

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών

Διδακτορική Διατριβή

**Αξιοποίηση βακτηριακών γονιδίων *hrr/hrc* για την ανάπτυξη
ανθεκτικότητας σε αβιοτικές καταπονήσεις**

Νικολέττα Μητσοπούλου

ΒΟΛΟΣ, 2022



Αξιοποίηση βακτηριακών γονιδίων *hrp/hrc* για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αβιοτικές καταπονήσεις

Νικολέττα Μητσοπούλου

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ουρανία Ι. Παυλή: Αναπλ. Καθηγήτρια ΠΘ, Γενετική Βελτίωση Φυτών (Επιβλέπουσα)

Ιμπραχίμ Αβραάμ Χα: Καθηγητής ΠΘ, Παραγωγή, Βελτίωση σπόρου και τεχνολογία πολ/κού υλικού κηπευτικών και φυτών μεγάλης καλλιέργειας (Μέλος)

Γεώργιος Ν. Σκαράκης: Ομότιμος Καθηγητής ΓΠΑ, Βελτίωση Φυτών και Γεωργικός Πειραματισμός (Μέλος)

Εξεταστική Επιτροπή:

Ουρανία Ι. Παυλή: Αναπλ. Καθηγήτρια ΠΘ, Γενετική Βελτίωση Φυτών (Επιβλέπουσα)

Ιμπραχίμ Αβραάμ Χα: Καθηγητής ΠΘ, Παραγωγή, Βελτίωση σπόρου και τεχνολογία πολ/κού υλικού κηπευτικών και φυτών μεγάλης καλλιέργειας (Μέλος)

Γεώργιος Ν. Σκαράκης: Ομότιμος Καθηγητής ΓΠΑ, Βελτίωση Φυτών και Γεωργικός Πειραματισμός (Μέλος)

Εμμανουήλ Φλεμετάκης: Αναπλ. Καθηγητής ΓΠΑ, Βιοχημεία Φυτών και Μικροοργανισμών

Ευάγγελος Βέλλιος: Επίκ. Καθηγητής ΠΘ, Φυτοπαθολογία- Σύγχρονες Μέθοδοι Διαγνωστικής

Παναγιώτης Μαδέσης: Επίκ. Καθηγητής ΠΘ, Μοριακή Βιολογία Φυτών

Ελένη Τάνη: Επίκ. Καθηγήτρια ΓΠΑ, Βελτίωση Φυτών

Ευχαριστίες

Πέντε χρόνια μετά την έναρξη κατέληξα στο συμπέρασμα ότι ο δρόμος ήταν κάποιες φορές ευχάριστος, αλλά πολλές φορές ήταν δύσκολος, επίπονος και μοναχικός. Κάνοντας τώρα πλέον έναν σύντομο απολογισμό των όσων έχουν προηγηθεί, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και να ευχαριστήσω ειλικρινά ορισμένους ανθρώπους οι οποίοι συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Αρχικά οφείλω να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την 3ετή χρηματοδότηση που μου παρείχε με σκοπό την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Άλλωστε, χωρίς την οικονομική ενίσχυση, η παρούσα διατριβή ίσως να μην είχε ολοκληρωθεί ποτέ...

Στη συνέχεια, ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσά μου κα Ουρανία Παυλή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του ΠΘ για την ανάθεση του θέματος, τις συμβουλές και υποδείξεις κατά τη διάρκεια της συγγραφής και διόρθωσης των κειμένων.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον κ Αβραάμ Χα, Καθηγητή του ΠΘ για την όμορφη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια, τις συμβουλές και τη στήριξη που μου παρείχε μέχρι και την τελευταία στιγμή της εξέτασης της διατριβής, καθώς και τον κ Γεώργιο Σκαράκη, Ομότιμο Καθηγητή του ΓΠΑ για τις υποδείξεις του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και της διόρθωσης της διατριβής. Ακολουθώ, θέλω να ευχαριστήσω τον κ Εμμανουήλ Φλεμετάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή του ΓΠΑ, για τη φιλοξενία στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και την πραγματοποίηση ίσως των πιο δύσκολων πειραμάτων της παρούσας διατριβής, καθώς και τους κ Ευάγγελο Βέλλιο Επίκουρο Καθηγητή του ΠΘ, Παναγιώτη Μαδέση, Επίκουρο Καθηγητή του ΠΘ και Ελένη Τάνη, Επίκουρη Καθηγήτρια του ΓΠΑ για τη συμμετοχή τους στην 7μελή εξεταστική επιτροπή.

Επιπρόσθετα, αν και δεν την γνωρίζω αρκετά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα Γεωργία Κελαϊδή, τα πειράματα της οποίας αποτέλεσαν τη βάση για ένα μεγάλο τμήμα της δικής μου διατριβής, καθώς και την κα Ευμορφία Μπατάκα για την καθοριστική συμβολή της στην επεξεργασία των δεδομένων της μεταβολομικής ανάλυσης. Ακόμη, ευχαριστώ θερμά την κα Μαρία Χολέβα, Γεωπόνο-Βακτηριολόγο του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου για την παροχή του βακτηριακού μολύσματος, με σκοπό την πραγματοποίηση επιπρόσθετων πειραμάτων. Τέλος, ευχαριστώ τους φοιτητές Κοσμά Λακιώτη, Ευάγγελο Αδαμόπουλο και Ελένη Μιχαηλίδου για τη βοήθεια και το χαρούμενο κλίμα συνεργασίας κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης των πειραμάτων.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	1
Summary.....	5
Κεφάλαιο 1 Γενική Εισαγωγή.....	8
Κεφάλαιο 2 Απόκριση <i>hrpZ_{P_{sph}}</i> -διαγονιδιακών σειρών του είδους <i>N. benthamiana</i> υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.....	32
Κεφάλαιο 3 Αξιολόγηση <i>hrpZ_{P_{sph}}</i> -διαγονιδιακών σειρών <i>N. benthamiana</i> υπό συνθήκες καταπόνησης καδμίου.....	57
Κεφάλαιο 4 Προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ των <i>hrpZ_{P_{sph}}</i> -σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας.....	75
Κεφάλαιο 5 Προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ των <i>hrpZ_{P_{sph}}</i> -σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας.....	101
Κεφάλαιο 6 Αξιολόγηση <i>hraA</i> -διαγονιδιακών σειρών του είδους <i>N. benthamiana</i> υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.....	130
Κεφάλαιο 7 Απόκριση <i>hraB</i> -διαγονιδιακών σειρών του είδους <i>N. benthamiana</i> υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.....	156
Κεφάλαιο 8 Γενική Συζήτηση.....	181
Παράρτημα.....	198

Πίνακας Συντομογραφιών

ABA: Absciscic Acid
AOS: Active Oxygen Species
APX: Ascorbate Peroxidase
AsA: Ascorbic Acid
BNYVV: Beet Necrotic Yellow Vein Virus
bp: base pairs
CAT: Catalase
Chla: Chlorophyll a
Chlb: Chlorophyll b
CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DREB: Dehydration-Responsive Element-Binding Protein
ET: Ethylene
ETI: Effector-Triggered Immunity
GABA: Gamma-aminobutyric acid
GC/MS: Gas Chromatography/ Mass Spectrometry
GPX: Glutathione Peroxidase
GR: Glutathione Reductase
GSH: Glutathione
GST: Glutathione S-transferase
HDR: Homology-Directed Repair
HpaA: Hrp-associated A
HpaB: Hrp-associated B
HR: Hypersensitive Response
hrp/hrc: HR and pathogenicity/HR and conserved
HSP: Heat Shock Protein
JA: Jasmonic Acid
LEA: Late Embryogenesis Abundant Protein
MAMPs: Microbe-Associated Molecular Pattern
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MAS: Marker Assisted Selection
Mb: Megabase
NBT: New Breeding Techniques
NO: Nitric Oxide
PAMPs: Pathogen -Associated Molecular Patterns
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDR: Pathogen-Derived Resistance
PLS-DA: Partial Least Squares Discriminant Analysis
POX: Peroxidase

PPO: Polyphenol Oxidase
PR: Pathogenesis-Related
PRR: Pattern Recognition Receptor
PTI: Pathogen-Triggered Immunity
QTL: Quantitative Trait Loci
R: Resistance
RNAi: RNA interference
RLK: Receptor-Like Kinase
ROS: Reactive Oxygen Species
RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SA: Salicylic Acid
SAR: Systemic Acquired Resistance
SOD: Superoxide Dismutase
T3SS: Type Three Secretion System
TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nucleases
TF: Transcription Factor
VIGS: Virus-Induced Gene Silencing
wt: wild type
ZFN: Zinc Finger Nucleases

Περίληψη

Η έκθεση των φυτών σε δυσμενή περιβάλλοντα αποβαίνει εξαιρετικά επισφαλής για την παραγωγικότητα και ικανότητα επιβιώσής τους, επιφέροντας παράλληλα ανάλογες προσαρμογές στα προγράμματα βελτίωσης που στοχεύουν στην ανάπτυξη ποικιλιών με γενετική ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων ως την πλέον βιώσιμη προσέγγιση για την εξασφάλιση της οικονομικής βιωσιμότητας των καλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο. Η επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων προσεγγίζεται παραδοσιακά μέσω της επιλογής ανθεκτικών γονοτύπων ή/και της μεταφοράς γνωρισμάτων ανθεκτικότητας σε ευαίσθητους γονοτύπους μέσω διασταυρώσεων. Παρά τα αδιαμφισβήτητα επιτεύγματα των κλασικών βελτιωτικών διαδικασιών, η αποτελεσματικότητά τους περιορίζεται από τον πολυγονιδιακό έλεγχο των γνωρισμάτων ανθεκτικότητας, την ύπαρξη σημαντικής αλληλεπίδρασης γονοτύπου-περιβάλλοντος, την αναγκαιότητα αξιολόγησης ενός μεγάλου αριθμού γονοτύπων, την εφαρμογή πολλαπλών κύκλων επιλογής, καθώς και τη δυσκολία επίτευξης ομοιόμορφων συνθηκών καταπόνησης σε συνθήκες αγρού. Στις ανωτέρω προκλήσεις τίθενται πρόσθετοι περιορισμοί που σχετίζονται με τη στενή γενετική βάση των καλλιεργούμενων ειδών καθώς την περιορισμένη διαθεσιμότητα αλλά και υπερκέρωση των χρησιμοποιούμενων πηγών ανθεκτικότητας που αναπόφευκτα πλήττει τη σταθερότητα της ανθεκτικότητας. Ενόψει της αναγκαιότητας διεύρυνσης της γονιδιακής δεξαμενής με στόχο την επίτευξη ευρείας και σταθερής ανθεκτικότητας, το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται δικαιολογημένα προς την αξιοποίηση των τεχνολογιών της γενετικής μηχανικής που δίνουν τη δυνατότητα στοχευμένης ένθεσης ενός μοναδικού επιθυμητού γονιδίου, ανεξαρτήτως προέλευσης και ταξινομικών εμποδίων, προσφέροντας δυνατότητες επίτευξης υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας ή/και ανοσίας χωρίς περαιτέρω αλλοίωση του οργανισμού -στόχου. Με δεδομένη την περιορισμένη διαθεσιμότητα φυσικών πηγών ανθεκτικότητας φυτικής προέλευσης, η έρευνα ενσωματώνει ολοένα και περισσότερο την αξιοποίηση γονιδίων μη φυτικής προέλευσης που δυνητικά προδίδουν ευρέος φάσματος ανθεκτικότητα. Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε στη διερεύνηση των δυνατοτήτων αξιοποίησης βακτηριακών γονιδίων *hrp/hrc*, που κωδικοποιούν το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS), για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αβιοτικές καταπονήσεις. Αρχικά, η έρευνα εστίασε στη μελέτη της επίδρασης των γονιδίων *hrpZ_{Psph}*, *hpaA* και *hpaB*, που ανήκουν στη συστάδα *hrp/hrc*, ως προς τη δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Έπειτα από τη διαπίστωση ότι οι *hrpZ_{Psph}*-σειρές εμφανίζουν προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας, ως ερευνητικός στόχος τέθηκε η αποσαφήνιση των μηχανισμών που κυβερνούν την ανθεκτικότητά τους, μέσω προσδιορισμού του μεταβολικού τους προφίλ υπό συνθήκες καταπόνησης, και η εύρεση πιθανών μεταβολικών βιοδεικτών που σηματοδοτούν τις μεταβολικές προσαρμογές στις εν λόγω καταπονήσεις.

Στο εισαγωγικό κεφάλαιο περιγράφονται οι επιπτώσεις που επιφέρουν οι καταπονήσεις στα φυτά καθώς και οι αποκρίσεις άμυνας των φυτών σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις. Ακολούθως, γίνεται περιγραφή των βελτιωτικών προσεγγίσεων για την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων, με έμφαση στις τεχνολογίες της γενετικής μηχανικής και στη φύση των χρησιμοποιούμενων πηγών

ανθεκτικότητας. Τέλος, γίνεται αναφορά στις δυνατότητες και προοπτικές που επιφέρει η αξιοποίηση φυτών-μοντέλων στα επιστημονικά πεδία της Βελτίωσης των Φυτών.

Με δεδομένες τις πολυδιάστατες λειτουργικές επιδράσεις των χαρπινών στα φυτά, στο Κεφάλαιο 2 διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}*, από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, για την επίτευξη ανθεκτικότητας στις καταπονήσεις ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. Τα ευρήματα από την αξιολόγηση κατέδειξαν την υπεροχή συγκεκριμένων *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών έναντι των φυτών wt, η οποία στα νεαρά στάδια εκφράστηκε μέσω του υψηλότερου δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων, ενώ στο στάδιο των ώριμων φυτών αποτυπώθηκε στην καθυστερημένη ανάπτυξη και στην εκδήλωση ηπιότερων συμπτωμάτων, στη βελτιωμένη ευρωστία, στο υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης αλλά και στην ικανότητα ανάκαμψης, μετά το πέρας της περιόδου καταπόνησης. Στο σύνολό τους, τα ευρήματα υποδεικνύουν τη θετική επίδραση του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στην επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.

Ακολούθως, αντικείμενο της μελέτης αποτέλεσε η απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών στην καταπόνηση καδμίου (Κεφάλαιο 3) στη φάση της βλάστησης και σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Τα ευρήματα συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές, και ιδιαίτερα οι σειρές #6 και #9, εμφανίζουν προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι της καταπόνησης καδμίου, όπως προκύπτει τόσο από το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων υπό συνθήκες καταπόνησης όσο και από τη φαινοτυπική και φυσιολογική απόκριση στο στάδιο των ώριμων φυτών. Είναι ενδιαφέρον ότι οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές εμφάνισαν διαφορετικό προφίλ συσσώρευσης καδμίου, συγκριτικά με τα φυτά wt. Ειδικότερα, τα φυτά wt εμφάνισαν μεγαλύτερη ποσότητα Cd στα φύλλα, ενώ οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές παρουσίασαν αντίθετο μοτίβο, γεγονός που πιθανά υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού συγκράτησης του Cd στις ρίζες.

Με δεδομένο τον πολυδιάστατο ρόλο του *hrpZ_{P_{sph}}* in planta, που αναδείχθηκε μέσω της παρατηρούμενης ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η κατανόηση της μεταβολικής απόκρισης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών στις ανωτέρω καταπονήσεις και ο εντοπισμός των μεταβολικών συστατικών με καίριο ρόλο στην επαγωγή ανθεκτικότητας. Στο Κεφάλαιο 4 έγινε προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ και συγκριτική αξιολόγηση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας. Τα συνολικά αποτελέσματα υπογραμμίζουν τη διαφορική απόκριση των υπό μελέτη γονοτύπων στην υδατική καταπόνηση, η οποία σημαίνεται πρωτίστως από τις διαφορές στο μεταβολικό περιεχόμενο της σειράς #6 που αναδείχθηκε ως η πλέον ανθεκτική στην ξηρασία κατά τη φάση της βλάστησης αλλά, κυρίως στο στάδιο των ώριμων φυτών. Επιπλέον, η έρευνα ανέδειξε ως βασικούς ρυθμιστές του μεταβολισμού υπό συνθήκες καταπόνησης τα συστατικά L-σερίνη, L- θρεονίνη, μουκικό οξύ και πιπεκολικό οξύ. Με δεδομένο ότι οι διαφορές στο προφίλ συσσώρευσης των ανωτέρω συστατικών σχετίστηκαν με το επίπεδο αντοχής των υπό μελέτη γονοτύπων, προσφέρονται σημαντικές προοπτικές αξιοποίησής τους ως βιοδείκτες για την αναγνώριση των ανθεκτικών γονοτύπων.

Αντίστοιχα, στο Κεφάλαιο 5 προσεγγίστηκε η μελέτη της μεταβολικής απόκρισης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας με στόχο αφενός μεν την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και

αφετέρου τον εντοπισμό των συστατικών που σηματοδοτούν τις μεταβολικές ρυθμίσεις υπό συνθήκες καταπόνησης. Τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν το διακριτό μεταβολικό περιεχόμενο των *hrrZ_{P_{sph}}*-σειρών, συγκριτικά με τα φυτά wt, τόσο απουσία όσο και παρουσία καταπόνησης αλατότητας, παρέχοντας ενδείξεις σχετικά με την επίδραση του *hrrZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό των φυτών του είδους *N. benthamiana*. Μεταξύ των *hrrZ_{P_{sph}}*-σειρών, σημαντική διαφοροποίηση ως προς το μεταβολικό περιεχόμενο εμφάνισε η σειρά #1, η οποία βάσει των ευρημάτων του Κεφαλαίου 2 αναδείχθηκε ως η πλέον ανθεκτική, στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών, έναντι των υπολοίπων *hrrZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt. Ως προς τα συστατικά που σηματοδοτούν τη ρύθμιση του μεταβολισμού υπό συνθήκες καταπόνησης, υπογραμμίζεται η σημαντική συνεισφορά των μεταβολιτών D-γαλακτόζη, L-προλίνη, D-σορβιτόλη, κιτρικό οξύ και μαλονικό οξύ, προσφέροντας δυνατότητες αξιοποίησής τους ως βιοδείκτες ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης υψηλής αλατότητας. Η παρούσα μελέτη προσδίδει καίρια γνώση σχετικά με την επίδραση της χαρπίνης HrrZ_{P_{sph}} στη μεταβολική απόκριση αντοχής στις καταπονήσεις ξηρασίας και υψηλής αλατότητας, συμβάλλοντας παράλληλα στον εντοπισμό των μεταβολικών συστατικών με πρωτεύοντα ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού υπό συνθήκες καταπόνησης.

Στο πλαίσιο αξιοποίησης πρωτεϊνών-τελεστών για την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων, αντικείμενο του Κεφαλαίου 6 αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης του γονιδίου *hpaA* από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, το οποίο βάσει της δράσης του έχει προταθεί ως τελεστής, ως προς την ικανότητα επαγωγής ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε η απόκριση *hpaA*-διαγονιδιακών φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana* στην καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών. Τα συνολικά ευρήματα υποδεικνύουν τη διαφορική απόκριση των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt στις καταπονήσεις της ξηρασίας και της υψηλής αλατότητας και υπογραμμίζουν την υπερέχουσα επίδοση των σειρών #1 και #5 έναντι των υπολοίπων. Η παρούσα μελέτη συνιστά την πρώτη αναφορά σχετικά με την επίδραση της έκφρασης του *hpaA in planta*, παρέχοντας περαιτέρω ενδείξεις σχετικά με τη θετική επίδραση της έκφρασης τελεστών στην άμυνα των φυτών έναντι καταπονήσεων. Παρά την αδυναμία σύνδεσης με συγκεκριμένες μοριακές ή/και βιοχημικές οδούς άμυνας, η παρατηρηθείσα προηγμένη ανθεκτικότητα πιθανά αποδίδεται στην ενεργοποίηση της γενικής άμυνας των φυτών λόγω της ενδογενούς έκφρασης του γονιδίου *hpaA* και, παράλληλα, θέτει τη βάση για την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης που φέρει η έκφραση του γονιδίου *hpaA in planta*.

Με δεδομένο το ρόλο της πρωτεΐνης HraB στην παθογένεια του βακτηριακού φορέα της, καθώς και τη δράση της ως δομικό συστατικό της εκκριτικής συσκευής T3SS, ερευνητικό στόχο του Κεφαλαίου 7 αποτέλεσε η μελέτη των λειτουργικών επιδράσεων του γονιδίου *hpaB in planta*, ως προς την ικανότητα επαγωγής ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Ειδικότερα, μελετήθηκε η απόκριση *hpaB*-σειρών του είδους *N. benthamiana*, από το βακτήριο *Xanthomonas vesicatoria*, στις καταπονήσεις ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Τα ευρήματα υπογραμμίζουν σαφώς την υπεροχή της σειράς #4, η οποία εκφράστηκε σε όλες τις υπό μελέτη παραμέτρους που αφορούν στο δυναμικό βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων, στο ποσοστό επιβίωσης των φυτών, στο χρόνο εκδήλωσης και στην ένταση των συμπτωμάτων, στην ικανότητα ανάκαμψης έπειτα από άρδευση, σε

αναπτυξιακά γνωρίσματα, στην ικανότητα συγκράτησης νερού στα φύλλα και στην περιεκτικότητα χλωροφύλλης και προλίνης. Αν και δεν παρέχεται επαρκής αιτιολόγηση σχετικά με τους μηχανισμούς που διέπουν την παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα, καθώς η παρούσα μελέτη συνιστά την πρώτη αναφορά σχετικά με τη λειτουργική επίδραση του *hpaB in planta*, τα ευρήματα προσφέρουν προοπτικές αξιοποίησης του γονιδίου *hpaB* για την αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων.

Τέλος, η Γενική Συζήτηση (Κεφάλαιο 8) επικεντρώνεται σε μία ανασκόπηση των βελτιωτικών προσεγγίσεων για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων, δίδοντας έμφαση στις τεχνολογίες της γενετικής μηχανικής. Τα αποτελέσματα της μελέτης συζητώνται υπό το πρίσμα της συνεισφοράς τους στην απόκτηση βασικής γνώσης αλλά και των προοπτικών αξιοποίησής τους στην έρευνα για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων. Η Γενική Συζήτηση ολοκληρώνεται με μία κριτική ανασκόπηση των νέων τεχνολογιών βελτίωσης, οι οποίες εμπλουτίζουν δραματικά τη φαρέτρα των βελτιωτών, σύμφωνα με το ρυθμό ανάπτυξής τους και τεκμηρίωσης της αποτελεσματικότητάς τους αλλά και του ρυθμιστικού πλαισίου που αναμένεται να καθορίσει το πλαίσιο εφαρμογής τους για ανάπτυξη και χρήση ποικιλιών με γενετική ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων.

Summary

Plants' exposure to unfavorable environments is extremely insecure for their productivity and survival, bringing about at the same time breeding schemes'-related appropriate adjustments, which aim at developing plant varieties resistant against stress factors as the most sustainable approach towards ensuring economic sustainability at a global level. Achieving resistance against stress factors is traditionally approached through selection of resistant genotypes and/or cross- transfer of resistant traits. Despite the unquestionable achievements of conventional breeding techniques, their effectiveness is limited by polygenic resistance traits, the existence of genotype-environment interaction, the need of large-scale evaluation of genotypes, the application of multiple cycle selection, as well as the difficulty in achieving uniform stress conditions at the field level. The above challenges are subjected to additional constraints regarding the narrow genetic base of crop species as well as the limited availability and the overexpression of utilized resistance sources, which inevitably affects resistance stability. In view of the necessity to expand the gene pool in order to achieve broad and stable resistance, research interest is justifiably turned to the exploitation of genetic engineering techniques which offer the possibility of targeted integration of a single favorable gene, regardless of origin and taxonomic barriers, offering opportunities of achieving of high-level resistance and/or immunity without further alteration of the target-organism. Given the limited availability of natural sources of plant-derived resistance, research increasingly incorporates the exploitation of non-plant origin genes that potentially confer broad spectrum resistance. The present dissertation aimed at deciphering the possibilities upon exploitation of bacterial *hrp/hrc* genes, which encode T3SS, to confer resistance against abiotic stresses. Firstly, the research focused on the investigation of *hrpZ_{P_{sph}}*, *hpaA* and *hpaB* gene expression, which belong to *hrp/hrc* cluster, for the development of resistance against abiotic stresses. Following the finding that *hrpZ_{P_{sph}}*-lines exhibit enhanced resistance against drought and salinity stress, the aim of the research was to decipher the mechanisms that govern the observed resistance, through the determination of plant metabolic profile under stress conditions and to find possible metabolic biomarkers that mark the metabolic adaptations under stress conditions.

The introductory chapter describes the effects of stresses on plants as well as plant defense responses under abiotic and biotic stresses. A description of breeding approaches for the development of resistance against abiotic and biotic stresses follows, with an emphasis on genetic engineering techniques and the origin of utilized sources of resistance. Finally, a reference is made to the potential and prospects of the use of model plants in the fields of Plant Breeding.

Given the multifaceted effects of harpins on plants, Chapter 2 investigates the possibility of exploitation of *hrpZ_{P_{sph}}* gene from *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* to confer resistance against drought and salinity stress. The findings showed the prevalence of specific *hrpZ_{P_{sph}}*-lines compared to wt plants, which at primary developmental stage was expressed through the enhanced seed germination and seedling growth potential, while at the vegetative state was reflected in the delayed and milder symptom development, the enhanced vigor, the higher survival rate and the recovery capacity after the period of stress.

Overall findings indicate the positive effect of *hrpZ_{P_{sph}}* gene to induce resistance against drought and salinity stress.

Afterwards, the aim of the study was the response of *hrpZ_{P_{sph}}*-lines under cadmium stress (Chapter 3) at the seedling stage and at later developmental stages. The findings support the conclusion that *hrpZ_{P_{sph}}*-lines, namely lines #6 and #9 exhibit enhanced resistance against cadmium stress, as shown by the seed germination and seedling growth potential under stress conditions and the phenotypic and physiological response at the vegetative state. It is surprising that *hrpZ_{P_{sph}}*-lines exhibited a differential cadmium accumulation pattern compared to wt plants. Specifically, wt plants displayed increased cadmium content in the leaves, whereas *hrpZ_{P_{sph}}*-lines displayed an opposite accumulation trend, which possibly indicates the existence of a Cd retention mechanism within the roots.

Given the multifaceted role of *hrpZ_{P_{sph}}* in *planta*, which was reflected by the observed resistance against abiotic stresses, the research objective was the understanding of *hrpZ_{P_{sph}}*-lines' metabolic response under the above stresses and the discovery of metabolic components that play a key role in the induction of resistance. In chapter 4, a determination of plant metabolic profile is made as well as a comparative evaluation of *hrpZ_{P_{sph}}*-lines and wt plants under drought stress conditions. Overall results underline the differential response of the studied genotypes under water stress conditions, which is primarily shown by the differences in metabolic content of line #6, identified as the most resistant to drought stress both at the seedling stage and mainly at the vegetative state. Furthermore, the study highlighted L-serine, L-threonine, mucic acid and pipecolic acid as key regulators under stress conditions. Considering that the differences in the accumulation trend of the above components correlated with the level of resistance of the studied genotypes, significant prospects are offered for their exploitation as biomarkers for the identification of resistant genotypes.

By analogy, in Chapter 5 an approach to the study of the metabolic response of *hrpZ_{P_{sph}}*-lines under salinity stress is adopted, with an aim to understand the mechanisms that govern the resistance of *hrpZ_{P_{sph}}*-lines and to identify the components that signal the metabolic regulations under stress conditions. The results underline the discrete metabolic content of *hrpZ_{P_{sph}}*-lines, compared to wt plants, both under normal and under stress conditions, providing evidence regarding the effect of *hrpZ_{P_{sph}}* gene on the metabolism of *N. benthamiana* plants. Among *hrpZ_{P_{sph}}*-lines, line #1 exhibited significant differentiation as to its metabolic content, which based on the evidence of Chapter 2 was identified as the most resistant to stress compared to other *hrpZ_{P_{sph}}*-lines and wt plants both at the seedling stage and at the vegetative state. In relation to the components that signal the metabolic regulation under stress conditions, the significant contribution of D-galactose, L-proline, D-sorbitol, citric acid and malonic acid is underlined, providing prospects for their exploitation as resistance biomarkers against salinity stress. The resent study offers crucial knowledge regarding the effect of harpin HrpZ_{P_{sph}} on the metabolic resistance response under drought and salinity stress, while contributing to the identification of metabolic components with key role in the metabolic regulation under stress conditions.

In the framework of exploiting effector proteins to induce resistance against stress factors, the objective of Chapter 6 was the investigation of *hpaA* gene effect from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, which based on its function has been proposed as effector as to

the ability to induce resistance against stresses. For this purpose, the response of *hpaA*-transgenic *Nicotiana benthamiana* plants was studied under drought and salinity stress at the seedling stage and at the vegetative state. Overall results indicate the differential response of *hpaA*-lines and wt plants under drought and salinity stress and emphasize the superior performance of lines #1 and #5 over the others. The present study constitutes the first report regarding the effect of *hpaA* expression *in planta*, providing further evidence about the positive effect of effector expression on plants' response against stress factors. Despite the inability to relate with known molecular and/or biochemical defense pathways, the observed increased resistance is possibly attributed to the induction of a general plant defense response due to the endogenous expression of *hpaA* gene and, in parallel, forms the basis for the further investigation regarding the effect of *hpaA* gene expression *in planta*.

Given the role of HpaB protein on bacterial pathogenicity, as well as its function as a structural component of T3SS, the objective of Chapter 7 was the study of the functional effects of *hpaB* gene *in planta*, as to its ability to confer resistance against abiotic stresses. In particular, the response of *hpaB*-lines of *N. benthamiana* plants from *Xanthomonas vesicatoria* was studied under drought and salinity stress at the seedling stage and later developmental stages. The evidence clearly underline the superiority of line #4, reflected in all parameters studied, regarding the seed germination and seedling growth potential, the survival rate, the time and intensity of symptoms, the recovery capacity following normal irrigation, growth traits, the ability to retain water in the leaves and the chlorophyll and proline content. Although the mechanisms governing the observed resistance are not adequately supported, as this study consists the first report regarding the functional effect of *hpaB* gene *in planta*, the results offer significant prospects for the exploitation of *hpaB* gene to enhance resistance against stresses.

Finally, General Discussion (Chapter 8) focuses on a review on the breeding approaches for the induction of resistance against stresses, with an emphasis on genetic engineering techniques. The results of the study are discussed in view of their contribution on acquiring basic knowledge and exploitation prospects in the research to induce resistance against stresses. General Discussion ends with a critical review of the new breeding techniques, which dramatically enrich breeders' quiver in relation to their developmental rate and validation of effectiveness as well as the regulatory framework that is expected to define their scope for development and use of crop varieties with genetic resistance against stress factors.

Κεφάλαιο 1

Γενική Εισαγωγή

Τα φυτά, λόγω της στατικής τους φύσης, δέχονται μια πληθώρα ερεθισμάτων, περιβαλλοντικών και μη, που διαταράσσουν τη φυσιολογική τους ανάπτυξη καθόλη τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου. Τα ερεθίσματα αυτά, που ορίζονται ως παράγοντες καταπόνησης, επιδρούν αρνητικά στην αύξηση και ανάπτυξη, μειώνοντας παράλληλα την παραγωγικότητα και τη δυνατότητα επιβίωσης των φυτών στο περιβάλλον ανάπτυξής τους, με αποτέλεσμα να διαμορφώνεται ανάλογα η κατανομή των φυτικών ειδών στα οικοσυστήματα (Osmond et al. 1987). Παράλληλα, συχνά απειλείται η επάρκεια τροφίμων και αγαθών σε παγκόσμια κλίμακα, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες μειώνοντας την απόδοση και την ποιότητα της παραγωγής στη γεωργία και στη δασοκομία. Σύμφωνα με τα ευρήματα παγκόσμιας έρευνας για τις κύριες καλλιέργειες τροφίμων, τα παθογόνα, έντομα, παράσιτα και ζιζάνια προκαλούν απώλειες απόδοσης που κυμαίνονται κατά μέσο όρο από 17,2 % στην πατάτα έως 30,0 % στο ρύζι (Savary et al. 2019). Ομοίως, οι κύριες αβιοτικές καταπονήσεις, όπως οι ακραίες θερμοκρασίες, η ξηρασία, καθώς και η ανεπάρκεια και η τοξικότητα των θρεπτικών συστατικών των φυτών, προκαλούν έως και 82 % ετήσια απώλεια της απόδοσης των καλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο (Oshunsanya et al. 2019; Zhang et al. 2020). Η έκθεση των φυτών σε μεταβολές στη ροή φωτονίων, μικρές θερμοκρασιακές μεταβολές ή αυξομειώσεις της ατμοσφαιρικής υγρασίας, οι οποίες οδηγούν σε ταχείες προσαρμογές των μεταβολικών ροών και του ρυθμού φωτοσύνθεσης και διαπνοής, δεν αποτελούν συνθήκες καταπόνησης υπό τη γενική έννοια του όρου (Lichtenthaler 2006).

Ανάλογα με τη φύση της προέλευσής τους, οι καταπονήσεις διακρίνονται σε αβιοτικές, βιοτικές και ανθρωπογενείς. Στις αβιοτικές καταπονήσεις συγκαταλέγονται αυτές που οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, φυσικούς ή χημικούς, και συνήθως προκαλούνται από την έλλειψη ή την περίσσεια τους (Gull et al. 2019; Zhang et al. 2020). Οι βιοτικές καταπονήσεις προκύπτουν εξαιτίας προσβολών από παθογόνους οργανισμούς και έντομα ή εχθρούς, ενώ οι ανθρωπογενείς αποδίδονται σε καλλιεργητικές πρακτικές ή ανθρωπινες παρεμβάσεις που αποβαίνουν επιζήμιες (Lichtenthaler, 2006; Gull et al. 2019).

Αβιοτικές καταπονήσεις

Στις αβιοτικές καταπονήσεις εντάσσονται περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η ανεπάρκεια ή υπερεπάρκεια εδαφικής υγρασίας, η υψηλή αλατότητα, οι ακραίες θερμοκρασίες, η ιονίζουσα και η υπεριώδης ακτινοβολία, η αυξημένη συσσώρευση βαρέων μετάλλων στο έδαφος και στο νερό, η περίσσεια ή έλλειψη θρεπτικών στοιχείων στο εδαφικό διάλυμα και ορισμένοι μηχανικοί παράγοντες (Lichtenthaler 2006; Calanca 2017). Οι καταπονήσεις αυτές, που συχνά οφείλονται στην επίδραση της κλιματικής αλλαγής, δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών, ανάλογα με το είδος, την ένταση και τη διάρκεια της καταπόνησης. Οι μεταβολές που λαμβάνουν χώρα υπό την επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων αποτυπώνονται σε πλήθος διεργασιών, με τις γενικές επιπτώσεις ωστόσο να αφορούν σε αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και της ροής ηλεκτρονίων (Gururani et al. 2015; Zhang et al. 2020), προκαλώντας παράλληλα

επιδράσεις σε μορφολογικό, φυσιολογικό, βιοχημικό και μεταβολικό επίπεδο. Παρά το εύρος των επιπτώσεων που προκαλούνται κατά την επικράτηση αβιοτικών καταπονήσεων, οι πλέον επιζήμιοι παράγοντες, με βάση τις απώλειες απόδοσης που συντελούνται, είναι η έλλειψη εδαφικής υγρασίας, η ιοντική ανισορροπία και οι ακραίες θερμοκρασίες.

Η υδατική καταπόνηση σε νεαρά αναπτυξιακά στάδια οδηγεί σε μείωση του ρυθμού διαίρεσης και επιμήκυνσης των κυττάρων, η οποία αποτυπώνεται μέσω του περιορισμού του δυναμικού βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων (Schuppler et al. 1998; Farooq et al. 2009). Σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, η υδατική καταπόνηση προκαλεί μείωση της αγωγιμότητας των στομάτων και παρεμπόδιση της εύρυθμης λειτουργίας του φωτοσυστήματος II της φωτοσύνθεσης και της πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων από το εδαφικό διάλυμα, επιφέροντας φαινοτυπικές επιδράσεις που αφορούν σε μαρασμό των φύλλων, μειωμένη ποσότητα χλωροφύλλης και μειωμένο ύψος των φυτών (Farooq et al. 2009; Dong et al. 2019; Kapoor et al. 2020). Σε βιοχημικό επίπεδο, οι επιδράσεις της καταπόνησης ξηρασίας περιλαμβάνουν μεταβολές στη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων, με κυριότερα την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την καταλάση (CAT) και την υπεροξειδάση (POX), και στη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενώσεων, όπως η γλουταθειόνη (GSH) και τα καροτενοειδή (Abid et al. 2018; Qayyum et al. 2018), εξαιτίας της αυξημένης παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Σε μεταβολικό επίπεδο, σημειώνεται αυξημένη κατανάλωση των ενεργειακών αποθεμάτων των κυττάρων και συντελούνται μεταβολές στη συσσώρευση πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών, κυρίως στα επίπεδα των υδατανθράκων, αμινοξέων, οργανικών οξέων και λιπαρών οξέων (Shu et al. 2011; Ahkami et al. 2019; Khan and Khan 2019).

Αντίστοιχα, η υψηλή αλατότητα προκαλεί ανάσχεση της βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων, που εκφράζεται μέσω της μειωμένης ανάπτυξης της ρίζας και του βλαστού (Santo et al. 2017; Dehnavi et al. 2020). Οι επιδράσεις της καταπόνησης αλατότητας στο φαινότυπο αποδίδονται κυρίως σε οσμωτική καταπόνηση και σε διαταραχές στις αναλογίες θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος και, σε μικρότερο βαθμό, στην εμφάνιση τοξικότητας εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης ιόντων Na^+ και Cl^- (Kaya et al. 2006; Munns and Tester 2008; Rahnama et al. 2019; Zörb et al. 2019). Σε βιοχημικό επίπεδο, η καταπόνηση αλατότητας επιδρά αρνητικά στη σύνθεση πρωτεϊνών, στη σταθερότητα των μεμβρανών και στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, λόγω αυξημένης σύνθεσης ROS (Abid et al. 2020). Παράλληλα, η καταπόνηση αλατότητας επιφέρει δραστικές μεταβολές σε μεταβολικό επίπεδο, επηρεάζοντας σημαντικά τα επίπεδα υδατανθράκων, αμινοξέων, πολυαμινών, οργανικών ενώσεων, φαινολικών ενώσεων, καροτενοειδών, αλκαλοειδών και τερπενοειδών (Shen et al. 1999; Arbona et al. 2013; Patel et al. 2020; Jan et al. 2021; Riseh et al. 2021).

Η αυξημένη συσσώρευση βαρέων μετάλλων επιφέρει ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στα λιπίδια των μεμβρανών με επακόλουθες μεταβολές στη δομή και στην πολικότητα των μεμβρανών (Devi and Prasad 2004). Παράλληλα, τα βαρέα μέταλλα επηρεάζουν δυσμενώς τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και την απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων και νερού από το εδαφικό διάλυμα, επιφέροντας έμμεσα τροφопενίες σε διάφορα στοιχεία (Sharma and Agrawal 2005). Σε βιοχημικό επίπεδο, η υψηλή συσσώρευση βαρέων μετάλλων σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ROS και ελεύθερων ριζών στα φυτικά κύτταρα, που

παράγονται είτε άμεσα μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης ή αντιδράσεων τύπου Haber-Weiss είτε έμμεσα μέσω της μειωμένης δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων ή διαταραχών στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Yadav 2010). Επιπλέον, οι ROS και οι ελεύθερες ρίζες επιδρούν αρνητικά σε ένα πλήθος μορίων και ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των νουκλεϊκών οξέων, αμινοξέων και πρωτεϊνών, επηρεάζοντας το συνολικό μεταβολισμό των φυτών και πλήττοντας την ανάπτυξη, παραγωγικότητα και ικανότητα επιβίωσής τους.

Αναφέρεται ωστόσο ότι η ανάσχεση της φυτικής ανάπτυξης υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης δεν αποτελεί μια παθητική απόκριση των φυτών αλλά, αντίθετα, συνιστά μία απόκριση προσαρμογής που στοχεύει στη βέλτιστη διαχείριση των αποθεμάτων ενέργειας και εξασφάλιση της επιβίωσής τους, γεγονός που αντανακλάται στην ταχεία μείωση της ανάπτυξης συγκριτικά με το ρυθμό φωτοσύνθεσης (Zhang et al. 2020).

Η απόκριση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων

Η απόκριση των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις περιλαμβάνει μια σειρά μηχανισμών σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο που αφορούν σε μεταβολές στις κυτταρικές δομές και στη φυσιολογία των φυτών, καθώς και στην ενεργοποίηση σύνθετων βιοχημικών και μεταβολικών μονοπατιών που συμβάλλουν στην αντίληψη και διασυστηματική μεταφορά σημάτων (Jeandroz and Lamotte 2017; He et al. 2018). Στο σύνολό τους, οι μηχανισμοί άμυνας στοχεύουν στον περιορισμό των επιπτώσεων ή στην αποκατάσταση των βλαβών που επιφέρουν οι αβιοτικές καταπονήσεις και στη διατήρηση της ομοιόστασης των φυτών, όπως αντανακλάται από τις μεταβολές σε πρωτεομικό, μεταγραφικό και μεταβολικό επίπεδο που συμβαίνουν ήδη από την έναρξη της καταπόνησης (Zhang et al. 2020). Αξίζει δε να αναφερθεί ότι οι προσαρμογές των φυτών σε μορφολογικό επίπεδο εμφανίζουν σχετική ομοιότητα μεταξύ των αβιοτικών καταπονήσεων, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανότητα ύπαρξης ενός διακριτού μηχανισμού που λειτουργεί σε επίπεδο κυττάρων ή οργανισμού (Patakas 2012). Υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας, παρατηρούνται μορφολογικές και ανατομικές προσαρμογές που αφορούν σε μεταβολές στην επιφάνεια και το πάχος των φύλλων, με κυριότερο το πάχος της επιδερμίδας, στα οργανίδια των φύλλων, και κυρίως στους χλωροπλάστες, καθώς και στο μήκος, στη διάμετρο, στην αρχιτεκτονική και στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος (Poljakoff – Mayber 1975; Liu et al. 2017). Αντίστοιχα, η απόκριση των φυτών στην καταπόνηση βαρέων μετάλλων περιλαμβάνει αναστολή του ρυθμού κυτταρικών διαιρέσεων στο μερίστωμα της ρίζας και σχηματισμό ριζικών τριχιδίων και πλάγιων ριζών.

Σε επόμενο στάδιο, η απόκριση των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις περιλαμβάνει μια σειρά μηχανισμών που στοχεύουν αρχικά στην αντίληψη του σήματος στο σημείο επαφής με την καταπόνηση και μετά, στη μεταγωγή του σήματος διασυστηματικά. Η αντίληψη του σήματος κινδύνου επιτελείται μέσω ειδικών υποδοχέων, όπως τα φυτοχρώματα και οι πρωτεϊνικές κινάσες, με κύριες τις κινάσες SnRK2. Οι τελευταίες, έχουν διαφοροποιηθεί σημαντικά στο πέρας της εξέλιξης και συμβάλλουν επιπλέον στην προσαρμογή του συνολικού μεταβολισμού των φυτών (Zhu et al. 2016). Ακολουθώς, οι πρωτεϊνικές κινάσες CPKs και MAPKs μεταφέρουν το σήμα εντός των κυττάρων, όπου ενεργοποιείται ο μηχανισμός παραγωγής σηματοδοτικών μορίων που περιλαμβάνει ROS, ABA, H₂S, NO, πολυαμίνες, Ca²⁺, καθώς και άλλους ρυθμιστές, με κύριους τους μεταγραφικούς

παράγοντες (Transcription Factors, TFs) τύπου NAC (Tuteja et al. 2011; He et al. 2018). Τα παραπάνω μόρια είτε καθορίζουν τα επίπεδα Ca^{2+} εντός των κυττάρων είτε συμμετέχουν στην ενεργοποίηση μιας αλυσίδας πρωτεϊνικής φωσφορύλωσης, που οδηγεί στην έκφραση γονιδίων άμυνας μέσω μεταγραφικού ελέγχου (MYC/MTB, CBF/DREB).

Επιπρόσθετα, τα φυτά έχουν αναπτύξει ένα μηχανισμό αποτοξικοποίησης των ROS που παράγονται υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει μεταβολές στη δραστηριότητα ενζυματικών και μη μορίων, τα οποία μπορούν να λειτουργούν συνεργιστικά με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών. Στα κύρια ενζυματικά μόρια εντάσσονται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR), η ασκορβική υπεροξειδάση (APX) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), ενώ στα μη ενζυματικά μόρια εντάσσονται ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, όπως η γλουταθειόνη (GSH), το ασκορβικό οξύ (AsA) και τα καροτενοειδή (Huang et al. 2019). Η αποτοξικοποίηση των ROS ενισχύεται επίσης από μεταβολικές προσαρμογές που συμβάλλουν στη μείωση της παραγωγής τους καθώς και από μηχανισμούς διατήρησης της συγκέντρωσης μετάλλων, όπως ο Fe^{2+} , που στοχεύουν στον περιορισμό του σχηματισμού τοξικών υδροξυλίων ($-\text{OH}$). Αναφέρεται ωστόσο ότι, εφόσον τα φυτικά κύτταρα διατηρούν επαρκή αποθέματα ενέργειας για την αποτοξικοποίηση των ROS, η συνεισφορά των ROS έχει θετικό πρόσημο καθώς συμβάλλουν στην προσαρμογή του συνολικού μεταβολισμού και στη βελτιωμένη απόκριση στην καταπόνηση (Choudhury et al. 2017). Επιπλέον, οι αποκρίσεις άμυνας των φυτών περιλαμβάνουν μεταβολικές προσαρμογές, με κύρια την αύξηση της συσσώρευσης οσμωπροστατευτικών ενώσεων, οι οποίες είναι ηλεκτρικά ουδέτερες και εμφανίζουν υψηλή διαλυτότητα και χαμηλή τοξικότητα, ενώ η συγκέντρωσή τους δεν επιδρά στο μεταβολισμό των κυττάρων. Στις οσμωπροστατευτικές ενώσεις εντάσσονται υδατάνθρακες -όπως η σουκρόζη, η τρεχαλόζη και η φρουκτόζη-, αμινοξέα -όπως η προλίνη και η βεταΐνη της γλυκίνης- και πολυόλες, οι οποίες συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα εξυπηρετώντας τη μεταφορά άνθρακα και ενέργειας μεταξύ των οργάνων παραγωγής και κατανάλωσης, την άμβλυνση των επιπτώσεων του χαμηλού υδατικού δυναμικού και την έμμεση προστασία της ενζυμικής δραστηριότητας και ακεραιότητας των μεμβρανών. Γενικά, οι οσμωπροστατευτικές ενώσεις φέρουν πολυδιάστατο ρόλο στις αποκρίσεις άμυνας, συμβάλλοντας στην επαγωγή της έκφρασης γονιδίων άμυνας, στη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων μέσω συνεχούς παροχής νερού, στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και των μεμβρανών, στην αναστολή της οξειδωσης λιπιδίων και στην ενίσχυση της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (Tuteja et al. 2011; Gupta and Huang 2014; He et al. 2018; Ahmad et al. 2020).

Περαιτέρω, η απόκριση των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις περιλαμβάνει την ενεργοποίηση βιοχημικών μονοπατιών, με κυριότερο το μονοπάτι του ABA. Το ABA συμβάλλει στην άμυνα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων μέσω της εμπλοκής του στη σύνθεση διαφόρων πρωτεϊνών, όπως οι πρωτεΐνες που φυσιολογικά συντίθενται σε μεγάλες ποσότητες στο τέλος της εμβρυογένεσης και είναι γνωστές ως Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA), και στην αυξημένη συσσώρευση οσμωπροστατευτικών ενώσεων (Verslues et al. 2006; Dar et al. 2017). Χαρακτηριστικά, η αύξηση των επιπέδων ABA εντός των κυττάρων συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα έναντι της καταπόνησης αλατότητας, μέσω της συσσώρευσης K^+ , Ca^{2+} καθώς και προλίνης και υδατανθράκων στο ριζικό σύστημα, αντισταθμίζοντας την απορρόφηση Na^+ and Cl^- (Gupta

and Huang 2014). Αντίστοιχα, υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, το ABA εμπλέκεται στο κλείσιμο των στομάτων, στη μείωση της σπαργής των κυττάρων και στη ροή ιόντων προς το εξωτερικό των κυττάρων, διεργασίες οι οποίες συμβάλλουν σε μείωση των απωλειών νερού και επομένως σε βελτιωμένη απόκριση στην καταπόνηση (He et al. 2018; Rasool et al. 2019).

Βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι αβιοτικών καταπονήσεων

Εν όψει των επιπτώσεων των καταπονήσεων στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών και της παράλληλης αυξανόμενης ζήτησης τροφής για την κάλυψη των αναγκών του παγκόσμιου πληθυσμού, η επιστήμη της βελτίωσης των φυτών διαδραματίζει καίριο ρόλο στοχεύοντας στην ανάπτυξη ποικιλιών που διατηρούν το δυναμικό απόδοσής τους σε μη βέλτιστες περιβαλλοντικές συνθήκες. Παραδοσιακά, η ανάπτυξη ποικιλιών με γενετική ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων προσεγγίζεται μέσω της επιλογής ανθεκτικών γονοτύπων ή/και της μεταφοράς γνωρισμάτων ανθεκτικότητας σε ευαίσθητους γονοτύπους μέσω διασταυρώσεων. Σύμφωνα με την κλασική βελτιωτική διαδικασία, επιδιώκεται η αξιοποίηση της γενετικής παραλλακτικότητας που υφίσταται στη διαθέσιμη γονιδιακή δεξαμενή, η οποία περιλαμβάνει άλλες καλλιεργούμενες ποικιλίες, συγγενικά είδη ή/και γένη καθώς και άγριους πληθυσμούς και άγρια συγγενικά είδη, μέσω της εφαρμογής ποικίλων βελτιωτικών σχημάτων, συμπεριλαμβανομένων αυτών της γενεαλογικής επιλογής, της αναδιασταύρωσης και, σε πληθυσμιακό επίπεδο, της επαναλαμβανόμενης επιλογής. Στο πλαίσιο αυτό, η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας συχνά βασίζεται στην αξιοποίηση πληθυσμών που αναπτύσσονται σε αλατούχα ή μερικώς αλατούχα εδάφη, καθώς ο φαινότυπος ανθεκτικότητας συνδέεται στενά με τη χαμηλή απορρόφηση ιόντων Na^+ και Cl^- από το εδαφικό διάλυμα (Blum and Jordan 1985). Παρά το γεγονός ότι οι εν λόγω προσεγγίσεις συνέβαλαν στην ανάπτυξη ποικιλιών ανθεκτικών στις καταπονήσεις ξηρασίας και υψηλής αλατότητας, η αποτελεσματικότητά τους περιορίζεται σημαντικά από τον πολυγονιδιακό έλεγχο των σχετικών γνωρισμάτων που απαιτεί πολλαπλούς κύκλους επιλογής ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο ανθεκτικότητας καθώς και τη σημαντική αλληλεπίδραση γονοτύπου - περιβάλλοντος ($G \times E$), που καθιστά απαραίτητη την αξιολόγηση σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Meena et al. 2016). Επιπλέον, οι επιλογές μεγάλης έντασης ενέχουν τον κίνδυνο απώλειας χρήσιμης γενετικής παραλλακτικότητας (Fita et al. 2015; Ahmar et al. 2020), ενώ τα προβλήματα αυξάνονται από τη συχνή μεταφορά ανεπιθύμητων γονιδίων που συνδέονται στενά με το(α) υπό ενσωμάτωση γονίδιο(α) σε προγράμματα αναδιασταύρωσης.

Με βάση τα παραπάνω, παρά τα αδιαμφισβήτητα επιτεύγματα της κλασικής βελτίωσης φυτών αναφορικά με την ανάπτυξη ποικιλιών με γενετική ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων, η φαρέτρα των βελτιωτών εμπλουτίζεται συνεχώς με νέες τεχνολογίες, σύμφωνα με το ρυθμό ανάπτυξής τους και την τεκμηρίωση της αποτελεσματικότητάς τους. Στο πλαίσιο αυτό, οι μοριακές μέθοδοι βελτίωσης, που αναπτύχθηκαν από τη δεκαετία του 1990, έχουν συνδράμει ουσιαστικά στη βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων (Ahmar et al. 2020), με κυριότερη σχετική εφαρμογή αυτή της υποβοηθούμενης από δείκτες επιλογής (Marker Assisted Selection, MAS). Οι δομικοί μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA φαινοτυπικά ουδέτερα, χωρίς περιβαλλοντική

εξάρτηση που εμφανίζουν υψηλή σύνδεση με τα επιθυμητά γονίδια ή τους γενετικούς τόπους που ελέγχουν ποσοτικά γνωρίσματα (Quantitative Trait Loci, QTL). Στους πλέον χρησιμοποιούμενους μοριακούς δείκτες εντάσσονται οι RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs), SSRs (Simple Sequence Repeats), RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) και SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Η χρήση τους συμβάλλει στην εξάλειψη του φορτίου σύνδεσης (linkage drag), κυρίως κατά τη μεταφορά γονιδίων από άγρια συγγενικά είδη, ενώ η ευρεία αξιοποίησή τους σε προγράμματα βελτίωσης βασίζεται στην κατασκευή γενετικών χαρτών για τον εντοπισμό των QTLs που ελέγχουν επιθυμητά γνωρίσματα και την τεκμηρίωση της αποτελεσματικότητάς τους ως προς τη δυνατότητα ανίχνευσης των επιθυμητών φαινοτύπων (Fita et al. 2015). Στο πλαίσιο ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, και ιδιαίτερα αυτών της ξηρασίας, υψηλής αλατότητας και ακραίων θερμοκρασιών, η έρευνα στη βελτίωση φυτών εντάσσει ολοένα και περισσότερο την επιλογή με τη χρήση μοριακών δεικτών, με πληθώρα αναφορών να καταδεικνύει την αποτελεσματικότητά της. Στοχεύοντας στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας του αραβοσίτου έναντι της ξηρασίας, έχει γίνει εντοπισμός των QTLs που ελέγχουν γνωρίσματα σχετιζόμενα με την ανθεκτικότητα, όπως η γήρανση, ο χρόνος άνθησης, το διάστημα από την άνθηση έως το μετάξωμα, το ύψος των φυτών και του σπάδικα, ενώ στην κράμβη έχει γίνει εντοπισμός γονιδίων που εμπλέκονται στη σηματοδότηση και την οσμωτική προσαρμογή έναντι της καταπόνησης ξηρασίας, με κυριότερο αυτό της βιοσύνθεσης προλίνης (Gantait et al. 2019). Αντίστοιχα, η αξιοποίηση των μοριακών δεικτών με στόχο την αναβάθμιση της ανθεκτικότητας στην υψηλή αλατότητα συνέβαλε στον καθορισμό της γενετικής βάσης των σχετικών γνωρισμάτων καθώς και στον εντοπισμό των QTLs με σημαντική συνεισφορά στην παραλλακτικότητα σχετικά με τις αποκρίσεις άμυνας των φυτών (Blumwald et al. 2004). Χαρακτηριστικά είναι τα ευρήματα σχετικά με τη δράση του γονιδίου *Saltol*, το οποίο ελέγχει την απορρόφηση ιόντων Na^+ και K^+ , σε φυτά ρυζιού καθώς και η ενσωμάτωση γονιδίων που ρυθμίζουν την ανθεκτικότητα στην αλατότητα και στην πυρικουλάρια του ρυζιού σε elite γενετικό υλικό, ενώ στην τομάτα η έρευνα συνέβαλε στην εύρεση QTLs που επηρεάζουν τη βλάστηση καθώς και άλλα γνωρίσματα, όπως η αποτελεσματικότητα χρήσης νερού, ο αριθμός και το βάρος των καρπών υπό συνθήκες καταπόνησης (Das and Rao 2015; Gantait et al. 2019). Παρά τις ενδείξεις σχετικά με τις δυνατότητες και προοπτικές αξιοποίησης των μοριακών δεικτών με στόχο την αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, η ευρεία αξιοποίησή τους περιορίζεται σημαντικά από τη μειωμένη αποτελεσματικότητα στην περίπτωση πολυγονιδιακών γνωρισμάτων που ελέγχονται από μεγάλο αριθμό QTLs καθώς και την περιορισμένη διαθεσιμότητα φυσικών πηγών ανθεκτικότητας. Παράλληλα, η χρήση τους συχνά συνοδεύεται από φαινόμενα επιστατικής δράσης γονιδίων, κατά την οποία η έκφραση του επιθυμητού φαινοτύπου δύναται να επισκιαστεί λόγω αλληλεπίδρασης με άλλα γονίδια (Hospital 2009).

Με δεδομένους τους περιορισμούς που τίθενται κατά την εφαρμογή των κλασικών διαδικασιών βελτίωσης, συμπεριλαμβανομένων αυτών της MAS, τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς την αξιοποίηση των σύγχρονων μοριακών τεχνολογιών, με έμφαση σε αυτές της γονιδιωματικής και της γενετικής μηχανικής. Στο επίκεντρο των προοπτικών αξιοποίησης των νέων τεχνολογιών βρίσκεται η δυνατότητα διεύρυνσης της γονιδιακής δεξαμενής, είτε μέσω της δημιουργίας νέας γενετικής παραλλακτικότητας με εισαγωγή μεταλλάξεων είτε μέσω της ενσωμάτωσης

διαγονιδίων, ακόμη και μη-φυτικής προέλευσης, ανεξαρτήτως ταξινομικών εμποδίων (Dhariwal et al. 1998; Moose and Mumm 2008; Anwar and Kim 2020). Στοχεύοντας στην επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι της ξηρασίας έχει εφαρμοστεί η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα σχετικά με τη βιοσύνθεση ABA, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το γονίδιο *AtZEP* που κωδικοποιεί το ένζυμο ζεαξανθίνη της εποξειδάσης, το γονίδιο *rd29a*, τις πρωτεΐνες DREB (Dehydration-Responsive Element Binding) καθώς και μεταγραφικούς παράγοντες που μπορεί να εμπλέκονται ή όχι στη μεταφορά σημάτων μέσω ABA, όπως αυτοί που ανήκουν στις ομάδες NAC, WRKY, RING finger και ZF (Jewel et al. 2010). Παράλληλα, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην ξηρασία έχει προσεγγιστεί μέσω ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που συμβάλλουν στην αντίληψη και μεταφορά σημάτων, όπως αυτά που κωδικοποιούν ROS (Reactive Oxygen Species), MAPK (Mitogen-activated protein kinase) κινάσες και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σηματοδότηση και εξαρτώνται από το Ca^{2+} (Hong-Bo et al. 2008; Jewel et al. 2010; Wani et al. 2017). Προς την ίδια κατεύθυνση, δυνητικό στόχο αποτελεί ο έλεγχος της έκφρασης πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην προστασία των κυττάρων, τη διαμερισματοποίηση ιόντων, τη σταθεροποίηση των μεμβρανών και των πρωτεϊνών, τη μεταφορά του νερού μέσω του αποπλάστη και στην αναδιάταξη των πρωτεϊνών, όπως οι LEA (Late Embryogenesis Abundant Proteins), οι HSPs (Heat Shock Proteins) και οι ακουαπορίνες, καθώς και η υπερέκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τη σύνθεση οσμωπροστατευτικών ενώσεων, όπως η βεταΐνη της γλυκίνης, η προλίνη και η τρεχαλόζη. Ως περιορισμοί στις ανωτέρω προσεγγίσεις, τίθενται η πολυγονιδιακή φύση των γνωρισμάτων ανθεκτικότητας στην ξηρασία καθώς και η ενδεχόμενη πλειοτροπική δράση των διαγονιδίων (Jewel et al. 2010; Wani et al. 2017).

Κατ' αντιστοιχία, οι διαγονιδιακές προσεγγίσεις για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην καταπόνηση αλατότητας βασίζονται στην έκφραση γονιδίων που προσφέρουν άμεση προστασία όπως αυτά που κωδικοποιούν i) ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση προλίνης (*P5CS*), τρεχαλόξης (*TPS1*, *TPS2*, *OsTPPI*) και βεταΐνης της γλυκίνης (*codA*, *BADH*) (Jewel et al. 2010), ii) αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως τα *GPX* (Glutathione peroxidase), *SOD* (Superoxide dismutase), *CAT* (catalase), *APX* (Ascorbate peroxidase) και *GST* (Glutathione transferase) (Jewel et al. 2010; Wani et al. 2017) και iii) πρωτεΐνες αντιμεταφοράς ιόντων Na^+/H^+ , όπως τα γονίδια *AtNHX1*, *AtNHX3* και *OsNHX1* που εμπλέκονται στην ομοιοστάση ιόντων (Wani et al. 2017; Jha 2019). Στο ίδιο πλαίσιο, στόχο αποτελεί η ρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών που συμβάλλουν είτε στην προστασία των κυτταρικών τοιχωμάτων, μεταβάλλοντας την έκφραση άλλων πρωτεϊνών, είτε στην αύξηση της συσσώρευσης οσμωπροστατευτικών ενώσεων, όπως οι πρωτεΐνες LEA (Bhardwaj et al. 2013; Wani et al. 2017; Aziz et al. 2021). Παράλληλα, έχει αποδειχθεί η συνεισφορά της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως αυτοί που ανήκουν στις ομάδες bZip, MYB, WRKY, NAC, ERF και CBF/DREB (Jewel et al. 2010; Wang et al. 2017; Jha 2019), καθώς και γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση πολυαμινών, με κυριότερα αυτά της δικαρβοξυλάσης της αργινίνης (*ADC*), της δικαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (*ODC*), της δικαρβοξυλάσης της αδενοσυλμεθειονίνης (*SAMDC*) και της *Spd* συνθάσης (*SPDS*) (Gill and Tuteja 2010).

Επιπλέον, σημαντικό πεδίο έρευνας με στόχο την επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων αποτελεί η αξιοποίηση γονιδίων μη-φυτικής προέλευσης. Στο

επίπεδο αυτό, έχει καταδειχθεί η θετική επίδραση της ενδογενούς έκφρασης ή της εξωγενούς εφαρμογής διεγερτών προερχόμενων από φυτοπαθογόνους μύκητες ή βακτήρια. Οι εν λόγω διεγέρτες έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στον περιορισμό των επιπτώσεων της καταπόνησης, μέσω της επαγωγής της έκφρασης γονιδίων ή/και βιοχημικών μονοπατιών άμυνας καθώς και της αυξημένης συσσώρευσης αντιοξειδωτικών ενζύμων, με κυριότερα τα CAT, SOD και POX (Dana et al. 2006; Wiesel et al. 2014; Peng et al. 2015; Shi et al. 2017; Ali et al. 2018). Προς την ίδια κατεύθυνση, ένας αυξανόμενος αριθμός ερευνών έχει εστιάσει στην προοπτική επίτευξης ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων μέσω της ενδογενούς έκφρασης ή εξωγενούς εφαρμογής βακτηριακής προέλευσης χαρπινών, που αποτελούν δομικά συστατικά του εκκριτικού συστήματος τύπου III (T3SS) των Gram-αρνητικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων (Alfano and Collmer 2004), συμβάλλοντας στην έγχυση τελεστών στο εσωτερικό των κυττάρων των ξενιστών (Kvitko et al. 2007). Η πολυδιάστατη επίδραση των χαρπινών στα φυτά έχει ερευνηθεί εκτενώς και περιλαμβάνει την επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), την ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων και την ταυτόχρονη προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (Wei et al. 1992; He et al. 1993; Alfano and Collmer 2004; Oh and Beer 2007; Huo et al. 2010; Tampakaki et al. 2010; Choi et al. 2013; Ji et al. 2021). Με δεδομένες τις πολύπτυχες λειτουργικές επιδράσεις των χαρπινών στα φυτά, η αξιοποίηση των γονιδίων *hrp/hrc* (*hrp*: HR and pathogenicity, *hrc*: HR and conserved), που κωδικοποιούν το T3SS, έχει μελετηθεί εκτενώς στο πλαίσιο επίτευξης ευρείας ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων. Η επαγόμενη από χαρπίνες ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, όπως αυτές της ξηρασίας, υψηλής αλατότητας και ακραίων θερμοκρασιών, οφείλεται στην ενεργοποίηση των ABA- και ET-μονοπατιών, στην επαγωγή γονιδίων άμυνας και στην ενίσχυση της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως τα SOD, CAT, APX, καθώς και στην αυξημένη συγκέντρωση οσμωπροστατευτικών ενώσεων (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2007, 2011; Chuang et al. 2010; Liu et al. 2016; Cao et al. 2018; Zhou et al. 2019; Demirkol 2021; Ji et al. 2021). Σε ανάλογο επίπεδο, τα ευρήματα πρόσφατων ερευνών υπογραμμίζουν τη συνεισφορά της χαρπίνης HrpZ_{Psph}, από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας έναντι του ιού BNYVV, που προκαλεί την ασθένεια της ριζομανίας των ζαχαροτεύτλων, η οποία πιθανά σχετίζεται με την υπερέκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση AOS, SA και PR-πρωτεϊνών καθώς και γονιδίων που σχετίζονται με την HR (Pavli et al. 2011). Παράλληλα, αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατη έρευνα κατέδειξε την επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ_{Psph}* στο μεταβολισμό των φυτών του είδους *N. benthamiana*, επιφέροντας μεταβολές που σχετίζονται άμεσα με τη βελτιωμένη απόκριση των *hrpZ_{Psph}*-σειρών σε καταπονήσεις, όπως αυτές της αυξημένης συσσώρευσης α,α-τρεχαλόζης, μυο-ινοσιτόλης, L-προλίνης, GABA και καδαβερίνης (Pavli et al. 2019).

Τα τελευταία χρόνια, έπειτα από την ανάδειξη του ρόλου των προερχόμενων από παθογόνα πρωτεϊνών-τελεστών, η πρακτική αξιοποίησή τους για την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων αποτελεί ένα αναδυόμενο πεδίο έρευνας στη βελτίωση και βιοτεχνολογία των φυτών. Οι τελεστές φέρουν διττό ρόλο στα συστήματα παθογόνων-ξενιστών (Alfano and Collmer 2004; Kamoun 2006), συνεισφέροντας στην παθογένεια και στην ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας σε ευαίσθητα φυτικά είδη και ευαίσθητους γονοτύπους, καθώς και στην επαγωγή αντιδράσεων ανοσίας, όπως η HR σε ανθεκτικούς γονοτύπους

(Hogenhout et al. 2009; Dou and Zhou 2012). Παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των ερευνών που πραγματεύονται τη βελτίωση της ανθεκτικότητας μέσω τελεστών αφορούν σε ασθένειες, ένας -ακόμη περιορισμένος- αριθμός μελετών καταδεικνύει την αποτελεσματικότητα της αξιοποίησης τελεστών προερχόμενων από μύκητες για την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας, η οποία αποδίδεται σε αυξημένη έκφραση γονιδίων άμυνας ή γονιδίων που κωδικοποιούν HSPs (Rajput et al. 2015; Zhang et al. 2015).

Βιοτικές καταπονήσεις

Οι βιοτικές καταπονήσεις προκαλούνται έπειτα από προσβολές από παθογόνους οργανισμούς, όπως οι μύκητες, τα βακτήρια, οι ιοί, τα ιοειδή, τα έντομα, οι νηματώδεις και τα ζώα για τα οποία τα φυτά αποτελούν πηγή τροφής. Οι επιδράσεις των βιοτικών καταπονήσεων φέρουν οικονομικές και οικολογικές συνέπειες που αφορούν στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών καθώς και στην υποβάθμιση της ποιότητας και εμπορικότητας των παραγόμενων προϊόντων, απειλώντας έμμεσα την οικονομία και την ασφάλεια των τροφίμων σε παγκόσμια κλίμακα. Οι παθογόνοι οργανισμοί, μέσω της άντλησης θρεπτικών στοιχείων από τους ιστούς του ξενιστή, απειλούν την επιβίωση των φυτών, προκαλώντας παράλληλα απώλειες απόδοσης των καλλιεργειών έως και κατά 35 % (Pimentel 1991; Gull et al. 2019). Τα συμπτώματα προσβολών είτε εντοπίζονται αποκλειστικά στο σημείο προσβολής των παθογόνων είτε είναι διασυστηματικά και επεκτείνονται σε όλους τους φυτικούς ιστούς, ενώ συχνά προσομοιάζουν με αυτά που οφείλονται σε έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, όπως συμβαίνει στην περίπτωση προσβολών από παρασιτικούς νηματώδεις. Περαιτέρω, οι βιοτικές καταπονήσεις επιδρούν δυσμενώς στις φυτικές κοινότητες και τη βιοποικιλότητα, οδηγώντας συχνά σε μείωση της κυριαρχίας ενός είδους σε ένα δεδομένο περιβάλλον (Mack et al. 2000; Mordecai 2011). Η επιτυχής ωστόσο είσοδος και εγκατάσταση ενός παθογόνου οργανισμού εντός των φυτικών ιστών και τελικά η εκδήλωση ασθένειας απαιτεί την αλληλεπίδραση ενός ευαίσθητου ξενιστή με ένα παθογόνο οργανισμό υπό κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα φωτός και νερού, η γονιμότητα του εδάφους, η ταχύτητα του ανέμου καθώς και η περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας σε CO₂ (Velásquez et al. 2018).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών και παθογόνων οργανισμών αποτελεί μία πολυσχιδή διαδικασία, η οποία ρυθμίζεται από μόρια που προέρχονται τόσο από τον ξενιστή όσο και από το παθογόνο, τα οποία κατά βάση ανήκουν στις χημικές ομάδες των πρωτεϊνών, σακχάρων και λιποσακχαριτών (Boyd et al. 2013). Τα μόρια που εκκρίνονται από τα παθογόνα συνιστούν τους καθοριστικούς παράγοντες της παθογένειας και συμβάλλουν στην επιτυχή αποίκιση εντός του ξενιστή. Από την άλλη πλευρά, τα μόρια που προέρχονται από τα φυτά εμπλέκονται στην αναγνώριση των παθογόνων, η οποία αποτελεί εφαλτήριο για την ενεργοποίηση των διαθέσιμων αποκρίσεων άμυνας. Στο πλείστο των περιπτώσεων, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και παθογόνων οργανισμών έχουν οδηγήσει εξελικτικά στην ανάπτυξη αποκρίσεων άμυνας των φυτών με στόχο την άμβλυνση των δυνητικών δυσμενών επιπτώσεών τους.

Παρά το γεγονός ότι τα φυτά στερούνται ανοσοποιητικού συστήματος, παρόμοιου με αυτό των θηλαστικών, έχουν την ικανότητα αντίστασης στα περισσότερα παθογόνα που

απαντώνται στη ριζόσφαιρα ή στη φυλλόσφαιρα. Η ασθένεια αποτελεί συνεπώς την εξαίρεση και όχι το γενικό κανόνα, καθώς τα φυτά δρουν ως «λειτουργικοί μη-ξενιστές» στην πλειονότητα των δυνητικών παρασίτων και τα δύο μέρη χαρακτηρίζονται από θεμελιώδη ασυμβατότητα (Reignault and Sancholle 2005). Ορισμένα παθογόνα ωστόσο στερούνται εξειδίκευσης, με αποτέλεσμα να προσβάλουν ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, όπως χαρακτηριστικά συμβαίνει στην περίπτωση των νεκρότροφων μυκήτων και των βακτηρίων που οδηγούν σε νέκρωση των φυτικών ιστών που έχουν αποικηθεί. Αντίθετα, λόγω της αμοιβαίας αναγνώρισης μεταξύ των φυτών και των παθογόνων, ορισμένα παράσιτα εμφανίζουν εξειδίκευση σε ένα περιορισμένο εύρος ξενιστών, ακόμη και σε επίπεδο μοναδικού ξενιστή. Η στενή εξειδίκευση συνήθως χαρακτηρίζει τους βιότροφους οργανισμούς που διατηρούν τη δομική και φυσιολογική ακεραιότητα του ξενιστή. Η εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης, καθορίζει εάν το φυτό θα αντισταθεί στο παθογόνο ή εάν θα εδραιωθεί ασθένεια (de Wit 1992; Reignault and Sancholle 2005).

Η απόκριση φυτών σε συνθήκες βιοτικών καταπονήσεων

Η απόκριση των φυτών στους παθογόνους οργανισμούς αποτελεί μία ιδιαίτερα σύνθετη διαδικασία που επιτελείται σε ποικίλα και διακριτά, ως προς το στόχο τους, επίπεδα. Αρχικά, σημειώνεται ενεργοποίηση μιας σειράς διεργασιών σε μορφολογικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο, με στόχο την αντίληψη και την ανάσχεση της εισόδου των παθογόνων οργανισμών εντός των φυτικών ιστών. Οι μηχανισμοί άμυνας των φυτών κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία, εντάσσονται οι προϋπάρχοντες ή δομικοί μηχανισμοί που αφορούν σε προ-διαμορφωμένες κατασκευές και συνιστούν φραγμό στην είσοδο των παθογόνων οργανισμών, όπως τα κυτταρικά τοιχώματα, η υφή της επιδερμίδας και η σύνθεση μεταβολιτών, οργανικών οξέων, φαινολικών ενώσεων και τερπενοειδών. Στη δεύτερη κατηγορία, ανήκουν οι επαγόμενοι μηχανισμοί άμυνας, οι οποίοι αφορούν σε χημικές ενώσεις και ένζυμα που ενεργοποιούνται με την αντίληψη των παθογόνων οργανισμών ή διεγερτών των παθογόνων και ενδέχεται να είναι γενικοί ή να διαφοροποιούνται με βάση τα στελέχη ή τις φυλλές των παθογόνων (Freeman and Beattie 2008; Onaga and Wydra 2017; Belete 2021).

Η είσοδος των παθογόνων στους φυτικούς ιστούς, που πραγματοποιείται μέσω ειδικών διεγερτών (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) -όπως η φλαγγελίνη, η χιτίνη και οι λιποπολυσακχαρίτες-, οδηγεί στη σύνθεση αντιμικροβιακών ενώσεων των φυτών, όπως οι ROS και οι πρωτεΐνες-υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένων των MAPK κινάσων, συμβάλλοντας στην επαγωγή βασικής ανοσίας, γνωστής ως PTI (Pathogen - Triggered Immunity). Από την πλευρά τους, οι παθογόνοι οργανισμοί έχουν την ικανότητα καταστολής της βασικής ανοσίας των φυτών, μέσω της έγχυσης εντός των φυτικών ιστών πρωτεϊνών-τελεστών που συχνά φέρουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες λευκίνης (Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeats, NB-LRRs). Ακολούθως, οι πρωτεΐνες-τελεστές αναγνωρίζονται από αντίστοιχες πρωτεΐνες άμυνας των φυτών (Resistance Proteins, R-proteins), με αποτέλεσμα την επαγωγή του δεύτερου επιπέδου ανοσίας των φυτών, γνωστής ως ETI (Effector - Triggered Immunity) (Jones and Dangl 2006; Wu et al. 2014). Η αναγνώριση των πρωτεϊνών-τελεστών από τα φυτά οδηγεί στην ενεργοποίηση γονιδίων άμυνας (Pathogen-Related genes, PR-genes) και στη συσσώρευση σαλικυλικού οξέος, ιασημονικού οξέος και αιθυλενίου. Η δράση των ανωτέρω φυτοορμονών είναι

συνεργιστική ή ανταγωνιστική και σχετίζεται με την επαγωγή της HR, που αποτελεί μορφή τοπικού κυτταρικού θανάτου με στόχο τον περιορισμό της περαιτέρω διάδοσης του παθογόνου εντός των φυτικών ιστών (Heath, 2000; de Wit 2007; Park and Paek 2007). Επιπλέον, λαμβάνει χώρα παραγωγή ROS, χημικών ενώσεων και πρωτεϊνών -όπως χιτινάσες, αναστολείς πρωτεασών και φυτοαλεξίνες, που αποσκοπούν στην αποδόμηση των πρωτεϊνών-τελεστών και στην αναστολή της εδραίωσης των παθογόνων (Andersen 2018). Αναφέρεται ωστόσο ότι, στο πλαίσιο της συνεξέλιξης φυτών-παθογόνων οργανισμών, έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες-τελεστές, μέσω εξάλειψης των R-πρωτεϊνών των φυτών, με συνέπεια τη μειωμένη αναγνώρισή τους από τα φυτά (de Wit 2007; Cui et al. 2009).

Βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι βιοτικών καταπονήσεων

Ο περιορισμός των δυσμενών επιπτώσεων που επιφέρουν οι βιοτικές καταπονήσεις βασίζεται παραδοσιακά στη χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων που εφαρμόζονται είτε προληπτικά είτε θεραπευτικά. Με δεδομένη ωστόσο τη συχνή αναποτελεσματικότητά τους σε περιπτώσεις προσβολών από φυτοπαθογόνα βακτήρια και ορισμένους ιούς ή ιοειδή, τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις που επιφέρει η εφαρμογή τους και την, για το λόγο αυτό, συνεχώς μειούμενη διαθεσιμότητα επιτρεπόμενων δραστικών ουσιών, η ανάπτυξη ποικιλιών με γενετική ανθεκτικότητα έναντι ασθενειών αποτελεί αναμφισβήτητη την πλέον βιώσιμη προσέγγιση. Διαχρονικά, η έρευνα στρέφεται προς τη βελτίωση της ανθεκτικότητας μέσω κλασικών διαδικασιών, οι οποίες περιλαμβάνουν υβριδισμό για ενσωμάτωση *R* γονιδίων, που προέρχονται από ποικίλες φυσικές πηγές ανθεκτικότητας, και σχήματα επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων. Παρά την αδιαμφισβήτητη αποτελεσματικότητα ως προς την επίτευξη υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας, που ενίοτε δεν περιορίζεται σε ένα μόνο στέλεχος του παθογόνου, και την παράλληλη μείωση των καλλιεργητικών εισροών (Balconi et al. 2012), οι κλασικές βελτιωτικές διαδικασίες χαρακτηρίζονται ως επίπονες και ιδιαίτερα χρονοβόρες καθώς απαιτούν πολλαπλούς κύκλους επιλογής και συχνά συνοδεύονται από πρόσθετες δυσκολίες που σχετίζονται με i) την περιορισμένη διαθεσιμότητα φυσικών πηγών ανθεκτικότητας, ii) τα προβλήματα ασυμβίβαστου ή/και στειρότητας των παραγόμενων υβριδίων και iii) τα προβλήματα γενετικής σύνδεσης με ανεπιθύμητα γονίδια, η απάλειψη των οποίων απαιτεί αρκετούς κύκλους αναδιασταύρωσης. Τέλος, στα ανωτέρω προστίθεται το ενδεχόμενο διάσπασης της ανθεκτικότητας λόγω εμφάνισης νέων μολυσματικών στελεχών ή φυλών των παθογόνων που έχουν την ικανότητα υπερνίκησης της χρησιμοποιούμενης ανθεκτικότητας (Yin and Qiu 2019; Khan et al. 2020).

Με βάση τους ανωτέρω περιορισμούς, η έρευνα στρέφεται δικαιολογημένα προς την αξιοποίηση τεχνολογιών γενετικής μηχανικής, που δίνουν τη δυνατότητα στοχευμένης ένθεσης ενός μοναδικού επιθυμητού γονιδίου, ανεξαρτήτως προέλευσης και ταξινομικών εμποδίων και προσφέρουν δυνατότητες επίτευξης υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας ή/και ανοσίας χωρίς περαιτέρω αλλοίωση του οργανισμού στόχου (Moose and Mumm 2008; Parmar et al. 2017). Με στόχο την επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι φυτοπαθογόνων βακτηρίων, έχουν εφαρμοστεί ποικίλες προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν την αναστολή της παθογένειας, μέσω της έκφρασης τοξινών, την έκφραση πεπτιδίων ή πρωτεϊνών, όπως οι PR-πρωτεΐνες, που συμμετέχουν στην παραγωγή μεταβολιτών και στην επαγωγή

διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (Systemic Acquired Resistance, SAR) καθώς και την έκφραση διεγερτών προερχόμενων από παθογόνα ή *R* γονιδίων. Παρά την αποτελεσματικότητά τους ως προς τη δυνατότητα επίτευξης υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας ή ανοσίας, οι ανωτέρω προσεγγίσεις μειονεκτούν ως προς τη σταθερότητα της ανθεκτικότητας καθώς και την εξειδίκευσή της σε συγκεκριμένο παθογόνο ή στέλεχος παθογόνου, ενώ παράλληλα είναι κυρίως αποτελεσματικές έναντι βιοτροφικών παθογόνων (Mourgues et al. 1998; Wally and Punja 2010).

Αξιοποίηση των φυτών – μοντέλων στην έρευνα της Βελτίωσης Φυτών

Τις τελευταίες δεκαετίες, πλήθος ερευνών έχει στραφεί προς την αξιοποίηση φυτών-μοντέλων στα επιστημονικά πεδία της Βελτίωσης των Φυτών. Η χρήση των φυτών-μοντέλων στην έρευνα αποτέλεσε αρχικά προϋπόθεση σε περιπτώσεις όπου η μελέτη του είδους-στόχου εμφάνιζε σημαντικές δυσκολίες και περιορισμούς ή δεν υπήρχε διαθέσιμο γενετικό υλικό προς μελέτη. Με δεδομένο ωστόσο ότι η βασική γνώση που αποκτήθηκε από φυτά-μοντέλα προσδίδει δυνατότητες μεταφοράς σε άλλα συγγενή είδη, λόγω της συνταινίας (συντήρηση ποικίλων κυτταρικών και μοριακών διεργασιών που ρυθμίζονται από γενετικά αποτυπώματα που κληρονομούνται από κοινούς προγόνους), είναι πλέον αδιαμφισβήτητη η συνεισφορά τους σε μελέτες σχετικά με την ανάπτυξη των φυτών, τη φυσική επιλογή, εξέλιξη και εξημέρωση, την κατανόηση των γονιδιωμάτων καθώς και τη βελτίωση των φυτικών ειδών. Ωστόσο, το πλέον σημαντικό ζήτημα που τίθεται στη μεταγονιδιωματική εποχή σχετίζεται με την πρακτική αξιοποίηση της αυξανόμενης γενετικής και βιολογικής πληροφορίας και την επέκτασή τους από τα φυτά-μοντέλα στα καλλιεργούμενα είδη.

Με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους, το εύρος εφαρμογών που παρέχουν και πρακτικά ζητήματα που σχετίζονται με τις δυνατότητες και προοπτικές αξιοποίησής τους για ερευνητικούς σκοπούς, παραδοσιακά διακρίνονται ως καίριας σημασίας φυτά-μοντέλα τα είδη *Arabidopsis thaliana*, *Lotus japonicus*, και *Medicago spp.*, ενώ στην επιστήμη της Βελτίωσης Φυτών αναγνωρίζονται ως μοντέλα το καλαμπόκι, η σόγια και ο καπνός. Στις βασικές ιδιότητες που δυνητικά φέρει ένας οργανισμός-μοντέλο εντάσσονται η ευχερής μεταχείριση, που καθορίζεται από το σύντομο βιολογικό κύκλο, την απρόσκοπτη ανάπτυξη, την ικανοποιητική παραγωγή απογόνων, το μικρού μεγέθους γονιδίωμα και την επιδεκτικότητα σε χειρισμούς διασταύρωσης, μετάλλαξης και γενετικού μετασχηματισμού (Cesarino et al. 2020). Περαιτέρω, η ευρεία χρήση ενός είδους ως μοντέλου έγκειται στην ευχέρεια ανάπτυξης και διαθεσιμότητα πρωτοκόλλων και υλικών χειρισμού τους (Chang et al. 2016). Τα πρώτο είδος που καθιερώθηκε, κυρίως για πρακτικούς λόγους, ως φυτό-μοντέλο είναι το *Arabidopsis thaliana* κατά τη δεκαετία του 1980. Ακολούθως, η έρευνα στράφηκε προς την αξιοποίηση πρόσθετων ειδών, τα οποία χαρακτηρίζονται ως ‘δεύτερης γενεάς’, εξαιτίας των φυλογενετικών σχέσεων και της επιδεκτικότητας σε σύγχρονες βιοτεχνολογικές μεθόδους, συμπεριλαμβανομένων των TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes), RNAi και της επαγωγής στοχευμένων μεταλλάξεων μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9. Αξίζει δε να σημειωθεί ότι στη λίστα των χρησιμοποιούμενων φυτών διαρκώς προστίθενται νέα είδη με σκοπό την κάλυψη περισσότερων καλλιεργούμενων φυτών και δένδρων (Chang et al. 2016; Cesarino et al. 2020). Μεταξύ

των ειδών που επικράτησαν ως φυτά-μοντέλα και παρουσιάζουν ευρύτατη χρήση είναι το *Arabidopsis thaliana*, το *Medicago truncatula* και το *Nicotiana benthamiana*.

Το είδος *Arabidopsis thaliana* ταξινομικά ανήκει στην οικογένεια Brassicaceae, εμφανίζοντας μεγάλη διασπορά σε παγκόσμιο επίπεδο, με αρκετούς οικότυπους που χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς σκοπούς να έχουν συλλεγεί από φυσικούς πληθυσμούς. Η αραβίδοψη αποτελεί το πρώτο πλήρες πυρηνικό γονιδίωμα ανώτερου φυτού που αλληλουχήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 2000, με μέγεθος γονιδιώματος 125 έως 150 Mbp που αριθμεί περί τα 30.000 γονίδια που καταναίονται σε πέντε χρωμοσώματα (Meinke et al. 1998; Weigel and Mott 2009). Επιπλέον, η αραβίδοψη χαρακτηρίζεται από σύντομο βιολογικό κύκλο, περί τις έξι εβδομάδες, αποτελεί αυτογονιμοποιούμενο είδος με ικανότητα παραγωγής έως και 5.000 σπόρων, με τους περισσότερους οικότυπους να είναι κατά βάση ομοζύγωτοι. Η ευρεία χρήση της ως φυτό-μοντέλο ήδη από τη δεκαετία του 1980, οφείλεται στην ευχερή ανάπτυξη πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού, επαγωγής μεταλλάξεων, διασταυρώσεων, γονιδιακής σίγησης, ανάλυσης τετράδων, κ.α. (Meinke et al. 1998). Είναι δε αξιοσημείωτο ότι το μέγεθος των χρωμοσωμάτων, που αρχικά θεωρήθηκε ως εμπόδιο σε κυτταρογενετικές αναλύσεις, αποτέλεσε προτέρημα στις μοριακές αναλύσεις, ενώ η κάλυψη της επιφάνειας των φύλλων από τρίχες θεωρείται ως προνομιακή για μελέτες μορφογένεσης και διαφοροποίησης των κυττάρων (Koornneef and Meinke 2010). Παρά τα αδιαμφισβήτητα πλεονεκτήματα που χαρακτηρίζουν την αραβίδοψη, η οριζόντια χρήση της σε διαφορετικές μελέτες περιορίζεται λόγω του μικρού μεγέθους της, που καθιστά δύσκολη την εκχύλιση χημικών ενώσεων σε επαρκείς ποσότητες, ενώ ορισμένοι μεταβολίτες απουσιάζουν πλήρως. Επίσης, παρά το ότι έχουν αναφερθεί περιπτώσεις επιτυχούς μόλυνσης με παθογόνα βακτήρια και μύκητες, το εν λόγω είδος εμφανίζει περιορισμένο αριθμό οργανισμών που το προσβάλλουν, γεγονός που δυσχεραίνει την ανάλυση αλληλεπιδράσεων φυτών-παθογόνων (Sijmons et al. 1991). Τέλος, το είδος *Arabidopsis thaliana* δεν συμβιώνει πλήρως με μυκόρριζες και ενδοσυμβιωτικά βακτήρια που δεσμεύουν άζωτο (Woodward and Bartel 2018).

Το είδος *Medicago truncatula* προέρχεται από την περιοχή της Μεσογείου και ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών, ενώ χαρακτηρίζεται από μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς τα μορφολογικά και αναπτυξιακά γνωρίσματα, γεγονός που επέτρεψε την επιλογή και ανάπτυξη διαφορετικών τύπων. Το είδος *M. truncatula*, αν και φυτό μικρής βιομάζας, είναι ιδιαίτερα ευέλικτο για τη μελέτη φαινοτυπικών γνωρισμάτων και συμβιωτικών σχέσεων. Αποτελεί αυτογονιμοποιούμενο και διπλοειδές ($2n = 16$) είδος με οκτώ χρωμοσώματα και γονιδίωμα μεγέθους 430 Mb (Barker et al. 1990). Το συγκεκριμένο φυτό έχει τύχει αξιοποίησης σε εφαρμογές σωματικού υβριδισμού, λόγω της υψηλής ικανότητας αναγέννησης, η οποία ωστόσο παρουσιάζει σημαντική γονοτυπική εξάρτηση (Rose 2008). Η καθιέρωσή του ως φυτό-μοντέλο οφείλεται στην ευχερή ανάπτυξη και διαθεσιμότητα μεθόδων τεχνητού υβριδισμού, παραγωγής καθαρών σειρών, επαγωγής μεταλλάξεων, γενετικού μετασχηματισμού -μέσω των *A. tumefaciens* και *A. rhizogenes*- καθώς και στη διαθεσιμότητα χαρτών και βιβλιοθηκών που προσφέρονται για πρωτεομική και μεταβολομική ανάλυση (Kang et al. 2016; Wettberg et al. 2020). Τα τελευταία χρόνια, η αξιοποίησή του ως φυτό επικεντρώνεται στη μελέτη της συμβίωσης ψυχανθών με μυκόρριζες και των μηχανισμών που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του κυτταρικού τοιχώματος στα δικότυλα φυτά (Rose 2008; Tesfaye et al. 2009). Παράλληλα, λόγω του ευρέως

φάσματος βιοτροφικών και νεκροτροφικών οργανισμών που το προσβάλλουν, όπου εντάσσονται μύκητες, βακτήρια, νηματώδεις και έντομα, με κυριότερα τα παθογόνα εδάφους, διακρίνεται ως σημαντική η συνεισφορά του στην αποσαφήνιση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης των φυτών και παθογόνων στα ψυχανθή, γεγονός που συνέβαλλε στην ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών που φέρουν την ικανότητα συμβίωσης με παθογόνα (Garvin and Schornack 2020).

Το είδος *Nicotiana benthamiana* ανήκει στην οικογένεια Solanaceae και είναι ενδημικό της Αυστραλίας, παρουσιάζοντας ευρεία διασπορά στην κεντρική, δυτική και βόρεια Αυστραλία με ικανότητα ανάπτυξης σε περιβάλλοντα δυσμενή για άλλα είδη του γένους *Nicotiana*. Η ευρεία διασπορά του, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ως είδος έχει εξελικτικά αναπτυχθεί απουσία άλλων ειδών του ίδιου γένους, έχει οδηγήσει στη δημιουργία μεγάλης παραλλακτικότητας ως προς τα μορφολογικά, φυσιολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά μεταξύ των φυσικών πληθυσμών (Goodin et al. 2008). Στο επίπεδο αυτό, η συγκριτική μελέτη του γονιδιώματος άγριων γονοτύπων κατέδειξε ότι ο γονότυπος που έχει επικρατήσει για εργαστηριακές μελέτες προέρχεται από πληθυσμό που εκφράζει μια μετάλλαξη της RNA-εξαρτημένης RNA πολυμεράσης RDR1, η οποία συνδέεται με αυξημένη ικανότητα επικράτησης στα δυσμενή περιβάλλοντα της κεντρικής Αυστραλίας (Bally et al. 2015, 2018). Περαιτέρω, πρόσφατες έρευνες όπου εφαρμόστηκε αγροεμποτισμός με πρωτεΐνες-τελεστές παρέχουν ενδείξεις ότι οι γονότυποι που χρησιμοποιούνται ευρέως σε εργαστηριακό επίπεδο ενδεχομένως δεν έχουν πανομοιότυπο γονιδίωμα (Derevnina et al. 2018). Ως φυτό-μοντέλο έχει αξιοποιηθεί ευρέως σε μελέτες αλληλεπίδρασης φυτών-παθογόνων καθώς αποτελεί ξενιστή σε ένα εύρος παθογόνων (Pombo et al. 2020), ενώ η καταλληλότητά του στο πεδίο της ιολογίας έγκειται στη μειωμένη δραστηριότητα της πρωτεΐνης RDR1, η οποία συνδέεται στενά με αυξημένη ευαισθησία έναντι ιικής μόλυνσης (Todesco and de Felipes 2016). Επιπλέον, η χρήση του ως φυτό-μοντέλο καθίσταται ελκυστική εξαιτίας της ικανότητας έκφρασης -μέσω φορέων-γονιδίων ποικίλης προέλευσης, της ευχερούς εφαρμογής της γονιδιακής σίγησης (VIGS) και του αγροεμποτισμού για την άμεση έκφραση πρωτεϊνών ενδιαφέροντος στα φυτικά κύτταρα (Goodin et al. 2008), προσφέροντας παράλληλα δυνατότητες παραγωγής ενώσεων και μορίων ενδιαφέροντος, ιδιαίτερα αντιβιοτικών και πρωτεϊνών φαρμακευτικής χρήσης (Bally et al. 2018).

Βιβλιογραφία

- Abid M, Ali S, Qi LK, Zahoor R, Tian Z, Jiang DJ, Snider JL, Dai T (2018) Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). Sci Rep 8:4615. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21441-7>
- Abid M, Zhang YJ, Li Z, Bai DF, Zhong YP, Fang JB (2020) Effect of salt stress on growth, physiological and biochemical characters of four kiwifruit genotypes. Sci Hort 271: 109473. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109473>
- Ahkami AH, Wang W, Wietsma TW, Winkler T, Lange I, et al. (2019) Metabolic shifts associated with drought-induced senescence in *Brachypodium*. Plant Sci 289:110278. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110278>

- Ahmad F, Singh A, Kamal A (2020) Osmoprotective role of sugar in mitigating abiotic stress in plants. In Roychoudhury A and Tripathi DK (eds) Protective chemical agents in the amelioration of plant abiotic stress: biochemical and molecular perspectives. John Wiley & Sons Ltd, pp 53-70. <https://doi.org/10.1002/9781119552154.ch3>
- Ahmar S, Gill RA, Jung KH, Faheem A, Qasim MU, Mubeen M, Zhou W (2020) Conventional and Molecular Techniques from Simple Breeding to Speed Breeding in Crop Plants: Recent Advances and Future Outlook. *Int J Mol Sci* 21:2590. <https://doi.org/10.3390/ijms21072590>
- Alfano JR, Collmer A (2004) Type III Secretion System Effector Proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* 42:385-414. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731>
- Ali S, Park S-K, Kim W-C (2018) The pragmatic introduction and expression of microbial transgenes in plants. *J Microbiol Biotechnol* 28:1955-1970. <https://doi.org/10.4014/jmb.1808.08029>
- Andersen EJ, Ali S, Byamukama E, Yen Y, Nepal MP (2018) Disease Resistance Mechanisms in Plants. *Genes* 9:339. <https://doi.org/10.3390/genes9070339>
- Anwar A, Kim JK (2020) Transgenic breeding approaches for improving abiotic stress tolerance: Recent progress and future perspectives. *Int J Mol Sci* 21:2695. <https://doi.org/10.3390/ijms21082695>
- Arbona V, Manzi M, de Ollas C, Gómez-Cadenas A (2013) Metabolomics as a Tool to Investigate Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Int Mol Sci* 14:4885-4911. <https://doi.org/10.3390/ijms14034885>
- Aziz MA, Sabeem M, Mullath SK, Brini F, Masmoudi K (2021) Plant Group II LEA Proteins: Intrinsically Disordered Structure for Multiple Functions in Response to Environmental Stresses. *Biomolecules* 11: 1662. <https://doi.org/10.3390/biom11111662>
- Balconi C, Stevanato P, Motto M, Biancardi E (2012) Breeding for biotic stress resistance/tolerance in plants. In: Ashraf M, et al. (eds) *Crop Production for Agricultural Improvement*. Springer, Dordrecht pp 57-114. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4116-4_4
- Bally J, Nakasugi K, Jia F, Jung H, Ho SYW, Wong M, et al. (2015) The extremophile *Nicotiana benthamiana* has traded viral defence for early vigour. *Nat Plants* 1:15165. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.165>
- Bally J, Jung H, Mortimer C, Naim F, Philips JG, Hellens R, et al. (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>
- Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad S, et al. (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Plant Mol Biol Rep* 8:40-49. <https://doi.org/10.1007/bf02668879>
- Belete T (2021) A Critical Review on Defense Mechanisms of Plants against Bacterial Pathogens: from Morphological to Molecular levels. *J Plant Pathol Microbiol* 12:534.
- Bhardwaj R, Sharma I, Kanwar M, Sharma R, Handa N, Kaur H, Kapoor D, Poonam (2013) LEA Proteins in Salt Stress Tolerance. In: Ahmad P, et al. (eds) *Salt Stress in Plants* Springer, New York, NY pp 79-112. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6108-1_5
- Blum A, Jordan WR (1985) Breeding crop varieties for stress environments, *Crit Rev Plant Sci* 2:199-238. <https://doi.org/10.1080/07352688509382196>

- Blumwald E, Grover A, Good AG (2004) Breeding for abiotic stress resistance: challenges and opportunities. In: Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, p 2.
- Boyd LA, Ridout C, O'Sullivan DM, Leach JE, Leung H (2013) Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends Genet* 29: 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.011>
- Calanca PP (2017) Effects of abiotic stress in crop production. In: Ahmed M, Stockle CO (eds) Quantification of climate variability, adaptation and mitigation for agricultural sustainability. Springer International Publishing, Switzerland, pp 165-180. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32059-5_8
- Cao Y, Yang M, Ma W, Sun Y, Chen G (2018) Overexpression of *SSB_{Xoc}*, a single-stranded DNA-binding protein from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, enhances plant growth and disease and salt stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci* 9:953. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00953>
- Cesarino I, Ioio RD, Kirschner GK, Ogden MS, Picard KL, Rast-Somssich MI, Somssich M (2020) Plant science's next top models. *Ann Bot* 126: 1–23. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa063>
- Chang C, Bowman JL, Meyerowitz EM (2016) Field guide to plant model systems *Cell* 167: 325-339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.031>
- Choi M-S, Kim W, Lee C, Oh C-S (2013) Harpins, multifunctional proteins Secreted by Gram-Negative plant-pathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 1115-1122. <https://doi.org/10.1094/mpmi-02-13-0050-cr>
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant J* 90:856-867. <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>
- Chuang Hw, Harnrak A, Chen YC, Hsu CM (2010) A harpin-induced ethylene-responsive factor regulates plant growth and responses to biotic and abiotic stresses. *Biochem Biophys Res Commun* 402:414–420. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.047>
- Cui H, Xiang T, Zhou JM (2009) Plant Immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. *Cell Microbiol* 11: 1453-1461. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01359.x>
- Dana MM, Pintor-Toro JA, Cubero B (2006) Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol* 142:722-730. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086140>
- Dar NA, Amin I, Wani W, Wani SA, Shikari AB, Wani Sh, et al. (2017) Absciscic acid: a key regulator of abiotic stress tolerance in plants. *Plant Gene* 11:106-111. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.003>
- Das G, Rao GJN (2015) Molecular marker assisted gene stacking for biotic and abiotic stress resistance genes in an elite rice cultivar. *Front Plant Sci* 6:698. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00698>
- de Wit PJGM (1992) Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant–fungus interactions and the applications of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 30: 391-418. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.002135>
- de Wit (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci* 64: 2726-2732. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7284-7>

- Dehnavi AR, Zahedi M, Ludwiczak A, Perez SG, Piernik A (2020) Effect of salinity stress on seed germination and seedling development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) genotypes. *Agronomy* 10:859. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060859>
- Demirkol G (2021) PopW enhances drought stress tolerance of alfalfa via activating antioxidative enzymes, endogenous hormones, drought related genes and inhibiting senescence genes. *Plant Physiol Biochem* 166:540-548. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.036>
- Derevnina L, Kamoun S, Wu C-h (2018) Dude, where is my mutant? *Nicotiana benthamiana* meets forward genetics. *New Phytol* 221: 607-610. <https://doi.org/10.1111/nph.15521>
- Devi SR, Prasad MNV (2004) Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad MNV (eds) *Heavy metal stress in plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 127-145. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07743-6_5
- Dhariwal HS, Kawai M, Uchimiya H (1998) Genetic engineering for abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biotechnol* 15:1-10. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.15.1>
- Dong HP, Yu H, Bao Z, Guo X, Peng J, et al (2005) The *ABI2*-dependent abscisic acid signaling controls HrpN-induced drought tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* 221:313–327. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1444-x>
- Dong S, Jiang Y, Dong Y, Wang L, Wang W, Ma Z, et al (2019) A study on soybean responses to drought stress and rehydration. *Saudi J Biol Sci* 26:2006-2017. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.08.005>
- Dou D, Zhou JM (2012) Phytopathogen effectors subverting host immunity: Different Foes, Similar Battleground. *Cell Host Microbe* 12:484-495. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.003>
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29:185–212. <https://doi.org/10.1051/agro:2008021>
- Fita A, Rodríguez-Burruezo A, Boscaiu M, Prohens J, Vicente O (2015) Breeding and domesticating crops adapted to drought and salinity: a new paradigm for increasing food production. *Front Plant Sci* 6:978. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00978>
- Freeman BC, Beattie GA (2008) An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *Plant Health Instr.* <https://doi.org/10.1094/phi-i-2008-0226-01>
- Gantait S, Sarkar S, Verma SK (2019) Marker-assisted selection for abiotic stress tolerance in crop plants. In: Roychoudhury A and Tripathi DK(eds) *Molecular plant abiotic stress: biology and biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd pp 335-368. <https://doi.org/10.1002/9781119463665.ch18>
- Garvin A, Schornack S (2020) *Medicago truncatula* as a model organism to study conserved and contrasting aspects of symbiotic and pathogenic signaling pathways. In: de Bruijn FJ (eds) *The Model Legume Medicago truncatula*. John Wiley & Sons, Inc pp 317-330. <https://doi.org/10.1002/9781119409144.ch38>
- Gill SS, Tuteja N (2010) Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav* 5:26-33. <https://doi.org/10.4161/psb.5.1.10291>
- Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA (2008) *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant–pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1015-1026. <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-8-1015>

- Gull A, Lone AA, Wani NI (2019) Biotic and abiotic stresses in plants. In de Oliveira A (eds) Abiotic and Biotic Stress in Plants. IntechOpen pp 1-6. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85832>
- Gupta B, Huang B (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int J Genomics* 701596: 1-18. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Gururani MA, Venkatesh J, Tran L-SP (2015) Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Mol Plant* 8: 1304–1320. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.005>
- He M, He C-Q, Ding N-Z (2018) Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Front Plant Sci* 9:1771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>
- He SY, Huang HC, Collmer A (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpins: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73: 1255-1266. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90354-s](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90354-s)
- Heath MC (2000) Hypersensitive response-related death. In: Lam E., Fukuda H., Greenberg J. (eds) Programmed cell death in higher plants. Springer, Dordrecht pp 77-90. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0934-8_6
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, Kamoun S (2009) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact* 22:115-122. <https://doi.org/10.1094/mpmi-22-2-0115>
- Hong-Bo S, Wei-Yi S, Li-Ye C (2008) Advances of calcium signals involved in plant anti-drought. *CR Biologies* 331:587-596. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.03.012>
- Hospital F (2009) Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica* 136:303-310. <https://doi.org/10.1007/s10709-008-9307-1>
- Huang H, Ullah F, Zhou DX, Yi M, Zhao Y (2019) Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Front Plant Sci* 10:800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Huo R, Wang Y, Ma LL, Qiao JQ, Shao M, Gao XW (2010) Assessment of inheritance pattern and agronomic performance of transgenic rapeseed having harpin_{Xooc}-encoding *hrf2* gene. *Transgenic Res* 19: 841–847. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9365-x>
- Jan R, Asaf S, Numan M, Lubna L, Kim KM (2021) Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy* 11:968. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050968>
- Jeandroz S, Lamotte O (2017) Editorial: Plant responses to biotic and abiotic stresses: lessons from cell signaling. *Front Plant Sci* 8:1772. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01772>
- Jewel MC, Campbell BC, Godwin ID (2010) Transgenic plants for abiotic stress resistance. In: Kole C et al. (eds) Transgenic crop plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 67-132. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04812-8_2
- Jha S (2019) Transgenic Approaches for Enhancement of Salinity Stress Tolerance in Plants. In: Singh S et al (eds) Molecular approaches in plant biology and environmental challenges. Energy, environment, and sustainability. Springer Singapore, pp 265-322. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0690-1_14
- Ji ZL, Yu MH, Ding YY, Li J, Zhu F, He JX, Yang LN (2021) Coiled-Coil N21 of Hpa1 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* promotes plant growth, disease resistance and drought

- tolerance in non-hosts via eliciting HR and regulation of multiple defense response genes. *Int J Mol Sci* 22:203. <https://doi.org/10.3390/ijms22010203>
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kamoun S (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* 44:41–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>
- Kang Y, Li M, Sinharoy S, Verdier J (2016) A snapshot of functional genetic studies in *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci* 7:1175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01175>
- Kapoor D, Bhardwaj S, Landi M, Sharma A, Ramakrishnan M, Sharma A (2020) The impact of drought in plant metabolism: How to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Appl Sci* 10:5692. <https://doi.org/10.3390/app10165692>
- Kaya MD, Okçu G, Atak M, Çikili Y, Kolsarici Ö (2006) Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Europ J Agron* 24:291-295. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.08.001>
- Khan AH, Hassan M, Khan MN (2020) Conventional plant breeding program for disease resistance. In: Haq IUI, Ijaz S (eds) *Plant disease management strategies for sustainable agriculture through traditional and modern approaches, sustainability in plant and crop protection*. Springer Nature Switzerland, pp 27-51. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3_3
- Khan MS, Khan MN (2019) Understanding plant responses to drought and salt stresses: Advances and challenges in “Omics” approaches. In: Khan MS, Malik KA (eds) *Transgenic crops - emerging trends and future perspectives*. IntechOpen, pp 75-98. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81041>
- Koornneef M, Meinke D (2010) The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J* 61:909-921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2009.04086.x>
- Kvitko BH, Ramos AR, Morello JE, Oh HS, Collmer A (2007) Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. *J Bacteriol* 189:8059–8072. <https://doi.org/10.1128/jb.01146-07>
- Lichtenthaler HK (2006) The stress concept in plants: an introduction. *Ann N Y Acad Sci* 30:187-198. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x>
- Liu H, Wang Y, Zhou X, Wang C, Wang C, Fu J, Wei T (2016) Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* from *Ralstonia solanacearum* primed antioxidant defenses with enhanced drought tolerance in tobacco plants. *Plant Cell Rep* 35:1333–1344. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1965-3>
- Liu Y, Li P, Xu GC, Xiao L, Ren ZP, Bin Z (2017) Growth, morphological, and physiological responses to drought stress in *Bothriochloa ischaemum*. *Front Plant Sci* 8:230. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00230>
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, Evans H, Clout M, Bazzaz FA (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecol Appl* 10:689-710. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[0689:bicegc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0689:bicegc]2.0.co;2)
- Meena HP, Bainsla NK, Yadav DK (2016) Breeding for abiotic stress tolerance in crop plants. In: Yadav P, et al (eds) *Recent advances in plant stress physiology*. Daya Publishing House New Delhi, pp 329-378.

- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. Science 282:662-682. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>
- Moose SP, Mumm RH (2008) Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. Plant Physiol 147:969–977. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118232>
- Mordecai EA (2011) Pathogen impacts on plant communities: unifying theory, concepts, and empirical work. Ecol Monogr 81:429-441. <https://doi.org/10.1890/10-2241.1>
- Mourgues F, Brisset MN, Chevreau E (1998) Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. Trends Biotechnol 16:203-210. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(98\)01189-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(98)01189-5)
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annu Rev. Plant Biol 59:651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Oh CS, Beer SV (2007) AtHIPM, an Ortholog of the apple HrpN-Interacting Protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth-enhancing effect of HrpN in Arabidopsis. Plant Physiol 145:426-436. <https://doi.org/10.1104/pp.107.103432>
- Onaga G, Wydra K (2017) Advances in plant tolerance to biotic stress. In: Abdurakhmonov IY (eds) Plant Genomics, pp 229- 272. <https://doi.org/10.5772/64351>
- Oshunsanya SO, Nwosu NJ, Li Y (2019) Abiotic stress in agricultural crops under climatic conditions. In Jhariya MK, et al. (eds) Sustainable agriculture, forest and environmental management. Springer Singapore, pp 71–100. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6830-1_3
- Osmond CB, Austin MP, Berry JA, Billings WD, Boyer JS, Dacey JWH, Nobel PS, Smith SD, Winner WE (1987) Stress physiology and the distribution of plants. The survival of plants in any ecosystem depends on their physiological reactions to various stresses of the environment. Bioscience 37:38-48. <https://doi.org/10.2307/1310176>
- Park JM, Paek KH (2007) Recognition and response in plant-pathogen interactions. J Plant Biol 50:132-138. <https://doi.org/10.1007/bf03030621>
- Parmar N, Singh KH, Sharma D, Singh L, Kumar P, et al (2017) Genetic engineering strategies for biotic and abiotic stress tolerance and quality enhancement in horticultural crops: a comprehensive review. 3 Biotech 7. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0870-y>
- Patakas A (2012). Abiotic stress-induced morphological and anatomical changes in plants. In: Ahmad P, Prasad M (eds) Abiotic stress responses in plants. Springer New York pp 21-39. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0634-1_2
- Patel MK, Kumar M, Li W, Luo Y, Burritt DJ, Alkan N, Phan Tran LS (2020) Enhancing salt tolerance of plants: from metabolic reprogramming to exogenous chemical treatments and molecular approaches. Cells 9:2492. <https://doi.org/10.3390/cells9112492>
- Pavli OI, Kelaidi GI, Tampakaki AP, Skaracis GN (2011) The *hrpZ* gene of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola enhances resistance to rhizomania disease in transgenic *Nicotiana benthamiana* and sugar beet. PLoS ONE 6: e17306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017306>
- Pavli OI, Mitsopoulou N, Zianna E, Foti C, Aliferis KA, Skaracis GN (2019) Transgenic expression of *hrpZ_{PspH}* gene substantially alters the metabolome of *Nicotiana benthamiana* plants. In: Proceedings of 70th HSBMB Conference, p 10.

- Peng X-C, Qiu D-W, Zeng H-M, Guo L-H, Yang X-F, Liu Z (2015) Inducible and constitutive expression of an elicitor gene *Hrip1* from *Alternaria tenuissima* enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. Transgenic Res 24:135-145. <https://doi.org/10.1007/s11248-014-9824-x>
- Pimentel D (1991) Diversification of biological control strategies in agriculture. Crop Prot 10:243-253. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(91\)90001-8](https://doi.org/10.1016/0261-2194(91)90001-8)
- Poljakoff – Mayber A (1975) Morphological and anatomical changes in plants as a response to salinity stress. In: Poljakoff-Mayber A et al. (eds) Plants in saline environments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 97-117. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80929-3_8
- Pombo MA, Rosli HG, Fernandez-Pozo N, Bombarely A (2020) *Nicotiana benthamiana*, a popular model for genome evolution and plant-pathogen interactions. In: Ivanov NV et al. (eds) The tobacco plant genome, Compendium of plant genomes. Springer Nature Switzerland, pp 231-247. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29493-9_14
- Qayyum A, Razzaq A, Bibi Y, Khan SU, Abbasi KS, Sher A, et al. (2018) Water stress effects on biochemical traits and antioxidant activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) under *in vitro* conditions. Acta Agric Scand - B Soil Plant Sci 68:283-290. <https://doi.org/10.1080/09064710.2017.1395064>
- Rahnama A, Fakhri S, Meskarbashee M (2019) Root growth and architecture responses of bread wheat cultivars to salinity stress. Agron J 111:2991-2998. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.12.0795>
- Rajput NA, Zhang M, Shen D, Liu T, Zhang Q, et al. (2015) Overexpression of a Phytophthora cytoplasmic CRN effector confers resistance to disease, salinity and drought in *Nicotiana benthamiana*. Plant Cell Physiol 56:2423-2435. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv164>
- Rasool S, Mir BA, Rehman MU, Amin A, Mir MUR, Ahmad SB (2019) Abiotic stress and plant senescence. In: Sarwat M and Tuteja N (eds) Senescence signalling and control in plants. Elsevier Inc pp 15-27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813187-9.00002-0>
- Reignault P, Sancholle M (2005) Plant–pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? C R Biol 328:821-833. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.07.002>
- Riseh SR, Ebrahimi-Zarandi M, Tamanadar E, Pour MM, Thakur VK (2021) Salinity stress: toward sustainable plant strategies and using Plant Growth-Promoting Rhizobacteria encapsulation for reducing it. Sustainability 13:12758. <https://doi.org/10.3390/su132212758>
- Rose RJ (2008) *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future. Funct Plant Biol 35:253-264. <https://doi.org/10.1071/fp07297>
- Santo A, Mattana E, Frigau L, Marzo Pastor A, Picher Morelló MC, Bacchetta G (2017) Effects of NaCl stress on seed germination and seedling development of *Brassica insularis* Moris (Brassicaceae). Plant Biol 19:368-376. <https://doi.org/10.1111/plb.12539>
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ et al. (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. Nat Ecol Evol 3: 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Schuppler U, He PH, John PCL, Munns R (1998) Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. Plant Physiol 117:667–678. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.667>
- Sharma RK, Agrawal M (2005) Biological effects of heavy metals: An overview. J Exp Biol 26:301-313.

- Shen B, Hohmann S, Jensen RG, Bohnert HJ (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol* 121:45-52. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.45>
- Shi F, Dong Y, Zhang Y, Yang X, Qiu D (2017) Overexpression of the *PeaTl* elicitor gene from *Alternaria tenuissima* improves drought tolerance in rice Plants via interaction with a myo-inositol oxygenase. *Front Plant Sci* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00970>
- Shu L, Lou Q, Ma C, Ding W, Zhou J, Wu J, Feng F, Lu X, Luo L, Xu G, Mei H (2011) Genetic, proteomic and metabolic analysis of the regulation of energy storage in rice seedlings in response to drought. *Proteomics* 11:4122-4138. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000485>
- Sijmons PC, Grundler FMW, von Mende N, Burrows PR, Wyss U (1991) *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant-parasitic nematodes. *Plant J* 1:245-254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.1991.00245.x>
- Tampakaki AP, Skandalis N, Gazi AD, Bastaki MN, Sarris PF, Charova SN, Kokkinidis M, Panopoulos NJ (2010) Playing the “Harp”: Evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. *Ann Rev Phytopathol* 48: 347-370. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114407>
- Tesfaye M, Yang SS, Lamb JFS, Jung H-JG, Samac DA, Vance CP, Gronwald JW, VandenBosch KA (2009) *Medicago truncatula* as a model for dicot cell wall development. *Bioenerg Res* 2:59-76. <https://doi.org/10.1007/s12155-009-9034-1>
- Todesco M, de Felippes FF (2016) Why benthamiana went viral. *Trends Plant Sci* 21: 4-6. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.014>
- Tuteja N, Gill SS, Tuteja R (2011) Plant responses to abiotic stresses: shedding light on salt, drought, cold and heavy metal stress. In: Tuteja N et al. (eds) *Omics and Plant Abiotic Stress Tolerance*. Bentham Science Publishers Ltd pp 39-64. <https://doi.org/10.2174/978160805058111101010039>
- Velásquez AC, Castroverde CDM, He SY (2018) Plant and pathogen warfare under changing climate conditions. *Curr Biol* 28:R619-R634. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.054>
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* 45:523–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x>
- Wally O, Punja ZK (2010) Genetic engineering for increasing fungal and bacterial disease resistance in crop plants. *GM Crops* 1:199-206. <https://doi.org/10.4161/gmcr.1.4.13225>
- Wang K, Zhong M, Wu Y-h, Bai Z-y, Liang Q-y, Liu Q-l, et al. (2017) Overexpression of a chrysanthemum transcription factor gene *DgNAC1* improves the salinity tolerance in chrysanthemum. *Plant Cell Rep* 36: 571-581. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2103-6>
- Wani SH, Dutta T, Neelapu NRR, Surekha C (2017) Transgenic approaches to enhance salt and drought tolerance in plants. *Plant Gene* 11:219-231. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.05.006>
- Weigel D, Mott R (2009) The 1001 genomes project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol* 10:107. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-5-107>
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257: 85-88. <https://doi.org/10.1126/science.1621099>

- Wettberg EJB, Ray-Mukherjee J, Moriuchi K, Porter SS (2020) *Medicago truncatula* as an ecological, evolutionary, and forage legume model: new directions forward. In: de Bruijn FJ (eds) *The Model Legume Medicago truncatula*. John Wiley & Sons, Inc pp 31-40. <https://doi.org/10.1002/9781119409144.ch03>
- Wiesel L, Newton AC, Elliot I, Booty D, Gilroy EM, et al. (2014) Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Front Plant Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00655>
- Woodward AW, Bartel B (2018) Biology in bloom: A primer on the *Arabidopsis thaliana* model system. *Genetics* 208:1337-1349. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300755>
- Wu L, Chen H, Curtis C, Fu ZQ (2014) Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence* 5:710-721. <https://doi.org/10.4161/viru.29755>
- Yadav SK (2010) Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S Afr J Bot* 76:167-179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>
- Yin K, Qiu JL (2019) Genome editing for plant disease resistance: applications and perspectives. *Philos Trans R Soc B: Biol Sci* 374: 20180322. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0322>
- Zhang C, Qian J, Bao Z Hong X, Dong H (2007) The induction of abscisic-acid-mediated drought tolerance is independent of ethylene signaling in arabidopsis plants responding to a Harpin protein. *Plant Mol Biol Rep* 25:98–114. <https://doi.org/10.1007/s11105-007-0012-5>
- Zhang H, Zhao Y, Zhu JK (2020) Thriving under stress: how plants balance growth and the stress response. *Dev Cell* 55:529-543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.10.012>
- Zhang L, Xiao S, Li W, Feng W, Li J, Wu Z, Gao X, Liu F, Shao M (2011) Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *J Exp Bot* 62:4229-4238. <https://doi.org/10.1093/jxb/err131>
- Zhang M, Rajput NA, Shen D, Sun P, Zeng W, et al. (2015) A *Phytophthora sojae* cytoplasmic effector mediates disease resistance and abiotic stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Sci Rep* 5. <https://doi.org/10.1038/srep10837>
- Zhou X, Liu Y, Huang J, Liu Q, Sun J, Cai X, Tang P, Liu W, Miao W (2019) High temperatures affect the hypersensitive reaction, disease resistance and gene expression induced by a novel harpin HpaG-Xcm. *Sci Rep* 9:990. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37886-9>
- Zhu JK (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167:313-324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zörb C, Geilfus CM, Dietz KJ (2019) Salinity and crop yield. *Plant Biol* 21:31-38. <https://doi.org/10.1111/plb.12884>

Κεφάλαιο 2

Απόκριση *hrpZ_{PspH}*-διαγονιδιακών σειρών του είδους *N. benthamiana* υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας

Περίληψη

Οι αβιοτικές καταπονήσεις, με κύριες την ξηρασία και την υψηλή αλατότητα, αποτελούν σημαντικούς περιοριστικούς παράγοντες στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών. Το γονίδιο *hrpZ_{PspH}*, προερχόμενο από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, στην εκκρινόμενη μορφή του (*SP/hrpZ_{PspH}*), έχει αποδειχθεί ότι επάγει ανθεκτικότητα έναντι του ιού BNYVV, προάγοντας ταυτόχρονα την ανάπτυξη των φυτών. Με δεδομένα τα πρόσφατα ευρήματα σχετικά με την άμυνα των *SP/hrpZ_{PspH}*-φυτών στην καταπόνηση καδμίου καθώς και τον ευρέως γνωστό πολυδιάστατο ρόλο των χαρπινών στα φυτά, στόχο αποτέλεσε η μελέτη της απόκρισης των *SP/hrpZ_{PspH}*-φυτών ως προς την ανθεκτικότητα έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. Για το σκοπό αυτό, ομοζύγωτες διαγονιδιακές σειρές του είδους *N. benthamiana* καθώς και φυτά αγρίου τύπου υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών. Κατά τη φάση της βλάστησης, έγινε τοποθέτηση των σπόρων σε θρεπτικό υπόστρωμα 1/2 MS medium που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις D-mannitol (0, 100, 200, 300 mM) και NaCl (0, 100, 200, 300 mM), ενώ ως παράμετροι αξιολόγησης αξιοποιήθηκαν το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και ο ρυθμός ανάπτυξης των σποροφύτων καθώς και η συμπτωματολογία των φυτών. Στα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, τα φυτά υποβλήθηκαν σε καταπόνηση μέσω στέρησης νερού για διάστημα 10 ημερών και μέσω ριζοποτίσματος με διαλύματα NaCl (0, 100, 200 mM) για διάστημα 20 ημερών για την καταπόνηση ξηρασίας και αλατότητας αντίστοιχα. Ως παράμετροι αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι της ξηρασίας χρησιμοποιήθηκαν το ποσοστό επιβίωσης, η συμπτωματολογία και η περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη, ενώ η απόκριση στην καταπόνηση αλατότητας εκτιμήθηκε μέσω του ρυθμού ανάπτυξης, της συμπτωματολογίας και του περιεχομένου ολικής χλωροφύλλης. Στη φάση της βλάστησης, σημειώθηκαν διαφορές στο δυναμικό βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων και στο φαινότυπο των *hrpZ_{PspH}*-σειρών, οι οποίες εμφάνισαν υπεροχή έναντι των wt φυτών, ενώ στα υψηλά επίπεδα καταπόνησης σημειώθηκε πλήρης ανάσχεση της βλάστησης σε όλα τα υπό μελέτη φυτά. Στο στάδιο των ώριμων φυτών, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των *hrpZ_{PspH}*-σειρών και των φυτών wt, οι οποίες εντοπίζονταν στην ένταση των συμπτωμάτων, στο ποσοστό επιβίωσης των φυτών και στην περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης. Στο σύνολό τους, τα δεδομένα υποδεικνύουν την πιθανή συμβολή του γονιδίου *hrpZ_{PspH}* στην επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.

Το παρόν κεφάλαιο αποτελεί τροποποίηση της παρακάτω δημοσίευσης: Παυλή Ο.Ι., Μητσοπούλου Ν., Βισβίκης Β., Αντωνίου Μ., και Σκαράκης Γ.Ν. (2018). Έκφραση *HrpZ_{PspH}* σε φυτά *N. benthamiana*: ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών. 17-19 Οκτωβρίου 2018, Πάτρα, Σελ. 170.

Εισαγωγή

Ως αβιοτική καταπόνηση θεωρείται κάθε περιβαλλοντικός παράγοντας που αποκλίνει από τις φυσιολογικές τιμές και επηρεάζει δυσμενώς την ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών, την ποιότητα των σπόρων, επιδρώντας στη γεωγραφική κατανομή των φυτικών ειδών (Wang et al. 2003; Zhu et al. 2016; He et al. 2018). Στις αβιοτικές καταπονήσεις εντάσσονται η υψηλή αλατότητα, η ανεπάρκεια και η υπερεπάρκεια εδαφικής υγρασίας, οι ακραίες τιμές θερμοκρασίας, η υπεριώδης ακτινοβολία, η αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στο έδαφος, η παρουσία ατμοσφαιρικών ρύπων, η έλλειψη ή περίσσεια θρεπτικών στοιχείων στο εδαφικό διάλυμα καθώς και διάφοροι μηχανικοί παράγοντες (Pereira 2016; Calanca 2017). Η απόκριση των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης είναι μια αρκετά σύνθετη διαδικασία που καθορίζεται από το στάδιο ανάπτυξής τους, την ένταση και τη διάρκεια της καταπόνησης αλλά και την ταυτόχρονη παρουσία πλέον του ενός παράγοντα καταπόνησης και ρυθμίζεται από διαφορετικά και, συχνά, αντικρουόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια (Suzuki et al. 2014; Forni et al. 2017).

Μεταξύ των αβιοτικών καταπονήσεων, η ξηρασία και η υψηλή αλατότητα θεωρούνται ως οι πλέον επιζήμιες βάσει των επιπτώσεων που προκαλούν και της συχνότητας εμφάνισής τους σε παγκόσμιο επίπεδο. Η ξηρασία αναφέρεται στη μείωση του υδατικού δυναμικού και της σπαργής των φυτικών κυττάρων, που οδηγεί σε παρεμπόδιση των φυσιολογικών λειτουργιών των φυτών (de Oliveira et al. 2013). Οι επιδράσεις της αφορούν σε ανάσχεση της ανάπτυξης, λόγω μεταβολών στη μορφολογία και στην κατανομή της βιομάζας αλλά και περιορισμού των κυτταρικών διαιρέσεων, μεταβολές στις σχέσεις του νερού και των θρεπτικών στοιχείων εντός του φυτού και μείωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης, εξαιτίας της παρεμπόδισης εισόδου CO₂ στα φύλλα (Farooq et al. 2009; Li et al. 2017). Αντίστοιχα, με τον όρο αλατότητα νοείται η παρουσία ιόντων μετάλλων, κυρίως Na⁺, στο έδαφος και στο νερό σε συγκεντρώσεις που επηρεάζουν δυσμενώς την επιβίωση των φυτών, ενώ αλατούχο θεωρείται το έδαφος του οποίου η ηλεκτρική αγωγιμότητα στο διάλυμα κορεσμού στην περιοχή της ριζόσφαιρας υπερβαίνει τα 4 dS m⁻¹ και έχει 15 % ανταλλάξιμο νάτριο (Shrivastava and Kumar 2015). Η αλατότητα προκαλεί τοξικότητα ιόντων, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων -κυρίως N, Ca, K, P, Fe και Zn- και οσμωτική καταπόνηση, καθώς η οσμωτική πίεση στο εδαφικό διάλυμα υπερβαίνει αυτής των φυτικών κυττάρων (Kumar 2013; Shrivastava and Kumar 2015).

Τόσο η ξηρασία όσο και η αλατότητα προκαλούν ορισμένες κοινές μεταβολές σε φυσιολογικό, βιοχημικό και μεταβολικό επίπεδο. Σε φυσιολογικό επίπεδο, οι μεταβολές εντοπίζονται στην αρχιτεκτονική των κυττάρων με κλείσιμο των στομάτων, στη διατάραξη της διαπερατότητας των μεμβρανών (Sanchez et al. 1983; Sudhir and Murthy 2004; Forni et al. 2017; Wang et al. 2018) και στη μείωση της περιεχόμενης ποσότητας χλωροφύλλης, μέσω μείωσης της φωτοσύνθεσης. Σε βιοχημικό επίπεδο, οι επιδράσεις αφορούν σε συσσώρευση πολυσακχαριτών -όπως πηκτίνες και λιγνίνη- στο κυτταρικό τοίχωμα (Tenhaken 2015), πρόκληση οξειδωτικής καταπόνησης, λόγω συσσώρευσης O₂⁻ και H₂O₂ στους χλωροπλάστες, και μεταβολή στη βιοσύνθεση δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών καθώς και πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) και τη φωτοσύνθεση (Wang et al. 2003; El Rabey et al. 2016). Σε μεταβολικό επίπεδο, οι εν λόγω καταπονήσεις επιφέρουν μεταβολές στη συσσώρευση των πρωτογενών και δευτερογενών

μεταβολιτών, με κυριότερες αυτές των υδατανθράκων, αμινοξέων και οργανικών οξέων (Khan and Khan 2019).

Ως απόκριση στις ανωτέρω καταπονήσεις, τα φυτά ενεργοποιούν μια σειρά μηχανισμών που αρχικά περιλαμβάνουν την αντίληψη του σήματος στο σημείο που βρίσκεται σε επαφή με την καταπόνηση. Συγκεκριμένα, η οξειδωτική καταπόνηση, που συντελείται λόγω της αλατότητας ή/και της ξηρασίας, οδηγεί σε ενεργοποίηση πρωτεϊνών, γνωστές ως κινάσες (SnRK2), οι οποίες προκαλούν τη συσσώρευση αμπισικού οξέος (Abscisic acid, ABA) και την ενεργοποίηση πρωτεϊνών, γνωστών ως Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK). Στη συνέχεια, μέσω ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, συνοδών πρωτεϊνών και οσμοπροστατευτικών μορίων, το σήμα μεταφέρεται διασυστηματικά και ακολουθεί προσαρμογή του συνολικού μεταβολισμού. Η μεταβολική προσαρμογή αφορά σε καταστολή της δράσης των διεργασιών που καταναλώνουν ενέργεια και επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή ROS (Uddin et al. 2016; Zhu et al. 2016; Khan and Khan 2019). Η συσσώρευση ROS στα φυτικά κύτταρα συμβάλλει στην καταστροφή των πρωτεϊνών, των μεμβρανών και του DNA καθώς και στη συνένωση των φαινολικών και των γλυκοπρωτεϊνών που απαντώνται στο κυτταρικό τοίχωμα, με αποτέλεσμα τη μείωση του δυναμικού επιμήκυνσης των κυτταρικών τοιχωμάτων (Tenhaken 2015; Bechtold and Field 2018; Mhamdi and van Breusegem 2018). Ωστόσο, τα φυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αποτοξικοποίησης των ROS, που περιλαμβάνουν μεταβολές στη δραστηριότητα ενζύμων, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR), η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPX), αλλά και στην ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά μόρια/ενώσεις, όπως η γλουταθειόνη (GSH), το ασκορβικό οξύ (AsA), οι φαινολικές ενώσεις, η τοκοφερόλη και τα καροτενοειδή (Uddin et al. 2016; Huang et al. 2019).

Παραδοσιακά, η βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων προσεγγίζεται μέσω κλασικών διαδικασιών που περιλαμβάνουν υβριδισμό και ποικίλα σχήματα επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων. Αν και η πλειονότητα των καλλιεργούμενων ανθεκτικών ποικιλιών έχει δημιουργηθεί μέσω κλασικών διαδικασιών, η βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων ενέχει σημαντικές δυσκολίες λόγω της πολυγονιδιακής φύσης των γνωρισμάτων ανθεκτικότητας, των πολλαπλών κύκλων επιλογής που απαιτεί η επίτευξη του επιθυμητού επιπέδου ανθεκτικότητας και του κινδύνου απώλειας χρήσιμης γενετικής παραλλακτικότητας (Ahmar et al. 2020). Τα ανωτέρω, σε συνδυασμό με τη δυσκολία επίτευξης ομοιόμορφων συνθηκών καταπόνησης σε συνθήκες αγρού, καθιστούν τις κλασικές διαδικασίες συχνά αναποτελεσματικές. Αντίθετα, ένας συνεχώς αυξανόμενος όγκος ερευνητικών δεδομένων υπογραμμίζει την αποτελεσματικότητα των μοριακών μεθόδων, συμπεριλαμβανομένων αυτών της γονιδιοματικής και της γενετικής μηχανικής, οι οποίες, μεταξύ άλλων, προσφέρουν δυνατότητες αξιοποίησης και διεύρυνσης της διαθέσιμης γονιδιακής δεξαμενής, προσπερνώντας τα ταξινομικά εμπόδια (Moose and Mumm 2008).

Στο επίπεδο αυτό, η βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης ξηρασίας προσεγγίζεται μέσω γενετικής μηχανικής, στοχεύοντας στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία συνεισφέρουν στη βιοσύνθεση ABA, με χαρακτηριστικά παραδείγματα των γονιδίων που κωδικοποιούν DREB πρωτεΐνες (Dehydration-

Responsive Element Binding) καθώς και WRKY και NAC μεταγραφικούς παράγοντες (Hussain et al. 2011; Lata and Prasad 2011). Προς την ίδια κατεύθυνση, στόχο αποτελεί και η μεταβολή της έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντίληψη και μεταφορά σημάτων, όπως οι MAPK κινάσες, καθώς και πρωτεϊνών που σχετίζονται με την προστασία των φυτικών κυττάρων, τη διαμερισματοποίηση ιόντων και τη διατήρηση της δομής των μεμβρανών, όπως οι πρωτεΐνες που συντίθενται στο τέλος της διαδικασίας εμβρυογένεσης και είναι γνωστές ως LEA Proteins (Late Embryogenesis Abundant Proteins) και οι πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης γνωστές ως HSPs (Heat Shock Proteins) (Jewel et al. 2010). Αντίστοιχα, η βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης αλατότητας περιλαμβάνει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην άμεση προστασία των φυτών μέσω της παραγωγής λειτουργικών πρωτεϊνών, όπως το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο βιοσύνθεσης της προλίνης (*P5CS*). Παράλληλα, έχουν αξιοποιηθεί και γονίδια που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως τα *SOD* και *GST*, καθώς και πρωτεΐνες, όπως οι LEA και HSPs (Jha 2019; Funck et al. 2020).

Τα τελευταία χρόνια, η βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων περιλαμβάνει την αξιοποίηση πρωτεϊνών που προέρχονται από παθογόνα. Στο πλαίσιο αυτό, οι βακτηριακές προέλευσης χαρπίνες, κατά την ενδογενή έκφραση ή την εξωγενή εφαρμογή τους, επάγουν μια σειρά αντιδράσεων σε επίπεδο κυττάρων και μορίων, οι οποίες συνδέονται με τις λειτουργίες άμυνας των φυτών, προσδίδοντας ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2007; Chuang et al. 2010; Zhang et al. 2011; Liu et al. 2016; Cao et al. 2018; Zhou et al. 2019; Demirkol 2021). Με δεδομένη την πολυδιάστατη λειτουργικότητα των χαρπινών στα φυτά, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης της χαρπίνης HrpZ_{PspH}, προερχόμενης από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{PspH}), σε φυτά του είδους *N. benthamiana* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας βασίστηκε στο δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων υπό συνθήκες καταπόνησης, στην περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης, στο ποσοστό επιβίωσης καθώς και στη γενική συμπτωματολογία των φυτών.

Υλικά και Μέθοδοι

Γενετικό υλικό

Ως γενετικό υλικό αξιοποιήθηκαν διαγονιδιακές σειρές του είδους *N. benthamiana*, που εκφράζουν το γονίδιο *hrpZ*, προερχόμενο από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121) (Pavli et al. 2011). Οι διαγονιδιακές σειρές δημιουργήθηκαν μέσω γενετικού μετασχηματισμού με τη χρήση του στελέχους C58C1 του *Agrobacterium tumefaciens*. Το βακτήριο είχε μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/*hrpZ*_{PspH} που φέρει το γονίδιο *hrpZ* ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης PR1 (πρωτεΐνη παθογένειας του καπνού) (Tampakaki and Panopoulos 2000; Pavli et al. 2011).

Με στόχο την επιλογή και αξιοποίηση ομοζύγων ως προς το διαγονίδιο *hrpZ*_{PspH} σειρών στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας, αρχικά έγινε έλεγχος του επιπέδου ζυγωτίας σε σειρές T₂ γενεάς που προέρχονταν από διαφορετικά συμβάντα

μετασχηματισμού (T_0). Ο έλεγχος της ζυγωτίας έγινε έμμεσα με βάση την επιλογή για ανθεκτικότητα στο κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Μετά από επιφανειακή απολύμανση των σπόρων, μέσω εμβάπτισης σε καθαρή αιθανόλη (1 min), πραγματοποιήθηκε βλάστηση των σπόρων σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS medium (Murashige and Skoog 1962) που περιείχε υδρομυκίνη (25 $\mu\text{g/l}$). Ως ομοζύγωτες χαρακτηρίστηκαν οι *SP/hrpZ_{Psph}*-σειρές που εμφάνιζαν απουσία διάσπασης ως προς το γνώρισμα της ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη.

Οι επιλεγμένες σειρές αξιολογήθηκαν περαιτέρω για την επιτυχή ένθεση και έκφραση του διαγονιδίου, μέσω PCR και RT-PCR αντίστοιχα, με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών για την ενίσχυση προϊόντος 995 bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο *hrpZ_{Psph}* (Pavli et al. 2011). Για το σκοπό αυτό, έγινε απομόνωση ολικού DNA (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) και ακολούθησε έλεγχος για την ένθεση του γονιδίου *hrpZ_{Psph}* με τη χρήση των εκκινητών: *hrpZ_{Psph}-F*: CGAAAGCCCCGCATATGGCGCTCGTTCTG και *hrpZ_{Psph}-R*: CCGTCAGCGGGATCCAGTCAGGCAGCAG. Το μίγμα της PCR περιείχε 1 μl DNA ως μήτρα, 1.25 mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs, 0.5 μM από κάθε εκκινητή, 1.25 u Taq πολυμεράση (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega) 1x ρυθμιστικού διαλύματος σε τελικό όγκο 20 μl . Το πρόγραμμα ενίσχυσης περιλάμβανε ένα κύκλο στους 94 °C για 3 min, ακολουθούμενο από 30 κύκλους των 30 sec στους 94 °C, 1 min στους 52 °C, 1 min στους 72 °C και έναν κύκλο επιμήκυνσης στους 72 °C για 5 min. Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση του *hrpZ_{Psph}*, έγινε απομόνωση RNA (RNAeasy plant mini kit, Qiagen), ακολουθούμενη από αντίστροφη μεταγραφή (Im-Prom II Reverse Transcriptase System, Promega) και αντίδραση RT-PCR, με τη χρήση των εκκινητών, το μίγμα και το πρόγραμμα που προαναφέρθηκαν. Τα PCR προϊόντα ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X), η οποία περιείχε 1% βρωμιούχο αιθίδιο.

Βάσει της ζυγωτίας, έγινε τυχαία επιλογή 5 *SP/hrpZ_{Psph}*-ομοζύγων σειρών (#1, #2, #6, #7, #9), που συνιστούν ανεξάρτητα συμβάντα μετασχηματισμού (T_0), για αυτογονιμοποίηση προς παραγωγή σειρών T_3 γενεάς. Οι επιλεγμένες σειρές αξιοποιήθηκαν στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας κατά τη φάση της βλάστησης. Βάσει των δεδομένων που προέκυψαν από την *in vitro* αξιολόγηση, επιλέχθηκαν συγκεκριμένες σειρές προς αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στο στάδιο των ώριμων φυτών. Σε όλα τα πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν, ως μάρτυρες, φυτά αγρίου τύπου (wild type plants-wt), καθώς και φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία καταπόνησης.

Καταπόνηση ξηρασίας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών

Οι επιλεγμένες ομοζύγωτες *SP/hrpZ_{Psph}*-σειρές αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους έναντι της καταπόνησης ξηρασίας στη φάση της βλάστησης και σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Στη φάση της βλάστησης, η απόκριση των *hrpZ_{Psph}*-σειρών μελετήθηκε βάσει του δυναμικού βλάστησης των σπόρων και πρώιμης ανάπτυξης των σποροφύτων. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες σπόροι αγρίου τύπου (wild type-wt). Για κάθε συνδυασμό επιπέδου καταπόνησης-σειράς, χρησιμοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις (τριβλία) των 15 σπόρων (T_3 γενεάς). Αρχικά, έγινε απολύμανση των σπόρων, με χρήση καθαρής αιθανόλης (1 min) και ακολούθησε η τοποθέτησή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS medium που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις D-mannitol

(0, 100, 200, 300 mM). Τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με φωτοπερίοδο 16/8 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασία 25 °C. Η αξιολόγηση των φυτών βασίστηκε στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων, στο ρυθμό ανάπτυξης των σποροφύτων και στην ανάπτυξη συμπτωμάτων καταπόνησης για χρονικό διάστημα 20 ημερών.

Ακολούθησε η μελέτη της απόκρισης των *hrpZ_{Psph}*-σειρών, συγκριτικά με φυτά wt, στο στάδιο των ώριμων φυτών, όπου για κάθε συνδυασμό επιπέδου καταπόνησης-σειράς, χρησιμοποιήθηκαν 5 βιολογικές επαναλήψεις (ατομικά φυτά T₃ γενεάς). Οι σπόροι των *hrpZ_{Psph}*-σειρών και των φυτών wt απολυμάνθηκαν επιφανειακά με καθαρή αιθανόλη (1 min) και τοποθετήθηκαν σε σπορείο με μίγμα τύρφης-περλίτη (3:1). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον (φωτοπερίοδος: 16/8 h φως/σκοτάδι, θερμοκρασία: 25 °C). Στο στάδιο των 3-5 πραγματικών φύλλων, έγινε μεταφύτευση των φυτών σε φυτοδοχεία που περιείχαν μίγμα χώματος-τύρφης-περλίτη (1:1:1), ενώ η καταπόνηση πραγματοποιήθηκε σε φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων που βρίσκονταν στο στάδιο 5-7 πραγματικών φύλλων. Τα φυτά υποβλήθηκαν σε πλήρη στέρηση νερού, για χρονικό διάστημα 10 ημερών και ακολούθησε κανονική άρδευση διάρκειας 2 ημερών ώστε να εκτιμηθεί η ικανότητα ανάκαμψής τους. Ως παράμετροι αξιολόγησης της ανθεκτικότητας στην καταπόνηση ξηρασίας χρησιμοποιήθηκαν το ποσοστό επιβίωσης, η συμπτωματολογία των φυτών και η περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης των φύλλων, η οποία προσδιορίστηκε με χλωροφυλλόμετρο (SPAD-502 Plus, Konica Minolta), βάσει της τιμής 4 πλήρως ανεπτυγμένων μεσαίων υγιών φύλλων στο 1/3 της κορυφής του ελάσματος, κατά την 8^η ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης.

Καταπόνηση υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών

Η απόκριση των *hrpZ_{Psph}*-σειρών, συγκριτικά με φυτά wt, στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας μελετήθηκε βάσει του δυναμικού βλάστησης των σπόρων και πρώιμης ανάπτυξης των σποροφύτων. Για κάθε συνδυασμό επιπέδου καταπόνησης-σειράς, χρησιμοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις (τριβλία) των 15 σπόρων (T₃ γενεάς). Έπειτα από απολύμανση των σπόρων, με χρήση καθαρής αιθανόλης (1 min), έγινε τοποθέτησή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0, 100, 200, 300 mM). Τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με φωτοπερίοδο 16/8 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασία 25 °C. Η αξιολόγηση των φυτών βασίστηκε στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων, το ρυθμό ανάπτυξης των σποροφύτων και την ανάπτυξη συμπτωμάτων καταπόνησης για χρονικό διάστημα 20 ημερών.

Για την αξιολόγηση στο στάδιο των ώριμων φυτών, χρησιμοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις (ατομικά φυτά) για κάθε συνδυασμό σειράς-επιπέδου καταπόνησης. Προηγήθηκε απολύμανση των σπόρων των *hrpZ_{Psph}*-σειρών και φυτών wt, με καθαρή αιθανόλη (1 min), και τοποθέτησή τους σε φυτοδοχεία που περιείχαν μίγμα τύρφης: περλίτη (3:1). Ακολούθησε μεταφύτευση σε φυτοδοχεία με μίγμα τύρφης: χώματος: περλίτη (1:1:1), κατά το στάδιο των 3-5 πραγματικών φύλλων. Φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων, που βρίσκονταν στο στάδιο 5-7 πραγματικών φύλλων, υποβλήθηκαν σε καταπόνηση μέσω ριζοποτίσματος με διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης NaCl (0, 100, 200 mM) για χρονικό διάστημα 20 ημερών. Η απόκριση στην καταπόνηση αξιολογήθηκε με βάση το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών, τη συμπτωματολογία και την περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης των φύλλων, η

οποία εκτιμήθηκε με χλωροφυλλόμετρο (SPAD-502 Plus, Konica Minolta), όπως περιγράφεται παραπάνω. Επιπρόσθετα, η ποσότητα χλωροφύλλης των φύλλων εκτιμήθηκε φασματοφωτομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο των Winternans and de Mots (1965). Συνοπτικά, έγινε αποκοπή φυλλικών δίσκων διαμέτρου 1 cm, προερχόμενων από υγιή πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα, τοποθέτηση σε 20 ml διαλύματος NaCl (0, 100, 200 mM) για 72 h, εμβάπτιση σε αιθανόλη έως αποχρωματισμού (περίπου 1 h) και επώαση στο σκοτάδι για 30 min. Ακολούθησε ο προσδιορισμός των chl_a, chl_b και ολικής χλωροφύλλης φασματοφωτομετρικά (665 και 649 nm).

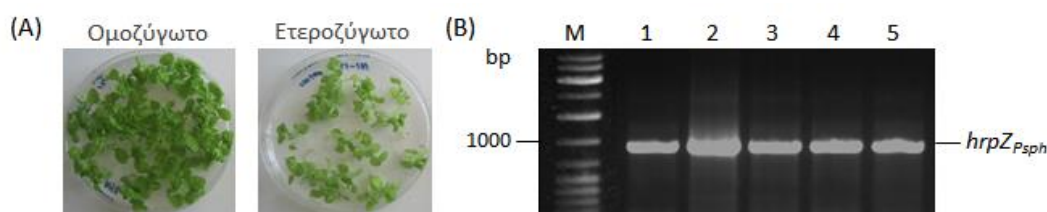
Στατιστική ανάλυση

Για κάθε παράμετρο και επίπεδο καταπόνησης, χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρως τυχαίοποιημένο σχέδιο. Οι επιδράσεις των κύριων παραγόντων και οι αλληλεπιδράσεις αυτών ελέγχθηκαν ως προς τη σημαντικότητά τους μέσω ANOVA ($P \leq 0.05$). Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του πακέτου JMP v.7 (SAS, Cary, NC, USA).

Αποτελέσματα

Επιλογή των ομοζύγων *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών

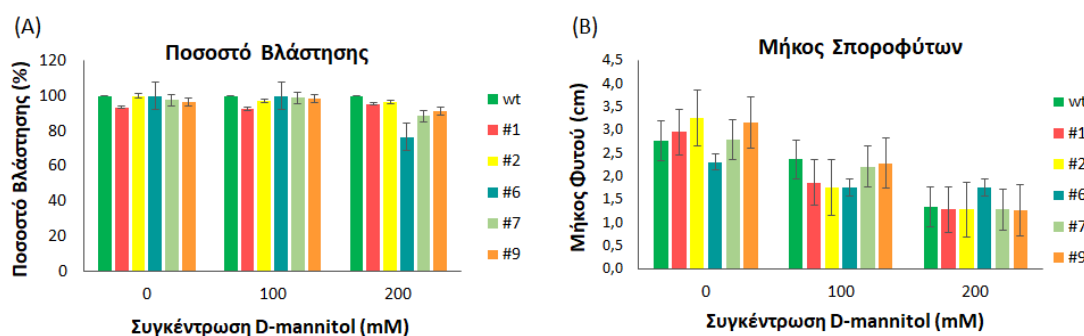
Ο προσδιορισμός της ομοζυγωτίας στους απόγονους αυτογονιμοποίησης (T_2) των αρχικών συμβάντων μετασχηματισμού (T_0) έγινε έμμεσα, βάσει των αναλογιών διάσπασης του γνωρίσματος της ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη, υπό συνθήκες πίεσης επιλογής. Οι διαγονιδιακές σειρές που χαρακτηρίστηκαν ως ομοζύγωτες εμφάνισαν μοτίβα κληρονομής ενός αντιγράφου του διαγονιδίου και βλάστηση του συνόλου των σπόρων, ενώ οι σειρές που χαρακτηρίστηκαν ως ετεροζύγωτες εμφάνισαν αναλογία διάσπασης 3:1 (Εικόνα 1Α). Επιπλέον, η ένθεση και η έκφραση του *hrpZ_{P_{sph}}* επιβεβαιώθηκε μέσω της ενίσχυσης προϊόντων μεγέθους 995 bp στα δείγματα όλων των σειρών που μελετήθηκαν (Εικόνα 1Β).



Εικόνα 1. Επιλογή των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών προς αξιοποίηση στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. (Α) Προσδιορισμός της ζυγωτίας βάσει των αναλογιών διάσπασης του γονιδίου ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη, υπό συνθήκες πίεσης επιλογής (25 μ g/ml), (Β) Προϊόντα PCR σε γονιδιωματικό DNA των φυτών του είδους *N. benthamiana*. Μ: Μάρτυρας σε bp (100 bp DNA Ladder, NEB). 1-5: Διαγονιδιακά φυτά που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* (995 bp).

Απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας

Η απόκριση των *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-ομοζύγωτων σειρών, συγκριτικά με φυτά wt, στην καταπόνηση ξηρασίας στη φάση της βλάστησης εκτιμήθηκε μέσω προσδιορισμού του δυναμικού βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις D-mannitol (0, 100, 200, 300 mM). Σχετικά με το δυναμικό βλάστησης των σπόρων, η καταπόνηση επέδρασε αρνητικά στα υψηλά επίπεδα (200 και 300 mM D-mannitol), ενώ παρατηρήθηκε αδυναμία βλάστησης στα 300 mM D-mannitol και στις δύο κατηγορίες φυτών (*hrpZ_{P_{sph}}* και wt). Ωστόσο, παρατηρήθηκε απουσία διαφορών στους μάρτυρες και στα φυτά που υποβλήθηκαν στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (100 mM D-mannitol) (92,5 - 100 %) (Εικόνα 2Α, Πίνακας 1, Παράρτημα Ι). Στα 200 mM, σημειώθηκε μείωση του ποσοστού βλάστησης στην πλειονότητα των υπό μελέτη σειρών, με εξαίρεση τα φυτά wt και τη σειρά #1 που εμφάνισαν ίδιες τιμές με τους μάρτυρες. Αντίθετα, η μεγαλύτερη μείωση έναντι του μάρτυρα σημειώθηκε στις σειρές #6 και #7 (23,5 και 9,23 %, αντίστοιχα) (Πίνακας 1).



Εικόνα 2. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές (#1, #2, #6, #7, #9) και στα φυτά wt στη φάση της βλάστησης. (Α) Ποσοστό βλάστησης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας (0, 100, 200 mM D-mannitol). (Β) Μήκος σποροφύτων των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας (0, 100, 200 mM D-mannitol). Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των πέντε επαναλήψεων ($n = 5$).

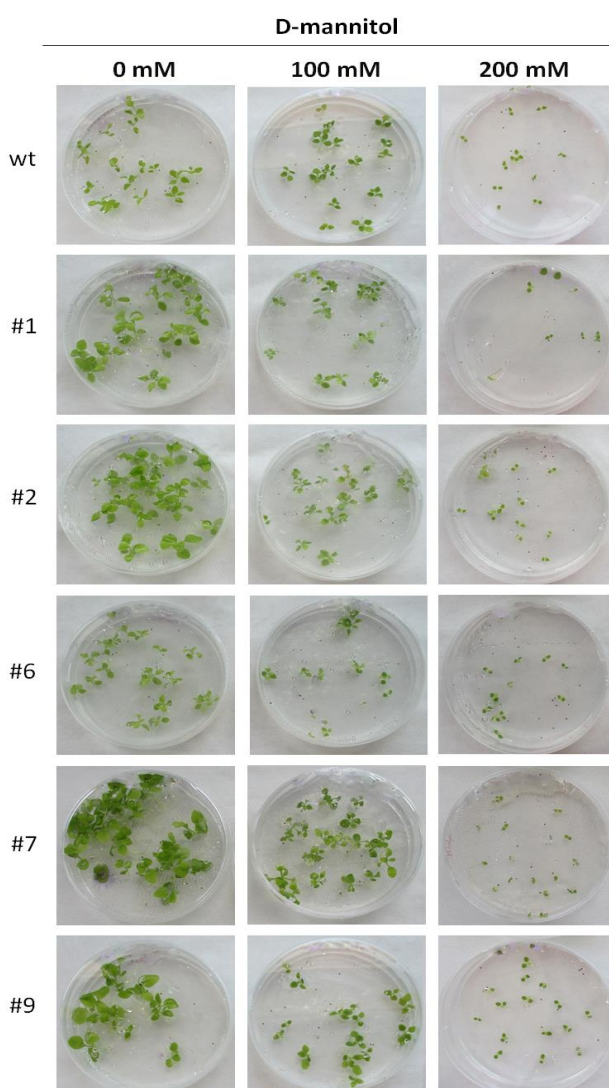
Επιπρόσθετα, η καταπόνηση επηρέασε σημαντικά το δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων και στις δύο κατηγορίες φυτών, με την επίδρασή της να είναι ανάλογη της έντασης, επιφέροντας πλήρη ανασχεση της ανάπτυξης στα 300 mM D-mannitol. Απουσία καταπόνησης, το μεγαλύτερο μήκος εμφάνισαν τα σπορόφυτα των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών #2 και #9 (3,25 και 3,15 cm, αντίστοιχα), ενώ σημαντικά μειωμένο μήκος παρουσίασαν οι σειρές #6, #7 και τα φυτά wt (2,30, 2,78 και 2,75 cm, αντίστοιχα) (Εικόνα 2Β, Παράρτημα Ι). Στα 100 mM D-mannitol, το μεγαλύτερο μήκος εμφάνισαν τα φυτά wt και η σειρά #9 (2,4 και 2,3 cm αντίστοιχα), ενώ το μικρότερο μήκος παρουσίασαν οι σειρές #2 και #6 (1,75 cm). Στα 200 mM D-mannitol, σημαντική υπεροχή εμφάνισε η σειρά #6 παρουσιάζοντας τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα (23,91 %). Αντίθετα, οι υπόλοιπες σειρές καθώς και τα φυτά wt εμφάνισαν δραστική μείωση του μήκους έναντι του μάρτυρα, η οποία κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα (51,63 % έως 60,61 %) (Εικόνα 2Β, Πίνακας 1).

Σε συμφωνία με τα ανωτέρω ευρήματα, σημειώθηκαν διαφορές και στο φαινότυπο των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών, με τις σειρές #2, #7 και #9 να εμφανίζουν μεγαλύτερη

επιφάνεια ελάσματος φύλλου και ευρωστία, συγκριτικά με τις υπόλοιπες σειρές και τα φυτά wt, τόσο απουσία όσο και παρουσία καταπόνησης ξηρασίας (Εικόνα 3).

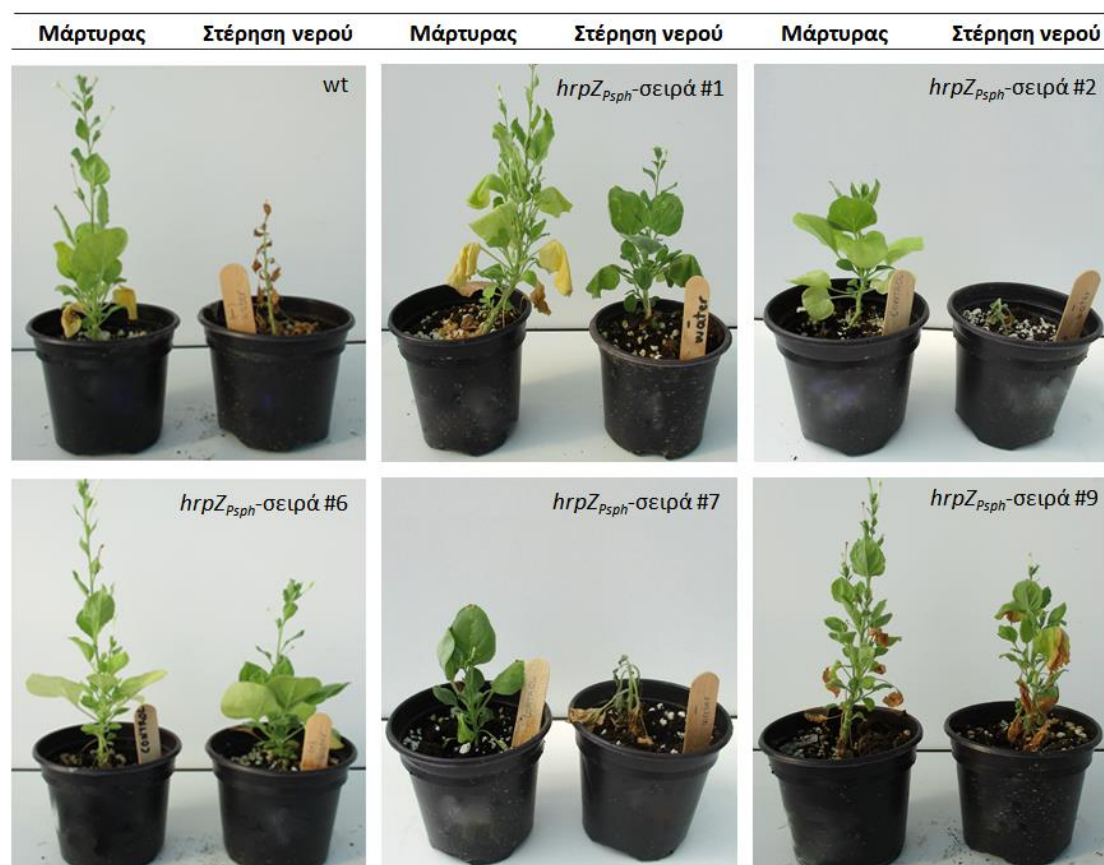
Πίνακας 1. Επίδραση του επιπέδου καταπόνησης ξηρασίας (0, 100, 200, 300 mM D-mannitol) στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και στα φυτά wt στη φάση της βλάστησης.

Μεταχείριση		Μείωση έναντι του μάρτυρα (%)				
		Ποσοστό Βλάστησης			Μήκος Σποροφύτων	
		Συγκέντρωση D-mannitol				
Σειρά	100 mM	200 mM	300 mM	100 mM	200 mM	300 mM
wt	0	0	100	14,54	51,63	100
#1	1,07	0	100	37,29	56,61	100
#2	3,00	4,50	100	46,15	60,61	100
#6	0	23,50	100	23,91	23,91	100
#7	0	9,23	100	20,86	53,96	100
#9	0	5.70	100	27.62	60.32	100



Εικόνα 3. Συγκριτική απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών (#1, #2, #6, #7, #9) και των φυτών wt ως προς το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας (0, 100, 200 mM D-mannitol). Στα 300 mM D-mannitol, το σύνολο των υπό μελέτη σειρών και των φυτών wt εμφάνισε αδυναμία βλάστησης.

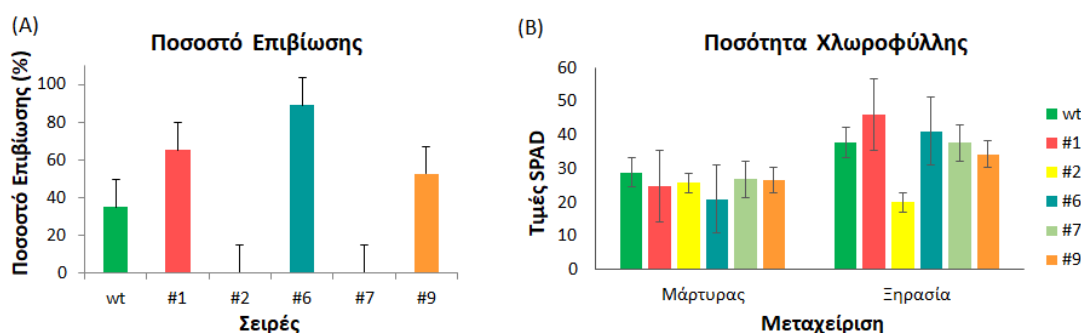
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι της καταπόνησης ξηρασίας στο στάδιο των ώριμων φυτών, φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων υποβλήθηκαν σε πλήρη στέρηση νερού για διάστημα 10 ημερών, ακολουθούμενη από κανονική άρδευση διάρκειας 2 ημερών ώστε να εκτιμηθεί η ικανότητα ανάκαμψης των φυτών. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, η απόκριση των φυτών στην καταπόνηση ξηρασίας διέφερε μεταξύ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt, με τις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές #1 και #6 να εμφανίζουν σχετική ευρωστία, ικανότητα άνθησης και ήπια συμπτώματα μαρασμού σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Αντίθετα, τα φυτά wt χαρακτηρίστηκαν από εκτεταμένο μαρασμό και συμπτώματα ξήρανσης των φύλλων, καθώς και αδυναμία ανάκαμψης έπειτα από κανονική άρδευση (Εικόνα 4). Αντίστοιχη ένταση συμπτωμάτων εμφάνισαν οι σειρές #2 και #7, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν από εκτεταμένη ξήρανση και μαρασμό από την έναρξη της καταπόνησης, ενώ με το πέρας της περιόδου ξηρασίας κατέστη αδύνατη η επιβίωσή τους (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Συγκριτική απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt στην υδατική καταπόνηση στο στάδιο των ώριμων φυτών, έπειτα από πλήρη στέρηση νερού για χρονικό διάστημα 10 ημερών.

Οι φαινοτυπικές παρατηρήσεις συμπίπτουν με το αυξημένο ποσοστό επιβίωσης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών #1 και #6 (65 και 89 %, αντίστοιχα) έναντι της μειωμένης ικανότητας επιβίωσης των φυτών wt (< 40 %), καθώς και της αδυναμίας επιβίωσης των σειρών #2 και #7 (Εικόνα 5Α, Παράρτημα Ι). Κατ' αναλογία, σημαντική διαφοροποίηση αναδείχθηκε ως προς την ποσότητα χλωροφύλλης, η οποία εμφάνισε αυξητική τάση υπό συνθήκες καταπόνησης, με εξαίρεση τη σειρά #2 που παρουσίασε μείωση στα καταπονημένα φυτά

συγκριτικά με τους μάρτυρες. Απουσία καταπόνησης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt, με εξαίρεση τη σειρά #6 που εμφάνισε τη χαμηλότερη τιμή (Εικόνα 5B). Υπό συνθήκες καταπόνησης, τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη εμφάνισαν οι σειρές #1 και #6 (Εικόνα 5B, Παράρτημα Ι).



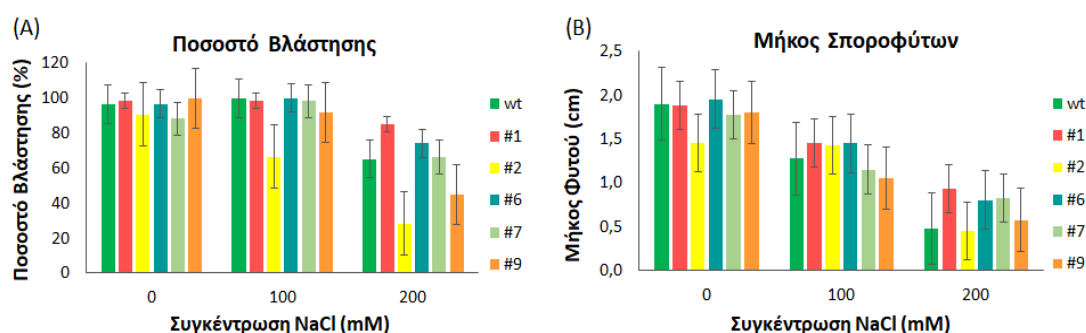
Εικόνα 5. Συγκριτική απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας στο στάδιο των ώριμων φυτών. (A) Ποσοστό επιβίωσης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt. (B) Ποσότητα χλωροφύλλης βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD την 8^η ημέρα από την έναρξη της καταπόνησης. Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τεσσάρων επαναλήψεων ($n = 4$).

Απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας

Υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας, τα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης επηρέασαν σημαντικά το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων, ενώ στα 300 mM NaCl παρατηρήθηκε αδυναμία βλάστησης στο σύνολο των υπό μελέτη φυτών (*hrpZ_{P_{sph}}*- και wt). Παράλληλα, σαφώς έκδηλη υπήρξε και η γονοτυπική επίδραση τόσο ως προς το ποσοστό βλάστησης όσο και ως προς το δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων, με τις διαφορές μεταξύ των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών να μεγιστοποιούνται στα 200 mM NaCl. Απουσία καταπόνησης δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς το ποσοστό βλάστησης των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών, με εξαίρεση τη σειρά #7, η οποία εμφάνισε τη χαμηλότερη τιμή (88,33 %). Στα 100 mM NaCl, το ποσοστό βλάστησης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt δε διέφερε σημαντικά, με εξαίρεση τη σειρά #2 που εμφάνισε τη μικρότερη τιμή (Εικόνα 6A, Παράρτημα Ι) καθώς και τη μεγαλύτερη μείωση έναντι του μάρτυρα (69,54 %) (Πίνακας 2). Στα 200 mM NaCl, το δυναμικό βλάστησης διέφερε σημαντικά μεταξύ των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών, με τη σειρά #1, ακολουθούμενη από τη σειρά #6, να εμφανίζουν υπεροχή έναντι των υπολοίπων (Εικόνα 2Δ), όπως καταδεικνύεται και από την αντίστοιχη μείωση έναντι του μάρτυρα (12,82 και 23,10 %, αντίστοιχα) (Πίνακας 2).

Επιπρόσθετα, το δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων επηρεάστηκε σημαντικά από την καταπόνηση, με την επίδραση να είναι ανάλογη της έντασής της στο σύνολο των φυτών, επιφέροντας σταδιακή μείωση με παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης NaCl. Απουσία καταπόνησης, το μήκος των σποροφύτων των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt δε διέφερε σημαντικά, με εξαίρεση τη σειρά #2 που εμφάνισε τη μικρότερη τιμή (1,45 cm). Ωστόσο υπό συνθήκες καταπόνησης, οι υπό μελέτη σειρές παρουσίασαν διαφορετική απόκριση ως προς το δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων. Στα 100 mM NaCl, το

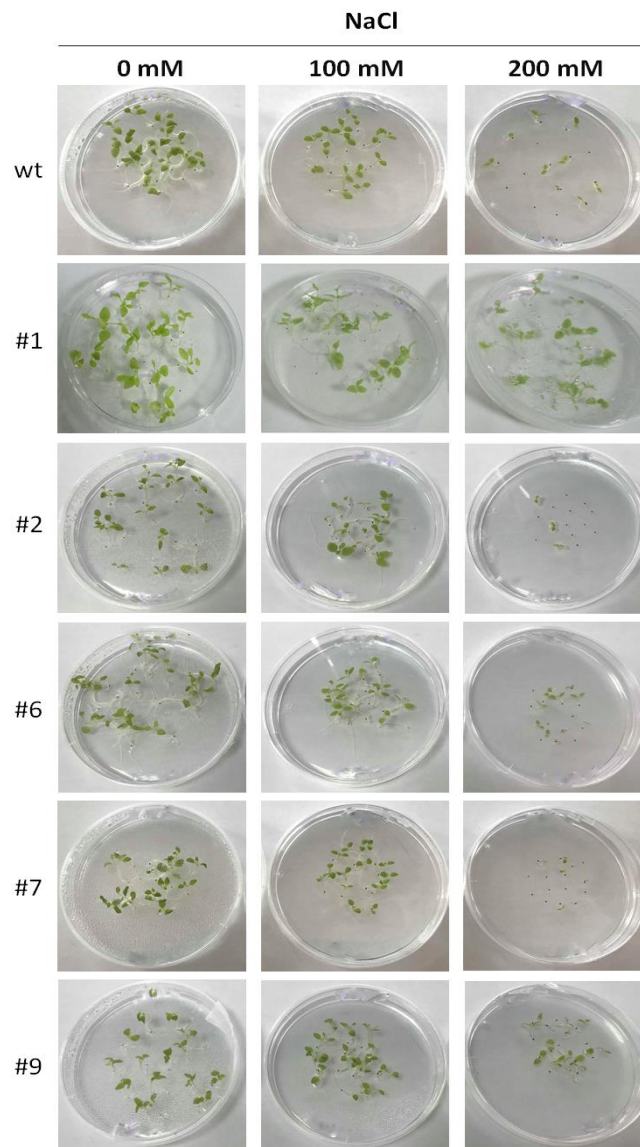
μεγαλύτερο μήκος εμφάνισαν οι σειρές #1, #2 και #6 (1,45, 1,43 και 1,45 cm, αντίστοιχα), ενώ το μικρότερο η σειρά #9 (1,05 cm) (Εικόνα 6B, Παράρτημα Ι). Στα 200 mM NaCl, το μεγαλύτερο μήκος εμφάνισαν τα σπορόφυτα των σειρών #1, #6 και #7 (Εικόνα 6B), με την υπεροχή αυτή να καταδεικνύεται και από τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα (50,53, 58,97 και 53,37 %, αντίστοιχα) (Πίνακας 2). Αντίθετα, τα φυτά wt σημείωσαν τη μεγαλύτερη αντίστοιχη μείωση (74,7 %) (Πίνακας 2). Σε φαινοτυπικό επίπεδο, παρά την απουσία συμπτωμάτων καταπόνησης, η πλειοψηφία των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών χαρακτηρίζονταν από βελτιωμένη ανάπτυξη και ευρωστία έναντι των φυτών wt, η οποία εκφράστηκε μέσω της μεγαλύτερης φυλλικής επιφάνειας, τόσο απουσία όσο και παρουσία καταπόνησης (Εικόνα 7).



Εικόνα 6. Επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές (#1, #2, #6, #7, #9) και στα φυτά wt στη φάση της βλάστησης. (Α) Ποσοστό βλάστησης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl). (Β) Μήκος σποροφύτων των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl). Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των πέντε επαναλήψεων ($n = 5$)

Πίνακας 2. Επίδραση του επιπέδου καταπόνησης αλατότητας (0, 100, 200, 300 mM NaCl) στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και στα φυτά wt στη φάση της βλάστησης.

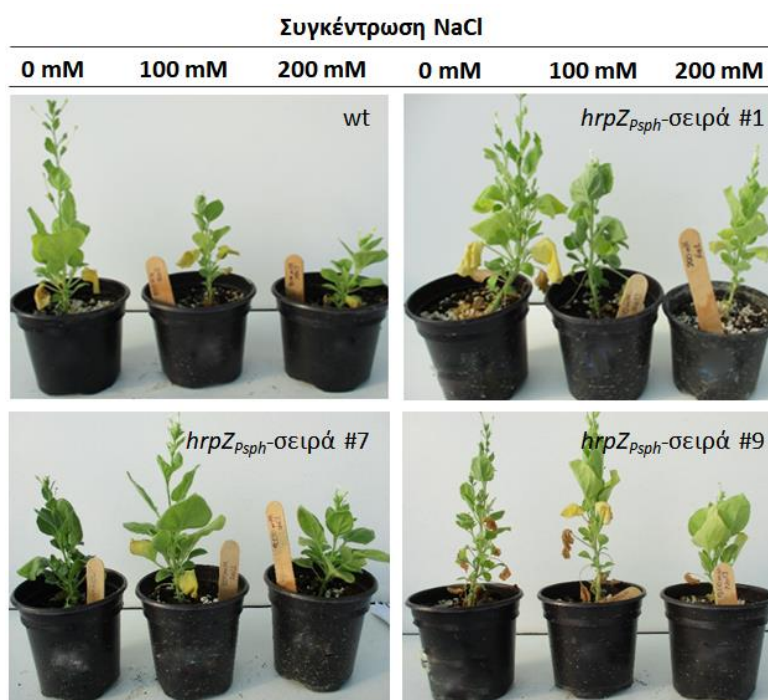
Μεταχείριση Σειρά		Μείωση έναντι του μάρτυρα (%)					
		Ποσοστό Βλάστησης			Μήκος Φυτού		
		Συγκέντρωση NaCl					
		100 mM	200 mM	300 mM	100 mM	200 mM	300 mM
wt	0	32,41	100	32,63	74,74	100	
#1	0	12,82	100	22,87	50,53	100	
#2	28,32	69,54	100	1,38	68,96	100	
#6	0	23,10	100	25,64	58,97	100	
#7	0	24,91	100	35,39	53,37	100	
#9	8,34	55.00	100	41,66	67,77	100	



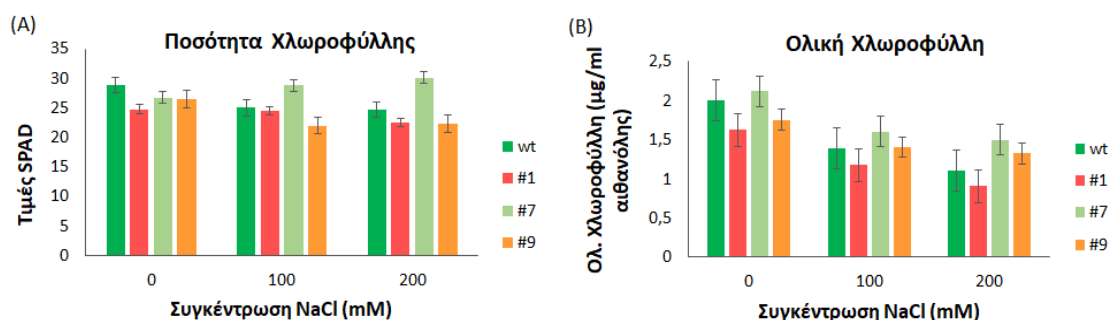
Εικόνα 7. Συγκριτική απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών (#1, #2, #6, #7, #9) και των φυτών wt ως προς το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl). Στα 300 mM NaCl, το σύνολο των υπό μελέτη σειρών και των φυτών wt εμφάνισε αδυναμία βλάστησης.

Η επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι της καταπόνησης υψηλής αλατότητας μελετήθηκε επιπλέον σε φυτά που βρίσκονταν στο στάδιο 5-7 πραγματικών φύλλων και υποβλήθηκαν σε ριζοπότισμα με διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης NaCl (0, 100, 200 mM) για χρονικό διάστημα 20 ημερών. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt, με τις πρώτες να εμφανίζουν σχετική ευρωστία, μεγαλύτερη επιφάνεια ελάσματος των φύλλων και ηπιότερα συμπτώματα χλώρωσης συγκριτικά με τα φυτά wt τόσο στα 100 όσο και στα 200 mM NaCl (Εικόνα 8). Αντίθετα, τα φυτά wt εμφάνισαν εκτεταμένη χλώρωση των φύλλων και αδυναμία περαιτέρω ανάπτυξης, η οποία ήταν περισσότερο έκδηλη στα 200 mM NaCl. Περαιτέρω, υπό συνθήκες καταπόνησης παρατηρήθηκαν διαφορές στην ποσότητα χλωροφύλλης μεταξύ των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών, με τη σειρά #7 να εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές τόσο στα 100 όσο

και στα 200 mM NaCl (Εικόνα 9Α). Αντίθετα, σημαντικά μειωμένη ποσότητα χλωροφύλλης εμφάνισαν η σειρά #9 και οι σειρές #1 και #9 στα 100 mM και στα 200 mM NaCl, αντίστοιχα (Εικόνα 9Α, Παράρτημα Ι). Τέλος, η καταπόνηση επέφερε μείωση της ποσότητας χλωροφύλλης των φυλλικών δίσκων που τοποθετήθηκαν σε διαλύματα NaCl και στις δύο κατηγορίες φυτών, η οποία ήταν ανάλογη του επιπέδου καταπόνησης, οδηγώντας σε μεγαλύτερη μείωση στα 200 mM NaCl. Απουσία καταπόνησης, η σειρά #7, ακολουθούμενη από τα φυτά wt, εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές χλωροφύλλης, ενώ τόσο στα 100 όσο και στα 200 mM NaCl, η σειρά #7 παρουσίασε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη (Εικόνα 9Β, Παράρτημα Ι).



Εικόνα 8. Συγκριτική απόκριση των *hrpZ_{p_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl) στο στάδιο των ώριμων φυτών.



Εικόνα 9. (Α) Περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη, βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD. Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τεσσάρων επαναλήψεων ($n = 4$). (Β) Περιεκτικότητα των φυλλικών δίσκων σε ολική χλωροφύλλη. Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τριών επαναλήψεων ($n = 3$).

Συζήτηση

Οι βακτηριακής προέλευσης χαρπίνες που εκκρίνονται μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III των Gram-αρνητικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων έχει αποδειχθεί ότι επάγουν αμυντικές αποκρίσεις σε φυτά έναντι βιοτικών καταπονήσεων, προάγοντας παράλληλα την ανάπτυξη των φυτών (Oh and Beer 2007; Wu et al. 2007, 2009; Ren et al. 2008; Dong et al. 2016; Liu et al. 2020). Ειδικότερα, η εξωγενής εφαρμογή σκευασμάτων χαρπινών ή η ενδογενής έκφρασή τους σε διαγονιδιακά φυτά έχει συσχετιστεί με προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι μυκήτων (Sohn et al. 2007; Shao et al. 2008; Wang et al. 2014), βακτηρίων (Sang et al. 2012; Wang et al. 2016), ιών (Li et al. 2011) και εντόμων (Liu et al. 2010; Lü et al. 2011; Fu et al. 2014; Xu et al. 2014). Περαιτέρω μελέτες καταδεικνύουν τη θετική επίδραση των χαρπινών στην επαγωγή ανεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένων της υψηλής αλατότητας, της ξηρασίας και των ακραίων θερμοκρασιών (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2007; Chuang et al. 2010; Zhang et al. 2011; Liu et al. 2016; Cao et al. 2018; Zhou et al. 2019; Demirkol 2021). Τα τελευταία χρόνια, έπειτα από την αναγνώριση της χαρπίνης HrpN από το βακτήριο *Erwinia amylovora* ως ανεξάρτητο διεγέρτη της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) (Wei et al. 1992), ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών υπογραμμίζει τις πολυδιάστατες λειτουργικές επιδράσεις των χαρπινών στα φυτά, οι οποίες εκτείνονται από την προαγωγή της ανάπτυξης έως και την επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Strobel et al. 1996; Dong et al. 1999, 2004; Peng et al. 2004; Jang et al. 2006; Chen et al. 2008a, b; Chuang et al. 2010; Huo et al. 2010; Cao et al. 2018; Liu et al. 2018, 2020; Ji et al. 2021).

Στο πλαίσιο αυτό, ανάλογα είναι τα ευρήματα ότι η έκφραση του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι του ιού BNYVV (Pavli et al. 2011), ενώ πρόσφατα αποδείχθηκε η ικανότητά του να επάγει ανεκτικότητα έναντι της τοξικότητας Cd στο είδος *N. benthamiana* (Mitsopoulou et al. 2021). Με δεδομένο ότι τα ανωτέρω ευρήματα παρέχουν ενδείξεις σχετικά με την ικανότητα του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* να επάγει ευρέος φάσματος ανθεκτικότητα, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η μελέτη της απόκρισης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών. Η αξιολόγηση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών έγινε συγκριτικά με φυτά wt και βασίστηκε σε φυσιολογικές και αναπτυξιακές παραμέτρους. Ειδικότερα, κατά τη φάση της βλάστησης η αξιολόγηση έγινε βάσει του δυναμικού βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων καθώς και της συμπτωματολογίας. Στο στάδιο των ώριμων φυτών, η απόκριση εκτιμήθηκε με βάση το ποσοστό επιβίωσης, τη συμπτωματολογία των φυτών και την περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης.

Η καταπόνηση ξηρασίας επιφέρει διάφορες μεταβολές στα φυτά, οι οποίες περιλαμβάνουν τη μείωση του δυναμικού βλάστησης των σπόρων και την ανασχηση της ανάπτυξης των σποροφύτων, λόγω παρεμπόδισης της επιμήκυνσης και διαίρεσης των κυττάρων (Pérez-Molphe-Balch et al. 1996; Schuppler et al. 1998; Farooq et al. 2009; Liu et al. 2015). Σε μεταγενέστερο αναπτυξιακό στάδιο, η καταπόνηση ξηρασίας προκαλεί συμπτώματα μαρασμού των φύλλων, μείωσης της περιεχόμενης ποσότητας χλωροφύλλης και ελάττωση του ύψους και της παραγωγικότητας των φυτών (Farooq et al. 2009; Dong et al. 2019;

Karoor et al. 2020). Τα συμπτώματα αυτά αποδίδονται σε μείωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης, λόγω μειωμένης αγωγιμότητας των στομάτων και δυσλειτουργιών στο φωτοσύστημα II, καθώς και σε διαταραχή στην πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από το εδαφικό διάλυμα (Cornic and Massacci 1996; Lawlor and Tezara 2009; Li et al. 2017). Στην παρούσα μελέτη, και οι δύο κατηγορίες φυτών επηρεάστηκαν αρνητικά από την καταπόνηση ξηρασίας. Ωστόσο, στη φάση της βλάστησης οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές εμφάνισαν κατά κανόνα βελτιωμένη απόκριση συγκριτικά με τα φυτά wt, η οποία εντοπίστηκε στο ρυθμό ανάπτυξης των σποροφύτων, με τη σειρά #6 να εμφανίζει τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα. Αντίστοιχα, στο στάδιο των ώριμων φυτών οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης, βελτιωμένο φαινότυπο και σχετική ευρωστία, η οποία εκφράστηκε μέσω της ικανότητας άνθησης και των ηπιότερων συμπτωμάτων μαρασμού έναντι των φυτών wt. Στο πλαίσιο αυτό, οι σειρές #1 και #6 διακρίθηκαν ως προς την υπεροχή τους, εμφανίζοντας σαφώς ηπιότερη συμπτωματολογία, βελτιωμένη ευρωστία, ικανότητα άνθησης και ανάκαμψη έπειτα από κανονική άρδευση, καθώς και αυξημένο ποσοστό επιβίωσης (65 και 89 %, αντίστοιχα), συγκριτικά με τις υπόλοιπες σειρές και τα φυτά wt. Περαιτέρω, οι σειρές #1 και #6 εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ποσότητα χλωροφύλλης υπό συνθήκες καταπόνησης έναντι των υπόλοιπων *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η ενδογενής έκφραση του γονιδίου *hrf1* προερχόμενο από το βακτήριο *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* σε φυτά του είδους *Oryza sativa*, οδήγησε σε ανθεκτικότητα έναντι της καταπόνησης ξηρασίας μέσω αύξησης του ποσοστού επιβίωσης των φυτών, υψηλότερης ικανότητας συγκράτησης νερού και αύξησης των επιπέδων ABA, SOD και προλίνης (Zhang et al. 2011). Επίσης, η εξωγενής εφαρμογή χαρπινών, και ειδικότερα της HrpN από το βακτήριο *Erwinia amylovora*, σε φυτά του είδους *Arabidopsis thaliana* οδήγησε σε αυξημένη ανθεκτικότητα στην ξηρασία που εκφράστηκε μέσω καθυστέρησης στην εμφάνιση και μειωμένης έντασης συμπτωμάτων μαρασμού, καθώς και υψηλότερου ποσοστού επιβίωσης φυτών, εξαιτίας της έκφρασης γονιδίων που συνδέονται με το ABA, όπως τα *ABI1* και *ABI2*, και της ταυτόχρονης μείωσης της έκφρασης του γονιδίου *ETR1* που συνδέεται με το μονοπάτι του αιθυλενίου (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2007). Περαιτέρω, σχετικά είναι τα ευρήματα ότι η εφαρμογή της χαρπίνης Hra1, που προέρχεται από το βακτήριο *X. oryzae* pv. *oryzae*, στο είδος *Nicotiana tabacum* επάγει ανθεκτικότητα στην ξηρασία, η οποία εκφράστηκε μέσω της ηπιότερης συμπτωματολογίας και της βελτιωμένης ικανότητας επιβίωσης και συγκράτησης νερού που συνδέονται με υπερέκφραση γονιδίων άμυνας, όπως τα *NtERD10B* και *NtLEA5*, και γονιδίων που συνδέονται με αποτοξικοποίηση των ROS, όπως τα *NtSOD*, *NtAPX* και *NtCAT* (Ji et al. 2021).

Οι επιδράσεις της καταπόνησης αλατότητας στα φυτά στη φάση της βλάστησης, περιλαμβάνουν μείωση του ποσοστού βλάστησης και αύξηση του μέσου χρόνου βλάστησης των σπόρων, αναστολή του ρυθμού αύξησης των σποροφύτων, η οποία εκφράζεται με ελάττωση του μήκους ρίζας και βλαστού, καθώς και μείωση της ευρωστίας και της βιομάζας των σποροφύτων, που εκδηλώνεται με μείωση του νωπού και ξηρού βάρους του βλαστού (Guo et al. 2012; Wu et al. 2015; Santo et al. 2017; Dehnavi et al. 2020). Οι επιδράσεις αυτές, που στο πλείστο των περιπτώσεων είναι ανάλογες του επιπέδου καταπόνησης, οφείλονται σε διαταραχές στις αναλογίες των θρεπτικών στοιχείων στο εδαφικό διάλυμα ή/και στην πρόκληση οσμωτικής καταπόνησης και τοξικότητας λόγω

αυξημένης συσσώρευσης ιόντων Na^+ και Cl^- στο κυτταρόπλασμα (Kaya et al. 2006; Munns and Tester 2008; Zörb et al. 2019). Παρά τις δυσμενείς επιδράσεις της καταπόνησης στο σύνολο των φυτών, οι υπό μελέτη κατηγορίες διαφοροποιήθηκαν σαφώς ως προς την απόκρισή τους στην υψηλή αλατότητα. Ειδικότερα, οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές #1 και #6 εμφάνισαν τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα ως προς το δυναμικό βλάστησης των σπόρων, συγκριτικά με τις υπόλοιπες *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και τα φυτά wt, ενώ οι σειρές #1, #7 και #6 παρουσίασαν τη μικρότερη αντίστοιχη μείωση ως προς το δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων στα 200 mM NaCl. Είναι γνωστό ότι στο στάδιο των ώριμων φυτών, η καταπόνηση αλατότητας προκαλεί χλώρωση και γήρανση των φύλλων, μείωση της ποσότητας χλωροφύλλης των φύλλων, μεταβολές στο πηλίκιο K/Na ενδοκυτταρικά και μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των φυτών (Hester et al. 2001; Munns and Tester 2008; Taïbi et al. 2016). Η μείωση της περιεχόμενης ποσότητας χλωροφύλλης λόγω μείωσης του ρυθμού φωτοσύνθεσης θεωρείται ως ένα χαρακτηριστικό σύμπτωμα της καταπόνησης αλατότητας (Hester et al. 2001; Taïbi et al. 2016), που οφείλεται σε μείωση της φυλλικής επιφάνειας και της αγωγιμότητας των στομάτων, αύξηση της ποσότητας NaCl στους χλωροπλάστες και αναστολή της εύρυθμης λειτουργίας του φωτοσυστήματος II (Netondo et al. 2004; Sudhir and Murthy 2004). Στην παρούσα μελέτη, οι επιδράσεις της καταπόνησης υψηλής αλατότητας ήταν εμφανείς τόσο στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές όσο και στα φυτά wt, ωστόσο παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την ένταση των συμπτωμάτων μεταξύ των δύο κατηγοριών φυτών. Οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές εμφάνισαν βελτιωμένη ανάπτυξη, μεγαλύτερη επιφάνεια ελάσματος και ηπιότερα συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων έναντι των φυτών wt, τα οποία χαρακτηρίστηκαν από εκτεταμένα συμπτώματα χλώρωσης και ανάσχεση της ανάπτυξης. Επίσης, στο επίπεδο των 100 mM NaCl οι σειρές #1 και #7 εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές χλωροφύλλης, ενώ στο επίπεδο των 200 mM NaCl η σειρά #7 παρουσίασε την υψηλότερη τιμή χλωροφύλλης έναντι των υπόλοιπων σειρών και των φυτών wt. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με αναφορές σχετικά με τη θετική επίδραση του διαγονιδίου *SSB_{Xoc}* από το βακτήριο *X. oryzae* pv. *oryzicola* στο είδος *N. benthamiana*, η οποία εκφράστηκε μέσω του υψηλότερου δυναμικού βλάστησης και της βελτιωμένης ανάπτυξης και αποδίδεται σε αυξημένη συσσώρευση προλίνης και έκφραση γονιδίων άμυνας, όπως τα *APX*, *GPX* και *CAT1* (Cao et al. 2018). Επίσης, οι Chuang et al. (2010) αναφέρουν ότι η έκφραση του γονιδίου *SIERF5*, που επάγεται μετά από έκφραση χαρπίνης, σε φυτά του είδους *Arabidopsis thaliana* οδήγησε σε προηγμένη ανθεκτικότητα στην καταπόνηση αλατότητας, η οποία εκφράστηκε μέσω βελτιωμένης ανάπτυξης του ριζικού συστήματος και οφείλεται στην ενεργοποίηση του ABA- μονοπατιού.

Στην παρούσα μελέτη, η αυξημένη ανθεκτικότητα των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών έναντι των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας πιθανά υποδεικνύει μία ευρέως φάσματος ανθεκτικότητα, λόγω της έκφρασης του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}*. Προς την ίδια κατεύθυνση, περαιτέρω συνηγορούν τα ευρήματα σχετικά με την προηγμένη ανθεκτικότητα των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, με υπερέχουσα απόκριση αυτή των σειρών #1 και #6, στην ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης που προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Η βελτιωμένη απόκριση των εν λόγω σειρών περιλάμβανε ηπιότερη συμπτωματολογία και μειωμένη αποίκιση του βακτηρίου στους φυτικούς ιστούς συγκριτικά με τις υπόλοιπες διαγονιδιακές σειρές και τα φυτά wt (μη δημοσιευμένα δεδομένα). Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ποικίλους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης πιθανά αποδίδεται σε ενεργοποίηση γονιδίων

άμυνας, λόγω της έκφρασης του *hrpZ_{P_{sph}}*, με σκοπό τη μείωση των αρνητικών επιδράσεων των καταπονήσεων. Στο πλαίσιο αυτό, σχετικά είναι τα ευρήματα προηγούμενης μελέτης που καταδεικνύουν τη διαφορετική έκφραση γονιδίων άμυνας σε *hrpZ_{P_{sph}}*- και φυτά wt (Pavli et al. 2011). Συγκεκριμένα, η ανάλυση ανέδειξε την υψηλότερη έκφραση των γονιδίων *AOX*, *NPR1* και *PR1a*, που εμπλέκονται στα βιοχημικά μονοπάτια AOS, SA και πρωτεϊνών παθογένειας (PR) αντίστοιχα, στα *hrpZ_{P_{sph}}*-φυτά, συγκριτικά με τα φυτά wt, καθώς και την υπερέκφραση των γονιδίων *WIPK* και *hin1* αποκλειστικά στα SP/*hrpZ_{P_{sph}}*-φυτά. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των *WIPK* και *hin1*, που επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας, σχετίστηκαν με μία κατάσταση προηγμένης άμυνας σε μοριακό επίπεδο. Η τελευταία, που είναι γνωστή ως “primed state”, συνδέεται με προηγμένη και ταχεία αντίσταση των φυτών έναντι βιοτικών ή/και αβιοτικών καταπονήσεων (Conrath et al. 2006). Σε ανάλογο πλαίσιο, οι παρατηρηθείσες διαφορές στο επίπεδο ανθεκτικότητας μεταξύ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών αποδίδονται στην τυχαία ένθεση του γονιδίου στα αρχικά συμβάντα μετασχηματισμού (T₀), γεγονός που επιφέρει μεταβολές στην έκφραση του *hrpZ_{P_{sph}}* και επακόλουθες μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων άμυνας στους απογόνους αυτογονιμοποίησης.

Συμπεράσματα

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα παρέχουν ενδείξεις σχετικά με τη διαφορετική απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, συγκριτικά με φυτά wt, στις καταπονήσεις ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών. Η παρατηρούμενη ανθεκτικότητα, που οφείλεται στην έκφραση της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}}, είναι αντίστοιχη με την ανθεκτικότητα που επάγεται από άλλες βακτηριακής προέλευσης χαρπίνες και πιθανά αποδίδεται σε επαγωγή της έκφρασης γονιδίων άμυνας ή/και σε μεταβολές σε μεταβολικό επίπεδο που περιλαμβάνουν κυρίως τη συσσώρευση οσμωπροστατευτικών μεταβολιτών. Με στόχο την ενδελεχή διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την παρατηρηθείσα βελτιωμένη απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, καθοριστική πρόκειται να είναι η ανάλυση του μεταβολικού τους προφίλ, συγκριτικά με αυτό των φυτών wt, υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.

Βιβλιογραφία

- Ahmar S, Gill RA, Jung KH, Faheem A, Qasim MU, Mubeen M, Zhou W (2020) Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: Recent advances and future outlook. *Int J Mol Sci* 21:2590. <https://doi.org/10.3390/ijms21072590>
- Bechtold U, Field B (2018) Molecular mechanisms controlling plant growth during abiotic stress. *J Exp Bot* 69:2753–2758. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery157>
- Calanca PP (2017) Effects of abiotic stress in crop production. In: Ahmed M, Stockle CO (eds) Quantification of climate variability, adaptation and mitigation for agricultural sustainability. Springer International Publishing, Switzerland, pp 165-180. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32059-5_8
- Cao Y, Yang M, Ma W, Sun Y, Chen G (2018) Overexpression of *SSB_{Xoc}*, a single-stranded DNA-binding protein from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, enhances plant growth and disease and salt stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci* 9:953. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00953>

- Chen L, Qian J, Qu S, Long J, Yin Q, Zhang C, Wu X, Sun F, Wu T, Hayes M, Beer SV, Dong H (2008a) Identification of specific fragments of HpaG Xooc, a harpin from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, that induce disease resistance and enhance growth in plants. *Phytopathology* 98:781-791. <https://doi.org/10.1094/phyto-98-7-0781>
- Chen L, Zhang SJ, Zhang SS, Qu S, Ren X, Long J, Yin Q, Qian J, Sun F, Zhang C, Wang L, Wu X, Wu T, Zhang Z, et al (2008b) A fragment of the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* harpin HpaG Xooc reduces disease and increases yield of rice in extensive grower plantings. *Phytopathology* 98:792-802. <https://doi.org/10.1094/phyto-98-7-0792>
- Chuang Hw, Harnrak A, Chen YC, Hsu CM (2010) A harpin-induced ethylene-responsive factor regulates plant growth and responses to biotic and abiotic stresses. *Biochem Biophys Res Commun* 402:414-420. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.047>
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, et al. (2006) Priming: Getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact* 19:1062-1071. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062>
- Cornic G, Massacci A (1996) Leaf photosynthesis under drought stress. In: Baker NR (eds) *Photosynthesis and the environment*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 347-366. https://doi.org/10.1007/0-306-48135-9_14
- de Oliveira AB, Alencar NLM, Gomes-Filho E (2013) Comparison between the water and salt stress effects on plant growth and development. In: Akinci S (eds) *Responses of organisms to water stress*. IntechOpen, pp 67-94. <https://doi.org/10.5772/54223>
- Dehnavi AR, Zahedi M, Ludwiczak A, Perez SG, Piernik A (2020) Effect of salinity stress on seed germination and seedling development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) genotypes. *Agronomy* 10:859. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060859>
- Demirkol G (2021) PopW enhances drought stress tolerance of alfalfa via activating antioxidative enzymes, endogenous hormones, drought related genes and inhibiting senescence genes. *Plant Physiol Biochem* 166:540-548. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.036>
- Dong H, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV (1999) Harpin induces disease resistance in arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. *Plant J* 20:207-215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1999.00595.x>
- Dong HP, Peng J, Bao Z, Meng X, Bonasera JM, Chen G, Beer SV, Dong H (2004) Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated arabidopsis growth and insect defense. *Plant Physiol* 136:3628-3638. <https://doi.org/10.1104/pp.104.048900>
- Dong HP, Yu H, Bao Z, Guo X, Peng J, et al. (2005) The *ABI2*-dependent abscisic acid signaling controls HrpN-induced drought tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* 221:313-327. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1444-x>
- Dong S, Jiang Y, Dong Y, Wang L, Wang W, Ma Z, et al. (2019) A study on soybean responses to drought stress and rehydration. *Saudi J Biol Sci* 26:2006-2017. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.08.005>
- Dong Y, Li P, Zhang C (2016) Harpin Hpa1 promotes flower development in *Impatiens* and *Parochetus* plants. *Bot Stud* 57. <https://doi.org/10.1186/s40529-016-0132-z>
- El Rabey HA, Al-Malki AL, Abulnaja KO (2016) Proteome analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) under severe drought and salt stress. *Int J Genomics*: 7840759. <https://doi.org/10.1155/2016/7840759>

- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29:185–212. <https://doi.org/10.1051/agro:2008021>
- Forni C, Duca D, Glick BR (2017) Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant Soil* 410:335–356. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x>
- Fu M, Xu M, Zhou T, Wang D, Tian S, Han L, Dong H, Zhang C (2014) Transgenic expression of a functional fragment of harpin protein Hpa1 in wheat induces the phloem-based defence against English grain aphid. *J Exp Bot* 65:1439–1453. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert488>
- Funck D, Baumgarten L, Stift M, von Wirén N, Schönemann L (2020) Differential contribution of P5CS isoforms to stress tolerance in arabidopsis. *Front Plant Sci* 11: 565134. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.565134>
- Guo Y, Jia W, Song J, Wang D, Chen M, Wang B (2012) *Thellungilla halophila* is more adaptive to salinity than *Arabidopsis thaliana* at stages of seed germination and seedling establishment. *Acta Physiol Plant* 34:1287–1294. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0925-y>
- He M, He CH, Ding NZ (2018) Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Front Plant Sci* 9:1771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>
- Hester MW, Mendelssohn IA, McKee KL (2001) Species and population variation to salinity stress in *Panicum hemitomon*, *Spartina patens* and *Spartina alterniflora*: morphological and physiological constraints. *Environ Exp Bot* 46:277-297. [https://doi.org/10.1016/s0098-8472\(01\)00100-9](https://doi.org/10.1016/s0098-8472(01)00100-9)
- Huang H, Ullah F, Zhou DX, Yi M, Zhao Y (2019) Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Front Plant Sci* 10:800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Huo R, Wang Y, Ma LL, Qiao JQ, Shao M, Gao XW (2010) Assessment of inheritance pattern and agronomic performance of transgenic rapeseed having harpin_{Xooc}-encoding *hrf2* gene. *Transgenic Res* 19: 841–847. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9365-x>
- Hussain SS, Kayani MA, Amjad M (2011) Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. *Biotechnol Prog* 27:297-306. <https://doi.org/10.1002/btpr.514>
- Jang YS, Sohn SI, Wang MH (2006) The *hrpN* gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Planta* 223:449-456. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0100-4>
- Jewel MC, Campbell BC, Godwin ID (2010) Transgenic plants for abiotic stress resistance. In: Kole C et al. (eds) *Transgenic crop plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 67-132. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04812-8_2
- Jha S (2019) Transgenic approaches for enhancement of salinity stress tolerance in plants. In: Singh S et al (eds) *Molecular approaches in plant biology and environmental challenges. Energy, environment, and sustainability*. Springer Singapore, pp 265-322. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0690-1_14
- Ji ZL, Yu MH, Ding YY, Li J, Zhu F, He JX, Yang LN (2021) Coiled-Coil N21 of Hpa1 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* promotes plant growth, disease resistance and drought

- tolerance in non-hosts via eliciting HR and regulation of multiple defense response genes. *Int J Mol Sci* 22:203. <https://doi.org/10.3390/ijms22010203>
- Kapoor D, Bhardwaj S, Landi M, Sharma A, Ramakrishnan M, Sharma A (2020) The impact of drought in plant metabolism: how to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Appl Sci* 10:5692. <https://doi.org/10.3390/app10165692>
- Kaya MD, Okçu G, Atak M, Çikili Y, Kolsarici Ö (2006) Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Europ J Agron* 24:291-295. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.08.001>
- Khan MS, Khan MN (2019) Understanding plant responses to drought and salt stresses: Advances and challenges in “Omics” approaches. In: Khan MS, Malik KA (eds) *Transgenic crops - emerging trends and future perspectives*. IntechOpen, pp 75-98. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81041>
- Kumar M (2013) Crop plants and abiotic stresses. *J Biomol Res Ther* 3:e125. <https://doi.org/10.4172/2167-7956.1000e125>
- Lata C, Prasad M (2011) Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J Exp Bot* 62:4731–4748. <https://doi.org/10.1093/jxb/err210>
- Lawlor DW, Tezara W (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann Bot* 103:561–579. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn244>
- Li JG, Cao J, Sun FF, Niu DD, Yan F, Liu HX, Guo JH (2011) Control of *Tobacco mosaic virus* by *PopW* as a result of induced resistance in tobacco under greenhouse and field conditions. *Phytopathology* 101:1202-1208. <https://doi.org/10.1094/phyto-02-11-0049>
- Li J, Cang Z, Jiao F, Bai X, Zhang D, Zhai R (2017) Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. *J Saudi Soc Agric Sci* 16:82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.03.001>
- Liu H, Wang Y, Zhou X, Wang C, Wang C, Fu J, Wei T (2016) Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* from *Ralstonia solanacearum* primed antioxidant defenses with enhanced drought tolerance in tobacco plants. *Plant Cell Rep* 35:1333–1344. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1965-3>
- Liu M, Li M, Liu K, Sui N (2015) Effects of drought stress on seed germination and seedling growth of different maize varieties. *J Agric Sci* 7:231-240. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n5p231>
- Liu R, Lu B, Wang X, Zhang C, Zhang S, Qian J, Chen L, Shi H, Dong H (2010) Thirty-seven transcription factor genes differentially respond to a harpin protein and affect resistance to the green peach aphid in arabidopsis. *J Biosci* 35:435-450. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0049-8>
- Liu Y, Zhou X, Liu W, Xiong X, Lv C, Zhou X, Miao W (2018) Functional regions of HpaXm as elicitors with specific heat tolerance induce the hypersensitive response or plant growth promotion in nonhost plants. *PLoS ONE* 13: e0188788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188788>
- Liu Y, Zhou X, Liu W, Huang J, Liu Q, Sun J, Cai X, Miao W (2020) HpaXpm, a novel harpin of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, acts as an elicitor with high thermal stability, reduces disease, and promotes plant growth. *BMC Microbiol* 20. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1691-4>
- Lü B, Sun W, Zhang S, Zhang C, Qian J, Wang X, Gao R, Dong H (2011) HrpNEa-induced deterrent effect on phloem feeding of the green peach aphid *Myzus persicae* requires

- AtGSL5* and *AtMYB44* genes in *Arabidopsis thaliana*. J Biosci 36:123–137. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9016-2>
- Mhamdi A, Van Breusegem F (2018) Reactive oxygen species in plant development. Development 145:dev164376. <https://doi.org/10.1242/dev.164376>
- Mitsopoulou N, Lakiotis K, Golia EE, Khah EM, Pavli OI (2021) Response of *hrpZ_{P_{sph}}*-transgenic *N. benthamiana* plants under cadmium stress. Environ Sci Pollut Res Int 28:3787–3796. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09204-2>
- Moose SP, Mumm RH (2008) Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. Plant Physiol 147:969–977. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118232>
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annu Rev. Plant Biol 59:651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Murashige T, Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Netondo GW, Onyango JC, Beck E (2004) Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. Crop Sci 44:806–811. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.8060>
- Oh CS, Beer SV (2007) AtHIPM, an ortholog of the apple HrpN-interacting protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth-enhancing effect of HrpN in Arabidopsis. Plant Physiol 145:426–436. <https://doi.org/10.1104/pp.107.103432>
- Pavli OI, Kelaidi GI, Tampakaki AP, Skaracis GN (2011) The *hrpZ* gene of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola enhances resistance to rhizomania disease in transgenic *Nicotiana benthamiana* and sugar beet. PLoS ONE 6:e17306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017306>
- Peng J, Bao ZL, Ren HY, Wang JS, Dong HS (2004) Expression of Harpin_{Xoo} in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death. Phytopathology 94:1048–1055. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.10.1048>
- Pereira A (2016) Plant abiotic stress challenges from the changing environment. Front Plant Sci 7:1123. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01123>
- Pérez-Molphe-Balch E, Gidekel M, Segura-Nieto M, Herrera-Estrella L, Ochoa-Alejo N (1996) Effects of water stress on plant growth and root proteins in three cultivars of rice (*Oryza sativa*) with different level of drought tolerance. Physiol Plant. 96:284–290. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00215.x>
- Ren X, Liu F, Bao Z, Zhang C, Wu X, Chen L, Liu R, Dong H (2008) Root growth of *Arabidopsis thaliana* is regulated by ethylene and abscisic acid signaling interaction in response to HrpN_{Ea}, a bacterial protein of harpin group. Plant Mol Biol Rep 26:225–240. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0038-3>
- Sanchez RA, Hall AJ, Trapani N, Cohen de Hunau R (1983) Effects of water stress on the chlorophyll content, nitrogen level and photosynthesis of leaves of two maize genotypes. Photosynth Res 4:35–47. <https://doi.org/10.1007/bf00041799>
- Sang S, Li X, Gao R, You Z, Lü B, Liu P, Ma Q, Dong H (2012) Apoplastic and cytoplasmic location of harpin protein Hpa1Xoo plays different roles in H₂O₂ generation and pathogen resistance in Arabidopsis. Plant Mol Biol 79:375–391. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9918-x>

- Santo A, Mattana E, Frigau L, Marzo Pastor A, Picher Morelló MC, Bacchetta G (2017) Effects of NaCl stress on seed germination and seedling development of *Brassica insularis* Moris (Brassicaceae). *Plant Biol* 19:368-376. <https://doi.org/10.1111/plb.12539>
- Schuppler U, He PH, John PCL, Munns R (1998) Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol* 117:667–678. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.667>
- Shao M, Wang J, Dean RA, Lin Y, Gao X, Hu S (2008) Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthe grisea*. *Plant Biotechnol J* 6:73-81. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00304.x>
- Shrivastava P, Kumar R (2015) Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J Biol Sci* 22:123-131. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>
- Sohn SI, Kim YH, Kim BR, Lee SY, Lim CK, Hur JH, Lee JY (2007) Transgenic tobacco expressing the *hrpN_{EP}* gene from *Erwinia pyrifoliae* triggers defense responses against *Botrytis cinerea*. *Mol Cells* 24:232-239.
- Strobel NE, Ji C, Gopalan S, Kuc JA, He SY (1996) Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZPss protein. *Plant J* 9:431-439. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1996.09040431.x>
- Sudhir P, Murthy SDS (2004) Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* 42:481-486.
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol* 203:32–43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>
- Taïbi K, Taïbi F, Abderrahim LA, Ennajah A, Belkhodja M, Mulet JM (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>
- Tampakaki AP, Panopoulos NJ (2000) Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZ_{PspH} produced in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1366-1374. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2000.13.12.1366>
- Tenhaken R (2015) Cell wall remodeling under abiotic stress. *Front Plant Sci* 5:771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00771>
- Uddin MN, Hossain MA, Burritt DJ (2016) Salinity and drought stress: Similarities and differences in oxidative responses and cellular redox regulation. In: Ahmad P (eds) *Water stress and crop plants: A sustainable approach*. Vol 1. Wiley J and Sons, pp 86-101. <https://doi.org/10.1002/9781119054450.ch7>
- Wang C, Wang C, Li HW, Wei T, Wang YP, Liu HX (2016) Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* in tobacco enhances resistance against *Ralstonia solanacearum*. *Biol Plant* 60:181-189. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0571-5>
- Wang D, Wang Y, Fu M, Mu S, Han B, Ji H, et al (2014) Transgenic expression of the functional fragment Hpa1₁₀₋₄₂ of the harpin protein *Hpa1* imparts enhanced resistance to powdery mildew in wheat. *Plant Dis* 98:448–455. <https://doi.org/10.1094/pdis-07-13-0687-re>
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>

- Wang Z, Li G, Sun H, Ma L, Guo Y, Zhao Z, Gao H, Mei L (2018) Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biol Open* 7:bio035279. <https://doi.org/10.1242/bio.035279>
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257: 85-88. <https://doi.org/10.1126/science.1621099>
- Wenters JEG, de Mots A (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophyll a and b and their phaeophytins in ethanol. *Biochim Biophys Acta* 109:448-453. [https://doi.org/10.1016/0926-6585\(65\)90170-6](https://doi.org/10.1016/0926-6585(65)90170-6)
- Wu G-Q, Jiao Q, Shui Q-Z (2015) Effect of salinity on seed germination, seedling growth, and inorganic and organic solutes accumulation in sunflower. *Plant Soil Environ*. 61:220-226. <https://doi.org/10.17221/22/2015-pse>
- Wu H, Wang S, Qiao J, Liu J, Zhan J, Gao X (2009) Expression of HpaGXooc protein in *Bacillus subtilis* and its biological functions. *J Microbiol Biotechnol* 19:194–203. <https://doi.org/10.4014/jmb.0802.154>
- Wu X, Wu T, Long J, Yin Q, Zhang Y, Chen L, Liu R, Gao T, Dong H (2007) Productivity and biochemical properties of green tea in response to full-length and functional fragments of HpaG Xooc, a harpin protein from the bacterial rice leaf streak pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *J Biosci* 32:1119-1131. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0113-1>
- Xu My, Zhou T, Zhao Yy, Li Jb, Xu H, Dong Hs, Zhang Cl (2014) Transgenic expression of a functional fragment of Harpin protein Hpa1 in wheat represses English grain aphid infestation. *J Integr Agric* 13:2565-2576. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(13\)60735-2](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(13)60735-2)
- Zhang C, Qian J, Bao Z Hong X, Dong H (2007) The induction of abscisic-acid-mediated drought tolerance is independent of ethylene signaling in arabidopsis plants responding to a Harpin protein. *Plant Mol Biol Rep* 25:98–114. <https://doi.org/10.1007/s11105-007-0012-5>
- Zhang L, Xiao S, Li W, Feng W, Li J, Wu Z, Gao X, Liu F, Shao M (2011) Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *J Exp Bot* 62:4229-4238. <https://doi.org/10.1093/jxb/err131>
- Zhou X, Liu Y, Huang J, Liu Q, Sun J, Cai X, Tang P, Liu W, Miao W (2019) High temperatures affect the hypersensitive reaction, disease resistance and gene expression induced by a novel harpin *HpaG-Xcm*. *Sci Rep* 9:990. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37886-9>
- Zhu JK (2016) Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* 167:313-324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zörb C, Geilfus CM, Dietz KJ (2019) Salinity and crop yield. *Plant Biol* 21:31-38. <https://doi.org/10.1111/plb.12884>

Κεφάλαιο 3

Αξιολόγηση *hrpZ_{P_{sph}}* -διαγονιδιακών σειρών *N. benthamiana* υπό συνθήκες καταπόνησης καδμίου

Περίληψη

Το γονίδιο *hrpZ*, προερχόμενο από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (*SP/hrpZ_{P_{sph}}*) έχει βρεθεί ότι επάγει ανθεκτικότητα έναντι του ιού της ριζομανίας των ζαχαροτεύτλων, καθώς και έναντι αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης, βελτιώνοντας παράλληλα το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών. Στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της απόκρισης των *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης καδμίου. Για το σκοπό αυτό ομοζύγωτες διαγονιδιακές σειρές του είδους *Nicotiana benthamiana*, καθώς και φυτά αγρίου τύπου, υποβλήθηκαν σε καταπόνηση καδμίου σε διαφορετικά επίπεδα (0, 50, 100, 150 μM CdCl_2). Η απόκριση των φυτών στην καταπόνηση αξιολογήθηκε στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών, με βάση φυσιολογικές και αναπτυξιακές παραμέτρους συμπεριλαμβανομένου του ποσοστού βλάστησης των σπόρων, του μήκους βλαστού και ρίζας, της περιεχόμενης ποσότητας χλωροφύλλης των φύλλων, του νωπού και ξηρού βάρους ρίζας, καθώς και της συμπτωματολογίας των φυτών και της απορρόφησης Cd στα φύλλα και τις ρίζες. Στη φάση της βλάστησης καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό βλάστησης και στο ρυθμό ανάπτυξης των νεαρών σποροφύτων μεταξύ των επιπέδων καταπόνησης, με τις επιδράσεις του καδμίου να είναι ως επί το πλείστον ανάλογες του επιπέδου καταπόνησης, καθώς και μεταξύ των κατηγοριών φυτών. Αν και ο ρυθμός αύξησης των σποροφύτων επηρεάστηκε αρνητικά και στις δύο κατηγορίες φυτών, ιδιαίτερα στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης, οι σειρές #6 και #9 εμφάνισαν τη μικρότερη μείωση στο μήκος βλαστού και ρίζας έναντι του μάρτυρα. Η υπεροχή των σειρών αυτών ήταν εμφανής και στο στάδιο των ώριμων φυτών με την απουσία εμφάνισης συμπτωμάτων λόγω της καταπόνησης και της χαμηλής ή μηδενικής μείωσης στην περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε η ύπαρξη διαφορετικού μοτίβου απορρόφησης Cd μεταξύ των φυτών wt και των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, με τα μεν να παρουσιάζουν αυξημένη απορρόφηση καδμίου στα φύλλα και τα δε να διατηρούν το κάδμιο στις ρίζες. Τα δεδομένα αυτά συζητώνται στο πλαίσιο των πιθανών μηχανισμών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών έναντι καταπόνησης καδμίου.

