



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ
ΤΟΠΙΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της διαγονιδιακής έκφρασης της
χαρπίνης $HrpZ_{Psp}$ σε φυτά *Nicotiana*
benthamiana κάτω από συνθήκες αβιοτικών
καταπονήσεων

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος Ν. Σκαράκης

Λαζαρίδη Κ. Ευσταθία

Αθήνα, 2012

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ
ΤΟΠΙΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της διαγονιδιακής έκφρασης της
χαρπίνης $HrpZ_{Psp}$ σε φυτά *Nicotiana*
benthamiana κάτω από συνθήκες αβιοτικών
καταπονήσεων

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος Ν. Σκαράκης

Λαζαρίδη Κ. Ευσταθία

Αθήνα, 2012

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της διαγονιδιακής έκφρασης της
χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}} σε φυτά *Nicotiana benthamiana*
κάτω από συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων

Λαζαρίδη Κ. Ευσταθία

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΚΑΡΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΜΠΕΜΠΕΛΗ ΠΗΝΕΛΟΠΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΜΕΛΟΣ

ΦΛΕΜΕΤΑΚΗΣ
ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΕΛΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βιοχημικές αλλαγές καθώς και τα επαγόμενα υπό την επίδραση των αβιοτικών καταπονήσεων γονίδια αποτελούν αντικείμενο έρευνας, με απώτερο στόχο τη δημιουργία ανθεκτικών διαγονιδιακών φυτών. Οι βακτηριακής προέλευσης πρωτεΐνες-χαρπίνες (Hrp) έπειτα από την ενσωμάτωσή τους σε φυτά είναι ικανές να επάγουν γονίδια σχετιζόμενα με την άμυνα ενάντια σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης HrpZ_{P_{sph}}, του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola κάτω από συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, παράχθηκαν διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana*. Τα διαγονιδιακά φυτά (T2 γενιά) που εξέφραζαν το γονίδιο hrpZ_{P_{sph}} αξιολογήθηκαν σε μορφολογικό και αναπτυξιακό επίπεδο σε σύγκριση με φυτά- μάρτυρες και ακολούθησε έλεγχος για την επαγωγή γονιδίων εμπλεκόμενων με γνωστά μονοπάτια άμυνας των φυτών. Για την αξιολόγηση των μετασχηματισμένων φυτών πραγματοποιήθηκε πολλαπλή PCR αντίδραση για την ενίσχυση του διαγονιδίου hrpZ_{P_{sph}} και της περιοχής virG του *A. tumefaciens*, RT-PCR για τον έλεγχο της έκφρασης του διαγονιδίου και ανοσοανίχνευση κατά Western για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της παραγόμενης πρωτεΐνης. Ο μετασχηματισμός επιβεβαιώθηκε σε όλα τα φυτά που εξετάστηκαν τόσο με την ένθεση του διαγονιδίου hrpZ_{P_{sph}} όσο και με την επιτυχή μεταγραφή και μετάφραση του στην πρωτεΐνη HrpZ_{P_{sph}}. Προκειμένου να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητα των διαγονιδιακών φυτών έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, τα φυτά υπεβλήθησαν σε τέσσερις παράγοντες καταπόνησης (αλατότητα, ακραίες υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες, επίδραση ακτινοβολίας UV-B). Σε όλα τα πειράματα συμπεριλήφθηκαν και φυτά αγρίου τύπου ως μάρτυρες. Η απόκριση των διαγονιδιακών φυτών στα υπό μελέτη ερεθίσματα αξιολογήθηκε σε σύγκριση με φυτά- μάρτυρες με τον έλεγχο της επαγωγής γονιδίων που εμπλέκονται με γνωστά βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών, διαμέσου αντιδράσεων RT-PCR σε διαφορετικούς κύκλους ενίσχυσης. Ακολούθησε μεταβολομική ανάλυση (GC-MS) για τον προσδιορισμό του μεταβολικού προφίλ των διαγονιδιακών φυτών σε σύγκριση με αυτό των φυτών- μαρτύρων. Η ενδογενής έκφραση της χαρπίνης στην εκκρινόμενη μορφή της εξωκυτταρικά (SP-HrpZ_{P_{sph}}) επέδρασε θετικά στο φαινότυπο και το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών. Η ανάλυση μεταγραφημάτων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών κατέδειξε την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *Coll*, *hin1*, *PR1a*, *PR1b* και *AOX* στα διαγονιδιακά φυτά. Κατά τη μεταβολομική ανάλυση, σημειώθηκε αυξημένη συσσώρευση των μεταβολιτών: 2-κετο-L-γουλονικό οξύ, γαλακτουρονικό οξύ, ραφινόζη, θρεόζη, πορφίνη, γλυκονικό οξύ της λακτόνης και διπεπτίδιο της D-αλανίνης στα διαγονιδιακά φυτά σε σύγκριση με τα φυτά-μάρτυρες.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Λέξεις κλειδιά: *Nicotiana benthamiana*, χαρπίνη, αβιοτικές καταπονήσεις, μεταβολικό προφίλ

Transgene expression of harpin HrpZ_{P_{sph}} in *Nicotiana benthamiana* under abiotic stress conditions

ABSTRACT

The biochemical alterations as well as the study of genes which are induced by abiotic stresses constitute a field of constant research, finally aiming at the development of genetically resistant varieties. Harpins constitute a class of bacterial proteins which upon integration into the plant genome are capable of inducing genes related to the resistance mechanisms against both biotic and abiotic stresses. To explore possible sources of broad spectrum transgenic resistance to various abiotic stresses, the HrpZ_{P_{sph}} protein from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola was expressed in *N. benthamiana* plants. Transgenic plants (T2 generation) were evaluated at the morphological and physiological level in comparison with wild-type control plants. At the same time, transgenics were evaluated by means of PCR for the amplification of the transgene *hrpZ_{P_{sph}}*, RT-PCR for the amplification of the gene transcript and Western blot analysis for the detection and quantification of the foreign protein. Transgene integration and expression was confirmed in all primary transformants whereas at the same time, immunoblot analysis revealed that HrpZ_{P_{sph}} was produced. Transgenic plants (T2) were subjected to a series of abiotic stresses (extreme high and low temperatures, high salinity and UV radiation). Wild type plants of the same age were included as control in all experiments. Following abovementioned treatments, the activation of plant defence pathways, due to harpin expression, was examined by an RT-PCR assay, performed in different amplification cycles. Total RNA was extracted from both stressed and control plants and was subsequently subjected to reverse transcription and RT-PCR. The expression of known defence-associated genes was determined as a means to partially profile the transcriptome of transgenic vs wild type plants. In order to profile metabolites in transgenic and control plants, metabolites were extracted from leaves of both stressed and non-stressed plants and subsequently analysed using Gas-chromatography coupled to Mass-spectrometry (GC-MS). Endogenous expression of harpin in its secreted form (SP-HrpZ_{P_{sph}}) demonstrated a positive effect on phenotype and growth rate of plants. The analysis of transcripts associated with plants' defense indicated the induction of gene expression Col1, hin1, PR1a, PR1b and AOX in transgenic plants. Finally, metabolomic analysis revealed higher accumulations of specific metabolites in transgenic plants, compared to control plants, such as: 2-keto-L-gulonic acid, galacturonic acid, raffinose, threose, porphine, gluconic acid lactone and dipeptide of D-alanine.

Agricultural University of Athens

Keywords: *Nicotiana benthamiana*, harpin, abiotic stresses, metabolite profiling

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συμβολή και τη συνεχή καθοδήγηση πολλών ατόμων, τα οποία νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου.

Ευχαριστώ θερμά τον διευθυντή του Εργαστηρίου, Βελτίωσης Φυτών & Γεωργικού Πειραματισμού, Καθηγητή κ. Σκαράκη Γεώργιο, για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση και το προσωπικό του ενδιαφέρον σε όλα τα στάδια της μελέτης, καθώς και τις κυρίες Παυλή Ουρανία και Κελαϊδή Γεωργία για την πολύτιμη βοήθειά τους στο πειραματικό μέρος και τη συγγραφή της μελέτης αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα. Μπεμπέλη Πηνελόπη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Φλεμετάκη Εμμανουήλ που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή, για τη βαθμολόγηση της μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης την κα Ταμπακάκη Π. Αναστασία λέκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την πολύτιμη βοήθειά της, την παροχή των γονιδιακών κασετών, καθώς και για τη μακροχρόνια ερευνητική συμβολή της στον τομέα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και το προσωπικό του εργαστηρίου, που ήταν πάντα πρόθυμοι να συμβάλλουν όπως μπορούσαν αλλά και για το υπέροχο κλίμα μέσα στο οποίο εργάστηκα για την εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, την αδερφή μου , τη νονά μου και τους φίλους μου για την αγάπη και τη στήριξή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	ii
ABSTRACT	iii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Απόκριση των Φυτών στις Αβιοτικές Καταπονήσεις	2
1.2 Η συμβολή της Μοριακής Βελτίωσης	2
1.3 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών έναντι αβιοτικών καταπονήσεων	4
1.4 Πρωτεΐνες - Τελεστές	11
1.5 Χαρπίνες (harpins)	12
1.6 Συστημική Βιολογία – Βιολογία Συστημάτων	22
1.7 Μεταβολομική ανάλυση (metabolomics)	24
1.8 Δευτερογενής Μεταβολισμός	25
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	30
2.1 Φυτικό υλικό	31
2.2 Βακτηριακά στελέχη & Πλασμίδια	31
2.3 Ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών και φυτών-μαρτύρων	31
2.4 Επιβεβαίωση του Γενετικού Μετασχηματισμού των φυτών	32
2.5 Αξιολόγηση των διαγονιδιακών φυτών T2 σε μορφολογικό και αναπτυξιακό επίπεδο	34
2.6 Επεμβάσεις Αβιοτικής Καταπόνησης	34
2.7 Έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών	35
2.8 Προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ	39
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
3.1 Ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών και φυτών-μαρτύρων	43
3.2 Έλεγχος του μετασχηματισμού	44
3.3 Αξιολόγηση των διαγονιδιακών φυτών T2 σε μορφολογικό και αναπτυξιακό επίπεδο	45
3.4 Αξιολόγηση των διαγονιδιακών φυτών T2 υπό την επίδραση επεμβάσεων Αβιοτικής Καταπόνησης	54
3.5 Αξιολόγηση μεταβολικού προφίλ	64
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Απόκριση των Φυτών στις Αβιοτικές Καταπονήσεις

Οι αβιοτικοί παράγοντες επηρεάζουν και καθορίζουν τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά των οργανισμών και ιδίως των φυτών που στερούνται κίνησης, ώστε να είναι δυνατή η αποφυγή. Τα φυτά, κατόρθωσαν να αναπτύσσουν μηχανισμούς αντοχής ή ανοχής για την επιβίωσή τους, αντιμετωπίζοντας τις ολοένα αυξανόμενες περιβαλλοντικές αλλαγές και την αλληλεπίδραση των αβιοτικών παραγόντων μεταξύ τους, οι οποίοι διαταράσσουν τις μεταβολικές ή/και τις αναπτυξιακές τους λειτουργίες. Σύμφωνα με το FAO (FAO, 2004), σε παγκόσμιο επίπεδο, περίπου το 22% της γεωργικής γης πλήττεται από αλατότητα, ενώ οι περιοχές που υποφέρουν από ξηρασία αυξάνονται συνεχώς (Burke et al., 2006).

Ως αβιοτική καταπόνηση θεωρείται η επίδραση των δυσμενών αβιοτικών παραγόντων, οι οποίοι τείνουν να παρεμποδίσουν την κανονική λειτουργία των φυσιολογικών μηχανισμών των φυτών. Στις αβιοτικές καταπονήσεις των φυτών περιλαμβάνονται η αλατότητα, η ξηρασία, οι ακραίες θερμοκρασίες, η ανοξία, τα βαρέα μέταλλα (στην ατμόσφαιρα ή στο έδαφος) αλλά και ατμοσφαιρικής προέλευσης παράγοντες όπως το όζον και η υπερβόνη ακτινοβολία.

Οι χημικοί και φυσικοί αβιοτικοί παράγοντες παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα όσον αφορά την ένταση και τη διάρκεια επίδρασής τους. Η περιοχή επίδρασης ενός παράγοντα μέσα στην οποία ένα είδος κατορθώνει να επιβιώνει και να εκτελεί τις βιολογικές και φυσιολογικές του λειτουργίες ονομάζεται **εύρος ανοχής** (tolerance range). Στην περιοχή αυτή υπάρχει ένα σημείο **άριστης** (optimum) λειτουργίας. Αν τα επίπεδα ενός αβιοτικού παράγοντα βρίσκονται εκτός του εύρους ανοχής για ένα συγκεκριμένο είδος-οργανισμό, τότε το είδος-οργανισμός δύναται να επιβιώσει με δυσκολία, υπό φυσιολογική ένταση (stress). Σε **ζώνες μη ανοχής** (zone of intolerance) οι οργανισμοί δεν επιβιώνουν. Κάθε παράγοντας που πλησιάζει ή ξεπερνάει τα όρια ανοχής καλείται **περιοριστικός παράγοντας ή περιοριστική συνθήκη**. Η έννοια του περιοριστικού παράγοντα διατυπώθηκε το 1840 από τον Justus von Liebig, και αφορούσε τη μελέτη της επίδρασης των χημικών θρεπτικών συστατικών στην ανάπτυξη των φυτών. Η εκτίμηση της εκάστοτε καταπόνησης γίνεται μέσω της επιβίωσης ή μη του φυτού, της συσσώρευσης βιομάζας, του παραγόμενου γεωργικού προϊόντος, με τη βοήθεια μορφολογικών ή φυσιολογικών δεικτών, μέσω της φωτοσυνθετικής ταχύτητας, της φωτοχημικής απόδοσης του φωτοσυστήματος II ή του δυναμικού του νερού.

1.2 Η συμβολή της Μοριακής Γενετικής και Βιολογίας

Με την εξέλιξη της Μοριακής Γενετικής και Βιολογίας, έχει επιτευχθεί μεγάλη πρόοδος όσον αφορά στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών αντίδρασης των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις, καθώς και στο χαρακτηρισμό πολλών γονιδίων που επάγονται υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης. Μία πληθώρα διαγονιδιακών τεχνολογιών έχει

αναπτυχθεί για την ενσωμάτωση τέτοιων γονιδίων ανθεκτικότητας σε καλλιεργούμενα φυτά και σε φυτά μοντέλλα. (Allen, 1995). Η δράση των ερευνητών μέσω της Γενετικής Μηχανικής εστιάζεται σε δύο κύριες κατευθύνσεις: i) στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών που υπεισέρχονται στην ανθεκτικότητα και ii) στην ενίσχυση των υπαρχόντων μηχανισμών άμυνας των καλλιεργουμένων φυτών. Ως παράδειγμα, αναφέρεται η σύνθεση μιας σειράς πρωτεϊνών οι οποίες επάγονται υπό συνθήκες καταπόνησης και σχετίζονται με την ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας έναντι των αβιοτικών ή βιοτικών καταπονήσεων. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο σε επίπεδο κυτταρικού μεταβολισμού και η σύνθεσή τους επάγεται από περισσότερους του ενός παράγοντες καταπόνησης. Ωστόσο, σε άλλες περιπτώσεις η επαγωγή σύνθεσης των νέων πρωτεϊνών σχετίζεται με την εφαρμογή ενός μόνο εξειδικευμένου παράγοντα καταπόνησης. Ορισμένες επίσης, από τις πρωτεΐνες αυτές των οποίων η σύνθεση επάγεται σε συνθήκες καταπόνησης αποτελούν θεμελιώδεις πρωτεΐνες των οποίων τα υπεύθυνα γονίδια ρυθμίζονται θετικά υπό την επίδραση της καταπόνησης, ενώ άλλες παράγονται μόνο κατά την παρουσία του/των παράγοντα/ων καταπόνησης. Πληθώρα των πρωτεϊνών αυτών συντίθενται από αλληλουχίες οι οποίες είναι συντηρημένες σε πολύ υψηλό βαθμό μεταξύ των διαφόρων ειδών. Αυτό σημαίνει ότι ένας αριθμός γονιδίων, που επάγονται κάτω από συνθήκες καταπόνησης, διαθέτουν όμοιες αλληλουχίες.

Η ύπαρξη συντηρημένων μοτίβων σε γονίδια τα οποία επάγονται σε συνθήκες καταπόνησης δίνει τη δυνατότητα βελτίωσης της ανθεκτικότητας των φυτών με τις μεθόδους Γενετικής Μηχανικής. Με τις μεθόδους αυτές έχουν μέχρι σήμερα μεταφερθεί επιτυχώς γονίδια βακτηριακής ή ζωϊκής προέλευσης σε φυτά, προσδίδοντας αυξημένη ανθεκτικότητα. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η έκφραση γονιδίων δεν επηρέασε την ανθεκτικότητα των φυτών έναντι του παράγοντα καταπόνησης. Αρχικά, επιχειρήθηκε η μέσω της χρήσης μοριακών δεικτών αναβάθμιση και επιτάχυνση των βελτιωτικών προγραμμάτων (MAB, marker-assisted breeding). Ωστόσο, η ενσωμάτωση γονιδίων που κωδικοποιούν ποσοτικούς χαρακτήρες (QTLs), σχετιζόμενων με επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών σε διάφορες καταπονήσεις, συχνά έχει σαν συνέπεια την ταυτόχρονη μεταφορά ανεπιθύμητων αγρονομικών χαρακτηριστικών από τους γονείς-δότες. Οι πρώτες προσπάθειες για την ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών (κυρίως καπνού) με σκοπό την απόκτηση ανθεκτικότητας σε αβιοτικές καταπονήσεις έγιναν με την ενσωμάτωση μεμονωμένων γονιδίων, είτε υπεύθυνων για την τροποποίηση ενός και μόνο μεταβολίτη, ο οποίος θα παρείχε αυξημένη ανθεκτικότητα στην αλατότητα ή στην ξηρασία, είτε επαγόμενων από τις καταπονήσεις πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση οσμωλυτών (προλίνη, βεταΐνη, σάκχαρα), ενζύμων αποτοξίνωσης και πρωτεϊνών μεταφοράς. Κατέστη δυνατή η μεταφορά γονιδίων από στενά ή μακρινά συγγενικά είδη που δεν διασταυρώνονται εύκολα, καθώς ακόμα και από μη φυτικούς οργανισμούς. Σήμερα, γίνονται προσπάθειες για την ενσωμάτωση γονιδίων που κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι πιθανό να ρυθμίζονται ταυτόχρονα από ένα γονίδιο που επάγεται από τον παράγοντα καταπόνησης (Kasuga et al., 1999). Οι πιο πρόσφατες προσπάθειες αφορούν τη χρήση γονιδιακών κασετών με προσαρτημένους επαγόμενους από καταπονήσεις προαγωγείς. Με τον

αυξανόμενο αριθμό χαρακτηρισμένων γονιδίων επαγόμενων κατά τις καταπονήσεις, η αξιοποίηση των προαγωγέων που επάγονται από αναερόβιες συνθήκες, χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες, αλατότητα θεωρείται αποτελεσματική προσέγγιση για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών (Katiyar et al., 1999).

Γενικά, φαίνεται ότι η αντιμετώπιση ενός παράγοντα καταπόνησης απαιτεί τη συντονισμένη συνεργιστική δράση πολλών διαφορετικών γονιδίων, των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από διαφορετικούς εξωτερικούς και εσωτερικούς-κυτταρικούς παράγοντες. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι ο επιμερισμός των πόρων ως προς τις αμυντικές λειτουργίες, μέσω της έκφρασης ενός νέου γονιδίου, απαιτεί κατανάλωση ενέργειας και επομένως εκτροπή ενός τμήματος φωτοσυνθετικών προϊόντων προς την κατεύθυνση αυτή, με πιθανή απώτερη επίπτωση στην ανάπτυξη του φυτού και την επακόλουθη μείωση της παραγωγικότητας. Παράλληλα, είναι σημαντικό να εξετάζεται ο τρόπος αξιολόγησης των γενετικά τροποποιημένων φυτών-μοντέλων και ο έλεγχος ενσωμάτωσης και προσαρμογής του γονιδίου σε καλλιεργούμενα είδη σε φυσικές συνθήκες, διότι εκτός από τις βασικές διαφορές που υπάρχουν μεταξύ του εγκλιματισμού των φυτών σε διαφορετικές αβιοτικές συνθήκες, όταν αυτές συνδυάζονται, ενδέχεται να υπάρξουν αντικρουόμενες ή ανταγωνιστικές αποκρίσεις στα ερεθίσματα. Κατά τη διάρκεια της θερμικής καταπόνησης, για παράδειγμα, τα φυτά αντιδρούν με άνοιγμα των στοματίων ώστε να αποφευχθεί η διαπνοή. Ωστόσο, σε συνδυασμό με ξηρασία, τα φυτά δεν είναι σε θέση να ανοίξουν τα στοματίά τους με αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοκρασίας των φύλλων (Rizhsky et al., 2002). Επίσης, η επίδραση ψύχους ή ξηρασίας σε συνδυασμό με υψηλής έντασης φωτισμό, έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) από το φωτοσυνθετικό σύστημα, περιορίζοντας τη διαθεσιμότητα του CO₂ για την αναπνοή σκότους, αφήνοντας το O₂ ελεύθερο ως κύριο αναγωγικό προϊόν της φωτοσύνθεσης (Mittler, 2002).

1.3 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών έναντι αβιοτικών καταπονήσεων

Η άμυνα των φυτών βασίζεται τόσο σε μόνιμους όσο και σε επαγόμενους μηχανισμούς. Οι δεύτεροι, χρησιμοποιούνται κυρίως σε περιόδους που δεν υπάρχει άμεσος κίνδυνος για τα φυτά, εξοικονομώντας έτσι πολύτιμη ενέργεια (Karban & Baldwin, 1997) και επάγουν μια μορφή ενεργητικής ανθεκτικότητας, που προέρχεται από αντιδράσεις των φυτών, οι οποίες ενεργοποιούνται κατά την επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το στάδιο ανάπτυξης του φυτού κατά τη δράση της αβιοτικής καταπόνησης παίζει σημαντικό ρόλο. Φυτά που παρουσιάζονται ανθεκτικά σε ένα στάδιο ανάπτυξης μπορεί να είναι ευπαθή σε ένα άλλο στάδιο. Η αντιμετώπιση ενός παράγοντα καταπόνησης επέρχεται έπειτα από την αντίληψη ενός ερεθίσματος, τη μεταγωγή του σήματος και τη σύνθεση πρωτεϊνών καταπόνησης ως αποτέλεσμα της έκφρασης γονιδίων. Η ανταπόκριση του φυτού εξαρτάται άμεσα από την ένταση και τη διάρκεια του ερεθίσματος.

Η ανθεκτικότητα που αποκτάται μέσω των διαφόρων τρόπων άμυνας των φυτών διακρίνεται στην κατακόρυφη (ολιγονιδιακή ή μονογονιδιακή) και οριζόντια (πολυγονιδιακή) ανθεκτικότητα, ανάλογα με τον αριθμό των γονιδίων που την προάγουν και το βαθμό του ελέγχου που ασκούν. Όσον αφορά την ανθεκτικότητα στους αβιοτικούς παράγοντες χαρακτηρίζεται ως πολυγονιδιακή, ενώ η ενσωμάτωση μονογονιδιακής ανθεκτικότητας είναι απίθανο να είναι βιώσιμη.

1.3.1 Υδατική Καταπόνηση

Η υδατική καταπόνηση διακρίνεται σε: i) αφυδάτωση και ii) οσμωτική καταπόνηση. Κατά την επίδρασή της, παρατηρούνται τόσο μορφολογικές όσο και φυσιολογικές αλλαγές, καθώς επάγεται και η έκφραση γονιδίων για τη *de novo* σύνθεση πρωτεϊνών με σκοπό τη σύνθεση ορισμένων μεταβολιτών. Στις πρωτεΐνες συμπεριλαμβάνονται ένζυμα που εμπλέκονται σε βιοσυνθετικά μονοπάτια, ακουαπορίνες, ΑΤΡάσες, ένζυμα που υδρολύουν πρωτεΐνες και πρωτεΐνες LEA που σχετίζονται με την προστασία ενζύμων και μεμβρανών σε συνθήκες αφυδάτωσης. Η μεταγωγή του σήματος είναι πιθανό να στηρίζεται στην παρουσία αυξημένων επιπέδων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα.

Προσαρμοστικοί μηχανισμοί των φυτών στην υδατική καταπόνηση

- κλείσιμο στοματίων
- μείωση απόδοσης φωτοσυνθετικού μηχανισμού
- απόπτωση οργάνων
- δημιουργία νέων οργάνων με ξηροφυτικά χαρακτηριστικά
- είσοδος του οργανισμού σε λήθαργο
- διακίνηση ιόντων για οσμωτική εξισορρόπηση
- διακίνηση/βιοσύνθεση ABA

1.3.2 Αλατότητα

Ο όρος αλατότητα αναφέρεται στην υψηλή συγκέντρωση ιόντων (Na^+ , Cl^-) στο εδαφικό περιβάλλον του ριζικού συστήματος των φυτών. Συγκέντρωση 10-30 mM Na^+ χαρακτηρίζεται ως τοξική για το κυτταρικό διάλυμα των ριζών διότι αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα (Tester & Davenport, 2003), ενώ στα φύλλα ανέρχεται περί τα 100 mM (Wyn & Gorham, 2002). Τα Cl^- συσσωρεύονται κυρίως σε νεαρούς βλαστούς και φύλλα προκαλώντας νέκρωση των κυττάρων (Flowers & Yeo, 1995). Δεν έχουν καθοριστεί οι τοξικές συγκεντρώσεις, αλλά εκτιμάται ότι κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα για τα ιόντα Na^+ (Munns, 2005).

Οι υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων δημιουργούν μια μορφή υδατικής καταπόνησης όπως προαναφέρθηκε, γνωστή ως οσμωτική καταπόνηση. Τα φυτά για την οσμωρύθμισή τους χρησιμοποιούν δύο κύριες στρατηγικές: i) δεν επιτρέπουν την είσοδο των ιόντων στο εσωτερικό των κυττάρων, είτε αποκλείοντας την είσοδό τους είτε οδηγώντας τα σε εξειδικευμένους αλατώδεις αδένες και ii) μέσω κατάλληλα προσαρμοσμένου μεταβολισμού (συσσωρευτές άλατος) όπου τα άλατα οδηγούνται μέσω του αντιμεταφορέα Na^+/H^+ στο χυμοτόπιο, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις τους στο κυτταρόπλασμα να παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα. Μέχρι σήμερα, έχει παραχθεί ένας μεγάλος αριθμός διαγονιδιακών φυτών που χαρακτηρίζονται από αυξημένα κυτταρικά επίπεδα πρωτεϊνών που ελέγχουν τις μεταφορικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, διαγονιδιακά φυτά πεπονιού (Borda's et al., 1997) και τομάτας (Gisbert et al., 2000) εκφράζουν το γονίδιο *HAL1* ως ένα ορισμένο επίπεδο αλατότητας με στόχο τη διατήρηση περισσότερων ιόντων K^+ . Διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis thaliana* και τομάτας στα οποία έγινε υπερέκφραση του γονιδίου *AtNHX1* και του γονιδίου *AtCLCd*, που κωδικοποιεί ένα κανάλι Cl^- στο χυμοτόπιο, επέδειξαν ανθεκτικότητα στην αλατότητα με τον κατακερματισμό ιόντων Na^+ στα χυμοτόπια (Apse et al., 1999; Quintero et al., 2000; Zhang & Blumwald, 2001). Η αλληλουχία *SOS1*, που παρουσιάζει παρόμοια δράση με τον πλασματικό αντιμεταφορέα Na^+/H^+ σε βακτήρια και μύκητες, κλωνοποιήθηκε και υπερεκφράστηκε σε φυτά *A. thaliana* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *CaMV 35S* και η έκφρασή της παρείχε ανθεκτικότητα σε αυξημένα επίπεδα Na^+ , παρέχοντας μεγαλύτερη κινητήρια δύναμη πρωτονίων, απαραίτητη για την αυξημένη δραστηριότητα του αντιμεταφορέα Na^+/H^+ (Shi et al., 2000).

1.3.3 Ακραίες Θερμοκρασίες

Η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά τις φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών, όπως τη φωτοσύνθεση, την απορρόφηση του νερού, την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων, την αναπνοή, τη διαπνοή, τη μεταφορά θρεπτικών στοιχείων από το ένα όργανο στο άλλο (φύλλα προς ρίζα), τη σύνθεση χλωροφύλλης και άλλων χρωστικών, καθώς και την οντογένεση (μορφογένεση). Ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και το είδος, υπάρχουν διαφορετικές ευνοϊκές θερμοκρασίες για την σωστή επιτέλεση των φυσιολογικών αυτών διεργασιών. Ως παράδειγμα αναφέρονται οι διαφορετικές απαιτούμενες θερμοκρασίες για το φύτευμα, για τη διαφοροποίηση των οφθαλμών, για την άνθηση και την ωρίμανση των καρπών ενός φυτού. Ανάλογα με το είδος και την ποικιλία, το κάθε φυτό χαρακτηρίζεται από διαφορετικά θερμοκρασιακά όρια ανάπτυξης, πέρα των οποίων το φυτό δεν επιβιώνει.

Ακραίες χαμηλές θερμοκρασίες (ψύχος)

Ως ψύχος ορίζεται το εύρος θερμοκρασιών 0-15 °C που αποτελεί παράγοντα καταπόνησης σε πληθώρα φυτικών ειδών. Τα συμπτώματα εξαρτώνται άμεσα από το είδος, την ηλικία του φυτού και τη διάρκεια έκθεσης, και οφείλονται σε περιορισμό των λειτουργιών της αναπνοής, της φωτοσύνθεσης, της πρωτεϊνοσύνθεσης και της πρόσληψης

νερού και θρεπτικών συστατικών. Τα φυτά για την αντιμετώπισή του προβαίνουν σε μορφολογικές, φυσιολογικές, μεταβολικές αλλαγές και σε μεταβολές στην έκφραση γονιδίων που επάγονται από ρυθμιστικές πρωτεΐνες CBF/DREB1.

Προσαρμοστικοί μηχανισμοί των φυτών στην επίδραση ακραίων χαμηλών θερμοκρασιών

- απόπτωση οργάνων
- φαινόμενο της υπέρψυξης
- σταθεροποίηση μεμβρανών
- ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών συστημάτων
- μετατροπή του αμύλου σε σάκχαρα
- αύξηση της συγκέντρωσης φωσφορυλιωμένων μεταβολιτών
- συσσώρευση πρωτεϊνών: PRPs, LEA, COR15 (Lin & Thomashow, 1992), πρωτεϊνών αφυδάτωσης (Close et al., 1993) και οσμωλυτών

Ακραίες υψηλές θερμοκρασίες

Ως όριο ανθεκτικότητας υψηλών θερμοκρασιών για τα περισσότερα φυτικά είδη θεωρείται η θερμοκρασία των 40-45 °C. Η κύρια επίδραση συνίσταται σε προβλήματα στην περατότητα και στις καταλυτικές ιδιότητες των μεμβρανών των θυλακοειδών των χλωροπλαστών.

Προσαρμοστικοί μηχανισμοί των φυτών στην επίδραση ακραίων υψηλών θερμοκρασιών

- είσοδος σε λήθαργο
- δημιουργία και μορφολογία οργάνων που αντανάκλουν την ακτινοβολία και περιορίζουν τη διαπνοή
- παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών - ισοπρενίου
- παραγωγή θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (HSPs)

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (heat shock proteins, HSPs) παράγονται έπειτα από την έκθεση των περισσότερων φυτικών ειδών σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ δεν ανιχνεύονται ή ανιχνεύονται σε ίχνη υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η παραγωγή τους ξεκινά εντός ολίγων λεπτών από την επίδραση της καταπόνησης και σταματά σε διάστημα λίγων ωρών έπειτα από την έναρξη της επίδρασης φυσιολογικών θερμοκρασιών, ένδειξη ότι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην προστασία των κυττάρων κατά τις αιφνίδιες μεταβολές θερμοκρασιών. Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες διακρίνονται σε πέντε κατηγορίες με βάση το μοριακό τους βάρος. Μία εκ των σημαντικότερων πρωτεϊνών της οικογένειας αυτής είναι η ουμπικουϊτίνη. Ο ρόλος της αφορά τη σήμανση πρωτεϊνικών μορίων τα οποία έχουν υποστεί βλάβες λόγω της επίδρασης υψηλών θερμοκρασιών. Η έκφραση των γονιδίων που

κωδικοποιούν τις HSPs ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα (heat shock transcription factor, HSF) που αναγνωρίζει το ρυθμιστικό στοιχείο (heat shock element, HSE) του DNA. Η επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (*hsps*) είναι μία από τις πιο εξέχοντες παρατηρήσεις σε μοριακό επίπεδο σε οργανισμούς που εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες (Kimpel & Key, 1985; Lindquist, 1986; Vierling, 1991).

Η ενσωμάτωση γονιδίων που κωδικοποιούν θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες, όπως της ομάδας HSP70, έχει επιτευχθεί σε ένα μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών (Malik et al., 1999; Katiyar-Agarwal et al., 2003; Li et al., 2003). Αν και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες παρέχουν ανθεκτικότητα δεν είναι γνωστός, μελέτη έδειξε ότι η *in vivo* θερμοπροστατευτική λειτουργία επιτυγχάνεται μέσω της αποσύνθεσης, σε υψηλές θερμοκρασίες, συγκεντρωμένων σε κάψουλες μικρού μεγέθους sHSPs ή α -HSPs (α -crystallins) (12-43 kDa), που λειτουργούν κυρίως ως μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones) (HSGs; Miroshnichenko et al., 2005). Οι α -κρυσταλλίνες περιλαμβάνουν μία ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνών που απαντώνται σε πληθώρα ζώϊκών, φυτικών, βακτηριακών ειδών (Narberhaus, 2002).

