ως απόκριση στη θερμική καταπόνηση των 37 °C, την 7η, 13η, 21η και 28η ημέρα παρατήρησης.

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας βασίστηκε περαιτέρω στο ρυθμό ανάπτυξης καθώς και στο φαινότυπο των φυτών. Στην Εικόνα 3.17, παρουσιάζεται η ανάπτυξη της διαγονιδιακής σειράς *HraB* 4-3 σε σύγκριση με την ανάπτυξη του αγρίου τύπου, κατά τη θερμική καταπόνηση παρουσία του αντιβιοτικού. Πιο συγκεκριμένα, την 20η ημέρα του πειράματος, η σειρά *HraB* 4-3 παρουσίασε εμφανή αδυναμία ανάπτυξης καθώς και χλώρωση των φύλλων. Στην περίπτωση των φυτών αγρίου τύπου, αναστολή ανάπτυξης των φυτών, μειωμένη φυλλική επιφάνεια και εκτεταμένη χλώρωση των φύλλων.



**Εικόνα 3.17** Συγκριτική ανάπτυξη της διαγονιδιακής σειράς *HraB* 4-3 και του αγρίου τύπου στη θερμική καταπόνηση των 37°C (20η ημέρα) παρουσία Km. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς *HraB* 4-3.

### 3.3.2 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των *hraA* - διαγονιδιακών σειρών

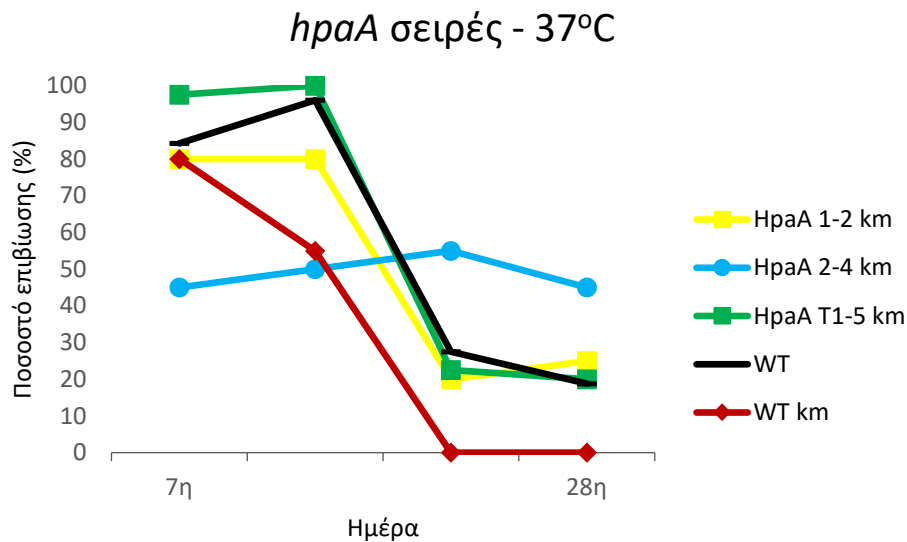
Από τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της ανθεκτικότητας, υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης, προκύπτει ότι η βλάστηση των σπόρων επηρεάστηκε σημαντικά από την καταπόνηση (Πίνακας 3.6).

Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε αυξημένος ρυθμός βλάστησης που την 13η ημέρα της καταπόνησης έφτασε στο μέγιστο επίπεδο και για τις δύο κατηγορίες φυτών, με τη σειρά *HraA* T1-5 να σημειώνει ποσοστό βλάστησης 100 % και τα φυτά αγρίου τύπου 96 %.

Αντίθετα παρουσία Km, τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν μειωμένο ποσοστό βλάστησης και συμπτώματα μάρανσης των φύλλων. Με την πάροδο του χρόνου, παρατηρήθηκε νέκρωση των φυτών τόσο των διαγονιδιακών σειρών όσο και του αγρίου τύπου (Διάγραμμα 3.10), ενώ με το πέρας του πειράματος (28η ημέρα παρατήρησης) η διαγονιδιακή σειρά στην οποία δεν έχει νεκρωθεί το σύνολο των φυτών είναι η *HpaA* 2-4 (ποσοστό βλάστησης 45%), με τις υπόλοιπες να ακολουθούν (Πίνακας 3.6).

**Πίνακας 3.6** Ποσοστό βλάστησης (%) των *HpaA* διαγονιδιακών σειρών που και των φυτών αγρίου τύπου παρουσία ή μη Καναμυκίνης, ως απόκριση στη θερμική καταπόνηση (37 °C), την 7η , 13η , 21η και 28η ημέρα.