Εισαγωγή

Τα φυτά ως ακίνητοι οργανισμοί στη φύση εκτίθενται διαρκώς σε ποικίλους παράγοντες καταπόνησης, οι οποίοι επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξή τους, ενώ συχνά αποτελούν απειλή για την παραγωγικότητά τους. Μεταξύ των αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης, τα βαρέα μέταλλα γενικά θεωρούνται από τους πιο σοβαρούς παράγοντες καθώς προκαλούν δυσμενείς συνέπειες τόσο σε επίπεδο φυτού όσο και σε επίπεδο οικοσυστήματος (Nagajyoti et al. 2010; Tchounwou et al. 2012). Τα βαρέα μέταλλα αποτελούν μια κατηγορία μεταλλικών στοιχείων με υψηλή πυκνότητα ($> 4 \text{ g cm}^{-3}$), τα οποία προκαλούν τοξικές επιδράσεις στα φυτά, όταν η συγκέντρωσή τους υπερβαίνει τις βέλτιστες τιμές (Tchounwou et al. 2012; Gall et al. 2015).

Το κάδμιο θεωρείται ως ένα από τα πιο τοξικά βαρέα μέταλλα, με την τοξική δραστηριότητά του να οφείλεται κατά κύριο λόγο στην υψηλή διαλυτότητά του στο νερό, η οποία διευκολύνει στην αποτελεσματική απορρόφηση από το ριζικό σύστημα του φυτού, στην ακόλουθη μεταφορά του στο υπέργειο τμήμα και στην τελική είσοδό του στην τροφική αλυσίδα (DalCorso et al. 2010; Lux et al. 2010). Η μόλυνση των εδαφών από Cd προέρχεται κυρίως από βιομηχανικές δραστηριότητες και εκτεταμένες καλλιεργητικές πρακτικές. Ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, το Cd έχει δυσμενείς επιπτώσεις στη δραστηριότητα βασικών ενζύμων που εμπλέκονται στον κύκλο του Calvin, στο μεταβολισμό φωσφόρου και υδατανθράκων, καθώς και στη δέσμευση του CO₂ (Sanita di Toropi and Gabbrielli 1999; Sharma and Dubey 2006). Τέτοιες μεταβολές στη δραστηριότητα των ενζύμων εκφράζονται τελικά ως καθυστερημένη ανάπτυξη, χλωρώση, επινασσία, τροποποιημένη δομή χλωροπλαστών, μειωμένος ρυθμός φωτοσύνθεσης, αναστολή βλάστησης γύρης και ανάπτυξης του γυρεοσωλήνα, επαγωγή οξείδωσης λιπιδίων, διαταραχή του μεταβολισμού N και S και διακοπή των εγγενών μηχανισμών άμυνας (DalCorso et al. 2010; Shanmugaraj et al. 2019).

Οι χαρπίνες είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III των Gram-αρνητικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων και έχουν ποικίλες επιδράσεις σε διάφορα φυτικά είδη (Wei et al. 1992; Galan and Collmer 1999; Collmer et al. 2000; Alfano and Collmer 2004; Buttner and He 2009; Tampakaki et al. 2010; Choi et al. 2013). Παρά τις διαφορές τους στις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, οι χαρπίνες που προέρχονται από διαφορετικά γένη βακτηρίων έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά, με βάση τα οποία διαφέρουν από άλλες πρωτεΐνες βακτηρίων. Μεταξύ των κοινών χαρακτηριστικών εντάσσονται η υψηλή συγκέντρωση υπολειμμάτων γλυκίνης και σερίνης, η απουσία ή η χαμηλή συγκέντρωση κυστεϊνών, η υψηλή οξύτητα, η θερμοσταθερότητα, καθώς και η επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά μη-ξενιστές (Wei et al. 1992), η οποία είναι μια μορφή επαγόμενου κυτταρικού θανάτου σε φυτά ανθεκτικά ή μη-ξενιστές. Η ανακάλυψη της επαγωγής αντίδρασης υπερευαισθησίας έστρεψε το ενδιαφέρον στην αξιοποίηση των χαρπινών στον τομέα της φυτοπροστασίας. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει τις ωφέλιμες επιδράσεις των χαρπινών στην ανάπτυξη των φυτών και την ανθεκτικότητα έναντι παθογόνων (Strobel et al. 1996; Dong et al. 1999; Chen et al. 2008a, b; Ren et al. 2008; Li et al. 2011; Zhou et al. 2019) και εντόμων (Dong et al. 2004; Liu et al. 2010; Lü et al. 2011, 2013; Zhang et al. 2011a) όταν παρέχονται με τη μορφή εμπορικών σκευασμάτων. Μέχρι σήμερα, πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η ενδογενής έκφραση των χαρπινών σε διαγονιδιακά φυτά, προάγει την ανάπτυξη των φυτών και αποκρίσεις άμυνας προσδίδοντας ανθεκτικότητα έναντι πληθώρας παθογόνων (Peng et al. 2004; Takakura et al. 2004; Jang et al. 2006; Sohn et al. 2007; Shao et al. 2008; Miao et al. 2010; Pavli et al. 2011; Choi et al. 2012; Wang et al. 2014, 2016; Du et al. 2018) και εντόμων (Fu et al. 2014). Ακόμη, αρκετές μελέτες τονίζουν την ικανότητα των χαρπινών στην επαγωγή ανεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι η HrpN και το γονίδιο *hrfI* προκαλούν ανεκτικότητα στην ξηρασία σε φυτά αραβίδωσης και ρυζιού αντίστοιχα, μέσω ενεργοποίησης του ABA-βιοχημικού μονοπατιού (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2011b). Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *popW* που ενεργοποιεί χαρπίνη, προκάλεσε ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας και αυξημένη ανεκτικότητα στην ξηρασία σε διαγονιδιακά φυτά καπνού (Liu et al. 2016), ενώ η υπερέκφραση του γονιδίου *SsbXoc*, σε φυτά του είδους

Nicotiana benthamiana, οδήγησε σε βελτιωμένη ανάπτυξη των φυτών και ανεκτικότητα στην αλατότητα και έναντι του βακτηρίου *P. s. tabaci* μέσω τροποποίησης της έκφρασης γονιδίων άμυνας (Cao et al. 2018).

Η έκφραση του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* προερχόμενο από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* στην εκκρινόμενη μορφή του (*SP/hrpZ_{P_{sph}}*), ώστε η έκφραση της πρωτεΐνης να κατευθύνεται στον αποπλάστη των κυττάρων, έχει αποδειχθεί ότι προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι του ιού της ριζομανίας των ζαχαροτεύτλων, τόσο σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* όσο και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου (Pavli et al. 2011). Επακόλουθα πειράματα παρέχουν βάσιμα στοιχεία ότι τα *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακά φυτά παρουσιάζουν αυξημένη ανεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις, ειδικότερα ξηρασία και υψηλή αλατότητα, τόσο στη φάση της βλάστησης όσο και στο στάδιο των ώριμων φυτών. Με βάση συγκριτική αξιολόγηση των *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-φυτών και των φυτών αγρίου τύπου που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας και αλατότητας, τα μεν εμφάνισαν υψηλότερο δυναμικό βλάστησης και ανάπτυξης υπό συνθήκες ιστοκαλλιέργειας καθώς και ηπιότερα συμπτώματα μαρανσης και χλώρωσης όταν η έκθεση των φυτών στην καταπόνηση έγινε στο στάδιο της άνθησης. Δεδομένων των ποικίλων επιδράσεων των χαρπινών στα φυτά, στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της απόκρισης *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης βαρέων μετάλλων. Για το σκοπό αυτό, διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*, αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους σε καταπόνηση Cd στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών.

Υλικά και Μέθοδοι

Γενετικό υλικό

Το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη συνιστά σπόρους γενετικά τροποποιημένων σειρών του είδους *N. benthamiana*, οι οποίοι εκφράζουν το γονίδιο *hrpZ* προερχόμενο από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (*P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121) (μεγέθους 995 bp) (Pavli et al. 2011). Ο γενετικός μετασχηματισμός έγινε με τη χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* (στέλεχος C58C1). Τα βακτηριακά κύτταρα έφεραν το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-*SP/hrpZ_{P_{sph}}*, το οποίο περιείχε το γονίδιο *hrpZ* ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης PR1 (Tampakaki and Panopoulos 2000).

Προκειμένου να γίνει επιλογή των ομοζύγων *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών για τη μετέπειτα χρήση τους στα πειράματα αξιολόγησης ανθεκτικότητας, πραγματοποιήθηκε βλάστηση σπόρων T₂ γενεάς σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium (Murashige and Skoog 1962) παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (hyg: 25 µg/l). Οι *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές που εμφάνιζαν απουσία διάσπασης ως προς το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη, επιλέχθηκαν για έλεγχο της ένθεσης και έκφρασης του διαγονιδίου μέσω αντιδράσεων PCR και RT-PCR αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στα 995 bp (Pavli et al. 2011).

Από τα παραπάνω πειράματα επιλέχθηκαν 5 *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-ομοζύγωτες σειρές (#1, #2, #6, #7, #9), οι οποίες προέρχονταν από διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού (T₀). Οι

σειρές αυτές οδηγήθηκαν σε αυτογονιμοποίηση με σκοπό την παραγωγή σειρών T₃ γενεάς, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση έναντι καταπόνησης καδμίου.

Καταπόνηση καδμίου στη φάση της βλάστησης

Οι επιλεγμένες ομοζύγωτες *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα έναντι καταπόνησης Cd στη φάση της βλάστησης και πρώιμης ανάπτυξης των σποροφύτων. Μη διαγονιδιακά φυτά (φυτά αγρίου τύπου, wild type plants-wt) συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες του πειράματος.

Σπόροι T₃ γενεάς των *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών καθώς και φυτών wt απολυμάνθηκαν με καθαρή αιθανόλη (1 min) και τοποθετήθηκαν σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium το οποίο περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις CdCl₂ (0, 50, 100, 150 μM). Τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με φωτοπερίοδο 16/8 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασία 25 °C. Το ποσοστό βλάστησης των σπόρων καταγράφονταν καθημερινά, ενώ ο ρυθμός αύξησης των σποροφύτων εκτιμήθηκε με βάση το μήκος βλαστού και ρίζας καθώς και τη συμπτωματολογία για χρονικό διάστημα 20 ημερών. Για κάθε συνδυασμό σειράς-επιπέδου καταπόνησης χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις (τριβλία) αποτελούμενες από δεκαπέντε σπόρους έκαστη.

Καταπόνηση καδμίου στο στάδιο των ώριμων φυτών

Σπόροι των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και φυτών wt απολυμάνθηκαν με καθαρή αιθανόλη (1 min) και μεταφέρθηκαν σε δοχεία τύπου jiffy pots. Τα φυτά αναπτύσσονταν σε ελεγχόμενο περιβάλλον με φωτοπερίοδο 16/8 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασία 25 °C. Φυτά ηλικίας 4 εβδομάδων υποβλήθηκαν στην καταπόνηση Cd μέσω ριζοποτίσματος με διαλύματα CdCl₂ διαφορετικής συγκέντρωσης (0, 50, 100, 150 μM), ενώ τα διαλύματα εφαρμόζονταν 3 φορές την εβδομάδα, για διάστημα 4 εβδομάδων. Η απόκριση στην καταπόνηση αξιολογήθηκε με βάση τη συμπτωματολογία των φυτών, την περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης των φύλλων, η οποία προσδιορίστηκε με το όργανο SPAD-502 Meter (Konica Minolta) μέσω μέτρησης 2 πλήρως ανεπτυγμένων μεσαίων φύλλων στο 1/3 της κορυφής αυτών, καθώς και με τη μέτρηση του νωπού και ξηρού βάρους της ρίζας. Για τη μέτρηση του ξηρού βάρους ρίζας, τα δείγματα μεταφέρθηκαν προς ξήρανση στους 70 °C για 24h. Επιπρόσθετα, η μέτρηση της απορρόφησης καδμίου εκτιμήθηκε με βάση τις συγκεντρώσεις στα φύλλα και τις ρίζες. Αρχικά έγινε έκπλυση των δειγμάτων φύλλων και ριζών με dH₂O για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων εδάφους. Ακολούθησε ξήρανση στους 70 °C για 24h, θρυμματισμός και 1 g δείγματος αποτελούμενο από πέντε φυτά μεταφέρθηκε σε κλίβανο στους 450 °C για 4 h. Η στάχτη που παραλήφθηκε, επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα HCl 20 % και διηθήθηκε με διηθητικό χαρτί τύπου Whatman^R No. 42. Η απορρόφηση καδμίου προσδιορίστηκε με ατομική φασματοσκοπία στα 228,8 nm σύμφωνα με την τεχνική Graphite Furnace. Για την αξιοπιστία του πειράματος συμπεριλήφθηκαν δείγματα-μάρτυρες, ενώ έγιναν διορθώσεις όπου κρίθηκε απαραίτητο.

Για κάθε συνδυασμό σειράς-επιπέδου καταπόνησης, χρησιμοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις (ατομικά φυτά). Συνολικά αξιολογήθηκαν 120 φυτά, αποτελούμενα από 100 *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-

φυτά (5 απόγονοι αυτογονιμοποίησης T_3 γενεάς για κάθε *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-σειρά/επίπεδο Cd) και 20 φυτά wt (5 φυτά/ επίπεδο Cd).

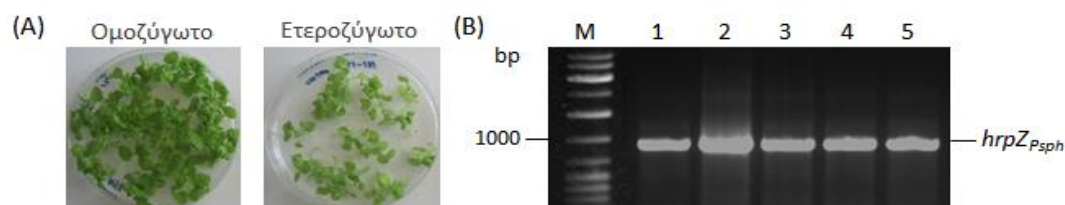
Στατιστική ανάλυση

Για κάθε παράμετρο και επίπεδο καταπόνησης χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρως τυχαίοποιημένο σχέδιο. Τόσο οι αλληλεπιδράσεις όσο και οι κύριοι παράγοντες ελέγχθηκαν ως προς τη σημαντικότητά τους μέσω ανάλυσης ANOVA ($P \leq 0.05$). Στις μπάρες των γραφημάτων, τα τυπικά σφάλματα (ΤΣ) εξυπηρετούν για τη σύγκριση της απόκρισης κάθε σειράς μεταξύ των επιπέδων Cd. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS v.25.

Αποτελέσματα

Επιλογή των ομοζύγων *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών

Ο έλεγχος της ομοζύγωσης/ετεροζύγωσης κατάστασης του διαγονιδίου των σειρών T_2 γενεάς που προέκυψαν από αυτογονιμοποίηση των T_0 συμβάντων μετασχηματισμού, βασίστηκε στις αναλογίες διάσπασης ως προς το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής (hyg: 25 $\mu\text{g}/\text{lt}$). Οι διαγονιδιακές σειρές που χαρακτηρίστηκαν ως ομοζύγες εμφάνιζαν μοντέλα κληρονομικότητας με ενσωμάτωση ενός αντιγράφου του διαγονιδίου (Εικόνα 1Α). Επίσης, η ένθεση και η έκφραση του *SP/hrpZ_{P_{sph}}* επιβεβαιώθηκε με αντιδράσεις PCR (Εικόνα 1Β) και RT-PCR σε όλες τις υπό μελέτη σειρές.



Εικόνα 1. Επιλογή των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών προς αξιοποίηση στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι καταπόνησης καδμίου. (Α) Προσδιορισμός της ζυγωτίας με βάση τις αναλογίες διάσπασης στο γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη υπό συνθήκες πίεσης επιλογής (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (Β) Προϊόντα ενίσχυσης PCR του DNA των φυτών του είδους *N. benthamiana*. M: Μάρτυρας σε bp (100 bp DNA Ladder, NEB). 1-5: Διαγονιδιακά φυτά που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* (995 bp).

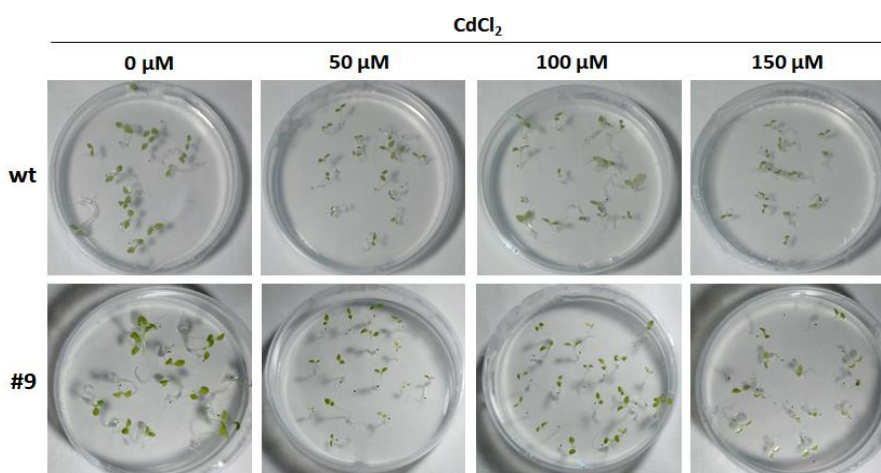
Μετά από αυτογονιμοποίηση όλοι οι απόγονοι (T_3 γενεά) παρουσίαζαν φυσιολογικό φαινότυπο, όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών, ενώ κάποιες σειρές παρουσίαζαν βελτιωμένο ρυθμό ανάπτυξης διακριτό από εκείνο των φυτών αγρίου τύπου.

Απόκριση των *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης καδμίου στη φάση της βλάστησης

Με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της έκφρασης του *SP/hrpZ_{P_{sph}}* υπό συνθήκες καταπόνησης καδμίου στη φάση της βλάστησης και πρώιμης ανάπτυξης των σποροφύτων, σπόροι των ομοζύγων *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών καθώς και φυτών wt τοποθετήθηκαν σε

θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS medium παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων CdCl_2 (0, 50, 100, 150 μM). Απουσία καταπόνησης, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό βλάστησης μεταξύ των δύο κατηγοριών φυτών, με τις σειρές #7 και #9 να εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά (88,5 και 100 % αντίστοιχα). Επίσης σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν στο ποσοστό βλάστησης υπό συνθήκες καταπόνησης, με τη σειρά #9 να εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά σε όλα τα επίπεδα CdCl_2 (μεταξύ 95,5 και 100 %) (Εικόνες 2, 3Α, Παράρτημα ΙΙ). Αντίθετα, η σειρά #1 εμφάνισε τη μεγαλύτερη μείωση στο ποσοστό βλάστησης έναντι του μάρτυρα σε όλα τα επίπεδα καταπόνησης, που έφτανε το 49,25 % στα 150 μM CdCl_2 (Πίνακας 1).

Όσον αφορά την ανάπτυξη των σποροφύτων, το μήκος βλαστού και ρίζας επηρεάστηκαν σημαντικά από το επίπεδο καταπόνησης, παρουσιάζοντας σταδιακή μείωση με αύξηση της συγκέντρωσης CdCl_2 . Επίσης, σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν ως προς τις σειρές, με αρκετές *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές να εμφανίζουν βελτιωμένο ρυθμό ανάπτυξης συγκριτικά με τα φυτά wt (Εικόνα 2). Σε αυτές τις σειρές η θετική επίδραση του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* επιβεβαιώθηκε με υψηλότερη ευρωστία των φυτών και μεγαλύτερη φυλλική επιφάνεια συγκριτικά με τα φυτά wt. Απουσία καταπόνησης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο μήκος βλαστού μεταξύ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt. Αν και το μήκος βλαστού μειώθηκε σε όλα τα φυτά που υποβλήθηκαν στην καταπόνηση συγκριτικά με τους μάρτυρες (με εύρος από 8,75 % έως 39,79 % και από 45,36 % έως 75,58 % στα 100 και 150 μM CdCl_2 αντίστοιχα), οι σειρές διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους, με τις σειρές #6 και #9 να εμφανίζουν τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα σε όλες τις συγκεντρώσεις CdCl_2 (Εικόνα 3Β) (Πίνακας 1, Παράρτημα ΙΙ). Αντίθετα, τα φυτά wt και η σειρά #2 εμφάνισαν τη μεγαλύτερη μείωση στο μήκος βλαστού σε όλα τα επίπεδα Cd (75,58 % και 59,64 %, αντίστοιχα στα 150 μM CdCl_2) συγκριτικά με τους μάρτυρες (Πίνακας 1).



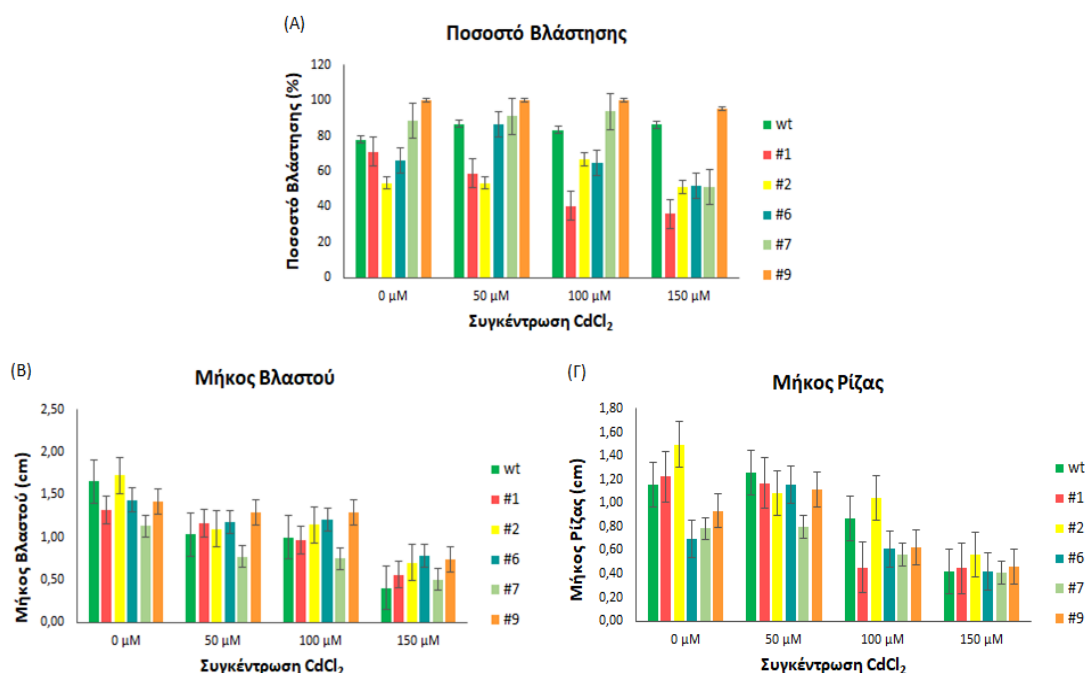
Εικόνα 2. Επίδραση της καταπόνησης Cd στα φυτά wt και στη σειρά #9 στη φάση της βλάστησης. Βλάστηση σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS medium παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων CdCl_2 (0, 50, 100, 150 μM).

Όσον αφορά το μήκος ρίζας, σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν στα 0, 100 και 150 μM CdCl_2 . Αν και στις δύο κατηγορίες φυτών σημειώθηκε σημαντική μείωση στο μήκος ρίζας στα υψηλά επίπεδα καταπόνησης (12,6-63,4 % και 39,7-64,2 % στα 100 και 150 μM CdCl_2 ,

αντίστοιχα), η μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα καταγράφηκε στις σειρές #6, #7 και #9 (Εικόνα 3Γ) (Πίνακας 1, Παράρτημα II). Στα 150 μM CdCl_2 , η μεγαλύτερη μείωση στο μήκος ρίζας παρατηρήθηκε στα φυτά wt και στη σειρά #1 (64,19 % και 63,43 % αντίστοιχα), με τα τελευταία ωστόσο να εμφανίζουν σημαντική μείωση ακόμη και στο επίπεδο των 100 μM CdCl_2 (63,02 %).

Πίνακας 1. Επίδραση του επιπέδου καταπόνησης Cd (0, 50, 100, 150 μM CdCl_2) στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και τα φυτά wt στη φάση της βλάστησης.

Μεταχείριση Σειρά	Μείωση έναντι του μάρτυρα (%)								
	Ποσοστό Βλάστησης			Μήκος Βλαστού			Μήκος Ρίζας		
	50 μM	100 μM	150 μM	50 μM	100 μM	150 μM	50 μM	100 μM	150 μM
wt	-11,40	-6,94	-10,97	37,75	39,79	75,58	-8,52	25,03	64,19
#1	17,20	43,16	49,25	11,69	26,05	57,32	4,49	63,02	63,43
#2	0,00	-25,00	4,13	36,61	33,94	59,64	27,55	30,30	62,35
#6	-31,11	1,97	21,86	17,78	15,87	45,36	-65,71	12,57	39,68
#7	-2,86	-5,87	42,30	31,79	34,00	55,74	-2,00	28,33	47,96
#9	0,00	0,00	4,47	8,75	8,75	47,53	-18,98	33,02	50,53



Εικόνα 3. Επίδραση της καταπόνησης Cd στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και τα φυτά wt στη φάση της βλάστησης. (Α) Ποσοστό βλάστησης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό κανονικές και υπό συνθήκες καταπόνησης Cd. Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τριών επαναλήψεων ($n = 3$). (Β) Μήκος βλαστού των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό κανονικές και υπό συνθήκες καταπόνησης Cd. (Γ) Μήκος ρίζας των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό κανονικές και υπό συνθήκες καταπόνησης Cd. Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των πέντε επαναλήψεων ($n = 5$).

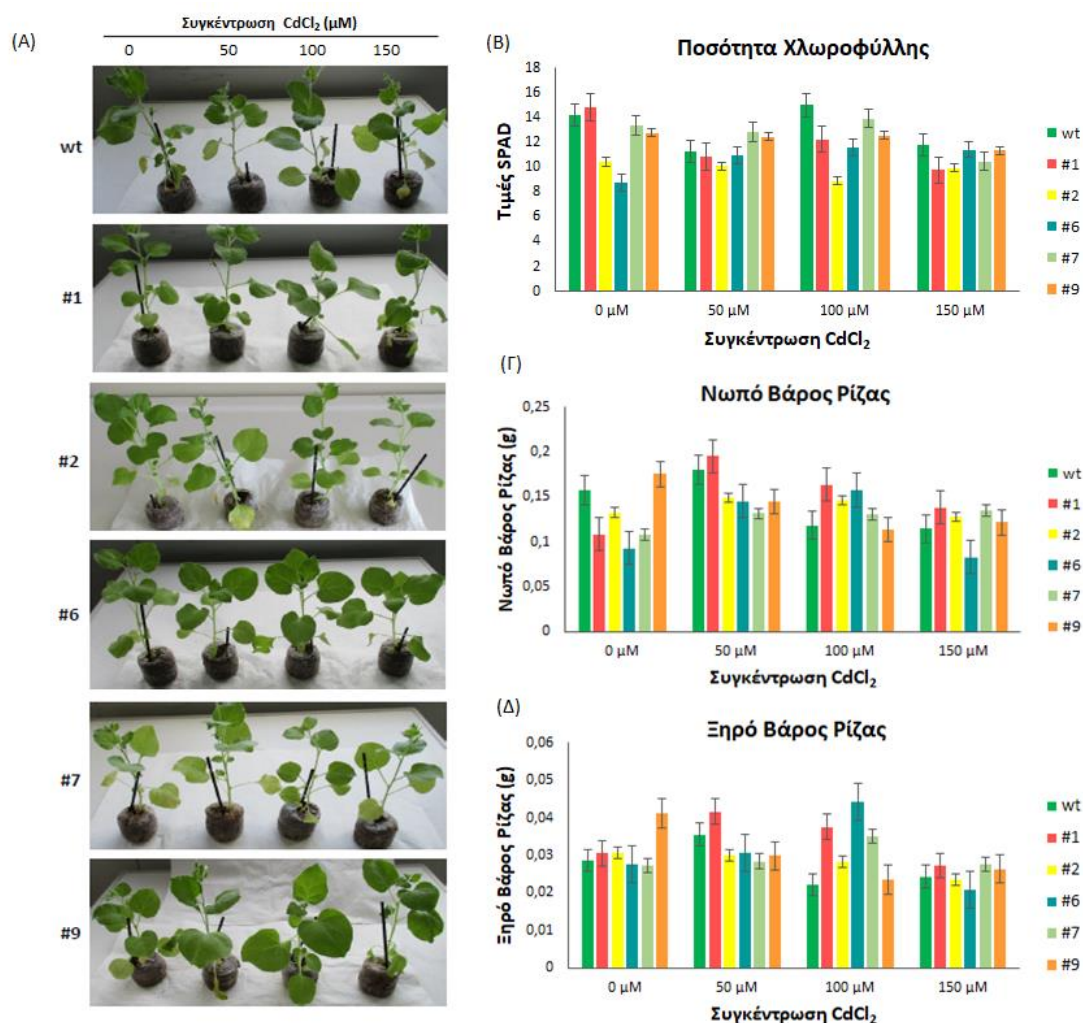
Απόκριση των *SP/hrpZ_{Psph}*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης καδμίου στο στάδιο των ώριμων φυτών

Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της έκφρασης του γονιδίου *hrpZ_{Psph}* υπό συνθήκες καταπόνησης καδμίου, μελετήθηκε η απόκριση των *hrpZ_{Psph}*-σειρών σε φυτά ηλικίας 4 εβδομάδων μετά από ριζοπότισμα με διαλύματα CdCl_2 συγκεντρώσεων 0, 50, 100, 150 μM για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων. Απουσία καταπόνησης, τόσο οι *hrpZ_{Psph}*-σειρές όσο και τα φυτά wt, εμφάνισαν φυσιολογικό φαινότυπο, αν και αρκετές *hrpZ_{Psph}*-σειρές εμφάνισαν υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης συγκριτικά με τα φυτά wt. Η καταπόνηση Cd οδήγησε στην εμφάνιση συμπτωμάτων χλώρωσης και ασθενούς μάρανσης, που εντοπίζονταν κυρίως στα μεσαία-κατώτερα φύλλα, ενώ η ένταση των συμπτωμάτων ήταν ως επί το πλείστον ανάλογη του επιπέδου καταπόνησης (Εικόνα 3Α). Οι *hrpZ_{Psph}*-σειρές #6 και #9 εμφάνισαν βελτιωμένο ρυθμό ανάπτυξης συγκριτικά με υπόλοιπες σειρές και τα φυτά wt, και απουσία συμπτωμάτων μάρανσης και χλώρωσης ακόμη και στα υψηλά επίπεδα καταπόνησης (Εικόνα 4Α).

Όσον αφορά την περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης των φύλλων, οι τιμές που λήφθηκαν από το όργανο SPAD-502 Meter, απουσία καταπόνησης, διέφεραν σημαντικά μεταξύ των σειρών, με τη σειρά #1 να εμφανίζει την υψηλότερη ποσότητα χλωροφύλλης. Η καταπόνηση Cd επέφερε σημαντικές διαφορές στην ποσότητα χλωροφύλλης μεταξύ των σειρών και των επιπέδων καταπόνησης, παρουσιάζοντας μείωση στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (150 μM CdCl_2) συγκριτικά με τα υπόλοιπα επίπεδα (0, 50, 100 μM CdCl_2) (Εικόνα 4Β). Επίσης, η σειρά #1 επηρεάστηκε περισσότερο σε όλα τα επίπεδα καταπόνησης (μείωση 34,3 % στην ποσότητα χλωροφύλλης στα 150 μM CdCl_2), ενώ οι σειρές #2 και #9 εμφάνισαν τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα στα 150 μM CdCl_2 (4,6 και 11,2 % αντίστοιχα). Εξάιρεση στην παρατηρούμενη τάση μείωσης της ποσότητας χλωροφύλλης στα 150 μM CdCl_2 παρουσίασε η σειρά #6, η ποσότητα χλωροφύλλης της οποίας αυξήθηκε έως και 32,7 % σε όλα τα επίπεδα καταπόνησης (Παράρτημα II).

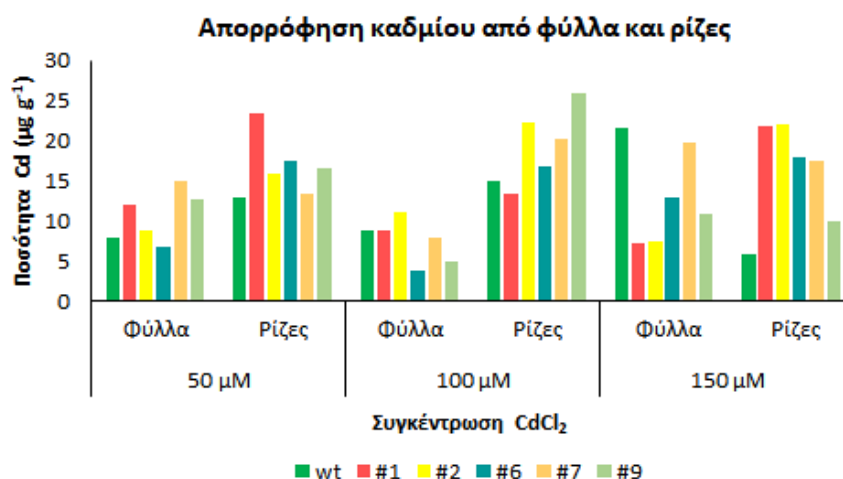
Σχετικά με το νωπό και ξηρό βάρος ρίζας, σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν τόσο μεταξύ των σειρών όσο και μεταξύ των επιπέδων καταπόνησης, με τις *hrpZ_{Psph}*-σειρές να παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τα φυτά wt. Όσον αφορά το νωπό βάρος ρίζας, σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν απουσία καταπόνησης, με τη σειρά #9 να παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή. Στα 100 μM CdCl_2 το νωπό βάρος ρίζας διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο κατηγοριών φυτών (με εύρος από 0,11 έως 0,16), με τις σειρές #1 και #6 να παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές, ενώ στα 50 και 150 μM CdCl_2 το νωπό βάρος ρίζας δεν επηρεάστηκε από τη σειρά (Εικόνα 4Γ, Παράρτημα II).

Ομοίως, το ξηρό βάρος ρίζας των φυτών που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση 100 μM CdCl_2 διέφερε μεταξύ των σειρών (με εύρος από 0,022 έως 0,044), με τη σειρά #6 να παρουσιάζει υψηλότερες τιμές. Σε όλες τις περιπτώσεις, η παρατηρούμενη μείωση στο νωπό και ξηρό βάρος ρίζας ήταν ανάλογη του επιπέδου καταπόνησης, οδηγώντας συνεπώς σε μεγαλύτερη μείωση στα 150 μM CdCl_2 (Εικόνα 4Δ, Παράρτημα II).



Εικόνα 3. Επίδραση της καταπόνησης Cd στις *hrpZPsph*-σειρές και τα φυτά wt στο στάδιο των ώριμων φυτών. (Α) Φαινότυπος των φυτών που υποβλήθηκαν στην καταπόνηση Cd στο στάδιο των ώριμων φυτών. (Β) Ποσότητα χλωροφύλλης των *hrpZPsph*-σειρών και των φυτών wt υπό κανονικές και υπό συνθήκες καταπόνησης Cd. (Γ) Νωπό Βάρος Ρίζας και (Δ) Ξηρό Βάρος Ρίζας των *hrpZPsph*-σειρών και των φυτών wt υπό κανονικές και υπό συνθήκες καταπόνησης Cd. Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους των \pm ΤΣ πέντε επαναλήψεων ($n = 5$).

Όσον αφορά την απορρόφηση καδμίου στα φύλλα και τις ρίζες των φυτών, αν και δεν ήταν δυνατό να εκτιμηθεί η σημαντικότητα των διαφορών λόγω έλλειψης βιολογικών επαναλήψεων, από τα προκαταρκτικά αποτελέσματα προκύπτει διαφορετική απόκριση μεταξύ των *hrpZPsph*-σειρών και των φυτών wt. Παρά το ότι η απορρόφηση Cd τόσο στα φύλλα όσο και στις ρίζες των φυτών δεν ήταν ανάλογη του επιπέδου καταπόνησης, διαφορές παρατηρήθηκαν στο μοτίβο απορρόφησης των διαγονιδιακών σειρών και των φυτών wt, οι οποίες ήταν ιδιαίτερα εμφανείς στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης. Τα αποτελέσματα συγκλίνουν στην ύπαρξη διαφορετικού μοτίβου απορρόφησης, που διαφέρει μεταξύ των ιστών, με τα φυτά wt και τις *hrpZPsph*-σειρές να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές στα φύλλα και τις ρίζες, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, η απορρόφηση Cd στα φύλλα των *hrpZPsph*-σειρών παρουσίασε έως και 3x μείωση συγκριτικά με τα φυτά wt (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Απορρόφηση καδμίου ($\mu\text{g g}^{-1}$) στα φύλλα και τις ρίζες των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση Cd. Τα δεδομένα αναφέρονται σε ένα ομαδοποιημένο δείγμα, αποτελούμενο από πέντε φυτά.

Συζήτηση

Οι χαρπίνες αποτελούν μια κατηγορία πρωτεϊνών που έχουν ερευνηθεί εκτενώς για τις λειτουργικές επιδράσεις τους στα φυτά, οι οποίες εκδηλώνονται κυρίως ως απόκριση άμυνας έναντι πληθώρας παραγόντων καταπόνησης όπως επίσης και προαγωγή της ανάπτυξης. Παρά το ότι τους έχει αποδοθεί κυρίαρχος ρόλος άμυνας έναντι διαφόρων παθογόνων και εντόμων, είτε η άμυνα εκφράζεται παρουσία είτε απουσία επαγωγής αντίδρασης υπερευαισθησίας, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν την ικανότητά τους στην πρόκληση ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων όπως η ξηρασία (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2011b; Liu et al. 2016) και η αλατότητα (Cao et al. 2018). Οι αναφορές αυτές είναι σε αντιστοιχία με ευρήματα που υποστηρίζουν ότι η ενδογενής έκφραση του γονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* σε φυτά του είδους *N. benthamiana*, το οποίο αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι του ιού της ριζομανίας των ζαχαρότευτλων (Pavli et al. 2011), προσδίδει βελτιωμένη ανεκτικότητα έναντι καταπόνησης ξηρασίας και αλατότητας. Με δεδομένο ότι τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν πιθανή ευρεία ανθεκτικότητα που βασίζεται στη χαρπίνη HrpZ, στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της απόκρισης των φυτών *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}* έναντι καταπόνησης Cd τόσο στη φάση της βλάστησης όσο και στο στάδιο των ώριμων φυτών. Η αξιολόγηση των *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών πραγματοποιήθηκε με βάση διάφορες φυσιολογικές και αναπτυξιακές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένου του ποσοστού βλάστησης των σπόρων, του μήκους βλαστού και ρίζας, της περιεχόμενης ποσότητας χλωροφύλλης των φύλλων, του νωπού και ξηρού βάρους ρίζας, καθώς και της απορρόφησης Cd στα φύλλα και τις ρίζες και της συνολικής συμπτωματολογίας των φυτών.

Στη φάση της βλάστησης, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων για τα φυτά που υποβλήθηκαν στην καταπόνηση συγκριτικά με τους μάρτυρες. Όπως αναμένονταν οι επιδράσεις της τοξικότητας Cd ήταν ως επί το πλείστον ανάλογες του εφαρμοζόμενου επιπέδου καταπόνησης, οδηγώντας σε μεγαλύτερες επιδράσεις στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης

(150 μM CdCl_2). Στο επίπεδο αυτό παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο δυναμικό βλάστησης μεταξύ των δύο κατηγοριών φυτών, με τη σειρά #9 να εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό βλάστησης. Επίσης, η ανάπτυξη των σποροφύτων επηρεάστηκε αρνητικά από την καταπόνηση, όπως εκφράστηκε μέσω της σταδιακής ανάσχεσης στην επιμήκυνση ιστών με αύξηση της συγκέντρωσης CdCl_2 . Παρά το ότι το μήκος βλαστού επηρεάστηκε αρνητικά και στις δύο κατηγορίες φυτών κυρίως στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης, μεγαλύτερη μείωση έναντι του μάρτυρα καταγράφηκε στα φυτά wt. Αντίθετα, οι σειρές #6 και #9 παρουσίασαν τη μικρότερη μείωση στο μήκος βλαστού έναντι του μάρτυρα. Ομοίως, το μήκος ρίζας επηρεάστηκε περισσότερο στα φυτά wt και στη σειρά #1, ενώ στις σειρές #6, #7 και #9 παρουσίασε τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα. Η ανασταλτική επίδραση του καδμίου στη βλάστηση των σπόρων και στην ανάπτυξη των σποροφύτων έχει αναφερθεί σε ποικίλα φυτικά είδη, μεταξύ των οποίων το *N. tabacum* (Sfaxi-Bousbih et al. 2010; Sethy and Ghosh 2013; Yan et al. 2019), ενώ έχει επίσης βρεθεί ότι η τοξικότητα παρατηρείται αρχικά από το μικρότερο μήκος ριζών, οι οποίες αποτελούν το πρώτο σημείο επαφής με το Cd. Η έκθεση σε αυξημένες συγκεντρώσεις Cd στη ριζόσφαιρα είναι συνδεδεμένη με ανάσχεση της επιμήκυνσης του ριζικού συστήματος και μεταβολή στην ανατομία του σε διάφορα φυτικά είδη (Lux et al. 2011). Στην παρούσα μελέτη, η ανασταλτική επίδραση του καδμίου στην ανάπτυξη των σποροφύτων ήταν εμφανής και στις δύο κατηγορίες φυτών, ενώ ορισμένες *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές, συγκεκριμένα οι σειρές #6 και #9, εμφάνισαν βελτιωμένη απόκριση έναντι τοξικότητας Cd. Οι διαφορές αυτές μεταξύ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών εξηγούνται από το γεγονός ότι αν και φέρουν το ίδιο διαγονίδιο, οι σειρές T₃ γενεάς αποτελούν απογόνους αυτογονιμοποίησης διαφορετικών συμβάντων μετασχηματισμού.

Σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις στη φάση της βλάστησης, σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν στην απόκριση των φυτών που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση Cd σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Οι φαινοτυπικές επιδράσεις της καταπόνησης Cd περιλάμβαναν ανάσχεση αύξησης και ανάπτυξη συμπτωμάτων χλώρωσης και μαρανσης, με την ένταση να διαφέρει μεταξύ των δύο κατηγοριών φυτών και των επιπέδων καταπόνησης. Οι σειρές #6 και #9 δεν εμφάνισαν συμπτώματα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ παράλληλα παρουσίασαν υψηλότερο ρυθμό αύξησης συγκριτικά με τα φυτά wt και με τις υπόλοιπες *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές. Σε συμφωνία με τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις, η ποσότητα χλωροφύλλης των φυτών που εκτέθηκαν στην καταπόνηση ήταν ως επί το πλείστον μειωμένη στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης. Ωστόσο, ακόμη και στο επίπεδο αυτό, η ποσότητα χλωροφύλλης της σειράς #6 αυξήθηκε ενώ οι σειρές #2 και #9 παρουσίασαν τη μικρότερη μείωση συγκριτικά με το μάρτυρα. Με δεδομένο ότι η μείωση στην ποσότητα χλωροφύλλης λόγω έκθεσης στην καταπόνηση Cd έχει αποδοθεί στην ανασταλτική επίδραση του Cd στη δραστηριότητα ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση χρωστικών μορίων (Qian et al. 2009), τα ευρήματα αυτά πιθανόν υποδεικνύουν μια βελτιωμένη ικανότητα των σειρών αυτών στην εξισορρόπηση των τοξικών επιδράσεων του καδμίου. Επιπρόσθετα, το νωπό και ξηρό βάρος ρίζας επηρεάστηκε διαφορετικά στις δύο κατηγορίες φυτών, με τις πιο σημαντικές διαφορές να καταγράφονται στα 100 μM CdCl_2 . Σε αυτό το επίπεδο, οι σειρές #1, #6 και #7 παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές, ενώ στα 150 μM CdCl_2 εξαίρεση στη γενικότερη τάση μείωσης του νωπού και ξηρού βάρους ρίζας αποτέλεσαν οι σειρές #1 και #7, οι οποίες είτε δεν επηρεάστηκαν είτε παρουσίασαν αυξημένες τιμές για τα γνωρίσματα αυτά. Αυξημένες

τιμές ξηρού βάρους υπό συνθήκες καταπόνησης καδμίου έχουν αποδοθεί στη μειωμένη ικανότητα των ριζών να απορροφούν νερό ως αποτέλεσμα ανισορροπίας στην απορρόφηση νερού και κλεισίματος των στομάτων (Sanità di Toppi and Gabbrielli 1999; DalCorso et al. 2008; Martins et al. 2011).

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε διαφορετικό μοτίβο απορρόφησης Cd μεταξύ των φυτών wt και των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, το οποίο ήταν περισσότερο εμφανές στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης. Ως εκ τούτου, τα φυτά wt απορρόφησαν μεγαλύτερη ποσότητα Cd στα φύλλα παρά στις ρίζες, ενώ οι περισσότερες *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές παρουσίασαν αντίθετο μοτίβο. Αν και η μετακίνηση Cd από το υπόγειο στο υπέργειο τμήμα του φυτού διαφέρει σημαντικά μεταξύ των φυτικών ειδών και των συγκεντρώσεων (Sanità di Toppi and Gabbrielli 1999), τα φυτά καπνού είναι γνωστά για την αποτελεσματική μετακίνηση Cd στο υπέργειο τμήμα του φυτού (Wagner and Yeagan 1986; Plustoš et al. 2006; Yoshihara et al. 2014), όπως συμβαίνει στην περίπτωση των φυτών wt. Τα προκαταρκτικά αυτά ευρήματα συγκράτησης Cd στις ρίζες των φυτών, αν και δεν μπορούν να εξηγηθούν με ακρίβεια, λόγω του ότι αυτή συνιστά την πρώτη μελέτη της απόκρισης φυτών που εκφράζουν χαρπίνη υπό συνθήκες καταπόνησης Cd, πιθανόν υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός μηχανισμού αναστολής της συγκράτησης εντός των χυμοτοπίων των ριζών και μετατόπισης προς το φλοιώμα και το ξύλωμα. Εναλλακτικά, μπορεί να υποθεθεί ότι οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές εμφανίζουν μια κατάσταση βελτιωμένης άμυνας σε μοριακό επίπεδο, παρόμοια με την κατάσταση προηγμένης γενικής άμυνας, που οδηγεί σε ένα πρώτο επίπεδο άμυνας έναντι ποικίλων ερεθισμάτων καταπόνησης. Παρά το ότι αποτελεί ένα πεδίο που δεν έχει ακόμη διερευνηθεί, τέτοια κατάσταση προηγμένης άμυνας επαγόμενη από έκφραση χαρπινών, έχει επιβεβαιωθεί σε διαγονιδιακά φυτά καπνού που εκφράζουν το γονίδιο *porW*, τα οποία εμφάνισαν βελτιωμένη κατάσταση ανεκτικότητας έναντι καταπόνησης ξηρασίας, λόγω ενεργοποίησης μηχανισμού προηγμένης άμυνας (Liu et al. 2016). Στην ίδια κατεύθυνση, σχετικά είναι τα ευρήματα ότι η ενδογενής έκφραση του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* μεταβάλλει σημαντικά το μεταβολικό προφίλ των φυτών του είδους *N. benthamiana*, όπως έχει πρόσφατα αποδειχθεί μέσω GC/MS μεταβολομικής ανάλυσης σε *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές έναντι φυτών wt που δεν υποβλήθηκαν σε καταπόνηση (Pavli et al. 2019). Παρά τις διαφορές στο μεταβολικό προφίλ των φύλλων των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, οι οποίες αποδίδονται στο ότι οι σειρές αποτελούν διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού, η ανάλυση έδειξε μια τάση αυξημένης συσσώρευσης μεταβολιτών οι οποίοι θεωρούνται ότι συνεισφέρουν στην απόκριση των φυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Ειδικότερα, οι περισσότερες *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές εμφάνισαν αυξημένη συσσώρευση α,α-τρεχαλόζης, μυο-ινοσιτόλης, L-προλίνης και GABA, ενώ οι σειρές #6 και #9 εμφάνισαν επίσης αυξημένη συσσώρευση καδαβερίνης. Η προλίνη θεωρείται βασικό στοιχείο που μετριάξει την τοξικότητα Cd λόγω αποτοξικοποίησης ROS, αυξάνοντας το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο γλουταθιόνης και προστατεύοντας τη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αυξημένη ποσότητά της μπορεί να προσδώσει προστασία έναντι τοξικότητας Cd (Xu et al. 2009). Επίσης, η τρεχαλόζη, η οποία είναι γνωστή για την επαγωγή ανεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, έχει πιθανή εμπλοκή υπό συνθήκες καταπόνησης Cd (Xie et al. 2014), ενώ η εφαρμογή καδαβερίνης οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού βλάστησης σε φυτά του είδους *Brassica juncea* (Tomar et al. 2013) και μειωμένη απορρόφηση Cd (Soudek et al. 2016), υποδεικνύοντας συνεπώς εμπλοκή στη μείωση των επιδράσεων της καταπόνησης καδμίου.

Συμπεράσματα

Στο σύνολό τους τα ευρήματα υποδεικνύουν τη διαφορετική απόκριση των φυτών wt και συγκεκριμένων *hrpZ_{PspH}*-σειρών στην καταπόνηση Cd, παρέχοντας ενδείξεις για την ωφέλιμη επίδραση του γονιδίου *hrpZ_{PspH}* στην πρόκληση ανθεκτικότητας στο κάδμιο σε φυτά του είδους *N. benthamiana*. Παρά το ότι αυτό δεν μπορεί να εξηγηθεί με ακρίβεια, διότι είναι η πρώτη μελέτη για την επίδραση της έκφρασης ενός γονιδίου *hrp* στην απόκριση άμυνας έναντι καταπόνησης Cd, μπορεί να υποτεθεί ότι η παρατηρούμενη ανθεκτικότητα είναι το αποτέλεσμα μιας κατάστασης βελτιωμένης άμυνας των *hrpZ_{PspH}* φυτών. Τα προκαταρκτικά αυτά δεδομένα διαμορφώνουν μια βάση για την περαιτέρω μελέτη των μοριακών μηχανισμών ανθεκτικότητας στην καταπόνηση Cd που βασίζεται στα γονίδια *hrp* και συγκεκριμένα στο γονίδιο *hrpZ_{PspH}*, και αποτελούν εργαλεία για την αξιοποίηση καινοτόμων στρατηγικών στη φυτοεξυγίανση ή στη δημιουργία φυτών ανθεκτικών στην καταπόνηση Cd.

Βιβλιογραφία

- Alfano JR, Collmer A (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Ann Rev Phytopathol* 42:385–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731>
- Buttner D, He SY (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol* 150:1656-1664. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139089>
- Cao Y, Yang M, Ma W, Sun Y, Chen G (2018) Overexpression of *SSB_{Xoc}*, a single-stranded DNA-binding protein from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, enhances plant growth and disease and salt stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci* 9:953. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00953>
- Chen L, Qian J, Qu S, Long J, Yin Q, Zhang C, Wu X, Sun F, Wu T, Hayes M, Beer SV, Dong H (2008a) Identification of specific fragments of HpaG Xoc, a harpin from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, that induce disease resistance and enhance growth in plants. *Phytopathology* 98:781-791. <https://doi.org/10.1094/phyto-98-7-0781>
- Chen L, Zhang SJ, Zhang SS, Qu S, Ren X, Long J, Yin Q, Qian J, Sun F, Zhang C, Wang L, Wu X, Wu T, Zhang Z, Cheng Z, Hayes M, Beer SV, Dong H (2008b) A fragment of the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* harpin HpaG Xoc reduces disease and increases yield of rice in extensive grower plantings. *Phytopathology* 98:792-802. <https://doi.org/10.1094/phyto-98-7-0792>
- Choi MS, Kim W, Lee C, Oh CS (2013) Harpins, multifunctional proteins secreted by gram-negative plant-pathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 26:1115-1122. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-13-0050-CR>
- Choi MS, Heu S, Paek NC, Koh HJ, Lee JS, Oh CS (2012) Expression of *hpa1* gene encoding a bacterial harpin protein in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* enhances disease resistance to both fungal and bacterial pathogens in rice and Arabidopsis. *Plant Pathol J* 28:364–372. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2012.0136>
- Collmer A, Badel JL, Charkowski AO, Deng WL, Fouts DE, Ramos AR, Rehm AH, Anderson DM, Schneewind O, van Dijk K et al. (2000) *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8770-8777. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8770>

- DalCorso G, Farinati S, Maistri S, Furini A (2008) How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J Integr Plant Biol* 50:1268–1280. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00737.x>
- DalCorso G, Farinati S, Furini A (2010) Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant Signal Behav* 5:663–667. <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11425>
- Dong H, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV (1999) Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. *Plant J* 20:207–215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1999.00595.x>
- Dong HP, Peng J, Bao Z, Meng X, Bonasera JM, Chen G, Beer SV, Dong H (2004) Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated *Arabidopsis* growth and insect defense. *Plant Physiol* 136:3628–3638. <https://doi.org/10.1104/pp.104.048900>
- Dong HP, Yu H, Bao Z, Guo X, Peng J, et al. (2005) The *ABI2*-dependent abscisic acid signaling controls HrpN-induced drought tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* 221:313–327. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1444-x>
- Du Q, Yang X, Zhang J, Zhong X, Kim KS, Yang J et al. (2018) Over-expression of the *Pseudomonas syringae* harpin-encoding gene *hrpZm* confers enhanced tolerance to *Phytophthora* root and stem rot in transgenic soybean. *Transgenic Res* 27:277–288. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0071-4>
- Fu M, Xu M, Zhou T, Wang D, Tian S, Han L, Dong H, Zhang C (2014) Transgenic expression of a functional fragment of harpin protein Hpa1 in wheat induces the phloem-based defence against English grain aphid. *J Exp Bot* 65:1439–1453. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert488>
- Galan JE, Collmer A (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284:1322–1328. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1322>
- Gall JE, Boyd RS, Rajakaruna N (2015) Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environ Monit Assess* 187. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4436-3>
- Jang YS, Sohn SI, Wang MH (2006) The *hrpN* gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Planta* 223:449–456. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0100-4>
- Li JG, Cao J, Sun FF, Niu DD, Yan F, Liu HX, Guo JH (2011) Control of *Tobacco mosaic virus* by *PopW* as a result of induced resistance in tobacco under greenhouse and field conditions. *Phytopathology* 101:1202–1208. <https://doi.org/10.1094/phyto-02-11-0049>
- Liu R, Lu B, Wang X, Zhang C, Zhang S, Qian J, Chen L, Shi H, Dong H (2010) Thirty-seven transcription factor genes differentially respond to a harpin protein and affect resistance to the green peach aphid in *Arabidopsis*. *J Biosci* 35:435–450. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0049-8>
- Liu H, Wang Y, Zhou X, Wang C, Wang C, Fu J, Wei T (2016) Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* from *Ralstonia solanacearum* primed antioxidant defenses with enhanced drought tolerance in tobacco plants. *Plant Cell Rep* 35:1333–1344. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1965-3>
- Lü B, Sun W, Zhang S, Zhang C, Qian J, Wang X, Gao R, Dong H (2011) HrpNEa-induced deterrent effect on phloem feeding of the green peach aphid *Myzus persicae* requires *AtGSL5* and *AtMYB44* genes in *Arabidopsis thaliana*. *J Biosciences* 36:127–137. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9016-2>

- Lü B, Li X, Sun W, et al. (2013) AtMYB44 regulates resistance to the green peach aphid and diamondback moth by activating EIN2-affected defenses in Arabidopsis. *Plant Biol* 15:841–850. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00675.x>
- Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J Exp Bot* 62:21–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq281>
- Martins LL, Mourato MP, Cardoso AI, Pinto AP, Mota AM, M. de Lurdes S. Goncalves, de Varennes A (2011) Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiol Plant* 33:1375–1383. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0671-y>
- Miao W, Wang X, Song C, Wang Y, Ren Y, Wang J (2010) Transcriptome analysis of *Hpa1_{Xoo}* transformed cotton revealed constitutive expression of genes in multiple signaling pathways related to disease resistance. *J Exp Bot* 61:4263–4275. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq227>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8: 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Pavli OI, Kelaidi GI, Tampakaki AP, Skaracis GN (2011) The *hrpZ* gene of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola enhances resistance to rhizomania disease in transgenic *Nicotiana benthamiana* and sugar beet. *PLoS One* 6:e17306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017306>
- Pavli OI, Mitsopoulou N, Zianna E, Foti C, Aliferis KA, Skaracis GN (2019) Transgenic expression of *hrpZ_{PspH}* gene substantially alters the metabolome of *Nicotiana benthamiana* plants. In: Proceedings of 70th HSBMB Conference, p 10.
- Peng JL, Bao ZL, Ren HY, Wang JS, Dong HS (2004) Expression of harpin(*x_{oo}*) in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death. *Phytopathology* 94:1048–1055. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.10.1048>
- Qian H, Li J, Sun L, Chen W, Sheng GD, Liu W, et al. (2009) Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. *Aquat Toxicol* 94:56–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.014>
- Ren X, Liu F, Bao Z, Zhang C, Wu X, Chen L, Liu R, Dong H. (2008) Root growth of *Arabidopsis thaliana* is regulated by ethylene and abscisic acid signaling interaction in response to HrpN_{Ea}, a bacterial protein of harpin group. *Plant Mol Biol Rep* 26:225–240. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0038-3>
- Sanità di Toppi L, Gabbriellini R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* 41:105–130. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(98\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(98)00058-6)
- Shanmugaraj BM, Malla A, Ramalingam S (2019) Cadmium stress and toxicity in plants: An overview. In: Hasanuzzaman M, Prasad MNV, Fujita M (eds) Cadmium toxicity and tolerance in plants. From Physiology to Remediation. Academic Press, pp 1–17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00001-2>
- Sethy SK, Ghosh S (2013) Effect of heavy metals on germination of seeds. *J Nat Sci Biol Med* 4:272–275. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.116964>

- Sfahi-Bousbih A, Chaoui A, El Ferjani E (2010) Cadmium impairs mineral and carbohydrate mobilization during the germination of bean seeds. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1123–1129. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.01.005>
- Shao M, Wang J, Dean RA, Lin Y, Gao X, Hu S (2008) Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthe grisea*. *Plant Biotechnol J* 6:73–81. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00304.x>
- Sharma P, Dubey RS. (2006) Cadmium uptake and its toxicity in higher plants. In: Khan NA, Samiullah (eds) Cadmium toxicity and tolerance in plants. Narosa Publishing House, New Delhi, pp 64–86.
- Sohn SI, Kim YH, Kim BR, Lee SY, Lim CK, Hur JH, Lee JY (2007) Transgenic tobacco expressing the *hrpN_{EP}* gene from *Erwinia pyrifoliae* triggers defense responses against *Botrytis cinerea*. *Mol Cells* 24:232–239.
- Strobel RN, Gopalan JS, Kuc JA, He SY (1996) Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZ_{Pss} protein. *Plant J* 9:431–39. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.09040431.x>
- Soudek P, Ursu M, Petrová S, Vaněk T (2016) Improving crop tolerance to heavy metal stress by polyamine application. *Food Chem* 213:223–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.087>
- Takakura Y, Ishida Y, Inoue Y, Tsutsumi F, Kuwata S (2004) Induction of a hypersensitive response-like reaction by powdery mildew in transgenic tobacco expressing harpin_{Pss}. *Physiol Mol Plant Pathol* 64:83–89. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.06.002>
- Tampakaki AP, Panopoulos NJ (2000) Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZ_{PspH} produced in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1366–1374. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2000.13.12.1366>
- Tampakaki AP, Skandalis N, Gazi AD, Bastaki MN, Sarris PF, Charova SN, Kokkinidis M, Panopoulos NJ (2010) Playing the “Harp”: Evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. *Annu Rev Phytopathol* 48:347–370. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114407>
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ (2012) Heavy metal toxicity and the environment. In: Luch A (eds) *Molecular Clinical and Environmental Toxicology. Experientia Supplementum* 101:133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Tlustoš P, Pavlíková D, Száková J, Balík J (2006) Plant accumulation capacity for potentially toxic elements. In: Morel JL, Echevarria G, Goncharova N (eds) *Phytoremediation of metal-contaminated soils. NATO Science Series. Springer, Dordrecht*, pp 53–84. https://doi.org/10.1007/1-4020-4688-X_3
- Tomar PC, Lakra N, Mishra SN (2013) Effect of cadaverine on *Brassica juncea* (L.) under multiple stresses. *Indian J Exp Biol* 51:758–763.
- Wagner GJ, Yeagan R (1986) Variation in cadmium accumulation potential and tissue distribution of cadmium in tobacco. *Plant Physiol* 82:274–279. <https://doi.org/10.1104/pp.82.1.274>
- Wang D, Wang Y, Fu M, Mu S, Han B, Ji H, et al. (2014) Transgenic expression of the functional fragment Hpa1 10–42 of the harpin protein *Hpa1* imparts enhanced resistance to powdery mildew in wheat. *Plant Dis* 98:448–455. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0687-RE>

- Wang C, Wang C, Li HW, Wei T, Wang YP, Liu HX (2016) Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* in tobacco enhances resistance against *Ralstonia solanacearum*. *Biol Plant* 60:181-189. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0571-5>
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257:85-88. <https://doi.org/10.1126/science.1621099>
- Xie Y, Hu L, Du Z, Sun X, Amombo E, et al. (2014) Effects of cadmium exposure on growth and metabolic profile of bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.]. *PLoS ONE* 9:e115279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115279>
- Xu J, Yin H, Li X (2009) Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Rep* 28:325-333. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0643-5>
- Yan J, Ji W, Shi X, Zhu S, Li H (2019) Effects of cadmium stress on seed germination and seedling growth of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Crops* 35:142-149. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9422-8>
- Yoshihara T, Suzui N, Ishii S, Kitazaki M, Yamazaki H, Kitazaki K, Kawachi N, Yin YG, Ito-Tanabata S, Hashida SN, Shoji K, Shimada H, Goto F, Fujimaki S (2014) A kinetic analysis of cadmium accumulation in a Cd hyper-accumulator fern, *Athyrium yokoscense* and tobacco plants. *Plant Cell Environ* 37:1086-1096. <https://doi.org/10.1111/pce.12217>
- Zhang C, Shi H, Chen L, et al. (2011a) Harpin-induced expression and transgenic overexpression of the phloem protein gene *AtPP2-A1* in Arabidopsis repress phloem feeding of the green peach aphid *Myzus persicae*. *BMC Plant Biol* 11:11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-11>
- Zhang L, Xiao S, Li W, Feng W, Li J, Wu Z, Gao X, Liu F, Shao M (2011b) Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *J Exp Bot* 62:4229-4238. <https://doi.org/10.1093/jxb/err131>
- Zhou X, Liu Y, Huang J, Liu, Q, Sun J, Cai X, Tang P, Liu W, Miao W (2019) High temperatures affect the hypersensitive reaction, disease resistance and gene expression induced by a novel harpin *HpaG-Xcm*. *Sci Rep* 9:990. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37886-9>

Κεφάλαιο 4

Προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ των *hrpZ_{Psph}*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας

Περίληψη

Η ξηρασία συνιστά μία από τις πλέον επιζήμιες αβιοτικές καταπονήσεις με βάση τη συχνότητα εμφάνισής της σε παγκόσμιο επίπεδο αλλά και τις επιπτώσεις που επιφέρει στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών, ως αποτέλεσμα διαταραχών σε μορφολογικό και φυσιολογικό επίπεδο, σε σηματοδοτικά μονοπάτια, στη ρύθμιση των γονιδίων άμυνας και στο μεταβολισμό των φυτών. Οι χαρπίνες συνιστούν μία ομάδα πρωτεϊνών που εκκρίνονται στα φυτικά κύτταρα μέσω του T3SS των Gram-αρνητικών βακτηρίων, ενώ έχει αναδειχθεί ο πολυδιάστατος ρόλος τους στην πρόκληση ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων και στην προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών. Η χαρπίνη HrpZ_{Psph} έχει αναγνωριστεί ως διεγέρτης ποικίλων ωφέλιμων επιδράσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν την απόδοση ανθεκτικότητας έναντι του ιού BNYYV, της τοξικότητας καδμίου καθώς και των καταπονήσεων ξηρασίας και αλατότητας. Ενόψει της πολυδιάστατης δράσης της HrpZ_{Psph}, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η αποσαφήνιση της μεταβολικής απόκρισης των *hrpZ_{Psph}*-σειρών στην καταπόνηση ξηρασίας μέσω συγκριτικής αξιολόγησης του μεταβολικού τους προφίλ έναντι των φυτών αγρίου τύπου. Η ανάλυση GC/MS επέτρεψε την ανίχνευση 128 μεταβολιτών, ενώ -έπειτα από φιλτράρισμα- επιλέχθηκαν 86 μεταβολίτες προς ανάλυση. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε 17 συστατικά που εμφάνισαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους σε επίπεδο γονοτύπου ή/και μεταχείρισης ή/και αλληλεπίδρασής τους. Οι μεταβολίτες αυτοί ανήκαν στις χημικές ομάδες των αμινοξέων, των υδατανθράκων και των οργανικών οξέων. Περαιτέρω, η διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων επέτρεψε το διαχωρισμό των μεταβολικών προφίλ των *hrpZ_{Psph}*-σειρών και των φυτών wt αλλά και των καταπονημένων φυτών και των μαρτύρων, ενώ το κυκλικό διάγραμμα συσχέτισης μεταβλητών-κύριων συνιστωσών επέτρεψε τον εντοπισμό των συστατικών με τη μεγαλύτερη συνεισφορά στη μεταβολική απόκριση των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών. Τέλος, κατασκευάστηκε χρωματικός χάρτης, βάσει της διαμέσου των 4 βιολογικών επαναλήψεων ανά κατηγορία μεταβλητής, ο οποίος επέτρεψε το διαχωρισμό σε επίπεδο μεταχείρισης, καθώς διαμορφώνονται διακριτές συστάδες μεταξύ των καταπονημένων και των φυτών μαρτύρων, τονίζοντας παράλληλα τη διαφορετική μεταβολική απόκριση των γονοτύπων στην καταπόνηση ξηρασίας. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν τη διαφορετική απόκριση των υπό μελέτη γονοτύπων στην υδατική καταπόνηση, που σημαίνεται πρωτίστως από τις διαφορές στο μεταβολικό περιεχόμενο της σειράς #6, η οποία έχει αναδειχθεί ως η πλέον ανθεκτική στην ξηρασία κατά τη φάση της βλάστησης αλλά, κυρίως στο στάδιο των ώριμων φυτών. Η παρούσα μελέτη προσδίδει καίρια γνώση σχετικά με την επίδραση της χαρπίνης HrpZ_{Psph} στη μεταβολική απόκριση αντοχής στην ξηρασία, συμβάλλοντας παράλληλα στον εντοπισμό των μεταβολικών συστατικών με πρωτεύοντα ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού υπό συνθήκες καταπόνησης. Η έρευνα κατέδειξε τη διαφορετική συσσώρευση των συστατικών L-σερίνης, L- θρεονίνη, μουκικό οξύ και πιπεκολικό οξύ μεταξύ των ανθεκτικών και των ευαίσθητων γονοτύπων, παρέχοντας προοπτικές αξιοποίησης τους ως βιοδείκτες για την ευχερή επιλογή των ανθεκτικών γονοτύπων.

Εισαγωγή

Μεταξύ των αβιοτικών καταπονήσεων, η ξηρασία αδιαμφισβήτητα αποτελεί τον πλέον επιζήμιο περιβαλλοντικό παράγοντα σε μεγάλο εύρος καλλιεργούμενων ειδών, οδηγώντας σε σημαντικές απώλειες σε παραγωγικό και οικονομικό επίπεδο (Chaves and Oliveira 2004). Η ξηρασία ορίζεται ως μια κατάσταση που προκαλείται από μια μακρά περίοδο υδατικής ανεπάρκειας, η οποία επάγει ανισορροπία στις ποσότητες πρόσληψης και απώλειας νερού μέσω διαπνοής και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της σπαργής και την αφυδάτωση των κυττάρων, καθώς και την παρεμπόδιση των φυσιολογικών λειτουργιών των φυτών (de Oliveira et al. 2013; Carraro and di Lorio 2022). Πέραν των αλλαγών που προκαλούνται στα μορφολογικά και αναπτυξιακά γνωρίσματα, τόσο σε νεαρό όσο και σε μεταγενέστερο στάδιο ανάπτυξης, λόγω πρόκλησης οξειδωτικής καταπόνησης (Farooq et al. 2009; Liu et al. 2015; Rezayian et al. 2018; Kapoor et al. 2020), η καταπόνηση ξηρασίας επιφέρει μια σειρά αλλαγών σε μεταβολικό επίπεδο. Οι μεταβολικές προσαρμογές περιλαμβάνουν την αυξημένη παραγωγή ενζύμων που εμπλέκονται σε αναβολικά μονοπάτια και αυξημένη κατανάλωση ενέργειας από τα φυτικά αποθέματα, ενώ εκφράζονται μέσω μεταβολής στη συσσώρευση υδατανθράκων, οργανικών οξέων, αμινοξέων και λιπαρών οξέων (Shu et al. 2011; Ahkami et al. 2019; Khan and Khan 2019).

Με σκοπό την επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι καταπόνησης ξηρασίας, τα φυτά έχουν αναπτύξει τέσσερις κύριες στρατηγικές προσαρμογής: την αποφυγή, την ανεκτικότητα, τη διαφυγή και την ανάκαμψη. Ειδικότερα, η αποφυγή αναφέρεται στην ικανότητα αποθήκευσης ικανοποιητικής ποσότητας νερού και διατήρησης της μεταβολικής δραστηριότητας με στόχο την εξασφάλιση της επιβιώσής τους (Kooyers 2015; Carraro and di Lorio 2022). Η επίτευξη των ανωτέρω περιλαμβάνει κλείσιμο των στομάτων και συστροφή των φύλλων με στόχο την ελαχιστοποίηση των απωλειών νερού λόγω διαπνοής, προσαρμογές στο μήκος και στην πυκνότητα του ριζικού συστήματος και περιορισμό ή αύξηση του δυναμικού ανάπτυξης της ρίζας και του βλαστού (Fang and Xiong 2015). Επίσης, έχει παρατηρηθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της στρατηγικής αποφυγής και της ετεροχρονισμένης αυτογονιμοποίησης σε φυσικούς πληθυσμούς φυτών, υπό την έννοια ότι η αυτογονιμοποίηση προάγει την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του φυτού (Ricote et al. 2019). Η στρατηγική της ανεκτικότητας αναφέρεται στην ικανότητα διατήρησης των φυσιολογικών διεργασιών σε χαμηλό επίπεδο και την επιδιόρθωση τυχόν βλαβών που προκαλούνται λόγω οξειδωτικής καταπόνησης, ώστε να καταστεί εφικτή η επιβίωση σε δυσμενείς συνθήκες ξηρασίας (Fang and Xiong 2015; Carraro and di Lorio 2022). Η ανεκτικότητα περιλαμβάνει μεταβολικές προσαρμογές και αλλαγές στη συσσώρευση οσμωλυτών (π.χ. προλίνη) και αντιοξειδωτικών ενζύμων και σακχάρων (π.χ. σουκρόζη, τρεχαλόζη) καθώς και έκφραση γονιδίων που ενεργοποιούν βιοχημικά μονοπάτια άμυνας, με κυριότερο το μονοπάτι βιοσύνθεσης του αμπισισικού οξέος (ABA). Παράλληλα, η παροδική αύξηση της ποσότητας χλωροφύλλης των φύλλων παρουσία καταπόνησης ξηρασίας, ως αποτέλεσμα μειωμένου ρυθμού ανάπτυξης, λειτουργεί θετικά στην ανεκτικότητα έναντι της καταπόνησης ξηρασίας (Rolando et al. 2015).

Ως στρατηγική διαφυγής της ξηρασίας ορίζεται η φυσική ή τεχνητή προσαρμογή του βιολογικού κύκλου και της περιόδου ανάπτυξης των φυτών με σκοπό την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου πριν την έναρξη της καταπόνησης (Fang and Xiong 2015). Πρόκειται για μια εξελικτική προσαρμογή, ευρέως χρησιμοποιούμενη από άγρια μονοετή είδη φυτών,

που απαιτεί υψηλούς μεταβολικούς ρυθμούς και οδηγεί σε προοδευτική αύξηση και διαίρεση των κυττάρων. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, οι προσαρμογές περιλαμβάνουν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης, αυξημένη συσσώρευση αζώτου στα φύλλα καθώς και ταχεία μετάβαση από το αναπτυξιακό στο αναπαραγωγικό στάδιο, η οποία συνοδεύεται από πρόωμη άνθηση και μικρότερη βιομάζα (Kooyers 2015; Shavrukov et al. 2017). Η στρατηγική της διαφυγής ελέγχεται από QTLs, ενώ υπάρχει αλληλεπίδραση του βιοχημικού μονοπατιού του ABA με την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην άνθηση και τη φωτοπερίοδο (Riboni et al. 2013). Τέλος, η στρατηγική ανάκαμψης από την ξηρασία αφορά στην ικανότητα των φυτών να ανακτήσουν το ρυθμό αύξησης και παραγωγικότητας μετά το πέρας μιας δυσμενούς περιόδου ξηρασίας που συντέλεσε σε απώλεια της σπαργής των κυττάρων και αφυδάτωση των φύλλων. Στις διεργασίες που τείνουν να επαναφέρουν τη φυσιολογική λειτουργία συγκαταλέγονται η ρύθμιση της υδραυλικής αγωγιμότητας, της περιεκτικότητας των φύλλων σε νερό και η συσσώρευση H_2O_2 και χλωροφύλλης, λόγω βελτιωμένης δραστηριότητας του φωτοσυστήματος II (Chen et al. 2016; Gleason et al. 2017). Σημειώνεται ωστόσο ότι η απόκριση των φυτών στην καταπόνηση ξηρασίας δεν επιτρέπει την ευχερή διάκριση των στρατηγικών διαφυγής ή αποφυγής, καθώς συχνά επιτελούνται ταυτόχρονα συνδυαστικές λειτουργίες (Shavrukov et al. 2017).

Οι χαρπίνες συνιστούν μία ομάδα πρωτεϊνών που εκκρίνονται στα φυτικά κύτταρα μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III (T3SS) των Gram-αρνητικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Οι χαρπίνες έχουν αναγνωριστεί ως πολύ-λειτουργικοί διεγέρτες σε ένα εύρος φυτικών ειδών, με τις επιδράσεις τους να αφορούν σε πρόκληση ανθεκτικότητας έναντι μυκήτων (Jang et al. 2006; Sohn et al. 2007; Shao et al. 2008; Wang et al. 2014), βακτηρίων (Sang et al. 2012; Wang et al. 2016), ιών (Li et al. 2011) και εντόμων (Dong et al. 2004; Liu et al. 2010; Fu et al. 2014; Xu et al. 2014), καθώς και σε προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών (Oh and Beer 2007; Wu et al. 2007, 2009; Ren et al. 2008; Dong et al. 2016; Liu et al. 2020). Παράλληλα, έχει αναδειχθεί η ικανότητά τους να επάγουν ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένων αυτών της ξηρασίας, αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2007; Chuang et al. 2010; Zhang et al. 2011; Liu et al. 2016; Cao et al. 2018; Zhou et al. 2019; Demirkol 2021). Οι λειτουργικές πτυχές των χαρπινών, έπειτα από την ενδογενή έκφραση ή την εξωγενή εφαρμογή τους σε φυτά, υποστηρίζονται από μεταγραφικές και μεταβολικές αλλαγές που περιλαμβάνουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων, την ενεργοποίηση των MAPK πρωτεϊνών και την αύξηση της συσσώρευσης φαινολικών ενώσεων (Desikan et al. 2001; Livaja et al. 2008; Rodrigo-García et al. 2019).

Η χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}, που προέρχεται από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (*P. syringae* pv. *phaseolicola*), έχει αναγνωριστεί ως διεγέρτης ποικίλων ωφέλιμων επιδράσεων σε διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν την εκκρινόμενη μορφή της (SP/hrpZ_{P_{sph}}) ώστε να κατευθύνεται η έκφρασή της εξωκυτταρικά. Έπειτα από την ανακάλυψη ότι προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι του ιού BNYYV, τόσο σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* όσο και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου (Pavli et al. 2011), ολοένα και περισσότερα δεδομένα συντείνουν προς την ικανότητά της να επάγει αποκρίσεις άμυνας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της SP/hrpZ_{P_{sph}} στο είδος *N. benthamiana* προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας, αλατότητας (Κεφάλαιο 2) και τοξικότητας καδμίου (Mitsopoulou et al. 2021). Ενόψει της πολυδιάστατης δράσης της HrpZ_{P_{sph}} στο είδος *N.*

benthamiana, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η αποσαφήνιση της μεταβολικής απόκρισης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών στην καταπόνηση ξηρασίας. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε συγκριτική αξιολόγηση του μεταβολικού προφίλ των *SP/hrpZ_{P_{sph}}*- και των φυτών αγρίου τύπου, μέσω ανάλυσης GC/MS, με στόχο την παρακολούθηση των προσαρμογών που ρυθμίζουν τη μεταβολική απόκριση των *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας.

Υλικά και Μέθοδοι

Γενετικό υλικό

Το γενετικό υλικό αποτέλεσαν διαγονιδιακές σειρές του είδους *N. benthamiana*, που εκφράζουν το γονίδιο *hrpZ*, προερχόμενο από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (*P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121) (Pavli et al. 2011). Οι διαγονιδιακές σειρές δημιουργήθηκαν μετά από γενετικό μετασχηματισμό με πρωτόκολλο φυλλικών δίσκων (Horsch et al. 1985) και φορέα το στέλεχος C58C1 του *Agrobacterium tumefaciens* (Pavli et al. 2011). Το βακτήριο είχε μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-*SP/hrpZ_{P_{sph}}* που φέρει το γονίδιο *hrpZ* ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης PR1 (πρωτεΐνη παθογένειας του καπνού) (Tampakaki and Panopoulos 2000).

Για την επιλογή ομοζύγωτων ως προς το διαγονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του επιπέδου ζυγωτίας σε σειρές T₂ γενεάς που προέρχονταν από διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού (T₀) βάσει της επιλογής για ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό υδρομυκίνη. Αρχικά, έγινε επιφανειακή απολύμανση των σπόρων με εμβάπτιση σε καθαρή αιθανόλη (1 min) και βλάστηση σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium (Murashige and Skoog 1962) που περιείχε υδρομυκίνη (hyg: 25 µg/l). Οι *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές που χαρακτηρίστηκαν ως ομοζύγωτες, διότι εμφάνισαν απουσία διάσπασης ως προς την ανθεκτικότητα στην υδρομυκίνη, ελέγχθηκαν περαιτέρω για την ένθεση και έκφραση του *hrpZ_{P_{sph}}* με αντιδράσεις PCR και RT-PCR αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές για την ενίσχυση του *hrpZ_{P_{sph}}* (995 bp) (Pavli et al. 2011).

Βάσει των ανωτέρω διαδικασιών αξιολόγησης, έγινε επιλογή 5 *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-ομοζύγωτων σειρών (#1, #2, #6, #7, #9) για αυτογονιμοποίηση με σκοπό την παραγωγή σειρών T₃ γενεάς που προέρχονται από διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού (T₀). Οι επιλεγμένες σειρές υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας και ακολούθησε ο προσδιορισμός του μεταβολικού τους προφίλ. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες φυτά αγρίου τύπου (wild type plants-wt).

Πειραματικό σχέδιο

Βάσει των ευρημάτων σχετικά με τη συμπτωματολογία και τη φυσιολογική απόκριση των φυτών στην καταπόνηση ξηρασίας (Κεφάλαιο 2), επιλέχθηκαν 3 ομοζύγωτες *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές (#1, #6, #9) με στόχο τη μελέτη της μεταβολικής τους απόκρισης υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας, συγκριτικά με φυτά wt. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία καταπόνησης.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το σχέδιο των τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων με 4

επαναλήψεις. Για τη μεταβολομική ανάλυση, έγινε συλλογή δειγμάτων νεαρών φύλλων και ακολούθησε άμεση τοποθέτησή τους σε θάλαμο βαθείας κατάψυξης (-80 °C) έως ότου γίνει η απομόνωση των μεταβολιτών. Η συλλογή δειγμάτων από τα καταπονημένα φυτά και τους μάρτυρες έγινε ταυτόχρονα ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των μεταβολικών προφίλ. Σε όλες τις περιπτώσεις γονοτύπων και μεταχειρίσεων, η συλλογή δειγμάτων αφορούσε σε φύλλα που βρίσκονταν το μεσαίο και άνω τμήμα 4 φυτών. Τα δείγματα αυτά, που θεωρούνται ως ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις, αναλύθηκαν ξεχωριστά σε μεταβολικό επίπεδο.

Απομόνωση μεταβολιτών

Αρχικά, τα δείγματα των φυτών λειοτριβήθηκαν με υγρό άζωτο και 50 mg κορνιοποιημένου ιστού μεταφέρθηκαν σε erppendorf όπου προστέθηκαν 400 μl mastermix (395 μl μεθανόλη, 5 μl ριβιτόλη). Ακολούθησε ανάμειξη των δειγμάτων σε vortex και τοποθέτηση σε μηχανικό αναδευτήρα στους 70 °C για 15 min. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου, ανακίνηση και τοποθέτηση των δειγμάτων σε μηχανικό αναδευτήρα στους 37 °C για 5 min. Ακολούθησε προσθήκη 400 μl mQH₂O, εκ νέου ανάμειξη και φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 5 min. Τέλος, έγινε μεταφορά 100 ml του υπερκειμένου σε νέο erppendorf και εξάτμιση με αέριο άζωτο.

Για την αύξηση της πτητικότητας των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε παραγωγοποίηση των δειγμάτων. Αρχικά, έγινε επαναδιάλυση σε 25 μl διαλύματος μεθοξυαμίνης (MOX), τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 30 °C για 90 min και φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 30 sec. Ακολούθησε προσθήκη 75 μl N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA), τοποθέτηση σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 30 min και εκ νέου φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 2 min. Στη συνέχεια, έγινε μεταφορά του υπερκειμένου σε γυάλινα φιαλίδια προς ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας Agilent 7890A/5975C GC-MS system (Agilent, Waldbronn, Germany). Η διαδικασία απομόνωσης και παραγωγοποίησης των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής του ΓΠΑ.

Στατιστική ανάλυση

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών έγινε με τη χρήση του λογισμικού AMDIS (Stein 1999) που διαθέτει βιβλιοθήκες οι οποίες περιέχουν φάσματα και δείκτες δέσμευσης για μεταβολίτες που απαντώνται σε φυτά (Feihl metabolome database). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν μέσω του λόγου της περιοχής του μεταβολίτη στόχου προς την περιοχή του μεταβολίτη αναφοράς (ribitol, m/z 217) και παρουσιάστηκαν σε σχέση με το νωπό βάρος κάθε δείγματος.

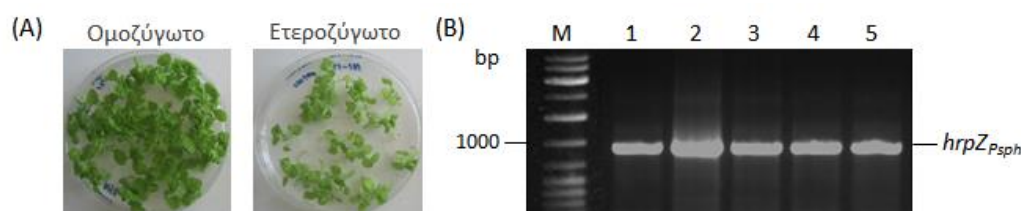
Η επεξεργασία και ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού R version 4.0.0 (R Core Team 2020, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα των δεδομένων ώστε να απομακρυνθούν οι μεταβολίτες που δεν πληρούσαν το κριτήριο των μη-μηδενικών τιμών (ο αριθμός των μηδενικών τιμών ξεπερνούσε το 80 % των παρατηρήσεων για κάθε μεταβολίτη). Ακολούθησε μονομεταβλητή ανάλυση, μέσω ανάλυσης διακύμανσης

(ANOVA) σε μοντέλο το οποίο περιέχει ως κύριους παράγοντες τη σειρά, τη μεταχείριση και την αλληλεπίδραση των κύριων παραγόντων χωριστά για τα δείγματα. Επίσης, έγινε προσαρμογή των τιμών-P για την ορθή ρύθμιση του σφάλματος τύπου I, εξαιτίας πολλαπλών ελέγχων υποθέσεων (Benjamini and Hochberg 1995), και επιλογή των μεταβολιτών που εμφάνιζαν για το αναμενόμενο ποσοστό σφαλμάτων τύπου I (FDR) προσαρμοσμένη τιμή-P < 0.05. Ακολούθησε πολυμεταβλητή ανάλυση, με τη χρήση του πακέτου “mixOmics” (Lê Cao et al. 2016), όπου εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), ανάλυση συστάδων και δημιουργία γραφημάτων. Στη συνέχεια, έγινε κατασκευή μεταβολικού χάρτη (heat map) για χαρακτηριστικές ζώνες διάκρισης των δειγμάτων, όπου χρησιμοποιήθηκε η διάμεσος των 4 βιολογικών επαναλήψεων ανά κατηγορία μεταβλητής.

Αποτελέσματα

Επιλογή των ομοζύγων *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών

Ο έλεγχος του επιπέδου ζυγωτίας στους απόγονους αυτογονιμοποίησης (T₂) των αρχικών συμβάντων μετασηματισμού (T₀) έγινε βάσει των αναλογιών διάσπασης του γονιδίου ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη, υπό συνθήκες πίεσης επιλογής. Οι διαγονιδιακές σειρές που χαρακτηρίστηκαν ως ομοζύγους εμφάνισαν απουσία διάσπασης, ενώ ως ετεροζύγους χαρακτηρίστηκαν οι σειρές που εμφάνισαν πρότυπο κληρονόμησης μονογονιδιακού γνωρίσματος (3:1) (Εικόνα 1Α). Επιπλέον, οι αντιδράσεις PCR και RT-PCR επαλήθευσαν την ένθεση και έκφραση του *hrpZ_{P_{sph}}*, μέσω της ενίσχυσης προϊόντων μεγέθους 995 bp, στο σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν (Εικόνα 1Β).

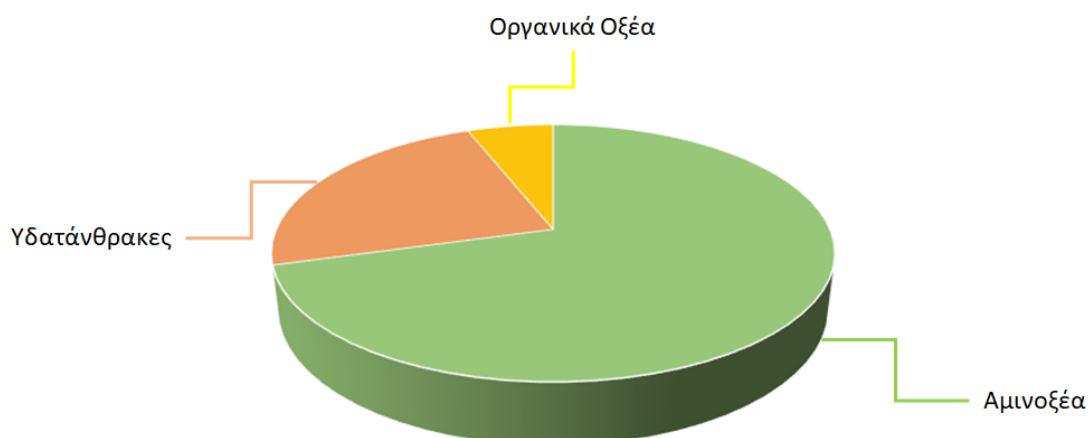


Εικόνα 1. Επιλογή των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών. (Α) Προσδιορισμός της ζυγωτίας βάσει των αναλογιών διάσπασης του γονιδίου ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη, υπό συνθήκες πίεσης επιλογής (25 µg/ml), (Β) Προϊόντα PCR σε γονιδιωματικό DNA των φυτών του είδους *N. benthamiana*. M: Μάρτυρας σε bp (100 bp DNA Ladder, NEB). 1-5: Διαγονιδιακά φυτά που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* (995 bp).

Μεταβολομική ανάλυση

Η μελέτη της απόκρισης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών στην καταπόνηση ξηρασίας, που περιλάμβανε την αξιολόγηση φαινοτυπικών και αναπτυξιακών παραμέτρων καθώς και του ποσοστού επιβίωσης των φυτών (Κεφάλαιο 2), οδήγησε στην επιλογή 3 σειρών T₃ γενεάς (#1, #6, #9) προς περαιτέρω αξιολόγηση της απόκρισής τους σε μεταβολικό επίπεδο. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες φυτά wt καθώς και φυτά όλων των κατηγοριών που δεν υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας.

Η μεταβολομική ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση 128 μεταβολιτών που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες. Έπειτα από φιλτράρισμα, επιλέχθηκαν 86 μεταβολίτες προς ανάλυση, ενώ η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων κατέδειξε την ύπαρξη 17 συστατικών με σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους σε επίπεδο γονοτύπου ή/και μεταχείρισης ή/και αλληλεπίδρασής τους, η οποία προσδιορίστηκε με βάση το κριτήριο $P\text{-value} < 0.05$. Σχετικά με τα συστατικά που μεταβλήθηκαν σημαντικά, ανήκουν κατά 70,6 % στη χημική ομάδα των αμινοξέων, 23,5 % στην ομάδα των υδατανθράκων και 5,9 % στην ομάδα των οργανικών οξέων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Κατανομή των μεταβολιτών που εμφάνισαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους σε επίπεδο γονοτύπου ή/και μεταχείρισης ή/και αλληλεπίδρασής τους ($P\text{-value} < 0.05$), βάσει της χημικής τους ομάδας.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι μεταβολίτες των οποίων η συσσώρευση εμφάνισε στατιστικά σημαντική μεταβολή, με βάση τη χημική ομάδα που ανήκουν.

Αμινοξέα

Στη χημική ομάδα των αμινοξέων, η ανάλυση ανέδειξε δέκα (10) συστατικά, τα οποία εμφάνισαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους σε επίπεδο γονοτύπου. Ειδικότερα, η β-αλανίνη σημείωσε αύξηση στο σύνολο των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών, με τη σειρά #1 ωστόσο να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση, ακολουθούμενη από τα φυτά wt. Το L-άνυδρο γλουταμικό οξύ σημείωσε αύξηση στις *hrpZ_{Psph}*-σειρές υπό συνθήκες καταπόνησης, με τη σειρά #6 να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση. Αντίθετα, η L-σερίνη 1 σημείωσε αύξηση στο σύνολο των υπό μελέτη φυτών, με εξαίρεση τη σειρά #6 που εμφάνισε μειωμένη συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης. Αξίζει να αναφερθεί η αύξηση της L-σερίνης 2 υπό συνθήκες καταπόνησης στην πλειοψηφία των γονοτύπων, η οποία ωστόσο μεγιστοποιήθηκε στη σειρά #6 (19x), ενώ η σειρά #9 χαρακτηρίστηκε από αντίθετη τάση μειωμένης συσσώρευσης. Περαιτέρω, σημαντική αύξηση υπό συνθήκες καταπόνησης σημειώθηκε στην L-θρεονίνη 2, η οποία σημείωσε τη μέγιστη αύξηση στη σειρά #6 (> 8x) και αντίθετη τάση μείωσης στη σειρά #9. Παρόμοιο μοτίβο διαφορικής συσσώρευσης μεταξύ της σειράς #9 και των υπολοίπων γονοτύπων παρατηρήθηκε στη L-

βαλίνη 2, η οποία εμφάνισε τάση αυξημένης συσσώρευσης, με εξαίρεση τη σειρά #9 που παρουσίασε μειωμένη συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης. Το ασπαρτικό οξύ 1 εμφάνισε μείωση στα φυτά των σειρών #1 και #6, ενώ αντίθετα στα φυτά wt και στη σειρά #9 ανιχνεύτηκε αποκλειστικά στα καταπονημένα φυτά. Επιπλέον, διαφορική απόκριση παρατηρήθηκε ως προς τη συσσώρευση του ασπαρτικού οξέος 2, με τις διαφορές να εντοπίζονται σε επίπεδο γονοτύπου, μεταχείρισης αλλά και αλληλεπίδρασής τους. Συγκεκριμένα, σημειώθηκε αύξηση της συσσώρευσης στα φυτά wt και σε αυτά της σειράς #6, ενώ οι σειρές #1 και #9 εμφάνισαν αντίθετο μοτίβο μειωμένης συσσώρευσης υπό συνθήκες καταπόνησης. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει το προφίλ συσσώρευσης της L-τρυπτοφάνης 2, το οποίο διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των γονοτύπων, με τα φυτά wt να εμφανίζουν σημαντική αύξηση ($> 14x$), τις σειρές #1 και #6 μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά και τη σειρά #9 αντίστοιχη μηδενική συσσώρευση στους μάρτυρες. Τέλος, η νορβαλίνη εμφάνισε αύξηση στα φυτά wt και σε αυτά της σειράς #1, ενώ οι σειρές #6 και #9 εμφάνισαν αντίθετο μοτίβο μηδενικής συσσώρευσης στα καταπονημένα φυτά και στους μάρτυρες αντίστοιχα. Το σύνολο των δεδομένων σχετικά με τη συσσώρευση αμινοξέων υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας υπογραμμίζει τη διαφορική μεταβολική απόκριση των σειρών #6 και #9 (Πίνακας 1, Παράρτημα III).

Υδατάνθρακες

Στην ομάδα των υδατανθράκων, προσδιορίστηκαν τέσσερα (4) συστατικά που εμφάνισαν σημαντικά διαφοροποιημένη συσσώρευση μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων. Ειδικότερα, η D-γλυκόζη 2, σημείωσε μικρή αύξηση στα φυτά wt και ανιχνεύτηκε αποκλειστικά στα καταπονημένα φυτά της σειράς #1, ενώ στα φυτά των σειρών #6 και #9 παρουσίασε μειωμένη ή μηδενική συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης. Περαιτέρω, η δεοξυ-γλυκόζη 1 εμφάνισε αύξηση υπό συνθήκες καταπόνησης στα φυτά wt και σε αυτά των σειρών #6 και #9, σημειώνοντας μηδενική συσσώρευση στους αντίστοιχους μάρτυρες, ενώ η σειρά #1 εμφάνισε αντίθετο προφίλ μηδενικής συσσώρευσης στα καταπονημένα φυτά. Επίσης, οι γονότυποι παρουσίασαν σημαντική διαφοροποίηση ως προς τη συσσώρευση της D-τρεχαλόζης, με τα φυτά wt και αυτά των σειρών #6 και #9 να εμφανίζουν μείωση υπό συνθήκες καταπόνησης και τη σειρά #1 να εμφανίζει μηδενική συσσώρευση τόσο στους μάρτυρες όσο και στα καταπονημένα φυτά. Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί ότι η σειρά #6, παρά τη μειωμένη συσσώρευση D-τρεχαλόζης υπό συνθήκες ξηρασίας, εμφάνισε υψηλότερες τιμές τόσο απουσία όσο και παρουσία καταπόνησης έναντι των υπόλοιπων γονοτύπων (Παράρτημα III). Τέλος, η μεθυλ-B γαλακτοπυρανοσίδη εμφάνισε αύξηση στο σύνολο υπό μελέτη φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης (Πίνακας 1, Παράρτημα III).

Οργανικά Οξέα

Στην ομάδα των οργανικών οξέων, προσδιορίστηκαν τρία (3) συστατικά που εμφάνισαν σημαντικά διαφοροποιημένη συσσώρευση μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων. Χαρακτηριστικά, το μουκικό οξύ παρουσίασε αυξημένη συσσώρευση στα φυτά wt και σε αυτά της σειράς #9, σημειώνοντας μηδενική συσσώρευση στους μάρτυρες, και αντίθετο μοτίβο συσσώρευσης στις σειρές #1 και #6. Το πιπεκολικό οξύ 1 εμφάνισε αύξηση στα

φυτά wt και σε αυτά της σειράς #9 και μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά των σειρών #1 και #6. Τέλος, το πιπεκολικό οξύ 2 εμφάνισε αυξημένη συσσώρευση στα φυτά wt και στις σειρές #1 και #6, με την τελευταία να εμφανίζει την πλέον δραστική αύξηση (> 25x), ενώ σημείωσε μείωση στη σειρά #9 (Πίνακας 1, Παράρτημα ΙΙΙ).