1.3.4 Ακτινοβολία

Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η ακτινοβολία μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα καταπόνησης για τους φυτικούς οργανισμούς. Μία εκ των περιπτώσεων ικανών να προκαλέσουν έντονες χημικές αλλαγές σε βιομόρια είναι και η επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η υπεριώδης ακτινοβολία αφορά την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μεταξύ 200-400 nm. Επιβλαβής θεωρείται η περιοχή UV-B (280-320 nm) της οποίας η απορρόφηση είναι δυνατό να προκαλέσει φωτοχημικές αλλοιώσεις βιομορίων.

Προσαρμοστικοί μηχανισμοί των φυτών στην επίδραση UV-B ακτινοβολίας

- παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στο χυμοτόπιο για απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας (φλαβονοειδή)
- δημιουργία και μορφολογία οργάνων με σκοπό τη συγκράτηση της υπεριώδους ακτινοβολίας

1.3.5 Οξειδωτική Καταπόνηση

Το φαινόμενο της έντονης οξειδωτικής καταπόνησης προκύπτει κατά την επίδραση άλλων μορφών καταπόνησης (υδατική καταπόνηση, ακραίες θερμοκρασίες, βαρέα μέταλλα). Ως οξειδωτική καταπόνηση ορίζουμε την κατάσταση κατά την οποία ο ρυθμός σχηματισμού ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) υπερβαίνει το ρυθμό εξουδετέρωσής τους από τα κύτταρα. Οι παράγοντες καταπόνησης είτε προκαλούν

αλλοιώσεις στη δομή των μεμβρανών, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη ροή ηλεκτρονίων, είτε προκαλούν διαταραχές στους μηχανισμούς των φυτών που εμπλέκονται στη συγκράτηση ενεργειακών ποσών, με αποτέλεσμα η ροή των ηλεκτρονίων να αυξάνεται. Αν και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) σχετίζονται με διαφορετικές βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες καταπόνησης, διαφορετικά γονίδια σε φυτά του είδους *A. thaliana* βρέθηκαν να ανταποκρίνονται ποικιλοτρόπως στα διαφορετικά είδη καταπονήσεων (Mittler et al., 2006).

Γενικά, η αύξηση της συγκέντρωσης των ROS κατά την επίδραση παραγόντων καταπόνησης προκαλεί οξειδωτικές βλάβες πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA, διάσπαση χρωστικών, μείωση της φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας και επαγωγή γήρανσης. Τα φυτά ανταποκρίνονται με αύξηση της δραστηριότητας ενζυμικών και μη αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων (περοξειδάσες, καταλάσες, υπεροξειδική δισμουτάση, αφυδροασκορβική αναγωγή, αναγωγή της γλουταθειόνης, πολυαμίνες, ασκορβικό οξύ, β-καροτένιο, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή), δρώντας σε υποκυτταρικό επίπεδο (κυτταρόπλασμα, μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες, πλαστίδια, φυμάτια, πυρήνας) ή αποπλαστικά. Με τη χρήση της γενετικής μηχανικής έχουν πλέον δημιουργηθεί διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν ένζυμα που εμπλέκονται στην οξειδωτική προστασία, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, υπεροξειδική δισμουτάση, ασκορβικές υπεροξειδάσες και αναγωγάσες του ασκορβικού οξέος (Roxas et al., 1997; Zhu et al., 1999). Διαγονιδιακά φυτά καπνού, εκφράζοντας υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) στο χλωροπλάστη, (Bowler et al., 1991; Van Camp et al., 1996) έχει αποδειχθεί ότι ενισχύουν την ανθεκτικότητα έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης. Η υπερέκφρασή της στο χλωροπλάστη Cu/Zn SOD έδειξε αύξηση της φωτοσυνθετικής απόδοσης κάτω από συνθήκες ψύχους (Sen Gupta et al., 1993) καθώς επίσης, διαγονιδιακά φυτά καπνού που υπερέκφραζαν το γονίδιο APX παρείχαν προστασία έναντι οξειδωτικής καταπόνησης (Webb & Allen, 1996) και O₃ (Orvar & Ellis, 1997).

1.3.6 Οσμωπροστατευτικές Ενώσεις

Η οσμωρύθμιση πιστεύεται ότι είναι η καλύτερη στρατηγική για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας όσον αφορά την ξηρασία, την αλατότητα και την επίδραση ακραίων υψηλών θερμοκρασιών, ιδίως σε καλλιέργειες που δεν συνθέτουν φυσικά τις οσμωπροστατευτικές τους ενώσεις.

Ως εκ τούτου, σήμερα έχουν δημιουργηθεί ανθεκτικά διαγονιδιακά φυτά, με την ενσωμάτωση πολλών γονιδίων που συμμετέχουν στη σύνθεση των βιολογικών οσμωπροστατευτικών ενώσεων, όπως αμινοξέα (π.χ. προλίνη), τεταρτοταγείς αμίνες (π.χ. γλυκοβηταΐνη, πολυαμίνες), σάκχαρα και σακχαρικές αλκοόλες (π.χ. μαννιτόλη, τρεχαλόζη) που συσσωρεύονται κατά την οσμωτική προσαρμογή (Vincour & Altman, 2005). Το πρώτο βήμα για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών έγινε με την προσθήκη γονιδίων που κωδικοποιούσαν γονίδια για τη σύνθεση επιλεγμένων οσμωλυτών (Bray, 1993). Αποτέλεσμα ήταν φυτά που παρήγαγαν γλυσίνη-βηταΐνη (Holmstrom, 2000; McNeil et al.,

2000; Sakamoto et al., 2000) και προλίνη (Zhu et al., 1998; Nanjo et al., 1999; Yamada et al., 2005). Επίσης, έχουν παραχθεί φυτά που παράγουν σακχαρούχες αλκοόλες (μαννιτόλη, τρεχαλόζη, μυο-ινοσιτόλη, σορβιτόλη) για προστασία των μεμβρανών και των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια των καταπονήσεων (Garg et al., 2002; Abebe et al., 2003; Cortina & Culiáñez-Macia, 2005) και πολυαμίνες (Waie & Rajam, 2003; Capell et al., 2004). Διαγονιδιακές τροποποιήσεις της βιοσύνθεσης των μεταβολικών οδών δείχνουν να επάγουν ανθεκτικότητα, ενώ η συσσώρευση συμβατών διαλυτών ουσιών φαίνεται να παρέχει προστασία έναντι των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) (McNeil et al., 1999; Diamant et al., 2001).

1.3.7 Επαγωγή έκφρασης γονιδίων υπό διαφορετικούς παράγοντες καταπόνησης

Σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται η επαγωγή διαφορετικών γονιδίων από ένα παράγοντα καταπόνησης, λόγω των κοινών μηχανισμών μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούν τους υπεύθυνους προαγωγείς για αυτά τα γονίδια, ενώ σε άλλες περιπτώσεις ένα γονίδιο περιλαμβάνει ρυθμιστικές ακολουθίες οι οποίες ενεργοποιούνται από διαφορετικού είδους καταπονήσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό της οσμωτικής η οποία συσσωρεύεται κατά την επίδραση υδατικής ή οσμωτικής καταπόνησης. Η οσμωτική παράγεται κάτω από την επίδραση συνθηκών αλατότητας, ξηρασίας, ψύχους, παραγωγής αιθυλενίου, ABA και IAA καθώς και κατά την προσβολή των φυτικών ιστών από ιούς και μύκητες.

Επίσης, πολλά ρυθμιστικά γονίδια ανταποκρίνονται σε πολλαπλές καταπονήσεις όπως η ξηρασία και οι χαμηλές θερμοκρασίες, σε μεταγραφικό επίπεδο. Οι αποκρίσεις αυτές είναι κυρίως προαγόμενες από το ABA (Mundy & Chua, 1988), το οποίο προστατεύει τα κύτταρα από την αφυδάτωση (Dure et al., 1989; Skriver & Mundy, 1990).

Μία ελκυστική προσέγγιση για τη χειραγώγηση γονιδίων είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδεμένοι με προαγωγείς γονιδίων ρυθμιζόμενων υπό αβιοτικές πιέσεις (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Winicov & Bastola, 1997), όπως υπό συνθήκες ξηρασίας (Bartels & Sunkar, 2005; Vincour & Altman, 2005). Η μεταγραφική ενεργοποίηση επαγόμενων από καταπόνηση γονιδίων έγινε δυνατή σε γενετικά τροποποιημένα φυτά. Δύο οικογένειες γονιδίων *bZIP* και *MYB*, εμπλέκονται στη μεταφορά σήματος και την ενεργοποίηση του γονιδίου παραγωγής ABA. Πολλά γονίδια επαγόμενα από το ABA εμπεριέχουν την αλληλουχία (C/T)ACGTGGC και το στοιχείο απόκρισης ABA (ABRE) στην περιοχή του προαγωγέα τους (Guiltinan et al., 1990). Διαγονιδιακά φυτά *A. thaliana* φάνηκε να υπερεκφράζουν ένα μεταγραφικό παράγοντα επαγόμενο από το ψύχος (*CBF1*; *CRT/DRE*) παρέχοντας ανθεκτικότητα δίχως αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη (Jaglo-Ottosen et al., 1998). Ένα άλλο ανεξάρτητο της επαγωγής ABA γονίδιο, το *ERD*, ο προαγωγέας του οποίου εντοπίζεται σε δύο *cis*-ενεργά στοιχεία, σχετίζεται με την υδατική

καταπόνηση (Simpson et al., 2003). Ομοίως, διαγονιδιακά φυτά που εξέφραζαν το μεταγραφικό παράγοντα *SHN1-3* ή *WXP1*, άμεσα σχετιζόμενο με την υδατική καταπόνηση, που επάγεται από γονίδια που αυξάνουν τη συσσώρευση κηρού παρουσίασαν αντοχή στην ξηρασία (Aharoni et al., 2004; Zhang et al., 2005). Το γονίδιο *CBF1* εισήχθη σε φυτά τομάτας (*Lycopersicon esculentum*) υπό τον έλεγχο του υποκινητή CaMV35S παρέχοντας ανθεκτικότητα σε συνθήκες ψύχους, ξηρασίας και αλατότητας, αλλά τα φυτά χαρακτηρίστηκαν από νάνο φαινότυπο και μειωμένη καρπόδεση (Hsieh et al., 2002).

Ενδιαφέρον αναπτύσσεται και για γονίδια που εμπλέκονται στη μεταγωγή και την ανίχνευση σημάτων υπό συνθήκες καταπόνησης σε φυτά *A. thaliana* (Winicov & Bastola, 1997; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1999). Στοιχεία του ίδιου μεταγωγικού μονοπατιού μπορεί επίσης να σχετίζονται με διαφορετικών ειδών παράγοντες καταπόνησης όπως η ξηρασία, η αλατότητα και το ψύχος (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1999). Τα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων εμπλέκονται ή όχι με αυτό του ABA. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που συσχετίζονται με την αλατότητα, το ψύχος και τη ξηρασία εμπλέκονται άμεσα με την παραγωγή ABA (Xiong et al., 1999). Εκτός του ABA, πληθώρα ουσιών σχετίζεται με την απόκριση των φυτών σε υψηλές θερμοκρασίες, στο ψύχος, στην ξηρασία και στα αναερόβια stress (Grover et al., 2001). Γενικά, η τροποποίηση των στοιχείων μεταγωγής σήματος είναι μια προσέγγιση που στοχεύει να μειώσει την ευαισθησία των κυττάρων υπό συνθήκες καταπόνησης ή να προκαλέσει την επαγωγή γονιδίων σε χαμηλά επίπεδα καταπονήσεων (Grover et al., 1999).

1.4 Πρωτεΐνες - Τελεστές

Ως πρωτεΐνες – τελεστές (effector proteins) ορίζονται οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από φυτοπαθογόνα ή/και συμβιωτικά βακτήρια και έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή, επηρεάζοντας τη φυσιολογία του και προωθώντας την αποίκιση. Οι πιο γνωστές πρωτεΐνες – τελεστές είναι προϊόντα των γονιδίων αμολυσματικότητας *avr*. Η απομόνωση του πρώτου *avr* γονιδίου αφορούσε το *avrA* από το *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Staskawicz et al., 1984), χωρίς βέβαια τότε να είναι γνωστό ότι το αντίστοιχο προϊόν κωδικοποιεί εκκριτικό υπόστρωμα.

Σήμερα είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες-τελεστές μεταφέρονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα και δρουν στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Στα παθογόνα βακτήρια, οι πρωτεΐνες - τελεστές επηρεάζουν το μεταβολισμό και το αμυντικό σύστημα του κυττάρου - ξενιστή.

Η δράση των πρωτεϊνών - τελεστών συνοψίζεται στις παρακάτω λειτουργίες:

- καταστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου - *HopAB2* (Abramovitch et al., 2003) και *AvrPto* (Kim et al., 2002)

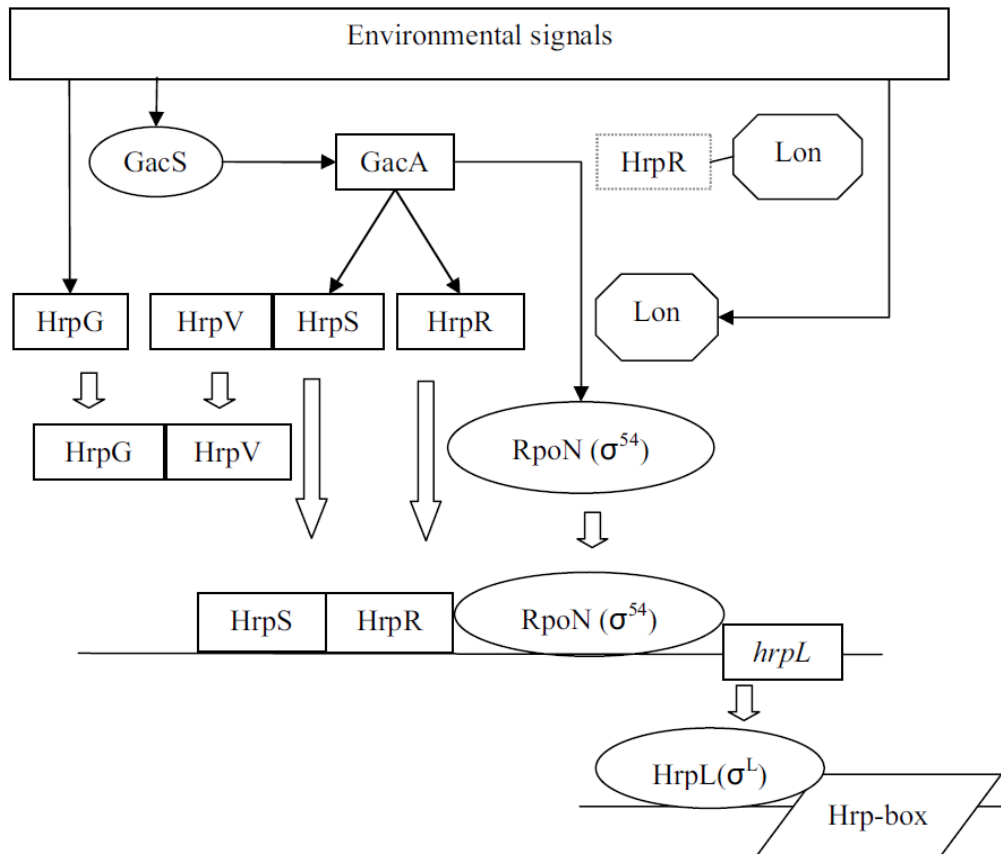
- ενεργοποίηση του μονοπατιού παραγωγής του ιασμονικού οξέος (JA) (He et. al., 2004)
- καταστολή της ενίσχυσης του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων των φυτών ξενιστών (papillae)
- ενεργοποίηση της λειτουργίας της μεταγραφής
- καταστολή των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας R - AvrRpt2 (Mackey et. al., 2003)

1.5 Χαρπίνες (harpins)

Πρόκειται για μία κατηγορία υδρόφιλων πρωτεϊνών (28-44kDa), πλούσιων σε γλυκίνη, δίχως κυστεΐνες που εμφανίζουν θερμοσταθερότητα. Εκκρίνονται στο βακτηριακό θρεπτικό μέσο καθώς δεν διαθέτουν αμινοτελικά πεπτίδια έκκρισης μέσω του εκκριτικού συστήματος III. Η έκφραση και έκκρισή τους εξαρτάται από τα γονίδια *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity genes - *hrp*). Τα προϊόντα των *hrp* γονιδίων αποτελούν γνωστούς διεγέρτες της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) (Ταμπακάκη, 1999). Κάθε είδος χαρπίνης διακρίνεται από διαφορετική ικανότητα επαγωγής της HR. Τα γονίδια *hrp* ανακαλύφθηκαν όταν διαπιστώθηκε ότι βακτήρια *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, με μεταλλαγές σε δομικά συστατικά του εκκριτικού συστήματος τύπου III, ήταν ανίκανα να προκαλέσουν ασθένεια σε φυτά-ξενιστές ή αντίδραση HR σε φυτά-μη ξενιστές (Lindgren et al., 1986), κατά την έγχυσή τους στον αποπλαστικό χώρο των κυττάρων. Τα *hrp* γονίδια απαντώνται σε γονιδιακές ομάδες (*hrp*-gene clusters) συγκεκριμένου μεγέθους (23-40kb) και οργάνωσης, αποτελούμενες από 20-27 γονίδια που εντοπίζονται είτε σε χρωμοσώματα είτε σε μεγασμιδία (Alfano & Colmer, 1997; He, 1998) και έχουν πλέον ταυτοποιηθεί σε όλα σχεδόν τα κύρια γένη φυτοπαθογόνων βακτηρίων: *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas* και *Ralstonia*, με εξαίρεση το *Agrobacterium tumefaciens* (Bogdanove et al., 1996). Οι γονιδιακές ομάδες (*hrp*-gene clusters) διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες (Alfano & Colmer, 1997) με βάση την ομολογία των γονιδίων τους:

- Ομάδα I: *Erwinia* και *Pseudomonas*
- Ομάδα II: *Ralstonia* και *Xanthomonas* (ανάμεσα στις δύο ομάδες τουλάχιστον 9 γονίδια είναι ομόλογα)

Η ρύθμιση των *hrp* γονιδίων ελέγχεται μέσω διαφορετικών ρυθμιστικών συστημάτων για την κάθε ομάδα φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Χαρακτηριστική είναι η διαφορά στον έλεγχο των οπερονίων μεταξύ των ρυθμιστικών συστημάτων των δύο ομάδων. Ο έλεγχος στις δύο ομάδες ενεργοποιείται από διαφορετικούς επαγωγείς. Στην ομάδα I, τα *hrp* γονίδια ενεργοποιούνται από τον HrpL, ενώ στην ομάδα II από ένα μέλος της οικογένειας AraC (Ταμπακάκη, 1999). Στα βακτήρια του γένους *P. syringae* το σύμπλοκο HrpR/HrpS προάγει την έκφραση του γονιδίου *hrpL* (Xiao et al., 1994), το οποίο δρα ως επαγωγέας των Hrp boxes, με τη συμμετοχή του εναλλακτικού παράγοντα σ^{54} ή RpoN (Hendrickson et al., 2000), ενώ στα βακτήρια του γένους *X. campestris* pv. *versicatoria* η μεταγραφή ελέγχεται από τα γονίδια *hrpG* και *hrpX* (Wengelnik et al., 1999).



Εικόνα 1.1: Έλεγχος της έκφρασης των TTS-σχετιζόμενων γονιδίων στο βακτήριο *P. syringae*. Το σύμπλοκο HrpR/HrpS προάγει την έκφραση του γονιδίου *hrpL* με τη συμμετοχή του εναλλακτικού παράγοντα RpoN (σ^{54}). Το γονίδιο *hrpL* επάγει τις TTS-σχετιζόμενες πρωτεΐνες (Hrp-box). Το HrpV δρα ως απορυθμιστής της έκφρασης των *hrp* γονιδίων (Preston et al., 1998). Το HrpG σχηματίζοντας σύμπλοκο με το HrpV, απομακρύνει τον παράγοντα HrpV από το HrpS και επιτρέπει την ενεργοποίηση της επαγωγής των *hrp* γονιδίων (Wei et al., 2005). Η έκφραση των *hrpR*, *hrpS* και του RpoN ελέγχεται από το ρυθμιστή ανταπόκρισης GacA (Chatterjee et al., 2003).

1.5.1 Εκκριτικό μονοπάτι τύπου III (T3SS)

Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει διάφορα μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών στο περιβάλλον, μεταξύ των οποίων είναι τα: I, II, III, IV, V και VI. Τα εκκριτικά μονοπάτια εμφανίζονται να είναι συντηρημένα φυλογενετικά (Hueck, 1998). Η διαφορά μεταξύ των διαφόρων μονοπατιών έγκειται στη διαφορά της θέσης έκκρισης της πρωτεΐνης, μετά την έξοδό της από το βακτηριακό κύτταρο και την ανάγκη της να διασχίσει το μεμβρανικό φάκελο στη λειτουργική της μορφή (Logy 1998).

Το εκκριτικό σύστημα έγχυσης πρωτεϊνών-τελεστών διαμέσου των ευκαρυωτικών κυτταρικών μεμβρανών και της εναπόθεσής τους απευθείας στο ευκαρυωτικό

κυτταρόπλασμα (Cornelis, 1997; Lee, 1997), είναι το σύστημα τύπου III (Type III secretion system, TTSS/T3SS). Η έκκριση μέσω του μονοπατιού αυτού γίνεται μέσω βελονοειδών σχηματισμών (Li et al., 2002), ενώ επάγεται μόνο έπειτα από επαφή των βακτηρίων με τα κύτταρα του φυτού-ξενιστή. Το εκκριτικό σύστημα τύπου III είναι φυλογενετικά συντηρημένο σε διάφορα είδη βακτηρίων (Foultier et al., 2002), προάγοντας την παθογόνο ικανότητα του εκάστοτε βακτηρίου (Mota & Cornelis, 2005). Τα συστήματα έκκρισης τύπου III των ζωικών και φυτικών παθογόνων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων θεωρούνται ότι εξελίχθηκαν για να μεταφέρουν στο κύτταρο του ξενιστή μια σειρά πρωτεϊνών που έχουν την ικανότητα να διεγείρουν αντιδράσεις άμυνας ή/και να παρεμβαίνουν με άλλους άγνωστους τρόπους στις κυτταρικές λειτουργίες του ξενιστή (Cornelis, 1997; Lee, 1997). Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS) ανακαλύφθηκε με την παρατήρηση μίας σειράς γονιδίων των Gram-αρνητικών βακτηρίων, σχετιζόμενων με την έκκριση παραγόντων παθογένειας, που ομοιάζε με γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τη σύνθεση του μαστίγιου (Michiels et al., 1991). Συνολικά, δέκα από τα έντεκα συντηρημένα γονίδια που έχουν ανακαλυφθεί και κωδικοποιούν το εκκριτικό σύστημα τύπου III, εμφανίζονται συντηρημένα και κατά τη σύνθεση του μαστιγίου (Büttner & Bonas, 2002).

Το εκκριτικό μονοπάτι III κωδικοποιείται από μία νησίδα παθογένειας η οποία αρχικά ονομάστηκε Hrp (Hypersensitive response and pathogenicity) (Lindgren et al., 1986). Μέχρι σήμερα, είκοσι πέντε είδη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, έχει βρεθεί ότι διαθέτουν μία ή περισσότερες γονιδιακές νησίδες που κωδικοποιούν συστατικά του συστήματος πρωτεϊνικής έκκρισης τύπου III, π.χ. οι πρωτεΐνες παθογένειας της *Yersinia* – Yops (Cornelis, 1997; Ταμπακάκη, 1999). Το εκκριτικό σύστημα τύπου III αποτελείται από τουλάχιστον 20 πολυπεπίδια, εκ των οποίων μόνο ένα εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη, ενώ τα υπόλοιπα βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηριακού φακέλου. Ορισμένες από τις συντηρημένες γενετικά πρωτεΐνες φαίνεται να είναι: η εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη HrcC, οι εσωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες/πρωτεΐνες πλήρους ενσωμάτωσης της μεμβράνης HrcR, HrcS, HrcT, HrcU, HrcV, οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες HrpQ, HrcQ, HrpE και η ATPase-HrcN η οποία παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για την εκκριτική διαδικασία.

(Salmond, 1994), ενώ δομείται από μικρές πρωτεΐνες (6-120 αμινοξέα), οι οποίες σχηματίζουν κυρίως δομές α -έλικας (Zhang et al., 2006). Η HrpA είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη του αγωγού Hrp, του βακτηρίου *P. syringae* (Roine et al., 1997; Hu et al., 2001) και κρίνεται απαραίτητη για την πυροδότηση της HR (Roine et al., 1997).

1.5.4 Ο ρόλος των χαρπινών στους φυτικούς οργανισμούς

Η συμβολή των χαρπινών κατά την ενσωμάτωσή τους σε φυτικούς οργανισμούς φαίνεται να είναι πολυδιάστατη. Έρευνες αποδεικνύουν ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη τους (Dong et al., 2004; Wu et al., 2007; Chen et al., 2008a,b), στην άμυνα ενάντια σε παθογόνα (Liu et al., 2006; Ren et al., 2006) και έντομα (Dong et al., 2004), καθώς και σε αβιοτικούς παράγοντες, όπως η ξηρασία (Dong et al., 2005; Zhang et al., 2007) και η αλατότητα (Ren et al., 2006).

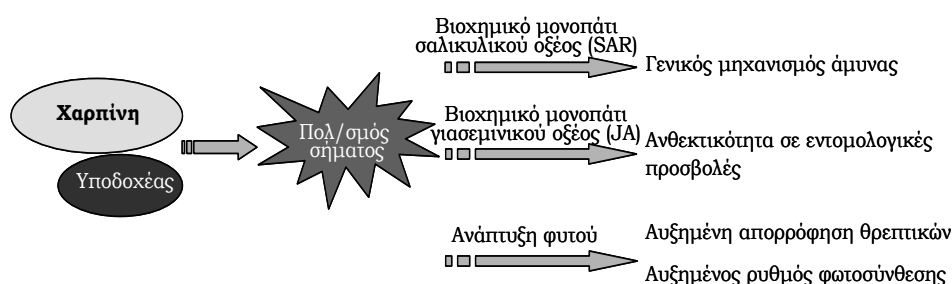
Όπως αναφέρεται από τους Dong et al. (2004), η χαρπίνη HrpNEa, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hrpNEa* του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, σε φυτά *A. thaliana* φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη τους και προάγει την ανθεκτικότητα σε έντομα, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού του αιθυλενίου (ET). Επίσης, ενεργοποιεί το μονοπάτι του αμπισισικού οξέος (ABA), επάγοντας την ανθεκτικότητα φυτών *A. thaliana* υπό συνθήκες ξηρασίας (Dong et al., 2004). Η χαρπίνη HrpZ του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* φαίνεται να επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) (He et al., 1993), την επίκτητη διασυστηματική ανοχή (Strobel et al., 1996) και την έκφραση σχετιζόμενων με την άμυνα γονιδίων (Gopalan et al., 1996) όταν εκχέεται στον αποπλαστικό χώρο των φυτών. Διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* και τεύτλων, που εκφράζουν το γονίδιο *hrpZ* φαίνεται να είναι ανθεκτικά στον ιό της ριζομανίας των τεύτλων (BNYVV) (Pavli et al. 2011). Ένα επαγόμενο από χαρπίνη γονίδιο (*hrfI*), προερχόμενο από το βακτήριο *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, φαίνεται να παρέχει μη εξειδικευμένη ανθεκτικότητα στο μύκητα *Magnaporthe grisea* (Shao et al., 2008).

Ο πολυδιάστατος αυτός ρόλος τους καθώς και η επιτακτική ανάγκη δημιουργίας και χρήσης χημικών ενώσεων φιλικών προς το περιβάλλον από τους παραγωγούς, οδήγησε στην εμπορική παραγωγή σκευασμάτων με δραστικές ουσίες, οι οποίες επάγοντας τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών, παρέχουν έμμεση προστασία σε προσβολές παθογόνων (Lyon & Newton, 2000) και σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Το πρώτο εμπορικό σκεύασμα χαρπίνης που κυκλοφόρησε στις Η.Π.Α. είναι το Messenger® /Harp-N-Tek Harpin Protein (Eden Bioscience Corporation) και δρα ως διεγέρτης των αμυντικών μηχανισμών των φυτών. Δραστική ουσία του Messenger είναι η χαρπίνη HrpNEa που προέρχεται από το βακτήριο *Erwinia amylovora*. Το Messenger παρέχει προστασία ενάντια μυκήτων, βακτηρίων, ιών, νηματωδών και εντόμων καθώς και κατά την επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων, σε διάφορες καλλιέργειες όπως στην πιπεριά (Diaz-Perez, 2007). Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί ότι συμβάλλει στην ταχύτερη και καλύτερη ανάπτυξη των φυτών και ευρωστία, με αποτέλεσμα την πρωίμηση και την αύξηση της παραγωγής (Βακαλουνάκης & Φραγκιαδάκης, 2003), ενώ δε φαίνεται να προκαλεί περιβαλλοντικές

επιπτώσεις, εξαιτίας της ταχείας διασπώμενης φύσεως της χαρπίνης και της μη επιβλαβούς αλληλεπίδρασής της με ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς.

1.5.5 Εμπλοκή των χαρπινών στα βιοχημικά μονοπάτια άμυνας και ανάπτυξης των φυτών

Οι χαρπίνες εμπλέκονται στα αλληλεπιδρώντα βιοχημικά μονοπάτια του σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος, καθώς και στο αναπτυξιακό μονοπάτι, επηρεάζοντας το ρυθμό φωτοσύνθεσης και την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από το έδαφος (Kim et al., 2000; Jang et al., 2006; Oh et al., 2007).



Εικόνα 1.3: Απεικόνιση του ρόλου των χαρπινών στα φυτά (Pavli et al., 2008)

1.5.5.1 Βιοχημικό μονοπάτι σαλικυλικού οξέος

Το σαλικυλικό οξύ (SA) παράγεται στους χλωροπλάστες των φυτών. Είναι προϊόν του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών και σχηματίζεται μέσω της υδροξυλίωσης του βενζοϊκού οξέος. Είναι άμεσα συνδεδεμένο με την ανάπτυξη επίκτητης διασυστηματικής αντοχής (SAR), χάρη την ιδιότητά του να μετακινείται εντός του ηθμού. Η απαραίτητη παρουσία του SA για επαγωγή της SAR αποδείχθηκε έπειτα από τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών καπνού και *A. thaliana*, τα οποία εξέφραζαν το βακτηριακής προέλευσης γονίδιο *nahG*, που κωδικοποιεί τη σαλικυλική υδροξυλάση, η οποία μετατρέπει το SA σε κατεχόλη (Gaaffney et al., 1993). Στα διαγονιδιακά φυτά παρατηρήθηκε η συσσώρευση μικρής ποσότητας SA, έπειτα από την προσβολή παθογόνου. Η εξωγενής εφαρμογή σαλικυλικού οξέος φαίνεται να προάγει την ανθεκτικότητα ενάντια ιών, όπως του ιού του μωσαϊκού του καπνού (TMV) (Raskin, 1992). Γενικά, το SA φαίνεται να συμμετέχει:

- στη βλαστικότητα των σπόρων
- στη φωτοσυνθετική διαδικασία
- στη διαδικασία της διαπνοής
- στην ανάπτυξη
- στην άνθηση

- στη γήρανση (San Vicente & Plasencia, 2011)

Αν και το σαλικυλικό οξύ απαιτείται για την επαγωγή της SAR, ωστόσο ερώτημα τίθεται για το αν αποτελεί τη σηματοδοτική ουσία (Vernooij et al., 1994), παρότι η συσσώρευσή του κρίνεται απαραίτητη σε μικρές ποσότητες για τη μεταφορά του σήματος (Meuwly et al., 1995; Vernooij, 1995). Το γονίδιο *NPRI* φαίνεται να είναι στενά συνδεδεμένο με την επαγωγή της SAR και τη ρύθμιση της ανοσοποίησης (Dong & Durrant, 2004). Η πρόκληση τυχαίων μεταλλαγών σε φυτά *A. thaliana* και ο έλεγχος ανάπτυξης της SAR, έδειξε ότι ορισμένα φυτά, δεν αντιδρούσαν στο SA. Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των φυτών ήταν η μετάλλαξη του γονιδίου *NPRI/NIMI* (Non-Expresser of PR Genes I / Non-Inducible Immunity I)1. Επίσης, τα φυτά αυτά παρουσίαζαν αυξημένη ευαισθησία σε παθογόνα και πρόβλημα στην έκφραση αντοχής που σχετίζεται με *PR* γονίδια. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα *npr1*- φυτά βρέθηκαν να παρουσιάζουν μειωμένη αντοχή στην τοξικότητα του SA και να συσσωρεύουν ενδογενώς SA σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις, οπότε το γονίδιο *NPRI* φαίνεται να συμμετέχει τόσο στην αποτροπή συσσώρευσης υψηλών συγκεντρώσεων SA στους ιστούς, όσο και στο ρυθμιστικό έλεγχο της βιοσύνθεσής του. Τέλος, υπερέκφραση του *NPRI* έδειξε ότι επάγει μεγάλης κλίμακας ανθεκτικότητα στα φυτά (Μοσχογιάννη, 2010).