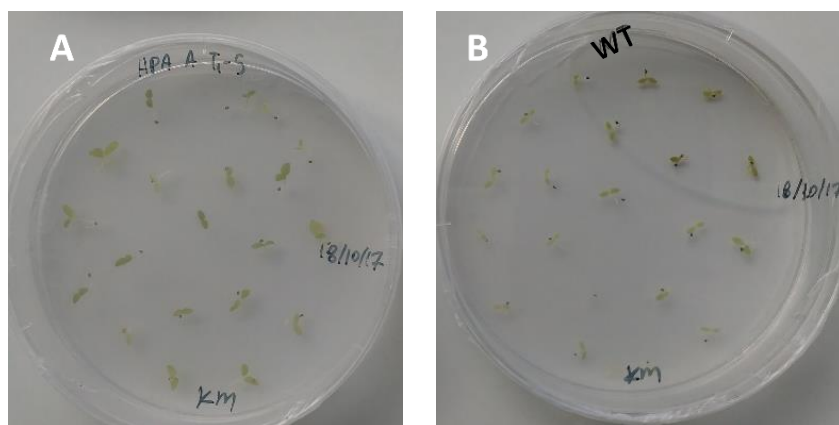
Ημέρα Παρατήρησης/Ημερομηνία	Σειρά	Ποσοστό Βλάστησης (%)
37°C		
7 <sup>η</sup> ημέρα 25/10/2017	<i>HpaA</i> 1-2	80.0
	<i>HpaA</i> 2-4	45.0
	<i>HpaA</i> T <sub>1</sub> -5	97.5
	<b>WT</b>	<b>84.3</b>
	<b>WT Km</b>	<b>80.0</b>
13 <sup>η</sup> ημέρα 31/10/2017	<i>HpaA</i> 1-2	80.0
	<i>HpaA</i> 2-4	50.0
	<i>HpaA</i> T <sub>1</sub> -5	100.0
	<b>WT</b>	<b>96.0</b>
	<b>WT Km</b>	<b>55.0</b>
21 <sup>η</sup> ημέρα 8/11/2017	<i>HpaA</i> 1-2	20.0
	<i>HpaA</i> 2-4	55.0
	<i>HpaA</i> T <sub>1</sub> -5	22.5
	<b>WT</b>	<b>27.5</b>
	<b>WT Km</b>	<b>0.0</b>
28 <sup>η</sup> ημέρα 13/11/2017	<i>HpaA</i> 1-2	25.0
	<i>HpaA</i> 2-4	45.0
	<i>HpaA</i> T <sub>1</sub> -5	20.0
	<b>WT</b>	<b>18.8</b>
	<b>WT Km</b>	<b>0.0</b>



**Διάγραμμα 3.10** Χρονική εξέλιξη ποσοστού βλάστησης (%) των σποροφύτων των *HpaA* διαγονιδιακών σειρών και των φυτών αγρίου τύπου παρουσία ή μη Καναμυκίνης, ως απόκριση στη θερμική καταπόνηση των 37°C, την 7η , 13η , 21η και 28η ημέρα.

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του φυτικού υλικού στην καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας, βασίστηκε στην καταμέτρηση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων, στο ρυθμό ανάπτυξης των φυτών και στην εμφάνιση ή μη συμπτωμάτων λόγω του παράγοντα καταπόνησης. Στην Εικόνα 3.18 παρουσιάζεται ο ρυθμός ανάπτυξης της σειράς *HpaA* T1-5 συγκριτικά με την ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου στην καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας παρουσία Km. Ειδικότερα, την 13η ημέρα η σειρά *HpaA* T1-5 εμφάνισε αδυναμία ανάπτυξης, η οποία συνοδεύτηκε από χλώρωση των φύλλων και μειωμένη φυλλική επιφάνεια. Ωστόσο, ο φαινότυπος αυτός είναι βελτιωμένος συγκριτικά με αυτό των φυτών αγρίου τύπου, όπου η μείωση της φυλλικής επιφάνειας υπήρξε σαφώς εντονότερη και τα συμπτώματα χλώρωσης ήταν περισσότερο εκτεταμένα.

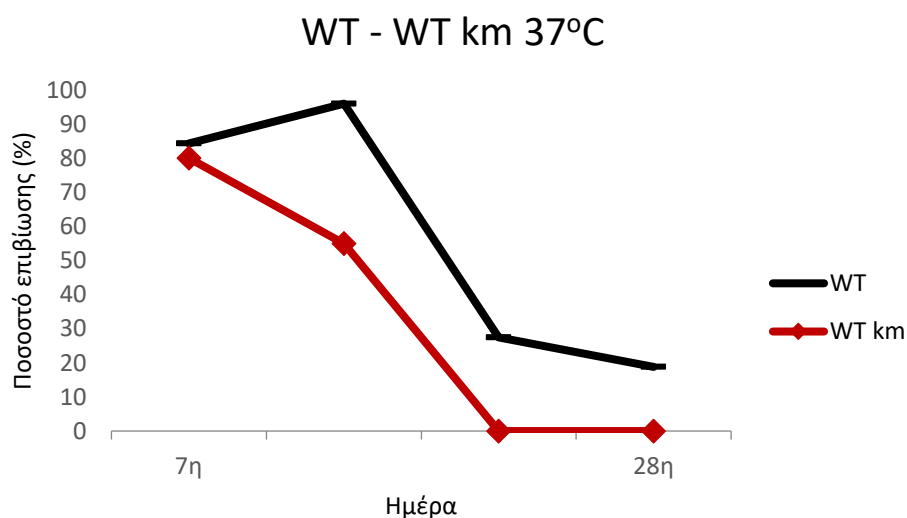




**Εικόνα 3.18** Συγκριτική ανάπτυξη της διαγονιδιακής σειράς *HraA* T1-5 και των φυτών αγρίου τύπου (WT) στη θερμική καταπόνηση (37°C), την 13η ημέρα παρατήρησης παρουσία Km. Α WT φυτά. Β Φυτά της σειράς *HraA* T1-5.