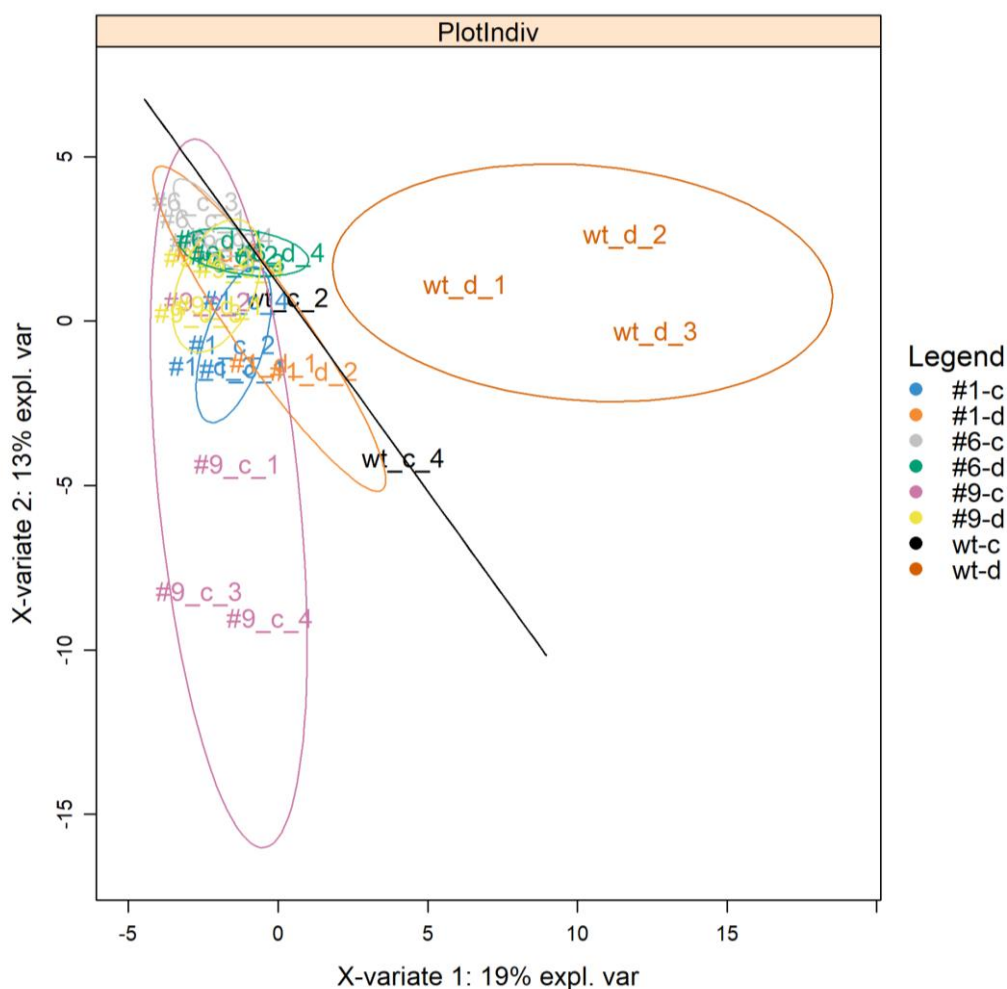
Πίνακας 1. Μεταβολίτες που παρουσίασαν σημαντική μεταβολή σε επίπεδο γονοτύπου ή/και μεταχείρισης ή/και αλληλεπίδρασής τους. Για κάθε μεταβολίτη, παρουσιάζεται ο χρόνος έκλουσης (RT), η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) καθώς και η σχετική αναλογία των καταπονημένων φυτών προς τους μάρτυρες για τις *hrpZ_{PspH}*-σειρές και τα φυτά wt. Η αναλογία υπολογίστηκε με βάση το μέσο όρο των 4 επαναλήψεων των καταπονημένων φυτών προς το μέσο όρο των 4 επαναλήψεων των μαρτύρων. Με έντονη γραφή σημειώνονται οι μεταβολίτες που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (P-value < 0.05) σε επίπεδο γονοτύπου (G), μεταχείρισης (T) και αλληλεπίδρασής τους (G x T).

Σχετική αναλογία καταπονημένα/μάρτυρες									
Μεταβολίτες	RT	m/z	wt	#1	#6	#9	G	T	G x T
Αμινοξέα									
β- αλανίνη	15,7764	248	3,5911	4,5650	1,8996	2,05897	0,01993	0,4701	0,57795
L-άνυδρο γλουταμικό οξύ	18,0601	156	0,9638	1,7184	3,0735	1,12539	0,00184	0,79892	0,98468
L-σερίνη 1	11,4327	132	1,16665	2,84816	0,05938	1,18827	0,0373	0,93353	0,77995
L-σερίνη 2	14,2646	204	2,33289	1,94534	19,3198	0,17692	0,005901	0,4701	0,06724
ασπαρτικό οξύ 1	15,653	160	# ¹	0,26639	0,18989	#	0,0098	0,4581	0,0725
ασπαρτικό οξύ 2	18,2255	232	6,51147	0,51469	8,3015	0,7402	5,92E-07	0,02174	0,00058
L-βαλίνη	10,3984	144	3,4757	5,3062	4,6156	0,59007	0,00072	0,1719	0,11298
L- θρεονίνη	14,957	218	1,7489	2,81085	8,67989	0,46041	0,0001	0,25082	0,42985
L-τρυπτοφάνη	32,2513	202	14,3138	#	#	0,0000	0,0041	0,37713	0,06724
Νορβαλίνη	7,1448	72	3,40462	2,4657	0,0000	#	0,01604	0,64878	0,57647
Υδατάνθρακες									
Γλυκόζη	27,1328	205	1,63047	#	0,087474	0,0000 ²	0,0172	0,933529	0,66833
6 δεοξυ- γλυκόζη 1	22,9882	117	#	0,0000	#	#	0,0488	0,648779	0,06724
D-τρεχαλόζη	41,0744	361	0,0918	- ³	0,689494	0,0000	0,0054	0,657533	0,89266
μεθυλ-Β γαλακτο-πυρανοσίδη	28,4014	204	1,4914	1,73764	1,253513	1,79271	0,03244	0,675781	0,9336
Οργανικά Οξέα									
Μουκικό οξύ	29,5907	333	#	0,0000	0,0000	#	0,00468	0,35097	0,06724
Πιπεκολικό οξύ 1	11,4644	84	1,0307	0,0000	0,0000	#	0,0059	0,72833	0,91327
Πιπεκολικό οξύ 2	14,113	156	1,3243	6,70148	25,5528	0,17729	0,00072	0,43447	0,56771

¹: Μηδενική συσσώρευση στους μάρτυρες, ²: Μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά, ³: Μηδενική συσσώρευση στους μάρτυρες και τα καταπονημένα φυτά.

Με στόχο την εύρεση των τάσεων μεταξύ των γονοτύπων (*hrpZ_{PspH}*-σειρές και φυτά wt) και των μεταχειρίσεων, εφαρμόστηκε PLS-DA. Η ανάλυση επέτρεψε το διαχωρισμό των

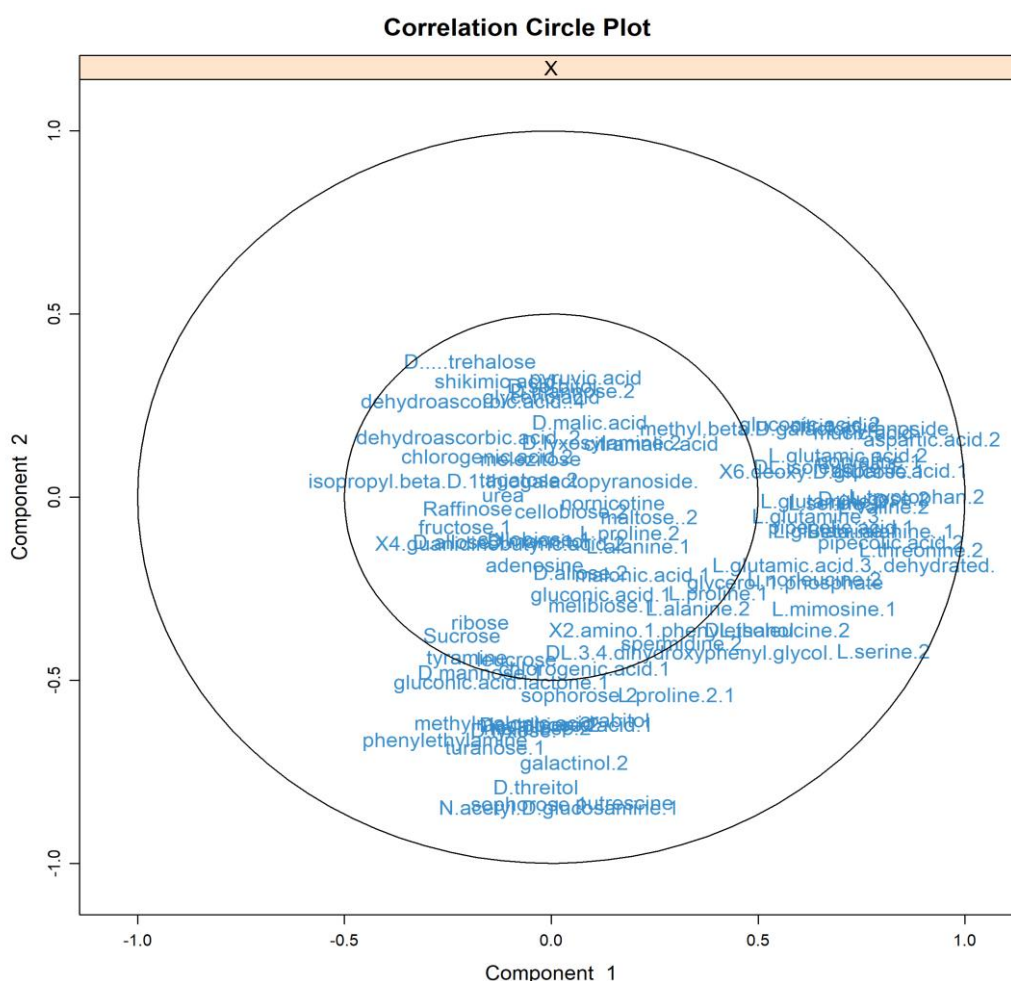
μεταβολικών προφίλ μεταξύ των *hrpZ_{Psph}*-σειρών και των φυτών wt αλλά και μεταξύ των καταπονημένων φυτών και των μαρτύρων. Ειδικότερα, το συστατικό 1, το οποίο επεξηγεί το 19 % της παραλλακτικότητας, επέτρεψε τον ευχερή διαχωρισμό των φυτών wt που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας, χωρίς ωστόσο να γίνεται διάκριση μεταξύ των υπόλοιπων γονοτύπων και μεταχειρίσεων. Αντίστοιχα, το συστατικό 2, που εξηγεί το 13 % της παραλλακτικότητας, επέτρεψε το μερικό διαχωρισμό των μαρτύρων της σειράς #9 από τα φυτά των υπολοίπων κατηγοριών. Περαιτέρω, το συστατικό ανέδειξε σημαντική επικάλυψη μεταξύ των μαρτύρων και των καταπονημένων φυτών της σειράς #6, υπογραμμίζοντας τη μερική ομοιότητα στη μεταβολική απόκρισή τους (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. PLS-DA score plot για το διαχωρισμό των GC/MS μεταβολικών προφίλ των φύλλων που προέρχονται από τους μάρτυρες και τα καταπονημένα φυτά των *hrpZ_{Psph}*-σειρών και των φυτών wt. c: Φυτά μάρτυρες, d: Φυτά που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας.

Ακολουθώντας, το κυκλικό διάγραμμα συσχέτισης μεταβλητών -κύριων συνιστωσών επέτρεψε τον εντοπισμό των μεταβολιτών με τη μεγαλύτερη συνεισφορά στη μεταβολική απόκριση των καταπονημένων φυτών και των μαρτύρων που προέρχονται από τις *hrpZ_{Psph}*-σειρές και τα φυτά wt (Εικόνα 4). Ως προς το συστατικό 1 παρατηρήθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των μεταβολιτών L-νορλευκίνη, β-αλανίνη, D-γλυκόζη, μουκικό οξύ,

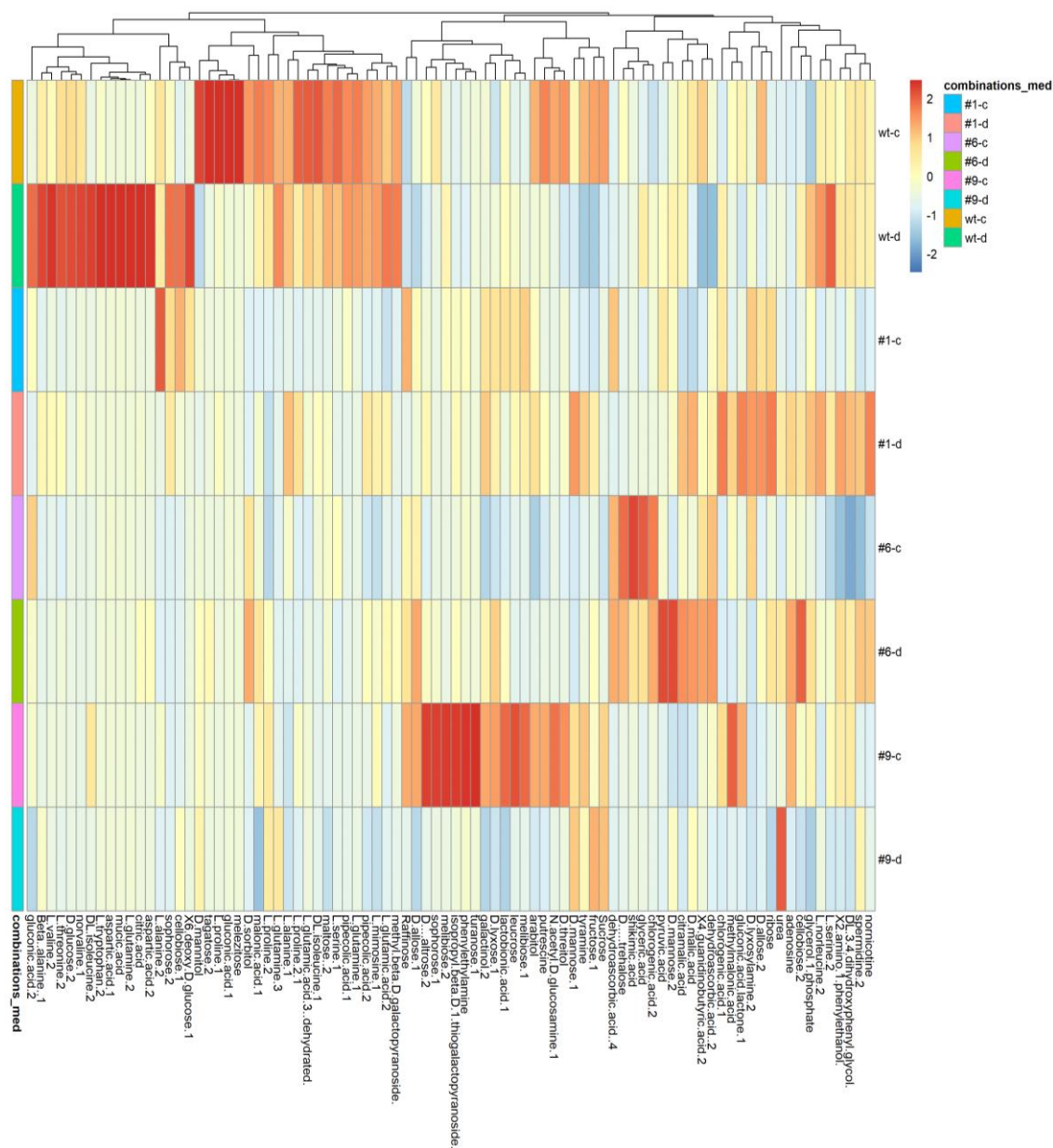
κιτρικό οξύ, γλουταμικό οξύ, πιπεκολικό οξύ, δεοξυ-γλυκόζη, L-μιμοσίνη, L-σερίνη, ασπαρτικό οξύ, γλυκονικό οξύ, L-βαλίνη, L-θρεονίνη, L-τρυπτοφάνη, νορβαλίνη, γλουταμίνη, φωσφορική γλυκερόλη, DL-ισολευκίνη και μέθυλ-β-γαλακτοπυρανοσίδη. Ως προς το συστατικό 2, σημαντική συνεισφορά εμφάνισαν τα μεταβολικά συστατικά φαινυλεθυλαμίνη, ποντρεσκίνη, N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη, λακτοβιονικό οξύ, D-θρεϊτόλη, γαλακτινίνη, μελιβιόζη, D-αλτρόζη, σοφορόζη, τυρανόζη, L-προλίνη, D-λυξόζη και αραβιτόλη (Παράρτημα ΙΙΙ).



Εικόνα 4. Κυκλικό διάγραμμα συσχέτισης μεταβλητών-κυρίων συνιστωσών για τον εντοπισμό των μεταβολιτών με τη μεγαλύτερη συνεισφορά στο διαχωρισμό των μεταβολικών προφίλ των καταπονημένων φυτών και των μαρτύρων που προέρχονται από τις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και τα φυτά wt.

Επιπρόσθετα, κατασκευάστηκε χρωματικός χάρτης (heat map) για τις τιμές των μεταβολιτών, βάσει της διαμέσου των 4 βιολογικών επαναλήψεων ανά κατηγορία μεταβλητής, με στόχο την ανάδειξη των σχέσεων μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών μεταβλητών. Οι τιμές, έπειτα από κλιμάκωση, κυμάνθηκαν από -2 έως +2 (Εικόνα 5). Στο χρωματικό χάρτη είναι εμφανής ο διαχωρισμός σε επίπεδο μεταχείρισης, καθώς διαμορφώνονται διακριτές συστάδες μεταξύ των καταπονημένων και των φυτών μαρτύρων. Ο πλέον εμφανής διαχωρισμός αφορά στα φυτά wt, όπου είναι ορατή η

δημιουργία τεσσάρων διαφορετικών συστάδων και ακολούθως στα φυτά της σειράς #9. Αντίθετα, στα φυτά της σειράς #6, και ακολούθως σε αυτά της σειράς #1, η διάκριση μεταξύ των καταπονημένων και των φυτών μαρτύρων υπήρξε λιγότερο εμφανής. Σε συνέχεια των ανωτέρω, προέκυψε ικανοποιητικός διαχωρισμός μεταξύ των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών, υπογραμμίζοντας τη διαφορετική μεταβολική τους απόκριση στην καταπόνηση ξηρασίας. Παράλληλα, από το χρωματικό χάρτη γίνεται εμφανής η σημαντική συνεισφορά των αμινοξέων και των σακχάρων στο διαχωρισμό των καταπονημένων και των φυτών μαρτύρων.



Εικόνα 5. Χρωματικός χάρτης (heat map) με βάση τη διάμεσο των 4 βιολογικών επαναλήψεων για κάθε κατηγορία μεταβλητής για τους μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στα φύλλα των *hprZ_{Psph}*-σειρών και των φυτών wt. c: Φυτά μάρτυρες, d: Φυτά που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας.

Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια, πληθώρα ερευνών υπογραμμίζει τις πολυδιάστατες λειτουργικές επιδράσεις των χαρπινών στα φυτά, με το ρόλο τους να εκτείνεται από την προαγωγή της ανάπτυξης έως και την επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Wei et al. 1992; He et al. 1993; Alfano and Collmer 2004; Oh and Beer 2007; Huo et al. 2010; Tampakaki et al. 2010; Choi et al. 2013; Ji et al. 2021). Παράλληλα, έχει αναδειχθεί ότι οι διαφορετικής προέλευσης χαρπίνες, καθώς και τα τμήματα αυτών, φέρουν την ικανότητα επαγωγής διαφορετικών αποκρίσεων που σχετίζονται με διακριτά σηματοδοτικά μονοπάτια, ρυθμίζοντας την ποικιλοότητα των επιδράσεων μεταξύ διαφορετικών μη-ξενιστών καθώς και μεταξύ ξενιστών και μη-ξενιστών (Strobel et al. 1996; Desikan et al. 2001; Lee et al. 2001; Oh and Beer 2005; Tampakaki et al. 2010). Στο πλαίσιο αξιοποίησης των χαρπινών ως μέσου ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών ή/και αβιοτικών καταπονήσεων, πρόσφατες έρευνες καταδεικνύουν την ικανότητα της πρωτεΐνης HrpZ_{PspH} να επάγει ανθεκτικότητα έναντι του ιού της ριζομανίας των ζαχαρότευτλων (Pavli et al. 2011) αλλά και της τοξικότητας καδμίου (Mitsopoulou et al. 2021), προάγοντας παράλληλα των ανάπτυξη των φυτών. Περαιτέρω, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής παρέχουν επιπλέον ενδείξεις σχετικά με την επαγωγή αποκρίσεων άμυνας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας (Κεφάλαιο 2). Σε συνέχεια πρόσφατης έρευνας που υπογραμμίζει την επίδραση του γονιδίου *hrpZ_{PspH}* στο μεταβολισμό των φυτών του είδους *N. benthamiana*, η οποία σηματοδοτείται από την αυξημένη συσσώρευση α,α-τρεχαλόξης, L-προλίνης, GABA και, σε ορισμένες περιπτώσεις, καδαβερίνης (Pavli et al. 2019), ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η αποσαφήνιση της μεταβολικής απόκρισης των *hrpZ_{PspH}*-σειρών στην καταπόνηση ξηρασίας. Απώτερο σκοπό αποτέλεσε αφενός μεν η κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών που διέπουν την άμυνα των *SP/hrpZ_{PspH}*-σειρών στην καταπόνηση ξηρασίας και αφετέρου ο εντοπισμός των συστατικών που παίζουν καίριο ρόλο στις μεταβολικές αποκρίσεις άμυνας και, συνεπώς, μπορούν να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες για την ευχερή επιλογή των ανθεκτικών γονοτύπων.

Η έρευνα εστίασε στη συγκριτική αξιολόγηση του μεταβολικού προφίλ των *SP/hrpZ_{PspH}*-και των φυτών αγρίου τύπου, μέσω ανάλυσης GC/MS, με στόχο τη μελέτη των προσαρμογών που ρυθμίζουν τη μεταβολική απόκριση των *SP/hrpZ_{PspH}*-φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας. Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση συνολικά 128 μεταβολιτών που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες, ενώ έπειτα από φιλτράρισμα έγινε επιλογή 86 συστατικών προς περαιτέρω ανάλυση. Η στατιστική επεξεργασία ανέδειξε 17 μεταβολικά συστατικά, των οποίων η συσσώρευση μεταβλήθηκε σημαντικά, με τη μεταβολή να έγκειται είτε σε επίπεδο γονοτύπου είτε σε επίπεδο μεταχείρισης ή/και αλληλεπίδρασής τους. Επιπλέον, αναδείχθηκε ότι η πλέον σημαντική συνεισφορά αφορά σε μεταβολίτες που ανήκουν στις χημικές ομάδες των αμινοξέων, των υδατανθράκων και των οργανικών οξέων.

Στη χημική ομάδα των αμινοξέων, σημαντικά μεταβαλλόμενη συσσώρευση, σε επίπεδο γονοτύπου, εμφάνισε το σύνολο των συστατικών που αναλύθηκαν, γεγονός που υπογραμμίζει αφενός μεν τον καίριο ρόλο των αμινοξέων στις μεταβολικές αποκρίσεις άμυνας και αφετέρου το διαφορετικό μεταβολικό περιεχόμενο των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών. Είναι γνωστό ότι τα αμινοξέα διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην απόκριση των

φυτών στην καταπόνηση ξηρασίας, συμβάλλοντας στη μεταβολή της σταθερότητας των κυτταρικών μεμβρανών, στη μείωση της ροής ιόντων, στην αποτοξικοποίηση των ROS και στην προστασία μακρομορίων με στόχο τη διατήρηση του υδατικού δυναμικού των κυττάρων (Farooq et al. 2009; Karoor et al. 2020). Παράλληλα, τα προϊόντα διάσπασης ορισμένων αμινοξέων αποτελούν βασικές ενώσεις του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, παρέχοντας ενδεχομένως εναλλακτικές πηγές C υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης (Živanović et al. 2020). Η αυξημένη συσσώρευση αμινοξέων αποδίδεται στην επαγωγή της πρωτεόλυσης καθώς και στον περιορισμό της πρωτεϊνσύνθεσης, ως μέσου προσαρμογής των φυτών στην καταπόνηση (Good and Zaplachinsky 1994; Ramanjulu and Sudhakar 1997; Scalabrin et al. 2020).

Στην παρούσα μελέτη, η μεταβολική απόκριση των αμινοξέων σηματοδοτείται από το προφίλ συσσώρευσης της L-σερίνης 2, η οποία σημείωσε αύξηση στην πλειοψηφία των γονοτύπων, με σημαίνουσα ωστόσο αυτή της σειράς #6 (19x), ενώ η σειρά #9 εμφάνισε αντίθετο μοτίβο μειωμένης συσσώρευσης. Η L-σερίνη αποτελεί βασικό συστατικό για τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών καθώς συμβάλλει στη βιοσύνθεση μορίων που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης συνεισφέρει στη σύνθεση νουκλεοτιδίων και, μέσω του ρόλου της ως πρόδρομη ένωση της βεταΐνης της γλυκίνης, στην προσαρμογή των φυτών υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης (Kishor et al. 2020). Περαιτέρω, τα ευρήματα κατέδειξαν τη διαφορετική συσσώρευση της L-θρεονίνης 2, η οποία σημείωσε αύξηση στο πλείστο των γονοτύπων, με εξαίρεση τη σειρά #9 που χαρακτηρίστηκε από μείωση της συσσώρευσης υπό συνθήκες καταπόνησης. Η πλέον δραστική αύξηση αφορούσε στη σειρά #6 (> 8x), παρέχοντας επιπλέον ενδείξεις σχετικά με τη διαφορετική απόκρισή της στην καταπόνηση ξηρασίας. Τα ανωτέρω ευρήματα υποστηρίζονται από προηγούμενες αναφορές σχετικά με τη θετική συσχέτιση μεταξύ της συσσώρευσης L-θρεονίνης υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων και του επιπέδου ανθεκτικότητας των γονοτύπων (Fàbregas and Fernie 2019; Živanović et al. 2020). Η L-θρεονίνη αποτελεί μόριο που αλληλεπιδρά με τα βιοχημικά μονοπάτια σύνθεσης της μεθειονίνης και της ισολευκίνης, με στόχο τη διατήρηση των επιπέδων ισολευκίνης υπό συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης (Joshi et al. 2010), ενώ το γονίδιο *TaSnRK2.4*, που κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, έχει διαπιστωθεί ότι προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, πιθανόν μέσω της αύξησης του οσμωτικού δυναμικού των φυτών (Mao et al. 2010). Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, η ανάλυση κατέδειξε τη διαφορετική συσσώρευση της L-βαλίνης 2, μεταξύ της σειράς #9 και των υπολοίπων γονοτύπων, με την πρώτη να παρουσιάζει μείωση και τους τελευταίους αύξηση υπό συνθήκες καταπόνησης. Τη μεγαλύτερη αύξηση εμφάνισε η σειρά #1, η οποία ταυτόχρονα χαρακτηρίστηκε και από την πλέον σημαντική αύξηση της β-αλανίνης. Η αυξημένη συσσώρευση L-βαλίνης και β-αλανίνης υπό συνθήκες ξηρασίας έχει αναφερθεί σε πληθώρα φυτικών ειδών (Good and Zaplachinsky 1994; Girousse et al. 1996; Pavli et al. 2013), ενώ χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η β-αλανίνη εμπλέκεται στην προστασία των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης, διαδραματίζοντας ενεργό ρόλο στη σύνθεση των φωσφολιπιδίων, στη σύνθεση και διάσπαση των λιπαρών οξέων καθώς και στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (Parthasarathy et al. 2019). Επιπλέον, η απόκριση της σειράς #6 στην καταπόνηση ξηρασίας περιλάμβανε την αυξημένη συσσώρευση L-άνυδρου γλουταμικού οξέος, η οποία υπερέβη αυτής των υπόλοιπων γονοτύπων. Το γλουταμικό οξύ αποτελεί ένα από τα πιο

συχνά ευρισκόμενα αμινοξέα στα φυτά με ενεργό ρόλο στο μεταβολισμό N, στη βλάστηση των σπόρων, στην αρχιτεκτονική της ρίζας και στην ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα, δρώντας παράλληλα ως σηματοδοτικό μόριο υπό συνθήκες βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Συγκεκριμένα, κατά την επικράτηση συνθηκών ξηρασίας, συχνά παρατηρείται αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα της συνθετάσης της γλουταμίνης στα νεότερα φύλλα που εμφανίζονται ως ανεκτικά στην ξηρασία (Martinelli et al. 2007). Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει το προφίλ συσσώρευσης των συστατικών ασπαρτικού οξύ 1 και 2, το οποίο διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των υπό μελέτη γονοτύπων. Συγκεκριμένα, το ασπαρτικό οξύ 1 εμφάνισε μείωση στα φυτά των σειρών #1 και #6 και αντίθετη τάση στα φυτά wt και στη σειρά #9, ενώ το ασπαρτικό οξύ 2, που εμφάνισε σημαντική αλληλεπίδραση G x E, σημείωσε αύξηση στα φυτά wt και στη σειρά #6 και αντίθετη τάση στις σειρές #1 και #9. Το ασπαρτικό οξύ αποτελεί δομικό στοιχείο που συμμετέχει στη βιοσύνθεση διαφόρων μορίων απαραίτητων για την ανάπτυξη των φυτών και τη σύνθεση χλωροφύλλης, όπως αμινοξέα, νουκλεοτίδια και οργανικά οξέα, αλληλεπιδρώντας παράλληλα με μεταβολικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τις αποκρίσεις άμυνας έναντι καταπονήσεων. Κατά την επικράτηση αβιοτικών καταπονήσεων, παρατηρείται θετική συσχέτιση μεταξύ της συσσώρευσης ασπαρτικού οξέος και της ικανότητας προσαρμογής στην οσμωτική καταπόνηση, με τη συσσώρευσή του ωστόσο να εξειδικεύεται ανάλογα με το φυτικό είδος και τη φύση της καταπόνησης. Συγκεκριμένα, κατά την υδατική καταπόνηση, η αυξημένη συσσώρευση ασπαρτικού οξέος συνδέεται με προηγμένη ικανότητα συγκράτησης νερού, ενώ συχνά η ανάκαμψη των φυτών συνοδεύεται από σχετική μείωση της συγκέντρωσής του. Με δεδομένη την ταχέως μεταβαλλόμενη συσσώρευση ασπαρτικού οξέος σε ανθεκτικούς γονοτύπους, η οποία ταυτόχρονα εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση με τη συσσώρευση αλλαντοίνης και άλλων αμινοξέων, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών υπογραμμίζει την πιθανή αξιοποίησή του ως βιοδείκτη που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα (Gargallo-Garriga et al. 2018; Melandri et al. 2019; Han et al. 2021; Lei et al. 2022). Τέλος, αξίζει η αναφορά στο παρατηρηθέν προφίλ συσσώρευσης της L-τρυπτοφάνης 2, η οποία σημείωσε σημαντική αύξηση στα φυτά wt (> 14x), μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά των σειρών #1 και #6 και αντίθετο μοτίβο μηδενικής συσσώρευσης στους μάρτυρες της σειράς #9. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αναφορές σχετικά με τη συσσώρευση L-τρυπτοφάνης σε γενετικό υλικό που εμφανίζει διαφορική απόκριση στην καταπόνηση ξηρασίας, με τους ανθεκτικούς γονοτύπους να φέρουν αυξημένη συσσώρευση του εν λόγω συστατικού έναντι των ευαίσθητων γονοτύπων (Bowne et al. 2012; Muscolo et al. 2015).

Επιπλέον, τα αποτελέσματα ανέδειξαν τη διαφορική απόκριση των γονοτύπων ως προς τη συσσώρευση ορισμένων υδατανθράκων, με τις πλέον σημαντικές μεταβολές να σημειώνονται στα μόρια της γλυκόζης και της D-τρεχαλόζης. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αναφορές ότι η καταπόνηση ξηρασίας διαταράσσει το μεταβολισμό υδατανθράκων, μέσω αυξημένης δραστηριότητας των ενζύμων που υδrolύουν τη σουκρόζη (Keller and Ludlow 1993; Farooq et al. 2009), με τις μεταβολές που συντελούνται ωστόσο να εξαρτώνται από το φυτικό είδος καθώς και την ένταση και διάρκεια της καταπόνησης (Yang et al. 2013). Στην παρούσα μελέτη, σημειώθηκε διαφοροποιημένη συσσώρευση D-γλυκόζης μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων, η οποία αφορούσε σε αύξηση στα φυτά wt και σε αυτά της σειράς #1 και αντίθετη τάση μείωσης και μηδενικής συσσώρευσης στα καταπονημένα φυτά των σειρών #6 και #9 αντίστοιχα.

Τα ευρήματα αυτά παρέχουν περαιτέρω ενδείξεις σχετικά με το γεγονός ότι το προφίλ συσσώρευσης της D-γλυκόζης κατά την καταπόνηση ξηρασίας παρουσιάζει σημαντική εξάρτηση από το φυτικό είδος. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αναφερθεί η υψηλή συσσώρευση διαλυτών υδατανθράκων σε ευαίσθητους γονοτύπους σόργου και βαμβακιού, η οποία αποδόθηκε σε διαδικασίες οσμωτικής προσαρμογής ή/και μείωσης του ρυθμού ανάπτυξης και σε μεταβολή του ρυθμού μεταφοράς εκτός του φύλλου αντίστοιχα (Newton et al. 1986; Timpa et al. 1986). Προς την ίδια κατεύθυνση, έχει αναφερθεί ότι η ανάπτυξη της ανάπτυξης φυτών μηδικής παρουσία καταπόνησης ξηρασίας συνδέεται θετικά με τη συσσώρευση D-γλυκόζης και σουκρόζης στους βλαστούς καθώς και αμινοξέων στους ιστούς βλαστού, ριζών και φυματίων (Schubert et al. 1995). Σε πλήρη αντίθεση με τα ανωτέρω, μία σειρά ερευνών υποστηρίζει την αυξημένη συσσώρευση σακχάρων σε ανθεκτικούς γονοτύπους, με την απόκριση αυτή να αποτελεί μέρος της στρατηγικής οσμωρύθμισης υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης (Pavli et al. 2013; Yang et al. 2013). Περαιτέρω, η ανάλυση κατέδειξε τη διαφορική απόκριση των γονοτύπων ως προς τη συσσώρευση της D-τρεχαλόζης, η οποία αφορούσε σε μείωση στα φυτά wt και σε αυτά της σειράς #6, ενώ οι σειρές #9 και #1 χαρακτηρίστηκαν από μηδενική συσσώρευση είτε στα καταπονημένα φυτά είτε και στις δύο κατηγορίες φυτών αντίστοιχα. Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί ότι, παρά την παρατηρηθείσα μειούμενη τάση υπό συνθήκες καταπόνησης, η σειρά #6 χαρακτηρίστηκε από την πλέον υψηλή συσσώρευση D-τρεχαλόζης *per se*, συγκριτικά με τις απόλυτες τιμές των υπολοίπων γονοτύπων (Παράρτημα III). Λαμβάνοντας υπόψη την προηγμένη άμυνα της σειράς #6 έναντι της καταπόνησης ξηρασίας, τόσο στη φάση της βλάστησης όσο και στο στάδιο των ώριμων φυτών (Κεφάλαιο 2), τα ανωτέρω ευρήματα συντείνουν στον ενεργό ρόλο της τρεχαλόζης στην επαγωγή αποκρίσεων αντοχής έναντι της καταπόνησης ξηρασίας (Ilhan et al. 2015; Zulfiqar et al. 2021). Συγκεκριμένα, κατά την επικράτηση υδατικής καταπόνησης, η τρεχαλόζη εμπλέκεται στη σταθεροποίηση ενζύμων, λιπιδίων και πρωτεϊνών με στόχο την ενίσχυση της φωτοσυνθετικής ικανότητας (Garg et al. 2002; Farooq et al. 2009; Kapoor et al. 2020). Επιπλέον, αναφέρεται ότι η συσσώρευση τρεχαλόζης συμβάλλει στη δημιουργία μιας ζελατινοειδούς φάσης, η οποία παρέχει προστασία των κυττάρων από την ξηρασία καθώς και των μεμβρανών και πρωτεϊνών από τη διάσπαση, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις προσδίδει προστασία των κυττάρων και άλλων οργανιδίων από μετουσίωση (Delorge et al. 2014; Rasool et al. 2019).

Στην ομάδα των οργανικών οξέων, η ανάλυση ανέδειξε τη διαφορική συσσώρευση των συστατικών μουκικό οξύ και πιπεκολικό οξύ μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων. Ως ιδιαίτερα ενδιαφέρον χαρακτηρίζεται το εύρημα ότι στα φυτά wt και σε αυτά της σειράς #9 το μουκικό οξύ ανιχνεύτηκε αποκλειστικά στα καταπονημένα φυτά, ενώ οι σειρές #1 και #6 εμφάνισαν αντίθετο προφίλ μηδενικής συσσώρευσης υπό συνθήκες καταπόνησης. Η διαφορική απόκριση των φυτών wt και της σειράς #9 σε σχέση με αυτή των σειρών #1 και #6 επαληθεύτηκε περαιτέρω στο πιπεκολικό οξύ 1, το οποίο εμφάνισε αντίστοιχο προφίλ συσσώρευσης με αυτό του μουκικού οξέος. Είναι ενδιαφέρον ωστόσο ότι το πιπεκολικό οξύ 2 εμφάνισε αυξημένη συσσώρευση στις σειρές #1 και #6, με την πλέον δραστική αύξηση να αφορά στην τελευταία (25x). Τα ευρήματα σχετικά με τη διαφορική απόκριση των ανθεκτικών και ευαίσθητων γονοτύπων, ευθυγραμμίζονται με το γνωστό ρόλο των οργανικών οξέων στην οσμωτική προσαρμογή, συμβάλλοντας στη διατήρηση των κυτταρικών λειτουργιών (Farooq et al. 2009; Kapoor et al. 2020), με την αυξημένη

συσσώρευσή τους να αποτελεί προσαρμοστική απόκριση των ανθεκτικών γονοτύπων (Timpra et al. 1986; Pavli et al. 2013). Σύμφωνα με τα ανωτέρω, έχει επίσης αποδειχθεί η ύπαρξη θετικής συσχέτισης μεταξύ της συσσώρευσης οργανικών οξέων και προλίνης, η οποία θεωρείται ως μόριο καίριας σημασίας κατά την προσαρμογή στην υδατική καταπόνηση (Venekamp et al. 1989). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, αν και υπογραμμίζουν τη διαφορετική απόκριση των ανθεκτικών και ευαίσθητων γονοτύπων, βρίσκονται σε διάσταση με προηγούμενες μελέτες αναφορικά με την αυξημένη συσσώρευση μουκικού οξέος παρουσία καταπόνησης ξηρασίας, το οποίο μάλιστα χαρακτηρίζεται ως βιοδείκτης ανθεκτικότητας καθώς, σε συνδυασμό με το σακχαρικό οξύ, δρα ως μόριο οσμωρύθμισης (Perlikowski et al. 2016; Sun et al. 2022). Αντίθετα, η δραστική αύξηση του πιπεκολικού οξέος στη σειρά #6 συνάδει πλήρως με αναφορές σχετικά με τη συνεισφορά του στην αντοχή έναντι της ξηρασίας, έπειτα από εξωγενή εφαρμογή, η οποία αποδίδεται στην επαγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων αλλά και στη μείωση της συσσώρευσης ROS (Caddell et al. 2020; Wang et al. 2021).

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υπογραμμίζουν τη διαφορετική απόκριση των υπό μελέτη γονοτύπων στην υδατική καταπόνηση, η οποία σημαίνεται πρωτίστως από τις διαφορές στο μεταβολικό περιεχόμενο της σειράς #6, η οποία έχει αναδειχθεί ως η πλέον ανθεκτική στην ξηρασία κατά τη φάση της βλάστησης αλλά, κυρίως στο στάδιο των ώριμων φυτών. Είναι προφανές ότι οι παρατηρηθείσες διαφορές των *hprZ_{P_{sph}}*-σειρών σε μεταβολικό επίπεδο, παρά την ομοιότητά τους ως προς την κατοχή του *hprZ_{P_{sph}}*, αποδίδονται σε επιδράσεις της θέσης ένθεσης του διαγονιδίου, η οποία είναι τυχαία και διαφέρει μεταξύ των αρχικών συμβάντων μετασχηματισμού (T₀). Ταυτόχρονα, τα συνολικά ευρήματα παρέχουν πρόσθετες ενδείξεις για τις προοπτικές αξιοποίησης των χαρπινών ως μέσου επαγωγής ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, όπως εξάλλου έχει αποδειχθεί για ένα εύρος διαφορετικών χαρπινών και καταπονήσεων, όπως αυτές της ξηρασίας, αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2007; Chuang et al. 2010; Zhang et al. 2011; Liu et al. 2016; Cao et al. 2018; Zhou et al. 2019; Demirkol 2021). Στο επίπεδο αυτό, προηγούμενες έρευνες έχουν αναδείξει ότι η προηγμένη αντοχή αποδίδεται σε ενεργοποίηση των ABA- και ET- βιοχημικών μονοπατιών, επαγωγή γονιδίων άμυνας, όπως τα *hinI* και *HSR203J*, ενίσχυση της δραστηριότητας ενζύμων αποτοξικοποίησης των ROS (SOD, POD, GR και CAT), μείωση της έκφρασης γονιδίων που ρυθμίζουν τη γήρανση των φύλλων, αυξημένη συσσώρευση ρυθμιστών αύξησης καθώς και οσμωπροστατευτικών μορίων, όπως αυτό της προλίνης. Σε συνέχεια των ανωτέρω, η παρούσα μελέτη προσδίδει σημαντική γνώση σχετικά με την επίδραση της χαρπίνης *HprZ_{P_{sph}}* στη μεταβολική απόκριση αντοχής στην ξηρασία, παρέχοντας ταυτόχρονα ισχυρές ενδείξεις σχετικά με τα μεταβολικά συστατικά που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού υπό συνθήκες καταπόνησης. Προς την κατεύθυνση αυτή, η έρευνα κατέδειξε τη διαφορετική συσσώρευση των αμινοξέων L-σερίνη και L- θρεονίνη καθώς και των οργανικών οξέων μουκικό οξύ και πιπεκολικό οξύ 1 και 2 μεταξύ των ανθεκτικών και ευαίσθητων γονοτύπων. Η παραπάνω συσχέτιση, πέραν του ότι συνηγορεί προς τον καίριο ρόλο των εν λόγω μεταβολικών συστατικών στην προσαρμογή του μεταβολισμού υπό συνθήκες ξηρασίας, θέτει τη βάση για την προοπτική αξιοποίησης τους ως βιοδείκτες για την ευχερή επιλογή των ανθεκτικών γονοτύπων.

Συμπεράσματα

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης καταδεικνύουν τη σημαντική επίδραση του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στη μεταβολική απόκριση των φυτών του είδους *N. benthamiana* στην καταπόνηση ξηρασίας. Περαιτέρω, η παρακολούθηση των μεταβολικών προσαρμογών στους διαφορετικούς γονοτύπους επέτρεψε την αναγνώριση των συστατικών L-σερίνη, L-θρεονίνη, μουκικό οξύ και πιπεκολικό οξύ ως καίριους ρυθμιστές του μεταβολισμού υπό συνθήκες καταπόνησης. Η επαλήθευση της συσχέτισης μεταξύ της συσσώρευσης των ανωτέρω συστατικών και του επιπέδου αντοχής στην καταπόνηση ξηρασίας αναμένεται να προσφέρει σημαντικές προοπτικές αξιοποίησής τους ως βιοδείκτες για την αναγνώριση ανθεκτικού γενετικού υλικού.

Βιβλιογραφία

- Ahkami AH, Wang W, Wietsma TW, Winkler T, Lange I, et al. (2019) Metabolic shifts associated with drought-induced senescence in Brachypodium. Plant Sci 289:110278. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110278>
- Alfano JR, Collmer A (2004) Type III Secretion System effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. Annu Rev Phytopathol 42:385-414. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731>
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. J R Stat Soc: B (Methodological) 57: 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bowne JB, Erwin TA, Juttner J, Schnurbusch T, Langridge P, Bacic A, Roessner U (2012) Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. Mol Plant 5:418-429. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr114>
- Caddell DF, Louie K, Bowen B, Sievert JA, Hollingsworth J, Dahlberg J, et al. (2020) Drought shifts sorghum root metabolite and microbiome profiles and enriches the stress response factor pipelicolic acid. <https://doi.org/10.1101/2020.11.08.373399>
- Carraro E, Di Iorio A (2022) Eligible strategies of drought response to improve drought resistance in woody crops: a mini-review. Plant Biotechnol Rep <https://doi.org/10.1007/s11816-021-00733-x>
- Cao Y, Yang M, Ma W, Sun Y, Chen G (2018) Overexpression of *SSB_{Xoc}*, a single-stranded DNA-binding protein from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, enhances plant growth and disease and salt stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana*. Front Plant Sci 9:953. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00953>
- Chaves MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: Prospects for water-saving agriculture. J Exp Bot 55:2365-2384. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh269>
- Chen D, Wang S, Cao B, Cao D, Leng G, Li H, Yin L, Shan L, Deng X (2016) Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. Front Plant Sci 6:1241. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01241>
- Choi M-S, Kim W, Lee C, Oh C-S (2013) Harpins, multifunctional proteins Secreted by Gram-Negative plant-pathogenic bacteria. Mol Plant Microbe Interact 26: 1115-1122. <https://doi.org/10.1094/mpmi-02-13-0050-cr>

- Chuang Hw, Harnrak A, Chen YC, Hsu CM (2010) A harpin-induced ethylene-responsive factor regulates plant growth and responses to biotic and abiotic stresses. *Biochem Biophys Res Commun* 402:414–420. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.047>
- de Oliveira AB, Alencar NLM, Gomes-Filho E (2013) Comparison between the water and salt stress effects on plant growth and development. In: Akıncı S (eds) *Responses of organisms to water stress*. IntechOpen, pp 67-94. <https://doi.org/10.5772/54223>
- Delorge I, Janiak M, Carpentier S, Van Dijck P (2014) Fine tuning of trehalose biosynthesis and hydrolysis as novel tools for the generation of abiotic stress tolerant plants. *Front Plant Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00147>
- Demirkol G (2021) PopW enhances drought stress tolerance of alfalfa via activating antioxidative enzymes, endogenous hormones, drought related genes and inhibiting senescence genes. *Plant Physiol Biochem* 166:540-548. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.036>
- Desikan R, Hancock JT, Ichimura K, Shinozaki K, Neill SJ (2001) Harpin induces activation of the arabidopsis Mitogen- Activated Protein Kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol* 126: 1579-1587. <https://doi.org/10.1104/pp.126.4.1579>
- Dong HP, Peng J, Bao Z, Meng X, Bonasera JM, Chen G, Beer SV, Dong H (2004) Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated Arabidopsis growth and insect defense. *Plant Physiol* 136:3628-3638. <https://doi.org/10.1104/pp.104.048900>
- Dong HP, Yu H, Bao Z, Guo X, Peng J, et al (2005) The *ABI2*-dependent abscisic acid signaling controls HrpN-induced drought tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* 221:313–327. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1444-x>
- Dong Y, Li P, Zhang C (2016) Harpin Hpa1 promotes flower development in *Impatiens* and *Parochetus* plants. *Bot Stud* 57. <https://doi.org/10.1186/s40529-016-0132-z>
- Fàbregas N, Fernie AR (2019) The metabolic response to drought. *J Exp Bot* 70:1077-1085. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery437>
- Fang Y, Xiong L (2015) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell Mol Life Sci* 72: 673-689. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0>
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29:185–212. <https://doi.org/10.1051/agro:2008021>
- Fu M, Xu M, Zhou T, Wang D, Tian S, Han L, Dong H, Zhang C (2014) Transgenic expression of a functional fragment of harpin protein Hpa1 in wheat induces the phloem-based defence against English grain aphid. *J Exp Bot* 65:1439–1453. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert488>
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Nat Acad Sci* 99:15898-15903. <https://doi.org/10.1073/pnas.252637799>
- Gargallo-Garriga A, Preece C, Sardans J, Oravec M, Urban O, Peñuelas J (2018) Root exudate metabolomes change under drought and show limited capacity for recovery. *Sci Rep* 8:12696. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30150-0>
- Girousse C, Bournoville R, Bonnemain JL (1996) Water Deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. *Plant Physiol* 111:109-113. <https://doi.org/10.1104/pp.111.1.109>

- Gleason SM, Wiggans DR, Bliss CA, Comas LH, Cooper M, et al. (2017) Coordinated decline in photosynthesis and hydraulic conductance during drought stress in *Zea mays*. *Flora* 227:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.11.017>
- Good AG, Zaplachinski ST (1994) The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. *Physiol Plant* 90:9-14. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb02185.x>
- Han M, Zhang C, Suglo P, Sun S, Wang M, Su T (2021) L-Aspartate: an essential metabolite for plant growth and stress acclimation. *Molecules* 26:1887. <https://doi.org/10.3390/molecules26071887>
- He SY, Huang HC, Collmer A (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpins: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73: 1255-1266. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90354-s](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90354-s)
- Horsch R, Fry J, Hoffman N, Eichholtz D, Rogers S, et al. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229–1231. <https://doi.org/10.1126/science.227.4691.1229>
- Huo R, Wang Y, Ma LL, Qiao JQ, Shao M, Gao XW (2010) Assessment of inheritance pattern and agronomic performance of transgenic rapeseed having harpin_{Xooc}-encoding *hrf2* gene. *Transgenic Res* 19: 841–847. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9365-x>
- Ilhan S, Ozdemir F, Bor M (2015) Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Capparis ovata* Desf. *Plant Biol* 17:402-407. <https://doi.org/10.1111/plb.12227>
- Jang YS, Sohn SI, Wang MH (2006) The *hrpN* gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Planta* 223:449-456. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0100-4>
- Ji ZL, Yu MH, Ding YY, Li J, Zhu F, He JX, Yang LN (2021) Coiled-Coil N21 of Hpa1 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* promotes plant growth, disease resistance and drought tolerance in non-hosts via eliciting HR and regulation of multiple defense response genes. *Int J Mol Sci* 22:203. <https://doi.org/10.3390/ijms22010203>
- Joshi V, Joung JG, Fei Z, Jander G (2010) Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids* 39:933-947. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0505-7>
- Kapoor D, Bhardwaj S, Landi M, Sharma A, Ramakrishnan M, Sharma A (2020) The impact of drought in plant metabolism: How to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Appl Sci* 10:5692. <https://doi.org/10.3390/app10165692>
- Keller F, Ludlow MM (1993) Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *J Exp Bot* 44:1351-1359. <https://doi.org/10.1093/jxb/44.8.1351>
- Khan MS, Khan MN (2019) Understanding plant responses to drought and salt stresses: Advances and challenges in “Omics” approaches. In: Khan MS, Malik KA (eds) *Transgenic crops - emerging trends and future perspectives*. IntechOpen, pp 75-98. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81041>
- Kishor PBK, Suravajhala R, Rajashekar G, Marka N, Shridhar KK et al. (2020) Lysine, lysine-rich, serine, and serine-rich proteins: link between metabolism, development, and abiotic stress tolerance and the role of ncRNAs in their regulation. *Front Plant Sci* 11:546213. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.546213>

- Kooyers NJ (2015) The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.012>
- Lê Cao KA, Costello ME, Lakis VA, Bartolo F, Chua XJ, Brazeilles R, Rondeau P (2016) MixMC: A multivariate statistical framework to gain insight into microbial communities. PLoS ONE 11: e0160169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160169>
- Lee J, Klessig DF, Nurnberger T. (2001) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. Plant Cell 13:1079–1093. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.5.1079>
- Lei S, Rossi S, Huang B (2022) Metabolic and Physiological Regulation of Aspartic Acid-Mediated Enhancement of Heat Stress Tolerance in Perennial Ryegrass. Plants 11:199. <https://doi.org/10.3390/plants11020199>
- Li JG, Cao J, Sun FF, Niu DD, Yan F, Liu HX, Guo JH (2011) Control of *Tobacco mosaic virus* by *PopW* as a result of induced resistance in tobacco under greenhouse and field conditions. Phytopathology 101:1202-1208. <https://doi.org/10.1094/phyto-02-11-0049>
- Liu H, Wang Y, Zhou X, Wang C, Wang C, Fu J, Wei T (2016) Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* from *Ralstonia solanacearum* primed antioxidant defenses with enhanced drought tolerance in tobacco plants. Plant Cell Rep 35:1333–1344. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1965-3>
- Liu M, Li M, Liu K, Sui N (2015) Effects of drought stress on seed germination and seedling growth of different maize varieties. J Agric Sci 7:231-240. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n5p231>
- Liu R, Lu B, Wang X, Zhang C, Zhang S, Qian J, Chen L, Shi H, Dong H (2010) Thirty-seven transcription factor genes differentially respond to a harpin protein and affect resistance to the green peach aphid in Arabidopsis. J Biosci 35:435-450. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0049-8>
- Liu Y, Zhou X, Liu W, Huang J, Liu Q, Sun J, Cai X, Miao W (2020) HpaXpm, a novel harpin of *Xanthomonas phaseoli* pv. manihotis, acts as an elicitor with high thermal stability, reduces disease, and promotes plant growth. BMC Microbiol 20. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1691-4>
- Livaja M, Palmieri MC, von Rad U, Durner J (2008) The effect of the bacterial effector protein harpin on transcriptional profile and mitochondrial proteins of *Arabidopsis thaliana*. J Proteom 71: 148-159. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.04.002>
- Mao X, Zhang H, Tian S, Chang X, Jing R (2010) TaSnRK2.4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis*. J Exp Bot 61:683-696. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp331>
- Martinelli T, Whittaker A, Bochicchio A, Vazzana C, Suzuki A, Masclaux-Daubresse C (2007) Amino acid pattern and glutamate metabolism during dehydration stress in the ‘resurrection’ plant *Sporobolus stapfianus*: a comparison between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant leaves. J Exp Bot 58:3037-3046. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm161>
- Melandri G, AbdElgawad H, Riewe D, Hageman JA, Asard H, et al. (2020) Biomarkers for grain yield stability in rice under drought stress. J Exp Bot 71:669-683. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz221>

- Mitsopoulou N, Lakiotis K, Golia EE, Khah EM, Pavli OI (2021) Response of *hrpZ_{Psph}*-transgenic *N. benthamiana* plants under cadmium stress. *Environ Sci Pollut Res Int* 28:3787-3796. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09204-2>
- Murashige T, Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Muscolo A, Junker A, Klukas C, Weigelt-Fischer K, Riewe D, Altmann T (2015) Phenotypic and metabolic responses to drought and salinity of four contrasting lentil accessions. *J Exp Bot* 18: 5467-5480. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv208>
- Newton RJ, Bhaskaran S, Puryear JD, Smith RH (1986) Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. *Plant Physiol* 81:626-629. <https://doi.org/10.1104/pp.81.2.626>
- Oh CH, Beer SV (2005) Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiol Lett* 253:185–192. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.051>
- Oh CS, Beer SV (2007) AtHIPM, an Ortholog of the apple HrpN-interacting protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth-enhancing effect of HrpN in arabidopsis. *Plant Physiol* 145:426-436. <https://doi.org/10.1104/pp.107.103432>
- Parthasarathy A, Savka MA, Hudson AO (2019) The synthesis and role of β -alanine in plants. *Front Plant Sci*.10:921. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00921>
- Pavli OI, Kelaidi GI, Tampakaki AP, Skaracis GN (2011) The *hrpZ* gene of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola enhances resistance to rhizomania disease in transgenic *Nicotiana benthamiana* and sugar beet. *PLoS ONE* 6: e17306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017306>
- Pavli OI, Vlachos CE, Kalloniati C, Flemetakis E, Skaracis GN (2013) Metabolite profiling reveals the effect of drought on sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) metabolism. *Plant Omics J* 6:371-376.
- Pavli OI, Mitsopoulou N, Zianna E, Foti C, Aliferis KA, Skaracis GN (2019) Transgenic expression of *hrpZ_{Psph}* gene substantially alters the metabolome of *Nicotiana benthamiana* plants. In: Proceedings of 70th HSBMB Conference, p 10.
- Perlikowski D, Czyżniewski M, Marczak Ł, Augustyniak A, Kosmala A (2016) Water deficit affects primary metabolism differently in two *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms with a distinct capacity for photosynthesis and membrane regeneration. *Front Plant Sci* 7:1063. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01063>
- Ramanjulu S, Sudhakar C (1997) Drought tolerance is partly related to amino acid accumulation and ammonia assimilation: A comparative study in two mulberry genotypes differing in drought sensitivity. *J Plant Physiol* 150:345-350. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(97\)80131-9](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(97)80131-9)
- Rasool S, Mir BA, Rehman MU, Amin I, Mir MUR, Ahmad SB (2019) Abiotic stress and plant senescence. In: Sarwat M, Tuteja N (eds) *Senescence signaling and control in plants*. Elsevier Inc, pp 15-27. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813187-9.00002-0>
- Ren X, Liu F, Bao Z, Zhang C, Wu X, Chen L, Liu R, Dong H (2008) Root growth of *Arabidopsis thaliana* is regulated by ethylene and abscisic acid signaling interaction in response to HrpN_{Ea}, a bacterial protein of harpin group. *Plant Mol Biol Rep* 26:225–240. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0038-3>

- Rezayian M, Niknam V, Ebrahimzadeh H (2018) Effects of drought stress on the seedling growth, development, and metabolic activity in different cultivars of canola. *Soil Sci Plant Nutr* 64: 360-369. <https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1436407>
- Riboni M, Galbiati M, Tonelli C, Conti L (2013) *GIGANTEA* enables drought escape response via abscisic acid- dependent activation of the florigens and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1. *Plant Physiol* 162: 1706-1719. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217729>
- Ricote N, Bastias CC (2019) Selfing and drought-stress strategies under water deficit for two herbaceous species in the South American Andes *Front Plant Sci* 10:1595. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01595>
- Rodrigo-García J, Navarrete-Laborde B, de la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E Núñez-Gastélum JA (2019) Effect of Harpin protein as an elicitor on the content of phenolic compounds and antioxidant capacity in two hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties. *Food Sci Technol* 39: 72-77. <https://doi.org/10.1590/fst.20417>
- Rolando JL, Ramírez DA, Yactayo W, Monneveux P, Quiroz R (2015) Leaf greenness as a drought tolerance related trait in potato (*Solanum tuberosum* L.) *Environ Exp Bot* 110:27-35. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.09.006>
- Sang S, Li X, Gao R, You Z, Lü B, Liu P, Ma Q, Dong H (2012) Apoplastic and cytoplasmic location of harpin protein Hpa1Xoo plays different roles in H₂O₂ generation and pathogen resistance in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 79:375–391. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9918-x>
- Scalabrin E, Radaelli M, Capodaglio G (2020) Effects of water deficit and heat stress on *Nicotiana langsdorffii* metabolomic pattern modified by insertion of *rolD* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *Metabolites* 10:310. <https://doi.org/10.3390/metabo10080310>
- Schubert S, Serraj R, Plies-Balzer E, Mengel K (1995) Effect of drought stress on growth, sugar concentrations and amino acid accumulation in N₂-Fixing alfalfa (*Medicago sativa*). *J Plant Physiol* 146:541-546. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82021-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82021-3)
- Shao M, Wang J, Dean RA, Lin Y, Gao X, Hu S (2008) Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthe grisea*. *Plant Biotechnol J* 6:73-81. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00304.x>
- Shavrukov Y, Kurishbayev A, Jatayev S, Shvidchenko V, Zotova L, et al. (2017) Early flowering as a drought escape mechanism in plants: how can it aid wheat production? *Front Plant Sci* 8:1950. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01950>
- Shu L, Lou Q, Ma C, Ding W, Zhou J, et al. (2011) Genetic, proteomic and metabolic analysis of the regulation of energy storage in rice seedlings in response to drought. *Proteomics* 11:4122-4138. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000485>
- Sohn SI, Kim YH, Kim BR, Lee SY, Lim CK, Hur JH, Lee JY (2007) Transgenic tobacco expressing the *hrpN_{EP}* gene from *Erwinia pyrifoliae* triggers defense responses against *Botrytis cinerea*. *Mol Cells* 24:232-239.
- Stein, SE (1999) An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *J Am Soc Mass Spectrom* 10: 770-781. [https://doi.org/10.1016/s1044-0305\(99\)00047-1](https://doi.org/10.1016/s1044-0305(99)00047-1)
- Strobel NE, Ji C, Gopalan S, Kuc JA, He SY (1996) Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZPss protein. *Plant J* 9:431-439. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1996.09040431.x>

- Sun X, Guo Z, Jiang Y, Qin L, Shi Z, Dong L, et al. (2022) Differential metabolomic responses of Kentucky bluegrass cultivars to low nitrogen stress. *Front Plant Sci* 12:808772. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.808772>
- Tampakaki AP, Panopoulos NJ (2000) Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZ_{psph} produced *in planta*. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1366-1374. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2000.13.12.1366>
- Tampakaki AP, Skandalis N, Gazi AD, Bastaki MN, Sarris PF, Charova SN, Kokkinidis M, Panopoulos NJ (2010) Playing the “Harp”: Evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. *Ann Rev Phytopathol* 48: 347-370. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114407>
- Timpa JD, Burke JJ, Quisenberry JE, Wendt CW (1986) Effects of water stress on the organic acid and carbohydrate compositions of cotton plants. *Plant Physiol* 82:724-728. <https://doi.org/10.1104/pp.82.3.724>
- Venekamp JH, Lampe JEM, Koot JTMT (1989) Organic acids as sources for drought-induced proline synthesis in field bean plants, *Vicia faba* L. *J Plant Physiol* 133:654-659. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80068-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80068-9)
- Wang C, Wang C, Li HW, Wei T, Wang YP, Liu HX (2016) Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* in tobacco enhances resistance against *Ralstonia solanacearum*. *Biol Plant* 60:181-189. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0571-5>
- Wang D, Wang Y, Fu M, Mu S, Han B, Ji H, et al (2014) Transgenic expression of the functional fragment Hpa1₁₀₋₄₂ of the harpin protein *Hpa1* imparts enhanced resistance to powdery mildew in wheat. *Plant Dis* 98:448–455. <https://doi.org/10.1094/pdis-07-13-0687-re>
- Wang P, Luo Q, Yang W, Ahammed GJ, Ding S, Chen X, et al. (2021) A novel role of pipecolic acid biosynthetic pathway in drought tolerance through the antioxidant system in tomato. *Antioxidants* 10:1923. <https://doi.org/10.3390/antiox10121923>
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257: 85-88. <https://doi.org/10.1126/science.1621099>
- Wu H, Wang S, Qiao J, Liu J, Zhan J, Gao X (2009) Expression of HpaGXooc protein in *Bacillus subtilis* and its biological functions. *J Microbiol Biotechnol* 19:194–203. <https://doi.org/10.4014/jmb.0802.154>
- Wu X, Wu T, Long J, Yin Q, Zhang Y, Chen L, Liu R, Gao T, Dong H (2007) Productivity and biochemical properties of green tea in response to full-length and functional fragments of HpaG Xooc, a harpin protein from the bacterial rice leaf streak pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *J Biosci* 32:1119-1131. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0113-1>
- Xu My, Zhou T, Zhao Yy, Li Jb, Xu H, Dong Hs, Zhang Cl (2014) Transgenic expression of a functional fragment of harpin protein Hpa1 in wheat represses English grain aphid infestation. *J Integr Agric* 13:2565-2576. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(13\)60735-2](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(13)60735-2)
- Yang Z, Xu L, Yu J, DaCosta M, Huang B (2013) Changes in carbohydrate metabolism in two Kentucky bluegrass cultivars during drought stress and recovery. *J Amer Soc Hort Sci* 138:24-30. <https://doi.org/10.21273/jashs.138.1.24>
- Zhang C, Qian J, Bao Z Hong X, Dong H (2007) The induction of abscisic-acid-mediated drought tolerance is independent of ethylene signaling in arabidopsis plants responding to a Harpin protein. *Plant Mol Biol Rep* 25:98–114. <https://doi.org/10.1007/s11105-007-0012-5>

- Zhang L, Xiao S, Li W, Feng W, Li J, Wu Z, Gao X, Liu F, Shao M (2011) Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrfI* in rice enhances drought tolerance. J Exp Bot 62:4229-4238. <https://doi.org/10.1093/jxb/err131>
- Zhou X, Liu Y, Huang J, Liu Q, Sun J, Cai X, Tang P, Liu W, Miao W (2019) High temperatures affect the hypersensitive reaction, disease resistance and gene expression induced by a novel harpin *HpaG*-Xcm. Sci Rep 9:990. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37886-9>
- Živanović B, Komić SM, Tosti T, Vidović M, Prokić L, Jovanović SV (2020) Leaf soluble sugars and free amino acids as important components of abscisic acid—mediated drought response in tomato. Plants 9:1147. <https://doi.org/10.3390/plants9091147>
- Zulfiqar F, Chen J, Finnegan PM, Younis A, Nafees M, Zorrig W, Hamed KB (2021) Application of trehalose and salicylic acid mitigates drought stress in sweet basil and improves plant growth. Plants 10:1078. <https://doi.org/10.3390/plants10061078>

Κεφάλαιο 5

Προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ των *hrpZ_{Psph}*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας

Περίληψη

Η επικράτηση συνθηκών υψηλής αλατότητας επιφέρει στα φυτά μια σειρά φυσιολογικών, βιοχημικών και μεταβολικών προσαρμογών με στόχο τον περιορισμό των επιπτώσεων της οξειδωτικής καταπόνησης. Στοχεύοντας στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας, οι χαρπίνες έχουν αναδειχθεί ως ικανές για πρόκληση ανθεκτικότητας σε ένα ευρύ φάσμα παραγόντων καταπόνησης, συμβάλλοντας παράλληλα στην προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών. Στο πλαίσιο αυτό, η έκφραση του γονιδίου *hrpZ_{Psph}*, από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, έχει αποδειχθεί ότι επάγει ανθεκτικότητα έναντι του ιού της ριζομανίας των ζαχαροτεύλων αλλά και έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένων της ξηρασίας, υψηλής αλατότητας και τοξικότητας καδμίου. Με δεδομένο τον πολυδιάστατο ρόλο του *hrpZ_{Psph} in planta*, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η κατανόηση της μεταβολικής απόκρισης των *hrpZ_{Psph}*-σειρών στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας και ο εντοπισμός των μεταβολικών συστατικών με καίριο ρόλο στην επαγωγή ανθεκτικότητας. Για το σκοπό αυτό, επιλεγμένες *hrpZ_{Psph}*-σειρές και φυτά αγρίου τύπου (wt) υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας (100 και 200 mM NaCl) και ακολούθησε προσδιορισμός του GC/MS μεταβολικού τους προφίλ, με στόχο την εις βάθος μελέτη των μεταβολικών οδών προσαρμογής στην καταπόνηση. Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση συνολικά 131 μεταβολιτών, ενώ -έπειτα από φιλτράρισμα- έγινε επιλογή 74 μεταβολιτών, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε στατιστική επεξεργασία προκειμένου να αναδειχθούν τα συστατικά που εμφανίζουν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους. Η ανάλυση κατέδειξε την ύπαρξη 43 συστατικών που εμφάνισαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους σε επίπεδο γονοτύπου ή/και μεταχείρισης ή/και αλληλεπίδρασής τους (P-value < 0.05). Παράλληλα, η διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων συνέβαλε στην ανάδειξη των διαφορών στο μεταβολικό προφίλ μεταξύ των γονοτύπων και των μεταχειρίσεων, ενώ το κυκλικό διάγραμμα συσχέτισης μεταβλητών-κύριων συνιστωσών επέτρεψε τον εντοπισμό των μεταβολιτών με τη μεγαλύτερη συνεισφορά στη μεταβολική απόκριση των φυτών. Τέλος, κατασκευάστηκε χρωματικός χάρτης, ο οποίος συνέβαλε στο διαχωρισμό μεταξύ των γονοτύπων και στο μερικό διαχωρισμό των καταπονημένων φυτών και των μαρτύρων, χωρίς ωστόσο να γίνεται ευχερής διάκριση μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων καταπόνησης. Βάσει των συνολικών ευρημάτων, η διαφορική απόκριση των *hrpZ_{Psph}*-σειρών και των φυτών wt σηματοδοτείται από τα διακριτά προφίλ συσσώρευσης των συστατικών D- γαλακτόζη, L-προλίνη, D-σορβιτόλη, κιτρικό οξύ και μαλονικό οξύ. Τα ευρήματα της μελέτης συμβάλλουν περαιτέρω στην αποσαφήνιση της επίδρασης του *hrpZ_{Psph}* στη μεταβολική απόκριση των φυτών στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας, αναδεικνύοντας παράλληλα το διακριτό μεταβολικό περιεχόμενο της σειράς #1, που περιλαμβάνει μεταβολικές ρυθμίσεις που προάγουν την άμυνα έναντι της αλατότητας, η οποία έχει εξάλλου επαληθευτεί τόσο στη φάση της βλάστησης όσο και στο στάδιο των ώριμων φυτών.

Εισαγωγή

Η υψηλή αλατότητα αποτελεί μια από τις πιο σοβαρές αβιοτικές καταπονήσεις με δεδομένη την επικράτησή της σε παγκόσμια κλίμακα και τις επιπτώσεις που επιφέρει στην παραγωγικότητα των φυτών, ενώ εκτιμάται ότι η επιφάνεια των αλατούχων εδαφών πρόκειται να αυξηθεί στο άμεσο μέλλον. Τα αλατούχα εδάφη, που εμφανίζουν ηλεκτρική αγωγιμότητα στο διάλυμα κορεσμού στην περιοχή της ριζόσφαιρας που υπερβαίνει τα 4 dS m⁻¹ και έχουν παράλληλα 15 % ανταλλάξιμο νάτριο (Shrivastava and Kumar 2015), οφείλουν την ύπαρξή τους σε αυξημένη εξάτμιση νερού έναντι ατμοσφαιρικών κατακρημνίσεων, κακή αποστράγγιση εδαφών και χρήση κακής ποιότητας νερού για άρδευση (Mbarki et al. 2018). Η υψηλή αλατότητα προκαλεί στα φυτά οσμωτική καταπόνηση, τοξικότητα ιόντων Na⁺ και Cl⁻, ανισορροπία στην πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από το εδαφικό διάλυμα, καθώς και μη εύρυθμη λειτουργία του φωτοσυστήματος II (Netondo et al. 2004; Munns and Tester 2008; Zörb et al. 2019). Οι επιδράσεις της υψηλής αλατότητας, που είναι κατά το πλείστο ανάλογες της έντασης και διάρκειας της καταπόνησης, είναι εμφανείς σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια των φυτών και περιλαμβάνουν αλλαγές σε μορφολογικό, βιοχημικό και μεταβολικό επίπεδο.

Κατά την επικράτηση καταπόνησης υψηλής αλατότητας, η προσαρμογή των φυτών περιλαμβάνει μεταβολές στη συσσώρευση τόσο των πρωτογενών όσο και των δευτερογενών μεταβολιτών. Αναφορικά με τους πρωτογενείς μεταβολίτες, σημειώνονται μεταβολές στη συσσώρευση συστατικών που ανήκουν στις χημικές ομάδες των υδατανθράκων, αμινοξέων, πολυαμινών και οργανικών ενώσεων, όπως οι πολυόλες. Η αύξηση της συσσώρευσης υδατανθράκων συμβάλλει στη διατήρηση της σπαργής των κυττάρων και των φυσιολογικών λειτουργιών των φυτών, με κυριότερη αυτή της φωτοσύνθεσης (Arbona et al. 2013; Patel et al. 2020), ενώ η μεταβαλλόμενη συσσώρευση αμινοξέων συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα, μέσω μείωσης του οσμωτικού δυναμικού των κυττάρων, διατήρησης των φυσιολογικών λειτουργιών και του υδατικού δυναμικού των φυτών καθώς και του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης, συμβάλλοντας παράλληλα στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών (Patel et al. 2020; Riseh et al. 2021). Αντίστοιχα, στις πολυαμίνες έχει αποδοθεί ρόλος αλληλεπίδρασης με φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων, με σκοπό τη σταθεροποίησή τους υπό συνθήκες καταπόνησης, καθώς και ρύθμισης της συσσώρευσης ιόντων Na⁺ και Cl⁻ και της έκφρασης γονιδίων για τη σύνθεση οσμωλυτών (Mbarki et al. 2018; Riseh et al. 2021). Τέλος, οι πολυόλες εμφανίζουν διττό ρόλο στην επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι της αλατότητας, συμβάλλοντας στην οσμωτική προσαρμογή και στη διαχείριση του ενεργειακού δυναμικού των κυττάρων (Shen et al. 1999). Με βάση το ρόλο τους κατά την προσαρμογή υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, ένας αριθμός μεταβολικών συστατικών χαρακτηρίζονται ως βιοδείκτες που σχετίζονται με την προηγμένη άμυνα των φυτών.

Στους δευτερογενείς μεταβολίτες εντάσσονται συστατικά που ανήκουν στις ομάδες των φαινολικών ενώσεων, αλκαλοειδών, τερπενοειδών, καροτενοειδών και γλυκοσινολιτών και αποτελούν παράγωγα των πρωτογενών μεταβολιτών. Οι εν λόγω ενώσεις εμφανίζουν εξειδίκευση με βάση το φυτικό είδος, ενώ ο ρόλος του έγκειται στην άμυνα έναντι καταπονήσεων, μέσω της αντιοξειδωτικής δράσης τους και της προστασίας των φυσιολογικών λειτουργιών των φυτών (Jan et al. 2021). Κατά την επικράτηση

καταπόνησης υψηλής αλατότητας, οι δευτερογενείς μεταβολίτες συμβάλλουν στη μείωση των ενεργών μορφών οξυγόνου, στη διατήρηση της ακεραιότητας των μεμβρανών και στην ενίσχυση της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (Patel et al. 2020), με την αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να οφείλεται κυρίως στη χημική τους δομή (Michalak 2006; Sarri et al. 2021).

Με στόχο την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών υπογραμμίζει τις δυνατότητες αξιοποίησης γονιδίων μη φυτικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων αυτών που προέρχονται από μικροοργανισμούς. Στο πλαίσιο αυτό, πρόσφατες έρευνες ανέδειξαν ότι η ενδογενής έκφραση τελεστών, προερχόμενων από το μύκητα *Phytophthora sojae*, οδηγεί σε προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας, η οποία αποδίδεται σε ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων άμυνας, όπως αυτά που κωδικοποιούν πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης (HSPs), μεταφορείς κασετών σύνδεσης-ATP (ABC transporters), μεταβολικά ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (Cyt P450) και Receptor-like Kinases (RLKs) (Rajput et al. 2015; Zhang et al. 2015). Προς την ίδια κατεύθυνση, οι βακτηριακής προέλευσης χαρπίνες ή τα τμήματά αυτών, έχουν ερευνηθεί εκτενώς για το ρόλο τους στην επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων και στην παράλληλη προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης αλατότητας, λόγω της έκφρασης του γονιδίου *SSB_{Xoc}* από το βακτήριο *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, η οποία αποδίδεται σε μεταβολικές προσαρμογές που περιλαμβάνουν την αυξημένη συσσώρευση προλίνης και την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα (Cao et al. 2018). Αντίστοιχα, η υπερέκφραση του γονιδίου *SIERF5*, που ανήκει στα επαγόμενα από χαρπίνες γονίδια, οδήγησε σε ανθεκτικότητα έναντι υψηλής αλατότητας, συμβάλλοντας στην επαγωγή πληθώρας γονιδίων που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια άμυνας, αποτοξίνωσης, και φωσφορλίωσης πρωτεϊνών, υπογραμμίζοντας τη δράση του στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με τις αποκρίσεις στο ABA και στην άμυνα των φυτών (Chuang et al. 2010). Παράλληλα, η εξωγενής εφαρμογή χαρπινών οδήγησε στην επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν MAPK πρωτεΐνες (Desikan et al. 2001) και ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των μιτοχονδρίων και στη μεταφορά πρωτεϊνών, καθώς και γονιδίων που εμπλέκονται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (Livaja et al. 2008), συμβάλλοντας επίσης σε μεταβολικές προσαρμογές που άπτονται της συσσώρευσης φαινολικών ενώσεων και της ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτών (Rodrigo-García et al. 2019).

Στο ίδιο πλαίσιο, σχετικά είναι τα ευρήματα ότι η ενδογενής έκφραση του γονιδίου *hrpZ_{PspH}* από το βακτήριο *Pseudomonas sanastanoi* pv. *phaseolicola*, πέραν της θετικής επίδρασης ως προς την ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών καταπονήσεων (Pavli et al. 2011), επάγει βελτιωμένη απόκριση έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένων της ξηρασίας, υψηλής αλατότητας (Κεφάλαιο 2) και τοξικότητας καδμίου (Mitsopoulou et al. 2021). Με δεδομένη την προηγμένη άμυνα των *hrpZ_{PspH}*-φυτών του είδους *N. benthamiana* έναντι ενός ευρέος φάσματος παραγόντων καταπόνησης, ως στόχος τέθηκε η κατανόηση της μεταβολικής τους απόκρισης στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας και ο εντοπισμός των μεταβολικών συστατικών με καίριο ρόλο στην επαγωγή ανθεκτικότητας. Για την επίτευξη των ανωτέρω, έγινε προσδιορισμός του GC/MS μεταβολικού προφίλ των SP/*hrpZ_{PspH}*- και των φυτών αγρίου τύπου με στόχο την αποσαφήνιση της μεταβολικής τους προσαρμογής κατά την καταπόνηση αλατότητας.

Υλικά και Μέθοδοι

Γενετικό υλικό

Ως γενετικό υλικό αξιοποιήθηκαν διαγονιδιακές σειρές του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *hrpZ*, προερχόμενο από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121) (Pavli et al. 2011), στην εκκρινόμενη μορφή του ώστε να κατευθύνεται η έκφρασή του στον αποπλάστη των φυτών (Tampakaki and Panopoulos 2000).

Με στόχο την επιλογή και αξιοποίηση αποκλειστικά ομοζύγωτων *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του επιπέδου ζυγωτίας, με βάση την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό υδρομυκίνη, στις διαθέσιμες σειρές T₂ γενεάς. Για το σκοπό αυτό, έγινε επιφανειακή απολύμανση των σπόρων μέσω εμβάπτισης σε καθαρή αιθανόλη (1 min) και τοποθέτησή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium (Murashige and Skoog 1962) που περιείχε υδρομυκίνη (hyg: 25 µg/l). Ως ομοζύγωτες χαρακτηρίστηκαν οι σειρές που εμφάνισαν απουσία διάσπασης ως προς την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό, σημειώνοντας βλάστηση του συνόλου των σπόρων. Οι εν λόγω σειρές αξιολογήθηκαν περαιτέρω για την ένθεση και έκφραση του *hrpZ_{P_{sph}}*, μέσω αντιδράσεων PCR και RT-PCR αντίστοιχα, με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών για το διαγονίδιο (995 bp) (Pavli et al. 2011).

Ακολούθως, επιλέχθηκαν 5 *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-ομοζύγωτες σειρές (#1, #2, #6, #7, #9), οι οποίες αυτογονιμοποιήθηκαν προς παραγωγή σειρών T₃ γενεάς. Οι τελευταίες, υποβλήθηκαν σε καταπόνηση υψηλής αλατότητας και η απόκρισή τους μελετήθηκε στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών (Κεφάλαιο 2). Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες φυτά αγρίου τύπου (wild type plants-wt).

Πειραματικό σχέδιο

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της απόκρισης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας (Κεφάλαιο 2), επιλέχθηκαν 3 *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές (#1, #7, #9) με στόχο τον προσδιορισμό του μεταβολικού τους προφίλ, συγκριτικά με φυτά wt. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες φυτά όλων των κατηγοριών που αναπτύχθηκαν απουσία καταπόνησης.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το σχέδιο των τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων με 4 επαναλήψεις. Για τις αναλύσεις της μεταβολομικής, έγινε δειγματοληψία νεαρών φύλλων, που βρίσκονταν στο μεσαίο και άνω τμήμα 4 φυτών. Η συλλογή δειγμάτων από τα καταπονημένα φυτά και τους μάρτυρες έγινε ταυτόχρονα ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της συγκριτικής τους μελέτης. Ακολούθησε άμεση τοποθέτηση των δειγμάτων σε θάλαμο βαθείας κατάψυξης (-80 °C) έως ότου γίνει η απομόνωση των μεταβολιτών.

Απομόνωση μεταβολιτών

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε λειοτρίβηση των δειγμάτων φυλλικού ιστού με υγρό άζωτο και 50 mg κορνιοποιημένου ιστού μεταφέρθηκαν σε Eppendorf όπου έγινε προσθήκη 400 µl mastermix, που περιείχε 395 µl μεθανόλης και 5 µl ριβιτόλης. Έπειτα από ανάμειξη σε

vortex, έγινε τοποθέτηση των δειγμάτων σε μηχανικό αναδευτήρα στους 70 °C για 15 min. Μετά την προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου, έγινε ανακίνηση των δειγμάτων και τοποθέτηση τους σε μηχανικό αναδευτήρα στους 37 °C για 5 min. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 400 μl mQH₂O, εκ νέου ανάμειξη και φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 5 min, για την απομάκρυνση τυχόν φυτικών θραυσμάτων. Ακολούθησε μεταφορά 100 ml του υπερκειμένου σε νέο erpendorf και εξάτμιση με αέριο άζωτο.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε παραγωγοποίηση των δειγμάτων με στόχο την αύξηση της πτητικότητας των μεταβολιτών. Για το σκοπό αυτό, έγινε επαναδιάλυση σε 25 μl διαλύματος μεθοξυαμίνης (MOX), επώαση σε υδατόλουτρο στους 30 °C για 90 min και φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 30 sec. Έπειτα από προσθήκη 75 μl N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA), έγινε εκ νέου επώαση σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 30 min και φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 2 min. Ακολούθως, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε γυάλινα φιαλίδια για την ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας Agilent 7890A/5975C GC-MS system (Agilent, Waldbronn, Germany). Οι ανωτέρω διαδικασίες απομόνωσης και παραγωγοποίησης των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του ΓΠΑ.

Στατιστική ανάλυση

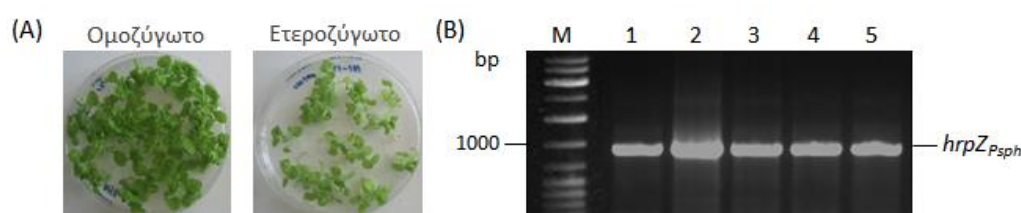
Η ταυτοποίηση των ανιχνευθέντων μεταβολιτών έγινε με τη χρήση του λογισμικού AMDIS (Stein 1999), το οποίο διαθέτει βιβλιοθήκες φασμάτων και δεικτών δέσμευσης για μεταβολίτες που απαντώνται στους φυτικούς οργανισμούς (Feihl metabolome database). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν μέσω του λόγου της περιοχής του μεταβολίτη στόχου προς την περιοχή του μεταβολίτη αναφοράς (ribitol, m/z 217) και παρουσιάζονται σε σχέση με το νωπό βάρος του εκάστοτε δείγματος.

Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε μέσω του λογισμικού R version 4.0.0 (R Core Team 2020, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Το σετ των πρωτογενών δεδομένων αρχικά υποβλήθηκε σε φιλτράρισμα, με στόχο την απάλειψη των συστατικών που δεν πληρούν το κριτήριο των μη-μηδενικών τιμών (< 80 %) και ακολούθησε μονο-μεταβλητή ανάλυση, μέσω ανάλυσης διακύμανσης σε μοντέλο με κύριους παράγοντες τη σειρά, τη μεταχείριση και την αλληλεπίδραση των κύριων παραγόντων χωριστά. Ακολούθως, έγινε προσαρμογή των τιμών-P για την ορθή ρύθμιση του σφάλματος τύπου I, εξαιτίας πολλαπλών ελέγχων υποθέσεων (Benjamini and Hochberg 1995), και επιλογή των μεταβολιτών με αναμενόμενο ποσοστό σφαλμάτων τύπου I (FDR) προσαρμοσμένη τιμή-P < 0.05. Στη συνέχεια, έγινε πολυμεταβλητή ανάλυση, με τη χρήση του πακέτου “mixOmics” (Lê Cao et al. 2016), που περιλάμβανε διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), ανάλυση συστάδων και δημιουργία γραφημάτων. Τέλος, κατασκευάστηκε μεταβολικός χάρτης (heat map) για χαρακτηριστικές ζώνες διάκρισης των δειγμάτων, όπου χρησιμοποιήθηκε η διάμεσος των 4 βιολογικών επαναλήψεων ανά κατηγορία μεταβλητής.

Αποτελέσματα

Επιλογή των ομοζύγων *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών

Ο έλεγχος της ζυγωτίας ως προς το διαγονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* στους απόγονους αυτογονιμοποίησης (T₂) βασίστηκε στις αναλογίες διάσπασης του γονιδίου που ελέγχει την ανθεκτικότητα στην υδρομυκίνη. Ως ομοζύγωτες χαρακτηρίστηκαν οι διαγονιδιακές σειρές που εμφάνισαν βλάστηση του συνόλου των σπόρων, ενώ ως ετεροζύγωτες χαρακτηρίστηκαν αυτές που εμφάνισαν αναλογία διάσπασης 3:1 (Εικόνα 1Α). Στις επιλεγμένες ομοζύγωτες σειρές επιβεβαιώθηκε περαιτέρω η ένθεση και έκφραση του *hrpZ_{P_{sph}}* μέσω αντιδράσεων PCR και RT-PCR, οι οποίες οδήγησαν στην ενίσχυση προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους (995 bp) (Εικόνα 1Β).

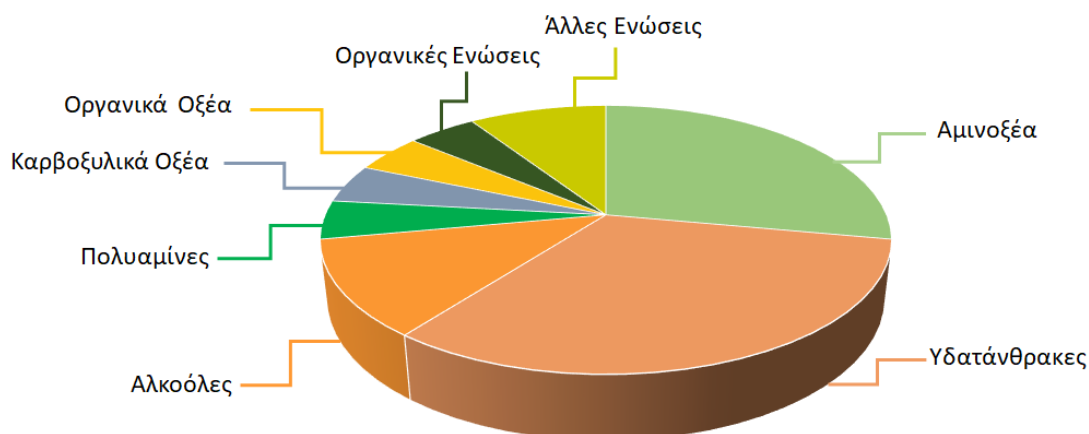


Εικόνα 1. Επιλογή των *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών. (Α) Προσδιορισμός της ζυγωτίας βάσει των αναλογιών διάσπασης του γονιδίου ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη, υπό συνθήκες πίεσης επιλογής (25 µg/ml), (Β) Προϊόντα PCR σε γονιδιωματικό DNA των φυτών του είδους *N. benthamiana*. M: Μάρτυρας σε bp (100 bp DNA Ladder, NEB). 1-5: Διαγονιδιακά φυτά που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* (995 bp).

Μεταβολομική ανάλυση

Η μελέτη της απόκρισης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας (Κεφάλαιο 2), οδήγησε στην επιλογή 3 σειρών T₃ γενεάς (#1, #7, #9) προς περαιτέρω αξιολόγηση της απόκρισής τους σε μεταβολικό επίπεδο. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες φυτά wt καθώς και φυτά όλων των κατηγοριών που αναπτύχθηκαν απουσία καταπόνησης.

Η GC/MS ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση συνολικά 131 μεταβολιτών που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες, ενώ -έπειτα από φιλτράρισμα- έγινε επιλογή 74 μεταβολιτών, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε στατιστική επεξεργασία προκειμένου να αναδειχθούν τα συστατικά που εμφανίζουν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους με βάση το κριτήριο P-value < 0.05. Η ανάλυση κατέδειξε την ύπαρξη 43 συστατικών που εμφάνισαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους σε επίπεδο γονοτύπου ή/και μεταχείρισης ή/και αλληλεπίδρασής τους (P-value < 0.05). Σύμφωνα με τα ευρήματα, τα συστατικά που μεταβλήθηκαν σημαντικά, ανήκουν κατά 32,56 % στη χημική ομάδα των υδατανθράκων, 27,91 % στην ομάδα των αμινοξέων, 11,63 % στην ομάδα των αλκοολών, από 4,65 % στις ομάδες των πολυαμινών, των καρβοξυλικών οξέων, των οργανικών οξέων, των οργανικών ενώσεων και κατά 9,3 % σε άλλες χημικές ομάδες (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Κατανομή των μεταβολιτών που εμφάνισαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους σε επίπεδο γονοτύπου ή/και μεταχείρισης ή/και αλληλεπίδρασής τους ($P\text{-value} < 0.05$), με βάση τη χημική τους ομάδα..

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι μεταβολίτες των οποίων η συσσώρευση εμφάνισε στατιστικά σημαντική μεταβολή, με βάση τη χημική ομάδα όπου ανήκουν.

Υδατάνθρακες

Στη χημική ομάδα των υδατανθράκων, η ανάλυση ανέδειξε δεκατρείς (13) μεταβολίτες που παρουσίασαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους, εκ των οποίων οι 2 διέφεραν μόνο σε επίπεδο γονοτύπου, οι 10 μόνο σε επίπεδο μεταχείρισης και 1 εμφάνισε σημαντική μεταβολή σε επίπεδο γονοτύπου, μεταχείρισης και αλληλεπίδρασής τους. Ειδικότερα, η συσσώρευση των συστατικών D-γαλακτόζη και σουκρόζη διέφερε σε επίπεδο γονοτύπου, με την πρώτη να παρουσιάζει μηδενική συσσώρευση στους μάρτυρες και στα καταπονημένα φυτά της σειράς #1, ενώ ανιχνεύτηκε αποκλειστικά στα καταπονημένα φυτά wt και σε αυτά της σειράς #7. Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο το προφίλ συσσώρευσης στη σειρά #9, όπου σημειώθηκε θεαματική αύξηση της D-γαλακτόζης ($> 129x$ και $> 78x$ στα 100 και 200 mM NaCl, αντίστοιχα) (Πίνακας 1). Αναφορικά με τη σουκρόζη, είναι ενδιαφέρον ότι το σύνολο των *hprZ_{P_{sph}}*-σειρών εμφάνισε αύξηση υπό συνθήκες καταπόνησης, ενώ τα φυτά wt παρουσίασαν αντίθετο προφίλ. Ένα σημαντικό μέρος των υδατανθράκων που παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε επίπεδο μεταχείρισης, συμπεριλαμβανομένων των D-μαννόζη-2, ταγκατόζη-2, D-αλλόζη-1, φρουκτόζη-1, μαλτόζη-2, γλυκονικό οξύ και μέθυλ-B-γαλακτοπυρανοσίδη, εμφάνισε μειωμένη ή μηδενική συσσώρευση στο σύνολο των κατηγοριών φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης. Επιπλέον, για το μεταβολίτη D-μαννόζη-1 σημειώθηκε είτε μειωμένη είτε μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά όλων των κατηγοριών, με εξαίρεση αυτά της σειράς #7 όπου η D-μαννόζη-1 ανιχνεύτηκε αποκλειστικά υπό συνθήκες καταπόνησης. Αντίστοιχα, η D-γλυκόζη-2 εμφάνισε είτε μειωμένη είτε μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά όλων των κατηγοριών, με εξαίρεση αυτά της σειράς #1 όπου ανιχνεύτηκε αποκλειστικά υπό συνθήκες καταπόνησης. Είναι ενδιαφέρον ότι ως προς τη D-λυξόζη-1, παρατηρήθηκε διαφορετικό προφίλ συσσώρευσης μεταξύ των φυτών wt και των *hprZ_{P_{sph}}*-σειρών, με τα πρώτα να εμφανίζουν μηδενική συσσώρευση στους μάρτυρες

και τα δεύτερα, στο πλείστο των περιπτώσεων, μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά. Τέλος, η σοφορόζη σημείωσε σημαντική μεταβολή σε επίπεδο γονοτύπου, μεταχείρισης και αλληλεπίδρασής τους, σημειώνοντας μηδενική συσσώρευση στο σύνολο των καταπονημένων φυτών και υψηλή συσσώρευση στους μάρτυρες της σειράς #9 (Πίνακας 1, Παράρτημα IV).

Αμινοξέα

Στην ομάδα των αμινοξέων, προσδιορίστηκαν δώδεκα (12) συστατικά που εμφάνισαν σημαντικά διαφοροποιημένη συσσώρευση, με τις διαφορές να εντοπίζονται σε επίπεδο γονοτύπου ή/και σε επίπεδο μεταχείρισης. Σχετικά με την L-προλίνη, καταγράφηκε διαφορετικό προφίλ συσσώρευσης μεταξύ των φυτών wt και των *hrrZ_{Psph}*-σειρών, με τα πρώτα να εμφανίζουν μείωση και τα τελευταία αύξηση υπό συνθήκες καταπόνησης. Είναι δε ενδιαφέρον ότι στα φυτά της σειράς #9 η L-προλίνη ανιχνεύτηκε αποκλειστικά υπό συνθήκες καταπόνησης, υπογραμμίζοντας τη διαφορική απόκριση των γονοτύπων στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας. Περαιτέρω, η σειρά #9 εμφάνισε διαφορετικό προφίλ ως προς τη συσσώρευση β-αλανίνης, σημειώνοντας μείωση και στα δύο επίπεδα καταπόνησης σε αντίθεση με τις υπόλοιπες κατηγορίες φυτών όπου παρατηρήθηκε σχετική αύξηση. Ως προς τη νορβαλίνη, οι γονότυποι εμφάνισαν διαφορετικό μοτίβο, με τα φυτά wt και αυτά της σειράς #1 να εμφανίζουν κατά βάση αύξηση υπό συνθήκες καταπόνησης και αυτά των σειρών #7 και #9 μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά και στους μάρτυρες αντίστοιχα. Επιπλέον, η L-αλανίνη παρουσίασε είτε μειωμένη είτε μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά όλων των κατηγοριών, με εξαίρεση τα φυτά wt όπου σημειώθηκε αύξηση στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης (200 mM NaCl). Περαιτέρω, σημειώθηκαν διαφορές και ως προς τη συσσώρευση DL-ισολευκίνης, με το προφίλ των γονοτύπων να διαφοροποιείται ανάλογα με το επίπεδο καταπόνησης. Στα 100 mM NaCl, το σύνολο των *hrrZ_{Psph}*-σειρών εμφάνισε αυξημένη συσσώρευση DL-ισολευκίνης, ενώ τα φυτά wt παρουσίασαν αντίθετο προφίλ. Στα 200 mM NaCl, παρατηρήθηκε μείωση υπό συνθήκες καταπόνησης, με εξαίρεση τη σειρά #9 όπου σημειώθηκε σχετική αύξηση. Ως προς τα συστατικά L-άνυδρο γλουταμικό οξύ, L-βαλίνη και L-θρεονίνη, το σύνολο των γονοτύπων εμφάνισε μειωμένη συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης, με εξαίρεση τα φυτά της σειράς #1 όπου παρατηρήθηκε αύξηση στα αντίστοιχα καταπονημένα φυτά. Σχετικά με το 4 γουανιδινοβουτυρικό οξύ, σημειώθηκε μείωση της συσσώρευσης υπό συνθήκες καταπόνησης, με εξαίρεση τις σειρές #1 και #7 που παρουσίασαν ελαφρώς αυξημένη συσσώρευση στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης. Αναφορικά με την L-σερίνη, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των γονοτύπων, με διαφορετικές τάσεις στα δύο επίπεδα καταπόνησης, με εξαίρεση τη σειρά #7 που εμφάνισε σταθερά αυξημένη συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης. Είναι ενδιαφέρον ότι το ασπαρτικό οξύ ανιχνεύτηκε αποκλειστικά στα καταπονημένα φυτά wt και σε αυτά της σειράς #9 και στους μάρτυρες της σειράς #7, σημειώνοντας παράλληλα αύξηση και μείωση στα φυτά της σειράς #1 στα 100 και 200 mM NaCl, αντίστοιχα. Τέλος, η L-γλουταμίνη εμφάνισε μειωμένη ή μηδενική συσσώρευση στο σύνολο των καταπονημένων φυτών, με εξαίρεση τα φυτά της σειράς #1 όπου καταγράφηκε αύξηση στα 100 mM NaCl (Πίνακας 1, Παράρτημα IV).

Πολυόλες

Στην ομάδα των πολυολών, προσδιορίστηκαν πέντε (5) συστατικά που εμφάνισαν σημαντικά διαφοροποιημένη συσσώρευση μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων ή/και μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Ειδικότερα, τα συστατικά D-σορβιτόλη, DL διυδροξυφαινυλ-γλυκόλη και αραβιτόλη εμφάνισαν διαφορές σε επίπεδο γονοτύπου, με την τελευταία να διαφέρει και σε επίπεδο μεταχείρισης. Η D-σορβιτόλη εμφάνισε σταθερό προφίλ μειωμένης συσσώρευσης στα καταπονημένα φυτά wt, ενώ οι *hrpZ_{Psph}*-σειρές διέφεραν ως προς την απόκρισή τους στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης. Συγκεκριμένα, η σειρά #1 εμφάνισε μείωση και δραστική αύξηση (> 14x) της συσσώρευσής της στα 100 και 200 mM NaCl αντίστοιχα, η σειρά #7 εμφάνισε αντίθετο προφίλ στα δύο επίπεδα καταπόνησης και, τέλος, η σειρά #9 εμφάνισε σταθερά αυξημένη συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης. Σχετικά με τη DL διυδροξυφαινυλ-γλυκόλη, σημειώθηκε είτε μειωμένη είτε μηδενική συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης, με εξαίρεση τα φυτά wt και αυτά της σειράς #7 που παρουσίασαν αύξηση στα 100 και 200 mM NaCl αντίστοιχα. Τέλος, η D-μαννιτόλη, και η D-θρειτόλη παρουσίασαν μειωμένη συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά όλων των κατηγοριών, με εξαίρεση την τελευταία που εμφάνισε αυξημένη συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά της σειράς #7 (Πίνακας 1, Παράρτημα IV).

Πολυαμίνες

Στη χημική ομάδα των πολυαμινών, εντοπίστηκαν δύο (2) συστατικά, τα οποία εμφάνισαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους. Συγκεκριμένα, η φαινυλαιθυλαμίνη παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε επίπεδο γονοτύπου και μεταχείρισης, ενώ η τυραμίνη εμφάνισε διαφορές σε επίπεδο μεταχείρισης. Τόσο η φαινυλαιθυλαμίνη όσο και η τυραμίνη σημείωσαν μείωση υπό συνθήκες καταπόνησης στο σύνολο των υπό μελέτη γονοτύπων, με την τελευταία ωστόσο να εμφανίζει μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά των σειρών #7 και #9 στα 100 και 200 mM NaCl αντίστοιχα (Πίνακας 1).

Καρβοξυλικά Οξέα

Στην ομάδα των καρβοξυλικών οξέων, σημαντική μεταβολή παρατηρήθηκε στη συσσώρευση των συστατικών κιτρικό οξύ και μεθυλμαλονικό οξύ, με τις διαφορές να εντοπίζονται σε επίπεδο μεταχείρισης. Σχετικά με το κιτρικό οξύ, παρά το γεγονός ότι το σύνολο των φυτών εμφάνισαν αυξημένη συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης, είναι αξιοσημείωτη η δραστική αύξηση της σειράς #1 και στα δύο επίπεδα καταπόνησης (> 81x και > 101x στα 100 και 200 mM NaCl, αντίστοιχα). Αντίθετα, το μεθυλμαλονικό οξύ σημείωσε μειωμένη ή μηδενική συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης σε όλους τους γονοτύπους (Πίνακας 1, Παράρτημα IV).

Οργανικά Οξέα

Στη χημική ομάδα των οργανικών οξέων, η ανάλυση ανέδειξε σημαντικές διαφορές σε επίπεδο γονοτύπου ή/και μεταχείρισης για τα συστατικά, μαλονικό οξύ, λακτοβιονικό οξύ και γλυκερικό οξύ. Ως προς το μαλονικό οξύ, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ

των γονοτύπων, με τα καταπονημένα φυτά wt να εμφανίζουν μειωμένη συσσώρευση, αυτά της σειράς #1 αυξημένη συσσώρευση και αυτά των σειρών #7 και #9 μηδενική συσσώρευση. Αντίθετα, το λακτοβιονικό οξύ, που εμφάνισε διαφορές σε επίπεδο μεταχείρισης, σημείωσε μειωμένη συγκέντρωση στο σύνολο των γονοτύπων, με εξαίρεση τη σειρά #9 που παρουσίασε μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά. Τέλος, το γλυκερικό οξύ εμφάνισε προφίλ αυξημένης συσσώρευσης στο σύνολο των καταπονημένων φυτών, με εξαίρεση τα φυτά των σειρών #1 και #9 που παρουσίασαν μειωμένη συσσώρευση στα 100 mM NaCl (Πίνακας 1).