Επίκτητη Διασυστηματική Αντοχή (SAR)

Ως επίκτητη διασυστηματική αντοχή (systemic acquired resistance, SAR) καλείται η άμυνα των φυτών που αναπτύσσεται έπειτα από αντίδραση υπεραίσθησίας σε κάποιο παθογόνο και μεταδίδεται διασυστηματικά σε μη προσβεβλημένα μέρη του φυτού (Agrios, 2005). Η SAR αναπτύσσεται έπειτα από την ενεργοποίηση μηχανισμών όπως:

- η αντίδραση υπεραίσθησίας (HR)
- η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)
- η παραγωγή αναστολέων πρωτεΐναιών
- η δημιουργία δομικών φραγμών (εναπόθεση λιγνίνης)
- η σύνθεση και συσσώρευση φυτοαλεξινών
- η διέγερση γονιδίων που συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού μέσω της δράσης πρωτεϊνών ανθεκτικότητας,

Κατά την εκδήλωση της SAR εκφράζεται μία ομάδα γονιδίων, αναφερόμενα ως γονίδια SAR (Ward et al., 1991). Σημαντική προσπάθεια έχει γίνει στον εντοπισμό και την απομόνωση βιοχημικών δεικτών για την επαγωγή της SAR ώστε να είναι διακριτή από τις υπόλοιπες αμυντικές αποκρίσεις των φυτών. Μια ομάδα πρωτεϊνών (SAR πρωτεΐνες), φαίνεται να σχετίζονται με τη διατήρηση της SAR (Neuenschwander et al., 1996). Ανάλυση των πρωτεϊνών SAR έδειξε ότι πολλές από αυτές ανήκουν στην κατηγορία των PR

πρωτεϊνών. Οι PR πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη SAR διακρίνονται σε 14 ομάδες (Τζάμος, 2007):

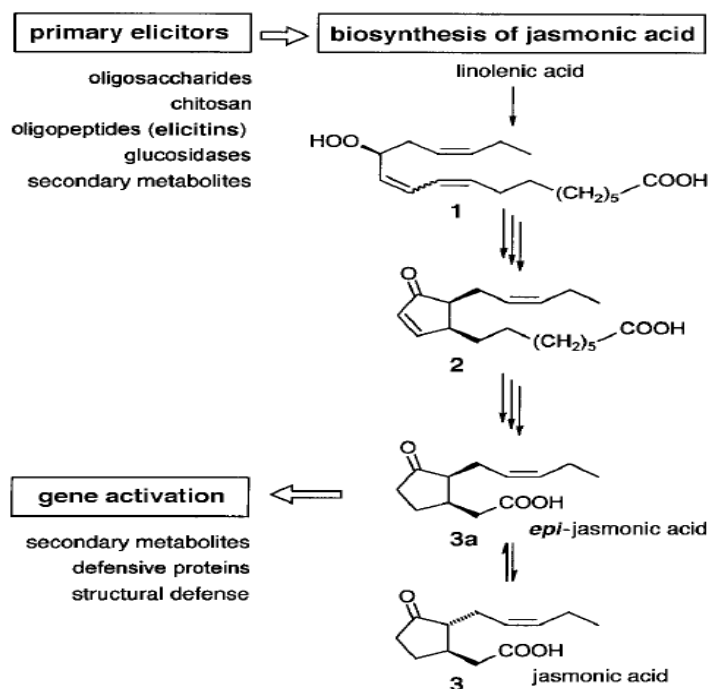
Πίνακας 1.1: Κατηγορίες και ιδιότητες των PR πρωτεϊνών

Ομάδες PR πρωτεϊνών	Ιδιότητες
PR-1	Άγνωστη
PR-2	β-1,3-γλουκανάσες
PR-3	χιτινάσες τύπου I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	χιτινάσες τύπου I, II
PR-5	ανάλογο θαυματίνης
PR-6	παρεμπόδιση πρωτεϊνών
PR-7	Ενδοπρωτεΐνωση
PR-8	χιτινάση τύπου III
PR-9	Περοξειδάση
PR-10	Ριβονουκλεάση
PR-11	χιτινάση τύπου I
PR-12	Ντιφενσίνη
PR-13	Θειονίνη
PR-14	πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων

Τα είδη καθώς και το επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών διαφοροποιούνται ανάλογα με το φυτικό είδος. Για παράδειγμα, στο αγγούρι, η έκφραση όξινης PR-1 είναι ασθενής (Ryals et al., 1992), ενώ σε φυτά καπνού και *A. thaliana*, η έκφρασή της είναι η κυρίαρχα εκφραζόμενη πρωτεΐνη. Σε φυτά *A. thaliana*, οι επικρατείς δείκτες SAR είναι οι PR-1, PR-2, και PR-5 (Uknes et al., 1992).

1.5.5.2 Βιοχημικό μονοπάτι Ιασμονικού οξέος

Το Ιασμονικό οξύ (JA) και τα παράγωγά του (methyl jasmonate, MeJA) παράγονται κατά το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων από το λινολενικό οξύ. Σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί τα περισσότερα ένζυμα που εμπλέκονται στο μονοπάτι της βιοσύνθεσής του.



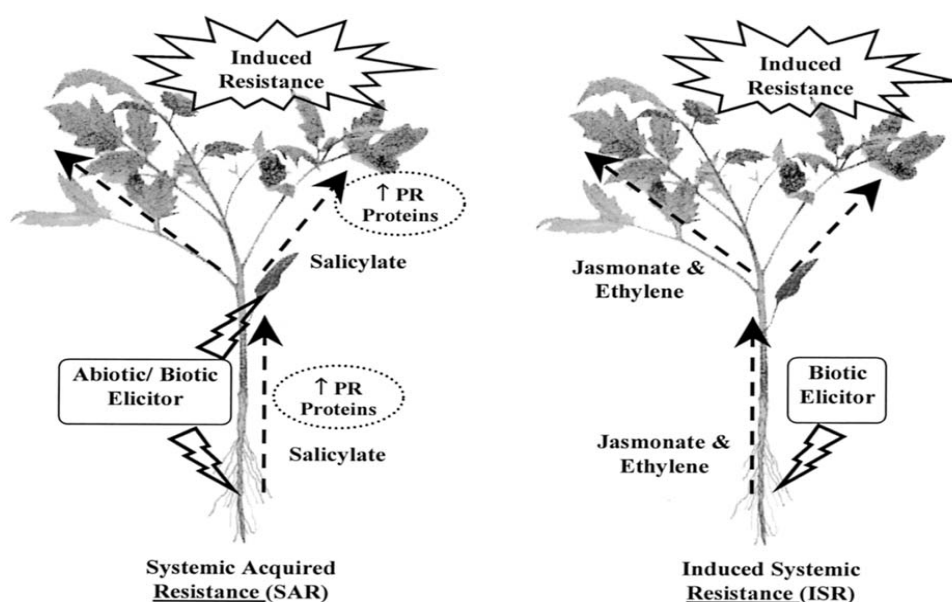
Εικόνα 1.4: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι του Ιασμονικού οξέος. Το JA παράγεται από το λινολενικό οξύ (LA), δια μέσου του οκταδεκανοειδούς μονοπατιού (Vick & Zimmermann, 1984). Έπειτα από λιποξείδωση, το ενδιάμεσο (13S)-υδροπéροξυ-9,11,15-οκταδεκατριενοϊκό οξύ (1) μετατρέπεται σε 12-οξοφυτοδιενοϊκό οξύ (2), το οποίο δρα ως φυτορμόνη. Μετατροπή του 12-οξοφυτοδιενοϊκού οξέος μέσω τριών κύκλων β-οξειδώσης τελικά οδηγεί στο σχηματισμό του Ιασμονικού οξέος (3)

Έρευνες έχουν δείξει ότι το JA ενεργοποιεί γονίδια που εμπλέκονται:

- στην ανθεκτικότητα ενάντια σε έντομα
- στην ανθεκτικότητα έναντι μικροοργανισμών
- στη βλαστική ανάπτυξη των φυτών
- στην παραγωγή καρπών και τη ζωτικότητα της γύρης
- στην αποθήκευση και συσσώρευση πρωτεϊνών
- στην ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων
- στη λειτουργία της φωτοσύνθεσης

Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η εξωγενής εφαρμογή του ιασμονικού οξέος ή των παραγώγων του επηρεάζει την ανάπτυξη των φυτών, την αποθήκευση και συσσώρευση πρωτεϊνών σε βλαστικά όργανα (VSPs) (Staswick, 1994), ενώ σχετίζεται με γονίδια που επάγονται έπειτα από έλλειψη νερού (Creelman & Mullet, 1995), έπειτα από μηχανικές βλάβες (Pearce et al., 1991; Creelman et al., 1992) και με σηματοδοτικά πεπτίδια των φυτών (Schaller et al., 1995). Παρουσία JA, παράγεται πληθώρα πρωτεϊνών που χαρακτηρίζονται από αντιμυκητιακή δράση, όπως η θειονίνη (Becker & Apel, 1992), η οσμωτίνη (Xu et al., 1994) και η PDF (Penninckx et al., 1996). Ομοίως, παρατηρείται η επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν φυτοαλεξίνες (Chs, Pal, HMGR) (Creelman et al., 1992; Choi et al., 1994) και

ουσίες που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών, όπως η πολυφαινολική οξειδάση (Doares et al., 1995), καθώς και η σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών (Boland et al., 1995; Kramell et al., 1995; Krummet et al., 1995). Αντιθέτως, το JA αποτρέπει την έκφραση γονιδίων εμπλεκόμενων στη λειτουργία της φωτοσύνθεσης (Bunker et al., 1995). Διαγονιδιακά φυτά κατάλληλα τροποποιημένα ώστε να μην αντιδρούν στην παρουσία JA, έχει αποδειχθεί ότι καθίστανται ανίκανα να επάγουν επαγόμενη διασυστηματική ανοχή (Induced Systemic Resistance ISR). Η ISR είναι μία μορφή διασυστηματικής ανθεκτικότητας η οποία διαφέρει, από τη SAR, ως προς τον επαγωγέα και ως προς τα μονοπάτια που εμπλέκονται σε αυτή (van Wees et al., 2000; Yan et al., 2002). Ως μεταφορείς του JA κατά την ISR, έχει προταθεί ότι δρουν είτε η Συστεμίνη, ένα πεπτίδιο 18 αμινικών οξέων που πιθανώς ελευθερώνεται από το σημείο μηχανικής βλάβης μέσω της υδρόλυσης ενός πολυπεπτιδίου (McGurl & Ryan, 1992), είτε μέσω της υδατικής φάσης του JA, η μορφή MeJA (Farmer & Ryan, 1990; Franceschi & Grimes, 1991).



Εικόνα 1.5: Σύγκριση των δύο τύπων ανθεκτικότητας, οι οποίες οδηγούν σε παρόμοιες φαινοτυπικές αποκρίσεις. Η SAR επάγεται ύστερα από έκθεση της ρίζας ή του φυλλώματος σε αβιοτικούς ή βιοτικούς παράγοντες, εξαρτάται από το SA και σχετίζεται με τις πρωτεΐνες παθογένειας (PR). Η ISR επάγεται από την έκθεση των ριζών σε βιοτικούς παράγοντες, εξαρτάται από το ET και το JA (ανεξάρτητη του SA) και δε σχετίζεται με τις PR. Ωστόσο, τα δύο μονοπάτια εμπλέκονται μοριακά (Gary et al., 2004).

1.5.5.3 Αναπτυξιακό & Φυσιολογικό μονοπάτι

Το αιθυλένιο θεωρείται η σημαντικότερη σηματοδοτική ουσία του αναπτυξιακού και του φυσιολογικού μονοπατιού των φυτών. Πρόκειται για μία ορμόνη αέριας μορφής που παράγεται από τη μεθειονίνη, με κατανάλωση ενέργειας υπό μορφή ATP, μέσω μιας διαδικασίας τριών σταδίων (McKeon et al., 1995). Το αιθυλένιο επηρεάζει φυσιολογικές και αμυντικές λειτουργίες των φυτών όπως:

- ο λήθαργος
- η διαφοροποίηση βλαστού-ρίζας
- ο ρυθμός ανάπτυξης
- η γήρανση
- η σύνθεση PR πρωτεϊνών και φυτοαλεξινών
- η απόκριση ουσιών κατά μηχανικών βλαβών και προσβολών από αρπακτικά (O'Donnel et al., 1996).
- η επαγωγή άμυνας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων (ξηρασία, ακραίες θερμοκρασίες, ακτινοβολία UV-B, όζον) (Morgan, 1997; Wilkinson et al., 2009)

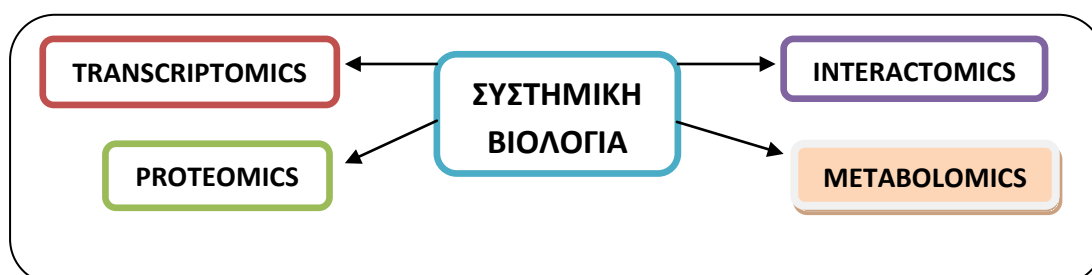
1.6 Συστημική Βιολογία – Βιολογία Συστημάτων

Πολλά πρακτικά προβλήματα που αφορούν τη γεωργία αντιμετωπίζονται πλέον μέσω της Συστημικής Βιολογίας, όπως η μελέτη διάφορων ποσοτικών χαρακτηριστικών (QTLs) και θέματα καταπόνησης και άμυνας των φυτών. Ο τομέας της Συστημικής Βιολογίας περιλαμβάνει την ολιστική περιγραφή και επεξεργασία πληροφοριών από διαφορετικές γονιδιωματικές μελέτες καθώς και τη μελέτη των αλληλεπιδράσεών τους. Ανεξάρτητα από τις τεχνικές (omics) που χρησιμοποιούνται για την απόκτηση δεδομένων, ως στόχος της Συστημικής Βιολογίας θεωρείται ο καθορισμός της δομής, της δυναμικής των βιολογικών συστημάτων και ο έλεγχός τους. Για το σκοπό αυτό έγινε ενσωμάτωση των πολυδιάστατων δεδομένων σε στατικά και δυναμικά δίκτυα:

- δίκτυο γονιδίου-μεταβολίτη - στατικό
- δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών - στατικό
- δίκτυο αλληλεπίδρασης ρυθμιστικών και καταβολικών μεταγραφημάτων – στατικό
- ρυθμιστικό γονιδιακό δίκτυο – δυναμικό (Yuan et al., 2008)

1.6.1 Συστημικές προσεγγίσεις/omics

Συνολικά έχουν αναπτυχθεί τέσσερις μέθοδοι προσέγγισης στη Συστημική Βιολογία: i) η μεταγραφομική/τρανσκριπτομική (transcriptomics) κατά την οποία γίνεται ανάλυση των κωδικευόμενων και μη RNAs, ii) η πρωτεομική (proteomics), που αφορά την ανάλυση πρωτεϊνών (Galbraith, 2006), iii) η μεταβολομική (metabolomics) όπου ερευνάται το σύνολο ή η πλειοψηφία των μεταβολιτών ενός οργανισμού (Hall, 2006) και iv) η αναφερόμενη ως 'interactomics' που περιλαμβάνει τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών (Li et al., 2004).



Εικόνα 1.6: Μέθοδοι προσέγγισης της Συστημικής Βιολογίας

1.6.2 Η συμβολή της Συστημικής Βιολογίας στη μελέτη απόκρισης των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις

Σήμερα, συναντάμε μία πληθώρα εφαρμογών των τεσσάρων προαναφερόμενων προσεγγίσεων στη μελέτη της απόκρισης των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις. Οι Kusano et al. (2011) μελέτησαν την επίδραση της ακτινοβολίας UV-B σε φυτά *A. thaliana* χρησιμοποιώντας μεταβολομική και τρανσκριπτομική ανάλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορετική απόκριση των φυτών ανάλογα με τη χρονική διάρκεια της καταπόνησής τους, επάγοντας αρχικά την παραγωγή ρυθμιστικών πρωτογενών μεταβολιτών και κατόπιν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών σχετιζόμενων με την άμυνα. Σημαντική είναι και η συμβολή των διαφορετικών μεθόδων στη διερεύνηση των σηματοδοτικών μονοπατιών κάτω από συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης. Οι Vanderauwera et al. (2005) χρησιμοποιώντας ανάλυση μικροσυστοιχιών, επιβεβαίωσαν ότι η παρουσία H_2O_2 εμπλέκεται στα σηματοδοτικά μονοπάτια κατά την επίδραση αλατότητας, ξηρασίας, ακραίων θερμοκρασιών και έντονης ακτινοβολίας. Πρόοδος έχει υπάρξει τα τελευταία χρόνια όσον αφορά και τη μελέτη των δικτύων σε καλλιεργούμενα είδη (Zobayed et al., 2005; Charlton et al., 2008; Shulaev et al., 2008).

Στην πράξη έχουν χρησιμοποιηθεί και οι τέσσερις τύποι δικτύων, συμβάλλοντας στην ανακάλυψη αρκετών γονιδίων επαγόμενων ως απόκριση των φυτών σε διάφορα είδη αβιοτικών καταπονήσεων (Cooper et al., 2003). Αναφορικά, για τη μελέτη της απόκρισης φυτών *A. thaliana* σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων χρησιμοποιήθηκε ένα δίκτυο γονίδιο-μεταβολίτη (Hirai et al., 2004; Nikiforova et al., 2005). Επίσης, ένα δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τον προσδιορισμό γονιδίων στο σιτάρι, εμπλεκόμενα σε αβιοτικές καταπονήσεις και τον έλεγχο ανθοφορίας του (Tardif et al., 2007). Τέλος, ένα μεταγραφικό ρυθμιστικό δίκτυο βοήθησε στο διασαφήνισμο των μοριακών μηχανισμών αφυδάτωσης και ανταπόκρισης στο ψύχος φυτών *A. thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki et al., 2006).

Οι δημοσιεύσεις βασιζόμενες στον τομέα της Συστημικής Βιολογίας, για τη μελέτη της άμυνας των φυτών κάτω από συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, παρουσίασαν ραγδαία αύξηση κατά τα δύο τελευταία έτη (Cramer et al., 2011), ενώ αναμένεται ότι η Βιολογία Συστημάτων θα προάγει την περαιτέρω κατανόηση της σύνθεσης, της μεταφοράς, της δυναμικής, της ρύθμισης δευτερογενών μεταβολιτών και της γονιδιακής τους έκφρασης κατά την άμυνα των φυτών (Sweetlove & Fernie, 2005; Hirai et al., 2007; Zulak et al., 2007). Για την πλήρη αξιοποίηση των συστημάτων κρίνεται αναγκαία η αναβάθμιση του τομέα της βιοπληροφορικής και της εφαρμοσμένης τεχνολογίας των βιοεπιστημών.

1.7 Μεταβολομική ανάλυση (metabolomics)

Η μεταβολομική ανάλυση είναι μια ταχύτατα αναπτυσσόμενη τεχνολογία, η οποία συνέβαλλε σημαντικά στην αποσαφήνιση της συμβολής, γενικευμένης ή εξειδικευμένης, των μεταβολιτών στην άμυνα των φυτών, κάτω από διαφορετικές αβιοτικές καταπονήσεις (Kaplan et al., 2004; Wienkoop et al., 2008). Η τεχνολογία αυτή βρίσκει εφαρμογή στη μελέτη της συμπεριφοράς των φυτικών οργανισμών υπό συνθήκες ακραίων θερμοκρασιών (Kaplan et al. 2004, 2007), αλατότητας (Kim et al., 2007), επίδρασης βαρέων μετάλλων (Lay et al., 2006) και οξειδωτικής καταπόνησης (Baxter et al., 2007), καθώς και συνδυασμών τους (συνθήκες ξηρασίας και ακραίων υψηλών θερμοκρασιών) (Rizhsky et al., 2004). Κατά αυτόν τον τρόπο, μέσω της μεταβολομικής κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός διαφόρων επαγόμενων ουσιών και μορίων μεταγωγής σήματος, όπως το SA, προϊόντων υποβάθμισης της κυτταρικής μεμβράνης (ROS) και αντιοξειδωτικών ενώσεων (Mittler et al., 2004). Παρόλα αυτά, πρόκληση παραμένει η πλήρης περιγραφή του μεταβολισμού για κάθε φυτικό οργανισμό. Υπολογίζεται ότι οι φυτικοί οργανισμοί παράγουν συνολικά περί τους 200.000 διαφορετικούς μεταβολίτες (Fiehn et al., 2001). Είναι συνεπώς προφανές ότι η ολοκληρωμένη κατανόηση του μεταβολισμού κάθε είδους θεωρείται κρίσιμη για τη συσχέτιση της λειτουργίας των γονιδίων με τις εκάστοτε λειτουργίες τους.

1.7.1 Μέθοδοι μεταβολομικής ανάλυσης

Σήμερα, η ταυτοποίηση μεταβολιτών (metabolic fingerprinting), ο προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ (metabolite profiling) καθώς και η στοχευμένη ανάλυσή τους (targeted analysis) αποτελούν σημαντικές προσεγγίσεις της μεταβολομικής ανάλυσης (Fiehn, 2002; Halket et al., 2005; Shulaev, 2006).

Ταυτοποίηση μεταβολιτών (metabolic fingerprinting)

Η μεθοδολογία χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό μεταβολιτών οι οποίοι συνδέονται με την απόκριση των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις, χωρίς ακριβή όμως προσδιορισμό ή ποσοτικό προσδιορισμό των διαφορετικών μεταβολιτών των δειγμάτων. Πληθώρα αναλυτικών τεχνικών βοηθά στην αποτύπωσή τους όπως: NMR (Krishnan et al., 2005), MS (Goodacre et al., 2003), Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry και Fourier transform infrared (FT-IR) σπεκτροσκοπία (Johnson et al., 2003). Ένας από τους περιορισμούς της φασματοσκοπίας NMR είναι η χαμηλή της ευαισθησία, γεγονός που καθιστά δύσκολο τον εντοπισμό μικρών ποσοτήτων κυτταρικών μεταβολιτών. Η MS θεωρείται περιπλοκότερη λόγω των φασμάτων που παράγονται αλλά διαθέτει το πλεονέκτημα της μεγαλύτερης ευαισθησίας και διακριτικής ικανότητας έναντι της NMR.

Προσδιορισμός μεταβολικού προφίλ (metabolite profiling)

Η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ έχει ως στόχο την ταυτόχρονη μέτρηση ενός συνόλου μεταβολιτών σε ένα δείγμα. Μεγάλος είναι ο αριθμός των εφαρμοσμένων αναλυτικών τεχνικών για τον προσδιορισμό μεταβολικών προφίλ (Shulaev, 2006), όπως η NMR, η GC-MS, η LC-MS, η CE-MS και η FT-IR φασματοσκοπία. Μέχρι σήμερα, η GC-MS θεωρείται η πιο ανεπτυγμένη αναλυτική μέθοδος. Η χρήση της GC-MS έχει συμβάλλει στον προσδιορισμό των προφίλ αρκετών εκατοντάδων ενώσεων, διαφορετικών τάξεων χημικών ουσιών (σακχάρων, οργανικών οξέων, αμινοξέων, αλκοολών, σακχάρων, αρωματικών αμινών και λιπαρών οξέων). Βασικό μειονέκτημα θεωρείται η ικανότητά της για ανάλυση μόνο πτητικών ενώσεων ή ενώσεων που εξαχνώνονται. Για τις μη πτητικές ενώσεις, η LC-MS και η CE-MS αποτελούν την πιο αξιόπιστη αναλυτική τεχνική, ιδίως μετά την ανάπτυξη της τεχνολογίας της εξαιρετικά υγρής χρωματογραφίας, που αυξάνει δραματικά την αποδοτικότητα διαχωρισμού και μειώνει το χρόνο ανάλυσης των δειγμάτων (Giri et al., 2007; Granger et al., 2007).

Στοχευμένη μεταβολική ανάλυση (targeted analysis)

Η στοχευμένη μεταβολική ανάλυση χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της ακριβούς συγκέντρωσης ενός περιορισμένου αριθμού γνωστών μεταβολιτών, παρέχοντας ένα χαμηλό επιτρεπτό όριο ανίχνευσης. Χρησιμοποιείται ευρέως για το δυναμικό προσδιορισμό περιορισμένου αριθμού μεταβολιτών κάτω από συγκεκριμένες αβιοτικές καταπονήσεις και για τη συγκριτική ανάλυση μεταβολιτών. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων είναι η καθαρότητα των δειγμάτων και η ύπαρξη ενός σταθερού ισοτόπου, διότι πολλοί μεταβολίτες καθώς και ενδιάμεσα προϊόντα τους εμπλέκονται στην απόκριση των φυτών σε διαφορετικές συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης. Μία εναλλακτική προσέγγιση για τη διασφάλιση της ύπαρξης σταθερού ισοτόπου έχει αναπτυχθεί κατά την οποία γίνεται *in vivo* εμπλουτισμός των μεταβολιτών με σταθερά ισότοπα ^{13}C ή ^{15}N , έπειτα από καλλιέργεια φυτικών κυττάρων σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει πηγές ^{13}C ή ^{15}N (Hegeman et al., 2007; Huege et al., 2007).

1.8 Δευτερογενής Μεταβολισμός

1.8.1 Δευτερογενείς Μεταβολίτες

Πρόκειται για οργανικές ενώσεις με αμυντικό ρόλο, οι οποίες δεν εμπλέκονται σε αναπτυξιακές λειτουργίες των φυτών, όπως η φωτοσύνθεση, η αναπνοή και η διαφοροποίηση, μεταφορά, μετακίνηση και αφομοίωση θρεπτικών ουσιών (Hartmann, 1991).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, ανάλογα με τη βιοσυνθετική οδό από την οποία παράγονται και το κεντρικό μόριο που τους αποτελεί. Διακρίνονται σε i) φαινολικές ενώσεις, ii) τερπένια και iii) θειούχες & αζωτούχες ενώσεις.

Φαινολικές ενώσεις

Κοινό μόριο όλων των φαινολικών ενώσεων είναι ένας φαινολικός αρωματικός δακτύλιος. Η βιοσύνθεσή τους γίνεται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού του σικιμικού οξέος. Ο ρόλος τους φαίνεται να είναι αμυντικός ενάντια σε παθογόνα και ριζικούς παρασιτικούς νηματώδεις (Wuyts et al., 2006). Στην ομάδα των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνονται ενώσεις όπως οι κουμαρίνες, οι λιγνίνες, τα φλαβονοειδή και οι ταννίνες.

Τερπένια

Πρόκειται για τη μεγαλύτερη ομάδα μεταβολιτών που περιλαμβάνει ενώσεις αποτελούμενες από μία βασική μονάδα ισοπεντανίου και χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία. Η βιοσύνθεσή τους πραγματοποιείται μέσω των μεταβολικών οδών του μεβαλονικού και του πυροσταφυλικού οξέος. Πολλά παράγωγα των τερπενίων και μονοτερπένια φαίνεται να αποτελούν τοξίνες, ενώ αρκετά σесκιτερπένια αποτελούν αποθητικά μόρια για φυτοφάγα έντομα και ζώα. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει επίσης ενώσεις όπως καροτενοειδή, γιββερελίνες, σαπωνίνες, στεροειδή καθώς και το αμπισικό οξύ (ABA).

Θειούχες & Αζωτούχες ενώσεις

Στην κατηγορία αυτή εμπεριέχονται ενώσεις που έχουν S ή N στο μόριό τους, που συντίθενται κυρίως από κοινά αμινοξέα (Rosenthal et al, 1992; Van Etten et al., 2001). Πρόσφατες *in vitro* έρευνες σε φυτά με τροποποιημένη την έκφραση δευτερογενών μεταβολιτών, επιβεβαίωσαν τον αμυντικό τους ρόλο (Mansfield, 2000; Mes et al., 2000).

Οι θειούχες ενώσεις περιλαμβάνουν ουσίες όπως η γλουταθειόνη, οι φυτοαλεξίνες, οι ντιφενσίνες, η θειονίνη και η αλλινίνη, που φαίνεται να συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με την άμυνα των φυτών ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Hell, 1997; Crawford et al., 2000; Leustek et al., 2000; Saito, 2004; Grubb & Abel, 2006; Halkier & Gershenzon, 2006), ενώ ορισμένες θειούχες ενώσεις (κυστεΐνη, γλουταθειόνη, φυτοαλεξίνες) φαίνεται να προάγουν την επαγόμενη ανθεκτικότητα, ενάντια μυκήτων, από το S (SIR) (Bloem et al, 2005, 2007).

Οι αζωτούχες ενώσεις περιλαμβάνουν αλκαλοειδή, γλυκοζίτες, κυανογονικά γλυκοσίδια και μη πρωτεϊνικά αμινοξέα, οι οποίες συμβάλλουν στην άμυνα κατά των φυτοφάγων εντόμων.

1.8.2 Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών στην άμυνα των φυτών

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες εμπλέκονται τόσο στη πρωτογενή/μόνιμη άμυνα των φυτών σε παθογόνα (φυτοαντισιπίνες) όσο και στην επαγόμενη κατά την επίθεση παθογόνων άμυνά τους (φυτοαλεξίνες) (Grayer & Harborne, 1994; Van Etten et al., 1994). Οι φυτοαντισιπίνες είτε προϋπάρχουν με την ενεργή τους μορφή στα φυτά είτε μετατρέπονται στην ενεργή τους μορφή κατά την προσβολή, ενώ όσον αφορά τις φυτοαλεξίνες, πρόκειται για υδρόφοβες κυρίως ενώσεις, μικρού μοριακού βάρους που η συγκέντρωσή τους αυξάνεται αποκλειστικά κατά την εισβολή του παθογόνου.

Επίσης, συμβάλλουν στην προστασία των φυτικών οργανισμών από παράσιτα και αρπακτικά, αποτρέποντας τη βρώση τους, ενώ γενικότερα συμμετέχουν στην αλληλοπάθεια και την αλληλεπίδραση των φυτών με τους υπόλοιπους οργανισμούς (Schafer et al., 2009). Επιπλέον, σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος τους στην άμυνα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, όπως στην έκθεση σε ακτινοβολία UV-B και την επίδραση αλατότητας (Khatkar & Kuhad, 2000).

Οι πολυόλες αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα δευτερογενών μεταβολιτών εμπλεκόμενων στην άμυνα των φυτών. Πρόκειται για κυκλικές ή γραμμικές, ωσμωτικά διαλυτές ενώσεις, μικρού μοριακού βάρους, που προέρχονται από τη διάσπαση-πολυυδροξυλίωση αλδοζών ή κετοζών. Ο όρος πολυόλη αναφέρεται στις ενώσεις με τρεις ή περισσότερους άνθρακες, όπου κάθε ένας φέρει μια ομάδα $-OH$; η απλούστερη άκυκλη πολυόλη είναι η γλυκερίνη. Συχνά παράγονται μέσω της φωτοσυνθετικής διαδικασίας και για τη μεταφορά τους δεν χρειάζεται κατανόηση ενέργειας. Στις πολυόλες ανήκουν ουσίες όπως η μαννιτόλη, η σορβιτόλη, η μυο-ινοσιτόλη και διάφοροι μονοσακχαρίτες. Η συσσώρευση των πολυολών γίνεται συνήθως στο χυμοτόπιο, εκτός της μυο-ινοσιτόλης όπου παρατηρείται η συγκέντρωσή της στη μεμβράνη του τονοπλάστη.

Ο ρόλος των πολυολών είναι πολυδιάστατος, ενώ εμπλέκονται κατά κύριο λόγο στο μεταβολισμό και τη φυσιολογία των φυτών (Moing et al., 2000). Η μαννιτόλη και η σορβιτόλη (άκυκλες πολυόλες) εξυπηρετούν λειτουργίες όπως η δυνατότητα διακίνησης των σκελετών και της ενέργειας του άνθρακα, ενώ η συγκέντρωσή τους στα κύτταρα φαίνεται να αυξάνεται κατά την επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων, όπως η αλατότητα (Stoop et al., 1996), η ξηρασία (Patonnier et al., 1999) και το ψύχος (Noiraud et al., 2001), για την αντιστάθμιση της απώλειας ύδατος (Popp & Smirnoff, 1995; Tilahun et al., 2003). Η αντίχενυσή τους σε αποθηκευτικά όργανα των φυτών καθώς και στο φλοιό, απουσία των άμεσα συσχετιζόμενων ενζύμων, αποδεικνύει τη μεταφορά τους σε μεγάλες αποστάσεις, από τα φύλλα. Έρευνες διεξάγονται όσον αφορά τον τρόπο μεταφοράς των πολυολών χρησιμοποιώντας ως φυτό μοντέλο το σέλινο (*Apium graveolens*). Σε φυτά *A. thaliana* παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης ενός μεταφορέα προλίνης (ProT2) κάτω από την επίδραση αλατότητας και ξηρασίας (Rentsch et al., 1996). Επίσης, κατά την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών σε φυτά σόγιας παρουσιάστηκε αύξηση της συγκέντρωσης πινιτόλης (Guo et al., 1995). Οι πολυόλες συμβάλλουν ακόμα στο σχηματισμό σταθερών συμπλόκων βορίου, όπου επηρεάζουν τη σταθερότητα και παρέχουν προστασία στις κυτταρικές μεμβράνες. Συγκεκριμένα, η απουσία πολυολών όπως η σορβιτόλη, η μαννιτόλη και η

γαλακτιτόλη οδηγεί σε μειωμένη κινητικότητα και συγκέντρωση βορίου, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενζύμων κατάλυσης των πολυολών και την οξειδωσή τους σχηματίζοντας ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS). Επιπλέον, σε παρασιτικά φυτά, η μαννιτόλη ενδέχεται να παίζει σημαντικό ρόλο τόσο κατά τη μετακίνηση νερού από τα φυτά ξενιστές, όσο και για τη φωτοσυνθετική τους 'επίκτητη' δραστηριότητα (Williamson et al., 2002).

Ένα ακόμα παράδειγμα δευτερογενών μεταβολιτών εμπλεκόμενων στην άμυνα των φυτών ενάντια στην επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων αποτελούν αρκετές πολυαμίνες (PAs), με κυριότερες την πουτρεσκίνη (Put), τη σπερμιδίνη (Spd) και τη σπερμίνη (Spm), όπου συμμετέχουν στην άμυνα των φυτών κατά την επίδραση αλατότητας (Galston et al., 1997), ακραίων χαμηλών θερμοκρασιών, ξηρασίας και ακτινοβολίας UV-B (Singh & Tuteja, 2010)

Σκοπός της εργασίας

Με δεδομένη την πολύπλευρη επίδραση των χαρπινών στα φυτά, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της διαγονιδιακής έκφρασης της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}} τόσο στον αναπτυξιακό φαινότυπο όσο και στην απόκριση φυτών που υπόκεινται σε ποικίλους παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης καθώς και η μελέτη των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή.