### 3.3.3 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των φυτών αγρίου τύπου παρουσία και απουσία Καναμυκίνης

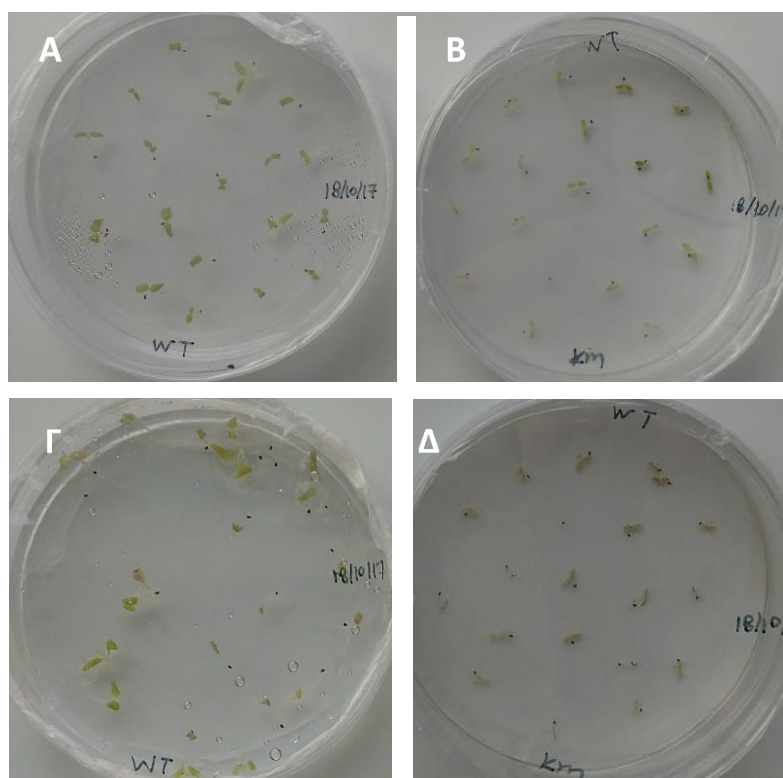
Από τα αποτελέσματα προκύπτει σαφώς ότι το δυναμικό βλάστησης των σπόρων επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία του αντιβιοτικού Km (Διάγραμμα 3.11). Συγκεκριμένα, κατά την 7η ημέρα παρατήρησης φαίνεται ότι η παρουσία του αντιβιοτικού δεν επιδρά σημαντικά στη βλάστηση και την ανάπτυξη των φυτών, διότι τα ποσοστά βλάστησης διατηρούνται σε αρκετά υψηλά επίπεδα. Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου (13η ημέρα), τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν νέκρωση (Διάγραμμα 3.11).



**Διάγραμμα 3.11** Χρονική εξέλιξη ποσοστού βλάστησης (%) των φυτών αγρίου τύπου

παρουσία ή μη Καναμυκίνης, ως απόκριση στη θερμική καταπόνηση των 37°C, την 7η, 13η, 21η και 28η ημέρα.

Στην Εικόνα 3.19 παρουσιάζεται η ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου, παρουσία ή απουσία Km, σε δύο διαφορετικές ημερομηνίες υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής θερμοκρασίας (37 °C). Ειδικότερα, τη 13 ημέρα τα φυτά που αναπτύσσονται απουσία Km χαρακτηρίζονται από ικανοποιητική ανάπτυξη και φυσιολογικό φαινότυπο (χρώμα φύλλων). Αντίθετα, τα φυτά που αναπτύσσονται παρουσία Km χαρακτηρίζονται από μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης και χλώρωση στα φύλλα (Εικόνα 3.19). Ακολούθως, τα φυτά αγρίου τύπου που αναπτύχθηκαν παρουσία Km εμφάνισαν μειωμένη φυλλική επιφάνεια, λόγω συστροφής των φύλλων προς τα κάτω και έντονα συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων, ενώ απουσία Km τα φυτά χαρακτηρίστηκαν από βελτιωμένο φαινότυπο (Εικόνα 3.19).



**Εικόνα 3.19** Συγκριτική ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (WT) στη θερμική καταπόνηση (37 °C), που αναπτύχθηκαν παρουσία ή απουσία Km, την 13η και 26η ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Α WT φυτά, απουσία Km, 13η ημέρα. Β WT φυτά, παρουσία Km, 13η ημέρα. Γ WT φυτά απουσία Km, 26η ημέρα. Δ WT φυτά παρουσία Km, 26η ημέρα.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, οι κλιματικές συνθήκες εντός των οποίων τα φυτά μπορούν να αναπτυχθούν, να επιτελέσουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες και να επιτύχουν το δυναμικό απόδοσής τους, έχουν υποστεί σημαντικές μεταβολές. Οι κυριότεροι περιβαλλοντικοί αβιοτικοί παράγοντες που επιδρούν στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών είναι η εδαφική υγρασία, η διαθεσιμότητα ανόργανων θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος, το φως και η θερμοκρασία (Mickelbart et al., 2015). Η απόκλιση από το άριστο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών οδηγεί σε καταπόνηση που εκφράζεται μέσω ποικίλων διαταραχών στη λειτουργία των φυτών τόσο σε μεταβολικό και βιοχημικό επίπεδο όσο και σε φυσιολογικό και αναπτυξιακό επίπεδο (Mickelbart et al., 2015). Στους κυριότερους αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης περιλαμβάνονται οι ακραίες θερμοκρασίες (υψηλή και χαμηλή), η περίσσεια και η έλλειψη νερού καθώς και θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος, η ηλιακή ακτινοβολία και η υψηλή αλατότητα. Οι ανωτέρω παράγοντες καταπόνησης μπορούν να επιφέρουν αδυναμία φυσιολογικής ανάπτυξης των φυτών, μείωση της παραγωγικότητας σε καρπό και βιομάζα (Calanca, 2017) αλλά ακόμη και νέκρωση των φυτών.

Μέχρι πρόσφατα, οι καλλιεργούμενες εμπορικές ποικιλίες φυτών δεν παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στους παραπάνω αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια, οι συνέπειες της κλιματικής αλλαγής, η βαθμιαία υποβάθμιση των εδαφών και η χημική ρύπανση του υδροφόρου ορίζοντα, σε συνδυασμό με την τάση υιοθέτησης συστημάτων φυτικής παραγωγής χαμηλών εισροών, καθιστούν απαραίτητο το σχεδιασμό εναλλακτικών στρατηγικών αντιμετώπισης των ανωτέρω προβλημάτων (Rosenzweig et al., 2014).