Οργανικές Ενώσεις

Στις οργανικές ενώσεις εντοπίστηκαν δύο (2) μεταβολικά συστατικά που εμφάνισαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους σε επίπεδο μεταχείρισης. Ειδικότερα, το διυδροασκορβικό οξύ 2 παρουσίασε μείωση της συσσώρευσης υπό συνθήκες καταπόνησης στο σύνολο των υπό μελέτη γονοτύπων, ενώ το διυδροασκορβικό οξύ 4 εμφάνισε μηδενική συσσώρευση στους μάρτυρες των φυτών wt και της σειράς #9 και αντίθετο μοτίβο μειωμένης ή μηδενικής συσσώρευσης στα καταπονημένα φυτά των σειρών #1 και #7 (Πίνακας 1, Παράρτημα IV).

Άλλες Ενώσεις

Επιπρόσθετα, ανιχνεύθηκαν τα συστατικά πουτρεσκίνη (αζωτούχα ένωση), ουρία (ανόργανη ένωση) και νορνικοτίνη (αλκαλοειδές), για τα οποία σημειώθηκαν διαφορές στη συσσώρευση σε επίπεδο μεταχείρισης, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν διαφορές μεταξύ των υπό μελέτη γονοτύπων. Τέλος, η αδενοσίνη (νουκλεϊκό οξύ) εμφάνισε μειωμένη ή μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά των *hrpZ_{Psph}*-σειρών και αντίθετο προφίλ αυξημένης συσσώρευσης στα καταπονημένα φυτά wt (Παράρτημα IV).

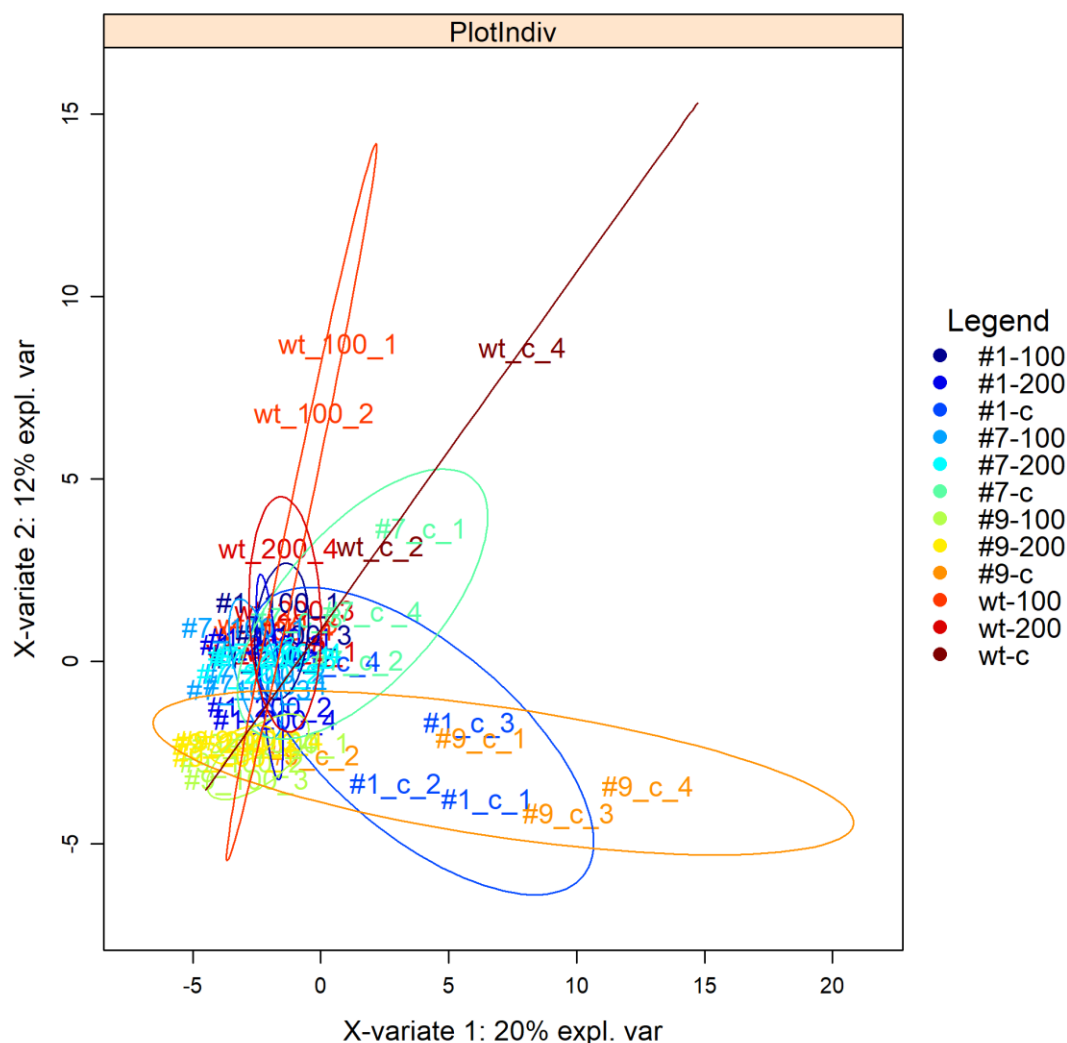
Προκειμένου να προσδιοριστούν οι τάσεις μεταξύ των υπό μελέτη γονοτύπων (*hrpZ_{Psph}*-σειρές και φυτά wt) και των μεταχειρίσεων (0, 100 και 200 mM NaCl) εφαρμόστηκε PLS-DA. Η ανάλυση ανέδειξε ορισμένες διαφορές στο μεταβολικό προφίλ των *hrpZ_{Psph}*-σειρών και των φυτών wt και, σε ορισμένες περιπτώσεις, μεταξύ των καταπονημένων φυτών και των μαρτύρων, χωρίς όμως να γίνεται διάκριση μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων καταπόνησης (100 και 200 mM NaCl). Το συστατικό 1, που εξηγεί το 20 % της παραλλακτικότητας, επέτρεψε το διαχωρισμό των σειρών #1 και #9 που αναπτύχθηκαν απουσία καταπόνησης αλατότητας, χωρίς ωστόσο να γίνεται διάκριση μεταξύ των υπόλοιπων γονοτύπων και μεταχειρίσεων. Αντίστοιχα, το συστατικό 2, που εξηγεί το 12 % της παραλλακτικότητας, επέτρεψε το μερικό διαχωρισμό των φυτών wt που αναπτύχθηκαν είτε απουσία καταπόνησης είτε στα 100 mM NaCl (Εικόνα 3). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάλυση επέτρεψε το μερικό διαχωρισμό των μεταβολικών προφίλ των μαρτύρων που ανήκουν στα φυτά wt και στις διαφορετικές *hrpZ_{Psph}*-σειρές, παρέχοντας σημαντικές ενδείξεις αφενός μεν για την επίδραση της έκφρασης του *hrpZ_{Psph}* στο μεταβολισμό των φυτών του είδους *N. benthamiana* και αφετέρου για το διαφορετικό προφίλ των *hrpZ_{Psph}*-σειρών, που αποδίδεται στο γεγονός ότι συνιστούν απογόνους που προέρχονται από διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού (Εικόνα 3).

Πίνακας 1. Μεταβολίτες που παρουσίασαν σημαντική μεταβολή σε επίπεδο γονοτύπου ή/και μεταχείρισης ή/και αλληλεπίδρασή τους. Για κάθε μεταβολίτη, παρουσιάζεται ο χρόνος έκλουσης (RT), η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) καθώς και η σχετική αναλογία των καταπονημένων φυτών προς τους μάρτυρες για τις *hprZ_{P_{sph}}*-σειρές και τα φυτά wt. Η αναλογία υπολογίστηκε με βάση το μέσο όρο των 4 επαναλήψεων των καταπονημένων φυτών προς το μέσο όρο των 4 επαναλήψεων των μαρτύρων. Με έντονη γραφή σημειώνονται οι μεταβολίτες που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (P-value < 0.05) σε επίπεδο γονοτύπου (G), μεταχείρισης (T) και αλληλεπίδρασής τους (G x T).

Μεταβολίτες	Σχετική αναλογία 100 mM/μάρτυρες						Σχετική αναλογία 200 mM/μάρτυρες						G	T	GxT
	RT	m/z	wt	#1	#7	#9	wt	#1	#7	#9					
Υδατάνθρακες															
D- γαλακτόζη	30,8246	319	# ¹	- ³	#	129,124	#	-	#	78,6252	0,00228	0,067984	0,21545		
σουκρόζη	39,5745	361	0,591324	1,011194	1,975863	2,36490	0,50966	2,060168	1,375259	1,49463	0,00228	0,201072	0,40947		
D-μαννόζη-2	27,1463	205	0,25981	0,02172	0,033317	0,000	0,099389	0,017454	0,027153	0,01654	0,47855	0,00233	0,78926		
ταγκατόζη-2	26,5986	217	0,000 ²	0,004329	0,046407	0,000	0,000	0,006041	0,000	0,37868	0,50068	0,02830	0,21545		
D-αλλόζη-1	30,8491	319	0,326373	0,257784	0,235897	0,26916	0,410028	0,188105	0,199983	0,12572	0,50068	4,48E-05	0,89730		
φρουκτόζη-1	26,3157	307	0,118942	0,042146	0,078601	0,28085	0,061977	0,022675	0,059089	0,09581	0,76001	0,016734	0,89254		
μαλτόζη-2	41,526	361	0,06187	0,036769	0,284353	0,000	0,000	0,083663	0,306577	0,86737	0,11616	0,044845	0,84736		
γλυκονικό οξύ	25,6881	319	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,4762	0,225907	0,03390	0,26315	0,004277	0,49959		
μέθυλ-B-γαλακτοπυρανοσίδη	28,4014	204	0,086474	0,744513	0,291773	0,18738	0,004347	0,209769	0,541857	0,000	0,26416	0,017735	0,11066		
D-μαννόζη-1	25,777	319	0,023261	0,060239	#	0,000	0,0278	0,030577	#	0,00934	0,24174	0,04702	0,33438		
D-γλυκόζη-2	27,1328	205	0,000	#	0,000	0,000	0,018095	#	0,064084	0,10513	0,50068	0,038663	0,49097		
D-λυξόζη-1	21,7698	217	#	0,054942	0,000	0,000	#	0,000	0,000	0,000	0,40754	0,000933	0,67070		
σοφορόζη	41,7169	319	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,02113	0,000933	0,03784		
Αμινοξέα															
L-προλίνη	9,2134	70	0,819806	2,183429	12,28925	#	0,30572	5,896977	6,098291	#	0,01401	0,626335	0,72309		
β-αλανίνη	15,7764	248	1,601464	2,928816	1,140858	0,827784	1,030404	1,660909	0,83674	0,626276	0,00228	0,51652	0,94706		
νορβαλίνη	7,1448	72	1,41484	1,7263	0,000	#	0,322823	1,17125	0,000	#	0,01401	0,395976	0,70966		
L-αλανίνη	14,038	147	0,833973	0,120959	0,284535	0,000	2,730971	0,31504	0,66614	0,000	0,01354	0,095098	0,33438		
DL-ισολευκίνη	9,27725	86	0,71156	1,875944	5,525179	3,08521	0,346232	0,889928	0,608167	2,478024	0,00889	0,431658	0,77813		
L- άνδρο γλουταμικό οξύ	18,060	156	0,596144	1,177039	0,466099	0,155331	0,192697	1,686474	0,615178	0,212881	0,02113	0,135542	0,40947		
L-βαλίνη	10,3984	144	0,851645	1,741738	0,222981	0,118535	0,660512	0,668918	0,437574	0,100932	0,03614	0,238045	0,84736		
L-θρεονίνη	14,957	218	0,413202	1,887301	0,457476	0,123674	0,326797	1,259433	0,545122	0,1346	0,03063	0,056601	0,60769		
4 γουανι-δινοβου-τυρικό οξύ	18,326	174	0,725834	0,832461	0,909355	0,787372	0,655386	1,423753	1,06723	0,971089	0,02175	0,732262	0,97866		
L-σερίνη	11,4327	132	1,902432	0,959446	3,825779	0,722411	0,992794	1,194016	1,985012	3,781007	0,00088	0,554258	0,75427		

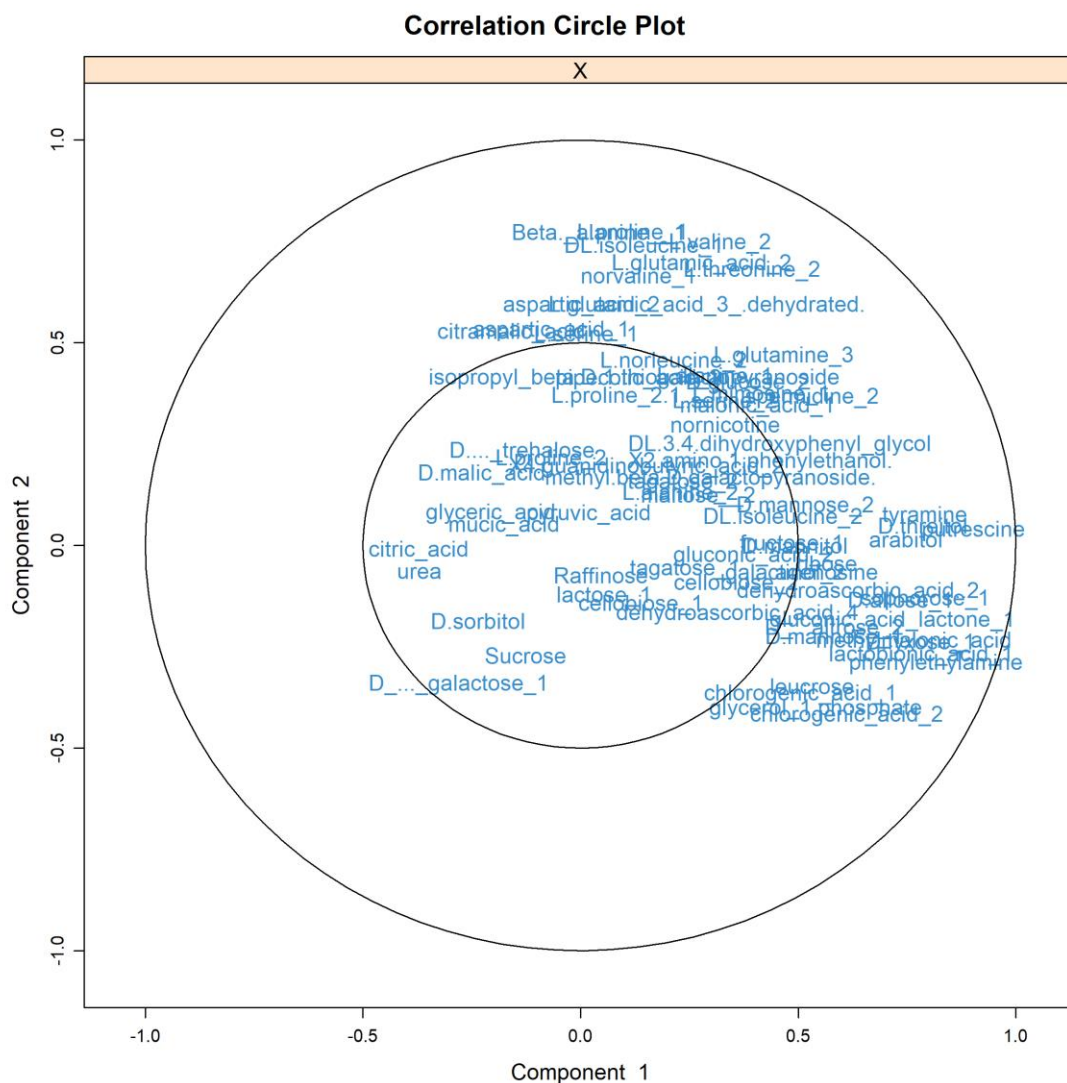
ασπαρτικό οξύ	15,653	160	#	2,646862	0,000	#	#	0,36666	0,000	#	0,03264	0,049738	0,33438
L-γλουταμίνη	23,8331	156	0,104487	2,22835	0,000	0,000	0,003555	0,613582	0,000	0,000	0,24407	0,017735	0,15804
Πολυόλες													
D-σορβιτόλη	27,3962	319	0,033685	0,226693	1,60508	9,397051	0,002912	14,37672	0,692375	7,046083	0,01401	0,509781	0,11752
DL διυδροξυφαινυλ-γλυκόλη	43,8742	355	1,618674	0,000	0,000	0,213663	0,958859	0,000	1,315268	0,188551	0,0407	0,238045	0,69790
D-θρεϊτόλη	18,1389	217	0,376359	0,353027	1,422739	0,351675	0,274459	0,452373	1,160207	0,337572	0,26254	0,010034	0,43550
D-μαννιτόλη	26,7855	319	0,15608	0,045338	0,052041	0,001902	0,107825	0,007638	0,047754	0,008409	0,59445	0,024548	0,87166
αραβιτόλη	22,5239	217	0,427068	0,389643	0,913856	0,440764	0,527848	0,553516	0,933655	0,361354	0,05440	0,001836	0,49097
Πολυαμίνες													
φαινυλεθυλαμίνη	18,9286	174	0,418517	0,262853	0,301846	0,159832	0,108208	0,229757	0,190351	0,101382	0,00643	5,68E-05	0,11066
τυραμίνη	26,5016	174	0,391889	0,266959	0,000	0,281551	0,15562	0,049692	0,12004	0,000	0,43553	5,68E-05	0,92364
Καρβοξυλικά Οξέα													
κιτρικό οξύ	25,0089	347	6,163671	81,95778	3,467623	2,045942	10,19196	101,1198	1,89393	22,09263	0,18203	0,005686	0,40947
μεθυλμαλονικό οξύ	10,0785	147	0,000	0,122107	0,953372	0,02114	0,066241	0,000	0,395573	0,218102	0,16914	0,005686	0,49019
Οργανικά Οξέα													
μαλονικό οξύ	10,0681	147	0,744384	3,872561	0,000	0,000	0,286262	1,228541	0,000	0,000	0,02175	0,074333	0,21545
λακτοβιονικό οξύ	34,5859	217	0,13813	0,192598	0,213252	0,000	0,056904	0,159072	0,101113	0,000	0,20766	0,001412	0,6077
γλυκερικό οξύ	13,5170	189	3,6828853	0,580838	2,112968	0,69626	2,194388	3,112859	1,076138	1,51934	0,01354	0,36287	0,69765
Οργανικές Ενώσεις													
διυδροασκορβικό οξύ 2	25,4993	173	0,411441	0,19808	0,442221	0,283921	0,300991	0,334026	0,300384	0,278072	0,27410	0,000933	0,92364
διυδροασκορβικό οξύ 4	27,3638	244	#	0,000	0,122124	#	#	0,000	0,000	#	0,26364	0,044845	0,40947

¹: Μηδενική συσσώρευση στους μάρτυρες, ²: Μηδενική συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά, ³: Μηδενική συσσώρευση στους μάρτυρες και τα καταπονημένα φυτά.



Εικόνα 3. PLS-DA score plot για το διαχωρισμό των GC/MS μεταβολικών προφίλ των φύλλων που προέρχονται από τους μάρτυρες και τα καταπονημένα φυτά των *hrpZ_{PspH}*-σειρών και των φυτών wt. c: Φυτά μάρτυρες, 100: Φυτά που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας (100 mM NaCl), 200: Φυτά που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας (200 mM NaCl).

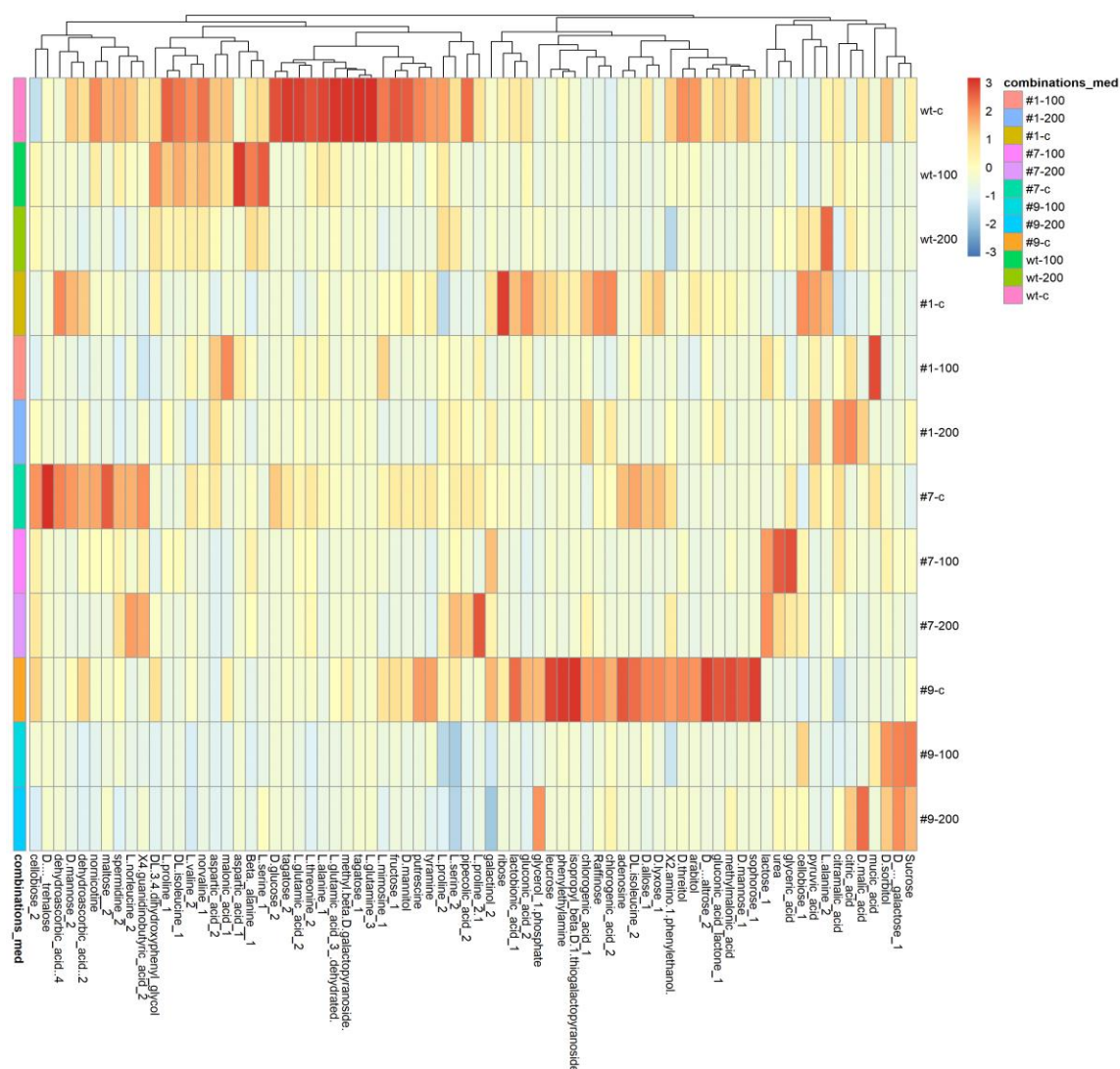
Με στόχο την εύρεση των συστατικών που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη συνεισφορά στο διαχωρισμό των μεταβολικών προφίλ των καταπονημένων φυτών και των μαρτύρων, κατασκευάστηκε διάγραμμα συσχέτισης μεταβλητών-κύριων συνιστωσών (Εικόνα 4). Ως προς το συστατικό 1 παρατηρήθηκε ισχυρή συσχέτιση των παρακάτω συστατικών: φαινυλαιθυλαμίνη, πουτεσκίνη, λακτοβιονικό οξύ, λευκρόζη, D-θρεϊτόλη, D-μαννόζη, D-μαννιτόλη, D-αλλόζη, σοφορόζη, μεθυλμαλονικό οξύ, τυραμίνη, αδενοσίνη, χλωρογενικό οξύ, D-λυξόζη, γλυκονικό οξύ, φρουκτόζη, διυδροασκορβικό οξύ, αραβιτόλη και ριβόζη. Αντίστοιχα, ως προς το συστατικό 2 καταγράφηκε ισχυρή συσχέτιση για τους μεταβολίτες: L-προλίνη, β-αλανίνη, γλουταμικό οξύ, L-γλουταμίνη, L-σερίνη, ασπαρτικό οξύ, L-βαλίνη, L-θρεονίνη, νορβαλίνη, DL-ισολευκίνη, D-γαλακτόζη και ασπαρτικό οξύ (Παράρτημα IV).



Εικόνα 4. Κυκλικό διάγραμμα συσχέτισης μεταβλητών-κυρίων συνιστωσών για τον εντοπισμό των μεταβολιτών με τη μεγαλύτερη συνεισφορά στο διαχωρισμό των μεταβολικών προφίλ των καταπονημένων φυτών και των μαρτύρων που προέρχονται από τις *hrpZ_{PspH}*-σειρές και τα φυτά wt.

Τέλος, κατασκευάστηκε χρωματικός χάρτης (heat map), με βάση τη διάμεσο των 4 βιολογικών επαναλήψεων ανά κατηγορία μεταβλητής, προκειμένου να προσδιοριστούν οι σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών μεταβλητών. Έπειτα από τη σχετική κλιμάκωση, το εύρος τιμών διαμορφώθηκε μεταξύ -3 και +3 (Εικόνα 5). Στο χρωματικό χάρτη είναι εμφανής ο διαχωρισμός σε επίπεδο μεταχείρισης για τα φυτά wt καθώς διαμορφώνονται διακριτές συστάδες μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν στα 0, 100 και 200 mM NaCl. Αντίστοιχα, γίνεται μερικός διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων καταπόνησης για τα φυτά της σειράς #1, ενώ στις σειρές #7 και #9 είναι εμφανής η διάκριση μεταξύ των μαρτύρων και των καταπονημένων φυτών, χωρίς ωστόσο να γίνεται ευχερής διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων καταπόνησης (100 και 200 mM NaCl). Παράλληλα, είναι εμφανής ο σαφής διαχωρισμός μεταξύ των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών, γεγονός που υποδεικνύει τη διαφορετική μεταβολική τους απόκριση στην καταπόνηση αλατότητας. Επιπρόσθετα, από το χρωματικό χάρτη προκύπτει η

σημαντική συνεισφορά των υδατανθράκων, αμινοξέων, πολυαμινών και οργανικών οξέων στο διαχωρισμό των καταπονημένων και των φυτών μαρτύρων. Σε επίπεδο μεμονωμένων συστατικών ως σημαντική, με βάση τη διακριτική ικανότητα, αναδεικνύεται η συνεισφορά των συστατικών D-τρεχαλόζη, τυραμίνη, μέθυλ-β-γαλακτοπυρανοσίδη, ταγκατόζη, L-άνυδρο γλουταμικό οξύ, ασπαρτικό οξύ, ριβόζη, ισοπροπυλική-β-D θειογαλακτοπυρανοσίδη, μουκικό οξύ και σοφορόζη.



Εικόνα 5. Χρωματικός χάρτης (heat map) με βάση τη διάμεσο των 4 βιολογικών επαναλήψεων για κάθε κατηγορία μεταβλητής για τους μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στα φύλλα των *hrpZ_{PspH}*-σειρών και των φυτών wt. c: Φυτά μάρτυρες, 100: Φυτά που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας (100 mM NaCl), 200: Φυτά που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας (200 mM NaCl).

Συζήτηση

Οι χαρπίνες συνιστούν πρωτεΐνες που προέρχονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια και εκκρίνονται στα φυτά μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III (T3SS) των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Πρόκειται για μια κατηγορία πρωτεϊνών με κοινές ιδιότητες, οι οποίες αφορούν στην όξινη και υδρόφιλη φύση τους, στη θερμοσταθερότητά τους, στην υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκίνη και την απουσία κυστεϊνών, στην ευαισθησία στην πρωτεάση και στην έκκρισή τους στο θρεπτικό μέσο κατά την έκφραση του συστήματος Hrp (Li 2007; Choi et al. 2013). Οι χαρπίνες διακρίνονται για τον πολυδιάστατο ρόλο τους στην επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων και την ταυτόχρονη προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (Strobel et al. 1996; Dong et al. 1999, 2004; Peng et al. 2004; Jang et al. 2006; Chen et al. 2008a, b; Chuang et al. 2010; Huo et al. 2010; Chuang et al. 2014; Cao et al. 2018; Liu et al. 2018, 2020; Ji et al. 2021). Μάλιστα, έχει αναδειχθεί ότι η οφειλόμενη σε χαρπίνες επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, όπως αυτές της ξηρασίας, υψηλής αλατότητας και ακραίων θερμοκρασιών, συντελείται λόγω ενεργοποίησης των ABA- και ET-μονοπατιών, επαγωγής γονιδίων άμυνας και ενίσχυσης της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων, καθώς και αυξημένης συγκέντρωσης προλίνης (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2007; Chuang et al. 2010; Zhang et al. 2011; Liu et al. 2016; Cao et al. 2018; Zhou et al. 2019; Demirkol 2021).

Σχετικά είναι τα ευρήματα ότι η ενδογενής έκφραση της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}}, στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{P_{sph}}), σε φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι του ιού BN_YVV, η οποία αποδίδεται στην επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση AOS, SA και PR-πρωτεϊνών καθώς και γονιδίων που σχετίζονται με την αντίδραση υπερευαισθησίας (Pavli et al. 2011). Περαιτέρω, πρόσφατες έρευνες κατέδειξαν τη συμβολή του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στην πρόκληση ανεκτικότητας έναντι της τοξικότητας καδμίου (Mitsopoulou et al. 2021) και στην απόδοση ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας (Κεφάλαιο 2). Με δεδομένα τα ευρήματα που υπογραμμίζουν τις επιδράσεις του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό των φυτών, επιφέροντας αυξημένη συσσώρευση α,α-τρεχαλόζης, L-προλίνης, GABA και καδαβερίνης (Pavli et al. 2019), αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η κατανόηση της μεταβολικής απόκρισης των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας. Για το σκοπό αυτό, επιλεγμένες *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και φυτά wt υποβλήθηκαν σε καταπόνηση υψηλής αλατότητας και προσδιορίστηκε το GC/MS μεταβολικό τους προφίλ με στόχο τον εντοπισμό των μεταβολιτών με καίριο ρόλο στην επαγωγή ανθεκτικότητας προς πιθανή αξιοποίησή τους ως βιοδείκτες για την επιλογή των ανθεκτικών γονοτύπων.

Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση συνολικά 131 μεταβολιτών που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες, ενώ έπειτα από φιλτράρισμα έγινε επιλογή 74 συστατικών προς περαιτέρω ανάλυση. Η στατιστική επεξεργασία ανέδειξε 43 συστατικά που παρουσίασαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευσή τους επίπεδο γονοτύπου ή/και μεταχείρισης ή/και αλληλεπίδρασής τους. Επιπλέον, η ανάλυση κατέδειξε ως πλέον σημαντική τη συμβολή των μεταβολικών συστατικών που ανήκουν στις χημικές ομάδες των υδατανθράκων, αμινοξέων, πολυολών, πολυαμινών, καρβοξυλικών οξέων και οργανικών οξέων. Είναι δε αξιοσημείωτο ότι η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε ορισμένες διαφορές στο μεταβολικό προφίλ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt και, σε

ορισμένες περιπτώσεις, μεταξύ των καταπονημένων φυτών και των μαρτύρων, χωρίς ωστόσο να γίνεται διάκριση μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων καταπόνησης. Περαιτέρω, η ανάλυση επέτρεψε το μερικό διαχωρισμό των μεταβολικών προφίλ των μαρτύρων των φυτών wt και των διαφορετικών *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, υπογραμμίζοντας τόσο την επίδραση της έκφρασης του *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό των φυτών όσο και τη διαφορετική απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, οι οποίες προέρχονται από διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού. Προς την ίδια κατεύθυνση, ο χρωματικός χάρτης ανέδειξε το διαχωρισμό των προφίλ των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών, γεγονός που παρέχει ενδείξεις σχετικά με τη διαφορετική μεταβολική τους απόκριση στην καταπόνηση αλατότητας.

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης κατέδειξαν τη σημαντική επίδραση της καταπόνησης αλατότητας αλλά και του γονοτύπου στη συσσώρευση υδατανθράκων. Είναι γνωστό ότι οι υδατάνθρακες αποτελούν πηγές C και ενέργειας, ενώ η αποθήκευσή τους με τη μορφή αποθησαυριστικών ενώσεων συμβάλλει στην κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων των φυτών. Επιπλέον, οι υδατάνθρακες δρουν ως σηματοδοτικά μόρια για τη ρύθμιση των μεταβολικών διεργασιών που συμβάλλουν στην αύξηση και στην ανάπτυξη αλλά και στην προσαρμογή των φυτών σε δυσμενή περιβάλλοντα, δρώντας παράλληλα ως αντιοξειδωτικές ενώσεις λόγω της ικανότητας αποτοξικοποίησης των ROS (Trouvelot et al. 2014). Υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας, συντελείται αφυδάτωση των κυττάρων και αναστολή της λειτουργίας των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων (Munns and Tester 2008). Ωστόσο, η καταπόνηση αλατότητας συχνά συνδέεται με αυξημένη συσσώρευση υδατανθράκων, με την αύξηση να παρατηρείται κυρίως στους ανθεκτικούς γονοτύπους, καθώς αποδίδεται στις οσμωπροστατευτικές ιδιότητες των εν λόγω συστατικών (Sami et al. 2016; Nas et al. 2022). Περαιτέρω, έχει παρατηρηθεί αυξημένη συσσώρευση υδατανθράκων στα φύλλα σε νεαρά αναπτυξιακά στάδια των φυτών και μεταφορά στους καρπούς κατά τη διάρκεια ωρίμανσής τους (Yin et al. 2010). Στην παρούσα μελέτη, η μεταβολική απόκριση των υδατανθράκων περιλάμβανε σημαντική μεταβολή στη συσσώρευση 13 συστατικών, με πλέον εξέχουσα ωστόσο τη μεταβολή στη συσσώρευση της D-γαλακτόζης μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων. Ειδικότερα, η D-γαλακτόζη εμφάνισε μηδενική συσσώρευση στα φυτά της σειράς #1, ανιχνεύτηκε αποκλειστικά στα καταπονημένα φυτά wt και αυτά της σειράς #7 και σημείωση δραστηκή αύξηση στα φυτά της σειράς #9 (> 129x και > 78x στα 100 και 200 mM NaCl, αντίστοιχα). Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε πλήρη ευθυγράμμιση σχετικά με την αυξημένη συσσώρευση σακχάρων, και ιδιαίτερα D-γαλακτόζης, έπειτα από έκθεση σε υψηλή αλατότητα, λόγω επαγωγής γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της D-γαλακτόζης, στην οποία αποδίδεται προστατευτικός ρόλος έναντι της καταπόνησης αλατότητας (Zhang et al. 2019). Περαιτέρω, έχει αποδειχθεί ότι η μεταβολική προσαρμογή των φυτών που αναπτύσσονται σε συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης, όπως αυτή της υψηλής αλατότητας, περιλαμβάνει αύξηση της D-γαλακτόζης, με την εν λόγω προσαρμογή να αφορά κυρίως τους ανθεκτικούς γονοτύπους, εξαιτίας της ενεργοποίησης του ενζύμου ινβεργτάση. Παράλληλα, τα αυξημένα επίπεδα D-γαλακτόζης συνδέονται με διατήρηση της ικανότητας αφομοίωσης CO₂, καθώς και με επαγωγή της βιοσύνθεσης ασκορβικού οξέος, γεγονός που συμβάλλει στην ανθεκτικότητα των γονοτύπων στην υψηλή αλατότητα (Darko et al. 2017, 2019). Επιπρόσθετα, τα ευρήματα κατέδειξαν τη διαφορετική συσσώρευση της σουκρόζης μεταξύ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt, με τις πρώτες να εμφανίζουν αυξημένη συσσώρευση υπό συνθήκες καταπόνησης και τα τελευταία

αντίθετο προφίλ. Τα ευρήματα αυτά παρέχουν επιπλέον ενδείξεις σχετικά με τη διαφορική απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt στην καταπόνηση αλατότητας, καθώς η σουκρόζη αποτελεί μια ένωση-κλειδί λόγω της εμπλοκής της στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης για παραγωγή ενέργειας και της παράλληλης δράσης της ως σηματοδοτικό μόριο υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Αν και τα επίπεδα σουκρόζης υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας δύνανται να αυξάνονται ή να μειώνονται, ανάλογα με το φυτικό είδος (Patel et al. 2020), στο πλείστο των περιπτώσεων η συσσώρευση της σουκρόζης σχετίζεται θετικά με το επίπεδο ανθεκτικότητας στην καταπόνηση αλατότητας. Υπό συνθήκες καταπόνησης αλατότητας, η συσσώρευση σουκρόζης, που συνεισφέρει στην προηγμένη άμυνα των φυτών, αποδίδεται στην υπερέκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα φωσφορική συνθάση της σουκρόζης, συνθάση της σουκρόζης και ινβεργτάση της σουκρόζης (Liu et al. 2008; Peng et al. 2016). Επιπρόσθετα, οι Mathan et al. (2021) περιγράφουν ότι η μεταφορά σουκρόζης εντός των φυτικών ιστών υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων οφείλεται στην υπερέκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν μεταφορείς σακχάρων (SWEETs) και σε πρόσδεση ABA-μεταγραφικών παραγόντων, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης σακχάρων.

Στη χημική ομάδα των αμινοξέων, η συντριπτική πλειοψηφία των συστατικών που αναλύθηκαν εμφάνισε σημαντικά μεταβαλλόμενη συσσώρευση μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων, γεγονός που είναι ενδεικτικό του καίριου ρόλου τους στην προσαρμογή των φυτών υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, παρέχοντας περαιτέρω ισχυρές ενδείξεις σχετικά με το διακριτό μεταβολικό προφίλ των υπό μελέτη γονοτύπων. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι υπό συνθήκες καταπόνησης αλατότητας, η προσαρμογή των φυτών, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνει την επαγωγή γονιδίων και μεταβολικών οδών που συμμετέχουν στο μεταβολισμό αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων των προλίνης, αλανίνης, γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης, ως μια στρατηγική για μείωση των επιδράσεων της καταπόνησης (Zhang et al. 2017). Παράλληλα, η απόκριση των φυτών μετά από έκθεση σε υψηλή αλατότητα περιλαμβάνει την παραγωγή πρωτεϊνών, όπως η σερίνη/θρεονίνη κινάση και η συνθάση της μεθειονίνης, που αμβλύνει τις επιπτώσεις της καταπόνησης στην ανάπτυξη των φυτών (Zörb et al. 2004), ενώ η υψηλότερη συσσώρευση αμινοξέων δυνητικά προκαλείται από αύξηση της διάσπασης ενδογενών αμινοξέων ή αναστολή της σύνθεσης αμινοξέων (Nedjimi 2011). Στην παρούσα μελέτη, η μεταβολική απόκριση στην καταπόνηση αλατότητας περιλάμβανε μεταβολή στη συσσώρευση της L-προλίνης, η οποία εμφάνισε αντίθετο προφίλ συσσώρευσης στα φυτά wt και στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές. Συγκεκριμένα, τα φυτά wt και το σύνολο των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών εμφάνισαν μείωση και αύξηση της L-προλίνης αντίστοιχα υπό συνθήκες καταπόνησης, ενώ είναι αξιοσημείωτο ότι στη σειρά #9 κατέστη δυνατή η ανίχνευσή της αποκλειστικά στα καταπονημένα φυτά. Με δεδομένη τη γνωστή δράση της προλίνης ως οσμωλύτη και την ταυτόχρονη επικράτησή της έναντι των υπολοίπων αμινοξέων υπό συνθήκες αλατότητας (Fougère et al. 1991), τα ανωτέρω ευρήματα συνηγούνται στον καίριο ρόλο της προλίνης στη βελτιωμένη απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών στην οσμωτική καταπόνηση. Πέραν της οσμωπροστατευτικής της δράσης, η αυξημένη συσσώρευση της προλίνης υπό συνθήκες καταπόνησης συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα μέσω ενίσχυσης της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, διατήρησης του υδατικού δυναμικού των κυττάρων, ενίσχυσης της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως τα POX και CAT, και ρύθμισης της σύνθεσης και διάσπασης πρωτεϊνών (Khedr et al. 2003; Gupta and Huang 2014). Η συμβολή της προλίνης στην ανθεκτικότητα

έναντι της υψηλής αλατότητας έχει περαιτέρω επαληθευτεί και μέσω της εξωγενούς εφαρμογής προλίνης, η οποία συνοδεύτηκε από μεταβολές στη μεταφορά αλάτων από το υπόγειο στο υπέργειο τμήμα, αύξηση του περιεχόμενου K^+ καθώς και ρύθμιση της περατότητας των μεμβρανών και της απορρόφησης ιόντων, το οποίο θεωρείται ως η πιθανότερη αιτία άμβλυνσης των επιπτώσεων της καταπόνησης (Rai 2002). Περαιτέρω, η μεταβολική απόκριση των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών στην καταπόνηση περιλάμβανε διαφορές στο προφίλ συσσώρευσης μιας σειράς αμινοξέων. Στο πλαίσιο αυτό, η σειρά #1 εμφάνισε υψηλότερη συσσώρευση β-αλανίνης, L-άνυδρου γλουταμικού οξέος, L-βαλίνης και L-θρεονίνης έναντι των υπόλοιπων γονοτύπων, ενώ οι σειρές #7 και #9 χαρακτηρίστηκαν από αυξημένη συγκέντρωση L-σερίνης και DL-ισολευκίνης στο χαμηλό ή/και στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης. Το L-άνυδρο γλουταμικό οξύ, επιδρά θετικά στον περιορισμό των επιπτώσεων της αλατότητας, συμβάλλοντας στη μείωση της συγκέντρωσης Na^+ , στη διατήρηση της ιοντικής ισορροπίας και στην ενίσχυση της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων, με κυριότερα τα POX και CAT (Fardus et al. 2021). Επιπλέον, το γλουταμικό οξύ αποτελεί βασικό μόριο για τη σύνθεση διάφορων αμινοξέων με οσμωπροστατευτική δράση, μεταξύ των οποίων και η προλίνη, η σύνθεση της οποίας επιτελείται από τις πρόδρομες ενώσεις γλουταμικό οξύ και ορνιθίνη (Dierks-Ventling and Tonelli 1982; Franzoni et al. 2022). Τέλος, οι Joshi et al. (2010) αναφέρουν αλληλεξάρτηση των μεταβολικών οδών της θρεονίνης, της μεθειονίνης και της ισολευκίνης, καθώς η ισολευκίνη συντίθεται στα φυτικά κύτταρα μέσω της θρεονίνης και της μεθειονίνης, με τη σύνθεση ή τη διάσπαση των αμινοξέων αυτών να επηρεάζει τη συσσώρευση ισολευκίνης.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα ανέδειξαν τη διαφορική απόκριση των γονοτύπων ως προς τη συσσώρευση ορισμένων πολυολών, με την πλέον σημαίνουσα μεταβολή να αφορά τη συσσώρευση της D-σορβιτόλης. Οι πολυόλες είναι ενώσεις που προέρχονται από τα σάκχαρα αλδόζη και κετόζη και απαντώνται σε διάφορους οργανισμούς, με τη δράση τους στα φυτά να σχετίζεται με τη ρύθμιση συνενζύμων και την οργανογένεση, τον έλεγχο των επιπέδων ενέργειας και την ιοντική ισορροπία εντός των κυττάρων (Shen et al. 1999), ενώ η σύνθεσή τους εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Loescher 1987; Moing 2000). Επιπλέον, οι πολυόλες δρουν ως σηματοδοτικές και οσμωρυθμιστικές ενώσεις, ενώ έχει αποδειχθεί ότι προάγουν την ανθεκτικότητα έναντι περιβαλλοντικών καταπονήσεων και ειδικότερα αυτών της αλατότητας, ξηρασίας και χαμηλών θερμοκρασιών (Moing 2000). Ειδικότερα, υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και αλατότητας, έχει παρατηρηθεί αυξημένη μεταφορά πολυολών τόσο στο φλοιώμα όσο και στο ξύλωμα των φυτών, με την αυξημένη σύνθεσή τους να αποτελεί πιθανή στρατηγική οσμωτικής προσαρμογής (Noiraud et al. 2001). Με δεδομένη την πολύπλευρη δράση τους, οι πολυόλες συχνά χρησιμοποιούνται για τον εμπλουτισμό των θρεπτικών μέσων σε καλλιέργειες *in vitro*, με σκοπό την επαγωγή της σύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών, καθώς και τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας γενετικού μετασχηματισμού (Steinitz 1999). Στην παρούσα μελέτη, είναι ενδιαφέρον ότι το προφίλ συσσώρευσης της D-σορβιτόλης διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των υπό μελέτη γονοτύπων, εμφανίζοντας μειωμένη συσσώρευση στα καταπονημένα φυτά wt, αυξημένη συσσώρευση στα αντίστοιχα φυτά της σειράς #9, ενώ η σειρά #1 εμφάνισε μείωση και δραστηική αύξηση ($> 14x$) στα 100 και 200 mM NaCl αντίστοιχα. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές σχετικά με τη μεταβολή της δραστηριότητας ενζύμων

καταβολισμού πολυολών, λόγω καταπόνησης υψηλής αλατότητας, η οποία έχει ως συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσής τους στα φυτά και τη λειτουργία τους ως οσμοπροστατευτικές ενώσεις που προάγουν την ανθεκτικότητα έναντι της καταπόνησης αλατότητας (Williamson et al. 2002).

Στην ομάδα των πολυαμινών, τα αποτελέσματα ανέδειξαν τη διαφορική απόκριση των γονοτύπων ως προς τη συσσώρευση της φαινυλαιθυλαμίνης και της τυραμίνης, με την πρώτη να εμφανίζει διαφορές σε επίπεδο γονοτύπου και μεταχείρισης και τη δεύτερη σε επίπεδο μεταχείρισης. Οι πολυαμίνες συνιστούν ενώσεις που εντοπίζονται στα περισσότερα φυτικά κύτταρα, ωστόσο το περιεχόμενο τους μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου των φυτών. Ο ρόλος του έγκειται κυρίως στις διεργασίες ανάπτυξης των φυτών και ειδικότερα στη διαφοροποίηση ανθοφόρων οφθαλμών και στη διαδικασία εμβρυογένεσης, ενώ η δραστηριότητα των ενζύμων σύνθεσης πολυαμινών είναι αυξημένη σε μεριστωματικά κύτταρα, συμβάλλοντας στην καθυστέρηση της γήρανσης των οργάνων (Chen et al. 2019; Seo et al. 2019). Επιπλέον, οι πολυαμίνες εμφανίζουν προστατευτικό ρόλο υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, συνεισφέροντας στη διατήρηση της σταθερότητας των μεμβρανών και της ομοιόστασης των κυττάρων, εξαιτίας της δράσης τους ως αντιοξειδωτικές ενώσεις και της αναστολής της σύνθεσης ROS (Liu et al. 2015). Υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας, έχει αναφερθεί αυξημένη συσσώρευση πολυαμινών, συμπεριλαμβανομένων των τυραμίνης, 1,3-διαμινοπροπάνης, καδαβερίνης και αγματίνης, και μείωση του περιεχόμενου ελεύθερων πολυαμινών, με τις αποκρίσεις αυτές να συνδέονται με προηγμένη αντίσταση την καταπόνηση (Aziz et al. 1999). Στην παρούσα μελέτη τόσο η φαινυλαιθυλαμίνη όσο και η τυραμίνη σημείωσαν μείωση υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας στο σύνολο των υπό μελέτη γονοτύπων, γεγονός που πιθανά σχετίζεται με αναφορές ότι η μείωση της συσσώρευσης ελεύθερων πολυαμινών συμβάλλει στη ρύθμιση της ιοντικής ισορροπίας στους ιστούς καθώς και στη διατήρηση της ροής συστατικών απαραίτητων για τη σύνθεση προλίνης. Στην ίδια κατεύθυνση, οι ElSayed et al. (2022) περιγράφουν την αύξηση της ποσότητας χλωροφύλλης, προλίνης, την αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου Rubisco, καθώς και την αύξηση των επιπέδων αντιοξειδωτικών ενζύμων που σχετίζονται με μείωση των αρνητικών επιδράσεων της καταπόνησης.

Στην ομάδα των καρβοξυλικών οξέων, η ανάλυση ανέδειξε τη διαφορική συσσώρευση των συστατικών κιτρικού οξέος και μεθυλμαλονικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων, με το προφίλ συσσώρευσης του πρώτου, ωστόσο, να σηματοδοτεί τη μεταβολική απόκριση των φυτών στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας. Ως ιδιαίτερα ενδιαφέρον χαρακτηρίζεται το εύρημα ότι, αν και το σύνολο των φυτών εμφάνισαν αυξημένη συσσώρευση κιτρικού οξέος υπό συνθήκες καταπόνησης, η σειρά #1 χαρακτηρίστηκε από δραστητική αύξηση και στα δύο επίπεδα καταπόνησης (> 81x και > 101x στα 100 και 200 mM NaCl, αντίστοιχα). Τα καρβοξυλικά οξέα, με κυριότερο το κιτρικό οξύ, αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, που εμπλέκονται σε ποικίλες μεταβολικές διεργασίες των φυτών. Χαρακτηριστικά οι μεταβολές στη συσσώρευση κιτρικού οξέος εντός των κυττάρων επηρεάζουν διεργασίες όπως η φωτοσύνθεση, η σύνθεση πρωτεϊνών, ο μεταβολισμός N και S και η σύνθεση DNA (Finkemeier et al. 2013). Κατά την επικράτηση αβιοτικών καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένων της αλατότητας, υψηλής θερμοκρασίας, ξηρασίας και τοξικότητας βαρέων μετάλλων, παρατηρείται αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων κιτρικού οξέος.

Υπό την έννοια αυτή, η ραγδαία αύξηση του κιτρικού οξέος στα καταπονημένα φυτά της σειράς #1 πιθανά σχετίζεται με τη βελτιωμένη απόκρισή της στην καταπόνηση, η οποία εξάλλου τεκμαίρεται από την υπερέχουσα επίδοσή της ως προς τα αναπτυξιακά και φυσιολογικά γνωρίσματα που μελετήθηκαν (Κεφάλαιο 2). Σε αυτό το επίπεδο, περαιτέρω σχετικά είναι τα ευρήματα ότι η εξωγενής εφαρμογή κιτρικού οξέος συμβάλλει στη διατήρηση του ρυθμού αύξησης και ανάπτυξης των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης αλατότητας και προάγει την ανθεκτικότητα, μέσω της επαγωγής αντιοξειδωτικών ενζύμων, με κυριότερα τα SOD, POX, CAT, GPX, PPO και APX (Tahjib-Ul-Arif et al. 2021).

Επιπλέον, τα αποτελέσματα ανέδειξαν τη διαφορική απόκριση των γονοτύπων ως προς τη συσσώρευση ορισμένων οργανικών οξέων, με τα συστατικά μαλονικό οξύ, λακτοβιονικό οξύ και γλυκερικό οξύ να σημειώνουν τις πλέον σημαντικές μεταβολές, οι οποίες εντοπίζονται σε επίπεδο γονοτύπου ή/και μεταχείρισης. Τα οργανικά οξέα, που παράγονται στα μιτοχόνδρια, αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων και έχουν ποικίλες λειτουργίες στα φυτά που περιλαμβάνουν τη ρύθμιση του pH και του οσμωτικού δυναμικού των κυττάρων, τη μεταφορά θρεπτικών στοιχείων εντός των ιστών, τη μείωση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του εδάφους και την αύξηση της διαθεσιμότητας N, P, και K του εδάφους. Πέραν αυτών, σημαντική κρίνεται η συνεισφορά τους στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων, με κυριότερες την καταπόνηση βαρέων μετάλλων και την υδατική καταπόνηση (Panchal et al. 2021). Αναφέρεται ωστόσο ότι η συσσώρευση οργανικών οξέων εξειδικεύεται σε επίπεδο φυτικού είδους αλλά και ιστού, ενώ η συμβιωτική σχέση των φυτών με μυκόρριζες φαίνεται να διαφοροποιεί τη σύσταση και το προφίλ των οργανικών οξέων (López-Bucio et al. 2000; Evelin et al. 2019). Η συσσώρευση οργανικών οξέων, με κυριότερα το μαλονικό και μαλικό οξύ, αυξάνεται υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας ως αντιστάθμισμα της μείωσης του οσμωτικού δυναμικού των φυτών (Lecoeur et al. 1992), ενώ υπό συνθήκες αλατότητας η προηγμένη ανθεκτικότητα στη σόγια συνδέθηκε με τη σύνθεση οργανικών οξέων και αμινοξέων, όπως επίσης και τον αυξημένο ρυθμό του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων απουσία καταπόνησης (Zhang et al. 2016). Στην παρούσα μελέτη, είναι ενδιαφέρον ότι το προφίλ συσσώρευσης του μαλονικού οξέος διέφερε σημαντικά μεταξύ των γονοτύπων, με τα καταπονημένα φυτά wt να εμφανίζουν μείωση, τα αντίστοιχα των σειρών #7 και #9 μηδενική συσσώρευση, και αυτά της σειράς #1 αντίθετο προφίλ αυξημένης συσσώρευσης. Τα ευρήματα αυτά πιθανώς υποδεικνύουν την ικανότητα αποκατάστασης του οσμωτικού δυναμικού των φυτών της σειράς #1, ενισχύοντας παράλληλα προηγούμενες αναφορές σχετικά με την εξάρτηση του μοτίβου συγκέντρωσης μαλονικού οξέος από το φυτικό ιστό, το είδος και την ένταση της καταπόνησης καθώς και το γονότυπο (Muscolo et al. 2015). Περαιτέρω, η ανάλυση ανέδειξε τη σημαντική μεταβολή στη συσσώρευση γλυκερικού οξέος, το οποίο σημείωσε καθολική αύξηση στο σύνολο των γονοτύπων στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης. Παρόμοια ευρήματα αυξημένης συσσώρευσης γλυκερικού οξέος υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας έχουν καταγραφεί και σε άλλα φυτά, με την αύξηση να εμφανίζεται ως ανάλογη της ανθεκτικότητας των φυτών, κυρίως λόγω της συνεισφοράς του στην αποτοξικοποίηση των ROS (Wang et al. 2021; Patel et al. 2022).

Συνολικά, τα ευρήματα της μελέτης παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι *hrpZ_{Psph}*-σειρές εμφανίζουν διακριτό μεταβολικό περιεχόμενο σε σχέση με τα φυτά wt τόσο απουσία όσο και παρουσία καταπόνησης υψηλής αλατότητας, υπογραμμίζοντας ότι η μεταβολική

απόκριση των πρώτων σηματοδοτείται σε σημαντικό βαθμό από την επίδραση του *hrpZ_{P_{sph}}*. Παράλληλα, τα δεδομένα της μεταβολομικής ανάλυσης αναδεικνύουν το διαφορετικό μεταβολικό προφίλ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, με τις διαφορές προφανώς να αποδίδονται στην επίδραση της θέσης ένθεσης του διαγονιδίου στις διαφορετικές σειρές. Ειδικότερα, οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερη συγκέντρωση L-προλίνης και D-σορβιτόλης έναντι των φυτών wt υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας, ενώ η σειρά #1 χαρακτηρίστηκε επιπλέον από αυξημένη συσσώρευση β-αλανίνης, L-βαλίνης, L-άνυδρου γλουταμικού οξέος, κιτρικού οξέος και μαλονικού οξέος. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε αντιστοιχία με μελέτες που αναφέρουν ότι η ενδογενής έκφραση ή η εξωγενής εφαρμογή βακτηριακής προέλευσης χαρπινών προκαλεί αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των φυτών, και κυρίως στη συγκέντρωση αμινοξέων και φαινολικών ενώσεων που σχετίζονται με τις αποκρίσεις άμυνας των φυτών έναντι αβιοτικών καταπονήσεων (Zhang et al. 2011; Cao et al. 2018; Rodrigo-García et al. 2019; Demirkol 2021). Σε ανάλογο επίπεδο, τα ευρήματα της μελέτης συντείνουν στην αποσαφήνιση της επίδρασης του *hrpZ_{P_{sph}}* στη μεταβολική απόκριση στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας, συμβάλλοντας παράλληλα στον εντοπισμό των συστατικών που σηματοδοτούν τη μεταβολική προσαρμογή των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών. Επιπλέον, τα συνολικά δεδομένα συνηγορούν προς την υπερέχουσα επίδοση της σειράς #1, η οποία -πέραν της φυσιολογικής απόκρισής της στο στάδιο της βλάστησης και των ώριμων φυτών- τεκμαίρεται από το μεταβολικό περιεχόμενό της υπό συνθήκες καταπόνησης που περιλαμβάνει μεταβολικές ρυθμίσεις που προάγουν την άμυνα έναντι της αλατότητας.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της μελέτης υπογραμμίζουν ότι το διαγονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* επιφέρει σημαντικές μεταβολές στο μεταβολισμό των φυτών του είδους *N. benthamiana*, συμβάλλοντας στη μεταβολική ρύθμιση της προσαρμογής στην καταπόνηση αλατότητας. Επιπλέον, η ανάλυση επέτρεψε τον εντοπισμό των συστατικών που σηματοδοτούν τη ρύθμιση του μεταβολισμού υπό συνθήκες καταπόνησης, παρέχοντας δυνατότητες αξιοποίησής τους ως βιοδείκτες ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης υψηλής αλατότητας. Προς την κατεύθυνση αυτή, η έρευνα κατέδειξε τον καίριο ρόλο των συστατικών D- γαλακτόζη, L-προλίνη, D-σορβιτόλη, κιτρικό οξύ και μαλονικό οξύ.

Βιβλιογραφία

- Arbona V, Manzi M, de Ollas C, Gómez-Cadenas A (2013) Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Int Mol Sci* 14:4885-4911. <https://doi.org/10.3390/ijms14034885>
- Aziz A, Martin-Tanguy J, Larher F (1999) Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Sci* 145:83-91. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(99\)00071-0](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(99)00071-0)
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc: B (Methodological)* 57: 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>

- Cao Y, Yang M, Ma W, Sun Y, Chen G (2018) Overexpression of *SSB_{Xoc}*, a single-stranded DNA-binding protein from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, enhances plant growth and disease and salt stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci* 9:953. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00953>
- Chen D, Shao Q, Yin L, Younis A, Zheng B (2019) Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Front Plant Sci* 9:1945. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945>
- Chen L, Qian J, Qu S, Long J, Yin Q, Zhang C, Wu X, Sun F, Wu T, Hayes M, Beer SV, Dong H (2008a) Identification of specific fragments of HpaG *Xoc*, a harpin from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, that induce disease resistance and enhance growth in plants. *Phytopathology* 98:781-791. <https://doi.org/10.1094/phyto-98-7-0781>
- Chen L, Zhang SJ, Zhang SS, Qu S, Ren X, Long J, Yin Q, Qian J, Sun F, Zhang C, Wang L, Wu X, Wu T, Zhang Z, et al. (2008b) A fragment of the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* harpin HpaG_{Xoc} reduces disease and increases yield of rice in extensive grower plantings. *Phytopathology* 98:792-802. <https://doi.org/10.1094/phyto-98-7-0792>
- Choi MS, Kim W, Lee C, Oh CS (2013) Harpins, multifunctional proteins secreted by gram-negative plant-pathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 26:1115-1122. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-13-0050-CR>
- Chuang Hw, Harnrak A, Chen YC, Hsu CM (2010) A harpin-induced ethylene-responsive factor regulates plant growth and responses to biotic and abiotic stresses. *Biochem Biophys Res Commun* 402:414-420. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.047>
- Chuang Hw, Chang PY, Syu Yy (2014) Harpin protein, an elicitor of disease resistance, acts as a growth promoter in *Phalaenopsis* orchids. *J Plant Growth Regul* 33:788-797. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9425-1>
- Darko E, Gierczik K, Hudák O, Forgó P, Pál M, Türkösi E, et al. (2017) Differing metabolic responses to salt stress in wheat-barley addition lines containing different 7H chromosomal fragments. *PLoS ONE* 12: e0174170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174170>
- Darko E, Végh B, Khalil R, Marček T, Szalai G, Pál M, et al. (2019) Metabolic responses of wheat seedlings to osmotic stress induced by various osmolytes under iso-osmotic conditions. *PLoS ONE* 14: e0226151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226151>
- Demirkol G (2021) PopW enhances drought stress tolerance of alfalfa via activating antioxidative enzymes, endogenous hormones, drought related genes and inhibiting senescence genes. *Plant Physiol Biochem* 166:540-548. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.036>
- Desikan R, Hancock JT, Ichimura K, Shinozaki K, Neill SJ (2001) Harpin induces activation of the arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol* 126: 1579-1587. <https://doi.org/10.1104/pp.126.4.1579>
- Dierks-Ventling C, Tonelli C (1982) Metabolism of proline, glutamate, and ornithine in proline mutant root tips of *Zea mays* (L.). *Plant Physiol* 69:130-134. <https://doi.org/10.1104/pp.69.1.130>
- Dong H, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV (1999) Harpin induces disease resistance in arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. *Plant J* 20:207-215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1999.00595.x>
- Dong HP, Peng J, Bao Z, Meng X, Bonasera JM, Chen G, Beer SV, Dong H (2004) Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated

- arabidopsis growth and insect defense. *Plant Physiol* 136:3628-3638. <https://doi.org/10.1104/pp.104.048900>
- Dong HP, Yu H, Bao Z, Guo X, Peng J, et al. (2005) The *ABI2*-dependent abscisic acid signaling controls HrpN-induced drought tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* 221:313–327. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1444-x>
- ElSayed A, Mohamed AH, Rafudeen MS, Omar AA, Awad MF, Mansour E (2022) Polyamines mitigate the destructive impacts of salinity stress by enhancing photosynthetic capacity, antioxidant defense system and upregulation of calvin cycle- related genes in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Saudi J Biol Sci* 29:3675-3686. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.02.053>
- Evelin H, Devi TS, Gupta S, Kapoor R (2019) Mitigation of salinity stress in plants by arbuscular mycorrhizal symbiosis: current understanding and new challenges. *Front Plant Sci* 10:470. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00470>
- Fardus J, Hossain MS, Fujita M (2021) Modulation of the antioxidant defense system by exogenous L-glutamic acid application enhances salt tolerance in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Biomolecules* 11:587. <https://doi.org/10.3390/biom11040587>
- Finkemeier I, König AC, Heard W, Nunes-Nesi A, Pham PA, Leister D, Fernie AR, Sweetlove LJ (2013) Transcriptomic analysis of the role of carboxylic acids in metabolite signaling in arabidopsis leaves. *Plant Physiol* 162:239-253. <https://doi.org/10.1104/pp.113.214114>
- Fougère F, Le Rudulier D, Streeter JG (1991) Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* 96: 1228-1236. <https://doi.org/10.1104/pp.96.4.1228>
- Franzoni G, Cocetta G, Trivellini A, Garabello C, Contartese V, Ferrante A (2022) Effect of exogenous application of salt stress and glutamic acid on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci Hort* 299:111027. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111027>
- Gupta B, Huang B (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int J Genomics* 701596: 1-18. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Huo R, Wang Y, Ma LL, Qiao JQ, Shao M, Gao XW (2010) Assessment of inheritance pattern and agronomic performance of transgenic rapeseed having harpin_{Xooc}-encoding *hrf2* gene. *Transgenic Res* 19: 841–847. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9365-x>
- Jan R, Asaf S, Numan M, Lubna L, Kim KM (2021) Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy* 11:968. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050968>
- Jang YS, Sohn SI, Wang MH (2006) The *hrpN* gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Planta* 223:449-456. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0100-4>
- Ji ZL, Yu MH, Ding YY, Li J, Zhu F, He JX, Yang LN (2021) Coiled-Coil N21 of Hpa1 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* promotes plant growth, disease resistance and drought tolerance in non-hosts via eliciting HR and regulation of multiple defense response genes. *Int J Mol Sci* 22:203. <https://doi.org/10.3390/ijms22010203>
- Joshi V, Joung JG, Fei Z, Jander G (2010) Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids* 39:933-947. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0505-7>
- Khedr AHA, Abbas MA, Wahid AAA, Quick WP, Abogadallah GM (2003) Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of

- Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. J Exp Bot 54: 2553-2562. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
- Lê Cao KA, Costello ME, Lakis VA, Bartolo F, Chua XJ, Brazeilles R, Rondeau P (2016) MixMC: A multivariate statistical framework to gain insight into microbial communities. PLoS ONE 11: e0160169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160169>
- Li MC (2007) Type III secretion system of phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae*: from gene to function. Academic Dissertation. Department of Biological and Environmental Sciences. Division of General Microbiology. Faculty of Biosciences and Graduate School in Biotechnology and Molecular Biology (GSBM) University of Helsinki. pp 21-31.
- Liu JH, Wang W, Wu H, Gong X, Moriguchi T (2015) Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. Front Plant Sci 6:827. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00827>
- Liu H, Wang Q, Yu M, Zhang Y, Wu Y, Zhang X (2008) Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene, *AtNHX3*, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots. Plant Cell Environ 31:1325-1334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01838.x>
- Liu H, Wang Y, Zhou X, Wang C, Wang C, Fu J, Wei T (2016) Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* from *Ralstonia solanacearum* primed antioxidant defenses with enhanced drought tolerance in tobacco plants. Plant Cell Rep 35:1333-1344. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1965-3>
- Liu Y, Zhou X, Liu W, Xiong X, Lv C, Zhou X, Miao W (2018) Functional regions of HpaXm as elicitors with specific heat tolerance induce the hypersensitive response or plant growth promotion in nonhost plants. PLoS ONE 13: e0188788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188788>
- Liu Y, Zhou X, Liu W, Huang J, Liu Q, Sun J, Cai X, Miao W (2020) HpaXpm, a novel harpin of *Xanthomonas phaseoli* pv. manihotis, acts as an elicitor with high thermal stability, reduces disease, and promotes plant growth. BMC Microbiol 20. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1691-4>
- Livaja M, Palmieri MC, von Rad U, Durner J (2008) The effect of the bacterial effector protein harpin on transcriptional profile and mitochondrial proteins of *Arabidopsis thaliana*. J Proteom 71: 148-159. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.04.002>
- Lecoeur J, Wery J, Turc O (1992) Osmotic adjustment as a mechanism of dehydration postponement in chickpea (*Cicer arietinum* L.) leaves. Plant Soil 144:177-189. <https://doi.org/10.1007/bf00012874>
- Loescher WH (1987) Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. Physiol Plant 70:553-557. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb02857.x>
- López-Bucio J, Nieto-Jacobo MF, Ramírez-Rodríguez V, Herrera-Estrella L (2000) Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic variety for cultivation in extreme soils. Plant Sci 160: 1-13. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(00\)00347-2](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(00)00347-2)
- Mathan J, Singh A, Ranjan A (2021) Sucrose transport in response to drought and salt stress involves ABA-mediated induction of *OsSWEET13* and *OsSWEET15* in rice. Physiol Plant 171:620-637. <https://doi.org/10.1111/pp1.13210>
- Mbarki S, Sytar O, Cerda A, Zivcak M, Rastogi A, He X, et al. (2018) Strategies to mitigate salt stress effects on photosynthetic apparatus and productivity of crop plants. In: Kumar

- V et al. (eds) Salinity responses and tolerance in plants, volume 1. Springer International Publishing AG, pp 85-136. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75671-4_4
- Michalak A (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J Environ Stud* 15:523-530.
- Mitsopoulou N, Lakiotis K, Golia EE, Khah EM, Pavli OI (2021) Response of *hrpZ_{P_{sph}}*-transgenic *N. benthamiana* plants under cadmium stress. *Environ Sci Pollut Res Int* 28:3787-3796. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09204-2>
- Moing A (2000) Sugar alcohols as carbohydrate reserves in some higher plants. In: Gupta AK, Kaur N (eds) *Developments in crop science*. Elsevier Science BV, pp 337-358. [https://doi.org/10.1016/S0378-519X\(00\)80017-3](https://doi.org/10.1016/S0378-519X(00)80017-3)
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev. Plant Biol* 59:651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Muscolo A, Junker A, Klukas C, Weigelt-Fischer K, Riewe D, Altmann T (2015) Phenotypic and metabolic responses to drought and salinity of four contrasting lentil accessions. *J Exp Bot* 66:5467-5480. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv208>
- Nas T, Iqbal MM, Akhtar J, Saqib M, Ali M, Zafar MI, et al. (2022) Carbohydrate partitioning, growth and ionic compartmentalisation of wheat grown under boron toxic and salt degraded land. *Agronomy* 12:740. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030740>
- Nedjimi (2011) Is salinity tolerance related to osmolytes accumulation in *Lygeum spartum* L. seedlings? *J Saudi Soc Agric Sci* 10:81-87. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2011.03.002>
- Netondo GW, Onyango JC, Beck E (2004) Sorghum and salinity: II. gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Sci* 44:806–811. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.8060>
- Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R (2001) Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol Biochem* 39:717-728. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01292-X](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01292-X)
- Panchal P, Miller AJ, Giri J (2021) Organic acids: versatile stress-response roles in plants. *J Exp Bot* 72:4038-4052. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab019>
- Patel J, Khandwal D, Choudhary B, Ardesana D, Jha RK, Tanna B, et al. (2022) Differential physio-biochemical and metabolic responses of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under multiple abiotic stress conditions. *Int J Mol Sci* 23:660. <https://doi.org/10.3390/ijms23020660>
- Patel MK, Kumar M, Li W, Luo Y, Burritt DJ, Alkan N, Phan Tran LS (2020) Enhancing salt tolerance of plants: from metabolic reprogramming to exogenous chemical treatments and molecular approaches. *Cells* 9:2492. <https://doi.org/10.3390/cells9112492>
- Pavli OI, Kelaidi GI, Tampakaki AP, Skaracis GN (2011) The *hrpZ* gene of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola enhances resistance to rhizomania disease in transgenic *Nicotiana benthamiana* and sugar beet. *PLoS ONE* 6:e17306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017306>
- Pavli OI, Mitsopoulou N, Zianna E, Foti C, Aliferis KA, Skaracis GN (2019) Transgenic expression of *hrpZ_{P_{sph}}* gene substantially alters the metabolome of *Nicotiana benthamiana* plants. In: *Proceedings of 70th HSBMB Conference*, p 10.

- Peng J, Bao ZL, Ren HY, Wang JS, Dong HS (2004) Expression of Harpin_{Xoo} in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death. *Phytopathology* 94:1048-1055. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.10.1048>
- Peng J, Liu J, Zhang L, Luo J, Dong H, Ma Y, et al. (2016) Effects of soil salinity on sucrose metabolism in cotton leaves. *PlosOne* 11: e0156241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156241>
- Rajput NA, Zhang M, Shen D, Liu T, Zhang Q, et al. (2015) Overexpression of a Phytophthora cytoplasmic CRN effector confers resistance to disease, salinity and drought in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol* 56:2423-2435. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv164>
- Rai VK (2002) Role of amino acids in plant responses to stresses *Biol Plant* 45:481-487. <https://doi.org/10.1023/a:1022308229759>
- Riseh SR, Ebrahimi-Zarandi M, Tamanadar E, Pour MM, Thakur VK (2021) Salinity stress: toward sustainable plant strategies and using Plant Growth-Promoting Rhizobacteria encapsulation for reducing it. *Sustainability* 13:12758. <https://doi.org/10.3390/su132212758>
- Rodrigo-García J, Navarrete-Laborde B, de la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E Núñez-Gastélum JA (2019) Effect of harpin protein as an elicitor on the content of phenolic compounds and antioxidant capacity in two hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties. *Food Sci Technol* 39: 72-77. <https://doi.org/10.1590/fst.20417>
- Sami F, Yusuf M, Faizan M, Faraz A, Hayat S (2016) Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* 109:54-61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.005>
- Sarri E, Termentzi A, Abraham EM, Papadopoulos GK, Baira E, et al. (2021) Salinity stress alters secondary metabolic profile of *M. sativa*, *M. arborea* and their hybrid (Arborea). *Int J Mol Sci* 22:4882. <https://doi.org/10.3390/ijms22094882>
- Seo Kim YJ, Park KY (2019) Increasing polyamine contents enhances the stress tolerance via reinforcement of antioxidative properties. *Front Plant Sci* 10:1331. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01331>
- Shen B, Hohmann S, Jensen RG, Bohnert HJ (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol* 121:45-52. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.45>
- Shrivastava P, Kumar R (2015) Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J Biol Sci* 22:123-131. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>
- Stein, SE (1999) An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *J Am Soc Mass Spectrom* 10: 770-781. [https://doi.org/10.1016/s1044-0305\(99\)00047-1](https://doi.org/10.1016/s1044-0305(99)00047-1)
- Steinitz B (1999) Sugar alcohols display nonosmotic roles in regulating morphogenesis and metabolism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. *J Plant Physiol* 155:1-8. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(99\)80133-3](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(99)80133-3)
- Strobel NE, Ji C, Gopalan S, Kuc JA, He SY (1996) Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZ_{Pss} protein. *Plant J* 9:431-439. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1996.09040431.x>
- Tahjib-Ul-Arif M, Zahan MI, Karim MM, Imran S, Hunter C, Islam MS, et al. (2021) Citric acid –mediated abiotic stress tolerance in plants. *Int Mol Sci* 22:7235. <https://doi.org/10.3390/ijms22137235>

- Tampakaki AP, Panopoulos NJ (2000) Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZ_{PspH} produced in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1366–1374. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2000.13.12.1366>
- Trouvelot S, Héloir MC, Poinssot B, Gauthier A, Paris F, Guilier C, et al. (2014) Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Front Plant Sci* 5:592. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00592>
- Wang Y, Huang L, Du F, Wang J, Zhao X, Li Z, Wang W, Xu J, Fu B (2021) Comparative transcriptome and metabolome profiling reveal molecular mechanisms underlying *OsDRAP1*-mediated salt tolerance in rice. *Sci Rep* 11:5166. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84638-3>
- Williamson JD, Jennings DB, Guo WW, Pharr DM (2002) Sugar alcohols, salt stress and fungal resistance: polyols-multifunctional plant protection? *J Amer Soc Hort Sci* 127:467–473. <https://doi.org/10.21273/JASHS.127.4.467>
- Yin YG, Kobayashi Y, Sanuki A, Kondo S, Fukuda N, Ezura H (2010) Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. ‘Micro-Tom’) fruits in an ABA- and osmotic stress-independent manner. *J Exp Bot* 61:563–574. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp333>
- Zhang C, Qian J, Bao Z, Hong X, Dong H (2007) The induction of abscisic-acid-mediated drought tolerance is independent of ethylene signaling in arabidopsis plants responding to a Harpin protein. *Plant Mol Biol Rep* 25:98–114. <https://doi.org/10.1007/s11105-007-0012-5>
- Zhang J, Yang D, Li M, Shi L (2016) Metabolic profiles reveal changes in wild and cultivated soybean seedling leaves under salt stress. *PLoS ONE* 11: e0159622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159622>
- Zhang L, Xiao S, Li W, Feng W, Li J, Wu Z, Gao X, Liu F, Shao M (2011) Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *J Exp Bot* 62:4229–4238. <https://doi.org/10.1093/jxb/err131>
- Zhang M, Rajput NA, Shen D, Sun P, Zeng W, et al. (2015) A *Phytophthora sojae* cytoplasmic effector mediates disease resistance and abiotic stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Sci Rep* 5. <https://doi.org/10.1038/srep10837>
- Zhang Y, Li D, Zhou R, Wang X, Dossa K, Wang L, et al. (2019) Transcriptome and metabolome analyses of two contrasting sesame genotypes reveal the crucial biological pathways involved in rapid adaptive response to salt stress. *BMC Plant Biol* 19. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1665-6>
- Zhang Z, Mao C, Shi Z, Kou X (2017) The amino acid metabolic and carbohydrate metabolic pathway play important roles during salt-stress response in tomato. *Front Plant Sci* 17:1231. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01231>
- Zhou X, Liu Y, Huang J, Liu Q, Sun J, Cai X, Tang P, Liu W, Miao W (2019) High temperatures affect the hypersensitive reaction, disease resistance and gene expression induced by a novel harpin HpaG-Xcm. *Sci Rep* 9:990. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37886-9>
- Zörb C, Schmitt, Neeb A, Karl S, Linder M, Schubert S (2004) The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. 167: 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.03.004>
- Zörb C, Geilfus CM, Dietz KJ (2019) Salinity and crop yield. *Plant Biol* 21:31–38. <https://doi.org/10.1111/plb.12884>

Κεφάλαιο 6

Αξιολόγηση *hpaA*-διαγονιδιακών σειρών του είδους *N. benthamiana* υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας

Περίληψη

Οι τελεστές που προέρχονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια έχει αποδειχθεί ότι, πέραν της παθογόνου δράσης τους, εμπλέκονται στη σηματοδότηση της άμυνας που προέρχεται από παθογόνα (PTI), μεταβάλλοντας ταυτόχρονα τις αμυντικές αποκρίσεις των φυτών σε μεταγραφικό επίπεδο. Η πρωτεΐνη HraA, που εμφανίζει υψηλή συντήρηση στο γένος *Xanthomonas* spp., έχει αναγνωριστεί ως βασικός ρυθμιστής του T3SS καθώς προάγει την αποτελεσματική έκκριση των T3SS συστατικών, δρώντας παράλληλα ως εκκρινόμενος ρυθμιστής της συνοδού πρωτεΐνης HraB, διότι η έκκρισή της ελευθερώνει την τελευταία, οδηγώντας σε μετατόπιση των HraB-εξαρτώμενων τελεστών. Με δεδομένο ότι στην πρωτεΐνη HraA έχει αποδοθεί ρόλος T3SS τελεστή και ότι ο ρόλος της *in planta* δεν έχει αποσαφηνισθεί, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaA* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε η απόκριση *hpaA*-διαγονιδιακών φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana* στην καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών. Στη φάση της βλάστησης, η αξιολόγηση βασίστηκε στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων και στο δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε D-mannitol (0, 100, 200, 300 mM) και NaCl (0, 100, 200 mM) για την καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας αντίστοιχα. Για τη μελέτη της απόκρισης των *hpaA*-σειρών, συγκριτικά με φυτά wt, σε μεταγενέστερα στάδια, φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων υποβλήθηκαν σε πλήρη στέρηση νερού για διάστημα 10 ημερών, ακολουθούμενο από πλήρη άρδευση για 2 ημέρες, καθώς και σε ριζοπότισμα με διαλύματα NaCl (0, 100, 200 mM) για διάστημα 20 ημερών για την καταπόνηση ξηρασίας και αλατότητας αντίστοιχα. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας βασίστηκε στη συμπτωματολογία, στο ποσοστό επιβίωσης των φυτών καθώς και σε αναπτυξιακά και φυσιολογικά γνωρίσματα, όπως η ποσότητα χλωροφύλλης, η απώλεια νερού λόγω διαπνοής και η ποσότητα προλίνης των φύλλων. Στο σύνολό τους, τα ευρήματα της μελέτης υποδεικνύουν τη διαφορική απόκριση των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt στις καταπονήσεις της ξηρασίας και της υψηλής αλατότητας και υπογραμμίζουν την υπερέχουσα επίδοση των σειρών #1 και #5 έναντι των υπολοίπων. Η παρούσα μελέτη συνιστά την πρώτη αναφορά σχετικά με την επίδραση της έκφρασης του *hpaA in planta*, παρέχοντας περαιτέρω ενδείξεις σχετικά με τη θετική επίδραση της ετερόλογης έκφρασης τελεστών στην άμυνα των φυτών έναντι καταπονήσεων. Παρά την αδυναμία σύνδεσης με συγκεκριμένες μοριακές και βιοχημικές οδούς άμυνας, η παρατηρηθείσα προηγμένη ανθεκτικότητα πιθανά αποδίδεται στην ενεργοποίηση της γενικής άμυνας των φυτών λόγω της ενδογενούς έκφρασης του γονιδίου *hpaA*.

Το παρόν κεφάλαιο αποτελεί τροποποίηση της παρακάτω δημοσίευσης: Παυλή ΟΙ, Κελαϊδή Γ, Μητσοπούλου Ν, Αντωνίου Ε, Μουρατίδου Κ, Σκαράκης ΓΝ (2018). Η έκφραση του γονιδίου *hpaA* σε φυτά επάγει ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών. 17-19 Οκτωβρίου 2018 Πάτρα Σελ 76.

Εισαγωγή

Τα φυτά εκτίθενται συνεχώς σε πληθώρα περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, τα οποία επηρεάζουν δυσμενώς την αύξηση και ανάπτυξη, πλήττοντας την παραγωγικότητα και την οικονομική βιωσιμότητα των καλλιεργειών. Μεταξύ των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, η ξηρασία και η υψηλή αλατότητα αποτελούν για πολλά φυτικά είδη τους κυριότερους παράγοντες καταπόνησης, με βάση τη σημαντικότητα των επιδράσεων και τη συχνότητα εμφάνισής τους (Bray et al. 2000; Tester and Langridge 2010; Golldack et al. 2014). Οι επιδράσεις τους στην παραγωγικότητα των φυτών αντανakλούν το αποτέλεσμα οσμωτικών και οξειδωτικών καταπονήσεων που εκφράζονται μέσω αφυδάτωσης κυττάρων, παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), βλαβών στα οργανίδια των κυττάρων και μεταβολικών δυσλειτουργιών, οι οποίες τελικά επηρεάζουν τα ενεργειακά αποθέματα και την ομοιόσταση των κυττάρων, ενώ η υψηλή αλατότητα προκαλεί επιπλέον ανισορροπία στην ομοιόσταση των ιόντων στα φυτικά κύτταρα (Bartels and Sunkar 2005). Οι αποκρίσεις των φυτών στις καταπονήσεις ξηρασίας και αλατότητας περιλαμβάνουν αλλαγές στα σηματοδοτικά μονοπάτια, μεταγραφική και μετα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων άμυνας, καθώς και μεταβολικές προσαρμογές, που αφορούν κυρίως στη βιοσύνθεση οσμωπροστατευτικών μορίων (Ruan and Teixeira da Silva 2011; Golldack et al. 2014; Slama et al. 2015; Khan and Khan 2019).

Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί αναφορικά με την κατανόηση των αποκρίσεων άμυνας των φυτών έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, η βελτίωση των γνωρισμάτων ανθεκτικότητας εξακολουθεί να παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς που έγκεινται κυρίως στον πολυγονιδιακό έλεγχο κληρονομιάς τους αλλά και στις πρακτικές δυσκολίες που συνοδεύουν την αξιολόγηση ενός μεγάλου αριθμού γονοτύπων σε ομοιόμορφες συνθήκες αγρού (Peleg et al. 2011). Συνεπώς, η βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων δικαιολογημένα στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς την εφαρμογή των σύγχρονων βιοτεχνολογικών μεθόδων, αξιοποιώντας γονίδια φυτικής ή μη-φυτικής προέλευσης (Bartels and Sunkar 2005; Gorantla et al. 2007). Στο πλαίσιο αυτό, έχει εφαρμοστεί επιτυχώς η μεταβολή της έκφρασης ενδογενώς εκφραζόμενων γονιδίων, όπως αυτά που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες και σηματοδοτικά μόρια που επάγουν αλλαγές σε μια σειρά σηματοδοτικών μονοπατιών προσδίδοντας ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων, αλλά και η ετερόλογη έκφραση γονιδίων ποικίλης προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων των διεγερτών προερχόμενων από παθογόνα καθώς και των πρωτεϊνών-τελεστών που εκκρίνονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια.

Ο διττός ρόλος των πρωτεϊνών-τελεστών, που εκκρίνονται εντός των φυτικών κυττάρων μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III (T3SS), αναφέρεται σε διάφορα συστήματα ξενιστών-παθογόνων (Alfano and Collmer 2004; Kamoun 2006). Οι πρωτεΐνες-τελεστές συμβάλλουν στην παθογένεια και στην ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας σε ευαίσθητα φυτικά είδη και ευαίσθητους γονοτύπους, καταστέλλοντας τις αποκρίσεις άμυνας των φυτών ή μεταβάλλοντας προς όφελός τους τη φυσιολογία των ξενιστών. Αντίθετα, σε ανθεκτικούς γονοτύπους, έπειτα από αναγνώριση των αντίστοιχων υποδοχέων, λειτουργούν ως παράγοντες αμολυσματικότητας, επάγοντας αντιδράσεις ανοσίας, συμπεριλαμβανομένης της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive Reaction, HR) (Alfano and Collmer 2004; Kamoun 2006; Hogenhout et al. 2009; Dean 2011; Thomma et al. 2011; Dou and Zhou 2012; Feng and Zhou 2012). Παρά τον κυρίαρχο ρόλο τους στην

παθογένεια, οι πρώτοι T3SS βακτηριακοί τελεστές αναγνωρίστηκαν μέσω των ιδιοτήτων αμολυσματικότητας σε ανθεκτικά φυτά, στρέφοντας το ερευνητικό ενδιαφέρον προς την πρακτική αξιοποίησή τους για ανάπτυξη διαγονιδιακής ανθεκτικότητας.

Η πρωτεΐνη HraA, που εμφανίζει υψηλή συντήρηση στο γένος *Xanthomonas* spp., έχει αναγνωριστεί ως βασικός ρυθμιστής του T3SS καθώς προάγει την αποτελεσματική έκκριση των T3SS συστατικών, συμπεριλαμβανομένων του αγωγού (pilus), του καναλιού μετατόπισης (translocon) και των πρωτεϊνών-τελεστών. Η πρωτεΐνη HraA δρα ως εκκρινόμενος ρυθμιστής της συνοδού πρωτεΐνης HraB καθώς η έκκρισή της, έπειτα από πρόσδεση στην ειδική συσκευή έκκρισης, ελευθερώνει τη συνοδό HraB, προάγοντας τη μετατόπιση των HraB-εξαρτώμενων τελεστών (Lorenz et al. 2008). Στην πρωτεΐνη HraA έχει αποδοθεί ρόλος T3SS τελεστή, λόγω της συνεισφοράς της στην παθογένεια και στην ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας σε ευαίσθητους γονοτύπους και στην επαγωγή της HR σε ανθεκτικούς γονοτύπους (Huguet et al. 1998; Lorenz et al. 2008; Lu et al. 2008; Büttner and Bonas 2010). Με δεδομένο ότι ο ρόλος της πρωτεΐνης HraA *in planta* δεν έχει αποσαφηνισθεί, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η μελέτη της απόκρισης *hraA*-διαγονιδιακών φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana* σε αβιοτικές καταπονήσεις, ειδικότερα της ξηρασίας και της υψηλής αλατότητας, στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών.

Υλικά και Μέθοδοι

Γενετικό υλικό

Το γενετικό υλικό αφορά σε σπόρους διαγονιδιακών σειρών του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *hraA* που προέρχεται από το βακτήριο *X. campestris* pv. *campestris* (στέλεχος ATCC 33913). Οι διαγονιδιακές σειρές δημιουργήθηκαν μέσω γενετικού μετασχηματισμού με τη χρήση πρωτοκόλλου φυλλικών δίσκων (Horsch et al. 1985) και φορέα το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* (στέλεχος GV3101) που είχε προηγουμένως μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pK7WG2D (Karimi et al. 2002). Η δημιουργία των γονιδιακών κασετών και ο γενετικός μετασχηματισμός των σειρών πραγματοποιήθηκαν από την κα Γ. Κελαϊδή, στο πλαίσιο εκπόνησης της διδακτορικής της διατριβής (ΓΠΑ).

Με στόχο την αναγνώριση και επιλογή σειρών που είναι ομοζύγωτες ως προς το διαγονίδιο *hraA*, αρχικά έγινε έλεγχος του επιπέδου ζυγωτίας των διαθέσιμων διαγονιδιακών σειρών T₂ γενεάς που προέρχονταν από διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού (T₀). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε επιφανειακή απολύμανση των σπόρων με καθαρή αιθανόλη (1 min) και τοποθέτησή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium (Murashige and Skoog 1962) που περιείχε το αντιβιοτικό καναμυκίνη (kan: 150 µg/ml). Οι *hraA*-διαγονιδιακές σειρές που δεν εμφάνιζαν διάσπαση ως προς το γνώρισμα ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (βλάστηση του συνόλου των σπόρων), ελέγχθηκαν για την ένθεση και έκφραση του διαγονιδίου μέσω αντιδράσεων PCR και RT-PCR.

Για τον έλεγχο της ένθεσης του *hraA*, έγινε απομόνωση ολικού DNA (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) και ακολούθησε αντίδραση PCR με τη χρήση των εκκινητών *hraA*-F: ATGATCCGGCGCATTTTCGCCA και *hraA*-R: TCATGCGCGAATCTCCTGAGCGG για την ενίσχυση αλληλουχίας μεγέθους 816 bp, που αντιστοιχεί στο γονίδιο *hraA*. Το

μίγμα της PCR περιείχε 1 μl DNA ως μήτρα, 1.25 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0.25 μM από κάθε εκκινητή, 1.25 u Taq polymerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega), 1x ρυθμιστικού διαλύματος σε τελικό όγκο 25 μl. Το πρόγραμμα της ενίσχυσης περιλάμβανε έναν αρχικό κύκλο στους 94 °C για 5 min ενώ ακολούθησαν 30 κύκλοι των 30 sec στους 94 °C, 1 min στους 57 °C, 1 min στους 72 °C και έναν τελικό κύκλο επιμήκυνσης στους 72 °C για 7 min. Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηχτή αгарόζης 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X), που περιείχε 1 % βρωμιούχο αιθίδιο. Για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *hpaA*, έγινε απομόνωση RNA (RNAeasy plant mini kit, Qiagen) από τα PCR-θετικά φυτά και ακολούθησε η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Im-Prom II Reverse Transcriptase System, Promega) για τη δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA). Η αντίδραση RT-PCR έγινε με τη χρήση των εκκινητών και τις συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω.

Βάσει του ανωτέρω ελέγχου, έγινε επιλογή 4 *hpaA*-ομοζύγωτων σειρών (#1, #2, #4, #5), οι οποίες προέρχονταν από διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού (T₀), προς αξιοποίηση στις δοκιμασίες αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. Με βάση τα ευρήματα της *in vitro* αξιολόγησης, επιλέχθηκαν 3 *hpaA*-σειρές (#1, #2, #5) για περαιτέρω αξιολόγηση της απόκρισής τους στο στάδιο των ώριμων φυτών. Στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας, συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες φυτά αγρίου τύπου (wild type plants-wt).

Καταπόνηση ξηρασίας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών

Η αξιολόγηση της απόκρισης των *hpaA*-σειρών, συγκριτικά με τα φυτά wt, στην καταπόνηση ξηρασίας έγινε μέσω βλάστησης των σπόρων σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε D-mannitol και εκτίμησης του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων. Για κάθε συνδυασμό σειράς-επιπέδου καταπόνησης πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις (τριβλία) των 15 σπόρων. Αρχικά, έγινε επιφανειακή απολύμανση των σπόρων των *hpaA*-σειρών (T₂ γενεά) και των φυτών wt, μέσω εμβάπτισης σε καθαρή αιθανόλη (1 min), και ακολούθησε τοποθέτησή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium, εμπλουτισμένου με διαφορετικές συγκεντρώσεις D-mannitol (0, 100, 200, 300 mM). Τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον υπό συνθήκες φωτοπεριόδου 16/8 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασίας 25 °C. Η απόκριση των *hpaA*-σειρών, συγκριτικά με τα φυτά wt, αξιολογήθηκε βάσει του ποσοστού βλάστησης των σπόρων και του μήκους των σποροφύτων για χρονικό διάστημα 20 ημερών.

Για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των *hpaA*-σειρών στην καταπόνηση ξηρασίας στο στάδιο των ώριμων φυτών, χρησιμοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις (ατομικά φυτά) για κάθε συνδυασμό σειράς-επιπέδου καταπόνησης. Έπειτα από επιφανειακή απολύμανση των σπόρων των *hpaA*-σειρών και φυτών wt, με εμβάπτιση σε καθαρή αιθανόλη (1 min), έγινε σπορά σε φυτοδοχεία με μίγμα τύρφης: περλίτη (3:1) και ακολούθησε μεταφύτευση σε φυτοδοχεία με μίγμα τύρφης: χώματος: περλίτη (1:1:1) όταν τα φυτά βρίσκονταν στο στάδιο των 3-5 πραγματικών φύλλων. Φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων υποβλήθηκαν σε πλήρη στέρηση νερού για χρονικό διάστημα 10 ημερών ενώ, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κανονική άρδευση για 2 ημέρες, με στόχο την εκτίμηση της ικανότητας ανάκαμψής τους.

Στο πλαίσιο μελέτης της απόκρισης των φυτών στην καταπόνηση ξηρασίας, χρησιμοποιήθηκαν ως παράμετροι αξιολόγησης το ποσοστό επιβίωσης, η ανάπτυξη συμπτωμάτων καταπόνησης, η μέτρηση της επιφάνειας του ελάσματος (cm^2) και η περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης με τη χρήση του χλωροφυλλόμετρου SPAD-502 Meter (Konica Minolta), μέσω μέτρησης 4 υγιών πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων στο 1/3 του μήκους του ελάσματος. Περαιτέρω, υπολογίστηκε το νωπό και ξηρό βάρος και η σχετική περιεκτικότητα νερού των φύλλων, το μήκος της ρίζας, το νωπό και ξηρό βάρος της ρίζας, η απώλεια νερού λόγω διαπνοής και η ποσότητα προλίνης των φύλλων. Το ποσοστό επιβίωσης των φυτών υπολογίστηκε μέσω του αριθμού των φυτών που επιβίωσαν προς το συνολικό αριθμό φυτών. Για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους, έγινε επώαση των δειγμάτων φύλλων και ρίζας στους 70°C για 24 h και 48 h, αντίστοιχα. Για την εκτίμηση του ρυθμού απώλειας νερού λόγω διαπνοής ακολουθήθηκε η μέθοδος των Qi et al. (2019). Εν συντομία, έγινε αποκοπή υγιών πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων και καταγραφή του βάρους τους σε τακτά χρονικά διαστήματα, υπό συνθήκες επώασης στους 20°C . Ο προσδιορισμός του ρυθμού απώλειας νερού έγινε με βάση τον τύπο: $[(\text{Αρχικό νωπό βάρος} - \text{Τελικό νωπό βάρος}) / \text{Αρχικό νωπό βάρος}] \times 100$. Για την εκτίμηση της ποσότητας προλίνης, έγινε λειοτρίβηση φυλλικού ιστού (100 mg) με αιθανόλη 70 % και, έπειτα από φυγοκέντριση στις 4.000 rpm για 10 min, έγινε τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 95°C για 25 min και άμεση μεταφορά τους σε παγόλουτρο. Έπειτα από φυγοκέντριση στις 4.000 rpm για 5 min, ακολούθησε εκτίμηση της ποσότητας προλίνης φασματοφωτομετρικά στα 520 nm.

Καταπόνηση υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών

Για την εκτίμηση της απόκρισης των *hpaA*-σειρών, συγκριτικά με τα φυτά wt, στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας έγινε βλάστηση των σπόρων σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε NaCl και προσδιορισμός του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων. Για κάθε συνδυασμό σειράς-επιπέδου καταπόνησης, χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις (τριβλία) των 15 σπόρων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απολύμανση των σπόρων των *hpaA*-σειρών (T_2 γενεά) και των φυτών wt, μέσω εμβάπτισης σε καθαρή αιθανόλη (1 min), και ακολούθησε τοποθέτηση σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS medium παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0, 100, 200 mM). Τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον υπό συνθήκες φωτοπερίόδου 16/8 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασίας 25°C . Ως παράμετροι αξιολόγησης αξιοποιήθηκαν το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και το μήκος των σποροφύτων που εκτιμήθηκε για χρονικό διάστημα 20 ημερών.

Στο πλαίσιο μελέτης της απόκρισης των *hpaA*-σειρών, συγκριτικά με τα φυτά wt, στο στάδιο των ώριμων φυτών, χρησιμοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις (ατομικά φυτά) για κάθε συνδυασμό σειράς-επιπέδου καταπόνησης. Έπειτα από επιφανειακή απολύμανση των σπόρων, με χρήση καθαρής αιθανόλης (1 min), σπόροι των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt τοποθετήθηκαν σε φυτοδοχεία με μίγμα τύρφης: περλίτη (3:1). Στο στάδιο των 3-5 πραγματικών φύλλων, έγινε μεταφύτευση σε φυτοδοχεία με μίγμα τύρφης: χώματος: περλίτη (1:1:1). Φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας

μέσω ριζοποτίσματος με διαλύματα NaCl (0, 100, 200 mM) για χρονικό διάστημα 20 ημερών.

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας βασίστηκε στο μακροσκοπικό έλεγχο των συμπτωμάτων καταπόνησης, ανά τακτά χρονικά διαστήματα (3 ημέρες), και στον προσδιορισμό της ποσότητας χλωροφύλλης άθικτων φύλλων, με τη χρήση χλωροφύλλόμετρου SPAD-502 Meter (Konica Minolta), και φυλλικών δίσκων, σύμφωνα με τη μέθοδο των Winternans and de Mots (1965). Συνοπτικά, έγινε αποκοπή φυλλικών δίσκων, διαμέτρου 6 mm, από υγιή πλήρως ανεπτυγμένα μεσαία φύλλα και τοποθέτησή τους σε 20 ml διαλύματος NaCl διαφορετικής συγκέντρωσης (0, 100, 200 mM) για 72 h. Έπειτα από εμβάπτιση των φυλλικών δίσκων σε αιθανόλη για 1 h ή έως αποχρωματισμού, έγινε επώαση για 30 min στο σκοτάδι και ακολούθησε εκτίμηση των chl_a, chl_b και ολικής χλωροφύλλης σε φασματοφωτόμετρο στα 665 και 649 nm.

Στατιστική ανάλυση

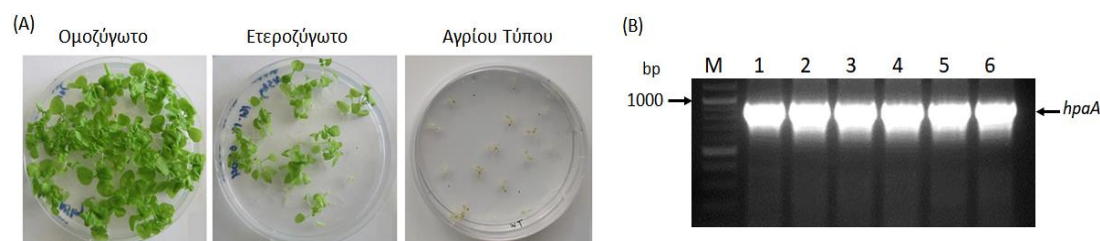
Για κάθε παράμετρο και επίπεδο καταπόνησης, χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο. Οι επιδράσεις των κύριων παραγόντων καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους εξετάστηκαν ως προς τη σημαντικότητα μέσω ανάλυσης ANOVA ($P \leq 0.05$). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου JMP v.7 (SAS, Cary, NC, USA).

Αποτελέσματα

Επιλογή των ομοζύγων *hpaA*-διαγονιδιακών σειρών

Με στόχο την επιλογή των ομοζύγων *hpaA*-σειρών έγινε βλάστηση των σπόρων των διαθέσιμων *hpaA*-σειρών (T_2 γενεά) σε θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής που περιείχε το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Η επιλογή για ομοζυγωτία ως προς το διαγονίδιο *hpaA* έγινε έμμεσα, βάσει της έκφρασης του γονιδίου-δείκτη *nptII* που κωδικοποιεί τη φωσφοτρανσφεράση τύπου II της νεομυκίνης και προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Ως ομοζύγωτες χαρακτηρίστηκαν οι σειρές που εμφάνισαν απουσία διάσπασης ως προς την ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη και συνεπώς παρατηρήθηκε βλάστηση του συνόλου των σπόρων. Αντίθετα, ως ετεροζύγωτες χαρακτηρίστηκαν οι σειρές που εμφάνισαν πρότυπο κληρομόνησης μονογονιδιακού γνωρίσματος (3:1) (Εικόνα 1Α). Ακολούθησε έλεγχος της ένθεσης και έκφρασης του διαγονιδίου *hpaA*, μέσω αντιδράσεων PCR και RT-PCR, όπου επιβεβαιώθηκε η διαγονιδιακή φύση των ανθεκτικών στην καναμυκίνη σειρών μέσω της ενίσχυσης προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους (816 bp) (Εικόνα 1Β).

Όλοι οι απόγονοι αυτογονιμοποίησης της T_2 γενεάς εμφάνιζαν φαινότυπο ανάλογο με εκείνον των φυτών wt όσον αφορά τα μορφολογικά και αναπτυξιακά γνωρίσματα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η ενδογενής έκφραση του γονιδίου *hpaA* δε μεταβάλλει το φαινότυπο των φυτών.



Εικόνα 1. Επιλογή των *hpaA*-σειρών προς αξιοποίηση στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας στις καταπονήσεις ξηρασίας και αλατότητας. (Α) Έμμεσος έλεγχος της ζυγωτίας για το διαγονίδιο *hpaA*, βάσει της έκφρασης του γονιδίου-δείκτη *nptII* που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη, υπό συνθήκες πίεσης επιλογής (150 $\mu\text{g/ml}$), (Β) Προϊόντα PCR σε γονιδιωματικό DNA των φυτών του είδους *N. benthamiana*. M: Μάρτυρας σε bp (100 bp DNA Ladder, NEB). 1-6: Διαγονιδιακά φυτά που φέρουν το γονίδιο *hpaA* (816 bp).

Αυξημένη ανθεκτικότητα των *hpaA*-σειρών έναντι καταπόνησης ξηρασίας

Η μελέτη της απόκρισης των *hpaA*-σειρών, συγκριτικά με φυτά wt, στην καταπόνηση ξηρασίας στη φάση της βλάστησης, έγινε βάσει του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων D-mannitol (0, 100, 200, 300 mM). Απουσία καταπόνησης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο κατηγοριών φυτών ως προς το ποσοστό βλάστησης (95-100 %), με εξαίρεση τη σειρά #4 που εμφάνισε σημαντικά μειωμένες τιμές (86,66 %). Υπό συνθήκες καταπόνησης, σημειώθηκε τάση μείωσης του ποσοστού βλάστησης, η οποία ήταν γενικά ανάλογη του εφαρμοζόμενου επιπέδου, επιφέροντας δραστικότερη μείωση στα 300 mM D-mannitol (Πίνακας 1). Μεταξύ των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών, το υψηλότερο ποσοστό βλάστησης εμφάνισε η σειρά #5, ακολουθούμενη από τη σειρά #1, σε όλα τα επίπεδα καταπόνησης (Πίνακας 1). Στο επίπεδο των 300 mM D-mannitol, όπου μεγιστοποιήθηκαν οι απώλειες ως προς το ποσοστό βλάστησης, το σύνολο των διαγονιδιακών σειρών εμφάνισε καλύτερη επίδοση συγκριτικά με τα φυτά wt. Ειδικότερα, τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα εμφάνισαν οι σειρές #4 και #5 (1,92 και 3,39 %, αντίστοιχα), ενώ αντίθετα τα φυτά wt παρουσίασαν την πλέον μεγαλύτερη μείωση έναντι του μάρτυρα (29,83 %) (Πίνακας 3).