Στα πλαίσια αυτά, παράχθηκαν διαγονιδιακά φυτά του αγρίου είδους καπνού *N. benthamiana* (T2 γενιά) τα οποία εκφράζουν τη χαρπίνη που προέρχεται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola στην εκκρινόμενη μορφή της, ώστε να κατευθύνεται η συσσώρευση της πρωτεΐνης εξωκυτταρικά (SP/HrpZ_{P_{sph}}). Στοχεύοντας στη μελέτη της επίδρασης της χαρπίνης στο αναπτυξιακό προφίλ των διαγονιδιακών φυτών, πραγματοποιήθηκε αξιολόγησή τους σε μορφολογικό και φυσιολογικό επίπεδο, λαμβάνοντας υπόψη συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Στη συνέχεια, τα διαγονιδιακά φυτά εκτέθηκαν σε ποικίλες συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης και κατόπιν αξιολογήθηκε η απόκριση τους σε σύγκριση με φυτά-μάρτυρες. Προκειμένου να μελετηθεί η τυχόν ενεργοποίηση μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών, ακολούθησε έλεγχος για την επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται σε σχετικά βιοχημικά μονοπάτια και προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ. Τα αποτελέσματα αυτά αναμένεται να διαφωτίσουν την επίδραση της έκφρασης της χαρπίνης σε διαγονιδιακά φυτά που υπέστησαν αβιοτικού τύπου καταπονήσεις.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Για τον σταθερό μετασχηματισμό, μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*, χρησιμοποιήθηκε το άγριο είδος καπνού *Nicotiana benthamiana*, ευρέως χρησιμοποιούμενο ως φυτό - μοντέλο για ερευνητικούς σκοπούς.

2.2 Βακτηριακά στελέχη & Πλασμίδια

Για το σταθερό μετασχηματισμό φυτών του είδους *N. benthamiana* χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens* C58C1. Το βακτηριακό στέλεχος περιείχε το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-*hrpZ_{P_{sph}}* ή το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/*hrpZ_{P_{sph}}* (Tampakaki & Panopoulos, 2000). Τα πλασμίδια αυτά περιείχαν δύο διαφορετικές μορφές του γονιδίου *hrpZ* από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (μεγέθους 1 kb): i) το γονίδιο εκφράζει την κανονική μορφή της πρωτεΐνης HrpZ_{P_{sph}} ii) το γονίδιο εκφράζεται ως προϊόν σύντηξης με το πεπτιδίο έκκρισης PR1, παράγοντας συνεπώς την εκκρινόμενη μορφή της πρωτεΐνης (SP/*hrpZ_{P_{sph}}*), ώστε να κατευθύνεται η συγκέντρωση της χαρπίνης εξωκυτταρικά (Tampakaki & Panopoulos, 2000). Οι πλασμιδιακές κατασκευές χορηγήθηκαν από την κα. Α. Ταμπακάκη (Επικ. Καθ., ΓΠΑ).

2.3 Ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών και φυτών-μαρτύρων

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη προέρχεται από προηγούμενη έρευνα κατά την οποία αναπτύχθηκαν μετασχηματισμένα φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* (T0 και T1 γενεών) που φέρουν τα διαγονίδια *hrpZ_{P_{sph}}* και SP/*hrpZ_{P_{sph}}* (Pavli et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη, οι επεμβάσεις αβιοτικής καταπόνησης καθώς και η μετέπειτα αξιολόγηση της ανθεκτικότητας αφορούσαν διαγονιδιακά φυτά T2 γενιάς.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η διαγονιδιακή φύση των απογόνων T2 γενιάς, πραγματοποιήθηκε βλάστηση των σπόρων σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Για το σκοπό αυτό, οι απόγονοι αυτογονιμοποίησης (T2 γενιά) των διαγονιδιακών T1 σειρών, εξετάστηκαν για τη διαγονιδιακή τους φύση μέσω βλαστικής επιλογής σε θρεπτικό μέσο (MS με βιταμίνες, NAA 0,1mg/l, BAP 1mg/l, 3% ζαχαρόζη και 5 gr/l agar) που περιείχε υγρομυκίνη (30 mg/l). Με στόχο να αξιολογηθεί η

αποτελεσματικότητα της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής, στις διαδικασίες βλάστησης σπόρων σε θρεπτικό μέσο επιλογής συμπεριλήφθηκαν και σπόροι άγριου τύπου.

Μετά από επώαση 1-2 εβδομάδων σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, παρατηρείται βλάστηση των σπόρων. Στο διάστημα αυτό καταμετρήθηκαν τα ανθεκτικά στην υδρομυκίνη φυτάρια και πραγματοποιήθηκε επιλογή των κατάλληλων T2 διαγονιδιακών σειρών, με βάση τη διάσπαση αυτών ως προς το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής.

Αφού επιλέχθηκαν οι κατάλληλες διαγονιδιακές σειρές (T2 γενιά), πραγματοποιήθηκε σπορά (05/04/2011) σε γλαστράκια με τύρφη, τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου (23C, 16/8 ώρες). Η πρώτη ανάδυση των φυταρίων παρατηρήθηκε στις 10/04/2011 και ακολούθησε μεταφύτευσή τους (09/05/2011), με σκοπό τη μεμονωμένη ανάπτυξή τους και τη διευκόλυνση στους χειρισμούς.

Για τις ανάγκες του πειράματος συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες και φυτά αγρίου τύπου (46).

Πίνακας 2.1: Διαγονιδιακές σειρές (T0) και αριθμός φυτών T2 γενιάς που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων.

Διαγονιδιακή σειρά T1 / WT	Τύπος έκκρισης	Αριθμός T2 φυτών
172-3	Ενδοκυτταρική (HrpZ _{P_{sph}})	5
177-4		8
Z8		15
161-12	Εξωκυτταρική (SP/HrpZ _{P_{sph}})	44
161-14		46
161-16		57
WT	---	46
Συνολικός αριθμός φυτών		221

2.4 Επιβεβαίωση του Γενετικού Μετασχηματισμού των φυτών

2.4.1 Έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου

Τα μετασχηματισμένα φυτά ελέγχθηκαν για την επιτυχή ένθεση του διαγονιδίου και την απουσία του γονιδίου *virG*, του *A. tumefaciens*, μέσω πολλαπλής PCR. Για την

επιβεβαίωση του μετασχηματισμού, απομονώθηκε DNA από τα T2 φυτά (DNAeasy plant mini kit, Qiagen) και ακολούθησε πολλαπλή αντίδραση PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της χαρπίνης και της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την περιοχή *virG* του *A. tumefaciens*. Η ενίσχυση των επιλεγμένων αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα εξής ζεύγη εκκινητών: *hrpZ* F: 5'-CGAAAGCCCGCATATGGCGCTCGTTCTG-3' και *hrpZ* R 5'- CCGTCAGCGGGATCCAGTCAGGCAGCAG-3' (Ταμπακάκη, 1999) για το *hrpZ* και *virG* F: 5'-GCCGGGGCGAGACCATAGG-3' και *virG* R: 5'-CGCACGCGCAAGGCAACC-3' για την περιοχή *virG*. Το μίγμα της PCR περιείχε 2μl DNA ως μήτρα, 0.25μM από κάθε εκκινητή, 200μM dNTPs, 1.25mM MgCl₂, 1x *Taq* buffer, 1.25u *Taq* polymerase (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega) σε τελικό όγκο 20μl. Το πρόγραμμα ενίσχυσης περιελάμβανε ένα αρχικό κύκλο στους 94°C για 3 λεπτά και στη συνέχεια 30 κύκλους των 30 δευτερολέπτων στους 94°C, 1 λεπτού στους 50°C, 1 λεπτού στους 72°C και ένα τελικό κύκλο επιμήκυνσης στους 72°C για 5 λεπτά. Τα προϊόντα ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X) με βρωμιούχο αιθίδιο.

2.4.2 Έλεγχος για την έκφραση του διαγονιδίου

Για τον έλεγχο της έκφρασης του διαγονιδίου, απομονώθηκε RNA (RNAeasy plant mini kit, Qiagen) από τα αναγεννημένα-ανθεκτικά στην υδρομυκίνη φυτά και ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή, με τη χρήση του Im-Prom II Reverse Transcriptase System (Promega) και PCR (RT-PCR). Η ενίσχυση του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των εκκινητών που αναφέρονται παραπάνω, ενώ το μίγμα και το πρόγραμμα που ακολούθηθηκε είναι όμοια με αυτά που προαναφέρθηκαν.

Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X), η οποία περιείχε 1% βρωμιούχο αιθίδιο.

2.4.3 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοανίχνευση κατά Western (Western blotting)

Με στόχο την ανίχνευση της παραγόμενης χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}} ή SP/HrpZ_{P_{sph}} στα μετασχηματισμένα φυτά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικής πρωτεΐνης με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος SDS και βράσιμο στους 100°C για 5 min. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου (14 % sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel). Ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF (Immobilon-PSQ, Millipore). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση με το πρώτο αντίσωμα (αραίωση 1:20000) και ακολούθησε επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα, το

οποίο είναι συζευγμένο με ένζυμο που δίνει χρωμογόνο αντίδραση (NBT/BCIP). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ανίχνευσης σήματος.

2.5 Αξιολόγηση των διαγονιδιακών φυτών T2 σε μορφολογικό και αναπτυξιακό επίπεδο

Τα διαγονιδιακά φυτά αξιολογήθηκαν ως προς ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και ως προς φυσιολογικά χαρακτηριστικά που αφορούν το ποσοστό βλαστικότητας, την έναρξη της άνθισης και την έναρξη της καρπόδεσης.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τα οποία εξετάστηκαν ήταν το ύψος του φυτού, ο αριθμός των φύλλων, το μήκος και το πλάτος των φύλλων. Για τη διεξαγωγή των μετρήσεων, έγινε τυχαία επιλογή πέντε φυτών από κάθε σειρά και πέντε φυτών αγρίου τύπου (WT). Οι σχετικές μετρήσεις έλαβαν χώρα στο χρονικό διάστημα από 17/05/2011 έως 16/07/2011 και διεξάγονταν ανά πέντε ημέρες. Κατάλληλο χρονικό σημείο έναρξης των μετρήσεων θεωρήθηκε αυτό κατά το οποίο όλα τα φυτά ανεξαιρέτως είχαν σχηματίσει τουλάχιστον τρία φύλλα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση μεταξύ τους, ενώ η μέτρηση του μήκους και του πλάτους των φύλλων κάθε φυτού προέκυπτε από τυχαία δειγματοληψία τριών φύλλων. Όσον αφορά στην άνθιση, οι μετρήσεις ξεκίνησαν στις 24/05/2011.

2.6 Επεμβάσεις Αβιοτικής Καταπόνησης

Τα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν την εκκρινόμενη μορφή της χαρπίνης (SP/HrpZ_{Psph}) αξιολογήθηκαν επίσης σε φυσιολογικό και μεταγραφικό επίπεδο και έγινε σύγκριση τόσο μεταξύ τους όσο και με φυτά – μάρτυρες. Τα φυτά υποβλήθηκαν σε τέσσερα διαφορετικά είδη αβιοτικής καταπόνησης: ακραίες συνθήκες υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών (**Heat Stress, Cold Stress**), αλατότητα (**NaCl**) και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (**UV**). Έπειτα από κάθε δειγματοληψία, τα δείγματα τοποθετούνταν άμεσα σε υγρό άζωτο.

2.6.1. Καταπόνηση υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (Heat Stress)

Έξι καλά ανεπτυγμένα φυτά από τη σειρά **161-16** και τέσσερα φυτά - μάρτυρες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (47 °C) για 120 min. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, λαμβάνονταν δείγματα φύλλων για εξαγωγή RNA (200 mg) και αξιολόγηση μεταβολιτών (50 mg), ως εξής:

- Δειγματοληψία για εξαγωγή RNA σε τρεις χρόνους (60, 90, 120 min)
- Δειγματοληψία για αξιολόγηση μεταβολιτών (30 min)

2.6.2 Καταπόνηση υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (Cold Stress)

Έξι καλά ανεπτυγμένα φυτά από τη σειρά **161-16** και τέσσερα φυτά - μάρτυρες τοποθετήθηκαν σε ψυγείο (4 °C) για 120 min. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, λαμβάνονταν δείγματα φύλλων για εξαγωγή RNA (200 mg) και αξιολόγηση μεταβολιτών (50 mg), ως εξής:

- Δειγματοληψία για εξαγωγή RNA σε δύο χρόνους (60, 120 min)
- Δειγματοληψία για αξιολόγηση μεταβολιτών σε δύο χρόνους (30, 60 min)

2.6.3 Καταπόνηση υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας (Salinity)

Επιλέχθηκαν τέσσερα καλά ανεπτυγμένα φυτά της σειράς **161-12** και τέσσερα της **161-16**, καθώς και δύο φυτά – μάρτυρες (**WT**) στα οποία χορηγήθηκε NaCl μέσω ριζοποτίσματος (M = 58,44 gr / 2 mol.lit). Σε κάθε φυτό χορηγούνταν 200 ml διαλύματος ανά δύο μέρες. Έγινε δειγματοληψία φύλλων για εξαγωγή RNA (200 mg) σε δύο χρόνους (16 h και 3 ημερών) και αξιολόγηση μεταβολιτών (50 mg) στο χρονικό σημείο των 6 ημερών.

2.6.4 Καταπόνηση υπό έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV)

Επιλέχθηκαν τέσσερα καλά ανεπτυγμένα φυτά της σειράς **161-12** και τέσσερα της **161-14**, καθώς και δύο φυτά – μάρτυρες (**WT**) τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής υπό συνθήκες υπεριώδους ακτινοβολίας (UV: 254 nm) για 45 min. Η δειγματοληψία φύλλων προς αξιολόγηση μεταβολιτών έγινε 3 ημέρες έπειτα από την έκθεση στην ακτινοβολία UV.

2.7 Έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών

2.7.1 Απομόνωση ολικού RNA

Για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων απομονώθηκε RNA από τα φυτά που υπεβλήθησαν στις διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις. Η απομόνωση του RNA επετεύχθη με τη χρήση του RNAeasy plant mini kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

- Αρχικά, καθορίστηκε το ποσό του φυτικού υλικού με ζύγιση 100 mg ιστού για κάθε δείγμα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε γουδί όπου και λειοτριβήθηκαν, παρουσία υγρού αζώτου
- Στη συνέχεια, η σκόνη μεταγγίστηκε σε σωλήνες eppendorf των 2 ml

- Σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 450 μ l Buffer **RLT** και ακολούθησε ανάδευση (vortex)
- Τα δείγματα επωάστηκαν στους 56°C για 1-3 min ώστε να διευκολυνθεί η διάρρηξη του περιεχόμενου ιστού
- Τα λύματα μεταφέρθηκαν σε QIAshredder spin column (lilac), των 2 ml και φυγοκεντρήθηκαν για 2 min στη μέγιστη ταχύτητα
- Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέους σωλήνες eppendorf χωρίς να διαταραχθεί το υποκείμενο-ίζημα
- Προστέθηκαν 0,5 vol **αιθανόλης** (96 - 100%) και ακολούθησε ανάδευση με πιπέτα
- Τα δείγματα (≤ 650 μ l) μεταφέρθηκαν σε RNeasy spin column (pink), σε σωλήνες eppendorf των 2 ml και φυγοκεντρήθηκαν για 15 sec στις $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Τα λύματα απομακρύνθηκαν
- Προστέθηκαν 700 μ l Buffer **RW1** και έγινε φυγοκέντρηση για 15 sec στις $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Τα λύματα απομακρύνθηκαν
- Ακολούθησε προσθήκη 500 μ l Buffer **RPE** και φυγοκέντρηση για 15 sec στις $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Τα λύματα απομακρύνθηκαν
- Επαναπροστέθηκαν 500 μ l Buffer **RPE** και έγινε φυγοκέντρηση για 2 min στις $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm)
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε νέους σωλήνες eppendorf των 2 ml και φυγοκεντρήθηκαν για 1 min
- Έγινε μεταφορά σε σωλήνες eppendorf των 1,5 ml και προστέθηκαν 30-50 μ l **RNase-free H₂O** με ακρίβεια στη μεμβράνη της κολώνας. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 1 min στις $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm)
- Το προηγούμενο βήμα επαναλήφθηκε με σκοπό η τελική συγκέντρωση σε RNA να είναι μεγαλύτερη, διότι η αναμενόμενη παραγωγή RNA ήταν >30 μ g
Το RNA που συλλέχθηκε αποθηκεύτηκε στους -80°C.

2.7.2 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του εξαγόμενου RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA έγινε φωτομετρικά, με τη χρήση του οργάνου Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. Συγκεκριμένα, 1 μ l από το κάθε δείγμα μεταφέρθηκε στη συσκευή Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 230, 260 και 280 nm. Ο μηδενισμός του οργάνου γινόταν με μία σταγόνα (1 μ l) **RNase-free H₂O** από το *RNeasy plant mini kit*. Η καθαρότητα ενός δείγματος εκτιμάται από το λόγο OD_{260}/OD_{280} και



Εικόνα 2.1: Συσκευή Nanodrop

OD₂₆₀/OD₂₃₀. Τιμές 1.8-2.0 και 0.5 αντίστοιχα αντιστοιχούν σε ικανοποιητική καθαρότητα δείγματος.

2.7.3 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT) για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Για την *in vitro* παραγωγή μορίων DNA, συμπληρωματικών ως προς τα τμήματα μορίων RNA, χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription). Συνολικά, παράχθηκε cDNA για 20 επιλεγμένα δείγματα, μέσω της παρακάτω διαδικασίας:

- Σε σωλήνα erpendorf προστέθηκαν 2-10 μg ολικού RNA, 1 μl oligo dT (500 μg/ml), 1 μl μείγμα dNTPs (10 mM) και dd H₂O έως τελικού όγκου 12 μl
- Τα δείγματα αποδιατάχθηκαν στους 65°C/5 min, όπου και πραγματοποιήθηκε ο υβριδισμός του εκκινητή με το RNA. Το δείγμα μεταφέρθηκε άμεσα σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση
- Ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση και προστέθηκαν 4 μl 5x First-Strand Buffer, 1 μl (40unit/ml) RNaseOUT και 2 μl 0.1 M DTT
- Έγινε ήπια ανάδευση του περιεχομένου των σωλήνων erpendorf και προθερμάνθηκαν στους 42°C για 2 min, ενώ στη συνέχεια προστέθηκε 1 μl (200 units) SuperScript II RT.
- Το μείγμα επώαστηκε στους 42°C για 50 min και τέλος, έγινε απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανσή του στους 70°C για 15 min

Το cDNA που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ενίσχυση επιθυμητών τμημάτων. Η ενίσχυση αυτή πραγματοποιήθηκε με PCR και τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.

2.7.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των 10 υπό μελέτη γονιδίων. Για την PCR σχεδιάστηκαν κατάλληλα ζεύγη εκκινητών (primers) για κάθε γονίδιο, ώστε να είναι συμπληρωματικοί προς τα δύο άκρα της εκάστοτε προς πολλαπλασιασμό αλληλουχίας. Η PCR καθίσταται εφικτή χάρη στη χρήση της DNA θερμοανεκτικής πολυμεράσης, συνήθως Taq πολυμεράσης που προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι συνθήκες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι τα εξής:

Πίνακας 2.2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση PCR

Buffer	4 µl (1x)
MgCl₂	1 µl (1.25 mM)
dNTPs	0.25 µl (200 µM)
Primers	0.75 µl (0.25 µM)
Taq polymerase	0.25 µl (1.25 u)
cDNA	0.5 µl
H₂O	12.5 µl
Τελικός Όγκος	20 µl

Πίνακας 2.3: Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Προ-αποδιάταξη	94	3 min	1
Αποδιάταξη	94	30 sec	20/24/35
Υβριδισμός	50	1 min	20/24/35
Σύνθεση	72	1 min	20/24/35
Τελική Σύνθεση	72	7 min	1

Οι εκκινητές οι οποίοι σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση των 10 γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα των φυτών καθώς και το διαγονίδιο της χαρπίνης (*hrpZ_{P_{sph}}*) παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα.

Πίνακας 2.3: Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Ρόλος
AOX-F	GCCATTGATTACTGCCGTCT	160	Βιοσύνθεση ενεργών ριζών O ₂
AOX-R	ATACCCAATTGGTGCTGGAG		
Col1-F	CCAATTGGGCTTGACGTACT	228	Βιοσύνθεση

			αιθυλενίου
Col1-R	CAATCCTGAGCCGCTTTAAC		
EF1a-F	GAGGTTCGAGAAG-GAAGCTGCTGAG	669	Εσωτερικός μάρτυρας
EF1a-R	AGAGCTTCGTGGAGCATCTCAACAG		
Hin1-F	GAGCTCTAGATGGCCCTTCCATTCCGC	847	Σηματοδοτικό μονοπάτι hrp
Hin1-R	GCTCTAGACGCCGAAAAACAAAAGG		
Hsr203J-F	CGCGGATCCGGCTGGCTTAGAGTTTTTC	596	Μονοπάτι επαγωγής HR
Hsr203J-R	TCCGGGATCCTCCGATAGGACCGCACG		
NPR1-F	ATGGATAATAGTAGGACTGCG	273	Μονοπάτι SA
NPR1-R	GAACGGACTCCTCGCCGAC		
PR1a-F	GTAATATCCCACTCTTGCCGTGCCC	335	Βιοσύνθεση πρωτεϊνών παθογένειας
PR1a-R	CCTAGCACATCCAACACGAACCGAG		
PR1b-F	GATACTCCACAACATTAGTTGC	216	Βιοσύνθεση πρωτεϊνών παθογένειας
PR1b-R	CACCGGAATGCTGCATCCTGCAG		
SIPK-F	TATAATTCCACCACCACAGA	755	Μονοπάτι επαγωγής HR
SIPK-R	CTTCATCTGTTCTCCGTAA		
WIPK-F	CAATTCCTGATTTTCTTCGG	1158	Μονοπάτι επαγωγής HR
WIPK-R	GGAAAGTAGATACTCCAGATC		
hrpZ_{P_{sph}}-F	CGAAAGCCCGCATATGGCGCTCGTTCTG	995	Ενίσχυση του διαγονιδίου hrpZ _{P_{sph}}
hrpZ_{P_{sph}}-R	CCGTCAGCGGGATCCAGTCAGGCAGCAG		

2.8 Προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ

Η ανάλυση έγινε με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας, με τη χρήση του Agilent 6890GC συζευγμένου με το φασματογράφο μάζας Agilent 5973 MSD. Η ταυτοποίηση έγινε μέσω κατάλληλου λογισμικού (AMDIS) που περιλαμβάνει βιβλιοθήκες οι οποίες περιέχουν

φάσματα και δείκτες δέσμευσης για μεγάλη ποικιλία μεταβολιτών που απαντώνται σε πληθώρα φυτικών οργανισμών. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος μεταξύ της περιοχής του μεταβολίτη στόχου προς την περιοχή του μεταβολίτη αναφοράς και αναφέρθηκαν σε σχέση με το νωπό βάρος των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν 40 δείγματα φυτικού ιστού - φύλλων, έπειτα από την εφαρμογή διαφόρων αβιοτικών καταπονήσεων και 24 δείγματα άνευ ιστού (blank).

Πίνακας 2.4: Δείγματα που αξιολογήθηκαν σε μεταβολικό επίπεδο, με βάση το είδος της αβιοτικής καταπόνησης

Είδος Αβιοτικής Καταπόνησης	Χρόνος Έκθεσης στην Καταπόνηση	Αριθμός δειγμάτων WT	Αριθμός δειγμάτων (T2), ανά σειρά (T1)
Χαμηλή θερμοκρασία	30 min	4	4 (161-16)
Χαμηλή θερμοκρασία	60 min	4	4 (161-16)
Υψηλή θερμοκρασία	30 min	4	4 (161-16)
Αλατότητα (NaCl)	6 days	4	4 (161-12)
Υπεριώδης Ακτινοβολία (UV)	3 days	4	4 (161-12)

Τα υπό μελέτη φυτικά όργανα είχαν αποθηκευθεί σε υγρό άζωτο (-80°C) για να ελαχιστοποιηθούν οι μετασυλλεκτικές αλλαγές στο πρότυπο των μεταβολιτών κατά τη μεταβολομική ανάλυση. Τα δείγματα φύλλων (50 mg) ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα εκχύλισης μεθανόλης (395 ml). Για τη διευκόλυνση της ποσοτικοποίησης των μεταβολιτών έγινε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ριβιτόλης (5 ml, 1 mg/ml), ως εσωτερικός μάρτυρας. Η ανάδευση έγινε με τη βοήθεια μηχανικού αναδευτήρα στους 70 °C για 15 min, ώστε να επιτευχθεί ένα όσο το δυνατό πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα μεταβολιτών. Έγινε προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου και επανατοποθέτηση των δειγμάτων στον αναδευτήρα για 5 min στους 37 °C. Ακολούθως προστέθηκαν 400 μl ddH₂O και τα δείγματα αναδεύτηκαν με vortex. Τα φυτικά θραύσματα απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση (13.000 rpm/5 min). Η υδατική φάση του διαλύματος (400 μl) μεταφέρθηκε σε νέους σωλήνες eppendorf και ακολούθησε εξάτμιση με αέριο άζωτο για την απομάκρυνση του διαλύτη. Η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε για δείγματα άνευ ιστού (blank) χρησιμοποιούμενα ως μάρτυρες.

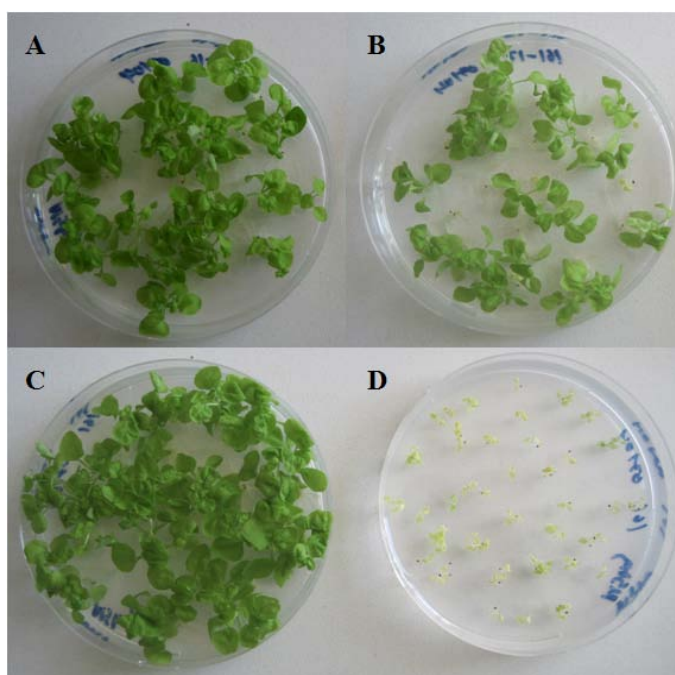
Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των δεδομένων με τη χρήση του προγράμματος SPSS Statistics 20 της IBM, όπου πραγματοποιήθηκε t-test για τα διαγονιδιακά φυτά και τα φυτά αγρίου τύπου, για συνολικά 109 είδη μεταβολιτών, καθώς και Ανάλυση Κυρίων

Συνιστωσών (Principal Component Analysis) με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Unscrambler. Η γραφική απεικόνισή τους έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot 11.0.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών και φυτών-μαρτύρων

Αρχικά επιλέχθηκαν 6 διαγονιδιακές σειρές T1 του είδους *Nicotiana benthamiana* για τη δημιουργία των T2 οικογενειών από σπόρο αυτογονιμοποίησης. Η επιλογή πραγματοποιήθηκε με βάση τις αναλογίες διάσπασης ως προς το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη. Όπως αναμενόταν, οι αναλογίες διάσπασης ακολούθησαν τη Μενδελιανή κληρονομικότητα που χαρακτηρίζει τα μονογονιδιακά γνωρίσματα (Εικόνα 3.1). Η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό επιλογής επιβεβαιώνει τη διαγονιδιακή φύση των T2 απογόνων.



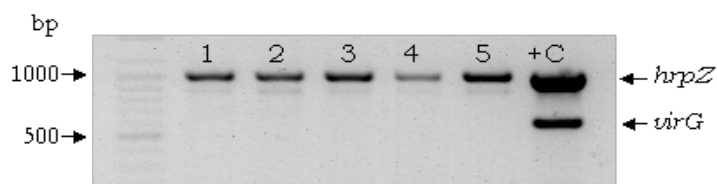
Εικόνα 3.1: Επιλογή σπόρων T2 γενιάς του είδους *Nicotiana benthamiana* σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιέχει υγρομυκίνη (30 mg/l). A, B, C: Διαγονιδιακά φυτά T2 γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη SP/HrpZ_{P_{sph}} (A. 161-12, B. 161-14, C. 161-16), D: Νεαρά φυτάρια άγριου τύπου (wt) που δεν αναπτύσσονται υπό την πίεση επιλογής. Η ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη επιβεβαιώνει τη διαγονιδιακή φύση των T2 απογόνων

Συνολικά προέκυψαν 175 φυτά T2 γενιάς, από τις 6 επιλεγμένες διαγονιδιακές σειρές T1 γενιάς. Τα 28 διαγονιδιακά φυτά κωδικοποιούσαν την κανονική μορφή της χαρπίνης (HrpZ_{P_{sph}}) (3 διαγονιδιακές T1 σειρές) και τα 147 (3 διαγονιδιακές T1 σειρές) την εκκρινόμενη μορφή της χαρπίνης (SP/-HrpZ_{P_{sph}}), μέσω της ένθεσης του τμήματος του N-αμινοτελικού άκρου του πεπτιδίου της πρωτεΐνης παθογένειας PR1 του καπνού. Για τις ανάγκες του πειράματος συμπεριλήφθηκαν 46 φυτά αγρίου τύπου, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων συνολικά αξιοποιήθηκαν 221 φυτά.

3.2 Έλεγχος του μετασχηματισμού

3.2.1 Έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου

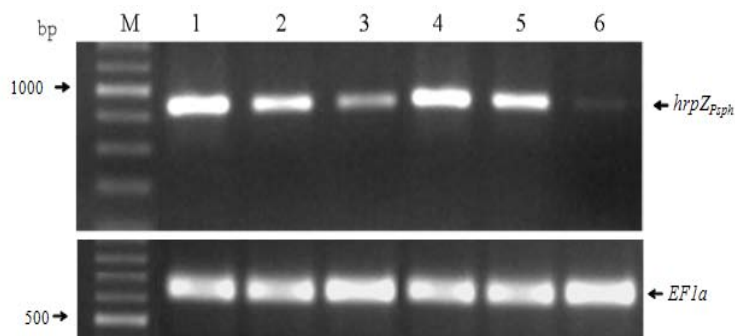
Για τον έλεγχο της ένθεσης του διαγονιδίου, αρχικά απομονώθηκε DNA από τα διαγονιδιακά φυτά **T2** γενιάς και ακολούθησε PCR. Η ανίχνευση της DNA αλληλουχίας αναμενόμενου μεγέθους αποτελεί παράγοντα σωστής ένθεσης του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}*, και επιβεβαιώθηκε στα φυτά της **T2** γενιάς με την ενίσχυση των προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους (995 bp) (Εικόνα 3.1). Ταυτόχρονα, η αδυναμία ενίσχυσης του προϊόντος που αντιστοιχεί στην περιοχή *virG* (590 bp) του αγροβακτηρίου απέδειξε την επιτυχία του μετασχηματισμού, εφόσον αποκλείστηκε η πιθανότητα μόλυνσης από το βακτήριο (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πολλαπλής PCR. 1-5: ενίσχυση του διαγονιδίου *hrpZ* (995 bp). +C (μετασχηματισμένα κύτταρα αγροβακτηρίου): ενίσχυση του διαγονιδίου *hrpZ* (995 bp) και της περιοχής *virG* (590 bp) του *A. tumefaciens*. Ladder: Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas)

3.2.2 Έλεγχος για την έκφραση του διαγονιδίου

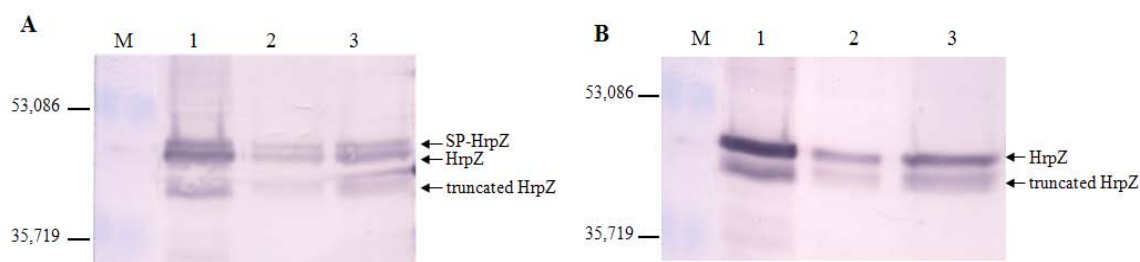
Για τον έλεγχο της έκφρασης του διαγονιδίου, απομονώθηκε RNA από τα διαγονιδιακά φυτά **T2** γενιάς και ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA). Η έκφραση του γονιδίου της χαρπίνης (*hrpZ_{P_{sph}}*) επιβεβαιώθηκε σε όλα τα δείγματα φυτών που εξετάστηκαν μέσω της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής, ακολουθούμενης από ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας (RT-PCR) (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αντίστροφης μεταγραφής ακολουθούμενης από PCR (RT-PCR). 1-3: ενίσχυση του διαγονιδίου *hrpZ* (995 bp) σε διαγονιδιακά φυτά που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/*hrpZ*_{P_{sph}}. 4-6: ενίσχυση του διαγονιδίου *hrpZ* (995 bp) σε διαγονιδιακά φυτά που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-*hrpZ*_{P_{sph}}. Το μεταγράφημα του γονιδίου *EF1a* (elongation factor 1-a) (668 bp) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ώστε να επιβεβαιωθεί η ισόποση φόρτωση RNA. Ladder: Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas)

2.4.3 Ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης HrpZ_{P_{sph}} κατά Western (Western blotting)

Προκειμένου να ελεγχθεί η παραγόμενη ποσότητα της πρωτεΐνης στα διαγονιδιακά φυτά που μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/*hrpZ*_{P_{sph}} ή pBin.Hyg.Tx-*hrpZ*_{P_{sph}}, πραγματοποιήθηκε ανοσοανίχνευση κατά Western. Τόσο η πρωτεΐνη HrpZ_{P_{sph}} όσο και η εξωκυτταρική της μορφή (SP/HrpZ_{P_{sph}}) ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 82% των φυτών που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.4).