Προς την κατεύθυνση αυτή, κεντρικό ρόλο παίζει η δημιουργία σύγχρονων βελτιωμένων ποικιλιών με αναβαθμισμένη ανθεκτικότητα έναντι των αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης που πλήττουν τη φυτική παραγωγή. Ειδικότερα, η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών χαρακτηρίζεται ως η πιο αποτελεσματική και οικονομικά βιώσιμη μέθοδος για την αντιμετώπιση ενός ευρέου φάσματος αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Παρά το γεγονός ότι οι κλασικές διαδικασίες βελτίωσης των φυτών έχουν επιδείξει σημαντικά επιτεύγματα, η περαιτέρω αναβάθμιση της αποτελεσματικότητας παραμένει μία δύσκολο, χρονοβόρα και συχνά αναποτελεσματική προσπάθεια. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στον πολυγονιδιακό έλεγχο του γνωρίσματος της ανθεκτικότητας

έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, στην αλληλεπίδραση γονοτύπου-περιβάλλοντος, στην αδυναμία ευχερούς διάκρισης και επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων, στην περιορισμένη διαθεσιμότητα φυσικών πηγών ανθεκτικότητας και στην έλλειψη κατάλληλων μεθόδων επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων. Εναλλακτικά, η τεχνολογία της Γενετικής Μηχανικής αποτελεί μία πολύ ελκυστική προσέγγιση, καθώς προσφέρει τη δυνατότητα ενσωμάτωσης γονιδίων, ποικίλης προέλευσης, που σχετίζονται με την επαγωγή της άμυνας των φυτών.

Με βάση τα παραπάνω, στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης των γονιδίων *hraA* και *hraB*, προερχόμενα από τα βακτήρια *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* και *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* αντίστοιχα, σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* αναφορικά με την ανθεκτικότητά τους έναντι των αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης ξηρασίας, υψηλής αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας.

Στο πλαίσιο αξιολόγησης της ανθεκτικότητας των *hraA*- και *hraB*- διαγονιδιακών σειρών στους προαναφερθέντες αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης, αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος των διαθέσιμων διαγονιδιακών σειρών ως προς την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση των διαγονιδίων. Η αξιολόγηση των διαγονιδιακών σειρών βασίστηκε στην εκτίμηση του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων σε θρεπτικό μέσο παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων οι υπό μελέτη διαγονιδιακές σειρές αξιολογήθηκαν σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου. Οι διαγονιδιακές σειρές που χαρακτηρίστηκαν ως ομοζύγωτες για τα διαγονίδια *hraA* και *hraB* αποτέλεσαν το φυτικό υλικό για τα πειράματα αξιολόγησης στις ανθεκτικότητας έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων.

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση στις ανθεκτικότητας έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων κατέδειξαν ότι η παρουσία των περιοριστικών παραγόντων της ξηρασίας, αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας επιδρά αρνητικά στη βλάστηση και ανάπτυξη των φυτών, με την επίδραση αυτή να είναι ανάλογη με το επίπεδο της καταπόνησης.

Αναφορικά με την καταπόνηση ξηρασίας, τα αποτελέσματα κατέδειξαν την αρνητική επίδραση της καταπόνησης και ειδικότερα στα υψηλά επίπεδα στρες (200 mM d-mannitol και 300 mM d-mannitol). Τα ευρήματα αυτά συγκλίνουν με προηγούμενες μελέτες που υπογραμμίζουν το γεγονός ότι η ξηρασία επιφέρει δυσμενείς επιπτώσεις, οι οποίες εκφράζονται μέσω της μείωσης της φυλλικής επιφάνειας, που αποδίδεται στην καταστολή

της διαστολής των φύλλων και στη μείωση της φωτοσύνθεσης (Avramova et al., 2015). Ακόμη, η ξηρασία βρέθηκε πως είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη μίτωση, την επιμήκυνση και διόγκωση των κυττάρων που έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ανάπτυξη (Potoponá et al., 2016).