Πίνακας 1. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο ποσοστό βλάστησης (%) των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό βλάστησης (%)									
	Συγκέντρωση D-mannitol (mM) (M)									
	0		100		200		300		M.O.(M)	
wt	95,00	ab	91,66	a	86,66	ab	66,66	b	85,00	bc
#1	100	a	98,33	a	100	a	86,66	ab	96,25	a
#2	100	a	96,66	a	88,33	ab	80,00	ab	91,25	ab
#4	86,66	b	75,00	b	75,00	b	85,00	ab	80,42	c
#5	98,33	a	100	a	100	a	95,00	a	98,33	a
M.O. (Σ)	96,00	a	92,33		90,00	ab	82,66	b		

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Σχετικά με τη μετα-βλαστική ανάπτυξη των σποροφύτων, ήταν επίσης εμφανής η ανασταλτική επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας, που επέφερε σταδιακή μείωση με αύξηση της συγκέντρωσης D-mannitol. Ωστόσο, οι υπό μελέτη κατηγορίες φυτών διέφεραν σημαντικά ως προς το μήκος των σποροφύτων τόσο υπό κανονικές όσο και υπό συνθήκες καταπόνησης, με τις διαφορές αυτές να αντανακλώνται επίσης σε φαινοτυπικό επίπεδο. Έτσι, ήταν ορατή η υπεροχή των σειρών #1 και #5 σε όλα τα επίπεδα καταπόνησης, η οποία εκφράστηκε ως καλύτερη ευρωστία και μεγαλύτερη επιφάνεια ελάσματος (Εικόνα 2). Απουσία καταπόνησης, οι σειρές #5 και #2 εμφάνισαν το μεγαλύτερο και μικρότερο μήκος σποροφύτων αντίστοιχα (Πίνακας 2). Υπό συνθήκες καταπόνησης, παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση ως προς το δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων. Σύμφωνα με τις μέσες τιμές σε όλα τα επίπεδα καταπόνησης, το μεγαλύτερο μήκος σποροφύτων εμφάνισαν οι σειρές #1 και #5 καθώς και τα φυτά wt (Πίνακας 2). Ειδικότερα, στα 100 mM D-mannitol το μεγαλύτερο μήκος εμφάνισαν οι σειρές #1 και #5 και το μικρότερο η σειρά #4. Στα 200 mM D-mannitol, το μεγαλύτερο μήκος εμφάνισαν οι σειρές #1, #5 και τα φυτά wt, ενώ στα 300 mM D-mannitol τις υψηλότερες τιμές παρουσίασαν η σειρά #1 και τα φυτά wt (Πίνακας 2). Επίσης, βάσει της μείωσης έναντι του μάρτυρα, που αποτελεί βασικό κριτήριο καθώς αντανακλά την επίδραση της καταπόνησης *per se*, την καλύτερη απόκριση εμφάνισε η σειρά #1 που χαρακτηρίστηκε από τη μικρότερη μείωση στο μήκος σποροφύτων στα 300 mM D-mannitol (Πίνακας 3).

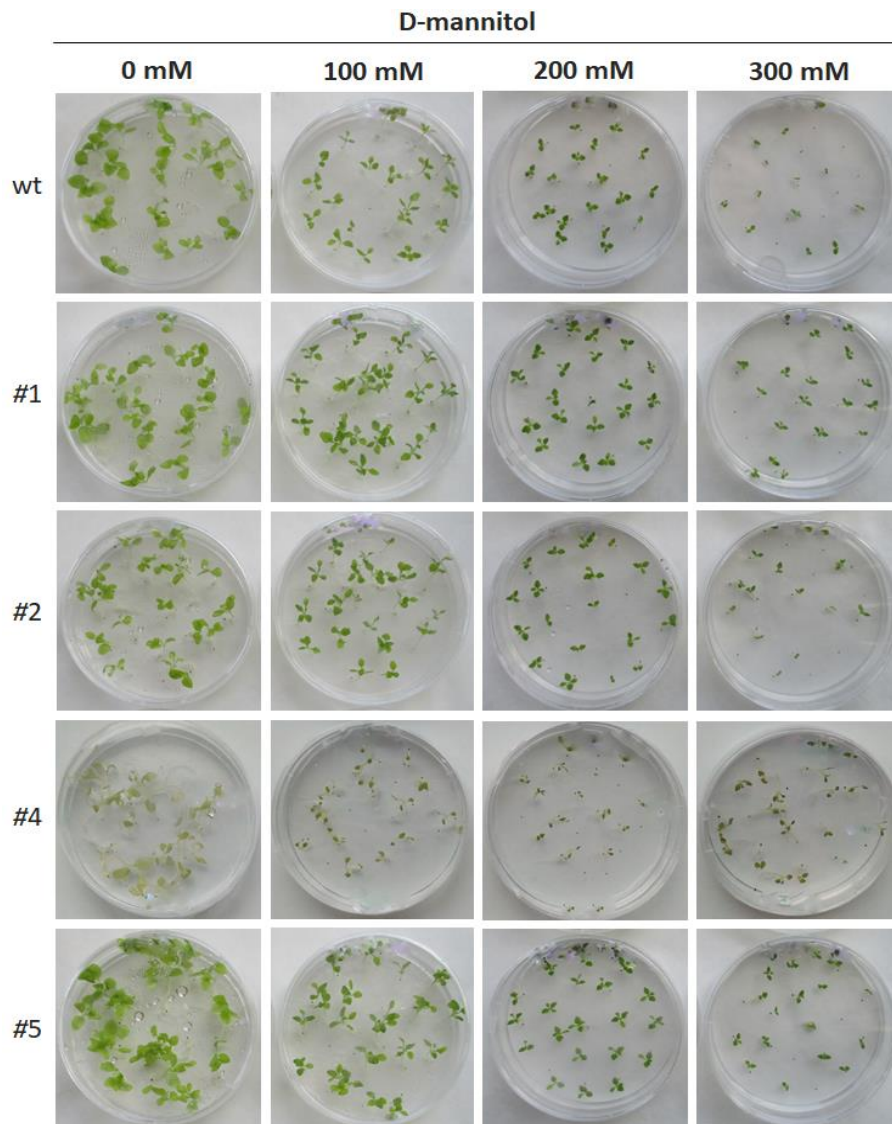
Πίνακας 2. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο μήκος των σποροφύτων (cm) των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Μήκος Σποροφύτων (cm)									
	Συγκέντρωση D-mannitol (mM) (M)									
	0		100		200		300		M.O.(M)	
wt	4,13	b	3,20	b	2,85	a	2,20	a	3,09	a
#1	4,10	b	3,40	a	2,78	a	2,23	a	3,13	a
#2	3,18	d	2,93	c	2,23	b	0,95	d	2,32	b
#4	3,50	c	2,80	c	1,95	c	1,45	c	2,43	b
#5	4,43	a	3,38	a	3,00	a	1,83	b	3,16	a
M.O. (Σ)	3,87	a	3,14	b	2,56	c	1,73	d		

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

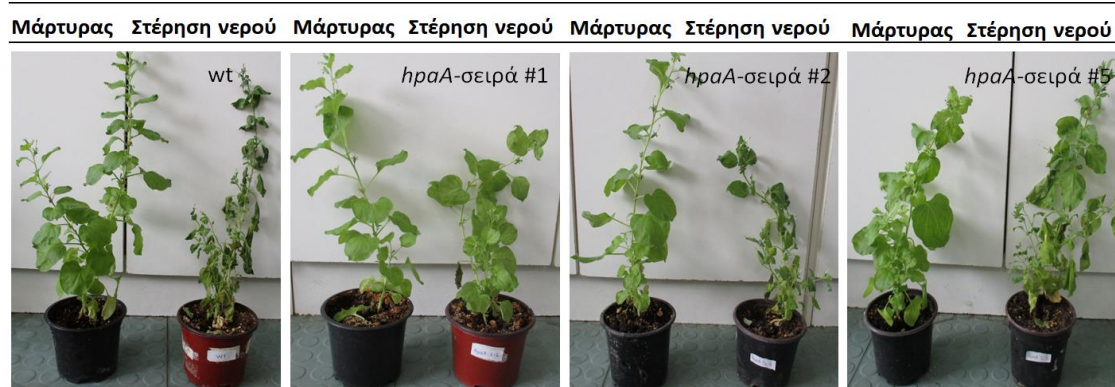
Πίνακας 3. Επίδραση του επιπέδου καταπόνησης ξηρασίας (0, 100, 200, 300 mM D-mannitol) στις *hpaA*-σειρές και στα φυτά wt στη φάση της βλάστησης.

Μεταχείριση Σειρά	Μείωση έναντι του μάρτυρα (%)					
	Ποσοστό βλάστησης			Μήκος σποροφύτων		
	Συγκέντρωση D-mannitol					
	100 mM	200 mM	300 mM	100 mM	200 mM	300 mM
wt	3,52	8,78	29,83	22,52	30,99	46,73
#1	1,67	0	13,34	17,07	32,19	45,61
#2	3,34	11,67	20,00	7,86	29,87	70,13
#4	13,45	13,45	1,92	20,00	44,28	58,57
#5	-1,67	-1,67	3,39	23,70	32,28	58,69



Εικόνα 2. Συγκριτική απόκριση των *hpaA*-σειρών (#1, #2, #4, #5) και των φυτών wt ως προς το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας (0, 100, 200, 300 mM D-mannitol).

Στο πλαίσιο περαιτέρω μελέτης σχετικά με την επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hpaA* στην απόκριση των φυτών στην καταπόνηση ξηρασίας στο στάδιο των ώριμων φυτών, φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων υποβλήθηκαν σε πλήρη στέρηση νερού για χρονικό διάστημα 10 ημερών ακολουθούμενη από πλήρη άρδευση για δύο ημέρες, ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα ανάκαμψής τους. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, οι υπό μελέτη κατηγορίες φυτών διέφεραν σημαντικά ως προς την απόκριση στην καταπόνηση, με τις *hpaA*-σειρές να εμφανίζουν σαφή υπεροχή έναντι των φυτών wt. Τα τελευταία, χαρακτηρίστηκαν από γενικευμένο μαρασμό, έντονη κύρτωση του ελάσματος και νέκρωση των κατώτερων φύλλων (Εικόνα 3). Αντίθετα, οι *hpaA*-σειρές εμφάνισαν ηπιότερα συμπτώματα κύρτωσης του ελάσματος και μαρασμού, ενώ η σειρά #1 χαρακτηρίστηκε από σαφώς βελτιωμένη απόκριση σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Αξίζει δε να σημειωθεί ότι, έπειτα από κανονική άρδευση για διάστημα 2 ημερών, τα φυτά wt χαρακτηρίστηκαν από αδυναμία ανάκαμψης, ενώ η σειρά #1 εμφάνισε πλήρη ανάκαμψη.



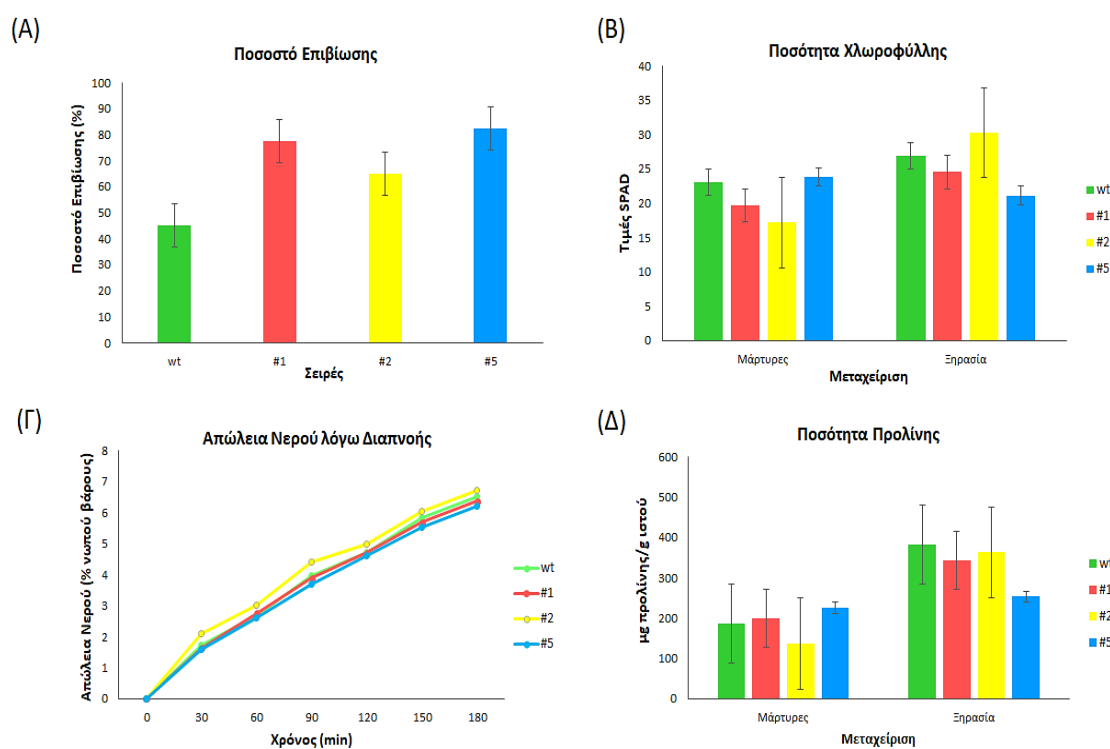
Εικόνα 3. Συγκριτική απόκριση των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt στην υδατική καταπόνηση στο στάδιο των ώριμων φυτών.

Σε συμφωνία με τα φαινοτυπικά ευρήματα, το σύνολο των *hpaA*-σειρών εμφάνισε υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης συγκριτικά με τα φυτά wt. Ειδικότερα, το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης εμφάνισαν οι σειρές #1 και #5 (77,50 % και 82,50 %, αντίστοιχα), ενώ τα φυτά wt παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη ικανότητα επιβίωσης (45 %) (Εικόνα 4Α, Παράρτημα V). Σε αναπτυξιακό επίπεδο, οι υπό μελέτη κατηγορίες φυτών διέφεραν σημαντικά ως προς το σύνολο των γνωρισμάτων που αξιοποιήθηκαν ως παράμετροι αξιολόγησης. Η καταπόνηση επέφερε σημαντική μείωση της επιφάνειας του ελάσματος στα φυτά wt (20,34 %), ενώ στις σειρές #1 και #2 δεν παρουσιάστηκε μεταβολή και η σειρά #5 εμφάνισε μικρή μείωση (7,24 %) (Πίνακας 4, Παράρτημα V). Ως προς το νωπό βάρος των φύλλων, τα φυτά wt εμφάνισαν τη μεγαλύτερη μείωση έναντι του μάρτυρα (23,56 %), ενώ οι σειρές #1 και #2 παρουσίασαν απουσία μεταβολής και αύξηση (31,08 %) αντίστοιχα (Πίνακας 4). Αντίθετα, το ξηρό βάρος των φύλλων παρέμεινε ανεπηρέαστο στα φυτά wt και στη σειρά #5, ενώ αυξήθηκε σημαντικά στις σειρές #1 και #2 (Πίνακας 4, Παράρτημα V). Επίσης, η σχετική περιεκτικότητα νερού των φύλλων μεταβλήθηκε σημαντικά, εμφανίζοντας μείωση σε όλα τα φυτά. Τη μεγαλύτερη μείωση εμφάνισαν τα φυτά wt (35,08 %), ενώ η μικρότερη παρατηρήθηκε στη σειρά #5, ακολουθούμενη από τη σειρά #1 (10,77 % και 23,44 %, αντίστοιχα) (Πίνακας 4, Παράρτημα V). Ως προς το νωπό και ξηρό βάρος της ρίζας, σημειώθηκε αύξηση στο σύνολο των υπό μελέτη φυτών, με εξαίρεση το νωπό βάρος της ρίζας στη σειρά #5 που εμφάνισε μικρή μείωση (4,17 %). Τη μεγαλύτερη αύξηση νωπού και ξηρού βάρους ρίζας έναντι του μάρτυρα εμφάνισαν οι σειρές #1 και #2 (Πίνακας 4, Παράρτημα V).

Πίνακας 4. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στην επιφάνεια του ελάσματος, στο νωπό και ξηρό βάρος των φύλλων στη σχετική περιεκτικότητα νερού των φύλλων και στο νωπό και ξηρό βάρος της ρίζας στις *hpaA*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Μείωση έναντι του μάρτυρα (%)					
	Επιφάνεια ελάσματος	Νωπό βάρος φύλλων	Ξηρό βάρος φύλλων	Σχετική Περιεκτικότητα Νερού	Νωπό βάρος ρίζας	Ξηρό βάρος ρίζας
wt	20,34	23,56	0	35,08	-11,46	-78,75
#1	-1,61	1,71	-20,00	23,44	-50,00	-143,68
#2	-0,67	-31,08	-57,14	29,22	-42,64	-199,00
#5	7,24	15,62	0	10,77	4,17	-48,80

Αναφορικά με την περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη, η καταπόνηση ξηρασίας οδήγησε σε αύξηση της χλωροφύλλης στο σύνολο των φυτών, με εξαίρεση τη σειρά #5 που εμφάνισε μικρή μείωση έναντι του μάρτυρα. Αντίθετα, η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη παρατηρήθηκε στα φύλλα της σειράς #2 (Εικόνα 4B, Παράρτημα V). Σχετικά με το ρυθμό απώλειας νερού λόγω διαπνοής, όπως αναμενόταν, καταγράφηκε σταδιακή αύξηση με την πάροδο του χρόνου. Τη μεγαλύτερη απώλεια εμφάνισαν τα φύλλα της σειράς #2, ακολουθούμενα από τα φυτά wt, ενώ η μικρότερη απώλεια παρατηρήθηκε στη σειρά #5 (Εικόνα 4Γ, Παράρτημα V). Τέλος, η καταπόνηση ξηρασίας επέφερε σημαντική αύξηση στην περιεκτικότητα των φύλλων σε προλίνη στο σύνολο των φυτών που μελετήθηκαν. Απουσία καταπόνησης, τη μεγαλύτερη ποσότητα προλίνης εμφάνισαν οι σειρές #1 και #5. Υπό συνθήκες καταπόνησης, τα φυτά wt και η σειρά #2 εμφάνισαν τη μεγαλύτερη αύξηση, ενώ τη μικρότερη μεταβολή παρουσίασε η σειρά #5 (Εικόνα 4Δ, Παράρτημα V). Τα συνολικά ευρήματα υποστηρίζουν τη βελτιωμένη απόκριση των σειρών #1 και #5 στην καταπόνηση ξηρασίας τόσο στη φάση της βλάστησης όσο και στο στάδιο των ώριμων φυτών, παρέχοντας ενδείξεις ότι η ενδογενής έκφραση του γονιδίου *hpaA* στο είδος *N. benthamiana* οδηγεί σε προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι της καταπόνησης ξηρασίας.



Εικόνα 4. Συγκριτική απόκριση των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας στο στάδιο των ώριμων φυτών. (Α) Ποσοστό επιβίωσης (%) (Β) Περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη, βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD. Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τεσσάρων επαναλήψεων ($n = 4$). (Γ) Απώλεια νερού λόγω διαπνοής. Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τριών επαναλήψεων ($n = 3$). (Δ) Ποσότητα προλίνης ($\mu\text{g/g}$ φυτικού ιστού). Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τεσσάρων επαναλήψεων ($n = 4$).

Αυξημένη ανθεκτικότητα των *hpaA*-σειρών έναντι καταπόνησης υψηλής αλατότητας

Για τη μελέτη της απόκρισης των *hpaA*-σειρών, συγκριτικά με φυτά wt, στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας κατά τη φάση της βλάστησης, εκτιμήθηκε το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0, 100, 200 mM). Απουσία καταπόνησης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο ποσοστό βλάστησης μεταξύ των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt (98,33 - 100 %), με εξαίρεση τη σειρά #4 που εμφάνισε σημαντικά μειωμένες τιμές (85 %) (Πίνακας 5). Ωστόσο, η απόκριση των φυτών στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης διέφερε σημαντικά. Στα 100 mM NaCl, η σειρά #5 και τα φυτά wt εμφάνισαν το υψηλότερο ποσοστό βλάστησης (93,33 και 91,66 % αντίστοιχα), ενώ η σειρά #1 σημείωσε τις χαμηλότερες τιμές (Πίνακας 5). Η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης NaCl στα 200 mM επέφερε αδυναμία βλάστησης στο σύνολο των φυτών, υποδεικνύοντας την αρνητική επίδραση της καταπόνησης. Βάσει της μείωσης του ποσοστού βλάστησης έναντι του μάρτυρα, την καλύτερη επίδοση εμφάνισαν η σειρά #5 και τα φυτά wt (6,67 % και 6,78 %, αντίστοιχα), ενώ στη σειρά #1 σημειώθηκε η δραστικότερη μείωση (35 %) (Πίνακας 6). Η επίδραση της καταπόνησης ήταν σαφώς έκδηλη και στο δυναμικό ανάπτυξης, επιφέροντας δραστική μείωση στο σύνολο των φυτών. Απουσία καταπόνησης, η σειρά #5, ακολουθούμενη από την #1, εμφάνισαν το μεγαλύτερο μήκος σποροφύτων, ενώ τα φυτά wt και αυτά της σειράς #2 χαρακτηρίστηκαν από το μικρότερο μήκος (Πίνακας 5). Στα 100 mM NaCl, το μεγαλύτερο και μικρότερο μήκος εμφάνισαν η σειρά #5 και τα φυτά wt αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη τη μείωση του μήκους έναντι του μάρτυρα, που συνιστά βασικό κριτήριο αξιολόγησης, την καλύτερη επίδοση εμφάνισαν οι σειρές #2 και #4 (μείωση 34,21 % και 34,36 %, αντίστοιχα), ενώ τα φυτά wt χαρακτηρίστηκαν από τη μεγαλύτερη μείωση (50 %) (Πίνακας 6) (Εικόνα 5).

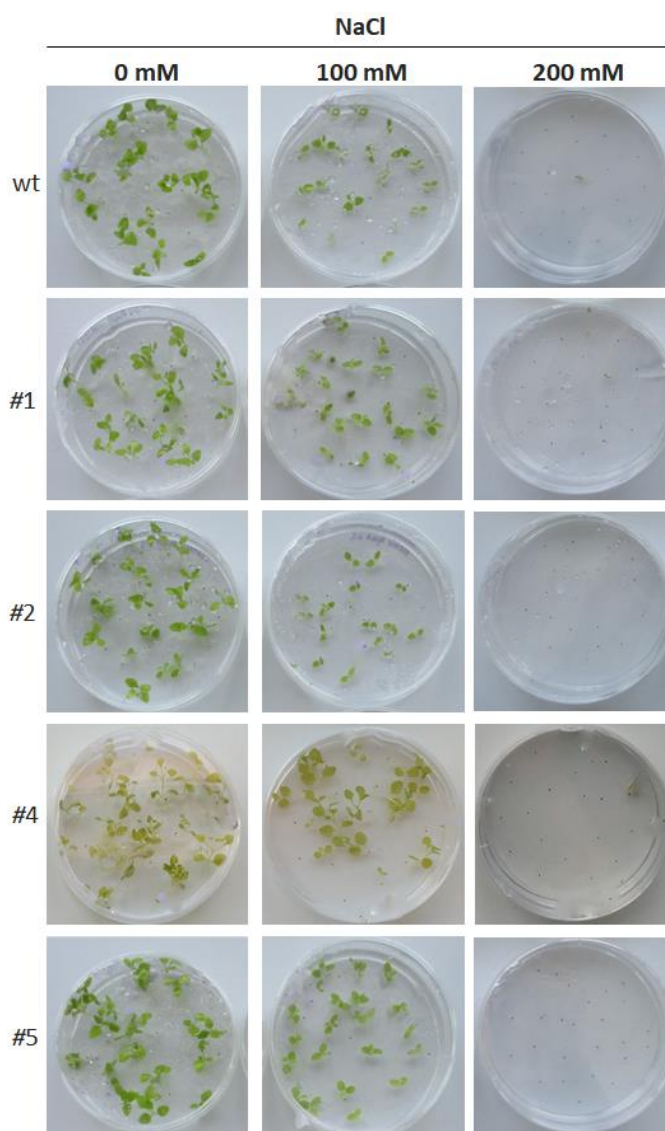
Πίνακας 5. Επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στο ποσοστό βλάστησης (%) και στο δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων (cm) των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό Βλάστησης (%)								Μήκος Φυτού (cm)							
	Συγκέντρωση NaCl (mM) (M)															
	0		100		200		M.O. (K)		0		100		200		M.O. (M)	
wt	98,33	a	91,66	a	-	95,00	a		1,90	c	0,95	c	-	1,43	b	
#1	100	a	65,00	c	-	82,50	ab		2,38	b	1,40	b	-	1,89	ab	
#2	100	a	86,66	ab	-	93,33	a		1,90	c	1,25	b	-	1,58	b	
#4	85,00	b	70,00	bc	-	77,50	b		1,95	c	1,28	b	-	1,61	b	
#5	100	a	93,33	a	-	96,66	a		3,03	a	1,75	a	-	2,39	a	
M.O.(Σ)	96,66	a	81,33	b					2,23	a	1,33	b				

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$). Στα 200 mM NaCl και οι δύο κατηγορίες φυτών εμφάνισαν αδυναμία βλάστησης (οι τιμές δε συμπεριλαμβάνονται στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων).

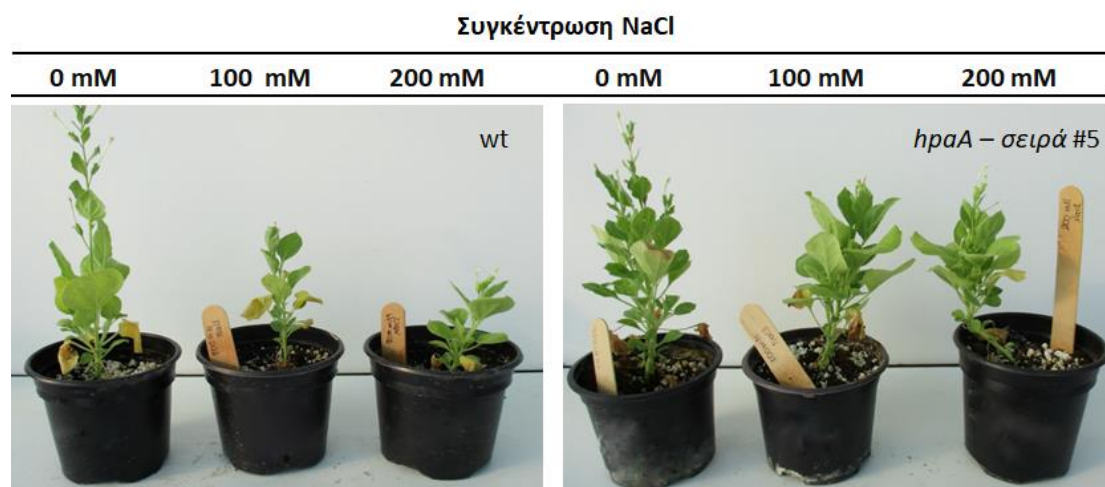
Πίνακας 6. Επίδραση του επιπέδου καταπόνησης υψηλής αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl) στις *hpaA*-σειρές και στα φυτά wt στη φάση της βλάστησης.

<div>Μεταχείριση</div> <div>Σειρά</div>		Μείωση έναντι του μάρτυρα			
		Ποσοστό βλάστησης		Μήκος σποροφύτων	
		Συγκέντρωση NaCl			
		100 mM	200 mM	100 mM	200 mM
wt	6,78	100,00	50,00	100,00	
#1	35,00	100,00	41,18	100,00	
#2	13,34	100,00	34,21	100,00	
#4	17,65	100,00	34,36	100,00	
#5	6,67	100,00	42,24	100,00	



Εικόνα 5. Συγκριτική απόκριση των *hpaA*-σειρών (#1, #2, #3, #4, #5) και των φυτών wt ως προς το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl). Στα 200 mM NaCl, το σύνολο των υπό μελέτη φυτών εμφάνισε αδυναμία βλάστησης.

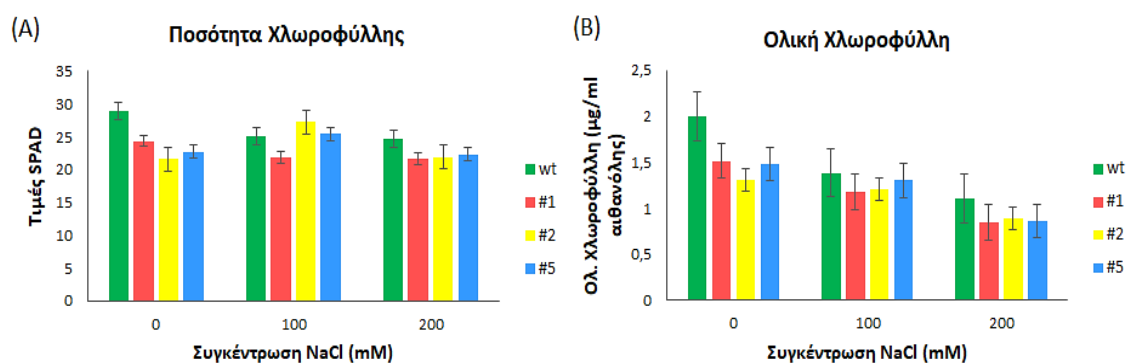
Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hpaA* στην απόκριση των φυτών στην καταπόνηση αλατότητας στο στάδιο των ώριμων φυτών, φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων υποβλήθηκαν σε ριζοπότισμα με διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης NaCl (0, 100, 200 mM) για χρονικό διάστημα 20 ημερών. Απουσία καταπόνησης, οι *hpaA*-σειρές εμφάνισαν φυσιολογικό φαινότυπο, παρόμοιο με αυτό των φυτών wt, τόσο ως προς το ύψος των φυτών όσο και ως προς την επιφάνεια του ελάσματος (Εικόνα 6). Υπό συνθήκες καταπόνησης, το σύνολο των φυτών χαρακτηρίστηκε από ανάσχεση της ανάπτυξης και εκδήλωση συμπτωμάτων χλώρωσης και μααρασμού, τα οποία ήταν περισσότερο εμφανή στις 20 ημέρες από την έναρξη της καταπόνησης, ωστόσο η απόκριση των φυτών διαφοροποιήθηκε σημαντικά. Τα φυτά wt χαρακτηρίστηκαν από σημαντική ανάσχεση της ανάπτυξης και εντονότερη συμπτωματολογία που αφορούσε σε εκτεταμένη χλώρωση και μααρασμό ή/και νέκρωση των κατώτερων φύλλων. Οι *hpaA*-σειρές παρουσίασαν βελτιωμένη απόκριση, συγκριτικά με τα φυτά wt, τόσο στα 100 όσο και στα 200 mM NaCl, η οποία εκφράστηκε μέσω του καλύτερου αναπτυξιακού δυναμικού αλλά και της ηπιότερης συμπτωματολογίας. Μεταξύ των *hpaA*-σειρών, την καλύτερη απόκριση εμφάνισε η σειρά #5, η οποία χαρακτηρίστηκε από βελτιωμένη ευρωστία και υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, που εκφράστηκε μέσω της μεγαλύτερης επιφάνειας ελάσματος των φύλλων και του μεγαλύτερου ύψους των φυτών, συγκριτικά με τις υπόλοιπες *hpaA*-σειρές και τα φυτά wt τόσο στα 100 όσο και στα 200 mM NaCl (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Συγκριτική απόκριση των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl) στο στάδιο των ώριμων φυτών. Φαινότυπος των φυτών wt και της σειράς #5 στα υπό μελέτη επίπεδα καταπόνησης.

Αναφορικά με την ποσότητα χλωροφύλλης, βάσει των τιμών SPAD, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των επιπέδων καταπόνησης, όπως προκύπτει από τις μέσες τιμές των σειρών. Ωστόσο, σημειώθηκαν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Απουσία καταπόνησης, τα φυτά wt και η σειρά #2 εμφάνισαν την υψηλότερη και χαμηλότερη περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη, αντίστοιχα. Υπό συνθήκες καταπόνησης παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης της ποσότητας χλωροφύλλης, η οποία ήταν περισσότερο έκδηλη στα 200 mM NaCl. Στα 100 mM NaCl, οι σειρές #2 και #5 εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές, ενώ στα 200 mM NaCl δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των

υπό μελέτη φυτών (Εικόνα 7Α, Παράρτημα V). Ομοίως, οι τιμές ολικής χλωροφύλλης των φυλλικών δίσκων που τοποθετήθηκαν σε διαλύματα NaCl παρουσίασαν σταδιακή μείωση με αύξηση της συγκέντρωσης NaCl (Εικόνα 7Β, Παράρτημα V). Απουσία καταπόνησης, τα φυτά wt και αυτά της σειράς #2 εμφάνισαν τις υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές, αντίστοιχα. Υπό συνθήκες καταπόνησης, οι τιμές δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών φυτών, ωστόσο τα φυτά wt εμφάνισαν υψηλότερες τιμές τόσο στα 100 όσο και στα 200 mM NaCl. Τα συνολικά δεδομένα υποδεικνύουν την πιθανή θετική επίδραση της έκφρασης γονιδίου *hpaA* στην απόκριση φυτών του είδους *N. benthamiana* στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας, η οποία στο στάδιο των ώριμων φυτών υπήρξε περισσότερο έκδηλη στα φυτά της σειράς #5.



Εικόνα 7. Συγκριτική απόκριση των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl) στο στάδιο των ώριμων φυτών. (Α) Περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD. Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τεσσάρων επαναλήψεων ($n = 4$). (Β) Περιεκτικότητα των φυλλικών δίσκων σε ολική χλωροφύλλη. Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τριών επαναλήψεων ($n = 3$).

Συζήτηση

Στο πλαίσιο ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την κατανόηση της μοριακής βάσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και παθογόνων μικροοργανισμών. Στο παρελθόν, η έρευνα εστίασε στην αναγνώριση γονιδίων και πρωτεϊνών που επάγουν την άμυνα των φυτών, όπως τα γονίδια αμολυσματικότητας που αλληλεπιδρούν με αντίστοιχα γονίδια (*R*) των φυτών (*gene-for-gene*) (Collmer 1998). Η ανάλυση μεταλλάξεων σε γονίδια αμολυσματικότητας ανέδειξε τη συνεισφορά τους είτε στην παθογένεια είτε στην προσαρμοστικότητα του παθογόνου, απουσία του αντίστοιχου γονιδίου *R* στα φυτά (White et al. 2000; Leach et al. 2001). Είναι πλέον ευρέως γνωστό ότι οι τελεστές δρουν ως παράγοντες αμολυσματικότητας και παθογένειας (Alfano and Collmer 2004; Kamoun 2006), με τον πρωταρχικό τους ρόλο ωστόσο να αφορά στην προαγωγή της ασθένειας. Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα στρέφεται προς την κατανόηση της λειτουργικής δράσης των τελεστών, που ορίζονται ως πρωτεΐνες προερχόμενες από βακτήρια ή συστατικά που συνεισφέρουν στις αποκρίσεις άμυνας των φυτών, περιλαμβάνοντας την εκδήλωση είτε ασθένειας είτε ανθεκτικότητας, η οποία συχνά συνοδεύεται από την αντίδραση υπερευαισθησίας (Alfano and Collmer 2004; Kamoun 2006; Hogenhout et al. 2009; Dean 2011; Thomma et al. 2011; Feng and Zhou 2012; Dou and Zhou 2012).

Η πρωτεΐνη HraA, που έχει απαντάται στα είδη *X. axonopodis* (*Xac*), *X. campestris* (*Xcc*, *Xcn*) και *X. oryzae* (*Xoo*, *Xoc*), αποτελεί καίριο ρυθμιστή του συστήματος T3S καθώς συμβάλλει στην έκκριση των T3SS συστατικών και των τελεστών εντός των φυτικών κυττάρων, αλληλεπιδρώντας παράλληλα με την πρωτεΐνη HraB για την επαγωγή της έκκρισης μη-τελεστών. Ειδικότερα, έχει αναδειχθεί ότι η πρόσδεση της HraA στην HraB πιθανά αποτρέπει την περίσσεια της HraB που διαταράσσει το T3SS, επιτρέποντας την ενσωμάτωση μη-τελεστών στη συσκευή έκκρισης (Büttner et al. 2004). Έπειτα από πρόσδεση στην εκκριτική συσκευή, η έκκριση της HraA συνοδεύεται από απελευθέρωση της συνοδού HraB, καθιστώντας εφικτή τη μεταφορά των HraB-εξαρτώμενων τελεστών στα φυτικά κύτταρα, η οποία είναι απαραίτητη για την επαγωγή της HR και την ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας (Lorenz et al. 2008; Scheibner et al. 2018). Επιπλέον, έχει αναδειχθεί η παρουσία δύο λειτουργικών NLS στην πρωτεΐνη HraA (Huguet et al. 1998), τα οποία συμβάλλουν στην μεταφορά, μέσω του T3SS, και τη συσσώρευση της HraA εντός του φυτικού πυρήνα. Βάσει των ανωτέρω, έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη HraA πιθανά εμφανίζει διττό ρόλο ως ρυθμιστής του T3SS και ως T3S τελεστής (Lorenz et al. 2008). Με δεδομένο ότι δεν έχει μελετηθεί η πιθανή λειτουργική επίδραση της HraA στα φυτικά κύτταρα, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hraA in planta* σε φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana*. Ειδικότερα, η έρευνα εστίασε στη μελέτη της απόκρισης *hraA*-διαγονιδιακών σειρών στην καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας κατά τη βλάστηση και σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια.

Η απόκριση των φυτών στην ξηρασία στη φάση της βλάστησης περιλάμβανε μείωση του ποσοστού βλάστησης, αλλά και ανάσχεση της ανάπτυξης των σποροφύτων, με τις επιδράσεις να είναι ανάλογες του επιπέδου καταπόνησης. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με μελέτες που αναφέρουν ότι σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο η υδατική καταπόνηση προκαλεί μια σειρά μορφολογικών και φυσιολογικών μεταβολών σε διάφορα φυτικά είδη, οι οποίες περιλαμβάνουν καθυστέρηση στη βλάστηση των σπόρων και μειωμένο δυναμικό βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων, που εκφράζεται μέσω ανάσχεσης της φυσιολογικής ανάπτυξης του βλαστού και της ρίζας (Pérez-Molphe-Balch et al. 1996; Sadeghian and Yavari 2004; Liu et al. 2015; Rezayian et al. 2018). Οι παρατηρούμενες μεταβολές στα νεαρά σπορόφυτα είναι το αποτέλεσμα μειωμένου ρυθμού διαίρεσης και επιμήκυνσης των κυττάρων λόγω συσσώρευσης ROS και πρόκλησης οξειδωτικής καταπόνησης στα φυτικά κύτταρα (Schuppler et al. 1998; Farooq et al. 2009). Αν και η επίδραση της καταπόνησης υπήρξε έκδηλη στο σύνολο των φυτών, οι υπό μελέτη κατηγορίες εμφάνισαν διαφορές ως προς την απόκριση στην ξηρασία. Ειδικότερα, οι σειρές #1 και #5 υπερείχαν έναντι των υπόλοιπων *hraA*-σειρών και των φυτών wt, όπως αποδεικνύεται από το υψηλότερο δυναμικό βλάστησης και το βελτιωμένο ρυθμό ανάπτυξης των σποροφύτων. Παράλληλα, οι σειρές αυτές χαρακτηρίστηκαν από βελτιωμένο φαινότυπο, ο οποίος εκφράστηκε μέσω της βελτιωμένης ευρωστίας και της μεγαλύτερης επιφάνειας ελάσματος των φύλλων.

Περαιτέρω, η επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας υπήρξε έκδηλη και στο στάδιο των ώριμων φυτών, με τις επιδράσεις να αντανakλώνται τόσο στο φαινότυπο όσο και στα αναπτυξιακά και φυσιολογικά γνωρίσματα των υπό μελέτη φυτών. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, η επίδραση της καταπόνησης εκδηλώθηκε μέσω της ανάσχεσης της ανάπτυξης και της εμφάνισης συμπτωμάτων μαρασμού και κύρτωσης του ελάσματος των φύλλων, συμπτωματολογία που αποδίδεται σε αναστολή του φυσιολογικού ρυθμού κυτταρικών

διαιρέσεων, διαταραχές στην πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων και διαταραχές στο μεταβολισμό των φυτών εξαιτίας πρόκλησης οξειδωτικής καταπόνησης (Farooq et al. 2009; Li et al. 2017; Dong et al. 2019; Karoor et al. 2020). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι οι δύο κατηγορίες φυτών παρουσίασαν σαφώς διαφοροποιημένη απόκριση στην ξηρασία, με τη σειρά #1 να χαρακτηρίζεται από ηπιότερη συμπτωματολογία και ικανότητα ανάκαμψης έπειτα από κανονική άρδευση. Αντίθετα, δραστικότερη υπήρξε η επίδραση της καταπόνησης στα φυτά wt, τα οποία χαρακτηρίζονταν από γενικευμένο μαρασμό, εκτεταμένη χλώρωση και νέκρωση των κατώτερων φύλλων, καθώς και αδυναμία ανάκαμψης μετά από άρδευση, γεγονός που συνάδει με το μειωμένο ποσοστό επιβίωσης συγκριτικά με τις *hpaA*-σειρές. Επιπρόσθετα, οι *hpaA*-σειρές παρουσίασαν βελτιωμένη απόκριση ως προς την επιφάνεια του ελάσματος, συγκριτικά με τα φυτά wt, γνώρισμα το οποίο συνδέεται άμεσα με την καταπόνηση ξηρασίας καθώς εντάσσεται στη στρατηγική άμβλυνσης των επιπτώσεων της καταπόνησης μέσω ελάττωσης της απώλειας νερού λόγω διαπνοής (Zhou et al. 2017; Abid et al. 2018; Zhang et al. 2020). Επιπρόσθετα, η μείωση της επιφάνειας του ελάσματος των φύλλων αποδίδεται σε εκτροπή από το φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο και ρυθμό φωτοσύνθεσης, λόγω μείωσης της δραστηριότητας της Rubisco και μεταβολών στο φωτοσύστημα II, καθώς και μείωση της αγωγιμότητας των στομάτων (Cornic and Massacci 1996; Lawlor and Tezara 2009; Karoor et al. 2020). Η παρατηρηθείσα υπεροχή των σειρών #1 και #5 ως προς την επιφάνεια ελάσματος, συνοδεύτηκε από μειωμένο ρυθμό απώλειας νερού λόγω διαπνοής, υποδεικνύοντας τη βελτιωμένη ικανότητα διατήρησης νερού στους ιστούς των εν λόγω σειρών, η οποία εξάλλου τεκμαίρεται και από την αυξημένη περιεκτικότητα νερού των φύλλων συγκριτικά με τη σειρά #2 και τα φυτά wt. Η σχετική περιεκτικότητα νερού θεωρείται ως ένα από τα πλέον βασικά κριτήρια αξιολόγησης της ανθεκτικότητας των φυτών στην ξηρασία, καθώς εκφράζει την ισορροπία μεταξύ των αποθεμάτων νερού και του ρυθμού διαπνοής νερού των φυτικών κυττάρων (Schonfeld et al. 1988). Η επίδραση της καταπόνησης αποτυπώθηκε επίσης μέσω μεταβολών στο νωπό και ξηρό βάρος της ρίζας στο σύνολο των φυτών, με τις σειρές #1 και #2 ωστόσο να εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αύξηση. Αντίστοιχες μεταβολές στο βάρος της ρίζας, στο πηλίκο του βάρους της ρίζας προς το βάρος του βλαστού καθώς και στη συνολική φυτική βιομάζα υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, αποτελούν χαρακτηριστικά συμπτώματα της καταπόνησης, ενώ η αύξηση στο ξηρό βάρος της ρίζας σχετίζεται με αυξημένη αποτελεσματικότητα χρήσης νερού (Khalil et al. 2020). Υπό συνθήκες ξηρασίας, η αύξηση στο ξηρό βάρος της ρίζας συνδέεται με διαμερισματοποίηση της φυτικής βιομάζας, η οποία συμβάλλει σε αυξημένη συσσώρευση οσμωλυτών και ABA, οδηγώντας σε βελτιωμένη απορρόφηση νερού και βελτίωση της κυτταρικής ομοιόστασης με σκοπό την άμβλυνση των επιπτώσεων της καταπόνησης (Shao et al. 2008; Xu et al. 2015; Ahmed et al. 2021). Περαιτέρω, η διαφορική απόκριση των υπό μελέτη φυτών αποτυπώθηκε στην περιεκτικότητα των φύλλων σε προλίνη υπό κανονικές και υπό συνθήκες καταπόνησης. Η καταπόνηση ξηρασίας οδήγησε σε αύξηση της ποσότητας προλίνης στο σύνολο των φυτών, ωστόσο η μεγαλύτερη αύξηση σημειώθηκε στη σειρά #2 και στα φυτά wt. Αντίθετα, η σειρά #5, για την οποία σημειώθηκε η υψηλότερη τιμή απουσία καταπόνησης, εμφάνισε τη μικρότερη μεταβολή. Η παρατηρηθείσα απουσία μεταβολής στη σειρά #5 βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές σχετικά με την αύξηση της περιεκτικότητας προλίνης σε ευαίσθητους γενοτύπους συγκριτικά με ανθεκτικούς γενοτύπους απουσία καταπόνησης ξηρασίας (Hussain et al. 2018), ενώ η αύξηση αυτή αποδίδεται στον οσμωπροστατευτικό ρόλο της

προλίνης (Rai et al. 2012; Dong et al. 2019) που συμβάλλει στη διατήρηση της φυσιολογικής πρωτεϊνικής λειτουργίας και του φυσιολογικού επιπέδου οσμωτικής πίεσης (Yang et al. 2021).

Σε ευθυγράμμιση με τα ανωτέρω ευρήματα, η καταπόνηση υψηλής αλατότητας επηρέασε αρνητικά το δυναμικό βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων, με τις επιδράσεις να είναι ανάλογες της έντασής της, επιφέροντας αδυναμία βλάστησης στα 200 mM NaCl στο σύνολο των υπό μελέτη φυτών. Οι επιπτώσεις της υψηλής αλατότητας σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο αφορούν σε μείωση του ποσοστού και του ρυθμού βλάστησης και ανάσχεση της ανάπτυξης, που εκφράζεται ως μειωμένο μήκος της ρίζας και του βλαστού (Guo et al. 2012; Wu et al. 2015; Santo et al. 2017; Dehnavi et al. 2020). Οι επιδράσεις αυτές αντανακλούν το αποτέλεσμα πρόκλησης οσμωτικής καταπόνησης, διαταραχών στις αναλογίες των θρεπτικών στοιχείων και εκδήλωσης τοξικότητας λόγω συσσώρευσης ιόντων Na^+ και Cl^- (Kaya et al. 2006; Munns and Tester 2008; Zörb et al. 2019). Παρά το γεγονός ότι στο σύνολο των φυτών ήταν ορατή η δυσμενής επίδραση της καταπόνησης, οι υπό μελέτη κατηγορίες εμφάνισαν διαφορετικά προφίλ βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων. Ως προς το ποσοστό βλάστησης στα 100 mM NaCl, την καλύτερη επίδοση εμφάνισαν τα φυτά της σειράς #5 και τα wt, εμφανίζοντας τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα, ενώ στα 200 mM NaCl σημειώθηκε πλήρης ανάσχεση της βλάστησης για το σύνολο των υπό μελέτη φυτών. Ωστόσο, τα φυτά wt χαρακτηρίστηκαν από σημαντική μείωση του δυναμικού ανάπτυξης των σποροφύτων, εμφανίζοντας το μικρότερο μήκος σποροφύτων καθώς και τη μεγαλύτερη μείωση έναντι του μάρτυρα. Αντίθετα, η σειρά #5 εμφάνισε το μεγαλύτερο μήκος, ενώ οι σειρές #2 και #4 χαρακτηρίστηκαν από τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα, υποδεικνύοντας την υπερέχουσα επίδοση των *hpaA*-σειρών έναντι των φυτών wt.

Επιπρόσθετα, η διαφορική απόκριση των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt στην καταπόνηση αλατότητας διαπιστώθηκε και στο στάδιο των ώριμων φυτών, με τις διαφορές να αφορούν τόσο στο φαινότυπο όσο και στην ανάπτυξη των φυτών. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, την εντονότερη συμπτωματολογία εμφάνισαν τα φυτά wt, τα οποία χαρακτηρίστηκαν από δραστική ανάσχεση της ανάπτυξης, γενικευμένο μαρασμό, εκτεταμένη χλώρωση και νέκρωση των κατώτερων φύλλων. Αντίθετα, το σύνολο των *hpaA*-σειρών παρουσίασε ηπιότερη συμπτωματολογία, με τη σειρά #5 να υπερέχει σαφώς έναντι των υπολοίπων, εμφανίζοντας βελτιωμένη ευρωστία και δυναμικό ανάπτυξης, εκφραζόμενο μέσω της μεγαλύτερης επιφάνειας ελάσματος των φύλλων και του μεγαλύτερου ύψους των φυτών στα υπό μελέτη επίπεδα καταπόνησης. Στο στάδιο των ώριμων φυτών, η εμφάνιση συμπτωμάτων χλώρωσης και γήρανσης των φύλλων, που συνοδεύονται από μείωση της περιεχόμενης χλωροφύλλης, αποτελούν τυπικά συμπτώματα της καταπόνησης υψηλής αλατότητας (Hester et al. 2001; Munns and Tester 2008; Taïbi et al. 2016), με τη μείωση της χλωροφύλλης να αποδίδεται κυρίως σε αντίστοιχη μείωση της αγωγιμότητας των στομάτων και εκτροπή από τη φυσιολογική λειτουργία του φωτοσυστήματος II (Netondo et al. 2004). Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, υπό συνθήκες καταπόνησης παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης της χλωροφύλλης, ιδιαίτερα στα 200 mM NaCl, η οποία υπήρξε περισσότερο έκδηλη στα φυτά wt.

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα της μελέτης υποδεικνύουν τη διαφορική απόκριση των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt στις καταπονήσεις της ξηρασίας και της υψηλής

αλατότητας, τόσο στη φάση της βλάστησης όσο και στα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Περαιτέρω, τα δεδομένα υποστηρίζουν αξιοσημείωτες διαφορές στις αποκρίσεις άμυνας των *hpaA*-σειρών, γεγονός που αποδίδεται κατά βάση στην τυχαία ένθεση του *hpaA* στο γονιδίωμα των φυτών, η οποία επακολούθως οδηγεί σε μεταβαλλόμενη έκφραση του διαγονιδίου στις διαφορετικές *hpaA*-σειρές. Στο πλαίσιο αυτό, τα συνολικά ευρήματα υπογραμμίζουν την υπερέχουσα επίδοση των σειρών #1 και #5 έναντι των υπολοίπων. Προς την ίδια κατεύθυνση, περαιτέρω συντείνουν τα ευρήματα προηγούμενης μελέτης που υπογραμμίζουν την προηγμένη ανθεκτικότητα των *hpaA*-σειρών, και ειδικότερα των σειρών #1 και #5, έναντι της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης που προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Συγκεκριμένα, οι εν λόγω σειρές χαρακτηρίστηκαν από ηπιότερη συμπτωματολογία, μειωμένη αποίκιση του βακτηρίου στους φυτικούς ιστούς και μικρότερη μεταβολή στην ποσότητα προλίνης συγκριτικά με τις υπόλοιπες διαγονιδιακές σειρές και τα φυτά wt (μη δημοσιευμένα δεδομένα). Η παρούσα μελέτη συνιστά την πρώτη αναφορά σχετικά με την επίδραση της έκφρασης του *hpaA in planta*, παρέχοντας περαιτέρω ενδείξεις σχετικά με τη θετική επίδραση της ετερόλογης έκφρασης τελεστών στην άμυνα των φυτών έναντι καταπονήσεων.

Αν και η παρατηρηθείσα απόκριση άμυνας των *hpaA*-φυτών δεν επεξηγείται σε μοριακό επίπεδο, πιθανά σχετικές είναι οι αναφορές για τη θετική επίδραση της έκφρασης τελεστών προερχόμενων από μύκητες στην ανθεκτικότητα έναντι των καταπονήσεων της ξηρασίας και υψηλής αλατότητας, η οποία αποδόθηκε στη μεταβολή της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης (HSPs) ή γονιδίων άμυνας, όπως τα *Cyt450* και *Blc2*, καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν Receptor-like Kinases (RLKs) (Rajput et al. 2015; Zhang et al. 2015). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι οι αναφορές σχετικά με την επίδραση της ετερόλογης έκφρασης τελεστών, προερχόμενων από φυτοπαθογόνα βακτήρια, στην ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, παρέχουν αντικρουόμενες ενδείξεις σχετικά με το μοριακό έλεγχο των αποκρίσεων άμυνας. Στο πλαίσιο αυτό, πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν ότι η πρωτεΐνη HopD1, που προέρχεται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae*, αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα NTL9 που αποτελεί βασικό ρυθμιστή της έκφρασης γονιδίων που επάγονται υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (Block et al. 2014; Büttner et al. 2016). Ωστόσο, σε διαφορετικό πλαίσιο δρα η πρωτεΐνη HopF2, από το βακτήριο *P. syringae*, η οποία επιδρά στο άνοιγμα των στομάτων και στην παραγωγή ROS, μεταβάλλοντας επακολούθως την έκφραση γονιδίων που επάγονται υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας (Hurley et al. 2014; Melotto et al. 2017). Περαιτέρω μελέτες υποδεικνύουν ότι η έκφραση τελεστών πιθανά συνδέεται με την επαγωγή βιοχημικών μονοπατιών άμυνας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Σχετικά είναι τα ευρήματα για την επαγόμενη σύνθεση ABA, λόγω της έκφρασης της πρωτεΐνης AvrPtoB -έπειτα από μόλυνση με βακτήριο-, η οποία οδηγεί σε μεταβολή της βασικής άμυνας καθώς και σε εναπόθεση καλλόζης (de Torres-Zabala et al. 2007). Η σύνθεση ABA προκαλεί κλείσιμο των στομάτων, περιορίζοντας την είσοδο παθογόνων εντός των κυττάρων και την απώλεια νερού λόγω διαπνοής, καθώς και μεταβολή της δραστηριότητας των χλωροπλαστών, επιδράσεις οι οποίες συνολικά προσδίδουν προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων και ειδικότερα καταπόνησης ξηρασίας (Wang et al. 2013; Kazan and Lyons 2014; Lim et al. 2015). Εναλλακτικά, μπορεί να υποθεθεί ότι η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα των *hpaA*-σειρών υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης σχετίζεται με μία κατάσταση προηγμένης γενικής άμυνας των φυτών, αντίστοιχη αυτής

που προκαλείται από την έκφραση διεγερτών προερχόμενων από παθογόνα (MAMPs) και τελεστών προερχόμενων από βακτήρια ή μύκητες καθώς και έπειτα από αποίκιση ωφέλιμων μικροοργανισμών. Στις ανωτέρω περιπτώσεις, η επαγωγή της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων συντελείται κυρίως μέσω της μεταβαλλόμενης σύνθεσης ROS ή νιτρικού οξέος (Borges et al. 2014). Παράλληλα, έχει αναδειχθεί ότι διεγέρτες προερχόμενοι από μικροοργανισμούς, όπως μύκητες, παθογόνα βακτήρια ή μη μολυσματικά στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* δύνανται να προσδώσουν προηγμένη γενική άμυνα στα φυτά, που εκφράζεται μέσω της αυξημένης ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών καταπονήσεων έπειτα από ταχεία ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας (Conrath 2011; Slaughter et al. 2012; Westman et al. 2019). Η εκδήλωση ανθεκτικότητας που διατηρείται στις διαδοχικές γενεές, αποδίδεται σε καταστολή της δράσης των ROS και σε επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα (González-Bosch 2018).

Συμπεράσματα

Τα συνολικά ευρήματα καταδεικνύουν ότι η ετερόλογη έκφραση του γονιδίου *hpaA* συμβάλλει στη βελτιωμένη απόκριση των φυτών στις καταπονήσεις ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στο είδος *N. benthamiana* τόσο στη φάση της βλάστησης των σπόρων όσο και σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Παρά την αδυναμία σύνδεσης με συγκεκριμένες μοριακές και βιοχημικές οδούς άμυνας, η παρατηρηθείσα προηγμένη ανθεκτικότητα πιθανά αποδίδεται στην ενεργοποίηση της γενικής άμυνας των φυτών λόγω της ενδογενούς έκφρασης του γονιδίου *hpaA*. Προς την αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα των *hpaA*-φυτών, καθοριστική πρόκειται να είναι η συμβολή μελετών σχετικά με την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια, στη μεταγραφική και μετα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων άμυνας καθώς και στη μεταβολική τους απόκριση, συγκριτικά με φυτά wt, υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.

Βιβλιογραφία

- Abid M, Ali S, Qi LK, Zahoor R, Tian Z, Jiang DJ, Snider JL, Dai T (2018) Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). Sci Rep 8:4615. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21441-7>
- Ahmed N, Zhu M, Li Q, Wang X, Wan J, Zhang Y (2021) Glycine betaine-mediated root priming improves water stress tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Agriculture 11: 1127. <https://doi.org/10.3390/agriculture11111127>
- Alfano JR, Collmer A (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. Annu Rev Phytopathol 42:385–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731>
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. Crit Rev Plant Sci 24:23-58. <https://doi.org/10.1080/07352680590910410>
- Block A, Toruno TY, Elowsky CG, Zhang C, Steinbrenner J, Beynon J, Alfano JR (2014) The *Pseudomonas syringae* type III effector HopD1 suppresses effector-triggered immunity, localizes to the endoplasmic reticulum, and

- targets the *Arabidopsis* transcription factor NTL9. *New Phytologist* 201: 1358–1370. <https://doi.org/10.1111/nph.12626>
- Borges AA, Jiménez-Arias D, Expósito-Rodríguez M, Sandalio LM, Pérez JA (2014) Priming crops against biotic and abiotic stresses: MSB as a tool for studying mechanisms. *Front Plant Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00642>
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W, Buchannan B, Jones R (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD, pp 1158–1203.
- Büttner D, Gürlebeck D, Noël LD, Bonas U (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol Microbiol* 54:755–768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04302.x>
- Büttner D, Bonas U (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* 34:107–133. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x>
- Büttner D (2016) Behind the lines-actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiol Rev* 40:894–937. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw026>
- Collmer A (1998) Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 1:329–335. [https://doi.org/10.1016/1369-5266\(88\)80055-4](https://doi.org/10.1016/1369-5266(88)80055-4)
- Conrath U (2011) Molecular aspects of defense priming. *Trends Plant Sci* 16:524–531. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.004>
- Cornic G, Massacci A (1996) Leaf photosynthesis under drought stress. In: Baker NR (eds) *Photosynthesis and the environment*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 347–366. https://doi.org/10.1007/0-306-48135-9_14
- De Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Egea PR, Bogre L, Grant M (2007) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J* 26:1434–1443. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601575>
- Dean P (2011) Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol Rev* 35:1100–1125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00271.x>
- Dehnavi AR, Zahedi M, Ludwiczak A, Perez SG, Piernik A (2020) Effect of salinity stress on seed germination and seedling development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) genotypes. *Agronomy* 10:859. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060859>
- Dong S, Jiang Y, Dong Y, Wang L, Wang W, Ma Z, et al. (2019) A study on soybean responses to drought stress and rehydration. *Saudi J Biol Sci* 26:2006–2017. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.08.005>
- Dou D, Zhou JM (2012) Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe* 12:484–495. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.003>
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29:185–212. <https://doi.org/10.1051/agro:2008021>
- Feng F, Zhou JM (2012) Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Curr Opin Plant Biol* 15:469–476. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.004>

- Goldback D, Li C, Mohan H, Probst N (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Front Plant Sci* 5 <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00151>
- González-Bosch C (2018) Priming plant resistance by activation of redox-sensitive genes. *Free Radic Biol Med* 122:171-180. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.028>
- Gorantla M, Babu PR, Lachagari VBR, Reddy AMM, Wusirika R, Bennetzen JL, et al. (2007) Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *J Exp Bot* 58:253-265. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl213>
- Guo Y, Jia W, Song J, Wang D, Chen M, Wang B (2012) *Thellungiella halophila* is more adaptive to salinity than *Arabidopsis thaliana* at stages of seed germination and seedling establishment. *Acta Physiol Plant* 34:1287-1294. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0925-y>
- Hester MW, Mendelssohn IA, McKee KL (2001) Species and population variation to salinity stress in *Panicum hemitomon*, *Spartina patens* and *Spartina alterniflora*: morphological and physiological constraints. *Environ Exp Bot* 46:277-297. [https://doi.org/10.1016/s0098-8472\(01\)00100-9](https://doi.org/10.1016/s0098-8472(01)00100-9)
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, Kamoun S (2009) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact* 22:115-122. <https://doi.org/10.1094/mpmi-22-2-0115>
- Horsch R, Fry J, Hoffman N, Eichholtz D, Rogers S, et al. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231. <https://doi.org/10.1126/science.227.4691.1229>
- Huguet E, Hahn K, Wengelnik K, Bonas U (1998) *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol Microbiol* 29:1379-1390. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01019.x>
- Hurley B, Lee D, Mott A, Wilton M, Liu J, Liu YC, et al. (2014) The *Pseudomonas syringae* type III effector HopF2 suppresses arabidopsis stomatal immunity. *PLoS One* 9: e114921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114921>
- Hussain S, Khalid MF, Saqib M, Ahmad S, Zafar W, et al. (2018) Drought tolerance in citrus rootstocks is associated with better antioxidant defense mechanism. *Acta Physiol Plant* 40: 135. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2710-z>
- Kamoun S (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* 44:41-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>
- Kapoor D, Bhardwaj S, Landi M, Sharma A, Ramakrishnan M, Sharma A (2020) The impact of drought in plant metabolism: How to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Appl Sci* 10:5692. <https://doi.org/10.3390/app10165692>
- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7:193-195. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02251-3)
- Kaya MD, Okçu G, Atak M, Çikili Y, Kolsarici Ö (2006) Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Europ J Agron* 24:291-295. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.08.001>
- Kazan K, Lyons R (2014) Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *Plant Cell* 26:2285-2309. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125419>

- Khalil AM, Murchie EH, Mooney SJ (2020) Quantifying the influence of water deficit on root and shoot growth in wheat using X-ray Computed Tomography. *AoBP Plants* 12: plaa036. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plaa036>
- Khan MS, Khan MN (2019) Understanding plant responses to drought and salt stresses: advances and challenges in “Omics” approaches. In: Khan MS, Malik KA (eds) *Transgenic Crops - Emerging Trends and Future Perspectives*. IntechOpen, pp 75-98. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81041>
- Lawlor DW, Tezara W (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann Bot* 103:561–579. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn244>
- Leach JE, Vera Cruz CM, Bai JF, Leung H (2001) Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu Rev Phytopathol* 39:187-224. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.187>
- Li J, Cang Z, Jiao F, Bai X, Zhang D, Zhai R (2017) Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. *J Saudi Soc Agric Sci* 16:82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.03.001>
- Lim CW, Baek W, Jung J, Kim JH, Lee SC (2015) Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. *Int J Mol Sci* 16:15251-15270. <https://doi.org/10.3390/ijms160715251>
- Liu M, Li M, Liu K, Sui N (2015) Effects of drought stress on seed germination and seedling growth of different maize varieties. *J Agric Sci* 7:231-240. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n5p231>
- Lorenz C, Kirchner O, Egler M, Stuttmann J, Bonas U, Büttner D (2008) HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol Microbiol* 69: 344–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06280.x>
- Lu H, Patil P, Van Sluys MA, White FF, Ryan RP, Dow JM, et al. (2008) Acquisition and evolution of plant pathogenesis– associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE* 3: e3828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003828>
- Melotto M, Zhang L, Oblessuc PR, He SY (2017) Stomatal defense a decade later. *Plant Physiol* 174:561–571. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01853>
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59:651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Netondo GW, Onyango JC, Beck E (2004) Sorghum and salinity: II. gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Sci* 44:806–811. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.8060>
- Páez-Watson T, Álvarez-Suárez JM, Rivas-Romero F, Estrada L, López D, Pérez PL et al. (2020) Increased salinity stress tolerance of *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* plants with the addition of xyloglucan oligosaccharides to the culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 56:325-334. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10048-w>
- Peleg Z, Apse MP, Blumwald E (2011) Engineering salinity and water stress tolerance in crop plants: Getting closer to the field. *Advances in Botanical Research* 57:406-432. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387692-8.00012-6>

- Pérez-Molphe-Balch E, Gidekel M, Segura-Nieto M, Herrera-Estrella L, Ochoa-Alejo N (1996) Effects of water stress on plant growth and root proteins in three cultivars of rice (*Oryza sativa*) with different level of drought tolerance. *Physiol Plant*. 96:284-290. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00215.x>
- Qi SL, Lin QF, Feng XJ, Han HL, Liu J, Zhang L, et al. (2019) IDD16 negatively regulates stomatal initiation via trans-repression of *SPCH* in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J* 17: 1446-1457. <https://doi.org/10.1111/pbi.13070>
- Rai AC, Singh M, Shah K (2012) Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in *ZAT12*-transformed transgenic tomato plants. *Plant Physiol Biochem* 61:108-114. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.09.010>
- Rajput NA, Zhang M, Shen D, Liu T, Zhang Q, et al. (2015) Overexpression of a *Phytophthora* cytoplasmic CRN effector confers resistance to disease, salinity and drought in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol* 56:2423-2435. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv164>
- Rezayian M, Niknam V, Ebrahimzadeh H (2018) Effects of drought stress on the seedling growth, development, and metabolic activity in different cultivars of canola. *Soil Sci Plant Nutr* 64: 360-369. <https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1436407>
- Ruan CJ, Teixeira da Silva JA (2011) Metabolomics: creating new potentials for unraveling the mechanisms in response to salt and drought stress and for the biotechnological improvement of xero-halophytes. *Crit Rev Biotech* 31:153–69. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.505908>
- Santo A, Mattana E, Frigau L, Marzo Pastor A, Picher Morelló MC, Bacchetta G (2017) Effects of NaCl stress on seed germination and seedling development of *Brassica insularis* Moris (Brassicaceae). *Plant Biol* 19:368-376. <https://doi.org/10.1111/plb.12539>
- Sadeghian SY, Yavari N (2004) Effect of water-deficit stress on germination and early seedling growth in sugar beet. *J Agron Crop Sci* 190:138-144. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2004.00087.x>
- Scheibner F, Hartmann N, Hausner J, Lorenz C, Hoffmeister AK, Büttner D (2018) The type III secretion chaperone HpaB controls the translocation of effector and noneffector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *Mol Plant Microbe Interact* 31:61-74. <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-17-0138-r>
- Schonfeld MA, Johnson RC, Carver BF, Mornhinweg DW (1988) Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Sci* 28:526-531. <https://doi.org/10.2135/cropsci1988.0011183X002800030021x>
- Schuppler U, He PH, John PCL, Munns R (1998) Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol* 117:667–678. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.667>
- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C R Biologies* 331:215-225. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.01.002>
- Slama I, Abdelly C, Bouchereau A, Flowers T, Savouré A (2015) Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Ann Bot* 115:433-447. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu239>
- Slaughter A, Daniel X, Flors V, Luna E, Hohn B, Mauch-Mani B (2012) Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiol* 158:835-843. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191593>

- Taïbi K, Taïbi F, Abderrahim LA, Ennajjah A, Belkhodja M, Mulet JM (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>
- Tester M, Langridge P (2010) Breeding Technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327:818-822. <https://doi.org/10.1126/science.1183700>
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAI (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23:4-15. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082602>
- Wang P, Xue L, Batelli G, Lee S, Hou YJ, Van Oosten MJ, et al. (2013) Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. *Proc Natl Acad Sci* 110:11205-11210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308974110>
- Westman SM, Kloth KJ, Hanson J, Ohlsson AB, Albrechtsen BR (2019) Defense priming in arabidopsis-a meta-analysis. *Sci Rep* 9:13309. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49811-9>
- White FF, Yang B, Johnson LB (2000) Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr Opin Plant Biol* 3:291-298. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00082-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00082-0)
- Wintermans JEG, de Mots A (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophyll a and b and their phaeophytins in ethanol. *Biochim Biophys Acta* 109:448-453. [https://doi.org/10.1016/0926-6585\(65\)90170-6](https://doi.org/10.1016/0926-6585(65)90170-6)
- Wu G-Q, Jiao Q, Shui Q-Z (2015) Effect of salinity on seed germination, seedling growth, and inorganic and organic solutes accumulation in sunflower. *Plant Soil Environ*. 61:220-226. <https://doi.org/10.17221/22/2015-pse>
- Xu W, Cui K, Xu A, Nie L, Huang J, Peng S (2015) Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedling. *Acta Physiol Plant* 37:9. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1760-0>
- Yang X, Lu M, Wang Y, Wang Y, Liu Z, Chen S (2021) Response mechanisms of plants to drought Stress. *Horticulturae* 7: 50. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030050>
- Zhang M, Rajput NA, Shen D, Sun P, Zeng W, et al. (2015) A *Phytophthora sojae* cytoplasmic effector mediates disease resistance and abiotic stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Sci Rep* 5. <https://doi.org/10.1038/srep10837>
- Zhang Y-B, Yang S-L, Dao J-M, Deng J, Shahzad AN, Fan X, et al. (2020) Drought-induced alterations in photosynthetic, ultrastructural and biochemical traits of contrasting sugarcane genotypes. *PLoS ONE* 15: e0235845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235845>
- Zhou R, Yu X, Ottosen CO, Rosenqvist E, Zhao L, Wang Y, et al. (2017) Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. *BMC Plant Biol* 17:24. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0974-x>
- Zörb C, Geilfus CM, Dietz KJ (2019) Salinity and crop yield. *Plant Biol* 21:31-38. <https://doi.org/10.1111/plb.12884>

Κεφάλαιο 7

Απόκριση *hpaB* -διαγονιδιακών σειρών του είδους *N. benthamiana* υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας

Περίληψη

Στοχεύοντας στην αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς την εφαρμογή των σύγχρονων βιοτεχνολογικών μεθόδων, οι οποίες προσφέρουν προοπτικές διεύρυνσης της γονιδιακής δεξαμενής, προσθέτοντας στη φαρέτρα των βελτιωτών τη δυνατότητα αξιοποίησης γονιδίων μη φυτικής προέλευσης. Το γονίδιο *hpaB*, από το βακτήριο *Xanthomonas vesicatoria*, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του βακτηρίου, ενώ η πρωτεΐνη HpaB αλληλεπιδρά με βακτηριακές πρωτεΐνες, επιτρέποντας την έκκριση πρωτεϊνών-μη τελεστών στα φυτικά κύτταρα. Με δεδομένη την έλλειψη αναφορών σχετικά με τις λειτουργικές επιδράσεις του *hpaB* *in planta*, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε ο προσδιορισμός της απόκρισης *hpaB*-φυτών ως προς την ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων στο είδος *Nicotiana benthamiana*. Έπειτα από αξιολόγηση των διαθέσιμων διαγονιδιακών σειρών, ως προς το επίπεδο ζυγωτίας, την ένθεση και έκφραση του *hpaB*, επιλεγμένες σειρές (T₂ γενεά) υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών. Στη φάση της βλάστησης, σπόροι των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium που περιείχε D-mannitol (0, 100, 200, 300 mM) και NaCl (0, 100, 200, 300 mM) και η απόκρισή τους αξιολογήθηκε βάσει του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων. Στο στάδιο των ώριμων φυτών, φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας με πλήρη στέρηση νερού για χρονικό διάστημα 10 ημερών, ακολουθούμενο από κανονική άρδευση διάρκειας 2 ημερών, και σε καταπόνηση υψηλής αλατότητας μέσω εφαρμογής διαλυμάτων NaCl (0, 100, 200 mM) για χρονικό διάστημα 20 ημερών. Η αξιολόγηση των σειρών βασίστηκε σε αναπτυξιακές και φυσιολογικές παραμέτρους. Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν ισχυρές ενδείξεις για τη θετική επίδραση του γονιδίου *hpaB* στην επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών στο είδος *N. benthamiana*. Βάσει του συνόλου των παραμέτρων που αξιοποιήθηκαν στο πλαίσιο αξιολόγησης της ανθεκτικότητας, η σειρά #4 εμφάνισε υπερέχουσα επίδοση τόσο υπό συνθήκες ξηρασίας όσο και υψηλής αλατότητας. Η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα συζητάται υπό το πρίσμα των αμυντικών μηχανισμών που πιθανά διέπουν την ανθεκτικότητα των *hpaB*-φυτών έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.

Το παρόν κεφάλαιο αποτελεί τροποποίηση της παρακάτω δημοσίευσης: Mitsopoulou N, Kelaidi GI, Skaracis GN, Pavli OI (2018) The *hpaB* gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* enhances abiotic stress tolerance in transgenic *N. benthamiana*. 69^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. 23-25 Νοεμβρίου 2018 Λάρισα Σ266.

Εισαγωγή

Τα φυτά, σε όλη τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου, βρίσκονται αντιμέτωπα με πλήθος αβιοτικών καταπονήσεων που μεταβάλλουν τη μορφολογία και τη σύνθεση χημικών ουσιών εντός των ιστών, επιδρώντας παράλληλα δυσμενώς στη φυσιολογική ανάπτυξη και παραγωγικότητά τους. Στις αβιοτικές καταπονήσεις συγκαταλέγονται η υψηλή αλατότητα, η ξηρασία, οι ακραίες τιμές θερμοκρασίας, η υπερϊώδης ακτινοβολία, η αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στο έδαφος, η έλλειψη ή περίσσεια θρεπτικών στοιχείων στο εδαφικό διάλυμα και οι ατμοσφαιρικοί ρύποι (Pereira 2016). Μεταξύ των ανωτέρω καταπονήσεων, η ξηρασία και η υψηλή αλατότητα θεωρούνται ως οι πλέον σημαντικές, λαμβάνοντας υπόψη τη σοβαρότητα των επιδράσεων που προκαλούν και τη συχνότητα εμφάνισής τους (Goldback et al. 2014; Zhu 2016). Ειδικότερα, η καταπόνηση ξηρασίας επιδρά στα φυτικά κύτταρα, προκαλώντας μείωση του ρυθμού των κυτταρικών διαιρέσεων, μεταβολή των σχέσεων νερού και θρεπτικών στοιχείων και μείωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης εξαιτίας της παρεμπόδισης εισόδου CO₂ στα φύλλα (Farooq et al. 2009; Li et al. 2017). Όμοια, η καταπόνηση υψηλής αλατότητας προκαλεί αλλαγές στο μεταβολισμό των κυττάρων μέσω της αύξησης της οσμωτικής πίεσης, της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων (N, Ca, K, P, Fe, Zn) και της μείωσης του ρυθμού φωτοσύνθεσης ως αποτέλεσμα της μειωμένης ποσότητας χλωροφύλλης και της επιτάχυνσης της γήρανσης κυρίως των πιο ώριμων φύλλων (Munns and Tester 2008; Shrivastava and Kumar 2015).

Η βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνει την εφαρμογή συνθετικών ενώσεων και ρυθμιστών ανάπτυξης που ενεργοποιούν βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών (Jakab et al. 2005; Nguyen et al. 2018; Venegas-Molina et al. 2020) καθώς και την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη μεταφορά σημάτων, όπως γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK). Επίσης, έχουν αξιοποιηθεί γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες προσφέρουν άμεση προστασία στα κύτταρα, όπως οι πρωτεΐνες που φυσιολογικά συντίθενται σε αυξημένες ποσότητες στο τέλος της διαδικασίας εμβρυογένεσης και είναι γνωστές ως Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA) και οι πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης (Heat Shock Proteins, HSPs) (Dita et al. 2006; Wani et al. 2017), γονίδια που κωδικοποιούν οσμωλύτες, με πιο γνωστές την προλίνη και τη βεταΐνη της γλυκίνης, καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η καταλάση (CAT) (Nguyen et al. 2018; Khan et al. 2019). Τα τελευταία χρόνια, πλήθος ερευνών καταδεικνύει τις δυνατότητες αξιοποίησης γονιδίων ή πρωτεϊνών μη-φυτικής προέλευσης για την επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Στην κατηγορία αυτή, εμπίπτουν οι διεγέρτες που προέρχονται από φυτοπαθογόνους μύκητες, οι οποίοι κατά την εξωγενή εφαρμογή ή την ενδογενή έκφραση συμβάλλουν στην επίτευξη μιας κατάστασης προηγμένης γενικής άμυνας (primed-state) που οδηγεί σε ενίσχυση της ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας ή περιορισμό των επιπτώσεών τους, μέσω της επαγωγής της έκφρασης γονιδίων ή βιοχημικών μονοπατιών άμυνας (Wiesel et al. 2014; Wang et al. 2017; Shi et al. 2017). Αντίστοιχα, έχει αξιοποιηθεί επιτυχώς η ενσωμάτωση γονιδίων, προερχόμενων από φυτοπαθογόνα βακτήρια, που κωδικοποιούν οσμωλύτες, όπως η βεταΐνη της γλυκίνης και η οξειδάση της χολίνης σε φυτά καπνού, η οποία οδήγησε σε προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων μέσω της αυξημένης συσσώρευσης οσμωλυτών

(Holmström et al. 2000; Huang et al. 2000). Τα τελευταία χρόνια, ο εμπλουτισμός της γνώσης σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις φυτών – παθογόνων μικροοργανισμών σε πληθώρα παθοσυστημάτων καθιστά εφικτή την αξιοποίηση γονιδίων προερχόμενων από τους τελευταίους με στόχο την ενίσχυση της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι καταπονήσεων. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αποδειχθεί ότι η ενδογενής έκφραση πρωτεϊνών-τελεστών που προέρχονται από μύκητες συνδέεται με ενίσχυση της ανθεκτικότητας έναντι της υψηλής αλατότητας και της ξηρασίας, μέσω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν HSPs πρωτεΐνες ή γονιδίων άμυνας (Rajput et al. 2015; Zhang et al. 2015).

Το γονίδιο *hpaB*, που προέρχεται από το βακτήριο *Xanthomonas vesicatoria* (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), κωδικοποιεί παράγοντα παθογένειας με χαρακτηριστικά του εκκριτικού συστήματος τύπου III (T3SS) των Gram- αρνητικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Το *hpaB* αποτελεί βασικό γονίδιο για την ανάπτυξη του βακτηρίου στους φυτικούς ιστούς, ενώ η σίγησή του οδηγεί σε απώλεια της παθογένειας του βακτηρίου σε ευαίσθητους γονοτύπους φυτών-ξενιστών (Büttner et al. 2004, 2006). Η πρωτεΐνη HpaB εμφανίζει υψηλή ομολογία σε είδη του γένους *Xanthomonas* και μικρότερη ομολογία σε άλλα γένη βακτηρίων, όπως τα *Ralstonia* και *Burkholderia*. Επιπρόσθετα, αποτελεί συνοδό του T3SS που αλληλεπιδρά με άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες-τελεστές (Büttner et al. 2006; Lonjon et al. 2017) προκειμένου να επιτευχθεί η έκκριση των τελευταίων εντός των φυτικών κυττάρων. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη HpaB αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HpaA, με στόχο την έκκριση πρωτεϊνών-μη τελεστών, ενώ μετά την έκκριση της HpaA συντελείται απελευθέρωση της HpaB και μεταφορά πρωτεϊνών-τελεστών στα φυτικά κύτταρα (Lorenz et al. 2008; Scheibner et al. 2018). Με δεδομένο το ρόλο του γονιδίου *hpaB* στην παθογένεια του βακτηρίου και την παράλληλη έλλειψη ερευνητικών δεδομένων σχετικά με τις λειτουργικές επιδράσεις του *in planta*, στόχο αποτέλεσε ο προσδιορισμός της απόκρισης διαγονιδιακών φυτών που εκφράζουν το γονίδιο *hpaB* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Για το σκοπό αυτό, *hpaB*-διαγονιδιακές σειρές του είδους *Nicotiana benthamiana* υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας και αξιολογήθηκε η απόκρισή τους βάσει μορφολογικών, αναπτυξιακών και φυσιολογικών παραμέτρων.

Υλικά και Μέθοδοι

Γενετικό υλικό

Το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη συνιστά σπόρους διαγονιδιακών σειρών του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *hpaB* που προέρχεται από το βακτήριο *X. campestris* pv. *vesicatoria* (στέλεχος 85-10). Ο γενετικός μετασχηματισμός των σειρών πραγματοποιήθηκε με πρωτόκολλο φυλλικών δίσκων (Horsch et al. 1985) και φορέα το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* (στέλεχος GV3101), ενώ τα βακτηριακά κύτταρα μετασχηματίστηκαν με το δυαδικό φορέα pK7WG2D (Gateway Cloning Technology) (Karimi et al. 2002). Η δημιουργία των γονιδιακών κασετών και ο γενετικός μετασχηματισμός των φυτών πραγματοποιήθηκαν από την κα Γ. Κελαϊδή, στο πλαίσιο εκπόνησης της διδακτορικής της διατριβής (ΓΠΑ).

Προκειμένου να γίνει επιλογή των ομοζύγων *hpaB*-σειρών για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ως προς το

επίπεδο ζυγωτίας των διαγονιδιακών σειρών T₂ γενεάς που προέρχονταν από διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού (T₀). Αρχικά, έγινε απολύμανση των σπόρων με καθαρή αιθανόλη (1 min) και βλάστηση σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium (Murashige and Skoog 1962) παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνη (kan: 150 µg/ml). Ως ομοζύγωτες χαρακτηρίστηκαν οι διαγονιδιακές σειρές που εμφάνιζαν απουσία διάσπασης ως προς το γνώρισμα της ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό.

Οι επιλεγμένες σειρές αξιολογήθηκαν περαιτέρω ως προς την επιτυχή ένθεση και έκφραση του διαγονιδίου *hpaB*, μέσω αντιδράσεων PCR και RT-PCR αντίστοιχα. Αρχικά, έγινε απομόνωση ολικού DNA (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) και ακολούθησε έλεγχος για την ένθεση του γονιδίου *hpaB* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές: *hpaB*-F: TCAGGCGCGTAACCACAGATAG και *hpaB*-R: CGAATCGCGCGCTGCTCAT για την ενίσχυση αλληλουχίας μεγέθους 471 bp, που αντιστοιχεί στο γονίδιο *hpaB*. Το μίγμα της PCR περιείχε 1 µl DNA ως μήτρα, 1.25 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.5 µM από κάθε εκκινητή, 1.25 u Taq πολυμεράση (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega), 1x ρυθμιστικού διαλύματος σε τελικό όγκο 20 µl. Το πρόγραμμα ενίσχυσης περιλάμβανε ένα αρχικό κύκλο στους 94 °C για 3 min και στη συνέχεια 30 κύκλους των 30 sec στους 94 °C, 1 min στους 50 °C, 1 min στους 72 °C και ένα τελικό κύκλο επιμήκυνσης στους 72 °C για 5 min. Για τον έλεγχο της έκφρασης του διαγονιδίου, αρχικά απομονώθηκε RNA (RNAeasy plant mini kit, Qiagen) από τα PCR-θετικά φυτά και ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή (Im-Prom II Reverse Transcriptase System, Promega) και PCR (RT-PCR). Η ενίσχυση των διαγονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των εκκινητών, το μίγμα και το πρόγραμμα που προαναφέρθηκαν. Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηχτή αгарόζης 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X), η οποία περιείχε 1% βρωμιούχο αιθίδιο.

Συνολικά επιλέχθηκαν 7 *hpaB*-ομοζύγωτες διαγονιδιακές σειρές (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7), προερχόμενες από διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού (T₀), προς αξιοποίηση στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. Βάσει των δεδομένων που προέκυψαν από την *in vitro* αξιολόγηση των σειρών, επιλέχθηκαν 2 διαγονιδιακές σειρές (#2, #4) για περαιτέρω αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στο στάδιο των ώριμων φυτών. Σε όλα τα πειράματα, ως μάρτυρες αξιοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου (wild type plants-wt).

Καταπόνηση ξηρασίας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών

Για τη μελέτη της απόκρισης των *hpaB*-σειρών στην καταπόνηση ξηρασίας έγινε βλάστηση των σπόρων σε θρεπτικό υπόστρωμα και αξιολόγηση της ανθεκτικότητάς τους βάσει του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων. Για κάθε συνδυασμό σειράς-επιπέδου καταπόνησης, χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις (τριβλία) των 15 σπόρων. Αρχικά, έγινε απολύμανση σπόρων των *hpaB*-διαγονιδιακών σειρών (T₂ γενεά) καθώς και των φυτών wt με εμβάπτιση σε καθαρή αιθανόλη (1 min). Ακολούθησε τοποθέτηση των απολυμασμένων σπόρων σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium, εμπλουτισμένου με διαφορετικές συγκεντρώσεις D-mannitol (0, 100, 200, 300 mM). Τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον υπό συνθήκες φωτοπεριόδου 16/8 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασίας 25 °C. Η αξιολόγηση των φυτών

πραγματοποιήθηκε με βάση το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και το μήκος των σποροφύτων που εκτιμήθηκε για χρονικό διάστημα 20 ημερών.

Ακολούθησε η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στο στάδιο των ώριμων φυτών, όπου για κάθε συνδυασμό σειράς-μεταχείρισης χρησιμοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις (ατομικά φυτά). Για το σκοπό αυτό, σπόροι των *hpaB*-σειρών και φυτών wt απολυμάνθηκαν επιφανειακά με καθαρή αιθανόλη (1 min) και ακολούθησε σπορά σε φυτοδοχεία που περιείχαν μίγμα τύρφης: περλίτη (3:1). Στο στάδιο των 3-5 πραγματικών φύλλων, έγινε μεταφύτευση σε φυτοδοχεία με μίγμα τύρφης:χώματος:περλίτη (1:1:1). Φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων υποβλήθηκαν σε πλήρη στέρηση νερού για χρονικό διάστημα 10 ημερών, ενώ ακολούθησε κανονική άρδευση για 2 ημέρες ώστε να εκτιμηθεί η ενδεχόμενη ικανότητα ανάκαμψής τους.

Η απόκριση των φυτών στην καταπόνηση αξιολογήθηκε με βάση το ποσοστό επιβίωσης, την ανάπτυξη συμπτωμάτων, τη μέτρηση της επιφάνειας ελάσματος (cm^2) και την περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης, η οποία προσδιορίστηκε με χρήση χλωροφυλλόμετρου (SPAD-502 Meter, Konica Minolta), μέσω μέτρησης 4 υγιών πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων στο 1/3 του μήκους τους. Επίσης, υπολογίστηκε το νωπό και ξηρό βάρος και η σχετική περιεκτικότητα νερού των φύλλων, το μήκος της ρίζας, το νωπό και ξηρό βάρος της ρίζας, η απώλεια νερού λόγω διαπνοής και η ποσότητα προλίνης των φύλλων. Το ποσοστό επιβίωσης των φυτών προσδιορίστηκε μέσω του αριθμού των φυτών που επιβίωσαν προς το συνολικό αριθμό φυτών. Για την εκτίμηση του ξηρού βάρους, τα δείγματα ιστού τοποθετήθηκαν στους 70 °C για 24 h και 48 h για τα δείγματα φύλλων και ρίζας, αντίστοιχα. Ο ρυθμός απώλειας νερού λόγω διαπνοής εκτιμήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Qi et al. (2019). Συνοπτικά, υγιή πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα που προέρχονταν από τις *hpaB*-σειρές και τα φυτά wt επώαστηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον (20 °C) και καταγράφηκε το βάρος τους σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ο υπολογισμός έγινε με τον τύπο: $[(\text{Αρχικό νωπό βάρος} - \text{Τελικό νωπό βάρος}) / \text{Αρχικό νωπό βάρος}] \times 100$. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της προλίνης στα φύλλα, πραγματοποιήθηκε λειοτρίβηση 100 mg ιστού με αιθανόλη 70 % και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 4.000 rpm για 10 min. Τα δείγματα ακολούθως μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 95 °C για 25 min και στη συνέχεια σε παγόλουτρο. Μετά από φυγοκέντριση στις 4.000 rpm για 5 min, μετρήθηκε η ποσότητα προλίνης σε φασματοφωτόμετρο στα 520 nm.

Καταπόνηση υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών

Για τη μελέτη της απόκρισης των *hpaB*-σειρών στην υψηλή αλατότητα έγινε βλάστηση των σπόρων υπό συνθήκες καταπόνησης και αξιολόγηση της ανθεκτικότητάς τους βάσει του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων. Για κάθε συνδυασμό σειράς-επιπέδου καταπόνησης, χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις (τριβλία) των 15 σπόρων. Έπειτα από απολύμανση των σπόρων των *hpaB*-σειρών (T_2 γενεά) και των φυτών wt, μέσω εμβάπτισης σε καθαρή αιθανόλη (1 min), έγινε τοποθέτησή τους σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS medium που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0, 100, 200, 300 mM). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον υπό συνθήκες φωτοπεριόδου 16/8 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασίας 25 °C. Η αξιολόγηση των φυτών πραγματοποιήθηκε

με βάση το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και το μήκος των σποροφύτων που εκτιμήθηκε για χρονικό διάστημα 20 ημερών.

Για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε μεταγενέστερο αναπτυξιακό στάδιο, χρησιμοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις (ατομικά φυτά) για κάθε συνδυασμό σειράς-επίπεδου καταπόνησης. Σπόροι των *hpaB*-σειρών και φυτών wt απολυμάνθηκαν με καθαρή αιθανόλη (1 min) και μεταφέρθηκαν σε φυτοδοχεία που περιείχαν μίγμα τύρφης: περλίτη (3:1). Στο στάδιο των 3-5 πραγματικών φύλλων έγινε μεταφύτευση σε φυτοδοχεία με μίγμα τύρφης:χώματος:περλίτη (1:1:1). Φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων, στο στάδιο 5-7 πραγματικών φύλλων, υποβλήθηκαν σε καταπόνηση μέσω ριζοποτίσματος με διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης NaCl (0, 100, 200 mM) για χρονικό διάστημα 20 ημερών.

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας βασίστηκε στην ανάπτυξη συμπτωμάτων και στην ποσότητα χλωροφύλλης των φύλλων, η οποία εκτιμήθηκε με χρήση χλωροφυλλόμετρου, όπως περιγράφηκε παραπάνω, καθώς και με τη μέθοδο των Wintermans and de Mots (1965). Ειδικότερα, φυλλικοί δίσκοι διαμέτρου 6 mm, που αποκόπηκαν από υγιή πλήρως ανεπτυγμένα μεσαία φύλλα, τοποθετήθηκαν σε 20 ml διαλύματος διαφορετικής συγκέντρωσης NaCl (0, 100, 200 mM) για 72 h και ακολούθησε εμβάπτιση σε αιθανόλη έως αποχρωματισμού (περίπου 1 h). Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση των φυλλικών δίσκων για 30 min στο σκοτάδι και εκτίμηση των chl_a, chl_b και ολικής χλωροφύλλης φασματοφωτομετρικά (665 και 649 nm).

Στατιστική ανάλυση

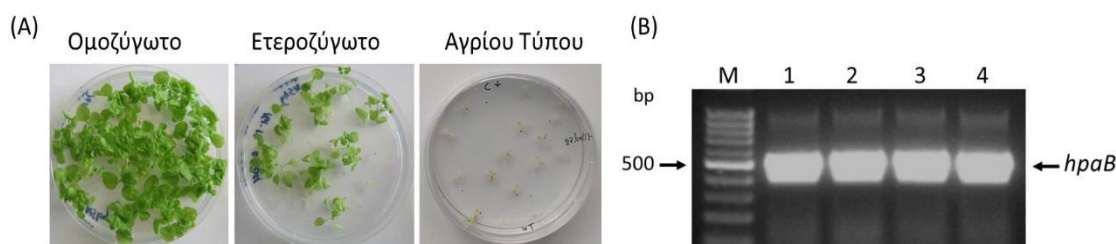
Για κάθε παράμετρο και επίπεδο καταπόνησης, χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο. Τόσο οι αλληλεπιδράσεις όσο και οι κύριοι παράγοντες ελέγχθηκαν ως προς τη σημαντικότητά τους μέσω ανάλυσης ANOVA ($P \leq 0.05$). Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου JMP v.7 (SAS, Cary, NC, USA).

Αποτελέσματα

Επιλογή των ομοζύγων *hpaB*-διαγονιδιακών σειρών

Η επιλογή των ομοζύγων *hpaB*-σειρών T₂ γενεάς πραγματοποιήθηκε με βάση τις αναλογίες διάσπασης ως προς το γνώρισμα ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη. Ως ομοζύγωτες χαρακτηρίστηκαν οι διαγονιδιακές σειρές που παρουσίασαν απουσία διάσπασης ως προς το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό (βλάστηση του συνόλου των σπόρων) και εμφάνισαν τη φαινοτυπική αναλογία που αντιστοιχεί στην κληρονόμηση μονογονιδιακού γνωρίσματος, επιβεβαιώνοντας την ενσωμάτωση ενός αντιγράφου του διαγονιδίου *hpaB* (Εικόνα 1Α). Η ένθεση και η έκφραση του γονιδίου *hpaB* επιβεβαιώθηκε με αντιδράσεις PCR και RT-PCR σε όλες τις υπό μελέτη σειρές, μέσω της ενίσχυσης προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους (471 bp) (Εικόνα 1Β).

Όλοι οι απόγονοι αυτογονιμοποίησης (T₂ γενεά) παρουσίαζαν φυσιολογικό φαινότυπο, ανάλογο με εκείνο των φυτών wt, σε μορφολογικό και αναπτυξιακό επίπεδο, υποδεικνύοντας ότι η ενδογενής έκφραση του *hpaB* δεν επιφέρει αλλαγές στο φαινότυπο.



Εικόνα 1. Επιλογή των *hpaB*-σειρών προς αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας. (Α) Προσδιορισμός της ζυγωτίας, βάσει των αναλογιών διάσπασης του γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη, υπό συνθήκες πίεσης επιλογής (150 µg/ml), (Β) Προϊόντα PCR σε γονιδιωματικό DNA των φυτών του είδους *N. benthamiana*. M: Μάρτυρας σε bp (100 bp DNA Ladder, NEB). 1-4: Διαγονιδιακά φυτά που φέρουν το γονίδιο *hpaB* (471 bp).

Απόκριση των *hpaB*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας

Ο έλεγχος της πιθανούς επίδρασης του γονιδίου *hpaB* στην απόκριση των φυτών στην ξηρασία κατά τη φάση της βλάστησης, αξιολογήθηκε με βάση το δυναμικό βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης (0, 100, 200, 300 mM D-mannitol). Απουσία καταπόνησης, το ποσοστό βλάστησης των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt κυμάνθηκε σε παρόμοια υψηλά επίπεδα (95-100 %), με εξαίρεση τη σειρά #7 που εμφάνισε σημαντικά μειωμένη τιμή (82,5 %). Υπό συνθήκες καταπόνησης, σημειώθηκε μείωση του ποσοστού βλάστησης, η οποία υπήρξε ανάλογη του επιπέδου καταπόνησης, επιφέροντας πιο δραστικές μεταβολές στα 300 mM D-mannitol. Επιπλέον, σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μεταξύ των εξεταζόμενων κατηγοριών φυτών, με τις σειρές #2, #4 και #5 να εμφανίζουν αξιοσημείωτη υπεροχή έναντι των υπολοίπων *hpaB*-σειρών και των φυτών wt στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης, όπου αναδείχθηκε η διαφορετική απόκριση των υπό μελέτη σειρών (Πίνακας 1). Στο επίπεδο αυτό, τη μικρότερη μείωση στο ποσοστό βλάστησης έναντι του μάρτυρα εμφάνισαν οι σειρές #4 και #5 (5 και 7,5 %, αντίστοιχα), ενώ τη μεγαλύτερη μείωση παρουσίασε η σειρά #1 (57,5 %) (Πίνακας 3).

Πίνακας 1. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο ποσοστό βλάστησης (%) των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό βλάστησης (%)									
	Συγκέντρωση D-mannitol (mM) (M)									
	0		100		200		300		M.O. (M)	
wt	97,5	a	92,5	b	87,5	b	70	b	86,88	ab
#1	100	a	100	a	100	a	42,5	d	85,63	abc
#2	97,5	a	100	a	100	a	87,5	a	96,25	ab
#3	95	a	90	b	95	a	47,5	cd	81,88	bc
#4	100	a	100	a	100	a	95	a	98,75	a
#5	100	a	100	a	95	a	92,5	a	96,88	a
#6	100	a	90	b	95	a	70	b	88,75	ab
#7	82,5	b	77,5	c	67,5	c	57,5	bc	71,25	c
M.O. (Σ)	96,56	a	93,75	a	92,50	a	70,31	b		

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Αναφορικά με την ανάπτυξη των σποροφύτων, το μήκος των σποροφύτων επηρεάστηκε σημαντικά από το επίπεδο καταπόνησης, παρουσιάζοντας σταδιακή μείωση με αύξηση της συγκέντρωσης D-mannitol. Απουσία καταπόνησης, το μεγαλύτερο μήκος εμφάνισαν τα σπορόφυτα της σειράς #5 και τα wt (Πίνακας 2). Υπό συνθήκες καταπόνησης, οι σειρές διαφοροποιήθηκαν σημαντικά ως προς το δυναμικό ανάπτυξής τους. Ειδικότερα, οι σειρές #4, #5 και τα φυτά wt εμφάνισαν το μεγαλύτερο μήκος σποροφύτων, όπως προκύπτει από τις μέσες τιμές σε όλα τα επίπεδα καταπόνησης. Ωστόσο, βάσει της μείωσης στο μήκος των σποροφύτων έναντι του μάρτυρα, υπεροχή εμφάνισαν οι σειρές #2, #4 και #7 (34,48, 33,73 και 34,48 %, αντίστοιχα) έναντι των υπολοίπων *hpaB*-σειρών και των φυτών wt, η οποία επίσης εκφράστηκε μέσω της βελτιωμένης ευρωστίας και της αυξημένης επιφάνειας του ελάσματος των φύλλων (Πίνακας 3) (Εικόνα 2). Αντίθετα, τη μεγαλύτερη μείωση στο μήκος σποροφύτων εμφάνισε η σειρά #6 (57,65 %) (Πίνακας 3).

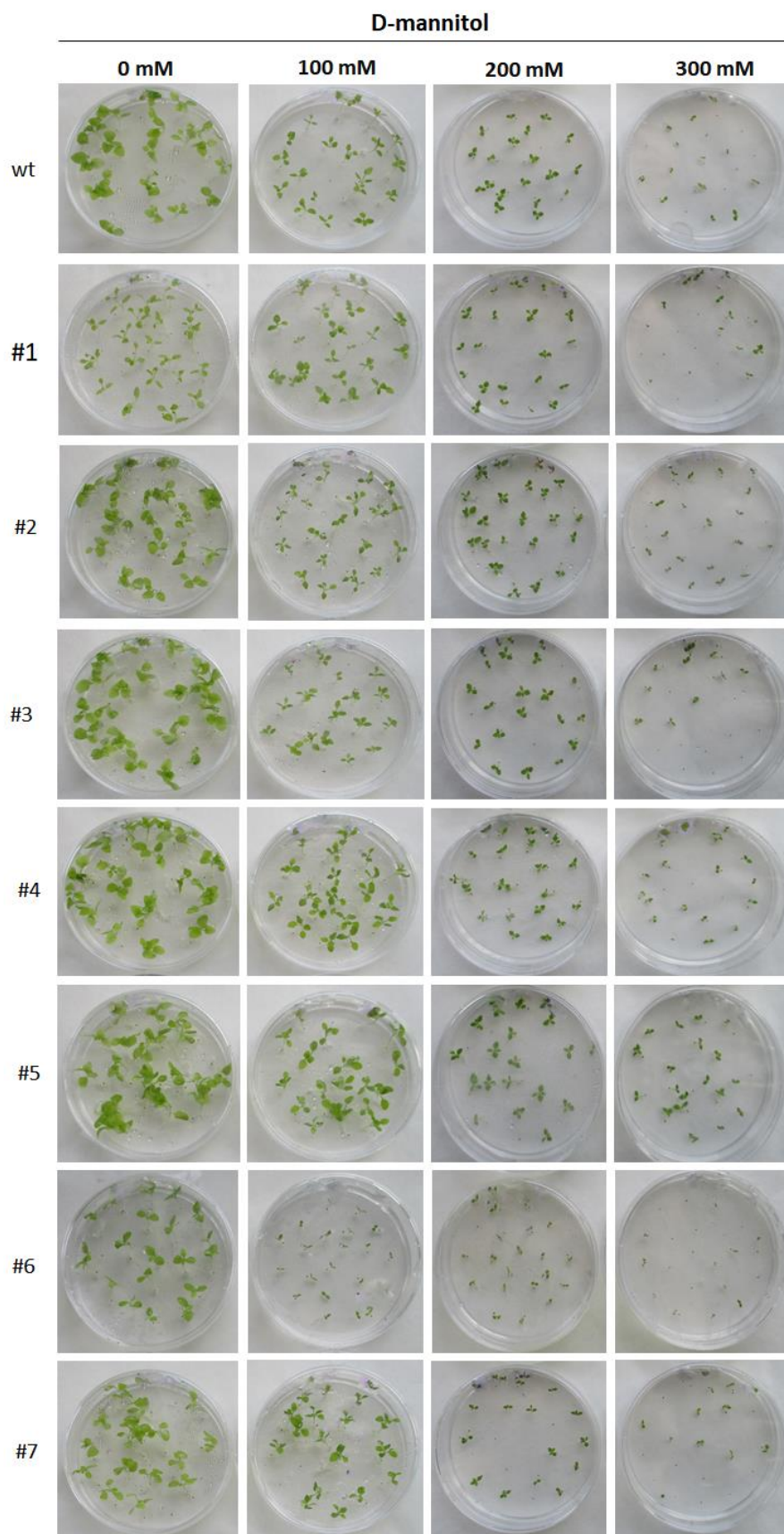
Πίνακας 2. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο μήκος των σποροφύτων των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Μήκος σποροφύτων (cm)									
	Συγκέντρωση D-mannitol (mM) (M)									
	0		100		200		300		M.O. (M)	
wt	3,78	a	3,08	ab	2,76	a	2,30	a	2,98	a
#1	2,80	c	2,34	d	2,20	c	1,78	b	2,28	c
#2	2,90	c	2,80	c	2,46	b	1,90	b	2,52	bc
#3	3,00	c	2,84	c	2,34	bc	1,74	b	2,48	bc
#4	3,32	b	2,90	bc	2,78	a	2,20	a	2,80	ab
#5	3,90	a	3,20	a	2,80	a	2,34	a	3,06	a
#6	3,40	b	2,86	c	2,46	b	1,44	c	2,54	bc
#7	2,90	c	2,78	c	2,30	bc	1,90	b	2,47	bc
M.O. (Σ)	3,25	a	2,85	b	2,51	c	1,95	d	2,98	a

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

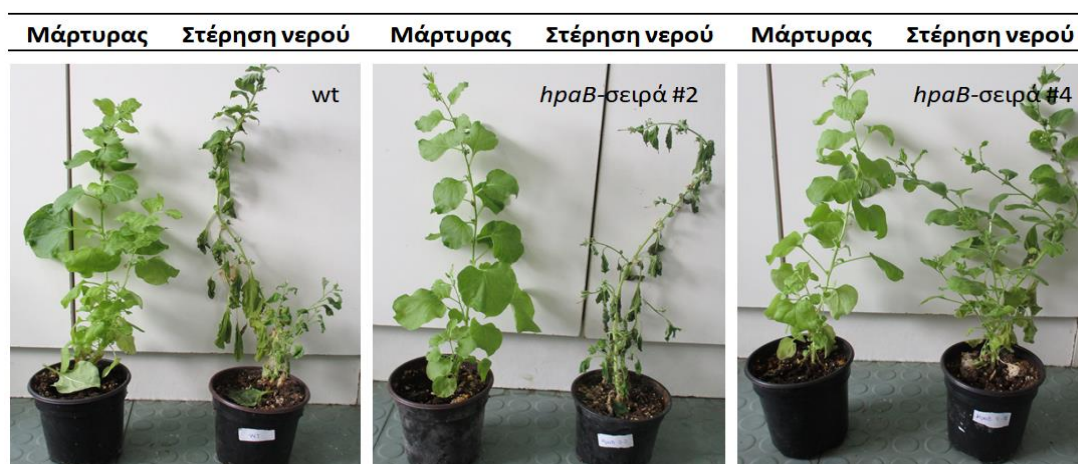
Πίνακας 3. Επίδραση του επιπέδου καταπόνησης ξηρασίας (0, 100, 200, 300 mM D-mannitol) στις *hpaB*-σειρές και στα φυτά wt στο στάδιο της βλάστησης.