Ε
Εικόνα 3.4: Ανοσοανίχνευση κατά Western της πρωτεΐνης SP/HrpZ_{P_{sph}} και HrpZ_{P_{sph}} σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φύλλα μετασχηματισμένων φυτών του είδους *N. benthamiana*. **A.** M: Marker (kDa) (Broad range pre-stained SDS marker, Biorad). 1, 2, 3: Διαγονιδιακά φυτά T2 γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την εξωκυτταρική μορφή της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}} (SP/HrpZ_{P_{sph}}). **B.** M: Marker (kDa) (Broad range pre-stained SDS marker, Biorad). 1, 2, 3: Διαγονιδιακά φυτά T2 γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την κανονική μορφή της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}}. Η ζώνη μικρότερου μεγέθους αντιστοιχεί στη πρωτεολυμένη μορφή της πρωτεΐνης (περίπου κατά 2kDa μικρότερη από τη HrpZ_{P_{sph}})

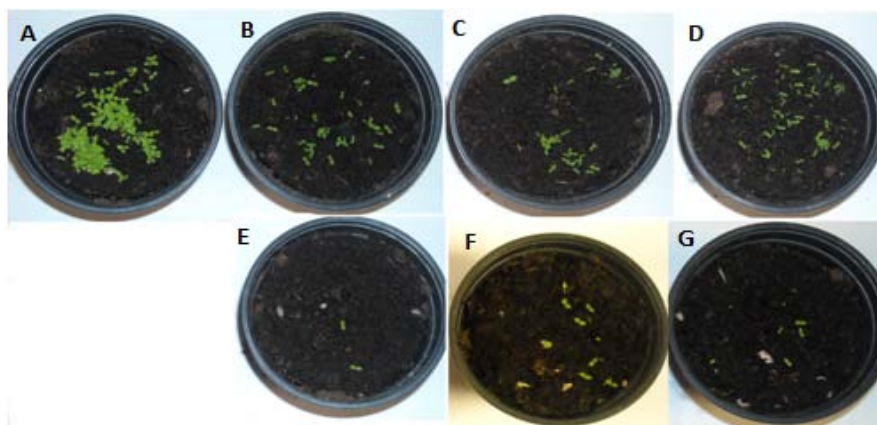
3.3 Αξιολόγηση των διαγονιδιακών φυτών T2 σε μορφολογικό και αναπτυξιακό επίπεδο

Για την αξιολόγηση των φυτών σε μορφολογικό και αναπτυξιακό επίπεδο και τη διεξαγωγή των μετρήσεων έγινε τυχαία επιλογή πέντε διαγονιδιακών φυτών για κάθε μία από τις 6 επιλεγμένες T1 σειρές (HrpZ_{P_{sph}}: 172-3, 177-4, Z-8 και SP/HrpZ_{P_{sph}}: 161-12, 161-14, 161-16) και πέντε φυτών αγρίου τύπου (WT). Τα επιλεγμένα διαγονιδιακά φυτά

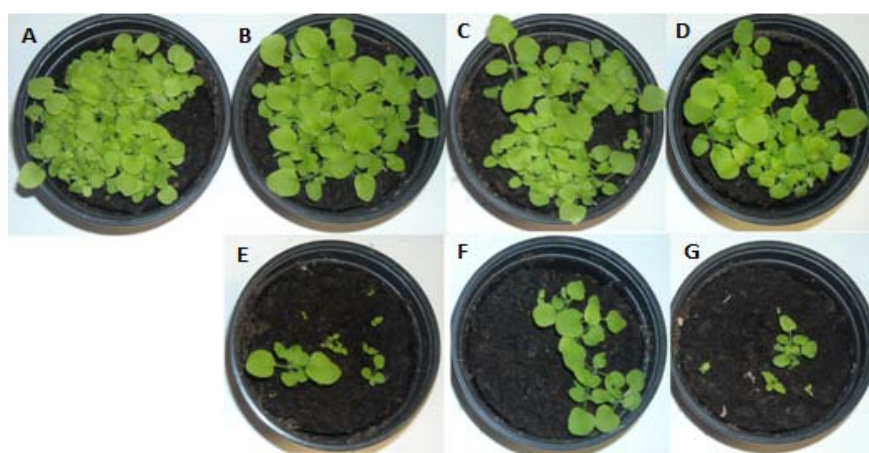
αξιολογήθηκαν ως προς ορισμένα μορφολογικά (ύψος φυτού, αριθμός φύλλων, μήκος και πλάτος φύλλων) και φυσιολογικά χαρακτηριστικά (ποσοστό βλαστικότητας, έναρξη άνθισης, έναρξη καρπόδεσης).

Ο φαινότυπος των διαγονιδιακών φυτών **T2** γενιάς που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (*SP/hrpZ_{P_{sph}}*) διέφερε από εκείνο των φυτών που εκφράζουν τη χαρπίνη στην κανονική της μορφή (*HrpZ_{P_{sph}}*) καθώς και των φυτών μαρτύρων-αγρίου τύπου (wild type).

Πιο συγκεκριμένα, η βλαστικότητα των διαγονιδιακών σειρών **161-12**, **161-14** και **161-16** που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (*SP/hrpZ_{P_{sph}}*) ήταν ελαφρώς μειωμένη σε σχέση με των φυτών αγρίου τύπου, ενώ οι διαγονιδιακές σειρές **172-3**, **177-4** και **Z8** που εκφράζουν τη χαρπίνη στην κανονική της μορφή παρουσίασαν εμφανώς μειωμένη βλαστικότητα (Εικόνα 3.5, Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.5: Εμφάνιση φυταρίων (13/04/11). **A.** φυτά αγρίου τύπου (WT). **B, C, D:** Διαγονιδιακά φυτά **T2** γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη *SP/HrpZ_{P_{sph}}* (**B.** 161-16, **C.** 161-14, **D.** 161-12). **E, F, G:** Διαγονιδιακά φυτά **T2** γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη *HrpZ_{P_{sph}}* (**E.** Z8, **F.** 177-4, **G.** 172-3)



Εικόνα 3.6: Ανάπτυξη φυτών ένα μήνα μετά τη σπορά. **A.** φυτά αγρίου τύπου (WT). **B, C, D:** Διαγονιδιακά φυτά **T2** γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη *SP/HrpZ_{P_{sph}}* (**B.** 161-16,

C. 161-14, D. 161-12). E, F, G: Διαγονιδιακά φυτά T2 γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη HrpZ_{P_{sph}} (E. Z8, F. 177-4, G. 172-3)

Σε μετέπειτα στάδια ανάπτυξης, η συνολική εμφάνιση των διαγονιδιακών φυτών που εκφράζουν τη χαρπίνη εξωκυτταρικά υπερτερούσε εμφανώς των φυτών που εκφράζουν τη χαρπίνη ενδοκυτταρικά καθώς και των φυτών-μαρτύρων (WT) (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7: Προώθηση της αύξησης των φυτών (09/05/11). A. φυτά αγρίου τύπου (WT). B, C, D: Διαγονιδιακά φυτά T2 γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη SP/HrpZ_{P_{sph}} (B. 161-16, C. 161-14, D. 161-12). E, F, G: Διαγονιδιακά φυτά T2 γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη HrpZ_{P_{sph}} (E. Z8, F. 177-4, G. 172-3)

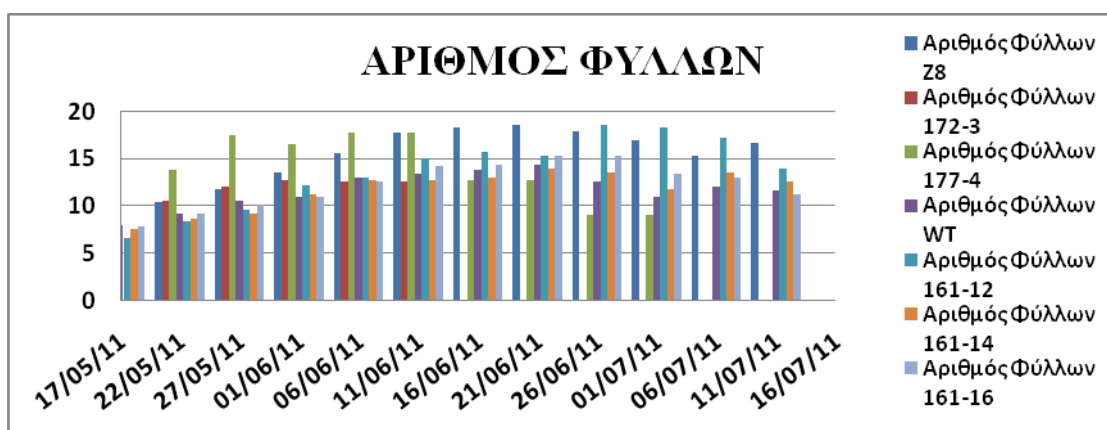
Για την περαιτέρω αξιολόγηση των φυτών σε μορφολογικό και αναπτυξιακό επίπεδο, ακολούθησε μεταφύτευση των φυτών σε γλαστράκια, με σκοπό τη μεμονωμένη ανάπτυξή τους και τη διευκόλυνση των χειρισμών.



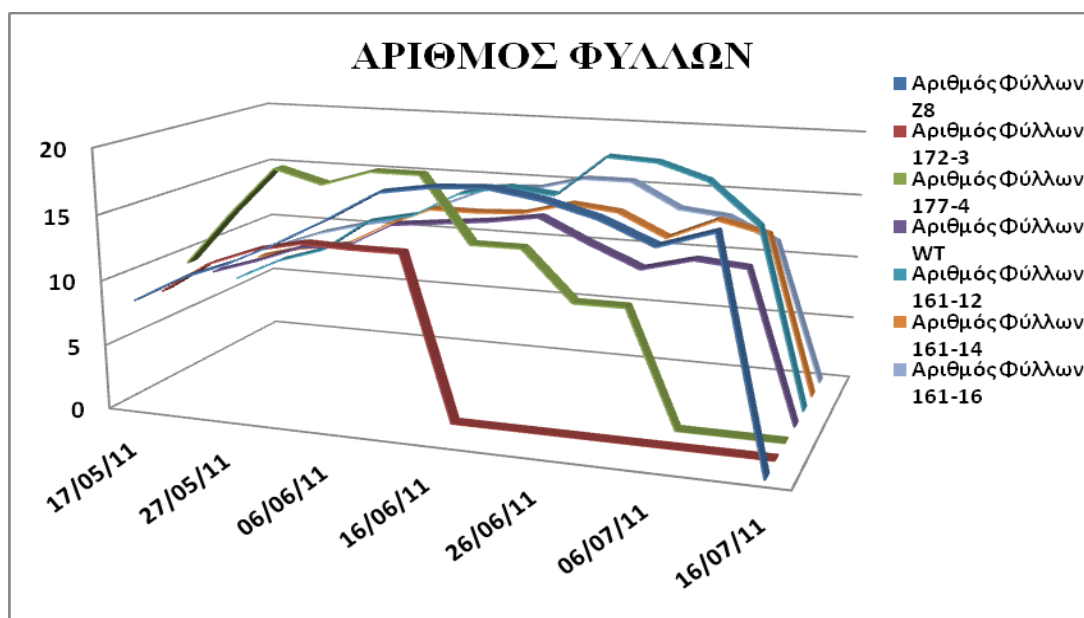
Εικόνα 3.8: Φυτά στο θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών έπειτα από τη μεταφύτευση

Κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου των φυτών παρατηρήθηκαν διαφορές στον παραγόμενο αριθμό φύλλων μεταξύ των διαφορετικών σειρών. Έτσι παρατηρήθηκε

μειωμένη διάρκεια βιολογικού κύκλου στα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη ενδοκυτταρικά (**172-3**, **177-4**), εκτός της σειράς **Z8**. Συγκεκριμένα, σημειώθηκε αυξημένη παραγωγή φύλλων των διαγονιδιακών σειρών **172-3** και **177-4** στα αρχικά στάδια ανάπτυξης, ενώ ακολούθησε απότομη μείωση στο ρυθμό δημιουργίας τους και τον παραγόμενο αριθμό τους. Εν αντιθέσει, ο βιολογικός κύκλος των διαγονιδιακών σειρών (**161-12**, **161-14**, **161-16**) που εκφράζουν τη χαρπίνη εξωκυτταρικά ήταν όμοιος με του μάρτυρα, ενώ ο αριθμός των φύλλων που παρήγαγαν εμφανίζεται ελαφρώς αυξημένος σε σχέση με το μάρτυρα από τα μέσα του βιολογικού τους κύκλου κι έπειτα (Διάγραμμα 3.1, Διάγραμμα 3.2).



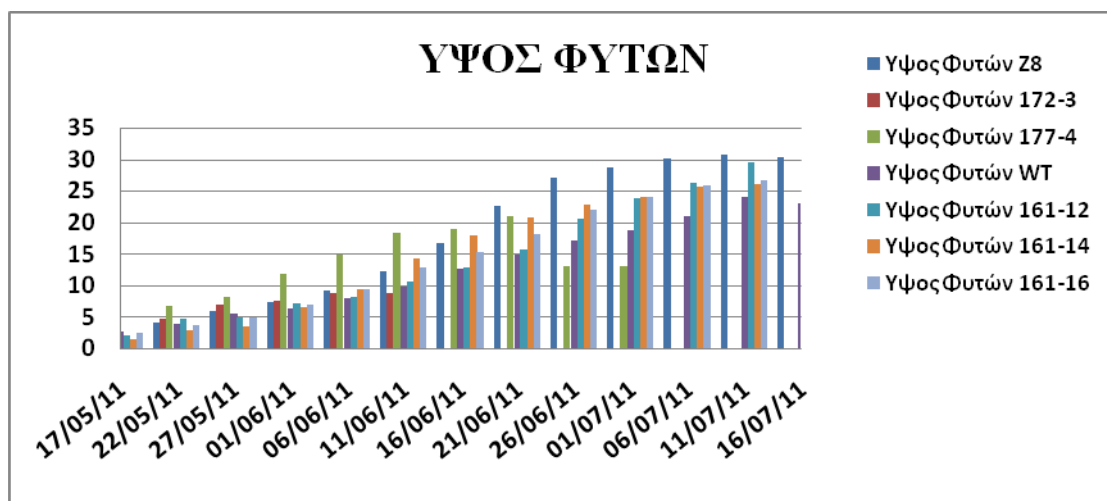
Διάγραμμα 3.1: Διαγραμματική απεικόνιση του αριθμού των φύλλων των διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου



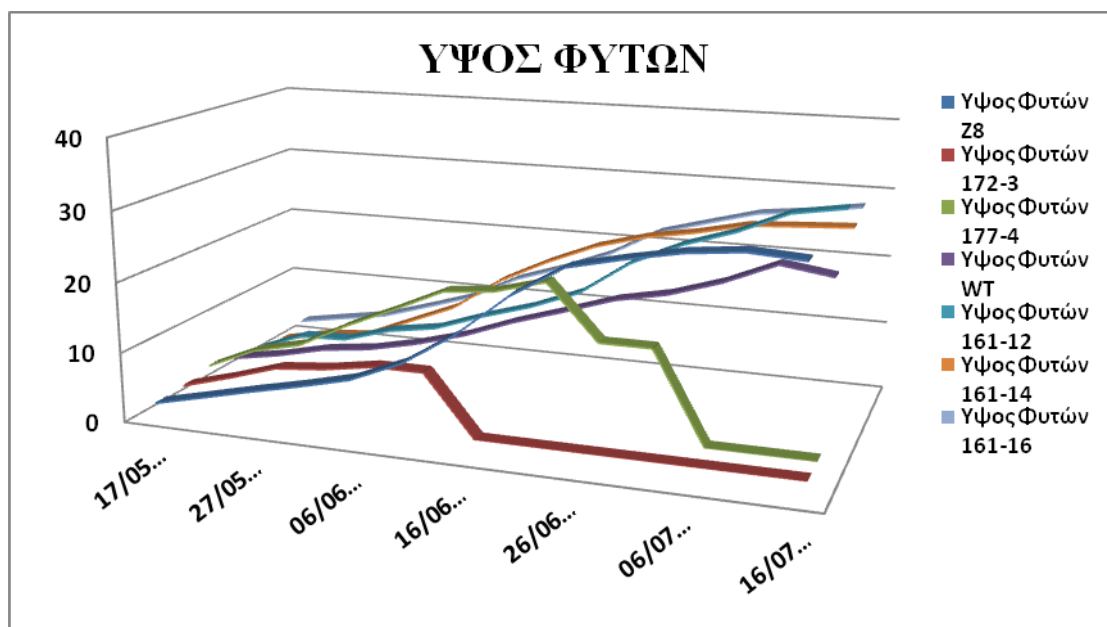
Διάγραμμα 3.2: Σχηματική απεικόνιση του αριθμού των φύλλων των διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου

Κατά την αξιολόγηση του ύψους μεταξύ των διαγονιδιακών φυτών παρατηρήθηκαν επίσης διαφορές. Οι σειρές που εκφράζουν την ενδοκυτταρική μορφή της χαρπίνης

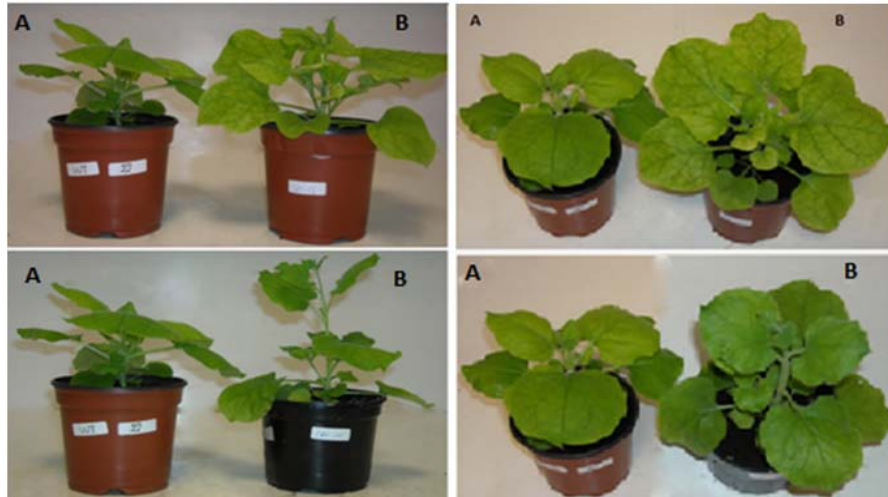
παρουσιάστηκαν να είναι ψηλότερες του μάρτυρα κατά τα πρώτα στάδια του βιολογικού τους κύκλου ενώ ακολούθως, με εξαίρεση τη σειρά **Z8**, υπερκεράστηκαν από τα φυτά μάρτυρες. Αντίθετα, οι σειρές που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της παρουσίασαν αρχικά καθυστέρηση αναφορικά με το ύψος των φυταρίων ενώ από τα μέσα του βιολογικού τους κύκλου, εμφάνισαν εμφανή υπεροχή εν συγκρίσει με τα φυτά μάρτυρες (Διάγραμμα 3.3, Διάγραμμα 3.4).



Διάγραμμα 3.3: Διαγραμματική απεικόνιση του ύψους των διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου

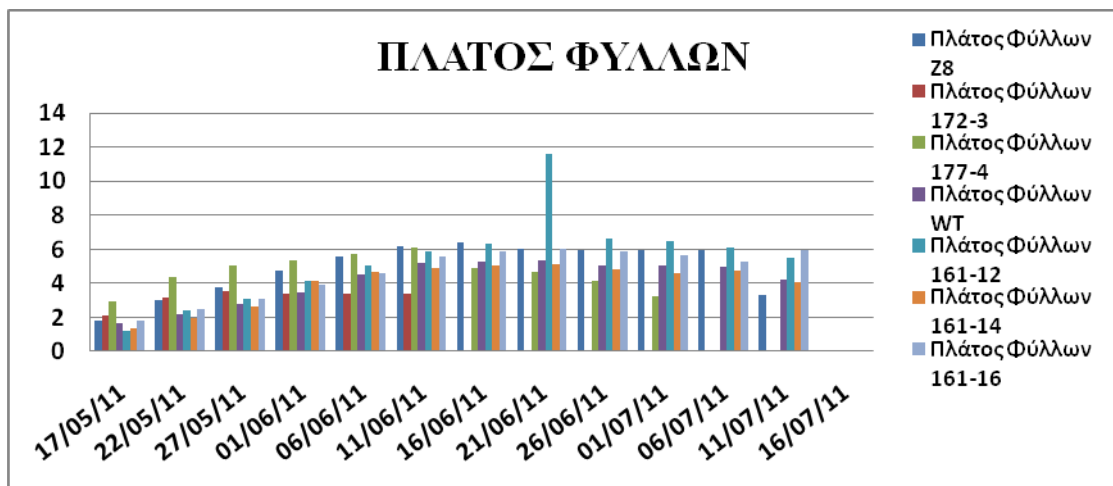


Διάγραμμα 3.4: Σχηματική απεικόνιση του ύψους των διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου



Εικόνα 3.9: Προώθηση της αύξησης, λόγω της εξωκυτταρικής έκφρασης της χαρπίνης. **A.** Φυτό αγρίου τύπου (WT) **B.** Διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* που εκφράζουν την εκκρινόμενη μορφή της πρωτεΐνης HrpZ_{PspH} στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης

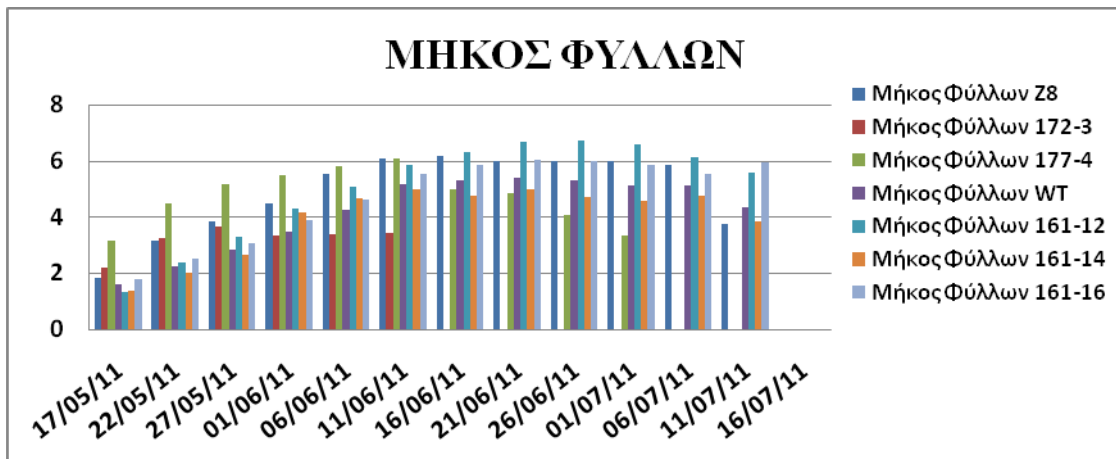
Προκειμένου να αξιολογηθεί το πλάτος και μήκος των φύλλων, πραγματοποιήθηκε επίσης τυχαία δειγματοληψία τριών φύλλων από τα πέντε επιλεγμένα φυτά κάθε διαγονιδιακής σειράς καθώς και τα πέντε επιλεγμένα φυτά-μάρτυρες (WT). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων καταδεικνύουν την υπεροχή των διαγονιδιακών σειρών **161-12** και **161-16** σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου ενώ αντίθετα, η σειρά **161-14** υπολείπεται του μάρτυρα. Η σειρά **Z8** φάνηκε επίσης να υπερτερεί του μάρτυρα κατά το μεγαλύτερο μέρος του βιολογικού τους κύκλου, ενώ η σειρά **177-4** υπερτερούσε του μάρτυρα μόνο κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης. Τέλος, η σειρά **172-3** παρουσίασε σημαντική υστέρηση σε σχέση με τα φυτά τόσο των υπολοίπων διαγονιδιακών σειρών όσο και των φυτών αγρίου τύπου (Διάγραμμα 3.5, Διάγραμμα 3.6, Διάγραμμα 3.7, Διάγραμμα 3.8).



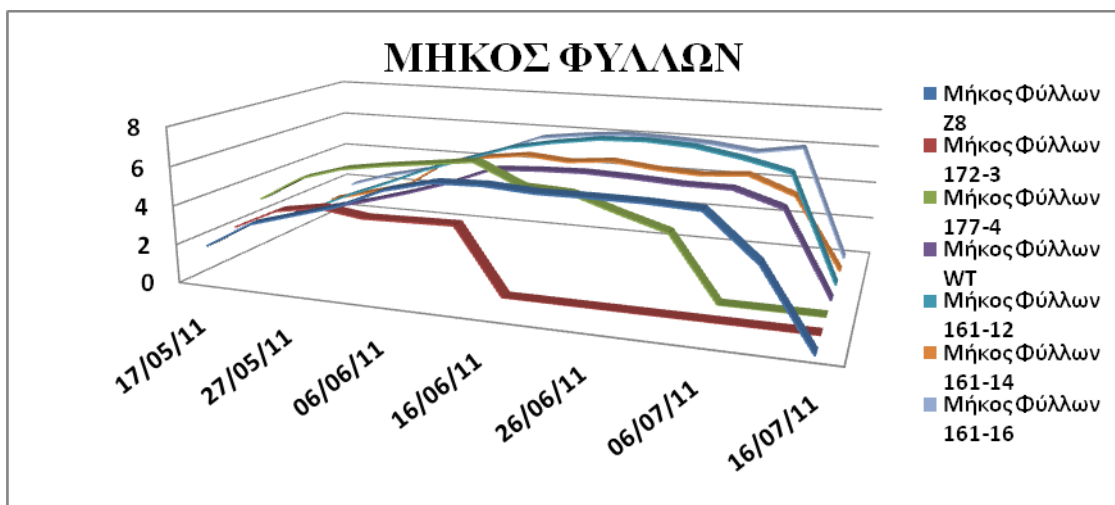
Διάγραμμα 3.5: Διαγραμματική απεικόνιση του πλάτους των φύλλων των διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών και των φυτών-μαρτύρων έπειτα από τυχαία δειγματοληψία



Διάγραμμα 3.6: Σχηματική απεικόνιση του πλάτους των φύλλων των διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου

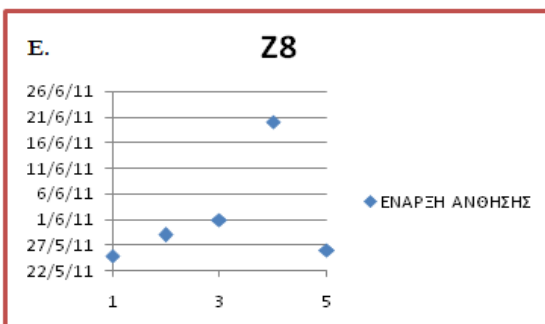
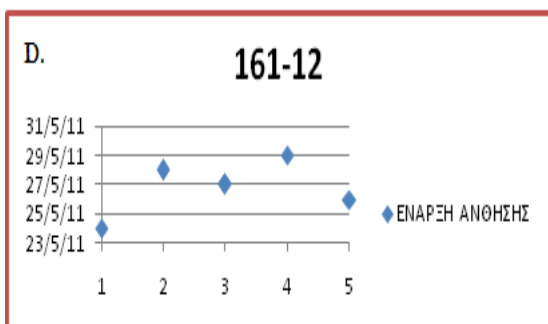
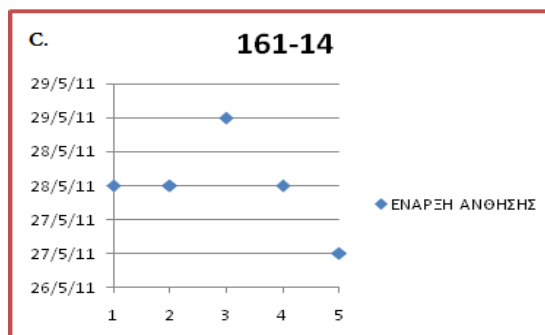
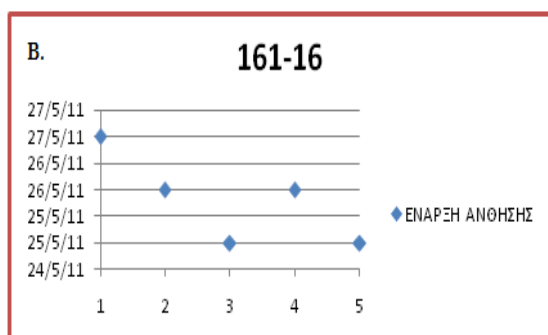
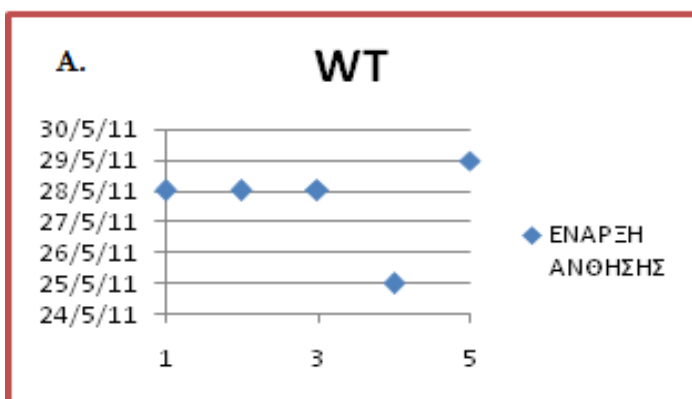


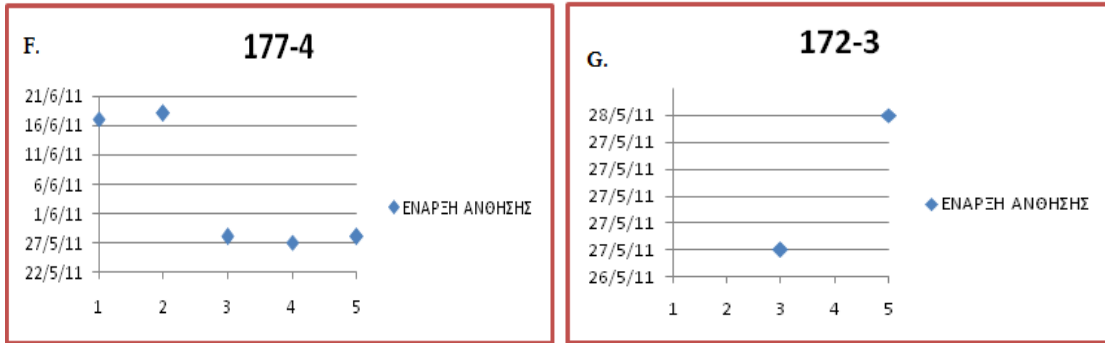
Διάγραμμα 3.7: Διαγραμματική απεικόνιση του μήκους των φύλλων των διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών και των φυτών-μαρτύρων έπειτα από τυχαία δειγματοληψία



Διάγραμμα 3.8: Σχηματική απεικόνιση του μήκους των φύλλων των διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου

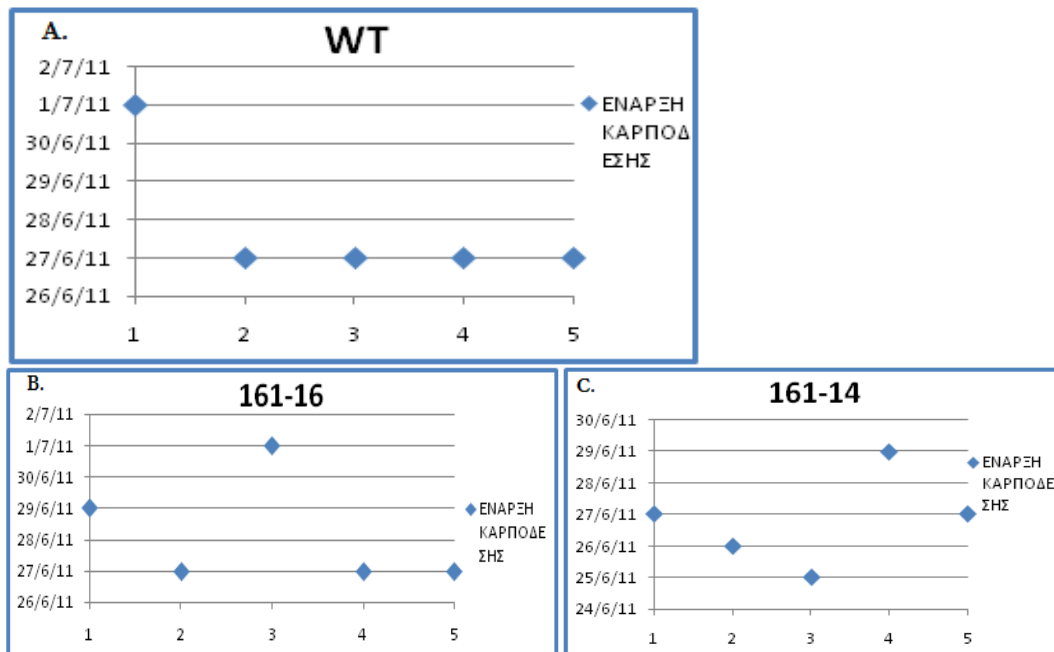
Η έναρξη της άνθησης και της καρπόδεσης των διαγονιδιακών φυτών T2 γενιάς που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{P_{sph}}) διαφοροποιήθηκαν χρονικά από τα αντίστοιχα στάδια των φυτών που εκφράζουν τη χαρπίνη στην κανονική της μορφή (HrpZ_{P_{sph}}) καθώς και των φυτών μαρτύρων-αγρίου τύπου (wild type). Διαφοροποίηση σημειώθηκε τόσο κατά τη χρονική περίοδο έναρξης των φυσιολογικών τους διεργασιών, όσο και στο συνολικό ποσοστό άνθησης (Διάγραμμα 3.9, Διάγραμμα 3.10, Διάγραμμα 3.11, Διάγραμμα 3.12, Διάγραμμα 3.13, Διάγραμμα 3.14, Διάγραμμα 3.15) και καρπόδεσής τους (Διάγραμμα 3.16, Διάγραμμα 3.17, Διάγραμμα 3.18, Διάγραμμα 3.19, Διάγραμμα 3.20, Διάγραμμα 3.21, Διάγραμμα 3.22).