Ειδικότερα, στην περίπτωση της ξηρασίας, οι *hpaA*-διαγονιδιακές σειρές δεν επηρεάστηκαν από τα επίπεδα καταπόνησης PEG 5% και 100 mM d-mannitol. Ωστόσο, σημαντική διαφοροποίηση ως προς το ποσοστό βλάστησης και ανάπτυξης των σειρών αυτών, σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου, παρατηρήθηκε στα επίπεδα 200 mM d-mannitol και 300 mM d-mannitol, με τη σειρά *hpaA T1-5* να υπερέχει σημαντικά, αγγίζοντας ποσοστά βλάστησης 97%. Στα συγκεκριμένα επίπεδα στρες, η σειρά *hpaA 2-4* επέδειξε επίσης ικανοποιητική απόκριση στην καταπόνηση ξηρασίας. Όσον αφορά τις *hpaB* διαγονιδιακές σειρές στα χαμηλά επίπεδα καταπόνησης των PEG 5% και 100 mM d-mannitol, δεν σημειώθηκαν ουσιαστικές διαφοροποιήσεις στα ποσοστά βλάστησης και στο δυναμικό ανάπτυξης συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Αντίθετα, στα υψηλότερα επίπεδα καταπόνησης των 200 mM d-mannitol και 300 mM d-mannitol, η σειρά *hpaB 4-3* υπερείχε έναντι των υπολοίπων σειρών, τα ποσοστά βλάστησης της οποίας ξεπερνούσαν το 90%, ενώ παράλληλα ο φαινότυπος των φυτών εμφάνισε σαφή υπεροχή συγκριτικά με τον αντίστοιχο φαινότυπο των φυτών μαρτύρων. Εφάμιλλη ήταν και η ανάπτυξη της σειράς *hpaB 2-1* στα ίδια επίπεδα καταπόνησης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με αποτελέσματα άλλων ερευνών όπου φαίνεται η υπεροχή διαγονιδιακών φυτών που εκφράζουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες τελεστές έναντι φυτών αγρίου τύπου που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας. Ειδικότερα, οι Zhang et al, 2011 αναφέρουν ότι φυτά ρυζιού στα οποία είχε ενσωματωθεί το γονίδιο *hrl1*, παρουσίασαν προηγμένη ανθεκτικότητα στην ξηρασία μέσω της σηματοδότησης αμπισικού οξέος, η οποία εκφράστηκε μέσω φυσιολογικών τροποποιήσεων όπως το κλείσιμο στομάτων, η αυξημένη ικανότητα συγκράτησης ύδατος, τα υψηλότερα επίπεδα σακχάρων και προλίνης, η βελτιωμένη εκκαθάριση ελευθέρων ριζών (ROS-scavenging) και η επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε αμυντικούς μηχανισμούς. Επίσης, οι Yavad et al, 2016 αναφέρουν ότι φυτά καπνού που φέρουν το γονίδιο *AnnAt8*, που κωδικοποιεί την ανεξίνη 8, στο είδος *Arabidopsis thaliana*, εμφάνισαν βελτιωμένη απόκριση στην ξηρασία έναντι των φυτών αγρίου τύπου, όπως προκύπτει από την καλύτερη ανάπτυξη του βλαστού και της ρίζας.

Αναφορικά με την καταπόνηση της αλατότητας, προκύπτει ότι το ποσοστό βλάστησης και το δυναμικό ανάπτυξης των *hpaA*- και *hpaB* -διαγονιδιακών σειρών, καθώς επίσης και των φυτών αγρίου τύπου, επηρεάστηκε σημαντικά τόσο από το επίπεδο καταπόνησης όσο και από την παρουσία αντιβιοτικού καναμυκίνη. Αναφορικά με την επίδραση της καταπόνησης, απουσία του αντιβιοτικού επιλογής, οι *hpaA* διαγονιδιακές σειρές καθώς και τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν αναστολή της βλάστησης καθώς παρουσίασαν μηδενικά ποσοστά βλάστησης τόσο στο χαμηλό (100 mM NaCl) όσο και στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl). Με την πάροδο του χρόνου, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του ποσοστού βλάστησης τόσο των *hpaA* διαγονιδιακών σειρών όσο και των wt φυτών, που τελικά έφτασε σε ποσοστό 100%. Ωστόσο, στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl), οι *hpaA* διαγονιδιακές σειρές εμφάνισαν υψηλά ποσοστά βλάστησης από τα πρώτα στάδια της καταπόνησης, γεγονός που υποδηλώνει ταχύτερο ρυθμό βλάστησης συγκριτικά με τα wt φυτά. Στο επίπεδο αυτό, η σειρά *hpaA T1-5* φάνηκε να υπερέχει σημαντικά έναντι των υπόλοιπων διαγονιδιακών σειρών αλλά και των wt φυτών. Σχετικά με τις *hpaB*-διαγονιδιακές σειρές, εμφάνισαν αρκετά υψηλά ποσοστά βλάστησης από την έναρξη της καταπόνησης στο χαμηλό επίπεδο (100 mM NaCl), τα οποία ωστόσο κυμάνθηκαν σε παρόμοια επίπεδα με τα αντίστοιχα των φυτών αγρίου τύπου. Στην κατηγορία των *hpaB*-σειρών, υπεροχή στην ανάπτυξη συγκριτικά με τα wt φυτά εμφάνισε η σειρά *hpaB 4-3*, τα φυτά της οποίας ήταν χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερη ευρωστία και ηπιότερα συμπτώματα της καταπόνησης. Με το πέρας όμως του πειράματος, τα ποσοστά βλάστησης δεν παρουσίασαν διαφορές συγκριτικά με αυτά των φυτών αγρίου τύπου τόσο στο χαμηλό όσο και στο υψηλό καταπόνησης. Επιπλέον, από τη σύγκριση των *hpaA*- και *hpaB*-διαγονιδιακών σειρών με τα αντίστοιχα wt φυτά διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου *hpaA* στα διαγονιδιακά φυτά, προάγει την ανάπτυξη τους και βελτιώνει την ευρωστία τους, καθώς τα διαγονιδιακά φυτά εμφάνισαν σαφώς καλύτερες επιδόσεις.

Αναφορικά με την επίδραση του αντιβιοτικού επιλογής, στα πειράματα καταπόνησης της αλατότητας παρουσία του αντιβιοτικού, τόσο οι *hpaA* όσο και οι *hpaB* διαγονιδιακές σειρές παρουσίασαν μειωμένα ποσοστά βλάστησης και μειωμένη ανάπτυξη που αντανακλάται στο μικρότερο μέγεθος των φυτών και στην εκτεταμένη χλόρωση και στο μεταχρωματισμό (λεύκανση) των φύλλων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει, ότι παρά τη διαγονιδιακή φύση των φυτών, που καθιστά εφικτή την ανάπτυξη και επιβίωσή τους παρουσία του αντιβιοτικού, το τελευταίο φαίνεται να επιδρά αρνητικά στο ρυθμό βλάστησης και ανάπτυξης των φυτών.