Μεταχείριση Σειρά		Μείωση έναντι του μάρτυρα (%)				
		Ποσοστό βλάστησης			Μήκος σποροφύτων	
		Συγκέντρωση D-mannitol				
		100 mM	200 mM	300 mM	100 mM	200 mM
wt	5,13	10,26	28,21	18,52	26,98	39,15
#1	0	0	57,50	16,43	21,43	36,43
#2	0	0	10,26	3,45	15,17	34,48
#3	0	0	50,00	5,33	22,00	42,00
#4	0	0	5,00	12,65	16,26	33,73
#5	0	5,00	7,50	17,95	28,21	40,00
#6	10,00	5,00	30,00	15,88	27,65	57,65
#7	6,06	18,18	30,30	4,14	20,69	34,48



Εικόνα 2. Συγκριτική απόκριση των *hpaB*-σειρών (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7) και των φυτών wt ως προς το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας (0, 100, 200, 300 mM D-mannitol).

Για να διερευνηθεί η επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hpaB* στην απόκριση στην ξηρασία στο στάδιο των ώριμων φυτών, φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων υποβλήθηκαν σε πλήρη στέρηση νερού για διάστημα 10 ημερών, ακολουθούμενη από κανονική άρδευση διάρκειας 2 ημερών ώστε να επιτραπεί η ανάκαμψη των φυτών. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, διαπιστώθηκε η υπεροχή της σειράς #4, η οποία εμφάνισε ηπιότερα συμπτώματα μααρασμού και κύρτωσης του ελάσματος των φύλλων, παρουσιάζοντας παράλληλα ανάκαμψη έπειτα από κανονική άρδευση (Εικόνα 3). Αντίθετα, η σειρά #2 και τα φυτά wt χαρακτηρίστηκαν από έντονα συμπτώματα μααρασμού και αφυδάτωσης και αδυναμία ανάκαμψης έπειτα από κανονική άρδευση. Τα φαινοτυπικά δεδομένα συμπίπτουν με το ποσοστό επιβίωσης των φυτών, που καταδεικνύει την υπεροχή της σειράς #4 (52,50 %) έναντι της σειράς #2 και των φυτών wt (26,67 και 37,50 %, αντίστοιχα) (Πίνακας 4, Παράρτημα VI). Σε αναπτυξιακό επίπεδο, η καταπόνηση επέφερε μείωση της επιφάνειας ελάσματος σε όλα τα φυτά, με τη σειρά #4 να εμφανίζει τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα (2,32 %) συγκριτικά με τη σειρά #2 και τα φυτά wt (30,67 και 28,09 %, αντίστοιχα) (Πίνακας 4, Παράρτημα VI). Αντίθετα, το μήκος της ρίζας καθώς και το νωπό και ξηρό βάρος των φύλλων δε διέφεραν μεταξύ των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt καθώς και μεταξύ των μεταχειρίσεων (Παράρτημα VI). Ωστόσο, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στη σχετική περιεκτικότητα νερού των φύλλων, η οποία μειώθηκε υπό συνθήκες καταπόνησης και στις δύο κατηγορίες φυτών. Η σειρά #4 εμφάνισε τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα (19,21 %) συγκριτικά με τη σειρά #2 και τα φυτά wt (26,63 και 28,47 % αντίστοιχα) (Πίνακας 4, Παράρτημα VI).

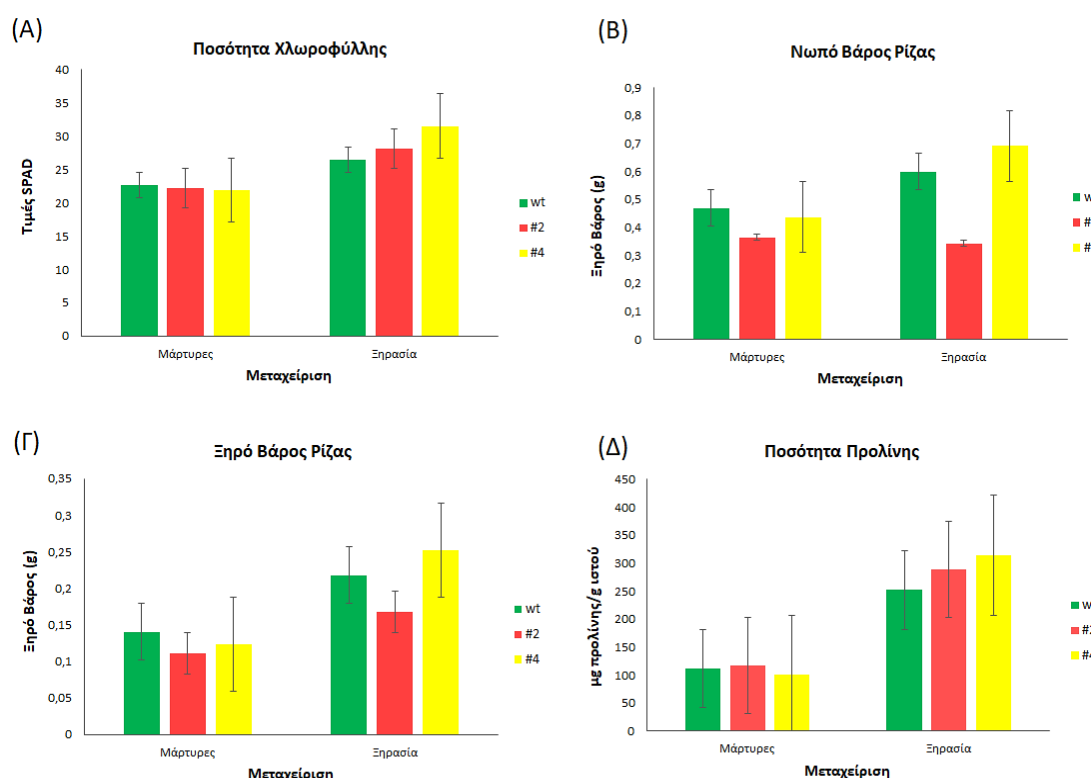


Εικόνα 3. Συγκριτική απόκριση των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt στην υδατική καταπόνηση στο στάδιο των ώριμων φυτών.

Πίνακας 4. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στην επιφάνεια του ελάσματος, στο μήκος της ρίζας, στο νωπό και ξηρό βάρος των φύλλων και στη σχετική περιεκτικότητα νερού των φύλλων στις *hpaB*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό επιβίωσης (%)	Μείωση έναντι του μάρτυρα (%)				
		Επιφάνεια ελάσματος	Μήκος ρίζας	Νωπό βάρος φύλλων	Ξηρό βάρος φύλλων	Σχετική Περιεκτικότητα Νερού
wt	37,50	28,09	-43,41	11,67	-31,82	28,47
#2	26,67	30,67	5,74	39,65	20,48	26,63
#4	52,50	2,32	14,43	-19,74	80,55	19,21

Σχετικά με την περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη, παρατηρήθηκε αύξηση της χλωροφύλλης σε όλα τα υπό μελέτη φυτά υπό συνθήκες καταπόνησης, με τη σειρά #4 να παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές (Εικόνα 4Α, Παράρτημα VI). Παράλληλα, σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν στο νωπό βάρος της ρίζας, με τη σειρά #4 να παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές υπό συνθήκες ξηρασίας (Εικόνα 4Β), καθώς και στο ξηρό βάρος της ρίζας που σημείωσε αύξηση στα καταπονημένα φυτά τόσο των *hpaB*-σειρών όσο και των φυτών wt (Εικόνα 4Γ, Παράρτημα VI). Ως προς το ξηρό βάρος της ρίζας, η σειρά #4 εμφάνισε τη μεγαλύτερη αύξηση έναντι του μάρτυρα (αύξηση 104,8 %) (Εικόνα 4Γ). Σχετικά με το ρυθμό απώλειας νερού λόγω διαπνοής, σημειώθηκε αύξηση τόσο στις *hpaB*-σειρές όσο και στα φυτά wt με το πέρας του χρόνου. Παρά το ότι ο ρυθμός απώλειας νερού δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των σειρών, η σειρά #2 εμφάνισε υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τη σειρά #4 και τα φυτά wt (Παράρτημα VI). Τέλος, η καταπόνηση οδήγησε σε αύξηση της ποσότητας προλίνης και στις δύο κατηγορίες φυτών, με τη σειρά #4, ακολουθούμενη από τη σειρά #2, να εμφανίζει τη μεγαλύτερη αύξηση (Εικόνα 4Δ, Παράρτημα VI). Στο σύνολό τους, τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η έκφραση του γονιδίου *hpaB* στο είδος *N. benthamiana* επηρεάζει την απόκριση των φυτών στην καταπόνηση ξηρασίας και επιπλέον υπογραμμίζουν την υπεροχή της σειράς #4 ως προς την ανθεκτικότητα έναντι της ξηρασίας τόσο στη φάση της βλάστησης όσο και στο στάδιο των ώριμων φυτών.



Εικόνα 4. Συγκριτική απόκριση των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας στο στάδιο των ώριμων φυτών. (Α) Περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη, βάσει του χλωροφύλλομετρου SPAD ($n = 4$). (Β) Νωπό βάρος ρίζας (g) ($n = 4$). (Γ) Ξηρό βάρος ρίζας (g) ($n = 4$). (Δ) Ποσότητα προλίνης (μg/g φυτικού ιστού) ($n = 4$). Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τεσσάρων επαναλήψεων.

Απόκριση των *hpaB*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας

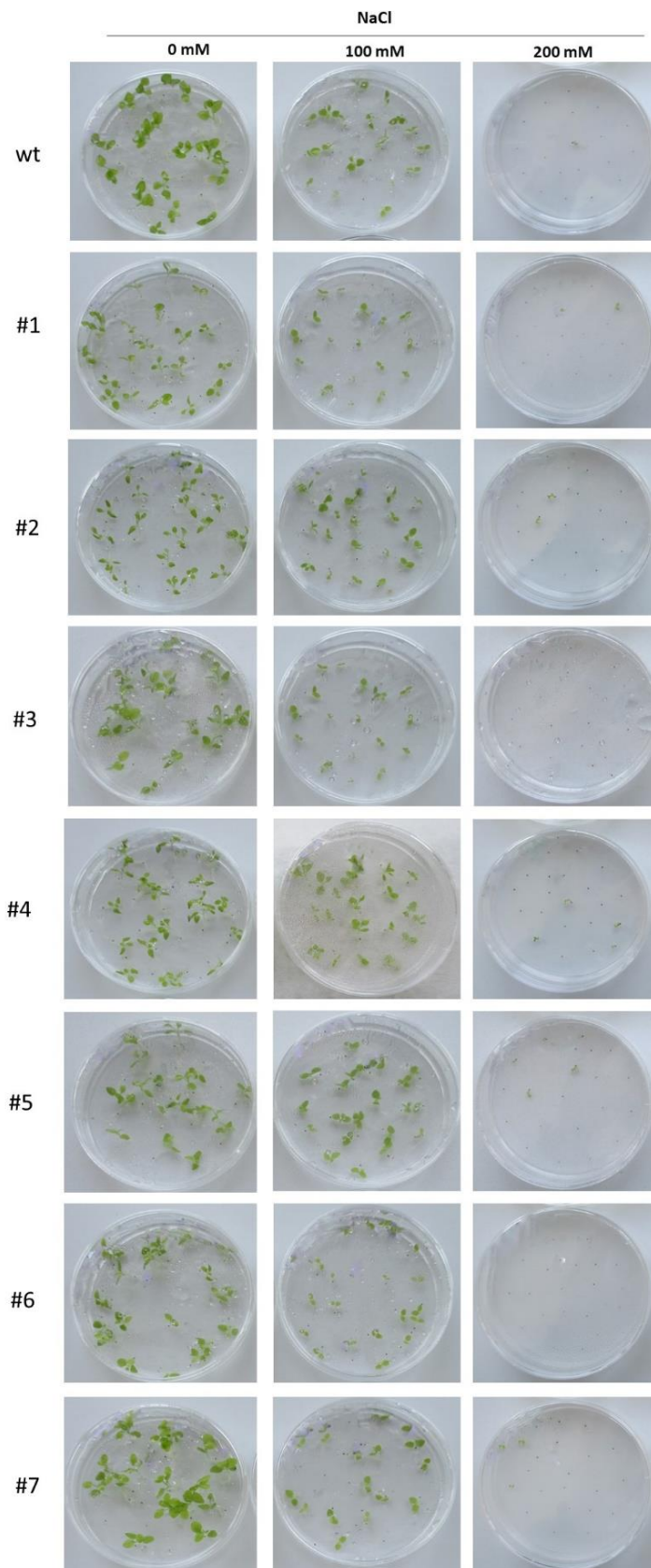
Η επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hpaB* έναντι της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και πρώιμης ανάπτυξης σποροφύτων αξιολογήθηκε μέσω τοποθέτησης σπόρων των *hpaB*-σειρών (T₂ γενεά) και φυτών wt σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0, 100, 200, 300 mM). Απουσία καταπόνησης, το ποσοστό βλάστησης των διαφορετικών κατηγοριών φυτών κυμάνθηκε σε παρόμοια υψηλά επίπεδα (92,5 – 100 %), με εξαίρεση τη σειρά #7 η οποία εμφάνισε το χαμηλότερο ποσοστό βλάστησης (77,5 %) (Πίνακας 5). Στα 100 mM NaCl, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt με τις σειρές #5, #2 και #6 να εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά βλάστησης (100, 95 και 92,5 % αντίστοιχα) (Πίνακας 5). Στα 200 mM NaCl, η επίδραση της καταπόνησης ήταν έκδηλη στο σύνολο των υπό μελέτη φυτών, επιφέροντας δραστική μείωση στο ποσοστό βλάστησής τους (64,52 - 100 %) (Πίνακας 6). Στο επίπεδο αυτό, σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό βλάστησης μεταξύ των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt, ενώ η σειρά #7 εμφάνισε το υψηλότερο ποσοστό βλάστησης (27,5 %) (Πίνακας 5). Σημειώνεται ότι η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης NaCl στα 300 mM είχε αρνητική επίδραση στη βλάστηση των σπόρων, επιφέροντας αδυναμία βλάστησης στο σύνολο των υπό μελέτη φυτών.

Αντίστοιχα, σημαντική υπήρξε η επίδραση της καταπόνησης και στο δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων, με τις *hpaB*-σειρές να εμφανίζουν διαφορετική απόκριση συγκριτικά με τα φυτά wt. Απουσία καταπόνησης, το μεγαλύτερο μήκος σποροφύτων εμφάνισαν οι σειρές #3 και #7, ενώ οι υπόλοιπες σειρές δε διέφεραν μεταξύ τους καθώς και με τα φυτά wt (Πίνακας 5) (Εικόνα 5). Ωστόσο, στα 100 mM NaCl το μεγαλύτερο μήκος εμφάνισαν τα σποροφύτα των σειρών #2 και #5, ενώ στα 200 mM NaCl σημειώθηκε υπεροχή των σειρών #4 και #7 (Πίνακας 5). Αξίζει να σημειωθεί ότι στα 200 mM NaCl η σειρά #4 επηρεάστηκε σε μικρότερο βαθμό από την καταπόνηση, λαμβάνοντας υπόψη ότι εμφάνισε τη μικρότερη μείωση έναντι του μάρτυρα (56,04 %) (Πίνακας 6). Αντίθετα, στο ίδιο επίπεδο καταπόνησης, οι σειρές #3, #6 και τα φυτά wt εμφάνισαν αδυναμία ανάπτυξης (Πίνακες 5, 6).

Πίνακας 5. Επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στο ποσοστό βλάστησης (%) και στο δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων (cm) των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό Βλάστησης (%)								Μήκος Φυτού (cm)							
	Συγκέντρωση NaCl (mM) (M)															
	0	100	200	M.O. (K)				0	100	200	M.O. (M)					
wt	97,5	a	75	d	0,0	d	57,50	a	1,90	b	1,00	d	0,0	c	0,97	b
#1	100	a	87,5	bc	2,5	cd	63,33	a	1,90	b	1,28	abc	0,16	c	1,11	ab
#2	100	a	95	ab	7,5	bcd	67,50	a	1,90	b	1,42	a	0,30	bc	1,21	ab
#3	97,5	a	55	e	0,0	d	50,83	a	2,76	a	1,10	cd	0,0	c	1,29	ab
#4	100	a	77,5	d	12,5	b	63,33	a	1,82	b	1,20	bc	0,80	a	1,27	ab
#5	92,5	a	100	a	10	bc	67,50	a	1,84	b	1,46	a	0,52	ab	1,27	ab
#6	95	a	92,5	ab	0,0	d	62,50	a	1,82	b	1,34	ab	0,0	c	1,05	b
#7	77,5	b	80	cd	27,5	a	61,67	a	2,88	a	1,36	ab	0,78	a	1,67	a
M.O. (Σ)	95	a	82,81	b	7,5	c			2,10	a	1,27	b	0,32	c		

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$). Στα 300 mM NaCl και οι δύο κατηγορίες φυτών εμφάνισαν αδυναμία βλάστησης.

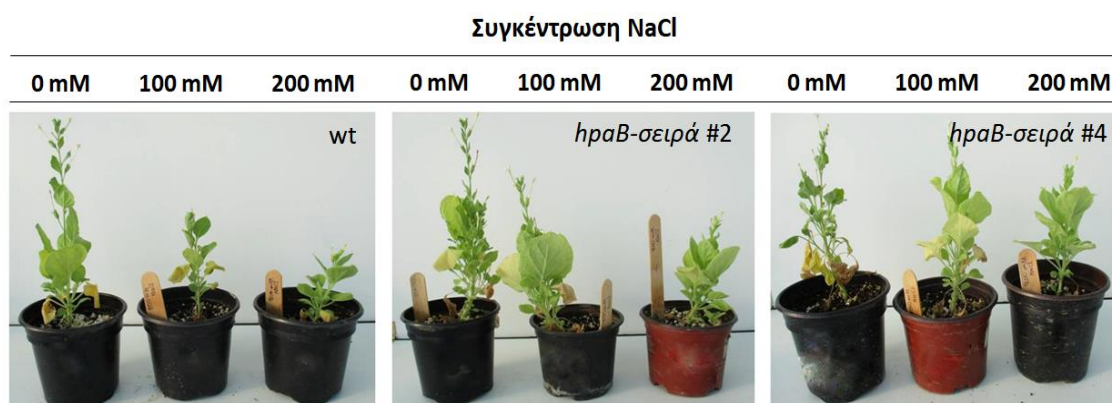


Εικόνα 5. Συγκριτική απόκριση των *hpaB*-σειρών (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7) και των φυτών wt ως προς το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl). Στα 300 mM NaCl, το σύνολο των υπό μελέτη σειρών και των φυτών wt εμφάνισε αδυναμία βλάστησης.

Πίνακας 6. Επίδραση του επιπέδου καταπόνησης υψηλής αλατότητας (0, 100, 200, 300 mM NaCl) στις *hpaB*-σειρές και στα φυτά wt στο στάδιο της βλάστησης.

Μεταχείριση Σειρά	Μείωση έναντι του μάρτυρα (%)					
	Ποσοστό βλάστησης			Μήκος σποροφύτων		
	Συγκέντρωση NaCl					
	100 mM	200 mM	300 mM	100 mM	200 mM	300 mM
wt	23,07	100,00	100,00	47,37	100,00	100,00
#1	12,50	97,50	100,00	32,63	91,58	100,00
#2	5,00	92,50	100,00	25,26	84,21	100,00
#3	43,59	100,00	100,00	60,14	100,00	100,00
#4	22,50	87,50	100,00	34,06	56,04	100,00
#5	-8,11	89,19	100,00	20,65	71,74	100,00
#6	2,63	100,00	100,00	26,37	100,00	100,00
#7	-3,22	64,52	100,00	52,78	72,92	100,00

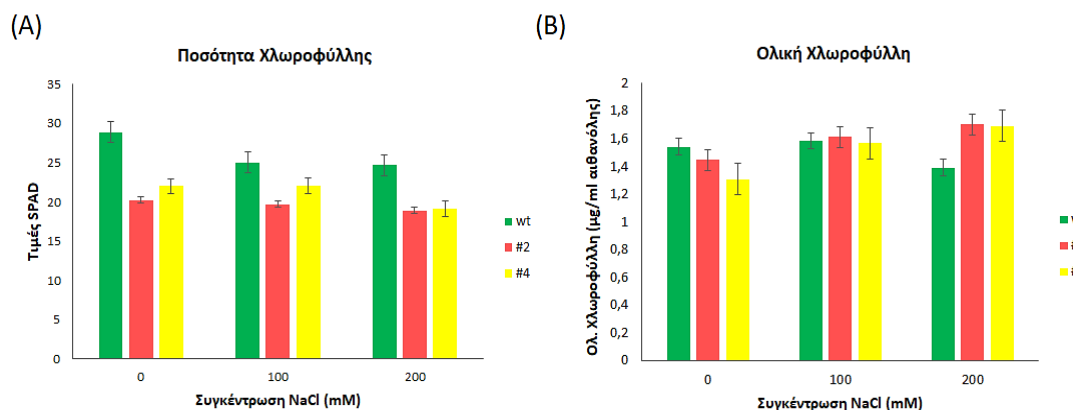
Η επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hpaB* στην πρόκληση ανθεκτικότητας έναντι καταπόνησης υψηλής αλατότητας διερευνήθηκε περαιτέρω σε φυτά ηλικίας 8 εβδομάδων έπειτα από ριζοπότισμα με διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης NaCl (0, 100, 200 mM) για χρονικό διάστημα 20 ημερών. Απουσία καταπόνησης, οι *hpaB*-σειρές εμφάνισαν φαινότυπο που δεν παρέκκλινε από το φυσιολογικό φαινότυπο των φυτών wt, όπως αναδεικνύεται από το ύψος των φυτών καθώς και την επιφάνεια του ελάσματος των φύλλων (Εικόνα 6Α). Υπό συνθήκες καταπόνησης, τόσο στα 100 όσο και στα 200 mM NaCl, το σύνολο των φυτών εμφάνισε συμπτώματα χλώρωσης, τα οποία ήταν περισσότερο έκδηλα στις 20 ημέρες από την έναρξη της καταπόνησης. Περαιτέρω, στα 200 mM NaCl, σημειώθηκε ανάρσωση της ανάπτυξης των φυτών, η οποία υπήρξε ιδιαίτερα δραστική στα φυτά wt. Στο επίπεδο αυτό, οι *hpaB*-σειρές, και ιδιαίτερα η σειρά #4, χαρακτηρίστηκαν από βελτιωμένη ανάπτυξη και ευρωστία, η οποία εκφράστηκε μέσω του μεγαλύτερου ύψους και της μεγαλύτερης επιφάνειας ελάσματος των φύλλων (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Συγκριτική απόκριση των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl) στο στάδιο των ώριμων φυτών.

Σχετικά με την ποσότητα χλωροφύλλης, βάσει των τιμών SPAD, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των *hpaB*- και των φυτών wt, με τα τελευταία να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές τόσο απουσία όσο και παρουσία καταπόνησης (Εικόνα 7Α, Παράρτημα VI). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι η καταπόνηση αλατότητας επέφερε μείωση της περιεκτικότητας

χλωροφύλλης στα φυτά wt, ενώ στις σειρές #2 και #4 η ποσότητα χλωροφύλλης δε μεταβλήθηκε σημαντικά. Αντίστοιχα, οι τιμές ολικής χλωροφύλλης σε φυλλικούς δίσκους που τοποθετήθηκαν σε διαλύματα NaCl δε διέφεραν μεταξύ των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt, με τις πρώτες ωστόσο να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές παρουσία καταπόνησης (Εικόνα 7B, Παράρτημα VI). Τα συνολικά ευρήματα παρέχουν ενδείξεις ότι η έκφραση του γονιδίου *hpaB* επιδρά θετικά στην απόκριση των φυτών στην καταπόνηση υψηλής αλατότητας, παρέχοντας περαιτέρω ενδείξεις σχετικά με τη βελτιωμένη απόκριση της σειράς #4, τόσο κατά τη φάση της βλάστησης όσο και στο στάδιο των ώριμων φυτών.



Εικόνα 7. Συγκριτική απόκριση των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας (0, 100, 200 mM NaCl) στο στάδιο των ώριμων φυτών. (Α) Περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη, βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD ($n = 4$). Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τεσσάρων επαναλήψεων. (Β) Περιεκτικότητα των φυλλικών δίσκων σε ολική χλωροφύλλη ($n = 3$). Τα δεδομένα αποτελούν τους μέσους όρους \pm ΤΣ των τριών επαναλήψεων.

Συζήτηση

Τα φυτά υπόκεινται συνεχώς στην επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων, οι οποίες επιδρούν δυσμενώς στα μορφολογικά και φυσιολογικά τους γνωρίσματα, επιφέροντας παράλληλη μείωση της παραγωγικότητάς τους και απειλώντας την επισιτιστική ασφάλεια σε παγκόσμιο επίπεδο. Μεταξύ των αβιοτικών καταπονήσεων, η ξηρασία και η υψηλή αλατότητα κατατάσσονται στις πλέον επιζήμιες, εξαιτίας της συχνής τους εμφάνισης αλλά και των επιπτώσεων που προκαλούν (Goldback et al. 2014; Zhu 2016). Με στόχο την αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς την εφαρμογή των σύγχρονων μοριακών και βιοτεχνολογικών μεθόδων, οι οποίες προσφέρουν σημαντικές προοπτικές διεύρυνσης της υπάρχουσας γονιδιακής δεξαμενής, δίνοντας τη δυνατότητα αξιοποίησης γονιδίων μη φυτικής προέλευσης. Στο πλαίσιο αυτό, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών υπογραμμίζει τη δυνατότητα επίτευξης ανθεκτικότητας μέσω της διαγονιδιακής έκφρασης γονιδίων που προέρχονται από μικροοργανισμούς, με κυριότερα αυτά που προέρχονται από φυτοπαθογόνους μύκητες και βακτήρια (Moose and Mumm 2008).

Το γονίδιο *hpaB*, που προέρχεται από το βακτήριο *Xanthomonas vesicatoria* (*X. campestris* pv. *vesicatoria*), έχει αποδειχθεί ότι δρα ως παράγοντας παθογένειας με χαρακτηριστικά

ενός συνοδού κυττάρου του T3SS, με την έκφρασή του να αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη του βακτηρίου εντός των φυτικών κυττάρων (Büttner et al. 2004, 2006). Η έρευνα σχετικά με τη δράση του γονιδίου *hpaB* έχει εστιάσει στο λειτουργικό ρόλο του γονιδίου στην παθογένειά του *per se* και στην εδραίωση ασθένειας, αλλά και στη συμβολή του στην έγχυση βακτηριακών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-τελεστών εντός των φυτικών κυττάρων (Scheibner et al. 2016), ενώ εκλείπουν μελέτες σχετικά με τις λειτουργικές επιδράσεις του σε φυτά. Στο πλαίσιο αυτό, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaB* κατά την έκφρασή του σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana*. Συγκεκριμένα, η μελέτη εστίασε στον προσδιορισμό της απόκρισης *hpaB*-σειρών στην καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών.

Ως προς την απόκριση των φυτών στην ξηρασία, τα συνολικά αποτελέσματα καταδεικνύουν τη σημαντική επίδραση της καταπόνησης τόσο στις *hpaB*-σειρές όσο και στα φυτά wt. Η καταπόνηση επέφερε μείωση του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων, με την επίδραση να είναι ανάλογη της έντασης της καταπόνησης. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε ευθυγράμμιση με αναφορές σχετικά με την επίδραση της ξηρασίας στη φάση της βλάστησης σε διάφορα φυτικά είδη, όπου η απόκριση των φυτών περιλαμβάνει μείωση του ποσοστού βλάστησης και ανάσχεση της ανάπτυξης των σποροφύτων ως αποτέλεσμα της μειωμένης διαίρεσης και επιμήκυνσης των κυττάρων λόγω πρόκλησης οσμωτικής καταπόνησης (Pérez-Molphe-Balch et al. 1996; Schuppler et al. 1998; Farooq et al. 2009; Liu et al. 2015). Παρά τις δυσμενείς επιδράσεις στο σύνολο των φυτών, οι υπό μελέτη κατηγορίες εμφάνισαν διαφορική απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης. Το σύνολο των ευρημάτων υπογραμμίζει την υπερέχουσα συμπεριφορά των σειρών #2, #4 και #5, η οποία εκφράστηκε μέσω των μειωμένων απωλειών ως προς το ποσοστό βλάστησης και το μήκος των σποροφύτων, συγκριτικά με τις υπόλοιπες σειρές και τα φυτά wt. Τα ευρήματα αυτά συνδυάστηκαν με τη φαινοτυπική υπεροχή των εν λόγω σειρών, οι οποίες χαρακτηρίζονταν από βελτιωμένη ευρωστία και μεγαλύτερη επιφάνεια ελάσματος.

Παράλληλα, η καταπόνηση ξηρασίας επέφερε δραστικές μεταβολές στο στάδιο των ώριμων φυτών, όπου οι επιδράσεις υπήρξαν έκδηλες τόσο σε φαινοτυπικό όσο και σε αναπτυξιακό και φυσιολογικό επίπεδο. Στο μεταγενέστερο αναπτυξιακό στάδιο, η απόκριση των φυτών περιλάμβανε ορατά συμπτώματα καταπόνησης, όπως γενικευμένο μαρασμό, αφυδάτωση και κύρτωση του ελάσματος των φύλλων. Η παρατηρηθείσα φαινοτυπική απόκριση έχει αναφερθεί και σε άλλα φυτικά είδη (Farooq et al. 2009; Dong et al. 2019) και αποδίδεται στο μειωμένο ρυθμό κυτταρικών διαιρέσεων και πρόσληψης θρεπτικών από τη ρίζα (Farooq et al. 2009; Li et al. 2017). Σε φαινοτυπικό επίπεδο, σαφώς έκδηλη ήταν η υπεροχή της σειράς #4, η οποία χαρακτηρίστηκε από φαινότυπο ανάκαμψης, έπειτα από κανονική άρδευση, απουσία ή ήπια εκδήλωση συμπτωμάτων καταπόνησης καθώς και σημαντικά αυξημένο ποσοστό επιβίωσης των φυτών. Περαιτέρω, η σειρά #4 εμφάνισε αξιοσημείωτη υπεροχή έναντι της σειράς #2 και των φυτών wt ως προς την επιφάνεια του ελάσματος, του οποίου η μείωση υπό συνθήκες ξηρασίας αποτελεί τυπικό σύμπτωμα που εντάσσεται στις στρατηγικές αποφυγής της καταπόνησης καθώς οδηγεί σε μειωμένη απώλεια νερού λόγω διαπνοής (Zhou et al. 2017; Abid et al. 2018; Zhang et al. 2020). Παράλληλα, η μειωμένη επιφάνεια ελάσματος σχετίζεται με το μειωμένο ρυθμό κυτταρικών διαιρέσεων και φωτοσύνθεσης, ως αποτέλεσμα της

μειωμένης αγωγιμότητας των στομάτων, της παρεμπόδισης της φυσιολογικής λειτουργίας των φωτοσυστημάτων και της μειωμένης δραστηριότητας της Rubisco (Cornic and Massacci 1996; Lawlor and Tezara 2009; Kapoor et al. 2020). Αξίζει δε να σημειωθεί ότι η απουσία μεταβολής στην επιφάνεια ελάσματος στη σειρά #4 συνοδεύτηκε από ικανότητα διατήρησης νερού στα φύλλα, συγκριτικά με τη σειρά #2 και τα φυτά wt, υποδεικνύοντας τη βελτιωμένη απόκριση της εν λόγω σειράς στην καταπόνηση ξηρασίας. Περαιτέρω, η σειρά #4 εμφάνισε τη μεγαλύτερη αύξηση στην ποσότητα χλωροφύλλης υπό συνθήκες καταπόνησης καθώς και τη μεγαλύτερη αύξηση στο νωπό και ξηρό βάρος της ρίζας, συγκριτικά με τη σειρά #2 και τα φυτά wt. Υπό συνθήκες ξηρασίας, είναι συνήθης η μείωση του βάρους της ρίζας και της συνολικής φυτικής βιομάζας ή η μεταβολή του πηλίκου του βάρους ρίζας προς το βάρος βλαστού, ενώ η αύξηση του ξηρού βάρους της ρίζας έχει συσχετιστεί με διαμερισματοποίηση της βιομάζας των φυτών υπό συνθήκες ξηρασίας, η οποία συνδέεται με αυξημένα επίπεδα οσμωλυτών ή αμπισισικού οξέος στο ριζικό σύστημα που συμβάλλουν στην καλύτερη απορρόφηση νερού (Shao et al. 2008; Xu et al. 2015). Σε πλήρη ευθυγράμμιση με τα ανωτέρω, βρίσκεται η δραστική αύξηση της προλίνης στα φύλλα της σειράς #4 (212,4 %), η οποία υπερέβη σημαντικά της αντίστοιχης μεταβολής στα φυτά της σειράς #2 και wt (145,9 % και 126,1 % αντίστοιχα). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τις αναφορές σχετικά με την αυξημένη συσσώρευση οσμωλυτών, με κύρια την προλίνη, υπό συνθήκες ξηρασίας (Rai et al. 2012; Dong et al. 2019), με τη σύνθεση της τελευταίας να εντάσσεται στις στρατηγικές προσαρμογές αποφυγής της ξηρασίας, καθώς συμβάλλει στη διατήρηση του φυσιολογικού επιπέδου οσμωτικής πίεσης και της δραστηριότητας των πρωτεϊνών (Yang et al. 2021). Τα συνολικά ευρήματα υπογραμμίζουν τη διαφορετική απόκριση των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt, η οποία αποτυπώνεται από τη σαφή υπεροχή ορισμένων *hpaB*-σειρών, με κυριότερη αυτή της σειράς #4 που εκφράστηκε τόσο στη βλάστηση όσο και σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια.

Κατ' αντιστοιχία, η επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας κατά τη φάση της βλάστησης ήταν εμφανής τόσο στις *hpaB*-σειρές όσο και στα φυτά wt και ήταν γενικά ανάλογη της έντασής της, επιφέροντας αδυναμία βλάστησης στα 300 mM NaCl. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με αναφορές σχετικά με τη μείωση του δυναμικού βλάστησης και την αύξηση του μέσου χρόνου βλάστησης των σπόρων καθώς και την ανάσχεση της επιμήκυνσης των ιστών βλαστού και ρίζας (Guo et al. 2012; Wu et al. 2015; Santo et al. 2017; Dehnavi et al. 2020) που συντελούνται λόγω μεταβολών στις αναλογίες θρεπτικών στοιχείων, πρόκλησης οσμωτικής καταπόνησης και τοξικότητας εξαιτίας της αυξημένης συσσώρευσης ιόντων Na^+ και Cl^- στο κυτταρόπλασμα (Kaya et al. 2006; Munns and Tester 2008; Zörb et al. 2019). Παρά το γεγονός ότι το σύνολο των υπό μελέτη φυτών επηρεάστηκαν δραστικά από την καταπόνηση, αξίζει να σημειωθεί ότι το πλείστο των *hpaB*-σειρών εμφάνισε υπεροχή έναντι των φυτών wt, η οποία αφορούσε σε υψηλότερο δυναμικό βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων σε όλα τα επίπεδα καταπόνησης. Στο πλαίσιο αυτό, η σειρά #7 διακρίθηκε ως προς το ποσοστό βλάστησης των σπόρων, εμφανίζοντας τις μικρότερες απώλειες έναντι του μάρτυρα, ενώ οι σειρές #4 και #5 εμφάνισαν καλύτερη επίδοση ως προς την ανάπτυξη των σποροφύτων, η οποία εκφράστηκε μέσω της μικρότερης μείωσης έναντι του μάρτυρα στα 200 mM NaCl.

Περαιτέρω, σημαντική υπήρξε η επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας και στο στάδιο των ώριμων φυτών, επιφέροντας μεταβολές τόσο σε φαινοτυπικό όσο και σε

αναπτυξιακό και φυσιολογικό επίπεδο, με τις *hpaB*-σειρές ωστόσο να διαφοροποιούνται σημαντικά σε σχέση με τα φυτά wt. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, σαφώς έκδηλη ήταν η υπεροχή της σειράς #4, η οποία χαρακτηρίστηκε από απουσία ή ήπια εκδήλωση συμπτωμάτων χλώρωσης καθώς και βελτιωμένη ανάπτυξη και ευρωστία, ενώ αντίθετα τα φυτά wt εμφάνισαν εντονότερα συμπτώματα χλώρωσης, μαρασμού και ανασχεση της ανάπτυξης. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με αναφορές ότι η καταπόνηση αλατότητας σε ώριμα φυτά εκδηλώνεται με χλώρωση και γήρανση των φύλλων και μείωση της περιεχόμενης ποσότητας χλωροφύλλης λόγω μειωμένης φωτοσυνθετικής ικανότητας (Hester et al. 2001; Munns and Tester 2008; Taïbi et al. 2016), η οποία αποδίδεται στη μειωμένη αγωγιμότητα των στομάτων και στη μη εύρυθμη λειτουργία του φωτοσυστήματος II (Netondo et al. 2004). Στην παρούσα μελέτη, η καταπόνηση επέφερε μείωση της περιεκτικότητας χλωροφύλλης στα φυτά wt, ενώ στις σειρές #2 και #4 η ποσότητα χλωροφύλλης δε μεταβλήθηκε σημαντικά, παρέχοντας επιπλέον ενδείξεις για τη βελτιωμένη απόκριση των τελευταίων στην καταπόνηση αλατότητας. Στο σύνολό τους, τα ανωτέρω υποδεικνύουν ότι η έκφραση του γονιδίου *hpaB* προάγει την ανθεκτικότητα έναντι της καταπόνησης υψηλής αλατότητας, υπογραμμίζοντας τη σχετική υπεροχή της σειράς #4 κατά τη φάση της βλάστησης αλλά και σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια.

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι η ενδογενής έκφραση του γονιδίου *hpaB* συμβάλλει στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας στην καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στο είδος *N. benthamiana*. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι οι *hpaB*-σειρές διέφεραν σημαντικά ως προς την απόκριση στην καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας, γεγονός που αποδίδεται στην τυχαία ένθεση του διαγονιδίου *hpaB* στα αρχικά συμβάντα μετασχηματισμού (T₀), επιφέροντας μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση του *hpaB* στους απογόνους αυτογονιμοποίησης (T₂ γενεά). Βάσει του συνόλου των παραμέτρων που αξιοποιήθηκαν στο πλαίσιο αξιολόγησης της ανθεκτικότητας, η σειρά #4 εμφάνισε υπερέχουσα επίδοση τόσο υπό συνθήκες ξηρασίας όσο και υψηλής αλατότητας. Παρά το γεγονός ότι η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα δεν μπορεί επακριβώς να αιτιολογηθεί, λόγω της έλλειψης επαρκών δεδομένων για τη λειτουργική δράση του *hpaB in planta*, τα ευρήματα αυτά πιθανά σχετίζονται με προηγούμενες αναφορές για την ανθεκτικότητα που προσδίδουν γονίδια που κωδικοποιούν διεγέρτες προερχόμενοι από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς. Σχετικά είναι τα ευρήματα της προηγμένης ανθεκτικότητας έναντι της ξηρασίας στο ρύζι, έπειτα από υπερέκφραση του γονιδίου *PeaT1* από το μύκητα *Alternaria tenuissima* (Shi et al. 2017), η οποία οδήγησε σε μεταβολή της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση των φυτών έναντι της καταπόνησης. Ειδικότερα, η ανάλυση κατέδειξε τη μείωση της έκφρασης γονιδίων που συνδέονται με την απόκριση των φυτών στην ξηρασία, όπως τα *OsAMI*, *OsLP2*, και *OsDST*, και την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που συμβάλλουν θετικά στην ανθεκτικότητα, όπως τα *OsSKIPa*, *OsCPK9*, *OsNAC9*, *OSEREBP1* και *OsTPKb*, στα *PeaT1OE*-διαγονιδιακά φυτά (Shi et al. 2017). Κατ' αντιστοιχία, πρόσφατη έρευνα κατέδειξε τη θετική επίδραση της υπερέκφρασης πρωτεϊνών-διεγερτών (*mohrip1* και *mohrip2*), προερχόμενων από το μύκητα *Magnaporthe oryzae*, στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας έναντι της πυρικούλαρίας και της ξηρασίας στο ρύζι (Wang et al. 2017). Η ανθεκτικότητα σχετίστηκε με επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στα βιοχημικά μονοπάτια σύνθεσης του σαλικυλικού (SA) και αμπισισικού οξέος (ABA), υποδεικνύοντας ότι οι εν λόγω διεγέρτες συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της SA-

σηματοδότησης και στη ρύθμιση του ABA, παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι της ασθένειας και της ξηρασίας, αντίστοιχα. Ως προς την ανθεκτικότητα στην ξηρασία, σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, τα διαγονιδιακά φυτά χαρακτηρίστηκαν από αυξημένη περιεκτικότητα νερού των φύλλων, μειωμένη απώλεια νερού λόγω διαπνοής, αύξηση της ποσότητας χλωροφύλλης και υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης (Wang et al. 2017). Αντίστοιχα, η εξωγενής εφαρμογή διεγερτών προερχόμενων από φυτοπαθογόνους μύκητες δύναται να οδηγήσει σε αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, μέσω ενεργοποίησης της SA-οδού, ενώ, εναλλακτικά, έχει προταθεί ότι οι διεγέρτες επάγουν μία κατάσταση βελτιωμένης άμυνας (primed state) που οδηγεί σε προηγμένη απόκριση σε καταπονήσεις (Wiesel et al. 2014). Περαιτέρω, οι T3SS τελεστές, που εκκρίνονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια, με στόχο την καταστολή της PTI-άμυνας, αλληλεπιδρούν με ποικίλα γονίδια και μεταβολίτες των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των συστατικών της πλασματικής μεμβράνης, όπως η πρωτεΐνη RPM1 4 (RIN4) στο είδος *A. thaliana* (Day et al. 2006). Κατ' αναλογία, μια σειρά από συστατικά του ξενιστή αλληλεπιδρούν με τελεστές, όπως οι PopP2 και οι T3SS τελεστές τύπου TAL του γένους *Xanthomonas*, που προσδένονται στο φυτικό DNA, προκαλώντας μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση που προάγουν την παθογένεια και αποίκιση του παθογόνου (Boch et al. 2009; Deslandes and Rivas 2012; Coll and Valls 2013). Προς την ίδια κατεύθυνση, έχει αποδειχθεί ότι οι βακτηριακοί τελεστές, όπως ο HopI1, προκαλούν μεταβολές σε χλωροπλαστικά συστατικά, οδηγώντας σε επαναπρογραμματισμό της χλωροπλαστικής θυλακοειδούς δομής και μεταβάλλοντας τη συσσώρευση SA (Jelenska et al. 2007). Είναι εξάλλου γνωστό ότι τα φυτά κατέχουν ένα εύρος γονιδίων *R*, των οποίων τα προϊόντα αναγνωρίζουν, άμεσα ή έμμεσα, τους τελεστές προκειμένου να επαχθεί η επαγόμενη από τελεστές άμυνα των φυτών (ETI) (Block and Alfano 2011; Deslandes and Rivas 2012).

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν ισχυρές ενδείξεις για τη θετική επίδραση του γονιδίου *hpaB* στην επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών. Παρά το γεγονός ότι στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης δεν έχει αποσαφηνισθεί η βιοχημική και μοριακή βάση της ανθεκτικότητας, καθώς δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την επίδραση του γονιδίου *hpaB in planta*, η παρατηρούμενη ανθεκτικότητα πιθανά σχετίζεται με μια κατάσταση προηγμένης άμυνας των *hpaB*-φυτών. Στο πλαίσιο αποσαφήνισης των μηχανισμών που διέπουν την προηγμένη ανθεκτικότητα των *hpaB*-φυτών, πρόκειται να συμβάλει καθοριστικά η μελέτη της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε βιοχημικά μονοπάτια άμυνας ή/και ο προσδιορισμός της μεταβολικής τους απόκρισης υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.

Βιβλιογραφία

Abid M, Ali S, Qi LK, Zahoor R, Tian Z, Jiang DJ, Snider JL, Dai T (2018) Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages

- in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci Rep* 8:4615. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21441-7>
- Block A, Alfano JR (2011) Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr Opin Plant Biol* 14: 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.12.011>
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S et al. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326: 1509–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- Büttner D, Gürlebeck D, Noël LD, Bonas U (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol Microbiol* 54:755–768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04302.x>
- Büttner D, Lorenz C, Weber E, Bonas U (2006) Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *Mol Microbiol* 59:513–527. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04924.x>
- Coll NS, Valls M (2013) Current knowledge on the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system. *Microb Biotechnol* 6: 614–620. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12056>
- Cornic G, Massacci A (1996) Leaf photosynthesis under drought Stress. In: Baker NR (eds) *Photosynthesis and the Environment*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 347–366. https://doi.org/10.1007/0-306-48135-9_14
- Day B, Dahlbeck D, Staskawicz BJ (2006) NDR1 interaction with RIN4 mediates the differential activation of multiple disease resistance pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 2782–2791. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044693>
- Dehnavi AR, Zahedi M, Ludwiczak A, Perez SG, Piernik A (2020) Effect of salinity stress on seed germination and seedling development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) genotypes. *Agronomy* 10:859. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060859>
- Deslandes L, Rivas S (2012) Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci* 17: 644–655. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.011>
- Dita MA, Rispail N, Prats E, Rubiales D, Singh KB (2006) Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphatica* 147:1–24. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-6156-9>
- Dong S, Jiang Y, Dong Y, Wang L, Wang W, Ma Z, et al. (2019) A study on soybean responses to drought stress and rehydration. *Saudi J Biol Sci* 26:2006–2017. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.08.005>
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29:185–212. <https://doi.org/10.1051/agro:2008021>
- Goldback D, Li C, Mohan H, Probst N (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Front Plant Sci* 5:151 <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00151>
- Guo Y, Jia W, Song J, Wang D, Chen M, Wang B (2012) *Thellungilla halophila* is more adaptive to salinity than *Arabidopsis thaliana* at stages of seed germination and seedling establishment. *Acta Physiol Plant* 34:1287–1294. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0925-y>

- Hester MW, Mendelssohn IA, McKee KL (2001) Species and population variation to salinity stress in *Panicum hemitomom*, *Spartina patens* and *Spartina alterniflora*: morphological and physiological constraints. *Environ Exp Bot* 46:277-297. [https://doi.org/10.1016/s0098-8472\(01\)00100-9](https://doi.org/10.1016/s0098-8472(01)00100-9)
- Holmström KO, Somersalo S, Mandal A, Palva TE, Welin B (2000) Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J Exp Bot* 51:177-185. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.343.177>
- Horsch R, Fry J, Hoffman N, Eichholtz D, Rogers S, et al. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229–1231. <https://doi.org/10.1126/science.227.4691.1229>
- Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA, Selvaraj G (2000) Genetic engineering of glycine betaine production toward enhancing stress tolerance in plants: Metabolic Limitations. *Plant Physiol* 122:747-756. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.747>
- Jakab G, Ton J, Flors V, Zimmerli L, Métraux JP, Mauch-Mani B (2005) Enhancing arabidopsis salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol* 139:267-274. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065698>
- Jelenska J, Yao N, Vinatzer BA, Wright CM, Brodsky, JL, Greenberg JT (2007) A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Curr Biol* 17: 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.028>
- Kapoor D, Bhardwaj S, Landi M, Sharma A, Ramakrishnan M, Sharma A (2020) The impact of drought in plant metabolism: how to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Appl Sci* 10:5692. <https://doi.org/10.3390/app10165692>
- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7:193-195. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02251-3)
- Kaya MD, Okçu G, Atak M, Çikili Y, Kolsarici Ö (2006) Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Europ J Agron* 24:291-295. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.08.001>
- Khan S, Anwar S, Yu S, Sun M, Yang Z, Gao ZQ (2019) Development of drought-tolerant transgenic wheat: achievements and limitations. *Int J Mol Sci* 20:3350. <https://doi.org/10.3390/ijms20133350>
- Lawlor DW, Tezara W (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann Bot* 103:561–579. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn244>
- Li J, Cang Z, Jiao F, Bai X, Zhang D, Zhai R (2017) Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. *J Saudi Soc Agric Sci* 16:82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.03.001>
- Liu M, Li M, Liu K, Sui N (2015) Effects of drought stress on seed germination and seedling growth of different maize varieties. *J Agric Sci* 7:231-240. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n5p231>
- Lonjon F, Lohou D, Cazalé AC, Büttner D, Ribeiro BG, et al. (2017) HpaB-Dependent secretion of type III effectors in the plant pathogens *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04853-9>

- Lorenz C, Kirchner O, Egler M, Stuttmann J, Bonas U, Büttner D (2008) HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol Microbiol* 69: 344–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06280.x>
- Moose SP, Mumm RH (2008) Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiol* 147:969–977. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118232>
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59:651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Netondo GW, Onyango JC, Beck E (2004) Sorghum and salinity: II. gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Sci* 44:806–811. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.8060>
- Nguyen HC, Lin KH, Ho SL, Chiang CM, Yang CM (2018) Enhancing the abiotic stress tolerance of plants: from chemical treatment to biotechnological approaches. *Physiol Plant* 164:452–466. <https://doi.org/10.1111/ppl.12812>
- Pereira A (2016) Plant abiotic stress challenges from the changing environment. *Front Plant Sci* 7:1123. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01123>
- Pérez-Molphe-Balch E, Gidekel M, Segura-Nieto M, Herrera-Estrella L, Ochoa-Alejo N (1996) Effects of water stress on plant growth and root proteins in three cultivars of rice (*Oryza sativa*) with different level of drought tolerance. *Physiol Plant*. 96:284–290. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00215.x>
- Qi SL, Lin QF, Feng XJ, Han HL, Liu J, Zhang L et al. (2019) IDD16 negatively regulates stomatal initiation via trans-repression of *SPCH* in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J* 17: 1446–1457. <https://doi.org/10.1111/pbi.13070>
- Rai AC, Singh M, Shah K (2012) Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in *ZAT12*-transformed transgenic tomato plants. *Plant Physiol Biochem* 61:108–114. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.09.010>
- Rajput NA, Zhang M, Shen D, Liu T, Zhang Q, et al. (2015) Overexpression of a *Phytophthora* cytoplasmic CRN effector confers resistance to disease, salinity and drought in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol* 56:2423–2435. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv164>
- Santo A, Mattana E, Frigau L, Marzo Pastor A, Picher Morelló MC, Bacchetta G (2017) Effects of NaCl stress on seed germination and seedling development of *Brassica insularis* Moris (Brassicaceae). *Plant Biol* 19:368–376. <https://doi.org/10.1111/plb.12539>
- Scheibner F, Schulz S, Hausner J, Marillonnet S, Büttner D (2016) Type III-dependent translocation of HrpB2 by a nonpathogenic *hpaABC* mutant of the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl Environ Microbiol* 82:3331–3347. <https://doi.org/10.1128/AEM.00537-16>
- Scheibner F, Hartmann N, Hausner J, Lorenz C, Hoffmeister AK, Büttner D (2018) The type III secretion chaperone HpaB controls the translocation of effector and noneffector proteins From *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant Microbe Interact* 31:61–74. <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-17-0138-r>
- Schuppler U, He PH, John PCL, Munns R (1998) Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol* 117:667–678. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.667>

- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C. R. Biologies* 331:215-225. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.01.002>
- Shi F, Dong Y, Zhang Y, Yang X, Qiu D (2017) Overexpression of the *PeaTl* elicitor gene from *Alternaria tenuissima* improves drought tolerance in rice Plants via interaction with a myo-inositol oxygenase. *Front Plant Sci* 8:970. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00970>
- Shrivastava P, Kumar R (2015) Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J Biol Sci* 22:123-131. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>
- Taïbi K, Taïbi F, Abderrahim LA, Ennajah A, Belkhodja M, Mulet JM (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>
- Venegas-Molina J, Proietti S, Pollier J, Orozco-Freire W, Ramirez-Villacis D, Leon-Reyes A (2020) Induced tolerance to abiotic and biotic stresses of broccoli and *Arabidopsis* after treatment with elicitor molecules. *Sci Rep* 10: 10319. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67074-7>
- Wang Z, Han Q, Zi Q, Lv S, Qiu D, Zeng H (2017) Enhanced disease resistance and drought tolerance in transgenic rice plants overexpressing protein elicitors from *Magnaporthe oryzae*. *PlosOne* 12: e0175734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175734>
- Wani SH, Dutta T, Neelapu NRR, Surekha C (2017) Transgenic approaches to enhance salt and drought tolerance in plants. *Plant Gene* 11:219-231. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.05.006>
- Wiesel L, Newton AC, Elliot I, Booty D, Gilroy EM, et al. (2014) Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Front Plant Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00655>
- Wintermans JEG, de Mots A (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophyll a and b and their phaeophytins in ethanol. *Biochim Biophys Acta* 109:448-453. [https://doi.org/10.1016/0926-6585\(65\)90170-6](https://doi.org/10.1016/0926-6585(65)90170-6)
- Wu G-Q, Jiao Q, Shui Q-Z (2015) Effect of salinity on seed germination, seedling growth, and inorganic and organic solutes accumulation in sunflower. *Plant Soil Environ*. 61:220-226. <https://doi.org/10.17221/22/2015-pse>
- Xu W, Cui K, Xu A, Nie L, Huang J, Peng S (2015) Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedling. *Acta Physiol Plant* 37:9. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1760-0>
- Yang X, Lu M, Wang Y, Wang Y, Liu Z, Chen S (2021) Response mechanisms of plants to drought Stress. *Horticulturae* 7: 50. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030050>
- Zhang M, Rajput NA, Shen D, Sun P, Zeng W, et al. (2015) A *Phytophthora sojae* cytoplasmic effector mediates disease resistance and abiotic stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Sci Rep* 5. <https://doi.org/10.1038/srep10837>
- Zhang Y-B, Yang S-L, Dao J-M, Deng J, Shahzad AN, Fan X, et al. (2020) Drought-induced alterations in photosynthetic, ultrastructural and biochemical traits of contrasting sugarcane genotypes. *PLoS ONE* 15: e0235845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235845>

- Zhou R (2017) Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. BMC Plant Biol 17:24.
<https://doi.org/10.1186/s12870-017-0974-x>
- Zhu JK (2016) Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell 167:313-324.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zörb C, Geilfus CM, Dietz KJ (2019) Salinity and crop yield. Plant Biol 21:31-38.
<https://doi.org/10.1111/plb.12884>

Κεφάλαιο 8

Γενική Συζήτηση

Η έκθεση των φυτών σε δυσμενή περιβάλλοντα αποτελεί καίριο παράγοντα που πλήττει την ανάπτυξη και παραγωγικότητά τους, επιφέροντας παράλληλα ανάλογες προσαρμογές στα προγράμματα βελτίωσης σε παγκόσμιο επίπεδο. Μέσω κλασικών διαδικασιών βελτίωσης, κατέστη δυνατή η ανάπτυξη νέων ποικιλιών προσαρμοσμένων στα καλλιεργητικά συστήματα και στα περιβάλλοντα καλλιέργειάς τους, οι οποίες παράλληλα χαρακτηρίζονται από υψηλή και σταθερή απόδοση (Cleveland 2001; Bradshaw 2016). Είναι ωστόσο ευρέως αποδεκτό ότι η κλιματική αλλαγή έχει σταδιακά επιφέρει μεταβολές στη συχνότητα και την ένταση των καιρικών φαινομένων, με κύρια την αύξηση των περιόδων ξηρασίας και υψηλής θερμοκρασίας, το χάσμα στις αποδόσεις των καλλιεργειών και την υποβάθμιση της ποιότητας των αγροτικών προϊόντων καθώς και τη μείωση της καλλιεργήσιμης έκτασης. Τα ανωτέρω, σε συνδυασμό με τις αλλαγές στην επιδημιολογία των παθογόνων αλλά και τις μεταβολές στις σχέσεις ξενιστών-παρασίτων, αναπόφευκτα στρέφουν το ερευνητικό ενδιαφέρον προς τη συνεχή αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων (Silva Dias 2015; Mir et al. 2022). Ταυτόχρονα, η ανάγκη για μείωση του ενεργειακού αποτυπώματος της γεωργίας, που αντανακλάται σε μείωση των καλλιεργητικών εισροών, καθώς και για εξασφάλιση της επάρκειας των τροφίμων και άλλων αγαθών, όπως ίνες, βιοκαύσιμα και ξύλο, για την κάλυψη των αναγκών σε παγκόσμιο επίπεδο, διαμορφώνουν ανάλογα τους στόχους της βελτίωσης των φυτών που επικεντρώνονται στην ανάπτυξη ποικιλιών που συγκεντρώνουν ένα εύρος επιθυμητών γνωρισμάτων.

Κατά κανόνα, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων βασίζεται σε κλασικές βελτιωτικές διαδικασίες που περιλαμβάνουν σχήματα επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων, αξιοποιώντας την υπάρχουσα γενετική παραλλακτικότητα ή, εναλλακτικά, προσεγγίζεται η δημιουργία νέας παραλλακτικότητας μέσω υβριδισμού και αναγνώρισης των ανθεκτικών γονοτύπων μετά από επιλογές στους διασπώμενους πληθυσμούς. Από τις ανωτέρω διαδικασίες επετεύχθη η εξημέρωση σημαντικών καλλιεργούμενων ειδών καθώς και η ανάπτυξη ποικιλιών με ικανότητα διατήρησης του δυναμικού απόδοσής τους υπό συνθήκες πίεσης επιλογής (Gilliham et al. 2017; Wolter et al. 2019). Παρά την αδιαμφισβήτητη αποτελεσματικότητά τους, οι ανωτέρω διαδικασίες δυσχεραίνονται σημαντικά από την πολυπλοκότητα των γνωρισμάτων ανθεκτικότητας καθώς και την ύπαρξη σημαντικής αλληλεπίδρασης γονοτύπου-περιβάλλοντος (Bansal et al. 2013), η οποία αποτελεί φραγμό στην ευχερή αναγνώριση των επιθυμητών γονοτύπων, ιδιαίτερα όταν στόχο αποτελεί η βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Σε ότι αφορά στις αβιοτικές καταπονήσεις, τίθενται πρόσθετοι περιορισμοί που σχετίζονται με την αναγκαιότητα αξιολόγησης ενός μεγάλου αριθμού γονοτύπων, την εφαρμογή πολλαπλών κύκλων επιλογής, προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο ανθεκτικότητας, καθώς και τη δυσκολία επίτευξης ομοιόμορφων συνθηκών καταπόνησης σε συνθήκες αγρού (Ahmar et al. 2020). Αντίστοιχα, στη βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών καταπονήσεων βασικό πυλώνα αποτελεί η σταθερότητα της ανθεκτικότητας, η οποία συχνά απειλείται λόγω αλλαγών στην επιδημιολογία των παθογόνων μικροοργανισμών και στη συμπεριφορά των εχθρών. Στοχεύοντας στην ανάπτυξη σταθερής ανθεκτικότητας, εναλλακτικά της ενσωμάτωσης ενός μοναδικού *R*

γονιδίου, συχνά επιδιώκεται η πυραμίδωση πλέον του ενός γονιδίου ανθεκτικότητας (gene pyramiding), πρακτική η οποία δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι η επίδραση του ενός γονιδίου είναι ορατή μόνο στην περίπτωση απουσίας άλλων γονιδίων ανθεκτικότητας (Bresghehlo and Coelho 2013). Στις ανωτέρω προκλήσεις τίθενται πρόσθετοι περιορισμοί που ανακύπτουν από τη στενή γενετική βάση των καλλιεργούμενων ειδών αλλά και την περιορισμένη διαθεσιμότητα φυσικών πηγών ανθεκτικότητας ως απόρροια της γενετικής στενωπού, που δημιουργήθηκε μέσω των κλασικών βελτιωτικών διαδικασιών, αλλά και της υπερκέρασης των χρησιμοποιούμενων γονιδίων ανθεκτικότητας (van de Wouw et al. 2010). Στο πλαίσιο διεύρυνσης της γονιδιακής δεξαμενής, συνήθη πρακτική αποτελεί η ενσωμάτωση άγριου γενετικού υλικού σε προγράμματα βελτίωσης, ως πολύτιμη πηγή γονιδίων ανθεκτικότητας, πρακτική η οποία, παρά την αποτελεσματικότητά της, επιφέρει προβλήματα σύνδεσης των γονιδίων ανθεκτικότητας με ανεπιθύμητα γονίδια.

Στοχεύοντας στη βέλτιστη διαχείριση της υπάρχουσας γενετικής παραλλακτικότητας, οι 'ομικές' τεχνολογίες και η γονιδιοματική, ενδυναμώνουν σημαντικά το οπλοστάσιο της βελτίωσης φυτών, προσφέροντας δυνατότητες ανακάλυψης μορίων ή/και γονιδίων με καίριο ρόλο στη ρύθμιση των προσαρμογών άμυνας έναντι καταπονήσεων. Αντίστοιχα, οι τεχνολογίες της γενετικής μηχανικής προσφέρουν απεριόριστες προοπτικές διεύρυνσης της γονιδιακής δεξαμενής, μέσω της αξιοποίησης γονιδίων ποικίλης προέλευσης, φυτικής ή μη (Moose and Mumm 2008; Mir et al. 2022). Με δεδομένη ωστόσο την περιορισμένη διαθεσιμότητα φυσικών πηγών ανθεκτικότητας φυτικής προέλευσης, η έρευνα έχει δικαιολογημένα στραφεί προς την αξιοποίηση γονιδίων που προέρχονται από άλλους οργανισμούς. Ιστορικά, η ανθεκτικότητα που προέρχεται από παθογόνα (Pathogen-Derived Resistance, PDR) αποτέλεσε θεμελιώδους αξίας πεδίο έρευνας για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι ασθενειών. Βάσει της PDR (Sanford and Johnston 1985), η επαγωγή ανθεκτικότητας προκύπτει από την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ξενιστή αλληλουχιών που προέρχονται από παθογόνα, όπως γονίδια που κωδικοποιούν καψιδιακή πρωτεΐνη, ρεπλικάση/πολυμεράση και πρωτεΐνες κίνησης, με στόχο τη διατάραξη της αλληλεπίδρασης παθογόνου-ξενιστή. Η εν λόγω προσέγγιση, που υπήρξε ιδιαίτερα καινοτόμα ως προς τη σύλληψη της έννοιας, οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι πληθώρας ασθενειών, με τις ιολογικές να αποτελούν τον πρωταρχικό στόχο, τόσο σε φυτά-μοντέλα όσο και σε καλλιεργούμενα είδη (Gottula and Fuchs 2009). Έπειτα από την αποσαφήνιση των μηχανισμών γονιδιακής σίγησης (RNA Silencing, RNAi) (Napolì et al. 1990), ως έμφυτων για προστασία έναντι ξένων αλληλουχιών από ιούς, βακτήρια, μεταθετά στοιχεία και διαγονίδια, η έρευνα στράφηκε προς την αξιοποίηση του RNAi για την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων. Στο πλαίσιο αυτό, πληθώρα ερευνών υπογραμμίζει την αποτελεσματικότητα του RNAi για την επίτευξη ανθεκτικότητας ή/και ανοσίας σε ένα πλήθος παθοσυστημάτων, ακόμη και σε φυτικά είδη στα οποία δεν είναι γνωστή η πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματός τους, ενώ παράλληλα εγκρίθηκε για εμπορική διάθεση (Duan et al. 2012). Αναφέρεται ωστόσο ότι η εν λόγω προσέγγιση περιορίζεται από το γεγονός ότι οι ιοί έχουν αναπτύξει προσαρμοστικούς μηχανισμούς καταστολής της γονιδιακής σίγησης (Zhao et al. 2020). Παρά το πλήθος των ερευνητικών δεδομένων που υπογραμμίζουν την αποτελεσματικότητα της έκφρασης γονιδίων που προέρχονται από παθογόνα σε ένα εύρος παθοσυστημάτων, η εν λόγω ανθεκτικότητα ή/και ανοσία παρουσιάζει το μειονέκτημα της περιορισμένης σταθερότητας στο χρόνο, με τη μέση διάρκειά της να χαρακτηρίζεται ως μη ικανοποιητική, ιδιαίτερα λαμβάνοντας υπόψη

το ύψος δαπάνης σε χρόνο και κόστος που απαιτεί η ανάπτυξη των ανθεκτικών ποικιλιών. Παράλληλα, οι εν λόγω προσεγγίσεις οδηγούν σε επίτευξη ανθεκτικότητας που εξειδικεύεται σε επίπεδο είδους ή ακόμη και φυλής του παθογόνου, γεγονός που περιορίζει την αποτελεσματικότητά τους.

Με δεδομένο ότι στη βελτίωση της ανθεκτικότητας βασικό πυλώνα αποτελεί η αποτελεσματικότητά της σε ένα ευρύ φάσμα βιοτικών ή/και αβιοτικών καταπονήσεων, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών εστιάζει στην αξιοποίηση γονιδίων φυτικής προέλευσης που δυνητικά προδίδουν ευρέος φάσματος ανθεκτικότητα, όπως αυτά που συνδέονται με την αντίληψη και μεταφορά σημάτων, τη μεταβολή της έκφρασης πρωτεϊνών άμυνας ή την επαγωγή της συσσώρευσης οσμωπροστατευτικών ενώσεων. Στην κατηγορία αυτών που εμπλέκονται στη μεταφορά σημάτων εμπίπτουν τα γονίδια που κωδικοποιούν MAPK (Mitogen-activated protein kinase) κινάσες, μεταγραφικούς παράγοντες (NAC, WRKY, ZF) και DREB (Dehydration-Responsive Element Binding) πρωτεΐνες, ενώ αυτά που στοχεύουν στη μεταβολή της έκφρασης πρωτεϊνών περιλαμβάνουν γονίδια που κωδικοποιούν LEA (Late Embryogenesis Abundant Proteins) και HSPs (Heat Shock Proteins) (Jewel et al. 2010; Wani et al. 2017). Επιπλέον, η επαγωγή ανθεκτικότητας επιδιώκεται μέσω της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αντιμεταφοράς ιόντων Na^+/H^+ (Wang et al. 2003), αντιοξειδωτικά ένζυμα, με πιο χαρακτηριστικά τα *SOD*, *APX*, *CAT* και *GST* (Nguyen et al. 2018), και γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση οσμωπροστατευτικών ενώσεων, όπως αμινοξέα, υδατάνθρακες, πολυαμίνες και πολυόλες (Vinocur and Altman 2005; Jewel et al. 2010).

Έπειτα από τη διαπίστωση ότι η έκφραση ιικών αλληλουχιών σε φυτά προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι του ιού προέλευσής τους (Lomonossoff 1995), αναδείχθηκε η προοπτική αξιοποίησης γονιδίων που προέρχονται από παθογόνα και διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων, για την επίτευξη ευρείας ανθεκτικότητας. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται σε χρήση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιμικροβιακούς παράγοντες, και ιδιαίτερα πρωτεΐνες και αντιβακτηριακά πεπτίδια και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διάσπαση τοξινών και στην αναστολή δραστηριότητας των ενζύμων διάσπασης των κυτταρικών τοιχωμάτων (Mourgues et al. 1998; Osuski et al. 2000; Dong and Ronald 2019). Στην ίδια κατηγορία ανήκουν οι βακτηριακής προέλευσης χαρπίνες που αποτελούν δομικά συστατικά του εκκριτικού συστήματος τύπου III (T3SS) των Gram-αρνητικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων (Alfano and Collmer 2004), συμβάλλοντας στην έγχυση τελεστών στο εσωτερικό των κυττάρων των ξενιστών (Kvitko et al. 2007). Μετά τη διαπίστωση ότι η χαρπίνη HrpN από το βακτήριο *Erwinia amylovora*, κατά την εξωγενή εφαρμογή της σε φύλλα, επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) (Wei et al. 1992), ακολούθησε η ανακάλυψη πληθώρας HR-διεγερτών, η πλειονότητα των οποίων συνιστούν T3SS τελεστές που εγχύονται στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων μέσω της T3SS-εκκριτικής συσκευής που δομείται έπειτα από έκφραση των γονιδίων *hrp/hrc* (*hrp*: HR and pathogenicity, *hrc*: HR and conserved). Οι χαρπίνες αποτέλεσαν αντικείμενο συστηματικής μελέτης σχετικά με τη δράση τους τόσο στους φυσικούς φορείς τους όσο και σε φυτά όπου εκφράζονται ενδογενώς ή έχουν εφαρμοστεί εξωγενώς. Τα ευρήματα των σχετικών ερευνών έχουν αναδείξει τον πολυδιάστατο ρόλο των χαρπινών στα φυτά, ο οποίος εκτείνεται από την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ένα ευρύ φάσμα εχθρών και ασθενειών αλλά και αβιοτικών καταπονήσεων έως και την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (Strobel et al. 1996; Dong et al. 1999, 2004; Peng et al. 2004; Jang

et al. 2006; Oh and Beer 2007; Chen et al. 2008a, b; Liu et al. 2018, 2020). Ο πολυδιάστατος ρόλος των χαρπινών στα φυτά είναι το αποτέλεσμα επαγωγής αμυντικών αποκρίσεων που σχετίζονται με μονοπάτια άμυνας των φυτών, με κυριότερα του σαλικυλικού (Salicylic Acid, SA), του ιασμονικού (Jasmonic Acid, JA) και του αμπισικού οξέος (Abscisic acid (ABA), τα οποία προκαλούν διαφορικές αποκρίσεις σε ξενιστές και μη-ξενιστές (Oh and Beer 2005; Tampakaki et al. 2010). Με δεδομένη την αναγνώριση των χαρπινών ως διεγέρτες της HR και τη συνεισφορά τους στην επαγωγή αμυντικών αποκρίσεων, έχει προταθεί η αξιοποίησή τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές με στόχο την επαγωγή ευρείας ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων (Tampakaki et al. 2010; Choi et al. 2013) ή/και βελτίωση της ποιότητας και παραγωγικότητας των φυτών που μπορεί να οφείλεται σε μεταβολές στο μεταβολικό τους περιεχόμενο (Wu et al. 2007; Fonseca et al. 2009; Rodrigo-García et al. 2019).

Η χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}, που προέρχεται από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. phaseolicola (*Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola), έχει αποδειχθεί ότι δρα τόσο ως παράγοντας παθογένειας, επηρεάζοντας την ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών του ξενιστή, καθώς και ως μοριακό πρότυπο του παθογόνου (Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP) που προκαλεί ανοσία κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (Tampakaki et al. 2010). Παράλληλα, η HrpZ εμφανίζει σύνδεση με τα λιποσώματα και τις στοιβάδες λιπιδίων και υψηλή συγγένεια με μεμβρανικά λιπίδια, δυνητικά σχηματίζει ολιγομερείς δομές οι οποίες αποτελούνται από διμερή, ενώ εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο κατά την έκφραση του συστήματος Hrp (Lee et al. 2001; Collmer et al. 2000; Haapalainen et al. 2011). Η ενδογενής έκφραση της HrpZ στην εκκρινόμενη μορφή της, ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης PR1 σε φυτά του είδους *N. benthamiana* (SP/HrpZ_{P_{sph}}), οδήγησε στην έκκρισή της μέσω του αποπλάστη των φυτών και στην επαγωγή κυτταρικής νέκρωσης (Tampakaki and Panopoulos 2000). Έπειτα από την ανακάλυψη ότι η χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}} επάγει ανθεκτικότητα έναντι του ιού BNYYV που προκαλεί την ασθένεια της ριζομανίας των ζαχαρότευτλων τόσο στο φυτό-μοντέλο *N. benthamiana* όσο και στο φυσικό ξενιστή του ιού, λόγω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων άμυνας και γονιδίων που σχετίζονται με την HR (Pavli et al. 2011), στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Στο πλαίσιο αυτό, διαγονιδιακές σειρές που εκφράζουν την πρωτεΐνη SP/HrpZ_{P_{sph}} υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών (Κεφάλαιο 2). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατέδειξαν την υπεροχή των σειρών #1 και #6, η οποία εκφράστηκε μέσω της καθυστερημένης ανάπτυξης και της εκδήλωσης ηπιότερων συμπτωμάτων, της βελτιωμένης ευρωστίας, του υψηλότερου ποσοστού επιβίωσης αλλά και της ικανότητας ανάκαμψης, μετά το πέρας της περιόδου καταπόνησης, συγκριτικά με τις υπόλοιπες *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και τα φυτά wt. Τα ανωτέρω ευρήματα συνάδουν με προηγούμενες αναφορές σχετικά με τη θετική επίδραση της ενδογενούς έκφρασης χαρπινών ή τμημάτων αυτών στην επαγωγή ανθεκτικότητας στις καταπονήσεις ξηρασίας και αλατότητας, λόγω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων άμυνας, ενεργοποίησης των ABA- και ET-μονοπατιών και αύξησης της συσσώρευσης προλίνης (Chuang et al. 2010; Zhang et al. 2011; Liu et al. 2016; Cao et al. 2018; Demirkol 2021). Είναι ενδιαφέρον ότι ανάλογη υπεροχή των σειρών #1 και #6 διαπιστώθηκε και έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. tabaci, που προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης, με την υπεροχή τους

να εκφράζεται μέσω της ηπιότερης συμπτωματολογίας και της μειωμένης αποίκησης του βακτηρίου στους φυτικούς ιστούς συγκριτικά με τις υπόλοιπες *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και τα φυτά wt (μη δημοσιευμένα δεδομένα). Περαιτέρω, αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε η απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών στην καταπόνηση καδμίου (Κεφάλαιο 3) (Mitsopoulou et al. 2021). Τα ευρήματα συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές, και ιδιαίτερα οι σειρές #6 και #9, χαρακτηρίζονταν από προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι της καταπόνησης καδμίου, όπως προκύπτει τόσο από το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ανάπτυξης των σποροφύτων υπό συνθήκες καταπόνησης όσο και από τη φαινοτυπική και φυσιολογική απόκριση στο στάδιο των ώριμων φυτών. Παράλληλα, είναι ενδιαφέρον ότι οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές εμφάνισαν διαφορετικό προφίλ συσσώρευσης καδμίου, συγκριτικά με τα φυτά wt. Ειδικότερα, τα φυτά wt εμφάνισαν μεγαλύτερη ποσότητα Cd στα φύλλα, ενώ οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές παρουσίασαν αντίθετο μοτίβο, γεγονός που πιθανά υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού συγκράτησης του Cd στις ρίζες. Στο σύνολό τους, τα ανωτέρω δεδομένα παρέχουν ενδείξεις σχετικά με την εμπλοκή της πρωτεΐνης HrpZ_{P_{sph}} στους μηχανισμούς απόκρισης σε ένα εύρος διαφορετικών παραγόντων καταπόνησης. Η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα πιθανόν να σχετίζεται με την οριζόντια μεταβολή που επιφέρει η έκφραση της πρωτεΐνης HrpZ_{P_{sph}} στο μεταβολισμό των φυτών. Στο πλαίσιο αυτό, προηγούμενη έρευνα κατέδειξε μια τάση αυξημένης συσσώρευσης μεταβολιτών με σημαντική συνεισφορά στην απόκριση των φυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Συγκεκριμένα, οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές χαρακτηρίστηκαν από προφίλ αυξημένης συσσώρευσης α,α-τρεχαλόζης, μυο-ινοσιτόλης, L-προλίνης και GABA, ενώ οι σειρές #6 και #9 εμφάνισαν επίσης αυξημένη συσσώρευση καδαβερίνης (Pavli et al. 2019).

Με στόχο την αποσαφήνιση των μηχανισμών που κυβερνούν την ανθεκτικότητα των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών έναντι της καταπόνησης ξηρασίας, στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε ο προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης (Κεφάλαιο 4). Για το σκοπό αυτό, οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας στο στάδιο των ώριμων φυτών και ακολούθησε ανάλυση GC/MS με στόχο την εύρεση πιθανών μεταβολικών βιοδεικτών που σηματοδοτούν τις μεταβολικές προσαρμογές στην καταπόνηση ξηρασίας. Τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη διαφορική μεταβολική απόκριση των υπό μελέτη γονοτύπων, με πλέον σημαίνουσες τις διαφορές στο προφίλ της σειράς #6, η οποία αναδείχθηκε ως η πλέον ανθεκτική τόσο στη φάση της βλάστησης όσο και στο στάδιο των ώριμων φυτών (Κεφάλαιο 2). Επιπλέον, πέραν της απόκτησης βασικής γνώσης σχετικά με την επίδραση του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στη μεταβολική απόκριση των φυτών στην καταπόνηση ξηρασίας, η ανάλυση επέτρεψε τον εντοπισμό των συστατικών με καίριο ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού υπό συνθήκες καταπόνησης. Ως πλέον βασικοί ρυθμιστές του μεταβολισμού υπό συνθήκες καταπόνησης αναδείχθηκαν τα συστατικά L-σερίνη, L-θρεονίνη, μουκικό οξύ και πιπεκολικό οξύ. Με δεδομένο ότι οι διαφορές στο προφίλ συσσώρευσης των ανωτέρω συστατικών σχετίστηκαν με το επίπεδο αντοχής των υπό μελέτη γονοτύπων, προσφέρονται σημαντικές προοπτικές αξιοποίησής τους ως βιοδείκτες για την αναγνώριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-ανθεκτικών γονοτύπων.

Περαιτέρω, μελετήθηκε η μεταβολική απόκριση των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας με στόχο αφενός μεν την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και αφετέρου τον εντοπισμό των συστατικών που σηματοδοτούν τις μεταβολικές ρυθμίσεις των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών υπό συνθήκες καταπόνησης. Για την επίτευξη των ανωτέρω, οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές καθώς και φυτά

wt υποβλήθηκαν σε καταπόνηση υψηλής αλατότητας στο στάδιο των ώριμων φυτών και ακολούθησε η συγκριτική αξιολόγηση του GC/MS μεταβολικού τους προφίλ (Κεφάλαιο 5). Τα συνολικά ευρήματα κατέδειξαν τη σημαντική επίδραση της καταπόνησης αλλά και του γονοτύπου στη συσσώρευση μεταβολιτών που ανήκουν στις χημικές ομάδες των υδατανθράκων, αμινοξέων, πολυολών, πολυαμινών, καρβοξυλικών οξέων και οργανικών οξέων. Παράλληλα, υπογραμμίζεται το διακριτό μεταβολικό περιεχόμενο των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, συγκριτικά με τα φυτά wt, τόσο απουσία όσο και παρουσία καταπόνησης αλατότητας, παρέχοντας ισχυρές ενδείξεις σχετικά με την επίδραση του *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό των φυτών του είδους *N. benthamiana*. Μεταξύ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, σημαντική διαφοροποίηση ως προς το μεταβολικό περιεχόμενο εμφάνισε η σειρά #1, η οποία βάσει των ευρημάτων από τη μελέτη της φυσιολογικής απόκρισης στην καταπόνηση αλατότητας αναδείχθηκε ως η πλέον ανθεκτική, στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών, έναντι των υπολοίπων *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt. Οι διαφορές μεταξύ των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, τόσο ως προς το επίπεδο αντοχής όσο και ως προς το μεταβολικό τους περιεχόμενο, προφανώς οφείλονται στην επίδραση της θέσης ένθεσης του *hrpZ_{P_{sph}}* στις διαφορετικές σειρές οι οποίες συνιστούν απογόνους (T₃ γενεά) που προέρχονται από διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού (T₀). Συνολικά, οι *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερη συγκέντρωση L-προλίνης και D-σορβιτόλης έναντι των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης, ενώ η σειρά #1 εμφάνισε περαιτέρω αυξημένη συσσώρευση β-αλανίνης, L-βαλίνης, L-άνυδρου γλουταμικού οξέος, κιτρικού οξέος και μαλονικού οξέος. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζονται από προηγούμενες μελέτες που περιγράφουν την επίδραση της ενδογενούς έκφρασης ή της εξωγενούς εφαρμογής χαρπινών στο μεταβολισμό των φυτών, η οποία μεταβάλλει τη συσσώρευση συστατικών, και ιδιαίτερα προλίνης, προσδίδοντας ανθεκτικότητα υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης (Zhang et al. 2011; Demirkol 2021). Περαιτέρω, οι επαγόμενες αλλαγές στο μεταβολισμό των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας συνάδουν με αναφορές σχετικά με την αυξημένη συσσώρευση προλίνης σε φυτά που εκφράζουν χαρπίνες, η οποία συμβάλλει σημαντικά στην απόκρισή τους στην καταπόνηση (Cao et al. 2018). Ως προς τα συστατικά που σηματοδοτούν τη ρύθμιση του μεταβολισμού υπό συνθήκες καταπόνησης, η έρευνα κατέδειξε την καίρια συνεισφορά των μεταβολιτών D-γαλακτόζη, L-προλίνη, D-σορβιτόλη, κιτρικό οξύ και μαλονικό οξύ, παρέχοντας δυνατότητες αξιοποίησής τους ως βιοδείκτες ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης υψηλής αλατότητας.

Η επίτευξη ευρείας ανθεκτικότητας προσεγγίζεται επίσης μέσω της αξιοποίησης γονιδίων που κωδικοποιούν μοριακά πρότυπα του παθογόνου (PAMPs) ή μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με τα μικρόβια (MAMPs) καθώς και πρωτεΐνες-τελεστές. Τα PAMPs δρουν ως διεγέρτες που αναγνωρίζονται από τα φυτά μέσω ειδικών υποδοχέων (Pattern Recognition Receptors, PRRs), με την αμοιβαία αναγνώριση να συμβάλλει στην αναστολή της περαιτέρω αποίκησης του παθογόνου και την επίτευξη του πρώτου επιπέδου ανοσίας των φυτών (PAMP-triggered immunity, PTI) (Jones and Dangl 2006). Τα πιο γνωστά PAMPs που προέρχονται από βακτήρια είναι η φλαγγελίνη (flg22), ο παράγοντας Tu (Elongation Factor Tu), η πεπτιδογλυκάνη και οι λιποπολυσακχαρίτες, ενώ εκείνα που προέρχονται από μύκητες είναι η χιτίνη, η β-γλυκάνη και το πεπτίδιο Ave1 (Newman et al. 2013). Εκτός από την αναγνώριση παθογόνων οργανισμών, οι PRRs δύνανται να αναγνωρίσουν και ερεθίσματα που σχετίζονται με αβιοτικές καταπονήσεις, προσφέροντας συνεπώς δυνατότητες αξιοποίησής τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές για επαγωγή

ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών ή/και αβιοτικών καταπονήσεων (Gigli-Bisceglia and Testerink 2021; Li et al. 2020; Loo et al. 2022). Κατ' αντιστοιχία, οι προερχόμενοι από παθογόνα τελεστές συνιστούν πρωτεΐνες που εγχύονται στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων, μέσω του TTSS, και φέρουν διττό ρόλο στα συστήματα παθογόνων-ξενιστών (Alfano and Collmer 2004; Kamoun 2006), αφενός μεν συμβάλλοντας στην παθογένεια και την ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας σε ευαίσθητους ξενιστές και αφετέρου δρώντας ως παράγοντες αμολυσματικότητας μέσω επαγωγής αμυντικών αντιδράσεων, με πιο χαρακτηριστική την HR (Hogenhout et al. 2009; Dou and Zhou 2012). Βάσει των ανωτέρω, τα τελευταία χρόνια η έρευνα στη βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων στρέφεται προς την έκφραση σε φυτά γονιδίων που κωδικοποιούν τελεστές, με την πλειοψηφία των μελετών και επιτευγμάτων ωστόσο να αφορούν σε ασθένειες (Tampakaki et al. 2010; van de Wouw and Idnurm 2019), έναντι των σαφώς περιορισμένων αναφορών για επαγωγή ανθεκτικότητας σε αβιοτικές καταπονήσεις.

Στο πλαίσιο αξιοποίησης τελεστών έναντι καταπονήσεων, στόχο της διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης του γονιδίου *hpaA*, το οποίο βάσει της δράσης στους βακτηριακούς φορείς του έχει προταθεί ως τελεστής, ως προς την ικανότητα επαγωγής ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων (Κεφάλαιο 6). Η πρωτεΐνη HpaA είναι συντηρημένη μεταξύ πολλών ειδών του γένους *Xanthomonas* και συνιστά βασικό ρυθμιστή του T3SS, λόγω της συμβολής της στην έκκριση T3SS συστατικών, συμπεριλαμβανομένων του αγωγού (pilus), του καναλιού μετατόπισης (translocon) και των τελεστών (Lorenz et al. 2008). Έχει αποδειχθεί η ύπαρξη δύο λειτουργικών σηματοδοτικών μορίων (Nuclear Localization Signals, NLS), καίριων για την παθογένεια του βακτηρίου, με τα οποία εξασφαλίζεται η μεταφορά της πρωτεΐνης εντός του πυρήνα των κυττάρων (Huguet et al. 1998). Ωστόσο, ο ακριβής τρόπος δράσης της δεν έχει πλήρως αποσαφηνισθεί, λόγω της ανομοιογένειας ως προς την αλληλουχία και την κατασκευή με άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες (Kay and Bonas 2009). Το γονίδιο *hpaA* ανήκει στη συστάδα *hrp/hrc*, ενώ η έκφρασή του καθορίζεται από πρωτεΐνες-ρυθμιστές της συστάδας *hrp* (Cho et al. 2008). Με δεδομένο ότι η HpaA συμβάλλει στην επαγωγή HR σε ανθεκτικούς γονοτύπους φυτών και στην ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας σε ευαίσθητους γονοτύπους, έχει προταθεί η δράση της ως τελεστή (Huguet et al. 1998; Lorenz et al. 2008; Lu et al. 2008; Büttner and Bonas 2010). Στην παρούσα έρευνα, μελετήθηκε η απόκριση *hpaA*-σειρών στις καταπονήσεις ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών, συγκριτικά με φυτά wt. Υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας, στη φάση της βλάστησης, αναδείχθηκε η υπεροχή των *hpaA*-σειρών, με πλέον υπερέχουσα την επίδοση των σειρών #1 και #5, η οποία εκφράστηκε μέσω του υψηλότερου δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων, καθώς της βελτιωμένης ευρωστίας και μεγαλύτερης επιφάνειας ελάσματος. Η υπεροχή των σειρών #1 και #5 διαπιστώθηκε περαιτέρω και στο στάδιο των ώριμων φυτών, όπου οι εν λόγω σειρές χαρακτηρίστηκαν από σαφώς ηπιότερη συμπτωματολογία, ικανότητα ανάκαμψης έπειτα από άρδευση, μεγαλύτερη επιφάνεια ελάσματος και αυξημένη περιεκτικότητα νερού των φύλλων. Αντίστοιχα, υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας, οι *hpaA*-σειρές χαρακτηρίστηκαν από βελτιωμένη απόκριση συγκριτικά με τα φυτά wt, η οποία εκφράστηκε στη φάση της βλάστησης αλλά και στο στάδιο των ώριμων φυτών, με πλέον υπερέχουσα την επίδοση της σειράς #5 τόσο σε φαινοτυπικό όσο και σε φυσιολογικό επίπεδο. Προς την ίδια κατεύθυνση, η υπεροχή των σειρών #1 και #5 τεκμαίρεται και από τα προκαταρκτικά

αποτελέσματα της αξιολόγησης έναντι της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης που προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Τα ευρήματα υποδεικνύουν την προηγμένη ανθεκτικότητά των σειρών #1 και #5, η οποία εκδηλώθηκε μέσω ηπιότερης συμπτωματολογίας, μειωμένης αποίκησης του βακτηρίου και μικρότερης μεταβολής στην ποσότητα προλίνης συγκριτικά με τις υπόλοιπες *hpaA*-σειρές και τα φυτά wt (μη δημοσιευμένα δεδομένα). Παρά την αδυναμία σύνδεσης με συγκεκριμένες μοριακές ή/και βιοχημικές οδούς άμυνας, τα ευρήματα παρέχουν ενδείξεις σχετικά με πιθανή πρόκληση ευρέος φάσματος ανθεκτικότητας λόγω της έκφρασης του γονιδίου *hpaA* και, παράλληλα, θέτουν τη βάση για την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης που φέρει η έκφραση του γονιδίου *hpaA in planta*. Η διεξαγωγή μελετών σχετικά με την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια και στη μεταγραφική και μετα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων άμυνας πιθανά να αναδείξει έναν τύπο ανθεκτικότητας που προσομοιάζει αυτόν που παρατηρήθηκε έπειτα από έκφραση τελεστών προερχόμενων από μύκητες, όπως οι CRN (crinkling and necrosis), έναντι των καταπονήσεων ξηρασίας και αλατότητας, η οποία αποδόθηκε σε αυξημένη έκφραση γονιδίων άμυνας (*Cyt450*, *Blc2*) και γονιδίων που κωδικοποιούν RLKs (Rajput et al. 2015; Zhang et al. 2015).

Με δεδομένο το ρόλο της πρωτεΐνης HraB στην παθογένεια του βακτηριακού φορέα της, καθώς και τη δράση της ως δομικό συστατικό της εκκριτικής συσκευής, πρόσθετο στόχο της διατριβής αποτέλεσε η μελέτη των λειτουργικών επιδράσεων του γονιδίου *hpaB in planta*, ως προς την ικανότητα επαγωγής ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων (Κεφάλαιο 7). Το *hpaB* συμβάλλει στην ικανότητα ανάπτυξης του βακτηρίου στους φυτικούς ιστούς, ενώ η σίγησή του οδηγεί σε απώλεια της παθογόνου δράσης σε ευαίσθητους γονοτύπους (Büttner et al. 2004, 2006). Επιπλέον, η πρωτεΐνη HraB αποτελεί συνοδό του T3SS που αλληλεπιδρά με άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες και τελεστές (Büttner et al. 2006; Lonjon et al. 2017) προκειμένου να επιτευχθεί η έκκριση των τελευταίων στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή. Έχει αποδειχθεί περαιτέρω ότι η πρωτεΐνη HraB αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HraA, με στόχο την έκκριση πρωτεϊνών-μη τελεστών, ενώ μετά την έκκριση της HraA συντελείται απελευθέρωση της HraB και μεταφορά των τελεστών στα φυτικά κύτταρα (Lorenz et al. 2008; Scheibner et al. 2018). Στην παρούσα έρευνα, μελετήθηκε η απόκριση φυτών του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο *hpaB*, από το βακτήριο *Xanthomonas vesicatoria* (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), στις καταπονήσεις ξηρασίας και υψηλής αλατότητας στη φάση της βλάστησης και στο στάδιο των ώριμων φυτών. Τα συνολικά ευρήματα υπογραμμίζουν σαφώς την υπεροχή της σειράς #4, η οποία εκφράστηκε σε όλες τις υπό μελέτη παραμέτρους που αφορούν στο δυναμικό βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων, στο ποσοστό επιβίωσης των φυτών, στο χρόνο εκδήλωσης και στην ένταση των συμπτωμάτων, στην ικανότητα ανάκαμψης έπειτα από άρδευση, σε αναπτυξιακά γνωρίσματα -όπως η επιφάνεια ελάσματος και το νωπό και ξηρό βάρος της ρίζας-, στην ικανότητα συγκράτησης νερού στα φύλλα και στην περιεκτικότητα χλωροφύλλης και προλίνης. Με δεδομένο ότι η παρούσα μελέτη συνιστά την πρώτη αναφορά σχετικά με τη λειτουργική επίδραση του *hpaB in planta*, δεν παρέχεται επαρκής αιτιολόγηση σχετικά με τους μηχανισμούς που διέπουν την παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα. Ωστόσο, τα ευρήματα ενδεχομένως σχετίζονται με την ανθεκτικότητα που προσδίδει η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν διεγέρτες προερχόμενους από φυτοπαθογόνους μύκητες, όπως τα γονίδια *PeaT1* και *mohrip1 / mohrip2*, η οποία οδήγησε σε προηγμένη αντοχή στην ξηρασία στο ρύζι, λόγω

επαγωγής της έκφρασης γονιδίων άμυνας και γονιδίων που συμμετέχουν στα βιοχημικά μονοπάτια των SA και ABA (Shi et al. 2017; Wang et al. 2017).

Παρά το πλήθος ερευνών που υπογραμμίζει την αποτελεσματικότητα και το εύρος εφαρμογών των τεχνολογιών της γενετικής μηχανικής για την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων, οι προοπτικές πρακτικής αξιοποίησής τους περιορίζονται αφενός μεν από τους πιθανούς κινδύνους που συνοδεύουν την καλλιέργειά τους, όσο από το σκεπτικισμό των καταναλωτών, κυρίως εντός της ΕΕ. Περαιτέρω αρνητικά συντείνει το ρυθμιστικό πλαίσιο που διέπει την καλλιέργεια και χρήση των γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών, το οποίο περιορίζει την ευρεία καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων φυτών. Σύμφωνα με την πλέον πρόσφατη νομοθεσία, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή αδειοδότησε τη χρήση επτά γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών (αραβόσιτος (3), σόγια (2), ελαιοκράμβη (1), βαμβάκι (1)) και ανανέωσε την άδεια χρήσης δύο καλλιεργειών αραβοσίτου και μίας καλλιέργειας ελαιοκράμβης που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και ζωοτροφή. Παρά τις εξαντλητικές διαδικασίες αδειοδότησης καθώς και τη θετική επιστημονική εισήγηση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), οι αποφάσεις αδειοδότησης δεν καλύπτουν την καλλιέργειά τους, ενώ τα προϊόντα των ανωτέρω καλλιεργειών υποχρεωτικά υποβάλλονται στους κανόνες τιτλοφόρησης και ιχνηλάτησης που έχει θεσπίσει η ΕΕ. Ως απόρροια των ανωτέρω, τα τελευταία χρόνια η έρευνα στρέφεται προς την ανάπτυξη και υιοθέτηση νέων τεχνολογιών βελτίωσης (New Breeding Techniques, NBT), οι οποίες περιορίζουν σαφώς τους κινδύνους που αφορούν στην τροφική αλυσίδα και στο περιβάλλον. Ως νέες τεχνολογίες ορίζεται ένα πλήθος μοριακών και βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων που προσφέρουν δυνατότητες χειρισμού της γενετικής πληροφορίας με στόχο τη διευκόλυνση της έρευνας στη βελτίωση αλλά και την ανάπτυξη ποικιλιών που συσσωρεύουν επιθυμητά γνώρισμα. Παρά τις διαφορές των NBT, τόσο ως προς τις μεθοδολογικές όσο και ως προς τις λειτουργικές πτυχές τους, ως θεμέλια βάση της εφαρμογής τους ορίζεται η δημιουργία νέας γενετικής παραλλακτικότητας είτε μέσω γενετικής μηχανικής είτε μέσω μεταλλαξιγένεσης. Στην κατηγορία των τεχνολογιών γενετικής μηχανικής εμπίπτουν οι τεχνολογίες cisgenesis και intragenesis, με την πρώτη να αφορά σε γενετική τροποποίηση με χρήση ενός αυτούσιου αντιγράφου φυσικών γονιδίων, με ίδια ρυθμιστικά στοιχεία που προέρχονται από φυτά συμβατά σε φυσική διασταύρωση, ενώ η δεύτερη αναφέρεται στη μεταφορά νέων γονιδιακών συνδυασμών και ρυθμιστικών αλληλουχιών που προέρχονται από το συγκεκριμένο είδος. Παρά το γεγονός ότι η χρήση τους βασίζεται στη διαθέσιμη γονιδιακή δεξαμενή, που είναι κοινή με την αντίστοιχη των κλασικών βελτιωτικών προγραμμάτων, απουσιάζουν δείκτες που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, συνεπώς τα φυτά που προκύπτουν δεν χαρακτηρίζονται ως κλασικά διαγονιδιακά (Schouten et al. 2006; Holme et al. 2013). Επιπλέον, αναφέρεται ότι η εφαρμογή των εν λόγω τεχνολογιών ελαχιστοποιεί τις τυχόν επιπτώσεις σε καταναλωτές των προϊόντων τους αλλά και σε οργανισμούς μη-στόχους, ενώ παράλληλα δεν επιφέρει προβλήματα γενετικής σύνδεσης των γονιδίων με ανεπιθύμητα γονίδια (linkage drag) (Chibage et al. 2022). Στην κατηγορία των προσεγγίσεων στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης εμπίπτουν οι τεχνολογίες ZFNs (Zinc finger nucleases) και TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), που επιτρέπουν τη γενετική τροποποίηση επάγοντας δίκλωνες θραύσεις στην έλικα DNA, οι οποίες ενεργοποιούν διαδικασίες μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (non homologous end-joining, NHEJ) ή επιδιόρθωσης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Homology-Directed

Repair, HDR) σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές θέσεις. Στις πρόσφατες τεχνολογίες γονιδιωματικής επεξεργασίας εντάσσεται η CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats) που παρέχει τη δυνατότητα πρόκλησης στοχευμένων δίκλωνων θραύσεων, οι οποίες συμβάλλουν σε ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης NHEJ και HDR, με τον πρώτο ωστόσο να συμβαίνει συχνότερα προκαλώντας προσθήκες και ελλείψεις που συμβάλλουν σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης (Ran et al. 2013; Chaudhary et al. 2019; Holme et al. 2019).

Η εποχή της γονιδιωματικής σηματοδοτείται από την ύπαρξη άπειρης πληροφορίας σχετικής με το γονιδίωμα ενός μεγάλου εύρους καλλιεργούμενων ειδών, προσφέροντας δυνατότητες εις βάθος κατανόησης της λειτουργίας γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών έναντι καταπονήσεων. Τα ανωτέρω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι προστίθενται στη φαρέτρα των σχετικών επιστημών ολοένα και περισσότερες τεχνολογίες που επιτρέπουν την ευχερή επεξεργασία των γονιδιωμάτων, προσφέρονται απεριόριστες προοπτικές αντιμετώπισης των καταπονήσεων με τρόπο που συμβάλλουν αφενός μεν στην ανάπτυξη σταθερής και ευρείας ανθεκτικότητας και αφετέρου στην ελαχιστοποίηση των κινδύνων που ενέχει η εφαρμογή των συμβατικών τεχνολογιών γενετικής μηχανικής. Η προοπτική πρακτικής αξιοποίησης των εν λόγω τεχνολογιών ωστόσο θα εξαρτηθεί άμεσα από το ρυθμιστικό πλαίσιο που πρόκειται να διαμορφωθεί σχετικά με την ένταξή τους σε συμβατικές ή γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες, των οποίων η καλλιέργεια και χρήση υπόκειται σε σημαντικούς περιορισμούς.