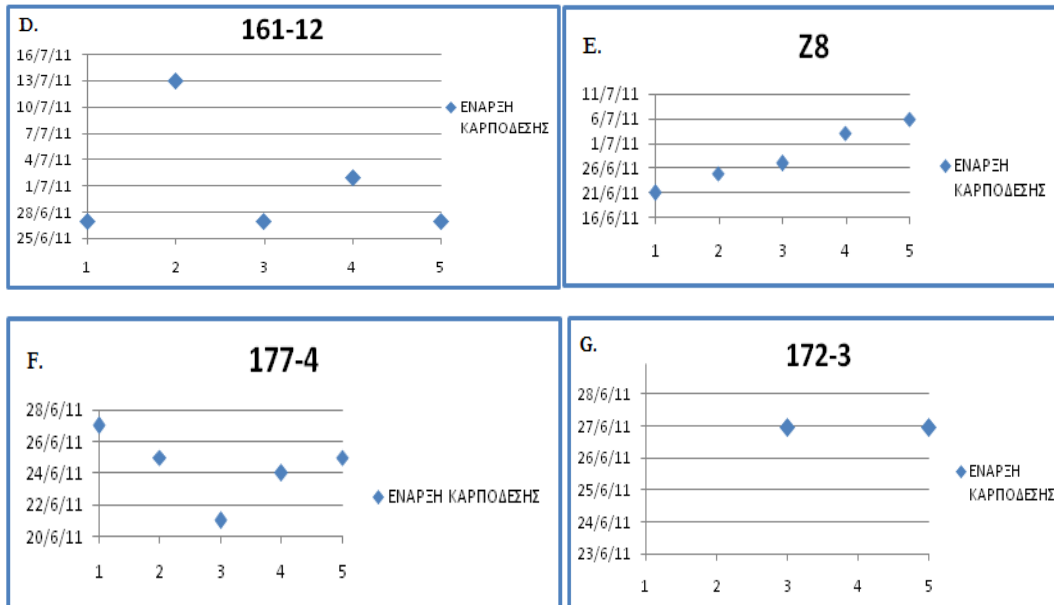




Διάγραμμα 3.9: Απεικόνιση της έναρξης άνθησης των φυτών. **A.** φυτά αγρίου τύπου (WT). **B, C, D:** Διαγονιδιακά φυτά T2 γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη SP/HrpZ_{P_{sph}} (**B.** 161-16, **C.** 161-14, **D.** 161-12). **E, F, G:** Διαγονιδιακά φυτά T2 γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη HrpZ_{P_{sph}} (**E.** Z8, **F.** 177-4, **G.** 172-3)

Όλες οι διαγονιδιακές σειρές και τα φυτά μάρτυρες που επιλέγησαν, παρουσίασαν ανθοφορία, εκτός της διαγονιδιακής σειράς 172-3, εκ της οποίας μόνο τα δύο από τα πέντε φυτά ανθοφόρησαν. Η διάρκεια της ανθοφορίας για όλες τις διαγονιδιακές σειρές και τα φυτά-μάρτυρες διήρκησε περίπου ένα μήνα, εκτός των σειρών 177-4 και 172-3 οι οποίες ολοκλήρωσαν την άνθησή τους σε μικρότερο χρονικό διάστημα του ενός μηνός. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το χρονικό διάστημα μεταξύ της έναρξης της ανθοφορίας και της έναρξης της καρπόδεσης ήταν σχεδόν σταθερό (ένας μήνας) στα φυτά-μάρτυρες και τις διαγονιδιακές σειρές, εκτός της σειράς 177-4, η οποία χαρακτηρίστηκε από πρόωμη έναρξη καρπόδεσης.





Διάγραμμα 3.10: Απεικόνιση της έναρξης καρπόδεσης των φυτών. **A.** φυτά αγρίου τύπου (WT). **B, C, D:** Διαγονιδιακά φυτά T2 γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη SP/HrpZ_{P_{sph}} (**B.** 161-16, **C.** 161-14, **D.** 161-12). **E, F, G:** Διαγονιδιακά φυτά T2 γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη HrpZ_{P_{sph}} (**E.** Z8, **F.** 177-4, **G.** 172-3)

Όλα τα φυτά που παρουσίασαν έναρξη ανθοφορίας οδηγήθηκαν σε καρποφορία. Η διάρκεια της καρποφορίας για όλες τις διαγονιδιακές σειρές και τα φυτά-μάρτυρες διήρκησε για χρονικό διάστημα λίγων ημερών (1-17 ημερών), με τη σειρά 172-3 να ολοκληρώνει την καρπόδεσή της σε μία μέρα, ενώ οι σειρές Z8 και 161-12 να χαρακτηρίζονται από τη μεγαλύτερη διάρκεια καρπόδεσης. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι τα τέσσερα εκ των πέντε φυτών αγρίου τύπου που είχαν επιλεγεί καρποφόρησαν την ίδια μέρα (27/6/11). Επιπλέον, η παραγωγή σε σπόρο όλων των διαγονιδιακών σειρών υπολειπόταν της παραγωγής σπόρου των φυτών-μαρτύρων (WT).

3.4 Αξιολόγηση των διαγονιδιακών φυτών T2 υπό την επίδραση επεμβάσεων Αβιοτικής Καταπόνησης

Δεδομένου ότι προηγούμενες έρευνες έχουν καταδείξει την αποτελεσματικότητα αξιοποίησης της ενδογενούς έκφρασης της εκκρινόμενης μορφής της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}} σε διαγονιδιακά φυτά για την επίτευξη ανθεκτικότητας σε ιολογική ασθένεια (Pavli et al., 2011), στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η αξιοποίηση της χαρπίνης SP/HrpZ_{P_{sph}} για την δημιουργία ανθεκτικότητας σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Για το σκοπό αυτό, τα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν την χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}} εξωκυτταρικά (SP/HrpZ_{P_{sph}}) αξιολογήθηκαν σε φυσιολογικό και μεταγραφικό επίπεδο αφού υποβλήθηκαν σε τέσσερα

διαφορετικά είδη αβιοτικής καταπόνησης: ακραίες συνθήκες υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών (**Heat Stress, Cold Stress**), αλατότητα (**NaCl**) και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (**UV**).

3.4.1. Απόκριση των φυτών σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (**Heat Stress**)

Έξι καλά ανεπτυγμένα φυτά της σειράς **161-16** και τέσσερα φυτά - μάρτυρες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (47 °C) για 120 min.

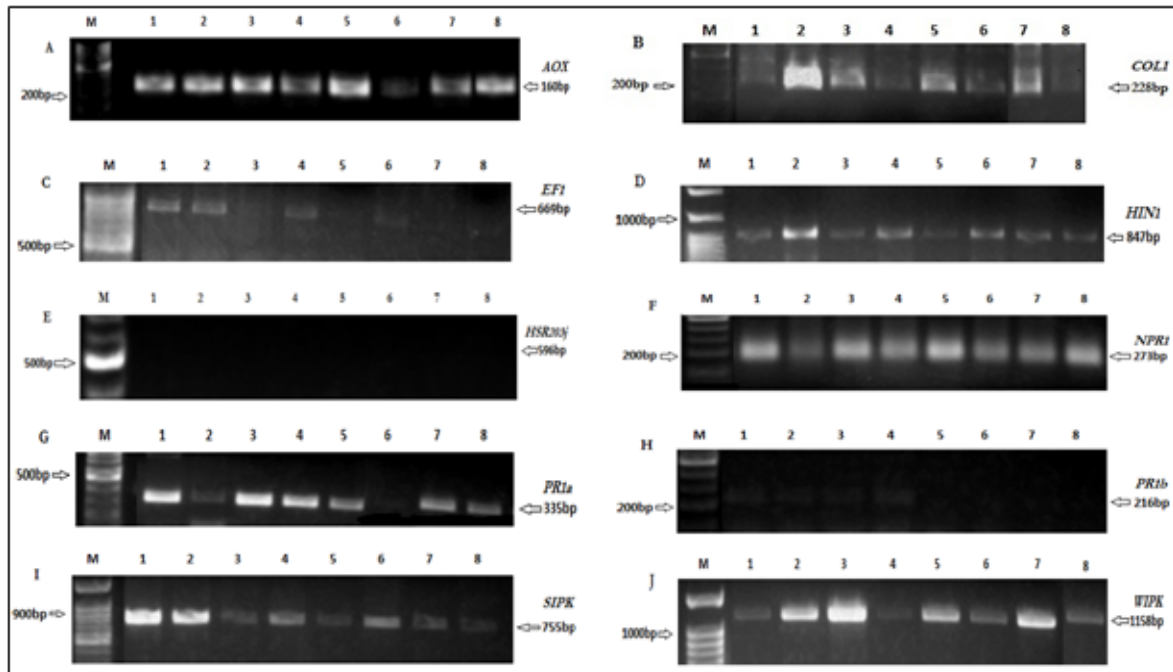
Κατά την επίδραση της αβιοτικής καταπόνησης, τα φυτά της διαγονιδιακής σειράς **161-16**, που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{Psph}), κατά τα πρώτα 30 min έκθεσής τους σε υψηλή θερμοκρασία φάνηκε να παρουσιάζουν ευαισθησία σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ εν συνεχεία παρουσίασαν φαινότυπο ανάκαμψης (recovery phenotype) ή/και ανθεκτικότητα σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10: Φυτά αγρίου τύπου (αριστερά) και της διαγονιδιακής σειράς 161-16 (δεξιά) **A.** 30min, **B.** 60min και **C.** 90min μετά την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, έγινε δειγματοληψία φύλλων με σκοπό τον έλεγχο ενδεχόμενης έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με μονοπάτια άμυνας των φυτών (Εικόνα 3.11).

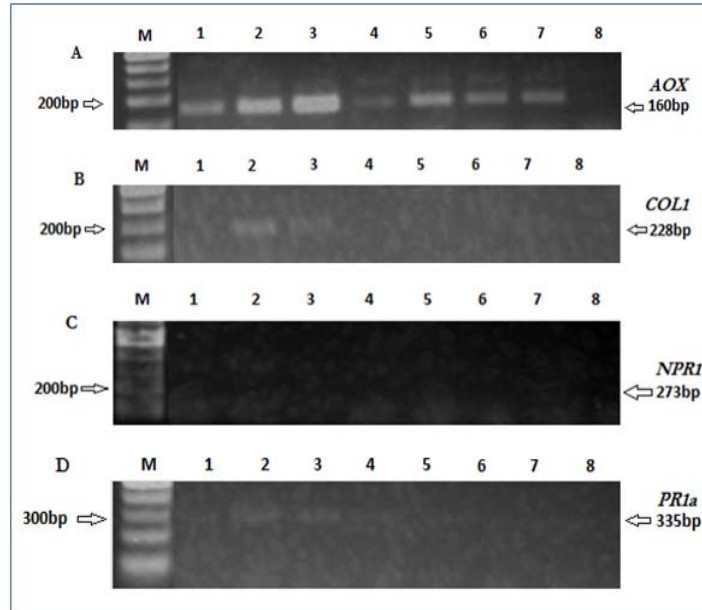
Ο έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται με μονοπάτια άμυνας των φυτών, έπειτα από την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών έδειξε ότι τα γονίδια *AOX*, *COL1*, *HIN1*, *NPRI*, *SIPK* και *WIPK* εκφράστηκαν σε όλα τα διαγονιδιακά φυτά που ελέγχθηκαν καθώς και στα φυτά αγρίου τύπου (WT). Το γονίδιο *HSR203j* δεν εκφράστηκε σε κανένα φυτό, ενώ το *PR1b* εκφράστηκε μόνο στο φυτό-μάρτυρα (1) και τα διαγονιδιακά φυτά (2, 3, 4). Τέλος, το γονίδιο *PR1a* που εμπλέκεται με το μονοπάτι βιοσύνθεσης πρωτεϊνών παθογένειας εκφράστηκε τόσο στα φυτά-μάρτυρες, όσο και στα διαγονιδιακά φυτά, πλην του φυτού (6) (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11: Επαγωγή γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα σε φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{P_{sph}}), έπειτα από την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών. Έκφραση των *AOX* (A), *COL1* (B), *EF1a* (C), *HIN1* (D), *hsr203J* (E), *NPR1* (F) *PR1a* (G), *PR1b* (H), *SIPK* (I), *WIPK* (J) που καθορίστηκε από RT-PCR σε SP/HrpZ_{P_{sph}} διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* (2, 3, 4, 5, 6, 8) και φυτά άγριου τύπου (WT) (1, 7). M: Μοριακός δείκτης σε bp (100 bp ladder, NEB). Προϊόντα ενίσχυσης που αντιστοιχούν στα γονίδια *AOX* (160 bp), *COL1* (228 bp), *EF1a* (669 bp), *HIN1* (847 bp), *hsr203J* (596 bp), *NPR1* (273 bp), *PR1a* (335 bp), *PR1b* (216 bp), *SIPK* (755 bp) και *WIPK* (1158 bp) στους 35 κύκλους

Κρίθηκε επίσης, σημαντικός ο έλεγχος έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με μονοπάτια άμυνας των φυτών, αλλά δεν εμπλέκονται σε μονοπάτια πυροδότησης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), εφόσον προηγούμενες μελέτες τη συνδέουν, όπως και τα υπό μελέτη γονίδια, άμεσα μόνο με την επίδραση βιοτικών καταπονήσεων (Pontier et al., 1999; Hsiang-En Huang et al., 2004; Mysore & Ryu, 2004; Takahashi et al., 2004), έπειτα από λιγότερους κύκλους ενίσχυσης PCR (24 / 20 κύκλους). Από τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων στους 20 κύκλους δεν υπήρξε προϊόν (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Στους 24 κύκλους το γονίδιο *AOX* εκφράστηκε σε όλα τα φυτά εκτός από το φυτό (8) που εκφράζει τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{P_{sph}}). Το γονίδιο *COL1* εκφράστηκε στις επεμβάσεις (2) και (3), σε μικρότερη ποσότητα από τους 35 κύκλους, ενώ δεν υπήρξε προϊόν από τα φυτά - μάρτυρες. Το γονίδιο *NPR1* δεν εκφράστηκε σε κανένα από τα φυτά που ελέγχθηκαν, σε αντίθεση με τους 35 κύκλους. Τέλος, το γονίδιο *PR1a* παρουσίασε χαμηλή έκφραση στα φυτά (2) και (3) (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12: Επαγωγή γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα σε φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{P_{sph}}), έπειτα από την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών. Έκφραση των *AOX* (A), *COL1* (B), *NPR1* (C), *PR1a* (D) που καθορίστηκε από RT-PCR σε SP/HrpZ_{P_{sph}} διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* (2, 3, 4, 5, 6) και φυτά άγριου τύπου (WT) (1, 7). M: Μοριακός δείκτης σε bp (100 bp ladder, NEB). Προϊόντα ενίσχυσης που αντιστοιχούν στα γονίδια *AOX* (160 bp), *COL1* (228 bp), *NPR1* (273 bp), *PR1a* (335 bp), στους 24 κύκλους

3.4.2. Απόκριση των φυτών σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (Cold Stress)

Έξι καλά ανεπτυγμένα φυτά της σειράς **161-16** και τέσσερα φυτά - μάρτυρες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (4 °C) για 120 min. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, έγινε λήψη φυλλικών δειγμάτων για εξαγωγή RNA σε δύο χρόνους (60, 120 min).

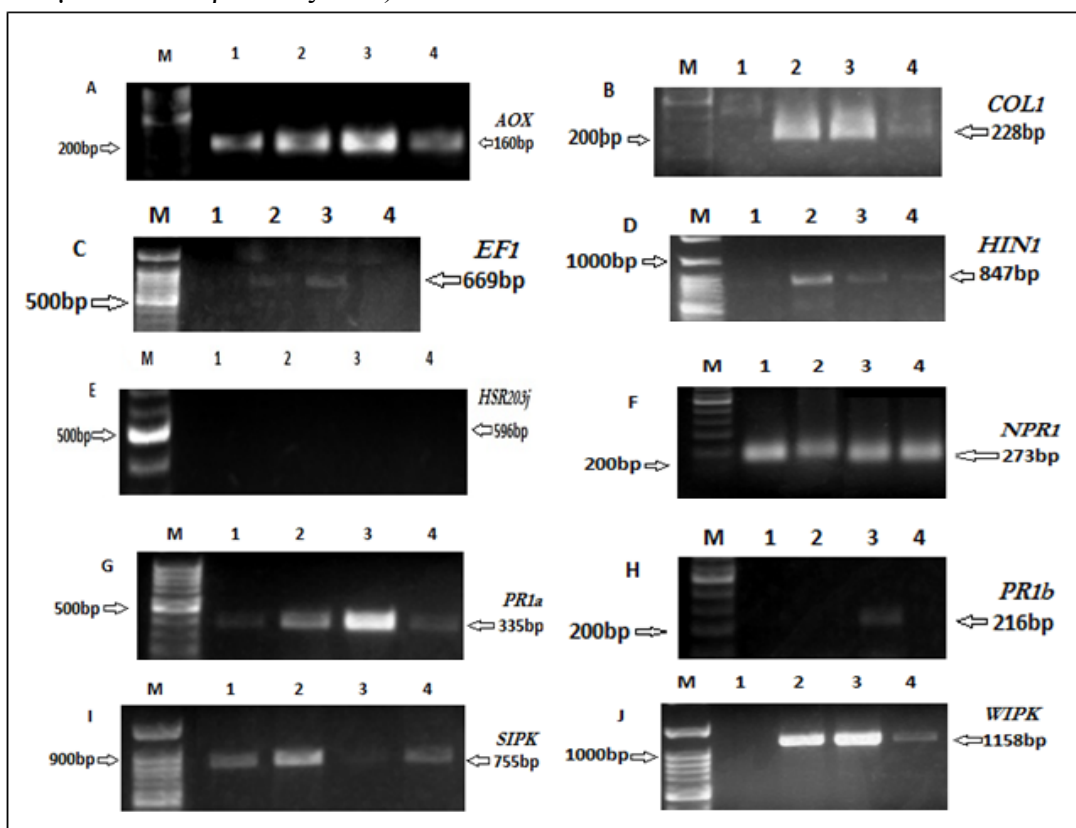
Κατά την επίδραση ακραίων χαμηλών θερμοκρασιών, τα φυτά της διαγονιδιακής σειράς **161-16**, που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{P_{sph}}) δε φάνηκε να παρουσιάζουν μακροσκοπικά διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα καθ' όλη τη διάρκεια της καταπόνησης (Εικόνα 3.13).



Εικόνα 3.13: Φυτά αγρίου τύπου (αριστερά) και της διαγονιδιακής σειράς 161-16 (δεξιά) A. 30min, B. 60min και C. 90min μετά την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών

Κατά την επίδραση ακραίων χαμηλών θερμοκρασιών, παρατηρήθηκε έκφραση του *AOX*, που σχετίζεται με τη βιοσύνθεση ενεργών ριζών οξυγόνου, η οποία φάνηκε να είναι αυξημένη στα διαγονιδιακά φυτά σε σχέση με το μάρτυρα. Επίσης, τα γονίδια *COL1*, *WIPK* και *HIN1* παρουσίασαν παρόμοια αποτελέσματα, εφόσον δεν εκφράστηκαν στα φυτά-μάρτυρες. Τα γονίδια *NPR1*, *PR1a* και *SIPK* εκφράστηκαν σε όλα τα διαγονιδιακά φυτά αλλά και τα φυτά-μάρτυρες. Το γονίδιο *HSR203j* δεν εκφράστηκε καθόλου, ενώ το *PR1b* εκφράστηκε μόνο στο διαγονιδιακό φυτό (3) (Εικόνα 3.14).

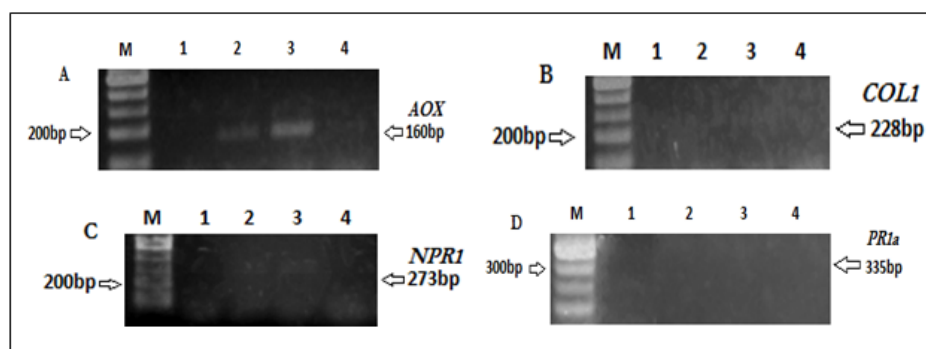
Όπως και έπειτα από την επίδραση ακραίων υψηλών θερμοκρασιών, έγινε περαιτέρω έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με μονοπάτια άμυνας των φυτών, αλλά δεν εμπλέκονται σε μονοπάτια πυροδότησης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), στους 24 κύκλους PCR. Από τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων στους 20 κύκλους δεν υπήρξε προϊόν (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 3.14: Επαγωγή γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα σε φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (*SP/HrpZ_{PspH}*), έπειτα από την επίδραση ακραίων χαμηλών θερμοκρασιών. Έκφραση των *AOX* (A), *COL1* (B), *EF1a* (C), *HIN1* (D), *hsr203J* (E), *NPR1* (F) *PR1a* (G), *PR1b* (H), *SIPK* (I), *WIPK* (J) που καθορίστηκε από RT-PCR σε *SP/HrpZ_{PspH}* διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* (2, 3, 4) και φυτά άγριου τύπου (WT) (1). M: Μοριακός δείκτης σε bp (100 bp ladder, NEB). Προϊόντα ενίσχυσης που αντιστοιχούν στα γονίδια *AOX* (160 bp), *COL1* (228 bp), *EF1a* (669 bp), *HIN1* (847 bp), *hsr203J* (596 bp), *NPR1* (273 bp), *PR1a* (335 bp), *PR1b* (216 bp), *SIPK* (755 bp) και *WIPK* (1158 bp) στους 35 κύκλους

Έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων στους 24 κύκλους, έπειτα από την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών, παρατηρήθηκε μόνο στις επεμβάσεις (2) και (3) για τα γονίδια

AOX και *NPR1*, ενώ μειωμένη έκφραση του γονιδίου *PR1a* παρατηρήθηκε επίσης στο φυτό (3) (Εικόνα 3.15).



Εικόνα 3.15: Επαγωγή γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα σε φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{Psph}), έπειτα από την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών. Έκφραση των *AOX* (A), *COL1* (B), *NPR1* (C), *PR1a* (D) που καθορίστηκε από RT-PCR σε SP/HrpZ_{Psph} διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* (2, 3, 4) και φυτά άγριου τύπου (WT) (1). M: Μοριακός δείκτης σε bp (100 bp ladder, NEB). Προϊόντα ενίσχυσης που αντιστοιχούν στα γονίδια *AOX* (160 bp), *COL1* (228 bp), *NPR1* (273 bp), *PR1a* (335 bp), στους 24 κύκλους

3.4.3. Απόκριση των φυτών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (Salinity)

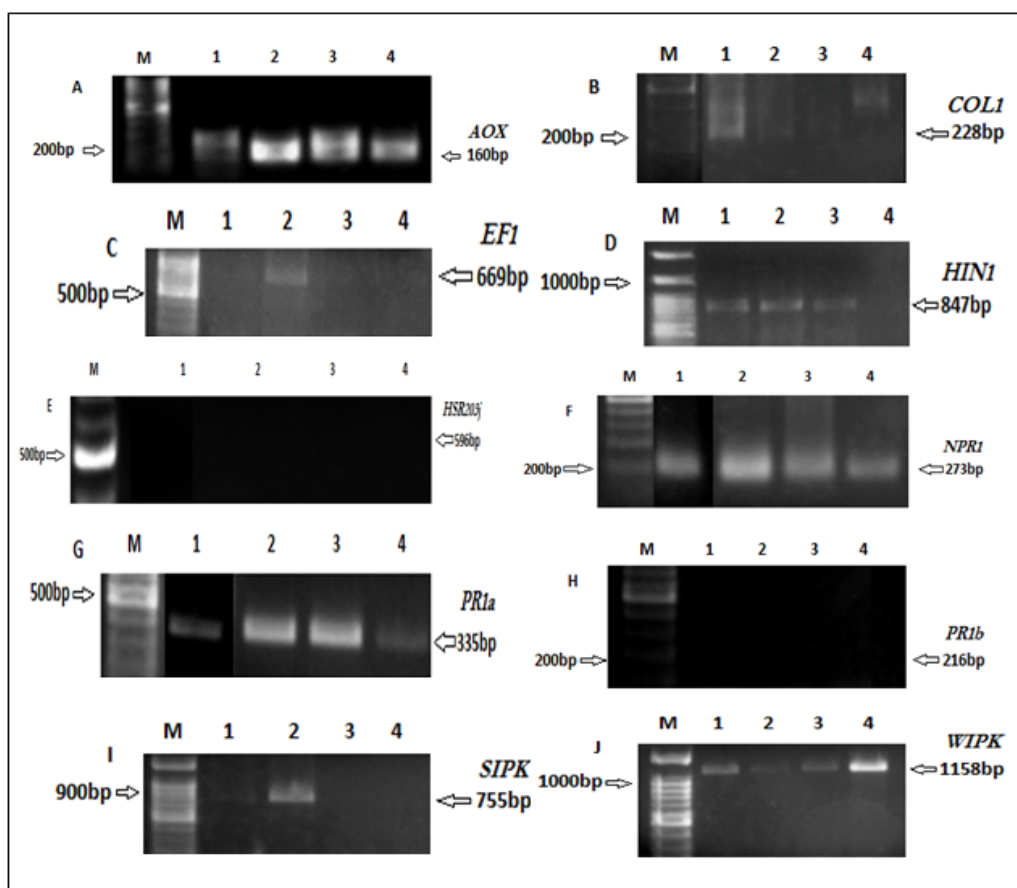
Τέσσερα καλά ανεπτυγμένα φυτά της σειράς **161-12** και τέσσερα της **161-16**, καθώς και δύο φυτά – μάρτυρες (**WT**) υποβλήθηκαν σε καταπόνηση υψηλής αλατότητας, μέσω χορήγησης 200 ml διαλύματος NaCl ανά δύο μέρες. Ακολούθησε δειγματοληψία φύλλων για εξαγωγή RNA και έλεγχος της επαγωγής γονιδίων που σχετίζονται με βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών.



Εικόνα 3.16: Φυτά αγρίου τύπου (αριστερά) και των διαγονιδιακών σειρών 161-12 και 161-14 έπειτα από την επίδραση αλατότητας, στο χρονικό διάστημα των 16h

Κατά τη διάρκεια της επίδρασης αλατότητας δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαγονιδιακών σειρών **161-12**, **161-14** και των φυτών μαρτύρων (**WT**), όσον αφορά σε μακροσκοπικά συμπτώματα σταδιακής μάρανσης των φυτών (Εικόνα 3.16).

Κατά τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων εμπλεκόμενων με τα μονοπάτια άμυνας των φυτών, έπειτα από την επίδραση συνθηκών αλατότητας, παρατηρήθηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονταν με τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών παθογένειας (*PR1a*), με το μονοπάτι βιοσύνθεσης του σαλυκιλικού οξέος (*NPR1*) καθώς και με τη βιοσύνθεση ενεργών ριζών οξυγόνου (*AOX*). Από τα γονίδια που εμπλέκονταν στο μονοπάτι επαγωγής αντίδρασης υπερευαισθησίας, μόνο το *WIPK* εκφράστηκε σε όλα τα φυτά (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά), ενώ το *SIPK* φάνηκε να εκφράζεται μόνο σε ένα διαγονιδιακό φυτό (2). Το γονίδιο *HSR203j*, που εμπλέκεται στο μονοπάτι επαγωγής της HR καθώς και το *PR1b*, που εμπλέκεται στη διαδικασία βιοσύνθεσης πρωτεϊνών παθογένειας, δεν εκφράστηκαν κατά τη καταπόνηση αλατότητας (Εικόνα 3.17).

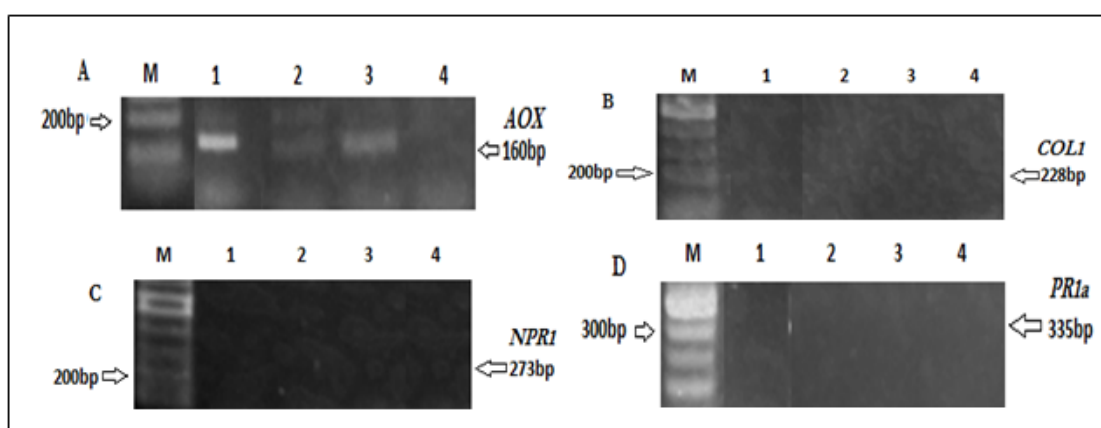


Εικόνα 3.17: Επαγωγή γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα σε φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{P_{sph}}), έπειτα από την επίδραση αλατότητας. Έκφραση των *AOX* (A), *COL1* (B), *EF1a* (C), *HIN1* (D), *hsr203J* (E), *NPR1* (F) *PR1a* (G), *PR1b* (H), *SIPK* (I), *WIPK* (J) που καθορίστηκε από RT-PCR σε SP/HrpZ_{P_{sph}} διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* (1, 3, 4) και φυτά αγρίου τύπου (WT) (2). M: Μοριακός δείκτης σε bp (100 bp ladder, NEB). Προϊόντα ενίσχυσης που αντιστοιχούν στα γονίδια *AOX* (160 bp), *COL1* (228 bp),

EF1a (669 bp), *HIN1* (847 bp), *hsr203J* (596 bp), *NPR1* (273 bp), *PR1a* (335 bp), *PR1b* (216 bp), *SIPK* (755 bp) και *WIPK* (1158 bp) στους 35 κύκλους

Το γονίδιο *COL1* εκφράστηκε σε χαμηλά επίπεδα τόσο στα διαγονιδιακά όσο και στα φυτά-μάρτυρες, ενώ φάνηκε να καταστέλλεται η έκφρασή του στο διαγονιδιακό φυτό 4. Τέλος, το *HIN1*, εμπλεκόμενο με το σηματοδοτικό μονοπάτι *hrp*, εκφράστηκε τόσο στα φυτά αγρίου τύπου όσο και στις διαγονιδιακές σειρές που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της, εκτός του φυτού (4) (Εικόνα 3.17).

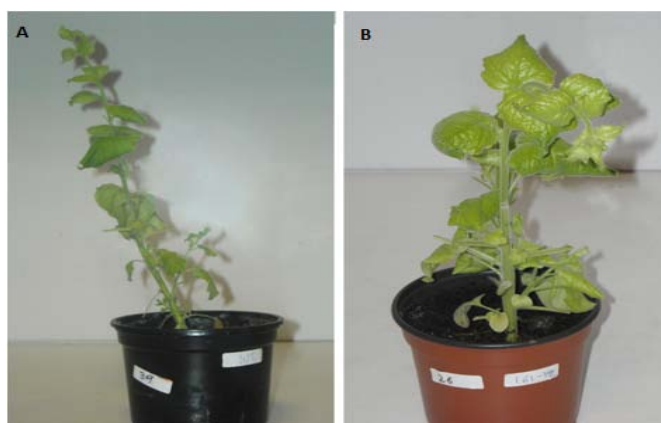
Ακολούθησε έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με μονοπάτια άμυνας των φυτών, αλλά δεν εμπλέκονται σε μονοπάτια πυροδότησης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), στους 24 κύκλους και στους 20 κύκλους, όπου δεν υπήρξε προϊόν (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Στους 24 κύκλους προϊόν έδωσε μόνο το γονίδιο *AOX* και για τις τρεις επεμβάσεις, καθώς και για το φυτό - μάρτυρα (Εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.18: Επαγωγή γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα σε φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (*SP/HrpZ_{P_{sph}}*), έπειτα από την επίδραση αλατότητας. Έκφραση των *AOX* (A), *COL1* (B), *NPR1* (C), *PR1a* (D) που καθορίστηκε από RT-PCR σε *SP/HrpZ_{P_{sph}}* διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* (2, 3, 4) και φυτά αγρίου τύπου (WT) (1). M: Μοριακός δείκτης σε bp (100 bp ladder, NEB). Προϊόντα ενίσχυσης που αντιστοιχούν στα γονίδια *AOX* (160 bp), *COL1* (228 bp), *NPR1* (273 bp), *PR1a* (335 bp), στους 24 κύκλους

3.4.4. Απόκριση των φυτών έπειτα από την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV)

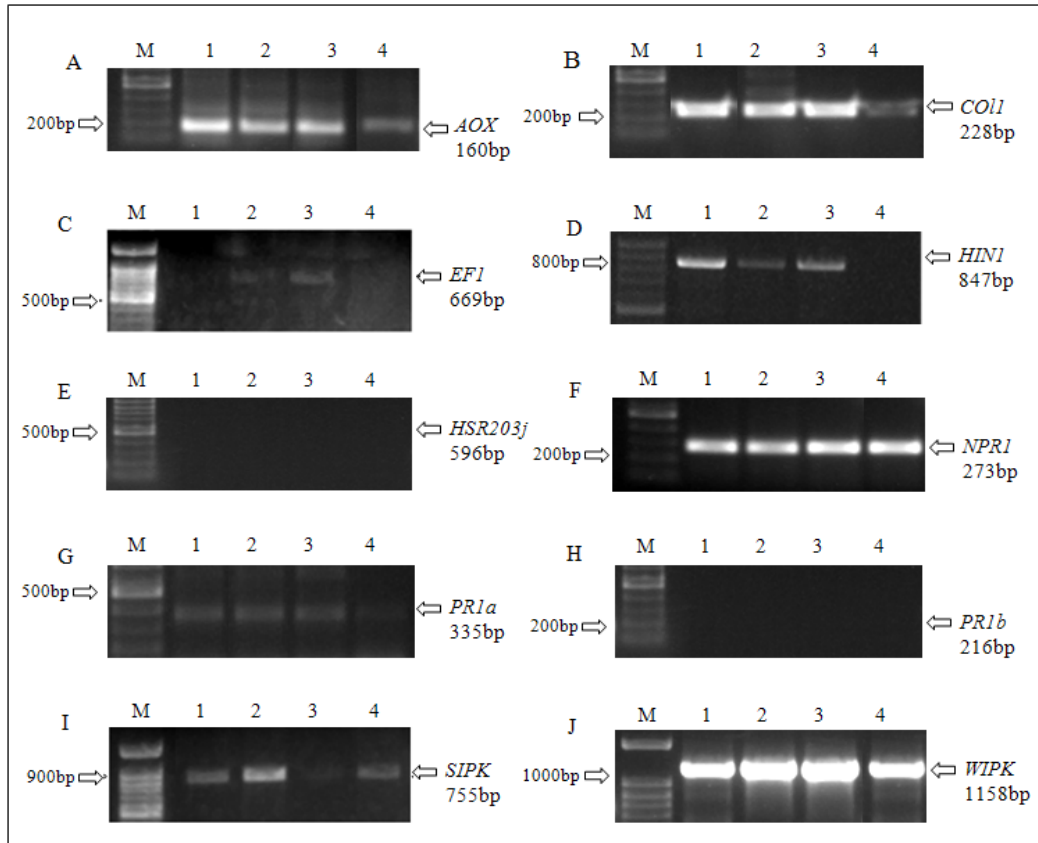
Τέσσερα επιλεγμένα φυτά της σειράς **161-12** και τέσσερα της **161-14**, καθώς και δύο φυτά - μάρτυρες (**WT**) τοποθετήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής υπό συνθήκες υπεριώδους ακτινοβολίας για 45 min (UV: 254 nm). Τόσο τα διαγονιδιακά φυτά όσο και τα φυτά-μάρτυρες δεν παρουσίασαν μακροσκοπικά συμπτώματα κατά τη διάρκεια της καταπόνησης (Εικόνα 3.19). Ορατά συμπτώματα άρχισαν να παρατηρούνται μετά το πέρας τριών ημερών, έπειτα από την παραμονή τους σε συνθήκες δωματίου, όπου και έγινε δειγματοληψία.