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες όπου αναφέρεται ότι η επιβράδυνση της ανάπτυξης των φυτικών οργανισμών υπό στρες αλατότητας πιθανώς αποδίδεται στην αναστολή της επιμήκυνσης των κυττάρων τους (Bandeoglu et al., 2004). Επίσης, τα αποτελέσματα υπεροχής των διαγονιδιακών σειρών συγκριτικά με τα wt φυτά συμφωνούν με προηγούμενες έρευνες, στις οποίες η ένθεση μεταγραφικών παραγόντων ή γονιδίων που δρούσαν ως μεταγραφικοί παράγοντες σε φυτά οδήγησε σε υπέρτερη ανάπτυξη των διαγονιδιακών φυτών και ανοχή στην καταπόνηση της αλατότητας στο στάδιο των σποροφύτων όσο και σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια (Ganesan et al., 2012; Singh et al., 2016). Τέλος, η μείωση των επιπέδων χλωροφύλλης στα φυτά που έχουν υποστεί υάλωση, θεωρείται ως τυπικό σύμπτωμα οξειδωτικού στρες (Smirnoff, 1996).

Αναφορικά με την απόκριση υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τόσο οι *hpaA* όσο και οι *hpaB* σειρές δεν κατάφεραν να ανακάμψουν μετά την καταπόνηση, παρουσιάζοντας εκτεταμένη χλώρωση και νέκρωση στα φύλλα τους. Παρά το γεγονός ότι κατά την έναρξη της καταπόνησης τα ποσοστά βλάστησης των σπόρων ήταν αρκετά υψηλά, με τις σειρές *hpaA T1-5* και *hpaB 4-3* να εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά βλάστησης (95 %), τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με το φαινότυπο των φυτών δεν παρείχαν τη δυνατότητα εξαγωγής ασφαλών συμπερασμάτων ως προς τα επίπεδα ανοχής στη θερμική καταπόνηση.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η διαφορά στο φαινότυπο των φυτών που αντικατοπτρίζεται τόσο σε επίπεδο ανθεκτικότητας στους αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης όσο και στο δυναμικό ανάπτυξης των φυτών ενδεχομένως αποδίδεται στο γεγονός ότι οι διαφορετικές *hpaA* και *hpaB* διαγονιδιακές σειρές συνιστούν διαφορετικά συμβάντα γενετικού μετασχηματισμού. Με δεδομένο ότι η ένθεση των γονιδίων έγινε σε διαφορετικές θέσεις στο γονιδίωμα των φυτών, οι σειρές αυτές ενδεχομένως να εμφανίζουν διαφορετική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την επαγωγή βιοχημικών μονοπατιών άμυνας έπειτα από έκθεση των φυτών σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης όπως αυτά του σαλικυλικού οξέος (SA), του ιασμονικού οξέος (JA), της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), της σύνθεσης ενεργών μορφών οξυγόνου (AOS), και πρωτεϊνών παθογένεσης (PR), όπως έχει αποδειχθεί για τα *hprZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, *Nicotiana benthamiana* διαγονιδιακά φυτά (Pavli et al., 2011).

Όταν το φυτό αντιλαμβάνεται κάποιου είδους καταπόνηση, μεταβιβάζει το σήμα σε κατάλληλα κέντρα με σκοπό την ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών που συνηθέστερα

περιλαμβάνουν την παραγωγή πρωτεϊνών που παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην αντιμετώπιση της καταπόνησης. Συνήθως, το επίπεδο έκφρασης των επαγόμενων πρωτεϊνών σχετίζεται θετικά με το επίπεδο άμυνας έναντι της καταπόνησης. Δεδομένου ότι το επίπεδο γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης σχετίζεται άμεσα με το γονότυπο, βασικό στόχο των σχετικών βελτιωτικών προγραμμάτων αποτελεί η αξιοποίηση της διαθέσιμης γενετικής παραλλακτικότητας για τον προσδιορισμό των επιθυμητών ανθεκτικών γονοτύπων ή η διεύρυνση της γενετικής παραλλακτικότητας μέσω κλασικών διαδικασιών βελτίωσης ή μέσω ενσωμάτωσης γονιδίων ανθεκτικότητας προερχόμενα από φυτικούς ή μη οργανισμούς. Τα γονίδια προς ενσωμάτωση είτε εμπλέκονται άμεσα σε μοριακά μονοπάτια άμυνας είτε επάγουν την παραγωγή πρωτεϊνών ή/και δευτερογενών μεταβολιτών με ρόλους που σχετίζονται με την άμυνα. Είναι αξιοσημείωτο ωστόσο ότι οι μελέτες που πραγματοποιούνται στην επαγωγή ανθεκτικότητας σε αβιοτικές καταπονήσεις είναι σαφώς περιορισμένες συγκριτικά με αντίστοιχες που προσβλέπουν στην αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών παθογόνων καταπόνησης. Παρ' όλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, πληθώρα μελετών αναφέρει τη δυνατότητα επίτευξης ευρείας ανθεκτικότητας, τόσο έναντι βιοτικών όσο και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης, μέσω της διαγονιδιακής έκφρασης γονιδίων προερχόμενων από παθογόνους μικροοργανισμούς. Στο επίπεδο αυτό, το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την αξιοποίηση γονιδίων βακτηριακής προέλευσης που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ανήκουν στην κατηγορία των χαρπινών και τελεστών. Προς την κατεύθυνση αυτή, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν πρόσθετες ενδείξεις για τη δυνατότητα αξιοποίησης των γονιδίων *hpaA* και *hpaB*, που προέρχονται από τα φυτοπαθογόνα βακτήρια *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* και *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* αντίστοιχα, για την βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.



## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη της επίδρασης της έκφρασης των γονιδίων *hraA* και *hraB*, προερχόμενα από τα βακτήρια *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* και *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* αντίστοιχα, σε φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* συνηγορεί στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- A) Τα διαγονιδιακά φυτά χαρακτηρίζονταν από αυξημένο ποσοστό βλάστησης και βελτιωμένη ανάπτυξη των σποροφύτων, συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας, γεγονός που αντανακλάται στα υψηλά επίπεδα καταπόνησης (200 mM, 300 mM d-mannitol).
- B) Όσον αφορά την καταπόνηση της αλατότητας, ορισμένες *hraA*- και *hraB*-διαγονιδιακές σειρές εμφάνισαν αυξημένο ποσοστό βλάστησης και βελτιωμένη ανάπτυξη των σποροφύτων συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου, με την υπεροχή αυτών να είναι περισσότερο εμφανής στο μεσαίο επίπεδο καταπόνησης (100 mM NaCl).
- Γ) Όσον αφορά την καταπόνηση της υψηλής θερμοκρασίας, οι *hraA*- και *hraB*-διαγονιδιακές σειρές εμφάνισαν βελτιωμένο φαινότυπο ανάκαμψης των φυτών σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου.
- Δ) Η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα των εξεταζόμενων διαγονιδιακών σειρών πιθανόν σχετίζεται με την επαγωγή μηχανισμών άμυνας στα διαγονιδιακά φυτά, ενώ παράλληλα δίνεται η δυνατότητα αξιοποίησης των γονιδίων αυτών για βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης με τη χρήση της Γενετικής Μηχανικής.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

- Atkinson N. J., Urwin P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J E Bot*, 63, 10, 3523–3543.
- Al-Whaibi, M. H. (2011). Plant heat-shock proteins: A mini review *JKSUS* 23, 2, 139-150.
- Bally J., Jung H., Mortimer C., Naim F., Philips J. G., Roger H, Bombarely, A., Goodin, M. M. and Waterhouse, P.W. (2018). The Rise and Rise of *Nicotiana benthamiana*: A Plant for All Reasons. *Annu Rev Phytopathol*, 56, 405-426. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050141>.
- Bochu Wang, Jing Zhou, Yichuan Wang, Jaime A. Teixeira da Silva, Liancai Zhu. (2006). “Physical Stress and Plant Growth”. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, Global Science Books, volume 3, pp. 68-85.
- Calanca, P. P. (2017). Effects of Abiotic Stress in Crop Production In: *Quantification of Climate Variability, Adaptation and Mitigation for Agricultural Sustainability*. M. Ahmed and C.O. Stockle eds. Springer International Publishing Switzerland, pp 165-180.
- Ganesan, G., Sankararamasubramanian, H. M., Harikrishnan, M., Ganpudi, A. and Parida, A. (2012). A MYB transcription factor from the grey mangrove is induced by stress and confers NaCl tolerance in tobacco. *J Exp Bot*, 63, 12, 4549–4561.
- Goodin, M. M., Zaitlin, D, Naidu, R.A., Lommel, S.A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* 21, 8, :1015-26 DOI: 10.1094/MPMI-21-8-1015.
- Kaur G., Asthir B. (2017). Molecular responses to drought stress in plants. *Biol. Plant*, 61, 2, 201–209.
- Hanif, K., Shabir, W. H., Iqbal, A.M. (2014). Molecular Approaches to Enhance Abiotic Stress Tolerance In: *Innovations in Plant Sciences and Biotechnology* Edition: 1<sup>st</sup>, habir H Wani, C.P. Malik, Amandeep Hora, Ritesh Kaur eds Agrobios (India) pp.151-170.
- Knapp, S., Chase, M. W., Clarkson, J. J. (2004). Nomenclatural Changes and a New Sectional Classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon*, 53, 1, 73-82. DOI: 10.2307/4135490.

- Lichtenthaler, H. K. (1998). The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Ann N Y Acad Sci*, 851, 1, 187-198. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x.
- Liu, Y.-C., Wang S.-C., Yu, Y.-J., Fung, K.-M., Yang, M.-T., Tseng Y.-H., Tsai, S.-F, Sun, S., Lyu, P.-C., Chou, S.-H. (2015). Complete Genome Sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Strain 17 from Taiwan. *Genome Announc*, 3,6. DOI: 10.1128/genomeA.01466-15.
- Lonjon, F., Lohou, D., Cazalé A.-C., Büttner, D., Ribeiro, B. G., Péanne C., Genin, S. and Vaillau, F. (2017). HpaB-Dependent Secretion of Type III Effectors in the Plant Pathogens *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* *Sci Rep*, 7: 4879 DOI: 10.1038/s41598-017-04853-9.
- Mickelbart, M.V., Hasegawa, P.M., Salt, D.E. (2015). Αποκρίσεις και Προσαρμοχές σε Αβιοτικές Καταπονήσεις. Απόδοση από: *Plant Physiology* (eds. Taiz L, Zeiger E). *Utopia*. pp 913-938.
- Mitra, J. (2001). Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Curr Sci*, 80, 25, 758-764.
- Mitsopoulou, N., Kelaidi, G. I., Skaracis, G. N. and Pavli, O.I.(2018). The *hpaB* gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* enhances abiotic stress tolerance in transgenic *N. benthamiana* .69<sup>th</sup> Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. 23-25 November 2018 Larissa Greece
- Patrick, K. L., Wojcechowskyj, J. A., Bell, S. L., Riba, M. N., Jing, T., Talmage, S., Xu, P., Cabello, A. L., Xu, J. Shales, M., Jimenez-Morales, D., Ficht, T. A. de Figueiredo, P., Samuel, J. E., Li, P., Krogan, N. J., Watson, R. O. (2018). Quantitative Yeast Genetic Interaction Profiling of Bacterial Effector Proteins Uncovers a Role for the Human Retromer in Salmonella Infection *Cell Syst*, 7:3, 323-338.e6.
- Rosenzweig, C., Iglesias, A., Yang, X.B., Epstein, P. R., Chivian, E. (2001). Climate Change and Extreme Weather Events; Implications for Food Production, Plant Diseases, and Pests. *Glob Chang Human Health*, 2, 2, 90–104.
- 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.
- Taïbi, K., Taïbi, F., Abderrahim, L. A., Ennajah, A., Belkhodja, M., Muletd, J.M. (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L.. *S Afr J Bot*, 105, 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.011>.