Βιβλιογραφία

- Ahmar S, Gill RA, Jung KH, Faheem A, Qasim MU, Mubeen M, Zhou W (2020) Conventional and Molecular Techniques from Simple Breeding to Speed Breeding in Crop Plants: Recent Advances and Future Outlook. *Int J Mol Sci* 21:2590. <https://doi.org/10.3390/ijms21072590>
- Alfano JR, Collmer A (2004) Type III Secretion System Effector Proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* 42:385-414. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731>
- Bansal KC, Lenka SK, Mondal TK (2013) Genomic resources for breeding crops with enhanced abiotic stress tolerance. *Plant Breed* 133:1-11. <https://doi.org/10.1111/pbr.12117>
- Bradshaw JE (2016) Scientific breeding in the twentieth century and future goals. In: Bradshaw JE (eds) *Plant Breeding: Past, Present and Future*. Springer International Publishing Switzerland pp 39-71. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23285-0_2
- Breseghele F, Coelho ASG (2013) Traditional and modern plant breeding methods with examples in rice (*Oryza sativa* L.). *J Agric Food Chem* 61:8277-8286. <https://doi.org/10.1021/jf305531j>
- Büttner D, Gürlebeck D, Noël LD, Bonas U (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol Microbiol* 54:755-768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04302.x>
- Büttner D, Lorenz C, Weber E, Bonas U (2006) Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *Mol Microbiol* 59:513-527. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04924.x>

- Büttner D, Bonas U (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. FEMS Microbiol Rev 34:107–133. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x>
- Cao Y, Yang M, Ma W, Sun Y, Chen G (2018) Overexpression of *SSB_{Xoc}*, a single-stranded DNA-binding protein from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, enhances plant growth and disease and salt stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana*. Front Plant Sci 9:953. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00953>
- Chaudhary J, Deshmukh R, Sonah H (2019) Mutagenesis approaches and their role in crop improvement. Plants 8:467. <https://doi.org/10.3390/plants8110467>
- Chen L, Qian J, Qu S, Long J, Yin Q, Zhang C, Wu X, Sun F, Wu T, Hayes M, Beer SV, Dong H (2008a) Identification of specific fragments of HpaG Xoo, a harpin from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, that induce disease resistance and enhance growth in plants. Phytopathology 98:781-791. <https://doi.org/10.1094/phyto-98-7-0781>
- Chen L, Zhang SJ, Zhang SS, Qu S, Ren X, Long J, Yin Q, Qian J, Sun F, Zhang C, Wang L, Wu X, Wu T, Zhang Z, et al. (2008b) A fragment of the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* harpin HpaG Xoo reduces disease and increases yield of rice in extensive grower plantings. Phytopathology 98:792-802. <https://doi.org/10.1094/phyto-98-7-0792>
- Chibage FC, Nyoni M, Murashiki TC, Samukange VC, Muzerengwa R, Mahuni C, Savadye DT (2022) Cisgenesis and Intragenesis: Innovative tools for crop improvement. In: Chaurasia A and Kole C (eds) Cisgenic crops: Potential and prospects, concepts and strategies in plant sciences. Springer Nature Switzerland pp 43-65. https://doi.org/10.1007/978-3-031-06628-3_3
- Cho H-J, Park Y-J, Noh T-H, Kim Y-T, Kim J-G, Song E-S, et al. (2008) Molecular analysis of the *hrp* gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10859. Microb Pathog 44:473-483. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.12.002>
- Choi M-S, Kim W, Lee C, Oh C-S (2013) Harpins, multifunctional proteins Secreted by Gram-Negative plant-pathogenic bacteria. Mol Plant Microbe Interact 26: 1115-1122. <https://doi.org/10.1094/mpmi-02-13-0050-cr>
- Chuang Hw, Harnrak A, Chen YC, Hsu CM (2010) A harpin-induced ethylene-responsive factor regulates plant growth and responses to biotic and abiotic stresses. Biochem Biophys Res Commun 402:414–420. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.047>
- Cleveland DA (2001) Is plant breeding science objective truth or social construction? The case of yield stability. Agric Human Values 18: 251–270. <https://doi.org/10.1023/A:1011923222493>
- Collmer A, Badel JL, Charkowski AO, Deng W-L, Fouts DE, Ramos AR, et al. (2000) *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. Proc Natl Acad Sci 97:8770-8777. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8770>
- Demirkol G (2021) PopW enhances drought stress tolerance of alfalfa via activating antioxidative enzymes, endogenous hormones, drought related genes and inhibiting senescence genes. Plant Physiol Biochem 166:540-548. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.036>
- Dong H, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV (1999) Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. Plant J 20: 207-215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00595.x>
- Dong HP, Peng J, Bao Z, Meng X, Bonasera JM, Chen G, Beer SV, Dong H (2004) Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated

- Arabidopsis growth and insect defense. *Plant Physiol* 136:3628-3638. <https://doi.org/10.1104/pp.104.048900>
- Dong OX, Ronald PC (2019) Genetic engineering for disease resistance in plants: recent progress and future perspectives. *Plant Physiol* 180:26-38. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01224>
- Dou D, Zhou JM (2012) Phytopathogen effectors subverting host immunity: Different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe* 12:484-495. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.003>
- Duan C-G, Wang C-H, Guo H-S (2012) Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence* 3:5. <https://doi.org/10.1186/1758-907x-3-5>
- Fonseca JM, Kim H-J, Kline WL, Wyenandt CA, Hoque M, Ajwa H, French N (2009) Effect of preharvest application of a second-generation harpin protein on microbial quality, antioxidants, and shelf life of fresh-cut lettuce. *J Amer Soc Hortic Sci* 134: 141-147. <https://doi.org/10.21273/jashs.134.1.141>
- Gigli-Bisceglia N, Testerink P (2021) Fighting salt or enemies: shared perception and signaling strategies. *Curr Opin Plant Biol* 64:102120. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102120>
- Gilliam M, Able JA, Roy S (2017) Translating knowledge about abiotic stress tolerance to breeding programmes. *Plant J* 90: 898-917. <https://doi.org/10.1111/tpj.13456>
- Gottula J, Fuchs M (2009) Toward a quarter century of pathogen-derived resistance and practical approaches to plant virus disease control. In: Loebenstein G and Carr JP (eds) *Advances in Virus Research* Elsevier Inc pp 161-183. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(09\)07505-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)07505-8)
- Haapalainen M, Engelhardt S, Küfner I, Li C-M, Nürnberger T, Lee J, Romantschuk M, Taira S (2011) Functional mapping of harpin HrpZ of *Pseudomonas syringae* reveals the sites responsible for protein oligomerization, lipid interactions and plant defence induction. *Mol Plant Pathol* 12: 151-166. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00655.x>
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, Kamoun S (2009) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact* 22:115-122. <https://doi.org/10.1094/mpmi-22-2-0115>
- Holme IB, Wendt T, Holm PB (2013) Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol J* 11:395-407. <https://doi.org/10.1111/pbi.12055>
- Holme IB, Gregersen PL, Brinch-Pedersen H (2019) Induced genetic variation in crop plants by random or targeted mutagenesis: convergence and differences. *Front Plant Sci* 10:1468. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01468>
- Huguet E, Hahn K, Wengelnik K, Bonas U (1998) *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol Microbiol* 29:1379-1390. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01019.x>
- Jang YS, Sohn SI, Wang MH (2006) The *hrpN* gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Planta* 223:449-456. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0100-4>
- Jewel MC, Campbell BC, Godwin ID (2010) Transgenic Plants for Abiotic Stress Resistance. In: Kole C et al. (eds) *Transgenic Crop Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 67-132. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04812-8_2

- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kamoun S (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* 44:41–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>
- Kay S, Bonas U (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol* 12:37-43. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.006>
- Kvitko BH, Ramos AR, Morello JE, Oh HS, Collmer A (2007) Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. *J Bacteriol* 189:8059–8072. <https://doi.org/10.1128/jb.01146-07>
- Lee J, Klüsener B, Tsiamis G, Stevens C, Neyt C, Tampakaki AP, Panopoulos NJ, Nöller J, Weiler EW, Cornelis GR, Mansfield JW, Nürnberger T (2001) HrpZP_{sph} from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 98: 289–294. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.1.289>
- Li Q, Wang B, Yu J, Dou D (2020) Pathogen-informed breeding for crop disease resistance. *J Integr Plant Biol* 63:305-311. <https://doi.org/10.1111/jipb.13029>
- Liu H, Wang Y, Zhou X, Wang C, Wang C, Fu J, Wei T (2016) Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* from *Ralstonia solanacearum* primed antioxidant defenses with enhanced drought tolerance in tobacco plants. *Plant Cell Rep* 35:1333–1344. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1965-3>
- Liu Y, Zhou X, Liu W, Xiong X, Lv C, Zhou X, Miao W (2018) Functional regions of HpaXm as elicitors with specific heat tolerance induce the hypersensitive response or plant growth promotion in nonhost plants. *PLoS ONE* 13: e0188788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188788>
- Liu Y, Zhou X, Liu W, Huang J, Liu Q, Sun J, Cai X, Miao W (2020) HpaXpm, a novel harpin of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, acts as an elicitor with high thermal stability, reduces disease, and promotes plant growth. *BMC Microbiol* 20. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1691-4>
- Lomonossoff GP (1995) Pathogen -derived resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 33:323-343. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.33.090195.001543>
- Lonjon F, Lohou D, Cazalé AC, Büttner D, Ribeiro BG, et al. (2017) HpaB-Dependent secretion of type III effectors in the plant pathogens *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04853-9>
- Loo EP-I, Tajima Y, Yamada K, Kido S, Hirase T, Ariga H, et al. (2022) Recognition of Microbe- and Damage-Associated Molecular Patterns by Leucine-Rich Repeat Pattern Recognition Receptor Kinases confers salt tolerance in plants. *Mol Plant Microbe Interact* 35: 554-566. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-21-0185-FI>
- Lorenz C, Kirchner O, Egler M, Stuttmann J, Bonas U, Büttner D (2008) HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol Microbiol* 69: 344–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06280.x>
- Lu H, Patil P, Van Sluys MA, White FF, Ryan RP, Dow JM, et al (2008) Acquisition and evolution of plant pathogenesis– associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE* 3: e3828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003828>

- Mir RR, Rustgi S, Zhang Y-M, Xu C (2022) Multi-faceted approaches for breeding nutrient-dense, disease resistant, and climate-resilient crop varieties for food and nutritional security. *Heredity* 128: 387-390. <https://doi.org/10.1038/s41437-022-00542-0>
- Mitsopoulou N, Lakiotis K, Golia EE, Khah EM, Pavli OI (2021) Response of *hrpZ_{P_{sph}}*-transgenic *N. benthamiana* plants under cadmium stress. *Environ Sci Pollut Res Int* 28:3787-3796. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09204-2>
- Moose SP, Mumm RH (2008) Molecular plant breeding as the foundation for 21st Century crop improvement. *Plant Physiol* 147:969–977. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118232>
- Mourgues F, Brisset MN, Chevreau E (1998) Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Trends Biotechnol* 16:203-210. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(98\)01189-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(98)01189-5)
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279>
- Newman M-A, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G (2013) MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern) triggered immunity in plants. *Front Plant Sci* 4: 139. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00139>
- Nguyen H-C, Lin K-H, Ho S-L, Chiang C-M, Yang C-M (2018) Enhancing the abiotic stress tolerance of plants: from chemical treatment to biotechnological approaches. *Physiol Plant* 164:452-466. <https://doi.org/10.1111/ppl.12812>
- Oh CH, Beer SV (2005) Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiol Lett* 253:185–192. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.051>
- Oh CS, Beer SV (2007) AtHIPM, an Ortholog of the apple HrpN-Interacting Protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth-enhancing effect of HrpN in Arabidopsis. *Plant Physiol* 145:426-436. <https://doi.org/10.1104/pp.107.103432>
- Osuski M, Zhou G, Osuska L, Hankock RE, Kay WW, Misra S (2000) Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnol* 18:1162-1166. <https://doi.org/10.1038/81145>
- Pavli OI, Kelaidi GI, Tampakaki AP, Skaracis GN (2011) The *hrpZ* gene of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola enhances resistance to rhizomania disease in transgenic *Nicotiana benthamiana* and sugar beet. *PLoS ONE* 6: e17306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017306>
- Pavli OI, Mitsopoulou N, Zianna E, Foti C, Aliferis KA, Skaracis GN (2019) Transgenic expression of *hrpZ_{P_{sph}}* gene substantially alters the metabolome of *Nicotiana benthamiana* plants. In: Proceedings of 70th HSBMB Conference, p 10.
- Peng J-L, Bao Z-L, Ren H-Y, Wang J-S, Dong H-S (2004) Expression of harpin_{Xoo} in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death. *Phytopathology* 94: 1048-1055. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.10.1048>
- Rajput NA, Zhang M, Shen D, Liu T, Zhang Q, et al. (2015) Overexpression of a *Phytophthora* cytoplasmic CRN effector confers resistance to disease, salinity and drought in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol* 56:2423-2435. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv164>
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8: 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>

- Rodrigo-García J, Navarrete-Laborde B, de la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, Núñez-Gastélum JA (2019) Effect of Harpin protein as an elicitor on the content of phenolic compounds and antioxidant capacity in two hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties. *Food Sci Technol* 39: 72-77. <https://doi.org/10.1590/fst.20417>
- Sanford JC, Johnston SA (1985) The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol* 113:395-405. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(85\)80234-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(85)80234-4)
- Scheibner F, Hartmann N, Hausner J, Lorenz C, Hoffmeister AK, Büttner D (2018) The type III secretion chaperone HpaB controls the translocation of effector and non-effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant Microbe Interact* 31:61-74. <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-17-0138-r>
- Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen E (2006) Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Rep* 7:750-753. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400769>
- Shi F, Dong Y, Zhang Y, Yang X, Qiu D (2017) Overexpression of the *PeaTI* elicitor gene from *Alternaria tenuissima* improves drought tolerance in rice plants via interaction with a myo-inositol oxygenase. *Front Plant Sci* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00970>
- Silva Dias JC (2015) Plant breeding for harmony between modern agriculture production and the environment. *Agric Sci* 6:87-116. <https://doi.org/10.4236/as.2015.61008>
- Strobel NE, Ji C, Gopalan S, Kuc JA, He SY (1996) Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZPss protein. *Plant J* 9:431-439. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1996.09040431.x>
- Tampakaki AP, Panopoulos NJ (2000) Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZ_{PspH} produced in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1366-1374. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2000.13.12.1366>
- Tampakaki AP, Skandalis N, Gazi AD, Bastaki MN, Sarris PF, Charova SN, Kokkinidis M, Panopoulos NJ (2010) Playing the “Harp”: Evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. *Ann Rev Phytopathol* 48: 347-370. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114407>
- van de Wouw AP, Idnurm A (2019) Biotechnological potential of engineering pathogen effector proteins for use in plant disease management. *Biotechnol Adv* 37:107387. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.009>
- van de Wouw M, van Hintum T, Kik C, van Treurer R, Visser B (2010) Genetic diversity trends in twentieth century crop cultivars: a meta analysis. *Theor Appl Genet* 120:1241-1252. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1252-6>
- Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol* 16:123-132. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.001>
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- Wang Z, Han Q, Zi Q, Lv S, Qiu D, Zeng H (2017) Enhanced disease resistance and drought tolerance in transgenic rice plants overexpressing protein elicitors from *Magnaporthe oryzae*. *PlosOne* 12: e0175734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175734>
- Wani SH, Dutta T, Neelapu NRR, Surekha C (2017) Transgenic approaches to enhance salt and drought tolerance in plants. *Plant Gene* 11: 219-231. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.05.006>

- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science 257: 85-88. <https://doi.org/10.1126/science.1621099>
- Wolter F, Schindele P, Puchta H (2019) Plant breeding at the speed of light: the power of CRISPR/Cas to generate directed genetic diversity at multiple sites. BMC Plant Biol 19:176. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1775-1>
- Wu X, Wu T, Long J, Yin Q, Zhang Y, Chen L, Liu R, Gao T, Dong H (2007) Productivity and biochemical properties of green tea in response to full-length and functional fragments of HpaG XooC, a harpin protein from the bacterial rice leaf streak pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. J Biosci 32:1119-1131. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0113-1>
- Zhang L, Xiao S, Li W, Feng W, Li J, Wu Z, Gao X, Liu F, Shao M (2011) Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrfI* in rice enhances drought tolerance. J Exp Bot 62:4229-4238. <https://doi.org/10.1093/jxb/err131>
- Zhang M, Rajput NA, Shen D, Sun P, Zeng W, et al. (2015) A *Phytophthora sojae* cytoplasmic effector mediates disease resistance and abiotic stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. Sci Rep 5. <https://doi.org/10.1038/srep10837>
- Zhao Y, Yang X, Zhou G, Zhang T (2020) Engineering plant virus resistance: from RNA silencing to genome editing strategies. Plant Biotechnol J 18:328-336. <https://doi.org/10.1111/pbi.13278>

Παράρτημα

Παράρτημα Ι

Πίνακας 1. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο ποσοστό βλάστησης (%) των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό βλάστησης (%)				
	Συγκέντρωση D-mannitol (mM) (M)				
	0	100	200	300	M.O.(M)
wt	100 a	100 a	100 a	-	100 a
#1	93,50 a	92,50 a	95,50 ab	-	98,83 ab
#2	100 a	97,00 a	96,50 ab	-	97,80 ab
#6	100 a	100 a	76,50 c	-	92,16 b
#7	97,50 a	99,00 a	88,50 b	-	95,00 ab
#9	96,50 a	98,50 a	91,00 ab	-	95,30 ab
M.O. (Σ)	97,92 a	97,83 a	91,33 b		

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$). Στα 300 mM D-mannitol και οι δύο κατηγορίες φυτών εμφάνισαν αδυναμία βλάστησης (οι τιμές δε συμπεριλαμβάνονται στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων).

Πίνακας 2. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων (cm) των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό βλάστησης (%)				
	Συγκέντρωση D-mannitol (mM) (M)				
	0	100	200	300	M.O.(M)
wt	2,75 c	2,35 a	1,33 b	-	2,14 a
#1	2,95 bc	1,85 b	1,28 b	-	2,03 a
#2	3,25 a	1,75 b	1,28 b	-	2,09 a
#6	2,30 d	1,75 b	1,75 a	-	1,93 a
#7	2,78 c	2,20 a	1,28 b	-	2,08 a
#9	3,15 ab	2,28 a	1,25 b	-	2,22 a
M.O. (Σ)	2,86 a	2,03 b	1,36 c		

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$). Στα 300 mM D-mannitol και οι δύο κατηγορίες φυτών εμφάνισαν αδυναμία βλάστησης (οι τιμές δε συμπεριλαμβάνονται στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων).

Πίνακας 3. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο ποσοστό επιβίωσης (%) των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό Επιβίωσης (%)
wt	35,00 b
#1	65,00 a
#2	0
#6	89,00 a
#7	0
#9	52,50 ab

Πίνακας 4. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στην περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη, βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD ($n=4$) στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	Μ.Ο. (Μ)
wt	28,86 a	37,80 ab	31,41 ab
#1	24,78 ab	46,03 a	35,40 a
#2	25,70 ab	20,00 b	24,07 b
#6	20,82 b	41,00 a	29,79 ab
#7	26,73 ab	37,60 ab	30,35 ab
#9	26,48 ab	34,28 ab	30,38ab
Μ.Ο. (Σ)	25,51 b	37,55 a	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 5. Επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στο ποσοστό βλάστησης (%) των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό βλάστησης (%)				
	Συγκέντρωση NaCl (mM) (Μ)				
	0	100	200	300	Μ.Ο.(Μ)
wt	96,66 ab	100 a	65,33 b	-	87,33 a
#1	97,50 ab	98,33 a	85,00 a	-	93,13 a
#2	93,00 ab	66,66 b	28,33 d	-	65,70 b
#6	96,66 ab	100 a	74,33 ab	-	90,33 a
#7	88,33 b	98,33 a	66,33 b	-	84,33 ab
#9	100 a	91,66 a	45,00 c	-	78,88 ab
Μ.Ο. (Σ)	95,11 a	92,50 a	60,72 b		

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$). Στα 300 mM NaCl και οι δύο κατηγορίες φυτών εμφάνισαν αδυναμία βλάστησης (οι τιμές δε συμπεριλαμβάνονται στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων).

Πίνακας 6. Επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στο δυναμικό ανάπτυξης των σποροφύτων (cm) των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό βλάστησης (%)				
	Συγκέντρωση NaCl (mM) (Μ)				
	0	100	200	300	Μ.Ο.(Μ)
wt	1,90 a	1,28 ab	0,48 c	-	1,22 a
#1	1,88 a	1,45 a	0,93 a	-	1,42 a
#2	1,45 b	1,43a	0,45 c	-	1,11 a
#6	1,95 a	1,45 a	0,80 ab	-	1,40 a
#7	1,78 a	1,15 bc	0,83 a	-	1,25 a
#9	1,80 a	1,05 c	0,58 bc	-	1,14 a
Μ.Ο. (Σ)	1,79 a	1,30 b	0,68 c		

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$). Στα 300 mM NaCl και οι δύο κατηγορίες φυτών εμφάνισαν αδυναμία βλάστησης (οι τιμές δε συμπεριλαμβάνονται στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων).

Πίνακας 7. Επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στην περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη, βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD ($n=4$) στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Συγκέντρωση NaCl (mM) (M)			
	0	100	200	M.O. (M)
wt	28,86 a	25,02 ab	24,66 ab	26,18 ab
#1	24,78 a	24,48 ab	22,50 b	23,92 b
#7	26,73 a	28,80 a	30,13 a	28,55 a
#9	26,48 a	21,98 b	22,34 b	23,39 b
M.O. (Σ)	26,71 a	25,07 a	24,90 a	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 8. Επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στην περιεκτικότητα των φυλλικών δίσκων σε ολική χλωροφύλλη ($n=3$) στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Συγκέντρωση NaCl (mM) (M)			
	0	100	200	M.O. (M)
wt	2,00 a	1,39 ab	1,11 ab	1,50 ab
#1	1,63 b	1,17 b	0,90 b	1,24 b
#7	2,12 a	1,61 a	1,50 a	1,74 a
#9	1,75 ab	1,41 ab	1,32 a	1,49 ab
M.O. (Σ)	1,87 a	1,39 ab	1,21 ab	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Παράρτημα II

Πίνακας 1. Επίδραση της καταπόνησης καδμίου στο ποσοστό βλάστησης (%) των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό βλάστησης (%)				
	Συγκέντρωση CdCl ₂ (μM) (M)				
	0	50	100	150	M.O. (M)
wt	77,80 ab	86,66 a	83,20 ab	86,33a	83,49 ab
#1	71,13 bc	58,90 b	40,43 c	36,10 b	23,75 c
#2	53,33 c	53,33 b	66,66 bc	51,13 b	56,11 b
#6	66,10 bc	86,66 a	64,80 bc	51,65 b	67,30 b
#7	88,56 ab	91,10 a	93,77 ab	51,10 b	81,13 ab
#9	100 a	100 a	100 a	95,53 a	98,88 a
M.O. (Σ)	76,15 ab	79,44 a	74,81 ab	62,58 b	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 2. Επίδραση της καταπόνησης καδμίου στο μήκος βλαστού των σποροφύτων (cm) των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Μήκος Βλαστού (cm)				
	Συγκέντρωση CdCl ₂ (μM) (M)				
	0	50	100	150	M.O. (M)
wt	1,66 a	1,03 ab	0,99 b	0,40 c	1,02 ab
#1	1,32 b	1,16 a	0,97 bc	0,56 bc	1,00 ab
#2	1,73 a	1,09 ab	1,14 ab	0,69 ab	1,16 a
#6	1,44 ab	1,18 a	1,21 ab	0,78 a	1,15 a
#7	1,13 b	0,77 b	0,75 c	0,50 c	0,78 b
#9	1,42 ab	1,29 a	1,29 a	0,74 a	1,18 a
M.O. (Σ)	1,45 a	1,09 b	1,06 b	0,60 c	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 3. Επίδραση της καταπόνησης καδμίου στο μήκος ρίζας των σποροφύτων (cm) των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Μήκος Ρίζας (cm)				
	Συγκέντρωση CdCl ₂ (μM) (M)				
	0	50	100	150	M.O. (M)
wt	1,16 ab	1,26 a	0,87 ab	0,41 b	0,93 ab
#1	1,22 ab	1,17 ab	0,45 c	0,45 b	0,82 b
#2	1,50 a	1,08 ab	1,04 a	0,56 a	1,04 a
#6	0,69 c	1,15 ab	0,61 bc	0,42 b	0,72 b
#7	0,78 bc	0,80 b	0,56 c	0,41 b	0,64 bc
#9	0,94 bc	1,11 ab	0,63 bc	0,46 ab	0,78 b
M.O. (Σ)	1,05 a	1,09 a	0,69 b	0,46 c	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 4. Επίδραση της καταπόνησης καδμίου στην περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης των φύλλων βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD ($n=4$) στις *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Ποσότητα Χλωροφύλλης				
	Συγκέντρωση CdCl ₂ (μM) (M)				
	0	50	100	150	M.O. (M)
wt	14,22 ab	11,30 a	15,01 a	11,79 a	13,08 a
#1	14,85 a	10,89 a	12,27 ab	9,76 a	11,94 ab
#2	10,45 ab	10,11 a	8,90 b	9,97 a	9,85 b
#6	8,73 b	10,94 a	11,59 ab	11,43 a	10,67 ab
#7	13,39 ab	12,46 a	13,95 a	10,49	12,67 ab
#9	14,96 a	12,83 a	12,57 ab	11,36 a	12,84 ab
M.O. (Σ)	12,77 a	11,42 ab	12,38 ab	10,80 b	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 5. Επίδραση της καταπόνησης καδμίου στο νωπό βάρος της ρίζας των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Νωπό Βάρος Ρίζας (gr)				
	Συγκέντρωση CdCl ₂ (μM) (M)				
	0	50	100	150	M.O. (M)
wt	0,158 ab	0,18 ab	0,118 ab	0,115 a	0,144 a
#1	0,108 bc	0,195 a	0,164 a	0,138 a	0,151 a
#2	0,132 ab	0,149 ab	0,146 ab	0,128 a	0,140 a
#6	0,093 c	0,145 ab	0,157 ab	0,083 a	0,122 a
#7	0,107 bc	0,132 b	0,131 ab	0,135 a	0,126 a
#9	0,175 a	0,137 ab	0,113 b	0,122 a	0,134 a
M.O. (Σ)	0,127 b	0,157 a	0,136 ab	0,122 b	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 6. Επίδραση της καταπόνησης καδμίου στο ξηρό βάρος της ρίζας των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ξηρό Βάρος Ρίζας (gr)				
	Συγκέντρωση CdCl ₂ (μM) (M)				
	0	50	100	150	M.O. (M)
wt	0,028 a	0,036 a	0,022 b	0,024 a	0,028 a
#1	0,03 a	0,042 a	0,038 ab	0,027 a	0,034 a
#2	0,03 a	0,03 a	0,028 ab	0,023 a	0,028 a
#6	0,027 a	0,031 a	0,044 a	0,021 a	0,031 a
#7	0,027 a	0,028 a	0,035 ab	0,027 a	0,029 a
#9	0,041 a	0,03 a	0,024 ab	0,027 a	0,029 a
M.O. (Σ)	0,03 ab	0,033 a	0,032 ab	0,025 b	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Παράρτημα III

Πίνακας 1. Μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στα φύλλα των μαρτύρων και των καταπονημένων φυτών των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας. RT: χρόνος έκλουσης, m/z: αναλογία μάζας προς φορτίο. Τα δεδομένα αφορούν τους μέσους όρους τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων ανά επίπεδο μεταχείρισης.

Μεταβολίτες	RT	m/z	wt_c	wt_d	#1_c	#1_d	#6_c	#6_d	#9_c	#9_d
[1000] 2-amino-1-phenylethanol [15.668]	11,66445	174	4,5090	5,1694	4,6251	4,7946	2,5186	5,3183	4,3901	2,7436
[1001] phenylethylamine [13.766]	18,9286	174	0,8927	0,3463	1,7162	0,7708	1,5274	0,9399	3,6784	1,1833
[1015] O-phosphocolamine [16.232]	24,1361	299	0,000	0,0638	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[1045] putrescine [15.709]	22,9455	174	3,3806	1,1944	1,1870	1,1985	0,4813	0,8201	3,0966	0,4784
[1060] pyruvic acid [6.714]	6,3859	174	0,000	0,0203	0,0203	0,0116	0,0237	0,0356	0,000	0,000
[10712] cellobiose 1 [24.444]	41,5241	361	0,000	0,3817	6,9544	0,1143	0,000	0,000	0,3099	0,1594
[10712] cellobiose 2 [24.7]	38,3499	204	0,6839	2,6317	1,7154	4,2590	1,6765	6,1082	2,4469	0,7336
[1102] spermidine 1 [20.327]	31,7774	200	0,000	0,0587	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[1102] spermidine 2 [20.811]	32,88545	174	0,3846	0,4497	0,1309	0,3815	0,0739	0,5238	0,4290	0,3473
[1176] urea [9.599]	10,7916	147	0,3269	1,4852	1,0960	3,7288	0,0654	5,0997	1,9136	9,3548
[145742] L-proline 1 [8.567]	9,2134	70	19,1915	4,1474	0,6568	2,9206	0,000	0,2150	0,000	0,0029
[145742] L-proline 2 [10.321]	12,46795	142	64,115	40,709	20,9736	13,3188	1,2524	51,1897	38,3706	35,5857
[156807] D-lyxosylamine 1 [14.737]	21,8345	103	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,1342	0,000	0,000
[156807] D-lyxosylamine 2 [14.861]	21,82925	217	0,2286	0,5591	0,6920	0,9451	0,8965	0,1723	0,000	0,000
[16218892] N-acetyl-D-glucosamine 1 [19.196]	29,3505	319	44,644	2,8140	5,4636	8,1303	1,4463	1,6956	56,6521	0,000
[16219560] lactobionic acid 1 [24.583]	34,5859	217	1,5796	1,6189	2,9379	1,4546	1,0605	1,5930	3,2641	0,5442
[16219560] lactobionic acid 2 [24.893]	43,7684	204	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

[165577] leucrose [24.975]	41,0492	361	0,0256	0,5072	4,1368	1,6875	0,0198	0,0388	3,0163	0,000
[169019] D-threitol [12.954]	18,1389	217	15,9398	3,7292	8,4917	5,8568	4,8120	5,0311	15,0698	5,7777
[18950] D-mannose 1 [17.287]	25,777	319	118,84	15,212	18,5047	300,3373	85,1179	66,812	318,2179	247,6876
[18950] D-mannose 2 [17.435]	27,1463	205	50,117	114,187	95,4434	37,3439	72,0133	187,183	23,6062	129,3397
[204] allantoin 1 [17.293]	26,31445	331	0,000	12,046	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,5786
[204] allantoin 2 [17.356]	26,3545	518	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[204] allantoin 3 [19.167]	29,7765	259	0,000	0,9862	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,1387
[206] D (+) galactose 1 [17.409]	30,8246	319	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,6875	0,1360	0,1731
[21236] L-norleucine 1 [8.945]	8,7693	86	0,2125	0,1456	0,000	0,0759	0,000	0,000	0,000	0,000
[21236] L-norleucine 2 [10.607]	11,857	158	0,3532	0,6246	0,0725	0,5326	0,0093	0,2432	0,1034	0,1300
[236] L-asparagine 1 [14.496]	20,8524	188	0,000	40,105	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,2534
[236] L-asparagine 2 [14.984]	21,6857	231	0,000	335,187	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,0843
[239] Beta- alanine 1 [12.044]	15,7764	248	0,1688	0,6061	0,0223	0,1018	0,0097	0,0185	0,0368	0,0758
[24749] D-glucose 1 [17.426]	26,9746	319	0,000	1,5962	1,4485	0,5595	0,000	0,000	3,6931	0,000
[24749] D-glucose 2 [17.625]	27,1328	205	28,098	45,813	0,000	3,8891	12,2507	1,0716	4,7387	0,000
[2724552] tagatose 1 [17.011]	26,2878	217	10,885	0,1374	5,2122	0,9737	0,000	0,000	1,2980	0,000
[2724552] tagatose 2 [17.212]	26,5986	217	157,917	1,3307	8,0882	2,5959	32,7337	30,6579	17,8277	11,2415
[3037582] mucic acid [18.907]	29,5907	333	0,000	1,5015	0,0192	0,000	0,0032	0,000	0,000	0,000
[311] citric acid [16.615]	25,0089	347	0,3059	36,890	0,0752	1,2256	0,2894	3,4097	0,2879	0,3560
[33032] L-glutamic acid 1 [13.338]	18,2619	174	0,000	0,7600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	20,5089	246	9,7683	36,2715	0,8387	4,9663	2,2762	5,4197	2,3881	1,8244
[33032] L-glutamic acid 3 (dehydrated) [13.232]	18,0601	156	16,071	15,490	1,6544	2,8431	0,7666	2,3562	4,3584	4,9048
[412] nornicotine [13.255]	17,899	142	3,9371	3,2721	1,0002	6,5756	0,3041	10,8033	1,7346	1,5481
[439193] isomaltose 2 [25.863]	42,94125	361	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,1344	0,000
[439194] glyceric acid [10.735]	13,51705	189	2,1636	8,3767	1,4286	12,6624	19,0337	12,8516	2,6255	2,8442
[439227] pipecolic acid 1 [9.868]	11,4644	84	0,1511	0,1557	0,0412	0,000	0,0252	0,000	0,000	0,000
[439227] pipecolic acid 2 [11.22]	14,113	156	0,0669	0,0887	0,0045	0,0305	0,0011	0,0284	0,0185	0,0033
[439232] N-acetyl-ornithine 2 [18.409]	27,86085	174	0,000	0,4334	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

[439242] Raffinose [29.282]	50,11735	87	0	0,0217	0,3984	0,0798	0,2174	0,6999	0,4321	1,9176
[439451] galactinol 2 [26.479]	43,9033	204	1,2819	1,3336	1,7694	2,0077	0,5372	1,7518	3,1121	0,5153
[439742] beta-cyano-L-alanine [11.288]	14,435	141	0,000	1,3496	0,0058	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[439746] 6-deoxy-D-glucose 1 [15.598]	22,9882	117	0,000	0,5961	0,2689	0,000	0,000	0,1309	0,000	0,000
[439746] 6-deoxy-D-glucose 2 [15.751]	22,8373	117	0,000	0,000	0,0948	0,0161	0,0124	0,000	0,000	0,000
[439766] citramalic acid [12.63]	17,0349	147	0,1525	0,2358	0,0712	0,4526	0,1050	0,3224	0,000	0,0371
[439958] D-glucose-6-phosphate 1 [21.394]	34,55255	387	0,000	0,0355	0,000	0,000	0,0190	0,0087	0,000	0,000
[439958] D-glucose-6-phosphate 2 [21.558]	34,5549	387	0,000	0,000	0,0195	0,000	0,000	0,0123	0,000	0,000
[440473] L-mimosine 1 [8.863]	9,79985	188	0,0694	0,0953	0,0236	0,0327	0,0134	0,0329	0,0436	0,0117
[440658] melibiose 1 [25.565]	42,4814	361	0,000	0,1264	0,2254	0,1906	0,000	0,000	0,1165	0,000
[440658] melibiose 2 [25.784]	41,5285	361	0,000	0,0468	0,1536	0,0000	0,000	0,000	0,1971	0,000
[441032] D (+)altrose 1 [17.397]	31,3607	319	0,000	0,2647	0,000	0,000	0,0050	0,1607	0,4704	0,000
[441032] D (+)altrose 2 [17.46]	31,3566	205	1,4672	0,4579	1,0324	1,7815	0,7244	1,0656	20,9172	0,5973
[448388] D-allose 1 [17.278]	30,8491	319	24,577	14,2078	41,0732	39,5995	42,3596	54,0116	45,8449	18,8020
[448388] D-allose 2 [17.521]	31,2329	319	0,3747	0,000	0,3134	0,4936	0,000	0,1617	0,000	0,000
[4623424] sophorose 1 [24.948]	41,71685	319	0,3327	0,000	0,0214	0,0213	0,0277	0,1366	0,7746	0,0379
[4623424] sophorose 2 [25.189]	41,7123	319	0,0497	0,1797	0,1543	0,0921	0,000	0,000	0,3187	0,0000
[487] methylmalonic acid [9.088]	10,07845	147	0,0623	0,0339	0,0769	0,1302	0,0754	0,0336	0,1744	0,0402
[500] 4-guanidinobutyric acid 2 [13.348]	18,3262	174	3,9695	1,4722	2,0348	2,2612	4,2360	4,1813	2,9681	2,4096
[5460935] turanose 1 [24.81]	40,6078	307	0,000	0,000	0,0246	0,1178	0,000	0,000	0,3826	0,000
[5460935] turanose 2 [25.018]	41,6982	361	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[5610] tyramine [17.562]	26,5016	174	2,0402	0,6690	1,8521	1,5870	1,0305	1,1043	1,8503	1,9945
[5780] D-sorbitol [17.898]	27,3962	319	33,29	7,8128	0,4181	14,5458	23,2071	28,3225	4,7165	0,0972
[5950] L-alanine 1 [7.495]	7,5327	116	1,6094	1,1348	1,6293	1,1876	0,5871	0,2230	0,000	0,000
[5950] L-alanine 2 [11.182]	14,038	147	0,2565	0,3241	0,4578	0,0959	0,0117	0,0350	0,1005	0,0137

[5951] L-serine 1 [9.706]	11,4327	132	1,3388	1,5619	0,1567	0,4463	0,5281	0,0314	0,1249	0,1485
[5951] L-serine 2 [11.174]	14,2646	204	2,9959	6,9892	1,4032	2,7297	0,1252	2,4180	3,2696	0,5785
[5960] aspartic acid 1 [12.002]	15,653	160	0,000	0,3677	0,0220	0,0059	0,0127	0,0024	0,0000	0,000
[5960] aspartic acid 2 [13.207]	18,22555	232	0,6620	4,3107	0,0825	0,0425	0,0915	0,7600	0,1189	0,0880
[5962] L-lysine 2 [17.643]	26,8498	317	0,000	2,8449	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[5984] fructose 1 [17.18]	26,3157	307	1469,83	286,885	1345,349	740,4237	551,0331	699,462	672,0020	1444,3756
[5988] Sucrose [23.988]	39,5745	361	469,348	147,05	183,9693	219,8696	206,4279	214,917	455,0938	471,3876
[604] gluconic acid 2 [18.297]	29,0558	333	0,3933	3,7231	0,6579	0,1983	1,1561	0,6934	0,4354	0,0280
[6057] L-tyrosine 2 [17.856]	27,1937	218	0,000	2,3022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[6057] tyrosine 2 [17.871]	27,1741	218	0,000	1,6789	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,1780
[60961] adenosine [23.825]	39,0032	236	0,000	0,0298	0,0151	0,0559	0,0593	0,0774	0,0742	0,0091
[6106] L-leucine 1 [8.298]	8,7546	86	0,000	0,3559	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[6106] L-leucine 2 [9.945]	11,8648	158	0,000	0,4265	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0360
[6137] L-methionine 2 [13.188]	18,03025	176	0,000	0,2094	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[614] L-proline 1 [8.58]	9,1621	70	0,000	0,000	0,4776	0,8187	0,000	0,000	0,000	0,000
[614] L-proline 2 [10.341]	12,4345	142	56,5489	17,5278	0,2038	27,8174	0,000	0,000	21,4632	9,8736
[6251] D-mannitol [17.81]	26,7855	319	632,309	320,745	841,3127	162,6555	260,122	302,833	301,8085	306,3980
[6255] maltose 2 [24.915]	41,526	361	1,3401	1,3205	0,7258	2,7207	0,4607	1,8412	0,3509	0,0565
[6255] maltose 1 [24.702]	40,89775	361	0,0552	0,000	0,000	0,000	0,000	0,2197	0,000	0,1899
[6262] L-ornithine 1 [14.349]	20,36845	142	0,000	0,4968	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[6262] L-ornithine 2 [16.632]	24,78405	174	0,000	1,6104	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[6287] L-valine 2 [9.151]	10,3984	144	1,4780	5,1371	0,4031	2,1392	0,0724	0,3344	0,5115	0,3018
[6288] L-threonine 1 [10.224]	12,4145	147	0,000	0,1935	0,000	0,000	0,1445	0,000	0,000	0,000
[6288] L-threonine 2 [11.464]	14,957	218	3,8716	6,7712	0,6873	1,9318	0,1835	1,5925	1,2136	0,5587
[6305] L-tryptophan 2 [20.466]	32,2513	202	0,1081	1,5474	0,000	0,1643	0,000	0,000	0,1457	0,000
[65080] phenyl-beta-glucopyranoside [21.186]	36,90195	361	0,000	0,08408	0,000	0,000	0,000	28,7471	0,000	0,000
[65098] norvaline 1 [7.582]	7,1448	72	0,0914	0,3113	0,0148	0,0365	0,0094	0,000	0,000	0,000
[65098] norvaline 2 [9.468]	10,36365	144	0,000	0,000	0,0154	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

[6537496] chlorogenic acid 1 [26.37]	44,26435	345	0,000	1,0368	2,9300	1,8472	0,000	0,000	2,0207	0,000
[6537496] chlorogenic acid 2 [27.18]	45,7829	345	0,1137	52,5747	56,3502	87,5434	206,784	168,3253	85,8107	37,1097
[65550] D-lyxose 1 [14.741]	21,76975	217	0,000	0,3104	0,8340	0,4996	0,000	0,9300	1,2873	0,000
[656894] isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside [19.097]	27,82575	217	0,000	0,4477	0,8131	3,7110	0,6672	14,4817	3,4299	0,4746
[71] gluconic acid 1 [17.693]	26,486	333	42,447	0,000	2,4304	2,8308	8,1265	2,0853	4,2347	0,000
[736] gluconic acid lactone 1 [17.303]	25,6881	319	0,6029	0,1918	0,5981	1,1808	0,4316	0,2798	1,1608	0,8952
[738] L-glutamine 1 [13.431]	18,3427	155	1,2837	3,7337	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0765	0,0928
[738] L-glutamine 2 [14.083]	19,85045	344	0,000	25,509	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0303	0,1253
[738] L-glutamine 3 [16.092]	23,8331	156	13,474	50,506	0,1594	0,5510	0,000	0,2415	2,4309	15,2170
[7405] L-pyroglutamic acid [13.218]	17,77515	156	0,000	60,009	0,1935	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[7427] D-(+) trehalose [24.752]	41,0744	361	0,6665	0,0612	0,000	0,000	3,2409	2,2346	0,1183	0,000
[754] glycerol 1-phosphate [16.056]	23,87475	357	0,000	0,1274	0,0387	0,0385	0,0171	0,0406	0,0542	0,000
[791] DL-isoleucine 1 [8.576]	9,27725	86	0,4001	0,9384	0,0197	0,1358	0,0561	0,000	0,0096	0,0367
[791] DL-isoleucine 2 [10.225]	12,42565	158	0,000	2,0111	0,2546	0,5604	0,0160	0,000	1,2782	0,0000
[835] dehydroascorbic acid 1 [16.863]	24,8161	173	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[835] dehydroascorbic acid 2 [17.139]	25,4993	173	4,5464	2,2569	7,8891	4,5832	15,0658	9,9621	4,4382	2,8402
[835] dehydroascorbic acid 3 [17.49]	26,8586	205	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[835] dehydroascorbic acid 4 [17.739]	27,3638	244	0,000	0,0914	0,6702	0,0158	0,7342	0,4165	0,000	0,1362
[84571] lactose 1 [24.386]	39,5997	361	0,000	11,585	13,3021	4,3798	0,000	0,000	30,1113	0,000
[84571] lactose 2 [24.534]	38,3503	204	0,000	0,6194	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[867] malonic acid 1 [8.919]	10,0681	147	0,2188	0,1666	0,0530	0,1184	0,1531	0,1387	0,1537	0,000
[8742] shikimic acid [16.433]	24,7948	204	0,000	0,1162	0,1488	0,0132	1,1309	0,2567	0,000	0,000

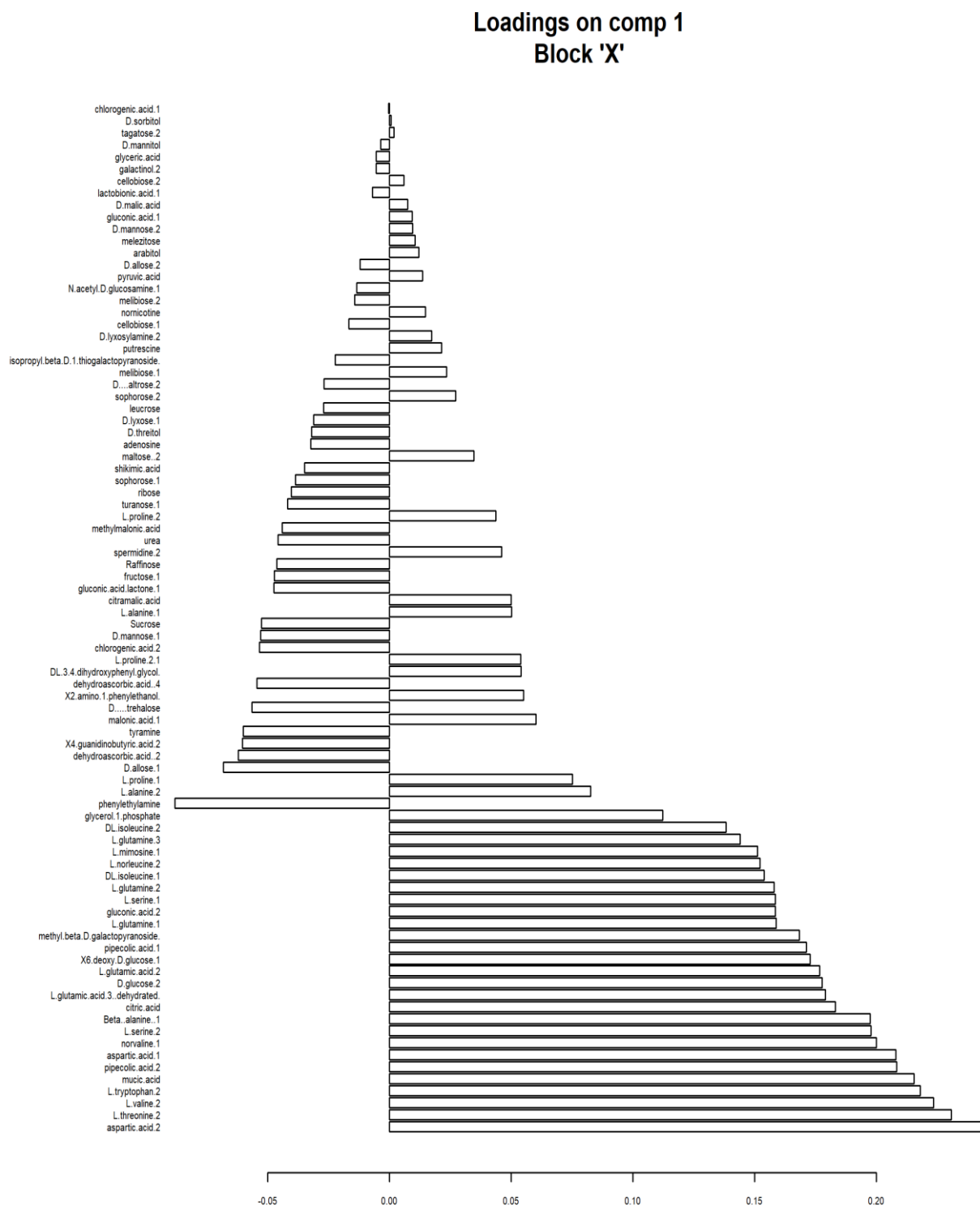
[91528] DL-3,4-dihydroxyphenyl glycol [17.208]	43,8742	355	0,0176	0,0203	0,0149	0,0175	0,0055	0,0172	0,0182	0,0087
[92817] D-(+)-melezitose [29.952]	39,6007	361	0,000	0,2959	0,000	0,000	0,000	34,3374	0,000	0,000
[92817] melezitose [29.884]	50,5449	361	99,3592	0,0117	0,0263	0,000	0,0085	0,000	0,0106	31,9551
[92824] D-malic acid [12.794]	17,4798	147	186,633	116,738	20,8640	231,2226	101,3692	270,6232	39,8021	164,4174
[94154] arabitol [15.601]	22,5239	217	12,9347	7,4449	8,1123	12,1993	5,4625	5,9269	13,0655	4,6568
[94214] methyl-beta-D-galactopyranoside [16.935]	28,4014	204	17,2263	25,692	1,6670	2,8967	6,1499	7,7089	3,5413	6,3485
[993] ribose [15.113]	21,4671	217	0,0786	0,0957	0,3522	0,3896	0,2518	0,5845	0,6238	0,0055
[994] Phenylalanine 1 [13.545]	18,4635	120	0,0483	0,2996	0,0039	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Πίνακας 2 p-values των μεταβολιτών που αναλύθηκαν σε επίπεδο γονοτύπου, μεταχείρισης και αλληλεπίδρασής τους (Κεφάλαιο 4).

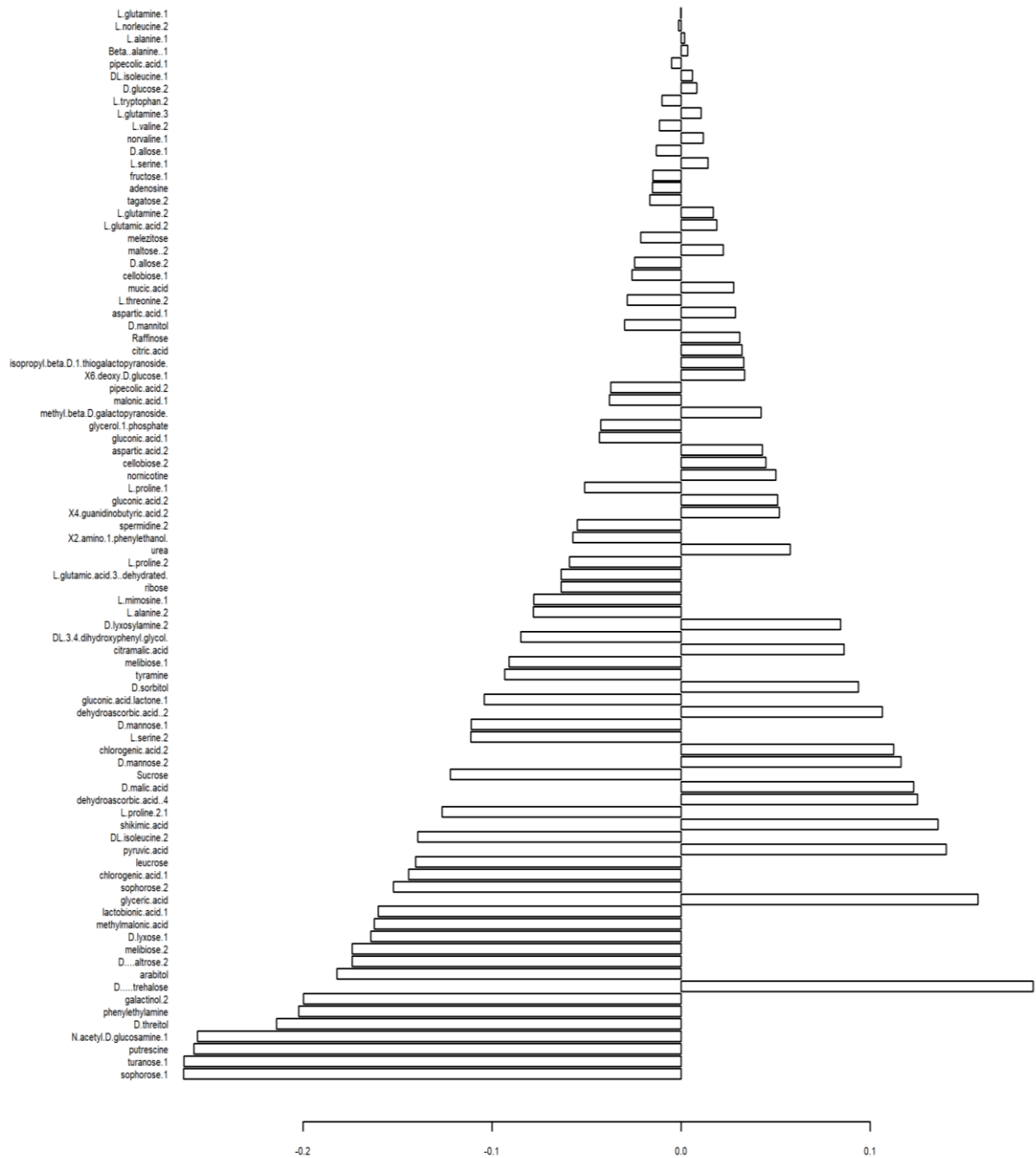
Μεταβολίτες	Γονότυπος	Μεταχείριση	Αλληλεπίδραση
2.amino.1.phenylethanol...15.668.	0,775565	0,775611	0,660197
phenylethylamine..13.766.	0,160656	0,1718997	0,660197
putrescine..15.709.	0,211105	0,1762067	0,220849
pyruvic.acid..6.714.	0,200859	0,775611	0,793603
cellobiose.1..24.444.	0,586714	0,6812711	0,727518
cellobiose.2..24.7.	0,331557	0,2936196	0,374882
spermidine.2..20.811.	0,783953	0,5489199	0,660197
urea..9.599.	0,247538	0,130644	0,660197
L.proline.1..8.567.	0,095414	0,6757811	0,426909
L.proline.2..10.321.	0,592008	0,775611	0,641796
D.lyxosylamine.2..14.861.	0,261868	0,8607677	0,660197
N.acetyl.D.glucosamine.1..19.196.	0,252668	0,1718997	0,301949
lactobionic.acid.1..24.583.	0,783953	0,503359	0,641796
leucrose..24.975.	0,336189	0,606198	0,757075
D.threitol..12.954.	0,540959	0,2508241	0,640055
D.mannose.1..17.287.	0,366058	0,8607677	0,660197
D.mannose.2..17.435.	0,786458	0,5585531	0,671234
L.norleucine.2..10.607.	0,101471	0,1718997	0,660197
Beta..alanine..1..12.044.	0,019931	0,4700992	0,577952
D.glucose.2..17.625.	0,017202	0,9335291	0,668331
tagatose.2..17.212.	0,541315	0,5585531	0,480078
mucic.acid..18.907.	0,004678	0,3509654	0,067238
citric.acid..16.615.	0,094671	0,4700992	0,393019
L.glutamic.acid.2..14.398.	0,094671	0,6212328	0,660197
L.glutamic.acid.3..dehydrated...13.232.	0,001845	0,7989237	0,984681
nornicotine..13.255.	0,623726	0,2878421	0,567712
glyceric.acid..10.735.	0,195385	0,775611	0,660197
pipecolic.acid.1..9.868.	0,005901	0,7283326	0,913269
pipecolic.acid.2..11.22.	0,000723	0,4344748	0,567712
Raffinose..29.282.	0,623726	0,6812711	0,793603
galactinol.2..26.479.	0,689396	0,7690297	0,25263
6.deoxy.D.glucose.1..15.598.	0,048796	0,6487788	0,067238
citramalic.acid..12.63.	0,322266	0,2508241	0,660197
L.mimosine.1..8.863.	0,130558	0,8994436	0,668331
melibiose.1..25.565.	0,322266	0,8607677	0,795881
melibiose.2..25.784.	0,587469	0,4581398	0,660197
D....altrose.2..17.46.	0,586714	0,6487788	0,660197
D.allose.1..17.278.	0,586714	0,775611	0,793603
D.allose.2..17.521.	0,095092	0,8607677	0,576469
sophorose.1..24.948.	0,094671	0,1718997	0,0927
sophorose.2..25.189.	0,708286	0,6812711	0,668331
methylmalonic.acid..9.088.	0,608035	0,6212328	0,641796
4.guanidinobutyric.acid.2..13.348.	0,399955	0,7690297	0,795881
turanose.1..24.81.	0,094671	0,3978551	0,078433
tyramine..17.562.	0,587469	0,775611	0,793603
D.sorbitol..17.898.	0,160656	0,9335291	0,641796
L.alanine.1..7.495.	0,269694	0,775611	0,984681
L.alanine.2..11.182.	0,066939	0,5585531	0,576469

L.serine.1..9.706.	0,037301	0,9335291	0,779947
L.serine.2..11.174.	0,005901	0,4700992	0,067238
aspartic.acid.1..12.002.	0,009802	0,4581398	0,07249
aspartic.acid.2..13.207.	5,92E-07	0,0217421	0,000576
fructose.1..17.18.	0,790492	0,8994436	0,660197
Sucrose..23.988.	0,160656	0,775611	0,660197
gluconic.acid.2..18.297.	0,159327	0,8343426	0,383587
adenosine..23.825.	0,541315	0,9335291	0,582569
L.proline.2..10.341.	0,284636	0,8607677	0,567712
D.mannitol..17.81.	0,790492	0,6487788	0,757075
maltose..2..24.915.	0,646098	0,6487788	0,789662
L.valine.2..9.151.	0,000723	0,1718997	0,112984
L.threonine.2..11.464.	0,00011	0,2508241	0,429849
L.tryptophan.2..20.466.	0,004121	0,3771293	0,067238
norvaline.1..7.582.	0,016036	0,6487788	0,576469
chlorogenic.acid.1..26.37.	0,211105	0,6487788	0,668331
chlorogenic.acid.2..27.18.	0,158952	0,8994436	0,838329
D.lyxose.1..14.741.	0,608035	0,775611	0,104529
isopropyl.beta.D.1.thiogalactopyranoside...19.097.	0,689396	0,6575327	0,668331
gluconic.acid.1..17.693.	0,540289	0,4344748	0,480078
gluconic.acid.lactone.1..17.303.	0,586714	0,9335291	0,838329
L.glutamine.1..13.431.	0,152335	0,775611	0,767564
L.glutamine.2..14.083.	0,223597	0,6487788	0,582569
L.glutamine.3..16.092.	0,195385	0,6487788	0,749215
D.....trehalose..24.752.	0,00543	0,6575327	0,892658
glycerol.1.phosphate..16.056.	0,676137	0,775611	0,567712
DL.isoleucine.1..8.576.	0,160656	0,775611	0,802269
DL.isoleucine.2..10.225.	0,195385	0,9192577	0,112984
dehydroascorbic.acid..2..17.139.	0,261868	0,6487788	0,984681
dehydroascorbic.acid..4..17.739.	0,290551	0,6487788	0,660197
malonic.acid.1..8.919.	0,399955	0,6487788	0,660197
shikimic.acid..16.433.	0,260066	0,6487788	0,660197
DL.3.4.dihydroxyphenyl.glycol....17.208.	0,79526	0,8607677	0,734364
melezitose..29.884.	0,474838	0,775611	0,374882
D.malic.acid..12.794.	0,587469	0,1718997	0,576469
arabitol..15.601.	0,608035	0,6487788	0,576469
methyl.beta.D.galactopyranoside....16.935.	0,032443	0,6757811	0,93359
ribose..15.113.	0,786458	0,8607677	0,660197

Εικόνα 1. Loading plots των μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στα καταπονημένα φυτά και στους μάρτυρες για τα συστατικά 1 και 2 (Κεφάλαιο 4). Η απόλυτη τιμή υποδηλώνει τη σημαντικότητα κάθε μεταβλητής για τον προσδιορισμό κάθε συστατικού.



Loadings on comp 2 Block 'X'



Παράρτημα IV

Πίνακας 1. Μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στα φύλλα των μαρτύρων και των καταπονημένων φυτών των *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών και των φυτών wt υπό συνθήκες καταπόνησης υψηλής αλατότητας. RT: χρόνος έκλουσης, m/z: αναλογία μάζας προς φορτίο. Τα δεδομένα αφορούν τους μέσους όρους τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων ανά επίπεδο μεταχείρισης (Κεφάλαιο 5).

Μεταβολίτες	RT	m/z	wt_c	wt_100	wt_200	#1_c	#1_100	#1_200	#7_c	#7_100	#7_200	#9_c	#9_100	#9_200
[1000]_2-amino-1-phenylethanol_[15.668]	11,66445	174	4,5090	4,0306	2,1829	4,6251	3,6812	4,9016	4,1476	3,3441	3,8984	4,3901	2,5914	3,2074
[1001]_phenylethylamine_[13.766]	18,9286	174	0,8927	0,3736	0,0966	1,71616	0,4511	0,3943	0,4728	0,1427	0,0900	3,6784	0,5879	0,3729
[1015]_O-phosphocolamine_[16.232]	24,1361	299	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0865	0,0583	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[1045]_putrescine_[15.709]	22,9455	174	3,3806	0,1234	0,0993	1,1869	0,3060	0,2557	1,1756	0,0446	0,0213	3,0966	0,2920	0,0197
[1060]_pyruvic_acid_[6.714]	6,3859	174	0,000	0,0100	0,0157	0,0203	0,0244	0,0184	0,0124	0,0073	0,0046	0,000	0,000	0,000
[10712]_cellobiose_1_[24.444]	41,5241	361	0,000	0,0274	7,0053	6,9543	0,0730	0,0515	0,000	0,1104	0,1268	0,3099	0,2064	0,0886
[10712]_cellobiose_2_[24.7]	38,3499	204	0,6839	1,7197	1,7811	1,7153	1,0515	1,3748	2,5889	1,6866	1,8369	2,4469	1,1967	0,8934
[1102]_spermidine_1_[20.327]	31,7774	200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[1102]_spermidine_2_[20.811]	32,88545	174	0,3846	0,3363	0,000	0,13089	0,0747	0,000	0,4907	0,1917	0,2746	0,4290	0,1262	0,0610
[1176]_urea_[9.599]	10,7916	147	0,3268	2,8056	6,2968	1,0959	10,8627	6,8592	3,7247	23,7751	15,6838	1,9136	3,6826	15,5689
[145742]_L-proline_1_[8.567]	9,2134	70	19,1914	15,7332	5,8672	0,6568	1,4341	3,8731	0,4388	5,3922	2,6758	0,000	0,000	0,000
[145742]_L-proline_2_[10.321]	12,46795	142	64,1149	54,4982	46,295	20,9736	87,7132	65,5916	35,4734	30,1497	75,9159	38,3706	10,8021	16,4094
[156807]_D-lyxosylamine_1_[14.737]	21,8345	103	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0231	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[156807]_D-lyxosylamine_2_[14.861]	21,82925	217	0,2286	0,1230	0,000	0,6920	0,000	0,000	0,0225	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[16218892]_N-acetyl-D-glucosamine_1_[19.196]	29,3505	319	44,6441	0,000	0,000	5,4636	0,000	0,000	0,0314	0,000	0,000	56,6521	0,000	0,000
[16219560]_lactobionic_acid_1_[24.583]	34,5859	217	1,5796	0,2182	0,0898	2,9378	0,5658	0,4673	0,3911	0,0834	0,0395	3,2641	0,000	0,000
[16219560]_lactobionic_acid_2_[24.893]	43,7684	204	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,1414	0,000
[165577]_leucrose_[24.975]	41,0492	361	0,02560	0,0241	0,0265	4,1367	0,0972	0,0517	0,000	0,1896	0,0584	3,0163	0,000	0,000
[169019]_D-threitol_[12.954]	18,1389	217	15,9397	5,9991	4,3748	8,4917	2,9978	3,8414	3,7198	5,2924	4,3158	15,0698	5,2997	5,0871
[18950]_D-mannose_1_[17.287]	25,777	319	118,837	2,7642	3,3036	18,504	1,1147	0,5658	0,0000	1,4443	1,2714	318,218	0,000	2,9709

[18950]_D-mannose_2_[17.435]	27,1463	205	50,1173	13,021	4,9811	95,4433	2,0730	1,6658	64,4829	2,1484	1,7509	23,6062	0,000	0,3903
[204]_allantoin_1_[17.293]	26,31445	331	0,000	0,000	0,000	0,000	13,1819	1,9777	0,4749	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[204]_allantoin_2_[17.356]	26,3545	518	0,000	0,0727	0,000	0,000	0,000	0,2225	0,0262	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[204]_allantoin_3_[19.167]	29,7765	259	0,000	0,000	0,000	0,000	0,6883	0,2811	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[206]_D_(+)_galactose_1_[17.409]	30,8246	319	0,000	0,0287	0,5885	0,000	0,000	0,000	0,000	1,5113	0,7134	0,1360	17,5628	10,6942
[21236]_L-norleucine_1_[8.945]	8,7693	86	0,21245	0,0882	0,0258	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[21236]_L-norleucine_2_[10.607]	11,857	158	0,3532	0,2733	0,1581	0,0725	0,0514	0,000	0,7413	0,2497	0,5148	0,1034	0,000	0,000
[236]_L-asparagine_1_[14.496]	20,8524	188	0,000	0,3684	0,000	0,000	60,0827	26,3317	2,0036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[236]_L-asparagine_2_[14.984]	21,6857	231	0,000	0,2246	0,000	0,000	253,610	102,556	0,1602	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[239]_Beta-_alanine__1_[12.044]	15,7764	248	0,1687	0,2703	0,1739	0,0223	0,0653	0,0370	0,0921	0,1051	0,0771	0,0368	0,0305	0,0231
[24749]_D-glucose_1_[17.426]	26,9746	319	0,000	0,000	0,000	1,4485	0,5007	0,000	0,000	0,000	0,000	3,6931	0,000	0,000
[24749]_D-glucose_2_[17.625]	27,1328	205	28,0981	0,000	0,5084	0,000	1,8775	1,0035	21,5447	0,000	1,3807	4,7387	0,000	0,4982
[2724552]_tagatose_1_[17.011]	26,2878	217	10,8846	0,000	1,0067	5,2122	0,000	3,2227	0,000	0,000	0,2567	1,2980	0,000	0,000
[2724552]_tagatose_2_[17.212]	26,5986	217	157,916	0,000	0,000	8,0882	0,0350	0,0489	41,9066	1,9448	0,000	17,8277	0,000	6,7509
[3034828]_palatinol_1_[25.922]	38,3166	361	0,000	0,000	0,000	0,000	0,2172	0,0447	0,0534	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[3037582]_mucic_acid_[18.907]	29,5907	333	0,000	0,0475	0,000	0,0192	0,2351	0,0521	0,0536	0,0596	0,0342	0,000	0,0475	0,0143
[311]_citric_acid_[16.615]	25,0089	347	0,3059	1,8854	3,1177	0,0752	6,1611	7,6016	0,5844	2,0264	1,1068	0,2879	0,5891	6,3613
[33032]_L-glutamic_acid_1_[13.338]	18,2619	174	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0409	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[33032]_L-glutamic_acid_2_[14.398]	20,5089	246	9,76827	5,8698	3,5962	0,8387	3,9302	2,3514	5,3975	2,6170	1,7086	2,3881	0,6988	0,8459
[33032]_L-glutamic_acid_3_(dehydrated)_[13.232]	18,0601	156	16,0712	9,5807	3,0969	1,6544	1,9473	2,7902	4,3872	2,0449	2,6989	4,3584	0,6770	0,9278
[412]_nornicotine_[13.255]	17,899	142	3,93710	1,7709	1,1502	1,0001	0,8540	0,1134	6,6124	1,3657	0,3490	1,7346	0,0521	0,000
[439193]_isomaltose_2_[25.863]	42,94125	361	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0032	0,1344	0,000	0,000
[439194]_glyceric_acid_[10.735]	13,51705	189	2,1636	7,9683	4,7478	1,4285	0,8298	4,4470	7,6287	16,1192	8,2095	2,6255	1,8280	3,9890
[439227]_pipecolic_acid_1_[9.868]	11,4644	84	0,1511	0,0229	0,0677	0,0411	0,0300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[439227]_pipecolic_acid_2_[11.22]	14,113	156	0,0669	0,0147	0,0317	0,0045	0,0387	0,0291	0,0377	0,0161	0,0345	0,0185	0,000	0,0050
[439232]_N-acetyl-ornithine__2_[18.409]	27,86085	174	0,000	0,000	0,000	0,000	0,2084	0,1702	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[439242]_Raffinose_[29.282]	50,11735	87	0,000	0,0043	0,1048	0,3983	0,0165	1,6037	0,1051	0,0380	0,0605	0,4321	0,0957	0,1078
[439451]_galactinol_2_[26.479]	43,9033	204	1,2819	1,2719	1,5061	1,7694	1,1839	1,5792	1,4601	2,5745	2,0558	3,1121	0,8678	0,000

[439742]_beta-cyano-L-alanine_ [11.288]	14,435	141	0,000	0,000	0,000	0,0058	0,5245	0,2289	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[439746]_6-deoxy-D-glucose_1_ [15.598]	22,9882	117	0,000	0,000	0,000	0,2688	0,000	0,000	0,000	0,0588	0,000	0,000	0,000	0,000
[439746]_6-deoxy-D-glucose_2_ [15.751]	22,8373	117	0,000	0,000	0,000	0,0948	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[439766]_citramalic_acid_[12.63]	17,0349	147	0,15247	0,2488	0,1323	0,0712	0,1320	0,2394	0,1977	0,1994	0,1091	0,000	0,0603	0,1116
[439958]_D-glucose-6- phosphate_1_[21.394]	34,55255	387	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0227	0,0080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0037	0,000
[439958]_D-glucose-6- phosphate_2_[21.558]	34,5549	387	0,000	0,000	0,000	0,0195	0,0083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[440473]_L-mimosine_1_[8.863]	9,79985	188	0,06941	0,0240	0,0233	0,0235	0,0441	0,0092	0,0264	0,0174	0,0112	0,0436	0,0119	0,0059
[440658]_melibiose_1_[25.565]	42,4814	361	0,000	0,000	0,000	0,2254	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,1165	0,000	0,000
[440658]_melibiose_2_[25.784]	41,5285	361	0,000	0,000	0,000	0,1535	0,000	0,000	0,000	0,0656	0,000	0,1971	0,000	0,000
[441032]_D_(+)_altrose_1_[17.397]	31,3607	319	0,000	0,3265	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0746	0,2493	0,3307	0,4704	6,1290	4,4585
[441032]_D_(+)_altrose_2_[17.46]	31,3566	205	1,46716	0,0902	0,1495	1,0324	0,5459	0,5949	0,2751	0,000	0,000	20,9172	0,3587	0,000
[448388]_D-allose_1_[17.278]	30,8491	319	24,5766	8,0211	10,077	41,073	10,5880	7,7261	35,8238	8,4507	7,1642	45,8449	12,3398	5,7636
[448388]_D-allose_2_[17.521]	31,2329	319	0,37476	0,0196	0,000	0,3134	0,0046	0,000	0,1796	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[4623424]_sophorose_1_[24.948]	41,71685	319	0,3327	0,000	0,000	0,0214	0,000	0,000	0,0136	0,000	0,000	0,7746	0,000	0,000
[4623424]_sophorose_2_[25.189]	41,7123	319	0,0497	0,000	0,000	0,1543	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,3187	0,000	0,000
[487]_methylmalonic_acid_[9.088]	10,07845	147	0,0622	0,000	0,0041	0,0769	0,0094	0,000	0,0194	0,0185	0,0077	0,1744	0,0037	0,0380
[500]_4- guanidinobutyric_acid_2_[13.348]	18,3262	174	3,9694	2,8812	2,6015	2,0347	1,6939	2,8970	5,3973	4,9081	5,7602	2,9681	2,3370	2,8823
[5460935]_turanose_1_[24.81]	40,6078	307	0,000	0,000	0,000	0,0245	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,3826	0,000	0,000
[5460935]_turanose_2_[25.018]	41,6982	361	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0215	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[5610]_tyramine_[17.562]	26,5016	174	2,0402	0,7995	0,3175	1,8521	0,4944	0,0920	1,0304	0,000	0,1237	1,8503	0,5209	0,000
[5780]_D-sorbitol_[17.898]	27,3962	319	33,2899	1,1214	0,0969	0,4181	0,0948	6,0113	10,8871	17,4747	7,5380	4,7165	44,3208	33,2326
[5810]_trans-4-hydroxy-L-proline_2_ [13.267]	18,3537	230	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[5950]_L-alanine_1_[7.495]	7,5327	116	1,6093	1,2455	0,2568	1,6293	0,3753	0,3416	0,4106	0,000	0,1136	0,000	0,000	0,1215
[5950]_L-alanine_2_[11.182]	14,038	147	0,2565	0,2139	0,7006	0,4578	0,0554	0,1442	0,1700	0,0484	0,1132	0,1005	0,000	0,000
[5951]_L-serine_1_[9.706]	11,4327	132	1,3388	2,5469	1,3292	0,1567	0,1504	0,1871	0,0828	0,3168	0,1643	0,1249	0,0903	0,4724

[5951]_L-serine_2_[11.174]	14,2646	204	2,9959	1,8675	3,8629	1,4032	3,1354	2,7476	2,9732	2,2330	3,4341	3,2696	0,3910	0,4468
[5960]_aspartic_acid_1_[12.002]	15,653	160	0,000	0,1022	0,0127	0,0219	0,0582	0,0081	0,0027	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[5960]_aspartic_acid_2_[13.207]	18,22555	232	0,6620	0,8258	0,3521	0,0825	0,9188	0,6278	0,4951	0,1675	0,000	0,1189	0,000	0,000
[5962]_L-lysine_2_[17.643]	26,8498	317	0,000	0,8629	0,000	0,000	0,4661	0,2083	0,8924	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[5984]_fructose_1_[17.18]	26,3157	307	1469,83	174,825	91,095	1345,35	56,7010	30,5055	495,981	38,9845	29,3072	672,002	188,729	64,3821
[5988]_Sucrose_[23.988]	39,5745	361	469,348	277,537	239,21	183,969	186,028	379,007	186,018	367,548	255,824	455,094	1076,25	680,198
[604]_gluconic_acid_2_[18.297]	29,0558	333	0,39326	0,3223	0,2560	0,6579	0,6494	0,1632	0,2118	0,0961	0,1943	0,4354	0,1974	0,0775
[6057]_L-tyrosine_2_[17.856]	27,1937	218	0,000	0,1861	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[6057]_tyrosine_2_[17.871]	27,1741	218	0,000	0,1184	0,0109	0,000	0,000	0,000	0,2889	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[60961]_adenosine_[23.825]	39,0032	236	0,000	0,0082	0,000	0,0150	0,0095	0,000	0,0647	0,000	0,000	0,0742	0,000	0,000
[6106]_L-leucine_1_[8.298]	8,7546	86	0,000	0,0047	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[6106]_L-leucine_2_[9.945]	11,8648	158	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0068	0,7064	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[6137]_L-methionine_2_[13.188]	18,03025	176	0,000	0,000	0,000	0,000	0,1447	0,0652	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[614]_L-proline_1_[8.58]	9,1621	70	0,000	0,000	0,000	0,4775	0,000	0,000	0,2040	1,7233	0,000	0,000	0,000	0,000
[614]_L-proline_2_[10.341]	12,4345	142	56,5489	15,8569	29,942	0,2037	66,6748	42,4648	52,8907	7,7272	109,226	21,4632	0,000	0,000
[6251]_D-mannitol_[17.81]	26,7855	319	632,309	98,6905	68,178	841,313	38,1435	6,4256	242,131	12,6009	11,5627	301,808	0,5741	2,5379
[6255]_maltose_2_[24.915]	41,526	361	1,34013	0,0829	0,000	0,7257	0,0267	0,0607	2,2800	0,6483	0,6990	0,3509	0,000	0,3044
[6255]_maltose_1_[24.702]	40,89775	361	0,0552	0,1081	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0527	0,000	0,000	0,000	0,0627	0,000
[6262]_L-ornithine_1_[14.349]	20,36845	142	0,000	0,000	0,000	0,000	0,5982	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[6262]_L-ornithine_2_[16.632]	24,78405	174	0,000	0,000	0,000	0,000	0,4631	0,2843	0,0946	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[6287]_L-valine_2_[9.151]	10,3984	144	1,47801	1,2587	0,9762	0,4031	0,7022	0,2697	1,2765	0,2846	0,5586	0,5115	0,0606	0,0516
[6288]_L-threonine_1_[10.224]	12,4145	147	0,000	0,1949	0,000	0,000	0,0302	0,0102	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0235	0,000
[6288]_L-threonine_2_[11.464]	14,957	218	3,8716	1,5997	1,2652	0,6873	1,2971	0,8656	2,6476	1,2112	1,4433	1,2136	0,1501	0,1633
[6305]_L-tryptophan_2_[20.466]	32,2513	202	0,1081	0,000	0,000	0,000	0,1155	0,0250	0,000	0,000	0,000	0,1457	0,000	0,000
[65080]_phenyl-beta-glucopyranoside_[21.186]	36,90195	361	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	23,3862	17,5921	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[65098]_norvaline_1_[7.582]	7,1448	72	0,0914	0,1293	0,0295	0,0148	0,0255	0,0173	0,0243	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[65098]_norvaline_2_[9.468]	10,36365	144	0,000	0,000	0,000	0,0153	0,000	0,1482	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[6537496]_chlorogenic_acid_1 [26.37]	44,26435	345	0,000	0,0501	0,1438	2,9299	0,3255	1,1441	0,000	0,4138	0,6730	2,0207	0,000	0,000
[6537496]_chlorogenic_acid_2_[27.18]	45,7829	345	0,1136	0,9257	5,0281	56,3502	4,2419	24,0615	18,1792	6,1603	8,8030	85,8107	15,0018	25,1120

[65550]_D-lyxose_1_[14.741]	21,76975	217	0,000	0,000	0,0699	0,8340	0,0458	0,000	0,7381	0,000	0,000	1,2873	0,000	0,000
[656894]_isopropyl_beta-D-1-thiogalactopyranoside_[19.097]	27,82575	217	0,000	15,8087	0,000	0,8131	0,000	0,000	0,1205	0,000	0,000	3,4299	0,000	0,000
[71]_gluconic_acid_1_[17.693]	26,486	333	42,4470	0,000	0,000	2,4303	0,000	0,000	3,2750	0,000	1,0589	4,2347	3,0108	0,000
[736]_gluconic_acid_lactone_1_[17.303]	25,6881	319	0,6029	0,000	0,000	0,5981	0,000	0,2848	0,1004	0,000	0,0227	1,1608	0,000	0,0394
[738]_L-glutamine_1_[13.431]	18,3427	155	1,28369	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,1640	0,000	0,000	0,0765	0,000	0,000
[738]_L-glutamine_2_[14.083]	19,85045	344	0,000	0,2998	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0557	0,000	0,000	0,0303	0,000	0,000
[738]_L-glutamine_3_[16.092]	23,8331	156	13,4739	1,4078	0,0479	0,1593	0,3551	0,0978	2,4683	0,000	0,000	2,4309	0,000	0,000
[7405]_L-pyroglutamic_acid_[13.218]	17,77515	156	0,000	0,000	0,0583	0,1935	0,2477	0,1568	0,000	0,000	0,2780	0	0,000	0,000
[7427]_D-(+)_trehalose_[24.752]	41,0744	361	0,6665	25,7193	26,246	0,000	0,0257	49,9765	35,9012	38,2510	0,000	0,1183	0,0631	0,000
[754]_glycerol_1-phosphate_[16.056]	23,87475	357	0,000	0,000	0,0109	0,0387	0,000	0,0086	0,0043	0,000	0,000	0,0542	0,000	0,0295
[791]_DL-isoleucine_1_[8.576]	9,27725	86	0,40005	0,2846	0,1385	0,0196	0,0369	0,0175	0,0213	0,1174	0,0129	0,0096	0,0297	0,0238
[791]_DL-isoleucine_2_[10.225]	12,42565	158	0,000	0,000	0,3787	0,2546	0,2406	0,0312	1,4495	0,000	0,2746	1,2782	0,000	0,000
[835]_dehydroascorbic_acid_1_[16.863]	24,8161	173	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[835]_dehydroascorbic_acid_2_[17.139]	25,4993	173	4,54643	1,8706	1,3684	7,8891	1,5627	2,6351	6,2381	2,7586	1,8738	4,4382	1,2601	1,2341
[835]_dehydroascorbic_acid_3_[17.49]	26,8586	205	0,000	0,000	0,0159	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[835]_dehydroascorbic_acid_4_[17.739]	27,3638	244	0,000	0,0603	0,0388	0,6702	0,000	0,000	0,3381	0,0413	0,000	0,000	0,000	0,000
[84571]_lactose_1_[24.386]	39,5997	361	0,000	0,000	11,140	13,302	40,4958	29,4103	0,000	56,9235	64,5860	30,1113	0,000	0,000
[84571]_lactose_2_[24.534]	38,3503	204	0,000	0,000	0,000	0,000	0,1765	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,1616	0,2473
[867]_malonic_acid_1_[8.919]	10,0681	147	0,2188	0,1629	0,0626	0,0529	0,2051	0,0651	0,0331	0,000	0,000	0,1537	0,000	0,000
[8742]_shikimic_acid_[16.433]	24,7948	204	0,000	0,000	0,000	0,1488	0,000	0,000	0,3000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
[91476]_lactitol_[24.877]	43,9062	361	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,7008	0,9873
[91528]_DL-3,4-dihydroxyphenyl_glycol_[17.208]	43,8742	355	0,01767	0,0286	0,0169	0,0149	0,000	0,000	0,0065	0,000	0,0085	0,0182	0,0039	0,0034
[92817]_D-(+)-melezitose_[29.952]	39,6007	361	0,000	13,6310	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	67,7241	59,4372
[92817]_melezitose_[29.884]	50,5449	361	0,000	0,000	0,0528	0,0263	0,000	25,1172	0,000	0,000	0,000	0,0106	47,7131	35,0923
[92824]_D-malic_acid_[12.794]	17,4798	147	186,633	173,812	81,627	20,864	28,7337	232,332	85,4823	271,898	30,5550	39,8021	56,1095	381,949
[94154]_arabitol_[15.601]	22,5239	217	12,9347	5,5240	6,8275	8,1123	3,1609	4,4903	4,2701	3,9023	3,9868	13,0655	5,7588	4,7213

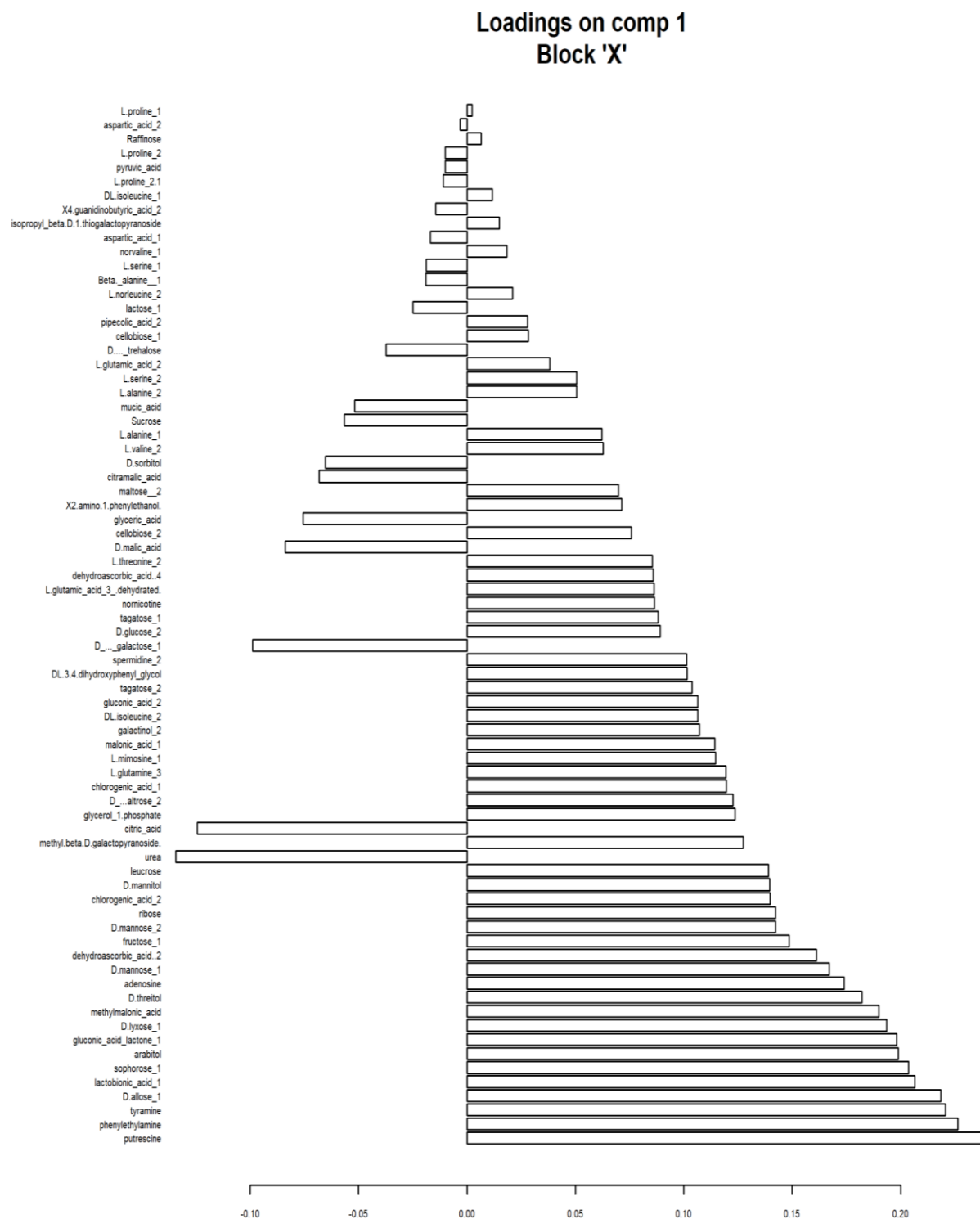
[94214]_methyl-beta-D-galactopyranoside _[16.935]	28,4014	204	17,2263	1,4896	0,0748	1,667	1,2411	0,3497	1,2288	0,3585	0,6659	3,5413	0,6636	0,000
[993]_ribose_[15.113]	21,4671	217	0,07866	0,2048	0,000	0,3522	0,0550	0,0025	0,1997	0,000	0,000	0,6238	0,000	0,000
[994]_Phenylalanine_1_[13.545]	18,4635	120	0,04833	0,11684	0,0107	0,0039	0,0076	0,000	0,0028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Πίνακας 2. p-values των μεταβολιτών που αναλύθηκαν σε επίπεδο γονοτύπου, μεταχείρισης και αλληλεπίδρασής τους (Κεφάλαιο 5).

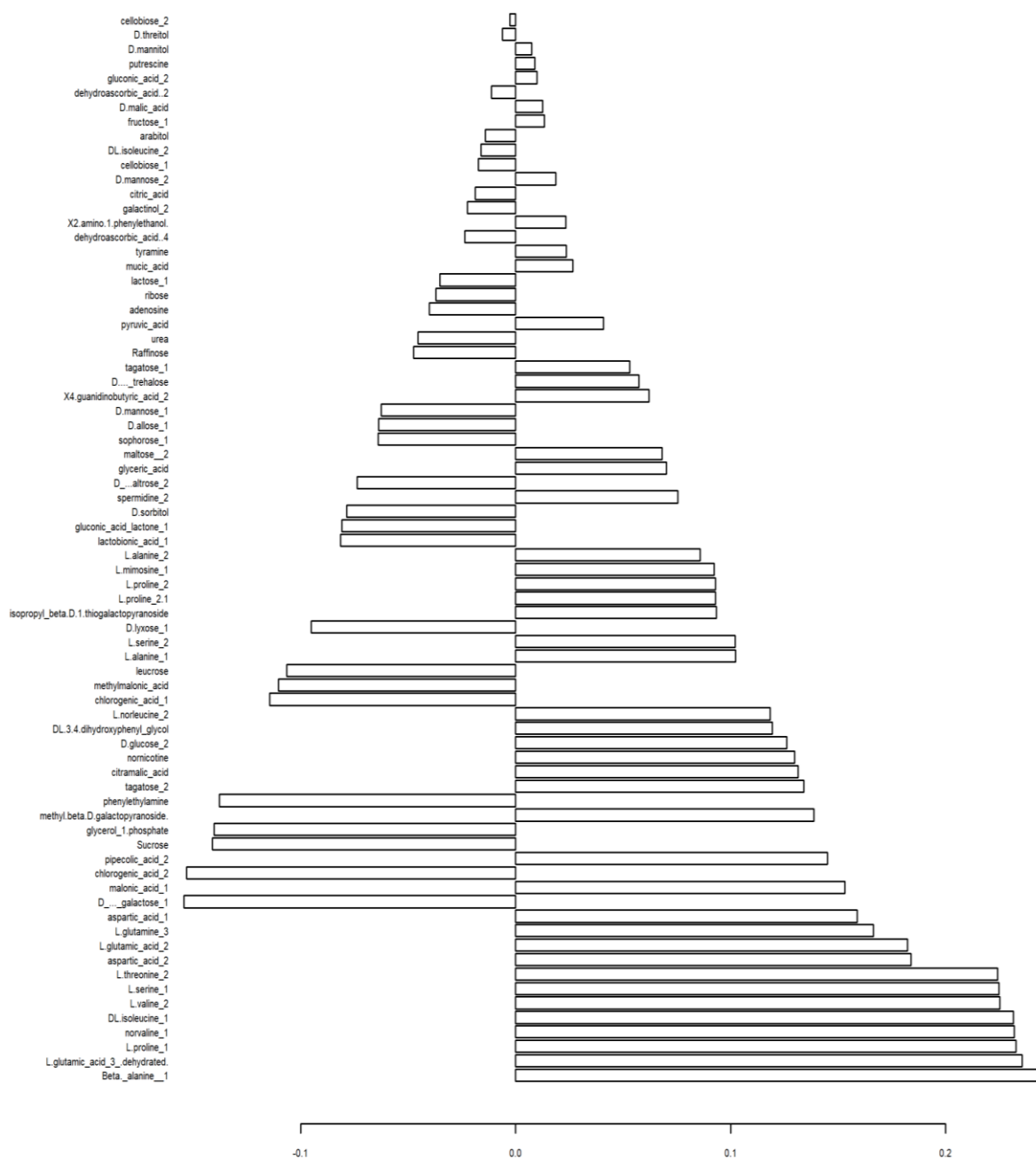
Μεταβολίτες	Γονότυπος	Μεταχείριση	Αλληλεπίδραση
2.amino.1.phenylethanol_.15.668.	0,594453	0,509780908	0,871661465
phenylethylamine_.13.766.	0,006432	5,67842E-05	0,110660953
putrescine_.15.709.	0,274102	4,28617E-06	0,215452813
pyruvic_acid_.6.714.	0,149441	0,991050653	0,947059201
cellobiose_1_.24.444.	0,597422	0,62633494	0,749448602
cellobiose_2_.24.7.	0,523646	0,349150229	0,70965541
spermidine_2_.20.811.	0,35256	0,091073353	0,871661465
urea_.9.599.	0,09658	0,024548027	0,599996078
L.proline_1_.8.567.	0,014005	0,62633494	0,723085312
L.proline_2_.10.321.	0,507433	0,814237024	0,78926435
lactobionic_acid_1_.24.583.	0,207658	0,001412391	0,607698491
leucrose_.24.975.	0,407536	0,079707082	0,697648957
D.threitol_.12.954.	0,262537	0,010034402	0,435501402
D.mannose_1_.17.287.	0,241744	0,047019722	0,334378836
D.mannose_2_.17.435.	0,478546	0,002326269	0,78926435
D_..._galactose_1_.17.409.	0,002283	0,067984237	0,215452813
L.norleucine_2_.10.607.	0,068825	0,516519944	0,947059201
Beta_.alanine_1_.12.044.	0,002283	0,516519944	0,947059201
D.glucose_2_.17.625.	0,500683	0,03866282	0,490965984
tagatose_1_.17.011.	0,426936	0,207874409	0,70965541
tagatose_2_.17.212.	0,500683	0,028299369	0,215452813
mucic_acid_.18.907.	0,426936	0,168882097	0,778133622
citric_acid_.16.615.	0,182026	0,005685763	0,40946609
L.glutamic_acid_2_.14.398.	0,274102	0,554258028	0,871661465
L.glutamic_acid_3_.dehydrated_.13.232.	0,021129	0,135542339	0,40946609
nornicotine_.13.255.	0,244071	0,028299369	0,70965541
glyceric_acid_.10.735.	0,01354	0,362870838	0,697648957
pipecolic_acid_2_.11.22.	0,324597	0,565095769	0,670701004
Raffinose_.29.282.	0,426936	0,572135929	0,79849805
galactinol_2_.26.479.	0,428619	0,294148073	0,158036876
citramalic_acid_.12.63.	0,342743	0,62633494	0,79849805
L.mimosine_1_.8.863.	0,694966	0,123554551	0,778133622
D_...altrose_2_.17.46.	0,428619	0,315074811	0,697648957
D.allose_1_.17.278.	0,500683	4,4753E-05	0,897301445
sophorose_1_.24.948.	0,021129	0,000933224	0,037839276
methylmalonic_acid_.9.088.	0,169139	0,005685763	0,49019385
4.guanidinobutyric_acid_2_.13.348.	0,021746	0,732262427	0,978656148
tyramine_.17.562.	0,435531	5,67842E-05	0,923636405
D.sorbitol_.17.898.	0,014005	0,509780908	0,117516362
L.alanine_1_.7.495.	0,274131	0,382827914	0,871661465
L.alanine_2_.11.182.	0,01354	0,095098109	0,334378836
L.serine_1_.9.706.	0,000881	0,554258028	0,754265977
L.serine_2_.11.174.	0,244071	0,408310389	0,40946609
aspartic_acid_1_.12.002.	0,032637	0,049737526	0,334378836

aspartic_acid_2_.13.207.	0,108569	0,554258028	0,607698491
fructose_1_.17.18.	0,760012	0,016733843	0,892541858
Sucrose_.23.988.	0,002283	0,201071948	0,40946609
gluconic_acid_2_.18.297.	0,255687	0,168597775	0,79849805
adenosine_.23.825.	0,263147	0,000846517	0,215452813
L.proline_2_.10.341.	0,207658	0,402340489	0,334378836
D.mannitol_.17.81.	0,594453	0,024548027	0,871661465
maltose__2_.24.915.	0,116163	0,04484464	0,847362941
L.valine_2_.9.151.	0,036138	0,238045424	0,847362941
L.threonine_2_.11.464.	0,030633	0,056600509	0,607698491
norvaline_1_.7.582.	0,014005	0,395976219	0,70965541
chlorogenic_acid_1_.26.37.	0,207658	0,168882097	0,628366318
chlorogenic_acid_2_.27.18.	0,182026	0,081974936	0,78926435
D.lyxose_1_.14.741.	0,407536	0,000933224	0,670701004
isopropyl_beta.D.1.thiogalactopyranoside_.19.097.	0,500683	0,565095769	0,763707774
gluconic_acid_lactone_1_.17.303.	0,263147	0,004276976	0,499588508
L.glutamine_3_.16.092.	0,244071	0,01773482	0,158036876
D....trehalose_.24.752.	0,624291	0,899042366	0,78926435
glycerol_1.phosphate_.16.056.	0,213577	0,092916462	0,763707774
DL.isoleucine_1_.8.576.	0,008886	0,43165811	0,778133622
DL.isoleucine_2_.10.225.	0,636218	0,091231377	0,756227627
dehydroascorbic_acid..2_.17.139.	0,274102	0,000933224	0,923636405
dehydroascorbic_acid..4_.17.739.	0,263637	0,04484464	0,40946609
lactose_1_.24.386.	0,274102	0,572135929	0,697648957
malonic_acid_1_.8.919.	0,021746	0,074333207	0,215452813
DL.3.4.dihydroxyphenyl_glycol.._.17.208.	0,040699	0,238045424	0,697901184
D.malic_acid_.12.794.	0,869688	0,319152934	0,215452813
arabitol_.15.601.	0,054404	0,001835942	0,490965984
methyl.beta.D.galactopyranoside.._.16.935.	0,264163	0,01773482	0,110660953
ribose_.15.113.	0,818604	0,089771962	0,847362941

Εικόνα 1. Loading plots των μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στα καταπονημένα φυτά και στους μάρτυρες για τα συστατικά 1 και 2 (Κεφάλαιο 5). Η απόλυτη τιμή υποδηλώνει τη σημαντικότητα κάθε μεταβλητής για τον προσδιορισμό κάθε συστατικού.



Loadings on comp 2 Block 'X'



Παράρτημα V

Πίνακας 1. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο ποσοστό επιβίωσης (%) των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό Επιβίωσης (%)
wt	45,00 b
#1	77,50 a
#2	65,00 ab
#5	82,50 a

Πίνακας 2. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στην επιφάνεια του ελάσματος των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	M.O. (Μ)
wt	27,23 a	21,69 a	24,46 a
#1	19,24 a	19,56 a	19,41 ab
#2	14,30 a	14,40 a	14,35 b
#5	23,49 a	21,79 a	22,64 a
M.O. (Σ)	-6,0	-4,3	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 3. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο νωπό και ξηρό βάρος των φύλλων των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Νωπό Βάρος Φύλλων (gr)			Ξηρό Βάρος Φύλλων (gr)		
	Μεταχείριση (Μ)			Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	M.O. (Μ)	Μάρτυρας	Ξηρασία	M.O. (Μ)
wt	0,331 a	0,253 a	0,292 a	0,03 a	0,03 a	0,03 a
#1	0,234 a	0,23 a	0,231 a	0,015 a	0,018 a	0,017 b
#2	0,148 a	0,194 a	0,177 b	0,014 a	0,022 a	0,018 b
#5	0,256 a	0,216 a	0,236 ab	0,022 a	0,022 a	0,022 ab
M.O. (Σ)	-0,076	-0,046		-0,0061	-0,008	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 4. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στη σχετική περιεκτικότητα νερού των φύλλων των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	
			M.O. (M)
wt	73,63 a	47,80 b	60,72 a
#1	77,44 a	59,29 ab	68,36 a
#2	78,01 a	55,21 ab	64,33 a
#5	74,52 a	66,49 a	70,50 a
M.O. (Σ)	-6,29	12,35	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 5. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο νωπό και ξηρό βάρος της ρίζας των *hpaA*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Νωπό Βάρος Ρίζας (gr)			Ξηρό Βάρος Ρίζας (gr)		
	Μεταχείριση (Μ)			Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	M.O. (M)	Μάρτυρας	Ξηρασία	M.O. (M)
wt	0,41 a	0,457 a	0,43 a	0,080 a	0,143 b	0,111 a
#1	0,38 a	0,57 a	0,489 a	0,087 a	0,212 a	0,158 a
#2	0,401 a	0,572 a	0,50 a	0,101 a	0,202 ab	0,159 a
#5	0,48 a	0,46 a	0,467 a	0,125 a	0,186 ab	0,160 a
M.O. (Σ)	-0,00058	-0,093		+0,054	-0,033	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 6. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στην περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD ($n=4$) στις *hpaA*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	
			M.O. (M)
wt	22,99 ab	26,84 ab	24,91 a
#1	19,69 ab	24,53 ab	22,11 a
#2	17,17 b	30,28 a	24,66 a
#5	23,83 a	21,21 b	22,28 a
M.O. (Σ)	-3,46	1,13	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 7. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο ρυθμό απώλειας νερού λόγω διαπνοής στις *hpaA*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Χρόνος (min) (Μ)							
	0	30	60	90	120	150	180	
	Μ.Ο. (Μ)							
wt	0	1,73 a	2,67 a	3,98 a	4,73 a	5,85 a	6,50 a	3,64 a
#1	0	1,64 a	2,76 a	3,90 a	4,70 a	5,70 a	6,38 a	3,58 a
#2	0	2,107 a	3,03 a	4,41 a	4,99 a	6,02 a	6,71 a	3,897 a
#5	0	1,60 a	2,60 a	3,69 a	4,61 a	5,54 a	6,21 a	3,46 a
Μ.Ο. (Σ)	0,00 g	1,77 f	2,77 e	3,99 d	4,76 c	5,78 b	6,45 a	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 8. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στην περιεκτικότητα των φύλλων σε προλίνη στις *hpaA*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Μεταχείριση (Μ)		Μ.Ο. (Μ)
	Μάρτυρας	Ξηρασία	
wt	183,13 a	380,82 a	282,98 a
#1	199,96 a	343,26 ab	271,61 a
#2	136,84 a	362,66 ab	249,75 a
#5	224,63 a	334,53 ab	279,58 a
Μ.Ο. (Σ)	186,14 b	355,31 a	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 9. Επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στην περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD ($n=4$) στις *hpaA*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Συγκέντρωση NaCl (mM) (Μ)			Μ.Ο. (Μ)
	0	100	200	
wt	28,86 a	25,02 ab	24,66 a	26,18 a
#1	24,36 ab	21,84 b	21,70 a	22,70 b
#2	21,60 b	27,25 a	21,88 a	23,58 ab
#5	22,72 ab	25,46 a	22,28 a	23,49 ab
Μ.Ο. (Σ)	24,53 a	24,77 a	22,72 a	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 10. Επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στην περιεκτικότητα των φυλλικών δίσκων σε ολική χλωροφύλλη ($n=3$) στις *hpaA*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Συγκέντρωση NaCl (mM) (M)			
	0	100	200	M.O. (M)
wt	2,00 a	1,39 a	1,11 a	1,50 a
#1	1,52 ab	1,17 ab	0,85 ab	1,18 ab
#2	1,30 a	1,20 ab	0,89 ab	1,13 ab
#5	1,48 ab	1,30 a	0,86 ab	1,21 ab
M.O. (Σ)	1,57 a	1,26 b	0,92 c	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Παράρτημα VI

Πίνακας 1. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο ποσοστό επιβίωσης (%) των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Ποσοστό Επιβίωσης (%)
wt	37,50 a
#2	26,67 a
#4	52,50 a

Πίνακας 2. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στην επιφάνεια του ελάσματος των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	
			M.O. (Μ)
wt	25,77 a	18,53 a	22,16 a
#2	27,48 a	19,05 a	23,27 a
#4	22,81 a	22,28 a	22,54 a
M.O. (Σ)	+ 0,54	- 4,86	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 3. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο μήκος της ρίζας των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	
			M.O. (Μ)
wt	7,67 b	11,0 a	9,57 a
#2	11,67 a	11,0 a	11,33 a
#4	12,13 a	10,38 a	11,25 a
M.O. (Σ)	-2,019	-2,09	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 4. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο νωπό και ξηρό βάρος των φύλλων των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Νωπό Βάρος Φύλλων (gr)			Ξηρό Βάρος Φύλλων (gr)		
	Μεταχείριση (Μ)			Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	M.O. (Μ)	Μάρτυρας	Ξηρασία	M.O. (Μ)
wt	0,30 a	0,265 a	0,282 a	0,22 a	0,29 a	0,026 a
#2	0,29 a	0,175 a	0,232 a	0,21 a	0,167 a	0,019 a
#4	0,233 a	0,279 a	0,256 a	0,18 a	0,035 a	0,026 a
M.O. (Σ)	-0,094	-0,059		-0,00564	-0,0118	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 5. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στη σχετική περιεκτικότητα νερού των φύλλων των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	
			M.O. (Μ)
wt	82,69 a	59,15 ab	70,93 a
#2	75,71 b	55,55 b	65,63 a
#4	74,45 b	60,15 a	67,30 a
M.O. (Σ)	-3,69	15,63	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 6. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στην περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD ($n=4$) στις *hpaB*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	
			M.O. (Μ)
wt	22,65 a	26,46 a	24,56 a
#2	22,16 a	28,07 a	24,69 a
#4	21,91 a	31,54 a	26,73 a
M.O. (Σ)	-3,57	+2,86	

Πίνακας 7. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο νωπό και ξηρό βάρος της ρίζας των *hpaB*-σειρών και των φυτών wt.

Σειρά (Σ)	Νωπό Βάρος Ρίζας (gr)			Ξηρό Βάρος Ρίζας (gr)		
	Μεταχείριση (Μ)			Μεταχείριση (Μ)		
	Μάρτυρας	Ξηρασία	M.O. (Μ)	Μάρτυρας	Ξηρασία	M.O. (Μ)
wt	0,469 a	0,60 ab	0,54 a	0,14 a	0,217 a	0,184 a
#2	0,363 a	0,34 b	0,35 b	0,11 a	0,167 a	0,139 a
#4	0,437 a	0,69 a	0,56 a	0,123 a	0,252 a	0,187 a
M.O. (Σ)	-0,015	-0,149		-0,049	+0,044	

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 8. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο ρυθμό απώλειας νερού λόγω διαπνοής στις *hpaB*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Χρόνος (min) (M)						
	0	30	60	90	120	150	180
	M.O. (M)						
wt	0	1,47 a	2,63 a	3,85 a	4,50 a	5,30 a	6,19 a
#2	0	1,69 a	2,99 a	4,33 a	5,28 a	5,94 a	6,71 a
#4	0	1,70 a	2,83 a	4,03 a	4,77 a	5,48 a	6,35 a
M.O. (Σ)	0,00 g	1,62 f	2,82 e	4,07 d	4,85 c	5,58 b	6,42 a

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 9. Επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στην περιεκτικότητα των φύλλων σε προλίνη στις *hpaB*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Μεταχείριση (M)	
	Μάρτυρας	Ξηρασία
	M.O. (M)	
wt	111,76 a	252,65 a
#2	117,21 a	288,28 a
#4	100,52 a	314,09 a
M.O. (Σ)	-52,54	121,97

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 10. Επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στην περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη βάσει του χλωροφυλλόμετρου SPAD ($n=4$) στις *hpaB*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Συγκέντρωση NaCl (mM) (M)		
	0	100	200
	M.O. (M)		
wt	28,86 a	25,02 a	24,66 a
#2	20,22 b	19,67 b	18,9 b
#4	22,0 b	22,02 ab	19,12 ab
M.O. (Σ)	24,17 a	22,58 a	21,2 a

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).

Πίνακας 11. Επίδραση της καταπόνησης υψηλής αλατότητας στην περιεκτικότητα των φυλλικών δίσκων σε ολική χλωροφύλλη ($n=3$) στις *hpaB*-σειρές και τα φυτά wt.

Σειρά (Σ)	Συγκέντρωση NaCl (mM) (M)		
	0	100	200
	M.O. (M)		
wt	1,54 a	1,58 a	1,39 a
#2	1,44 a	1,61 a	1,70 a
#4	1,31 a	1,57 a	1,69 a
M.O. (Σ)	1,43 a	1,59 a	1,59 a

* Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, εντός του κάθε επιπέδου, δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με την ΕΣΔ ($P \leq 0.05$).