Εικόνα 3.19: Α. Φυτά αγρίου τύπου (αριστερά) και Β. της διαγονιδιακής σειράς 161-12 (δεξιά) έπειτα από την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV: 254 nm) για 45 min

Κατά τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων εμπλεκόμενων με τα μονοπάτια άμυνας των φυτών έπειτα από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, σημειώθηκε έκφραση των γονιδίων *AOX* και *COL1*, που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση ενεργών ριζών οξυγόνου και ιασμονικού οξέος αντίστοιχα, η οποία φάνηκε να είναι αυξημένη στα διαγονιδιακά φυτά σε σχέση με το μάρτυρα. Επίσης, η έκφραση των γονιδίων *HIN1* και *PR1a*, που εμπλέκεται με το σηματοδοτικό μονοπάτι *hcr* και τη βιοσύνθεση σαλικυλικού οξέος αντίστοιχα, διαφοροποιήθηκε μεταξύ των διαγονιδιακών σειρών που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της και των φυτών αγρίου τύπου. Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου *PR1a*, που σχετίζεται με τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών παθογένειας κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα στα διαγονιδιακά και τα φυτά αγρίου τύπου.

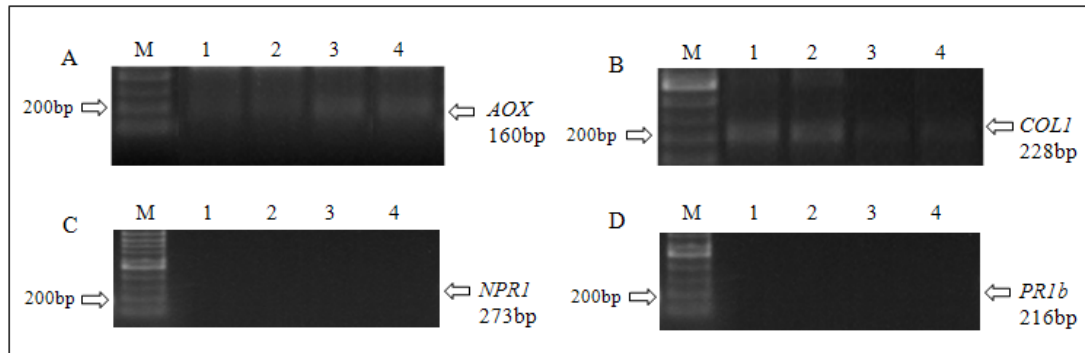
Αναφορικά με τα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι επαγωγής αντίδρασης υπερευαισθησίας, το γονίδιο *WIPK* παρουσίασε υψηλή έκφραση σε όλα τα φυτά (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά), ενώ το γονίδιο *SIPK* παρουσίασε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης, με το διαγονιδιακό φυτό (3) να σημειώνει τη χαμηλότερη έκφραση. Το γονίδιο *HSR203j*, που εμπλέκεται στο μονοπάτι επαγωγής της HR καθώς και το *PR1b*, που εμπλέκεται στη διαδικασία βιοσύνθεσης πρωτεϊνών παθογένειας, δεν εκφράστηκαν κατά την καταπόνηση υπεριώδους ακτινοβολίας (Εικόνα 3.20).



Εικόνα 3.20: Επαγωγή γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα σε φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{P_{sph}}), έπειτα από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Έκφραση των *AOX* (A), *COL1* (B), *EF1a* (C), *HIN1* (D), *hsr203J* (E), *NPR1* (F) *PR1a* (G), *PR1b* (H), *SIPK* (I), *WIPK* (J) που καθορίστηκε από RT-PCR σε SP/HrpZ_{P_{sph}} διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* (1, 2, 3) και φυτά άγριου τύπου (WT) (4). M: Μοριακός δείκτης σε bp (100 bp ladder, NEB). Προϊόντα ενίσχυσης που αντιστοιχούν στα γονίδια *AOX* (160 bp), *COL1* (228 bp), *EF1a* (669 bp), *HIN1* (847 bp), *hsr203J* (596 bp), *NPR1* (273 bp), *PR1a* (335 bp), *PR1b* (216 bp), *SIPK* (755 bp) και *WIPK* (1158 bp) στους 35 κύκλους

Ακολούθησε έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε μονοπάτια άμυνας των φυτών, αλλά δεν σχετίζονται με την πυροδότηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), τόσο στους 20 όσο και στους 24 κύκλους ενίσχυσης (PCR).

Κατά τον έλεγχο της έκφρασης των σχετικών γονιδίων στους 20 κύκλους δεν υπήρξε προϊόν ενίσχυσης (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων στους 24 κύκλους, έπειτα από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας σημειώθηκε για τα γονίδια *AOX* και *COL1*. Αντίθετα, τα γονίδια *NPR1* και *PR1a* δεν φάνηκε να εκφράζονται τόσο στα διαγονιδιακά όσο και στα αγρίου τύπου φυτά (Εικόνα 3.21).



Εικόν

α 3.21: Επαγωγή γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα σε φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{P_{sph}}), έπειτα από την επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας (UV). Έκφραση των *AOX* (A), *COLI* (B), *NPR1* (C), *PRIa* (D) που καθορίστηκε από RT-PCR σε SP/HrpZ_{P_{sph}} διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* (1, 2, 3) και φυτά άγριου τύπου (WT) (4). M: Μοριακός δείκτης σε bp (100 bp ladder, NEB). Προϊόντα ενίσχυσης που αντιστοιχούν στα γονίδια *AOX* (160 bp), *COLI* (228 bp), *NPR1* (273 bp), *PRIa* (335 bp), στους 24 κύκλους

3.5 Αξιολόγηση μεταβολικού προφίλ

Συνολικά αξιολογήθηκαν 40 δείγματα φυτικού ιστού - φύλλων, έπειτα από την εφαρμογή διαφόρων αβιοτικών καταπονήσεων και 24 δείγματα άνευ ιστού (blank) (Πίνακας 3.1). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δεδομένων που προήλθαν έπειτα από την επίδραση υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών καθώς και την επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας δεν παρουσιάζονται.

Πίνακας 3.1: Λίστα των δειγμάτων του είδους *N. benthamiana* που αξιοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα του φυτού στην καταπόνηση από αβιοτικούς παράγοντες (ακραίες θερμοκρασίες, υψηλή αλατότητα, υπερϊώδη ακτινοβολία)

<u>CS30</u>	<u>No.</u>	<u>gr.</u>	<u>NaCl6</u>	<u>No.</u>	<u>gr.</u>
WT	1	0,047	WT	25	0,0642
WT	2	0,066	WT	26	0,0449
WT	3	0,458	WT	27	0,0449
WT	4	0,2008	WT	28	0,1815
161-16	5	0,503	161-12	29	0,4079
161-16	6	0,05	161-12	30	0,521
161-16	7	0,0619	161-12	31	0,1513
161-16	8	0,0549	161-12	32	0,4537
<u>CS60</u>	<u>No.</u>	<u>gr.</u>	<u>UV3</u>	<u>No.</u>	<u>gr.</u>
WT	9	0,0582	WT	33	0,0417
WT	10	0,04	WT	34	0,0681
WT	11	0,1904	WT	35	0,1989

WT	12	0,0582	WT	36	0,1173
161-16	13	0,0582	161-12	37	0,3875
161-16	14	0,04	161-12	38	0,1962
161-16	15	0,233	161-12	39	0,2582
161-16	16	0,1942	161-12	40	0,2694
HS30	No.	gr.			
WT	17	0,0516			
WT	18	0,0448			
WT	19	0,0872			
WT	20	0,0672			
161-16	21	0,0552			
161-16	22	0,0604			
161-16	23	0,0998			
161-16	24	0,114			

3.5.1 Αξιολόγηση μεταβολικού προφίλ έπειτα από την επίδραση υψηλής αλατότητας

Τέσσερα φυτά της διαγονιδιακής σειράς 161-12 που εκφράζουν την εκκρινόμενη μορφή της χαρπίνης, καθώς και τέσσερα φυτά αγρίου τύπου αξιολογήθηκαν έπειτα από την επίδραση συνθηκών υψηλής αλατότητας για χρονικό διάστημα έξι ημερών.

Η μελέτη της επίδρασης της αλατότητας στο μεταβολικό προφίλ των φυτών κατέδειξε σημαντικές μεταβολές που διαφοροποιούν σαφώς τα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν την εκκρινόμενη μορφή της χαρπίνης από τα φυτά αγρίου τύπου. Από τους 109 μεταβολίτες που συνολικά αξιολογήθηκαν, τα επίπεδα μόνο 18 εκ αυτών κρίθηκαν σημαντικά έπειτα από στατιστική ανάλυση των δεδομένων με τη χρήση του προγράμματος SPSS Statistics 20 της IBM, όπου πραγματοποιήθηκε t-test (Πίνακας 3.2, Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.2: Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις κατά τη διεξαγωγή του t-test, για τα φυτά της διαγονιδιακής σειράς (1) και τα φυτά- μάρτυρες (2) που υπεβλήθησαν σε καταπόνηση αλατότητας για χρονικό διάστημα έξι ημερών

Μεταβολίτης	Σειρά	N	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα μεσής τιμής
2-keto- L- gulonic acid	1	4	.013173090450	.0243167098754	.0121583549377
	2	4	.000510652728	.0002578187078	.0001289093539
L-(-)- fucose	1	4	.000000000000	.000000000000	.000000000000
	2	4	.000244839854	.0001478221469	.0000739110735

D-glucose	1	4	.205232493375	.1788547406611	.0894273703306
	2	4	.212611625000	.0717891951270	.0358945975635
nornicotine	1	4	.000000000000	.000000000000	.000000000000
	2	4	.000018817176	.0000264228963	.0000132114482
Galacturonic acid	1	4	.000005499940	.0000078095773	.0000039047886
	2	4	.000000000000	.000000000000	.000000000000
raffinose	1	4	.000685782050	.0013715641000	.0006857820500
	2	4	.000013402240	.0000222089275	.0000111044637
galactinol	1	4	.000420750454	.0003201071911	.0001600535956
	2	4	.001500322925	.0006156589289	.0003078294645
palatinose	1	4	.000000000000	.000000000000	.000000000000
	2	4	.000057764871	.0000981711088	.0000490855544
threose	1	4	.000032045304	.0000631090378	.0000315545189
	2	4	.000000000000	.000000000000	.000000000000
arbutin	1	4	.000000000000	.000000000000	.000000000000
	2	4	.000021475374	.0000374713263	.0000187356632
D-Ala-D-Ala	1	4	.000067803054	.0001064161567	.0000532080784
	2	4	.000000000000	.000000000000	.000000000000
L- ornithine	1	4	.000000000000	.000000000000	.000000000000
	2	4	.000011382596	.0000131524979	.0000065762490
porphine	1	4	.005997483463	.0069985178324	.0034992589162
	2	4	.001389825200	.0004546987124	.0002273493562
Gluconic acid lactone	1	4	.000149726730	.0001733815505	.0000866907752
	2	4	.000000000000	.000000000000	.000000000000
glycine	1	4	.000272319410	.0001476180899	.0000738090449
	2	4	.000290289700	.0000202182960	.0000101091480
lactose	1	4	.000008274261	.0000165485215	.0000082742608
	2	4	.000073874755	.0001477495100	.0000738747550

malonic acid	1	4	.000003060700	.0000045965703	.0000022982851
	2	4	.000016340086	.0000143450271	.0000071725135
napthalene	1	4	.000000000000	.000000000000	.000000000000
	2	4	.000002388321	.0000028281951	.0000014140975

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis) με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Unscrambler (Πίνακας 3.4, Πίνακας 3.5), ενώ η γραφική απεικόνισή τους έγινε με τη χρήση του προγράμματος Sigmaplot 11.0 (Διάγραμμα 3.11).

Πίνακας 3.3: Πρότυπο των περισσότερο μεταβαλλόμενων μεταβολιτών σε φυτά του είδους *N. benthamiana* που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση υψηλής αλατότητας για χρονικό διάστημα έξι ημερών. Επίπεδο σημαντικότητας: $\alpha = 0.05$

Μεταβολίτης	Σημαντικότητα
2-keto-L-gluconic acid 2	0.025
L-(-)-fucose 1	0.000
D-glycose 1	0.022
nornicotine	0.046
galacturonic acid 2	0.049
raffinose	0.026
galactinol 2	0.016
palatinose	0.027
threose 1	0.024
arbutin	0.026
D-Ala-D-Ala 2	0.033
L-ornithine 2	0.000
porphine 1	0.045
gluconic acid lactone 2	0.000
glycine	0.039
lactose 2	0.038
malonic acid	0.007
napthalene	0.000

Πίνακας 3.4: Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών ανά επέμβαση και φυτό έπειτα από την επίδραση αλατότητας για χρονικό διάστημα έξι ημερών. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν 4 φυτά αγριίου τύπου και 4 φυτά της διαγονιδιακής σειράς 161-12 που εκφράζουν την εκκρινόμενη μορφή της χαρπίνης HrpZ_{PspH}

Επέμβαση	PC1	PC2
T1	0,415743	0,302026

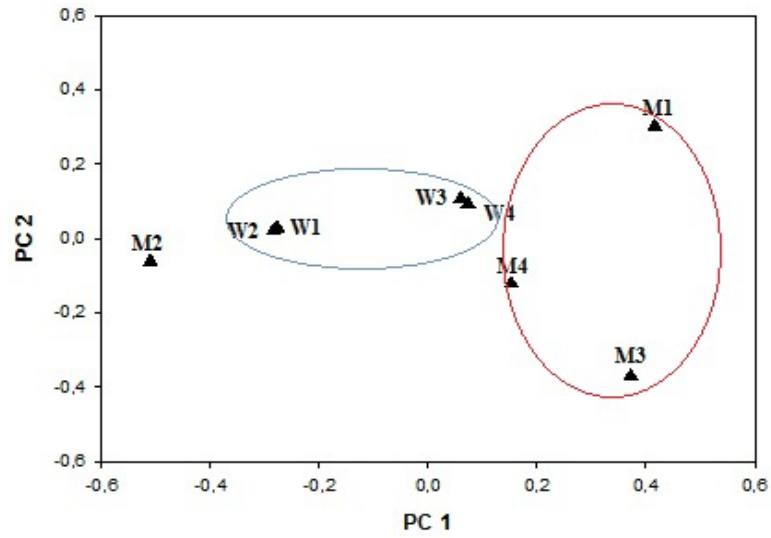
T2	-0,51064	-0,0609
T3	0,371922	-0,36993
T4	0,152051	-0,12093
W1	-0,27758	0,02827
W2	-0,28438	0,021264
W3	0,059745	0,107519
W4	0,073136	0,092687

Πίνακας 3.5: Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών ανά μεταβολίτη για τα φυτά της διαγονιδιακής σειράς 161-12, που εκφράζουν την εκκρινόμενη μορφή της χαρπίνης HrpZ_{PspH}, και τα φυτά αγρίου τύπου που υπεβλήθησαν σε καταπόνηση αλατότητας

Μεταβολίτης	PC1	PC2
[1000] 2-amino-1-phenylethanol [15.668]	0,011464	-0,01089
[1001] phenylethylamine [13.766]	0,000986	-0,00084
[1004] phosphoric acid [9.966]	0,008862	0,001872
[1045] putrescine [15.709]	0,00022	8,99E-06
[10465] heptadecanoic acid [19.8]	0,000219	-0,00028
[10467] arachidic acid [22.367]	0,000117	-0,00011
[1060] pyruvic acid [6.714]	1,59E-05	2,47E-05
[10712] cellobiose 2 [24.7]	-1,26E-05	0,000239
[107689] L-(+) lactic acid [6.851]	0,023046	-0,01839
[11005] myristic acid [16.887]	0,001082	-0,00082
[1102] spermidine 2 [20.811]	2,48E-06	9,22E-05
[1110] succinic acid [10.509]	0,000568	0,000386
[1176] urea [9.599]	0,000267	0,000188
[135] 4-hydroxybenzoic acid [14.505]	9,44E-05	-0,00016
[138] 5-aminovaleric acid 2 [14.955]	0,000379	-0,00084
[145742] L-proline 2 [10.321]	0,000981	-0,00074
[1531] 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol 2 [10.56]	8,77E-06	2,79E-05
[1549111] caffeic acid [19.755]	0,000291	-0,00055
[156807] D-lyxosylamine 1 [14.737]	-0,0001	5,16E-05
[159793] 2-keto-L-gulonic acid 2 [17.998]	0,024677	-0,06627
[16219560] lactobionic acid 1 [24.583]	0,001349	0,003464
[16219957] sedoheptulose anhydride monohydrate [17.766]	0,000223	0,000764
[169019] D-threitol [12.954]	0,00109	0,001311
[17106] L-(-)-fucose 1 [15.614]	-2,23E-05	0,000299
[1833] methoxytryptamine [22.284]	-2,37E-05	-0,00014
[18950] D-mannose 1 [17.287]	0,062549	0,388888
[18950] D-mannose 2 [17.435]	0,02946	-0,05101
[21236] L-norleucine 2 [10.607]	8,41E-05	-9,44E-06
[239] Beta- alanine 1 [12.044]	-1,21E-06	8,19E-06
[243] benzoic acid [9.594]	0,000252	-0,00014

[24749] D-glucose 1 [17.426]	0,326201	0,182028
[26519] tetratriacontane [29.185]	0,00268	-0,00537
[2682] 1-hexadecanol [18.045]	3,28E-05	-0,00011
[2724552] tagatose 2 [17.212]	0,063637	0,321095
[3037582] mucic acid [18.907]	7,07E-05	0,000275
[311] citric acid [16.615]	0,007538	-0,00299
[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	0,003603	0,001753
[3893] lauric acid [14.789]	2,53E-05	-3,94E-05
[412] nornicotine [13.255]	-2,61E-06	2,45E-05
[439194] glyceric acid [10.735]	0,005922	-0,00174
[439215] galacturonic acid 2 [18.111]	5,40E-06	1,74E-05
[439242] Raffinose [29.282]	0,001501	0,003112
[439280] 5-hydroxy-L-tryptophan 1 [22.224]	8,69E-05	-4,29E-05
[439451] galactinol 2 [26.479]	-0,00041	0,000789
[439559] palatinose [25.482]	9,61E-06	7,34E-05
[439665] threose 1 [12.251]	6,09E-05	-0,00018
[439766] citramalic acid [12.63]	0,000537	0,000444
[440575] trans-3-hydroxy-L-proline 2 [12.603]	3,35E-06	-2,42E-07
[440936] arbutin [23.393]	8,10E-06	3,02E-05
[441032] D (+)altrose 2 [17.46]	0,000528	0,000737
[441035] talose 1 [17.4]	-9,61E-05	-0,0002
[444266] maleic acid [10.323]	0,007749	0,004762
[444305] tartaric acid [14.588]	0,000238	-0,00016
[444972] fumaric acid [10.94]	0,001091	7,16E-06
[448388] D-allose 1 [17.278]	0,000736	-0,00341
[500] 4-guanidinobutyric acid 2 [13.348]	0,000413	0,000356
[5202] serotonin 2 [22.767]	6,84E-05	-9,11E-05
[5280335] D-sphingosine 3 [22.527]	6,36E-05	-9,61E-05
[5281] stearic acid [20.675]	0,033178	-0,04435
[5780] D-sorbitol [17.898]	1,25E-06	0,000189
[5950] L-alanine 1 [7.495]	-0,00026	0,000433
[5951] L-serine 2 [11.174]	0,000547	0,003607
[5960] aspartic acid 2 [13.207]	0,000887	0,000129
[5962] L-lysine 2 [17.643]	-8,48E-06	1,12E-05
[5984] fructose 1 [17.18]	0,092396	0,50869
[5988] Sucrose [23.988]	0,310622	0,498644
[601] D-Ala-D-Ala2 [14.11]	0,000135	-0,00026
[604] gluconic acid 2 [18.297]	0,000118	-4,48E-05
[6057] tyrosine 2 [17.871]	5,14E-05	1,39E-05
[60961] adenosine [23.825]	1,88E-05	4,86E-05
[6106] L-leucine 2 [9.945]	3,70E-05	-0,00019
[6255] maltose 2 [24.915]	5,36E-05	-0,00013
[6255] maltose 1 [24.702]	0,000237	0,000696
[6262] L-ornithine 2 [16.632]	-1,68E-05	4,20E-06
[6287] L-valine 2 [9.151]	0,000228	-4,71E-05

[6288] L-threonine 2 [11.464]	0,000342	0,000549
[6305] L-tryptophan 2 [20.466]	3,09E-06	0,000126
[6508] quinic acid [17.076]	0,010642	0,007148
[6537496] chlorogenic acid 2 [27.18]	0,013076	0,032089
[65550] D-lyxose 1 [14.741]	0,000702	0,000386
[656894] isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside [19.097]	0,000458	0,000845
[66868] porphine 1 [10.77]	0,010706	0,012452
[68152] 3-hydroxypropanoic acid 2 [13.848]	0,000117	0,000366
[736] gluconic acid lactone 2 [17.433]	-3,60E-05	-0,0005
[738] L-glutamine 3 [16.092]	2,56E-05	0,000363
[7405] L-pyroglutamic acid [13.218]	0,001071	0,002076
[7427] D-(+) trehalose [24.752]	6,00E-05	0,000196
[750] glycine [10.456]	0,000206	0,000176
[753] glycerol [9.941]	0,011956	-0,00227
[757] glycolic acid [7.049]	0,000346	-0,00025
[791] DL-isoleucine 2 [10.225]	0,000139	-3,06E-06
[7971] 3-hydroxypyridine [8.047]	0,000123	-0,00015
[827] ribitol [15.66]	0,006475	-0,01158
[8299] acetol 1 [13.293]	3,19E-05	0,00015
[84571] lactose 2 [24.534]	3,50E-05	8,73E-05
[8512] 1-hydroxyanthraquinone [20.965]	0,000113	-0,00013
[867] malonic acid 1 [8.919]	-1,99E-05	3,26E-06
[8742] shikimic acid [16.433]	0,000219	0,000122
[8871] 2-hydroxypyridine [6.519]	0,000772	-0,0009
[892] allo-inositol [17.245]	0,240147	0,173807
[92817] D-(+)-melezitose [29.952]	1,72E-06	-1,76E-05
[92817] melezitose [29.884]	6,17E-05	0,000145
[92824] D-malic acid [12.794]	0,847709	-0,40445
[931] naphthalene [8.87]	8,47E-07	3,53E-06
[94154] arabitol [15.601]	8,82E-05	0,00033
[94214] methyl-beta-D-galactopyranoside [16.935]	0,002015	0,001559
[971] oxalic acid [7.883]	-0,00368	0,00421
[985] palmitic acid [18.846]	0,014743	-0,01957
[993] ribose [15.113]	0,000624	0,000782



Διάγραμμα 3.11: Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA) για το σύνολο των μεταβολιτών σε φυτά του είδους *N. benthamiana* που υπέστησαν καταπόνηση αλατότητας για χρονικό διάστημα έξι ημερών. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν 4 φυτά αγρίου τύπου και 4 φυτά της διαγονιδιακής σειράς 161-12 που εκφράζουν την εκκρινόμενη μορφή της χαρπίνης HrpZ_{Psph}

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. Συζήτηση

Με δεδομένη την πολύπλευρη επίδραση των χαρπινών στα φυτά (Borejsza-Wysocka et al., 2000; Dong et al., 2005; Ren et al., 2006; Zhang et al., 2007; Shao et al., 2008; Wang et al., 2008), στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση της διαγονιδιακής έκφρασης της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}} του βακτηρίου *P. syringae* pv. phaseolicola, σε φυτά του είδους *N. benthamiana*, τόσο στον αναπτυξιακό φαινότυπο όσο και στην απόκριση φυτών που υπόκεινται σε ποικίλους παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης καθώς και η μελέτη των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή. Για το σκοπό αυτό, το γονίδιο *hrpZ* καθώς και η σύντηξή του με αλληλουχία που κωδικοποιεί για ένα φυτικό πεπτίδιο έκκρισης (signal peptide) της πρωτεΐνης παθογένειας PR1 του καπνού (SP/-HrpZ_{P_{sph}}), ώστε να κατευθύνεται η πρωτεϊνική έκφραση εξωκυτταρικά (Tampakaki & Panopoulos, 2000), εκφράστηκαν δομικά σε διαγονιδιακά φυτά και ακολούθησε η αξιολόγησή τους.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής υποδεικνύουν ότι τα φυτά κατά τη δομική έκφραση της HrpZ_{P_{sph}}, τόσο στην κανονική όσο και στην εκκρινόμενη μορφή της, παρουσιάζουν διαφοροποίηση στο φαινότυπο μεταξύ τους αλλά και μεταξύ αυτών και των φυτών μαρτύρων-αγρίου τύπου (wild type). Συγκεκριμένα, οι διαγονιδιακές σειρές που εκφράζουν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/-HrpZ_{P_{sph}}) υπερείχαν σημαντικά των φυτών- μαρτύρων τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και στα υπό μελέτη μορφολογικά χαρακτηριστικά (αριθμός φύλλων, ύψος φυτού, πλάτος και μήκος φύλλων). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την εμπλοκή των χαρπινών στα αλληλεπιδρώντα βιοχημικά μονοπάτια του σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος, καθώς και στο αναπτυξιακό και φωτοσυνθετικό μονοπάτι, προωθώντας την ανάπτυξη και αυξάνοντας τη ζωτικότητα των φυτών (Pavli et al., 2011). Παράλληλα, τα φυτά που εξέφραζαν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της χαρακτηρίστηκαν από διαφοροποίηση της χρονικής περιόδου έναρξης των φυσιολογικών διεργασιών άνθησης και καρπόδεσής τους, καθώς και από μειωμένη παραγωγή σε σπόρο συγκριτικά με τα φυτά-μάρτυρες (WT).

Η αξιοποίηση των βακτηριακών χαρπινών ως φυτοπροστατευτικές ουσίες έναντι βιοτικών καταπονήσεων (Strobel et al., 1996; Dong et al., 1999; Li & Fan, 1999; Peng et al., 2003; Takamura et al., 2004; Barbosa-Mendes et al., 2009; Percival et al., 2009) έπειτα από την ανακάλυψη ότι επάγουν το γενικό μηχανισμό άμυνας των φυτών, καθώς και η εμπλοκή τους στα βιοχημικά μονοπάτια του σαλικυλικού οξέος, του ιασμονικού οξέος και του αναπτυξιακού μονοπατιού (άμεσα συσχετιζόμενο με το αιθυλένιο) που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων (Stepanova et al., 2009), έδωσε το έναυσμα για τη διερεύνηση της επίδρασης των χαρπινών στην ανάπτυξη των φυτών και της ενδεχόμενης επαγωγής ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων.

Για το σκοπό αυτό, τα διαγονιδιακά φυτά που εξέφραζαν τη χαρπίνη στην εκκρινόμενη μορφή της υποβλήθηκαν σε ποικίλου τύπου αβιοτικές καταπονήσεις: χαμηλή θερμοκρασία, υψηλή θερμοκρασία, υψηλή αλατότητα, υπεριώδης ακτινοβολία. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται με μονοπάτια άμυνας των φυτών. Κατά την επίδραση των ποικίλων αβιοτικών καταπονήσεων τόσο τα διαγονιδιακά φυτά όσο και τα φυτά-μάρτυρες δεν παρουσίασαν μακροσκοπικά συμπτώματα, πλην της θερμικής καταπόνησης κατά την οποία τα SP/-HrpZ_{P_{sph}} φυτά παρουσίασαν φαινότυπο ανάκαμψης (recovery phenotype) ή/και ανεκτικότητα σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου.

Με στόχο τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται με μονοπάτια άμυνας των φυτών, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από τα φυτά που υπεβλήθησαν στις διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις και στη συνέχεια αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription) για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η παραπάνω ανάλυση που περιελάμβανε τον *in vitro* πολλαπλασιασμό 10 γονιδίων στους 35 κύκλους ενίσχυσης, κατέδειξε την διαφορετική έκφραση των γονιδίων τόσο μεταξύ των φυτών- μαρτύρων και των διαγονιδιακών φυτών όσο και μεταξύ των διαφορετικών τύπων καταπόνησης.

Αναφορικά με τα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), το γονίδιο *hsr203J* που σχετίζεται με την πυροδότηση της HR, δεν εκφράστηκε κατά τη διάρκεια όλων των αβιοτικών καταπονήσεων που εφαρμόστηκαν, επιβεβαιώνοντας την κύρια συσχέτιση της επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας ως μηχανισμού άμυνας έναντι βιοτικών καταπονήσεων (Pontier et al., 1999). Το γονίδιο *WIPK* παρουσίασε υψηλή έκφραση σε όλα τα φυτά (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά) κατά τη διάρκεια της επίδρασης υψηλών θερμοκρασιών, αλατότητας και υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), ενώ η έκφρασή του διαφοροποιήθηκε κατά την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών, με τη μη έκφρασή του στα φυτά- μάρτυρες. Το γονίδιο *SIPK* παρουσίασε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ των διαφόρων ειδών καταπόνησης, παρουσιάζοντας έκφραση σε όλα τα φυτά (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά) κατά τη διάρκεια της επίδρασης υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών και κατά την επίδραση ακτινοβολίας UV, ενώ έπειτα από την επίδραση αλατότητας, έκφρασή του παρατηρήθηκε μόνο στα διαγονιδιακά φυτά. Παράλληλα, η έκφραση του γονιδίου *AOX*, που σχετίζεται με την ενεργή βιοσύνθεση ριζών, παρατηρήθηκε να είναι έντονη κατά τη διάρκεια της επίδρασης υψηλών θερμοκρασιών και αλατότητας σε όλα τα φυτά (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά), ενώ εκφράστηκε μόνο στα διαγονιδιακά φυτά κατά τη διάρκεια της επίδρασης χαμηλών θερμοκρασιών και ακτινοβολίας UV, υποδηλώνοντας ότι δεν υπήρξε συμβολή των χαρπινών στη μείωσή τους κατά τη διάρκεια των καταπονήσεων και επομένως στη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων.

Έκφραση του γονιδίου *COL1*, που εμπλέκεται στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου υπήρξε σε όλα τα φυτά (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά) κατά τη διάρκεια της επίδρασης υψηλών θερμοκρασιών και αλατότητας, ενώ διαφοροποιήθηκε κατά την επίδραση των υπολοίπων επεμβάσεων. Συγκεκριμένα, κατά την επίδραση ακτινοβολίας UV

και χαμηλών θερμοκρασιών έκφραση του γονιδίου *COLI* παρατηρήθηκε μόνο στα διαγονιδιακά φυτά. Η έκφραση του κατά την επίδραση ακτινοβολίας UV και χαμηλών θερμοκρασιών μόνο στα διαγονιδιακά φυτά υποδεικνύει τη συμβολή των χαρπινών στην επαγωγή άμυνας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων και του αυξημένου ρυθμού ανάπτυξης των φυτών.

Το εμπλεκόμενο με το σηματοδοτικό μονοπάτι των χαρπινών γονίδιο, το *HIN1*, εκφράστηκε σε όλα τα φυτά (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά) κατά τη διάρκεια της επίδρασης υψηλών θερμοκρασιών και αλατότητας, ενώ διαφοροποιήθηκε κατά την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών και ακτινοβολίας UV, με την επαγωγή του μόνο στα SP/-HgrZ_{P_{sph}} φυτά.