- Singh, V. K., Mishra, A., Haque, I. and Jha, B. (2016). A novel transcription factor-like gene *SbSDRI* acts as a molecular switch and confers salt and osmotic endurance to transgenic tobacco. *Sci. Rep*, 6, 31686.
- Waldron, P. (2012). Release of a Draft Genome Sequence for *Nicotiana benthamiana* Available online: <https://btiscience.org/explore-bti/news/post/draft-genome-sequence-for-nicotiana-benthamiana-released-in-2012/>.
- Wieczorek, A. M. & Wright, M. G. (2012) History of Agricultural Biotechnology: How Crop Development has Evolved. *Nature Education Knowledge* 3,10,9.
- Yadav, D., Ahmed, I., Shukla, P., Boyidi, P. and Kirti, P.B. (2016). Overexpression of *Arabidopsis* AnnAt8 Alleviates Abiotic Stress in Transgenic *Arabidopsis* and Tobacco. *Plants*, 5, 2, 18.
- Zhang, L., Xiao, S., Li, W., Feng, W., Li, J., Wu, Z., Gao, X., Liu, F. and Shao M. (2011). Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *J Exp Bot*, 62, 12, 4229–4238.

#### Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ασημακοπούλου Γεωργία (2014). Γενετικός μετασχηματισμός στο είδος *Nicotiana benthamiana* με γονίδια φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Βισβίκης Βασίλειος (2018). Επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hrpZ<sub>PspH</sub>* σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα. Πτυχιακή Διατριβή Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Κούτρα Ελένη (2013). Μεταβολές Στη Λειτουργία Της Φωτοσυνθετικής Συσκευής Σε Σχέση Με Την Ταχύτητα Εμφάνισης της Υδατικής Καταπόνησης. Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Λαζαρίδη Ευσταθία (2012). Μελέτη της διαγονιδιακής έκφρασης της χαρπίνης *HrpZ<sub>PspH</sub>* σε φυτά *Nicotiana benthamiana* κάτω από συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Μανέτας Ιωάννης (2005). Φυσιολογία Φυτών Εκδόσεις Ίων Αθήνα.
- Μήτσιος Ι (2004). Γονιμότητα Εδαφών. Θρεπτικά στοιχεία φυτών (μακροθρεπτικά, μικροθρεπτικά) και Βαρέα Μέταλλα. Μέθοδοι και Εφαρμογές. Εκδόσεις Zymel, Αθήνα.

- Μητσοπούλου Ν (2016). Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε παθογόνους μικροοργανισμούς σε φυτά *N. benthamiana* που εκφράζουν ενδογενώς τη χαρπίνη HrpZ<sub>PspH</sub>. Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Γεωπονικών Επιστημών. Βόλος.

#### Διαδικτυακή Βιβλιογραφία

- CGIAR Integrated Breeding Platform. “MB1 - Molecular Breeding: the use of molecular markers for efficient crop improvement”.  
<http://passel.unl.edu/communities/index.php?idinformationmodule=1130447241&topicorder=8&maxto=10&min=1&idcollectionmodule=1130274258> / (πρόσβαση 28/12/2018).
- Gaia Επιχειρειν. (2015). “Αλατότητα και ανάπτυξη των φυτών”.  
<http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/%CE%91%CE%BB%CE%B1%CF%84%CF%8C%CF%84%CE%B7%CF%84%CE%B1%CE%BA%CE%B1%CE%B9%CE%B1%CE%BD%CE%AC%CF%80%CF%84%CF%85%CE%BE%CE%B7%CF%84%CF%89%CE%BD%CF%86%CF%85%CF%84%CF%8E%CE%BD#.CE.A4.CE.BF.CE.A7.CE.BB.CF.8E.CF.81.CE.B9.CE.BF.CF.84.CF.89.CE.BD.CE.9D.CE.B5.CF.81.CF.8E.CE.BD.CE.86.CF.81.CE.B4.CE.B5.CF.85.CF.83.CE.B7.CF.82> / (πρόσβαση 24/1/2019).
- Open Courses. (2016). “Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών”.  
<http://www.opencourses.gr/opencourse.xhtml;jsessionid=A12FBEB7E1A91F1B8125F82512AB84E0?id=14263&ln=el> / (πρόσβαση 24/1/2019).
- Sol Genomics Network. (2014). “Nicotiana benthamiana draft genome sequence v1.0.1”.  
[https://solgenomics.net/organism/Nicotiana\\_benthamiana/genome](https://solgenomics.net/organism/Nicotiana_benthamiana/genome) / (πρόσβαση 15/1/2019).
- Wikipedia. (2019). “Bacterial effector protein”.  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial\\_effector\\_protein](https://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial_effector_protein) / (πρόσβαση 21/1/2019).
- Wikipedia. (2019). “*Nicotiana benthamiana*”.  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotiana\\_benthamiana](https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotiana_benthamiana) / (πρόσβαση 8/1 2019).