Επίδραση των χαρπινών στα γονίδια επαγωγής και συσχετίσή τους με το μονοπάτι του SA παρουσιάστηκε καθ' όλες τις αβιοτικές καταπονήσεις. Τα γονίδια *PR1a* και *PR1b* που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών παθογένειας δεν παρουσίασαν ανάλογα επίπεδα και μοτίβα έκφρασης κατά τις διάφορες αβιοτικές επιδράσεις. Το γονίδιο *PR1a* εκφράστηκε σε όλα τα φυτά (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά) κατά τη διάρκεια της επίδρασης όλων των καταπονήσεων. Σε αντίθεση, το γονίδιο *PR1b* δεν εκφράστηκε κατά τη διάρκεια της επίδρασης αλατότητας και ακτινοβολίας UV, ενώ κατά τη διάρκεια της επίδρασης υψηλών θερμοκρασιών εκφράστηκε σε χαμηλά επίπεδα μόνο στα φυτά- μάρτυρες και κατά την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών μόνο στα διαγονιδιακά φυτά. Η διαφορετική αυτή έκφραση του πιθανώς να οφείλεται σε άμεση συσχέτιση του συγκεκριμένου γονιδίου αποκλειστικά με τις θερμοκρασιακές μεταβολές και θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Από τον περαιτέρω έλεγχο έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με μονοπάτια άμυνας των φυτών, αλλά δεν εμπλέκονται σε μονοπάτια πυροδότησης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) που κρίθηκε σημαντικός και ακολούθησε, για τους 24 κύκλους PCR, παρατηρήθηκε η έκφραση του γονιδίου *AOX* σε μικρότερες ποσότητες, σε όλα τα φυτά (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά) κατά τη διάρκεια της επίδρασης υψηλών θερμοκρασιών, αλατότητας και ακτινοβολίας UV. Κατά τη διάρκεια της επίδρασης χαμηλών θερμοκρασιών παρατηρήθηκε η έκφραση του μόνο στα διαγονιδιακά φυτά. Γενικότερα, η έκφραση του γονιδίου *AOX* φάνηκε να κυμαίνεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υπό μελέτη γονίδια. Το γονίδιο *COLI* εκφράστηκε σε όλα τα φυτά κατά την επίδραση ακτινοβολίας UV και σε ορισμένα διαγονιδιακά φυτά έπειτα από την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών, γεγονός που υποδεικνύει την επίδραση και συμβολή των χαρπινών στην παραγωγή αιθυλενίου κατά την καταπόνηση και επομένως την επαγωγή άμυνας και την επίδραση στο ρυθμό ανάπτυξης των φυτών. Τέλος, δεν υπήρξε έκφραση του γονιδίου *NPR1* στους 24 κύκλους, ενώ έκφραση του γονιδίου *PR1a* υπήρξε μόνο κατά την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών στα διαγονιδιακά φυτά.

Συνολικά όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις ενδυναμώνουν την πρόταση ότι οι χαρπίνες των φυτοπαθογόνων βακτηρίων εμπλέκονται στο αναπτυξιακό και φωτοσυνθετικό μονοπάτι των φυτών, προάγοντας την ανάπτυξη και την ευρωστία τους, καθώς επίσης ότι

μπορούν να προσφέρουν νέες δυνατότητες για την επίτευξη ανθεκτικότητας, όσον αφορά ποικίλους αβιοτικούς παράγοντες, στα καλλιεργούμενα φυτικά είδη.

Για την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης των χαρπινών στα φυτά και την εμπλοκή τους σε αμυντικά και αναπτυξιακά μονοπάτια των φυτών, καθώς και τη συσχέτισή τους με βιοχημικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε αβιοτικούς παράγοντες, ακολούθησε μεταβολομική ανάλυση.

Έπειτα από την επίδραση αλατότητας για χρονικό διάστημα έξι ημερών, παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στο μεταβολικό προφίλ των διαγονιδιακών φυτών σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, η συσσώρευση των μεταβολιτών: 2-κετο-L-γουλονικό οξύ, γαλακτουρονικό οξύ, ραφινόζη, θρεόζη, πορφίνη, γλυκονικού οξέος της λακτόνης και του διπεπτιδίου της D-αλανίνης, φάνηκε να είναι αυξημένη στα διαγονιδιακά φυτά και να διαφέρει σημαντικά της συσσώρευσης στα φυτά- μάρτυρες. Παράλληλα, παρατηρήθηκε αυξημένη συσσώρευση και διαφοροποιημένη αυτής των διαγονιδιακών φυτών των μεταβολιτών: L-(-)-φουκόζη, D-γλυκόζη, νορνικοτίνη, γαλακτινόλη, παλατινόζη, αρμπουτίνη, L-ορνιθίνη, γλυσίνη, λακτόζη, μαλονικό οξύ και ναφθαλενίου στα φυτά αγρίου τύπου.

Η αυξημένη συσσώρευση του σακχάρου ραφινόζης σε φυτά, σχετίζεται άμεσα με την επαγωγή ανθεκτικότητας σε αβιοτικούς παράγοντες όπως η ξηρασία και το ψύχος (Hannah et al., 2006), γεγονός που καθιστά την αυξημένη συσσώρευσή της στα διαγονιδιακά φυτά πιθανό προαγωγέα ανθεκτικότητας στην αλατότητα. Την υπόθεση αυτή στηρίζει η κοινή πορεία των μεταβολικών μονοπατιών ανθεκτικότητας σε διαφόρου τύπου αβιοτικές καταπονήσεις (Krasensky & Jonak, 2011). Επιπλέον, η ραφινόζη ανήκει στην οικογένεια των ολιγοσακχαριτών RFOs, προτεινόμενη ως προαγωγέας της ανθεκτικότητας σε συνθήκες αλατότητας (Gilbert et al., 1997), ενώ παράλληλα θεωρείται ότι παρέχει προστατευτικό ρόλο των κυττάρων ενάντια στην υδατική ανεπάρκεια (Taji et al., 2002). Επίσης, έχει παρατηρηθεί η συσσώρευσή της σε συνθήκες αλατότητας, υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών, σε φυτά του είδους *Arabidopsis thaliana* (Gupta & Kaur, 2005). Η γενικότερη συσσώρευση σακχάρων και σακχαρούχων αλκοολών, όπως η ραφινόζη, η τρεχαλόζη και η μαννιτόλη, έχει παρατηρηθεί κατά την επίδραση αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης και φαίνεται ότι συμβάλλει σε αυξημένη ανθεκτικότητα σε διαγονιδιακά φυτά (Gupta & Kaur, 2005). Κατ' αναλογία, η συσσώρευση του μονοσακχαρίτη θρεόζη στα διαγονιδιακά φυτά ενδεχομένως να εμπλέκεται στην ανθεκτικότητά τους στην αλατότητα.

Η αυξημένη συσσώρευση πορφίνης στα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη, καταδεικνύει το ρόλο της στο φωτοσυνθετικό μονοπάτι των φυτών, καθότι με βάση την πορφίνη σχηματίζεται η πρωτοπορφιρίνη και κατόπιν η Mg- πρωτοπορφιρίνη που αποτελεί τον τετραπυρολικό δακτύλιο της χλωροφύλλης (von Wettstein et al., 1995).

Επιπροσθέτως, η αυξημένη συγκέντρωση D- αλανίνης στα διαγονιδιακά φυτά και η μηδενική της συσσώρευση στα φυτά- μάρτυρες προσδίδει στις χαρπίνες την περαιτέρω συμβολή τους στη διατήρηση των επιπέδων αζώτου και άνθρακα σε συνθήκες υποξίας

(<http://pmn.plantcyc.org/ARA/NEW-IMAGE?object=ALANINE-SYN2-PWY>). Τέλος, η παραγωγή γλυκονικού οξέος της λακτόνης, παράγωγο της οξειδωσης της γλυκόζης από το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, και η ταυτόχρονη παραγωγή H₂O₂ στα διαγονιδιακά φυτά, αποδεικνύει την καταπόνηση λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, ενώ η συσσώρευση γαλακτουρονικού οξέος, συστατικού των πηκτινών, πολυσακχαριτών του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος, ενισχύει την επίδραση των χαρπινών και τη συμμετοχή τους στη βιοσύνθεση του σικιμικού οξέος, του οποίου ο ρόλος σχετίζεται με ανθεκτικότητα έναντι φυτοπαθογόνων οργανισμών.

Η αυξημένη παραγωγή των σακχάρων L-(-)-φουκόζης, D-γλυκόζης παλατινόζης και λακτόζης στα φυτά- μάρτυρες σε αντίθεση με την έως και μηδενική τους συσσώρευση στα διαγονιδιακά φυτά, πιθανόν να οφείλεται στην καταστολή των σχετικών γονιδίων ή/και βιοχημικών μονοπατιών παρουσία του γονιδίου που κωδικοποιεί τη χαρπίνη *HrpZ_{P_{sph}}*. Είναι επομένως πιθανό, η παρουσία του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* να οδηγεί στην ανάπτυξη διαφορετικών μηχανισμών ανθεκτικότητας. Στο πλαίσιο αυτό, είναι σχετική η εμπλοκή της D-γλυκόζης στην επαγωγή μηχανισμών ανθεκτικότητας των φυτών σε αβιοτικούς παράγοντες, μέσω της σύνθεσης μανιτόλης, μιας σημαντικής πολυόλης που φαίνεται να δρα ως αντισταθμιστής των απωλειών νερού στα κύτταρα, διατηρώντας τη σπαργή και προστατεύοντας τις ενζυμικές δραστηριότητες (Popp & Smirnov, 1995), καθώς και η επίδραση της L-(-)-φουκόζης στην ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών *Arabidopsis thaliana* και τη συνεκτικότητα των κυτταρικών τους τοιχωμάτων (Reiter et al., 1993). Η συσσώρευση της L-ορνιθίνης, μη πρωτεϊνικού αμινοξέος που συνθέτει μέσω του ενζύμου της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (ODC) την πουτρεσκίνη (Put). Η τελευταία, ανήκει στην ομάδα των πολυαμινών (PAs), που θεωρούνται άμεσα συνδεδεμένες με την απόκριση των φυτών σε περιβαλλοντικές πιέσεις όπως η θερμική ή ωσμωτική καταπόνηση (Galston et al., 1997). Ομοίως, η υψηλή συγκέντρωση της νορνικοτίνης, αλκαλοειδούς των καπνόφυτων, και της αρμπουτίνης που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών κάτω από συνθήκες σχεδόν πλήρους έλλειψης νερού (Oliver et al., 1997), στα φυτά- μάρτυρες σε αντίθεση με τα διαγονιδιακά φυτά, αποδεικνύει τη ανάπτυξη διακριτών μηχανισμών άμυνας. Αυτή την πρόταση ενισχύει και η συσσώρευση του ναφθλενίου, πολυκυκλικού υδρογονάνθρακα, στα φυτά αγρίου τύπου.

Τα διαφορετικά επίπεδα συσσώρευσης D-γλυκόζης και 2-κετο-L-γουλονικού οξέος μεταξύ των δύο σειρών, δεδομένης της παραγωγής του 2-κετο-L-γουλονικού οξέος από τη D-γλυκόζη και τη συσχέτισή του με την παραγωγή του L- ασκορβικού οξέος (Sonoyama et al., 1982), που αποτελεί κύριο αντιοξειδωτικό παράγοντα και προστατευτική ουσία έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης (Smirnov, 1996), υποδεικνύουν αφενώς την ανάπτυξη μηχανισμού ανθεκτικότητας των διαγονιδιακών φυτών έναντι της αλατότητας και αφετέρου ενισχύουν την πρόταση της πιθανής ανάπτυξης ενός διαφορετικού μηχανισμού από εκείνο των φυτών-μαρτύρων.

Η συσσώρευση του ολιγοσακχαρίτη γαλακτινόλη στα φυτά αγρίου τύπου, η οποία βάση προηγούμενων μελετών έχει συσχετισθεί με την ανθεκτικότητα στο ψύχος και την

ξηρασία σε φυτά του είδους *Arabidopsis thaliana* (Taji et al., 2002), υποδεικνύει την πιθανή εμπλοκή της σε ανθεκτικότητα κάτω από συνθήκες αλατότητας. Οι διαφορές που σημειώθηκαν στο μεταβολικό προφίλ μεταξύ των διαγονιδιακών φυτών και των φυτών-μαρτύρων υποδεικνύουν συνοπτικά την επίδραση και εμπλοκή των χαρπινών στα μονοπάτια άμυνας των φυτών και την αλληλεπίδρασή τους με τα βιοχημικά μονοπάτια σύνθεσης μεταβολιτών σχετιζόμενων με την άμυνα και την ανάπτυξη των φυτών. Επιπλέον, ενδυναμώνουν την άποψη ότι στις δύο κατηγορίες φυτών –διαγονιδιακά και άγριου τύπου φυτά- συντελείται η ενεργοποίηση διαφορετικών μηχανισμών άμυνας και η πιθανή αποσιώπηση και παρεμπόδιση της έκφρασης γονιδίων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καταδεικνύουν τη συμβολή της χρήσης των μεταβολομικών τεχνολογιών και την ταυτόχρονη συσχέτισή τους με τα δεδομένα που προκύπτουν από τις μεταγραφομικές προσεγγίσεις, ώστε i) να αποκρυπτογραφηθούν τα μονοπάτια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών σε αβιοτικούς παράγοντες, ii) να μελετηθεί η φυσική παραλλακτικότητα της έκφρασης των μεταβολιτών κάτω από συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, iii) να υπάρξει συσχέτιση των μονοπατιών άμυνας κάτω από διαφορετικού είδους καταπονήσεις και iv) να διερευνηθεί περαιτέρω η συμβολή των χαρπινών στην ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών παραγόντων, με απώτερους στόχους τη δημιουργία δικτύων συστημικών προσεγγίσεων και την παραγωγή ανθεκτικών καλλιεργούμενων φυτών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC (2003). Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol* **131**:1748–1755

Abramovitch RB, Kim YJ, Chen S, Dickman MB, Martin GB (2003). Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J* **22**:60–69

Agrios GN, (2005). *Plant Pathol.* Elsevier, CA, Academy Press

Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, van Arkel G, Pereira A (2004). The shine clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**:2463–2480

Alfano JR, Collmer A (1997). The type III (hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J Bacteriol* **179**:5655–5662

Allen RD (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* **107**:1049–1054

Anderson DM, Fouts DE, Collmer A & Schneewind O (1999). Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 12839–12843

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vascular Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**:1256–1258

Barbosa-Mendes JM, F de Filho AAM, Filho AB, Harakava R, Beer SV & Januzzi Mendes BM (2009). Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker, *Sci Hortic* **122(1)**: 109–115

Bartels D, Sunkar R (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* **21**:1–36

Basra S, Amarjit (2001). *Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress*, PhD Food Products Press

Baxter CJ, Redestig H, Schauer N, Repsilber D, Patil KR, Nielsen J, Selbig J, Liu J, Fernie AR, Sweetlove LJ (2007). The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. *Plant Physiol* **143**: 312–325

Becker W, Apel K (1992). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a novel jasmonate-induced protein of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol* **19**:1065–67

Bloem E, Haneklaus S, Schnug E (2005). Significance of sulphur compounds in the protection of plants against pests and diseases. *J Plant Nutr* **28**:763–784

Bloem, E, Haneklaus S, Salac I, Wickenha P & Schnug E (2007). Facts and fiction about sulfur metabolism in relation to plant–pathogen interactions. *Plant Biol* **9**:596– 607

Bogdanove AJ, Beer SV, Bonas U, Boucher CA, Collmer A, Coplin DL, Cornelis GR, Huang HC, Hutcheson SW, Panopoulos NJ & Van Gijsegem F (1996). Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **20**:681–683

- Boland W, Hopke J, Donath J, Nüske J, Bublitz F (1995).** *Angew Chem* **107**:1715–1717
- Borda's M, Montesinos C, Dabauza M, Salvador A, Roig LA, Serrano R, Moreno V (1997).** Transfer of the yeast salt tolerance gene *HAL1* to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance. *Transgenic Res* **5**:1–10
- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, Rycke RD, Botterman J, Sybesma C, van Montagu M, Inze D (1991).** Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* **10**:1723–1732
- Bray EA (1993).** Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol* **103**:1035–1040
- Bunker TW, Koetje DS, Stephenson LC, Creelman RA, Mullet JE, Grimes HD (1995).** Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. *Plant Cell* **7**:1319–31
- Burke EJ, Brown SJ, Christidis N (2006).** Modeling the recent evolution of global drought and projections for the twenty-first century with the Hadley centre climate model. *J Hydrometeor* **7**:1113–1125
- Büttner D & Bonas U (2002).** Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J*. **21**: 5313-22
- Capell T, Bassie L, Christou P (2004).** Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:9909–9914
- Charlton AJ et al. (2008).** Responses of the pea (*Pisum sativum* L.) leaf metabolome to drought stress assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics* **4**: 312–327
- Chatterjee A, Cui Y, Yang H, Collmer A, Alfano JR, Chatterjee AK (2001).** GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol. Plant Micro Interact* **16**:1106-17
- Chen L, Qian J, Qu SP, Long JY, Yin Q, Zhang CL, Wu XJ, Sun F, Wu TQ, Beer SV, Dong HS (2008a).** Identification of specific fragments of HpaGXooc, a harpin from *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae, that induce disease resistance and enhance growth in plants. *Phytopathology* **98(7):781-791**
- Chen L, Zhang SS, Qu SP, Long JY, Yin Q, Qian J, Sun F, Zhang SJ, Zhang CL, Wang LX, Wu XJ, Wu TQ, Zhang ZK, Cheng ZQ, Beer SV, Dong HS (2008b).** A fragment of the *Xanthomonas oryzae* pv. Oryzicola harpin HpaGXooc reduces disease and increases yield of rice in extensive grower plantings. *Plant Mol Biol Rep* **26**:225–240
- Choi D, Bostock RM, Avdiushko S, Hildebrand DF (1994).** Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3- methylglutaryl-coenzyme A reductase genes antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:2329–33
- Close T.J., R.D. Fenton, A. Yang, R. Asghar, D.A. DeMason, D.E. Crone, N.C.Meyer, F. Moonan (1993).** Dehydrin: The protein. *Current Topics in Plant Physiol* **10**:104-118
- Cooper B et al. (2003).** A network of rice genes associated with stress response and seed development. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:4945–4950
- Cornelis GR (1997).** Contact with eucaryotic cells: a new signal triggering bacterial gene expression. *Trends in Microbiol* **5(2):43-44**
- Cortina C & Culianez-Macia' FA (2005).** Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci* **169**:75–82

- Crawford NM, Kahn ML, Leustek T, Long SR (2000).** Nitrogen and sulfur. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Biologists), pp: 824–849
- Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE (1992).** Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:4938-4941
- Creelman RA & Mullet JE (1995).** Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**:4114-411
- Creelman A & Mullet E (1997).** Annu Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. *Plant Mol Biol* **48**:355–81
- Darwin KH, Miller VL (2001).** Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J*. **20**:1850-62
- Diamant S, Eliahu N, Rosenthal D, Goloubinoff P (2001).** Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem* **276**:39586– 39591
- Doares SH, Syrovets T, Weiler EW, Ryan CA (1995).** Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:4095–98
- Dong HS, Delaney TP, Bauer DW & Beer SV (1999).** Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquire resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. *Plant J* **20**: 207-215
- Dong HP, Peng J, Bao Z, Meng X, Bonasera JM, Chen G, Beer SV, Dong HS (2004).** Downstream divergence of ethylene signaling pathway for harpin-stimulated *Arabidopsis* growth and insect defense. *Plant Physiol* **136**: 3628–38
- Dong HP, Yu H, Bao Z, Guo X, Peng J, Yao Z, Chen GY, Qu SP, Dong HS (2005).** The ABI2-dependent abscisic acid signalling controls HrpN-induced drought tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* **221**:313–27
- Dong X & Durrant WE (2004).** Systemic Acquired Resistance, *Annl Rev Phytopathol* **42**:185-209
- Dure L, Crouch M, Harada J, Ho T-HD, Mundy J (1989).** Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol* **12**:475–486
- Esser K, Luttge U, Kadereit JW, Beyschlag W (2001).** *Progress in Botany 62: Genetics, Physiology, Systematics, Ecology*. Springer. 98-108
- FAO (Food, Agriculture Organization of the United Nations) (2004).** *FAO production yearbook*. FAO, Rome
- Farmer EE & Ryan CA (1990).** Interplant communication: airborne methyl jasmon-biosynthesis and action of Jasmonates induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:7713–16
- Fiehn O, Kloska S, Altmann T (2001).** Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. *Curr Opin Biotechnol* **12**:82–86
- Fiehn O (2002).** Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* **48**:155–171
- Flowers TJ, Yeo AR (1995).** Breeding for salinity resistance in crop plants—where next? *Austr J Plant Physiol* **22**:875–884
- Foultier B, Troisfontaines P, Muller S, Opperdoes FR, Cornelis GR (2002).** Characterization of the *ysa* pathogenicity locus in the chromosome of *Yersinia enterocolitica* and phylogeny analysis of type III secretion systems. *J Mol Evol* **55**:37-51
- Franceschi VR, Grimes HD (1991).** Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyljasmonate. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:6745–6749

- Gaffney T , Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1993).** Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Res. *Sci.* **261 (5122):**754-756 DOI: 10.1126/science.261.5122.754
- Galbraith DW (2006).** DNA microarray analyses in higher plants. *OMICS* **10:**455–473
- Galston AW, Kaur-Sawhney R, Altabella T, Tiburcio AF (1997).** Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot Acta* **110:**197-207
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YC, Kochian LV, Wu RJ (2002).** Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* **99:**15898–15903
- Ghosh P (2004).** Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Re.* **68:**771-95
- Gilbert GA, Wilson C, Madore MA (1997).** Root-zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in coleus. *Plant Physiol* **115:**1267–1276
- Giri S, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ (2007).** The metabolomics of (1/2)-arecoline 1-oxide in the mouse and its formation by human flavin-containing monooxygenases. *Biochemic Pharmacol* **73(4):**561-573
- Gisbert C, Rus AM, Bolarin MC, Lopez-Coronado M, Arrillaga I, Montesinos C, Caro M, Serrano R, Moreno V (2000).** The yeast *HAL1* gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiol* **123:**393–402
- Goodacre R, York EV, Heald JK, Scott IM (2003).** Chemometric discrimination of unfractionated plant extracts analyzed by electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* **62:**859–863
- Goodman R & Vallad E (2004).** REVIEW & INTERPRETATION Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture *Gary Crop Sci* **44:**1920–1934
- Gopalan S, Wei W & He SY (1996).** *hrp* gene-dependent induction of *hin1*: a plant gene activated rapidly by both harpins and the *avrPto* gene-mediated signal. *Plant J* **10(4):**591-600
- Granger JH, Williams R, Lenz EM, Plumb RS, Stumpf CL, Wilson ID (2007).** A metabonomic study of strain- and age-related differences in the Zucker rat. *Rapid Commun Mass Spectrom* **21:**2039–2045
- Cramer G, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K (2011).** Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol* **11:**163
- Grayer RJ & Harborne JB (1994).** A survey of antifungal compounds from higher plants 1982–1993. *Phytochemistry* **37:** 9-42
- Grover A, Kapoor A, Satya Lakshmi O, Agrawal S, Sahi C, Katiyar- Agarwal S, Agarwal M, Dubey H (2001).** Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. *Curr Sci* **80:**206–216
- Grover A, Sahi C, Sanan N, Grover A (1999).** Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. *Plant Sci* **143:**101–111
- Grubb C & Abel S (2006).** Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci* **11:**89–100
- Guiltinan MJ, Marcotte WR, Quatrano RS (1990).** A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* **250:**267–271
- Guo C, Oosterhuis DM (1995).** Pinitol occurrence in soybean plants as affected by temperature and plant growth regulators. *J Exp Bot* **46:**249–253
- Gupta AK & Kaur N (2005).** Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* **30:** 761–776

- Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RK, Fraser PD, Bramley PM (2005).** Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J Exp Bot* **56**:219–243
- Halkier BA & Gershenzon J (2006).** Biology and biochemistry of glucosinolates. *Ann Rev Plant Biol* **57**:303–333
- Hall RD (2006).** Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol* **169**:453–468
- Hannah1 Matthew A, Zuther Ellen 1, Buchel1Kerstin, Heyer Arnd G (2006).** Transport and metabolism of raffinose family oligosaccharides in transgenic potato. *J Exp Bot* **57**: 3801–3811
- doi:10.1093/jxb/erl152 Advance Access publication 18 October, 2006
- Hartmann T (1991).** Alkaloids. In herbivores; their interaction with secondary plant metabolites, Vol. I, The chemical participants, 2nd ed., G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum, eds Academic press, San Diego, pp:33–85
- He P, Chintamanani S, Chen Z, Zhu L, Kunkel BN et al. (2004).** Activation of a COI1-dependent pathway in Arabidopsis by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *Plant J* **37**:589–602
- He SY, Huang HC, A Collmer (1993).** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**:1255–1266
- He SY, Yoshiaki Y, Nishizawa Y, Takai R, Yamada K, Salkano K (1998).** Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitoheptaose. *Mol Plant Microbe Interact* **11**:1167–1174
- Hegeman AD, Schulte CF, Cui Q, Lewis IA, Huttlin EL, Eghbalnia H, Harms AC, Ulrich EL, Markley JL, Sussman MR (2007).** Stable isotope assisted assignment of elemental compositions for metabolomics. *Anal Chem* **79**: 6912–6921
- Hell R (1997).** Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta* **202**:138–148
- Hendrickson EL, Guevera P, Ausubel FM (2000).** The alternative sigma factor RpoN is required for hrp activity in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and acts at the level of hrpL transcription. *J Bacteriol* **182**:3508–3516
- Hienonen E (2006).** The *Pseudomonas syringae*-derived HrpA pilins – molecular characterization and biotechnological application of the transcripts. Helsinki
- Hirai MY et al. (2004).** Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:10205–10210
- Hirai MY et al. (2007).** Omics-based identification of Arabidopsis Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:6478–6483
- Holmstrom KO, Somersalo S, Mandal A, Palva ET, Welin B (2000).** Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J Expt Bot* **51**:177–185
- Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT (2002).** Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol* **130**:618–626
- Hu W, Yuan J, Jin QL, Hart P, He SY. (2001).** Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* assembled in minimal medium and in planta. *Mol. Plant Microbe Interact* **14**:234–241
- Hueck CJ (1998).** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:379–433

- Huege J, Sulpice R, Gibon Y, Lisee J, Koehl K, Kopka J (2007).** GC-EI-TOF-MS analysis of in vivo carbon-partitioning into soluble metabolite pools of higher plants by monitoring isotope dilution after $^{13}\text{CO}_2$ labelling. *Phytochemistry* **68**:2258-2272
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF (1998).** Arabidopsis CBF1 overexpression induces cor genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**:104–106
- 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
- Johnson HE, Broadhurst D, Goodacre R, Smith AR (2003).** Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochemistry* **62**:919–928
- Juan C & Dias- Perez (2007).** Effect of harpin protein ('Messenger') on bell pepper plant growth, plant disease, and fruit yield. *Cultural Management*:1-2
- Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL (2004).** Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **136**(4):4159-4168
- Kaplan F, Kopka J, Sung DY, Zhao W, Popp M, Porat R, Guy CL (2007).** Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Plant J* **50**:967–981
- Karban R & Baldwin IT (1997).** *Induced Responses to Herbivory*, University of Chicago Press, Chicago
- Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004).** A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol* **45**:346–350
- Katiyar-Agarwal S, Agarwal M, Grover A (1999).** Emerging trends in agricultural biotechnology research: use of abiotic stress induced promoter to drive expression of a stress resistance gene in the transgenic system leads to high level stress tolerance associated with minimal negative effects on growth. *Curr Sci* **77**:1577–1579
- Katiyar-Agarwal S, Agarwal M, Grover A (2003).** Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of hsp101. *Plant Mol Biol* **51**:677–686
- Keith Roberts (2007).** *Handbook of Plant Science Vol.2*. John Wiley & Sons Ltd
- Khathar D & Kuhad MS (2000).** Short-term salinity induced changes in two wheat cultivars at different growth stages. *Biol. Plant.* **43**:629–632
- Kim JF & Beer SV (2000).** *hrp* genes and harpins of *Erwinia amylovora*: a decade of discovery. In: Vanneste JL, ed. *Fire Blight and its Causative Agent, Erwinia amylovora*, CAB International, UK, Wallingford. pp 141–162
- Kim JK, Bamba T, Harada K, Fukusaki E, Kobayashi A (2007).** Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *J Exp Bot* **58**:415–424
- Kim YJ, Lin NC, Martin GB (2002).** Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell* **109**:589–98
- Kimpel JA & Key JL (1985).** Heat shock in plants. *Trends Biochem Sci* **10**:353–357
- Knoop V, Staskawicz B, Bonas U (1991).** Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J Bacteriol* **173**:7142–7150

- Krasensky J & Jonak C (2011).** Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp B*
- Krishnan P, Kruger NJ, Ratcliffe RG (2005).** Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J Exp Bot* **56**: 255–265
- Krummet T, Bandemer K, Boland W (1995).** *FEBS Lett* **377**: 523 - 529
- Kusano M, Tohge T, Fukushima A, Kobayashi M, Hayashi N, Otsuki H, Kondou Y, Goto H, Kawashima M, Matsuda F, Niida R, Matsui M, Saito K, Fernie AR (2011).** Metabolomics reveals comprehensive reprogramming involving two independent metabolic responses of Arabidopsis to UV-B light. *Plant J*, **67(2)**:354-369
- Lack AJ & Evans DE (2001).** Instant Notes Plant Biology BIOS Scientific Publishers Limited
- Le Lay P, Isaure MP, Sarry JE, Kuhn L, Fayard B, Le Bail JL, Bastien O, Garin J, Roby C, Bourguignon J (2006).** Metabolomic, proteomic and biophysical analyses of Arabidopsis thaliana cells exposed to a caesium stress. Influence of potassium supply. *Biochimie* **88**:1533–1547
- Lee CA (1997).** Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eucaryotic cells? *Trends Microbiol* **5(4)**:148-156
- Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP (2000).** Pathways and regulation of sulphur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Ann Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol* **51**:141–165
- Li CM, Brown I, Mansfield J, Stevens C, Boureau T, Romantschuk M, Taira S (2002).** The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *EMBO J* **21**:1909-15
- Li HY, Chang CS, Lu LS, Liu CA, Chan MT, Chang YY (2003).** Over-expression of Arabidopsis thaliana heat shock factor gene (*AtHsfA1b*) enhances chilling tolerance in transgenic tomato. *Bot Bull Acad Sin* **44**:129–140
- Li, S et al. (2004).** A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* **303**:540–543
- Lin C & Thomashow MF (1992).** A cold-regulated Arabidopsis gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochem Bioph Res Commun* **183**:1103-1108
- Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ (1986).** Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J Bacteriol* **168(2)**:512-522
- Lindquist S (1986).** The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* **55**:1151–1191
- Liu F, Liu H, Jia Q, Wu X, Guo X, Zhang S, Song F, Dong H (2006).** The internal glycine-rich motif and cysteine suppress several effects of the HpaGXooc protein in plants. *Phytopathology* **96**:1052–9
- Lory S (1998).** Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. *Curr Opin Microbiol* **1**:27-35
- Lyon GD & Newton AC (2000).** Implementation of elicitor mediated induced resistance in agriculture. In: Agrawal A.A., Tuzun S., Bent E. (eds). *Induced plant defence against pathogens and herbivores: Biochemistry, ecology and agriculture*, pp. 299-318. APS Press, St.Paul, MN
- Kramell R, Atzorn R, Schneider G, Miersch O, Brückner C, Schmidt J, Sembdner G, Parthier B (1995).** Occurrence and identification of jasmonic acid conjugates by osmotic stress in barley leaf tissue. *J Plant Growth Regul* **14**:29-36

- Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR, Dangl JL (2003).** *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**:379–389
- Malik MK, Solvin JP, Hwang CH, Zimmerman JL (1999).** Modified expression of a carrot small heat-shock protein gene, Hsp 17.7 results in increased or decreased thermotolerance. *Plant J* **20**:89–99
- Mansfield JW (2000).** Antimicrobial compounds and resistance. The role of phytoalexins and phytoanticipins. In: Slusarenko A, Fraser R, Van Loon L, eds. *Mechanisms of resistance to plant diseases*, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp: 325–370
- McKeon TA, Fernández-Maculet JC, Yang SF (1995).** Biosynthesis and metabolism of ethylene. In *Plant Hormones*, P.J. Davies, ed (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers) pp. 118–139
- McNeil SD, Nuccio ML, Hanson AD (1999).** Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol* **120**:945–949
- McNeil SD, Nuccio ML, Rhodes D, Shachar-Hill Y, Hanson AD (2000).** Radiotracer and computer modeling evidence that phosphobase methylation is the main route of choline synthesis in tobacco. *Plant Physiol* **123**:371–380
- Mes JJ, Van Doorn AA, Wijbrandi J, Simons G, Cornelissen BJC, Haring MA (2000).** Expression of the *Fusarium* resistance gene I-2 colocalizes with the site of fungal containment. *Plant J* **23**:183–193
- Meuwly P, Molders W, Buchala A, Métraux JP (1995).** Local and systemic biosynthesis of salicylic acid in infected cucumber plants. *Plant Physiol* **109**:1107–1114
- Michiels T, Vannoteghem JC, deRouvroit CL, China B, Gustin A, Boudry P, Cornelis GR (1991).** Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **173**:4994–5009
- Min Shao, Jinsheng Wan, Ralph A. Dean, Yongjun Lin, Xuewen Gao, Shuijin Hu (2008).** Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to Magnaporthe grise. *Plant Biotechnol J* **6**:73–81
- Miroshnichenko S, Tripp J, Nieden UZ, Neumann D, Conrad U, Manteuffel R (2005).** Immunomodulation of function of small heat shock proteins prevents their assembly into heat stress granules and results in cell death at sublethal temperatures. *Plant J* **41**:269–281
- Mittler R (2002).** Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**:405–410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004).** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9** 490–498
- Mittler R (2006).** Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* **11**(1):15–19
- Moing A (2000).** Sugar alcohols as carbohydrate reserves in higher plants, in: Gupta A.K., Kaur N. (Eds.), *Carbohydrate Reserves in Plants Synthesis and Regulation*, Elsevier Sciences B.V. pp. 337–358
- Morgan PW (1997).** Drew MC: Ethylene and plant responses to stress. *Physiol Plant* **100**(3):620–630
- Mota LJ & Cornelis GR (2005).** The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* **37**:234–249
- Mudgett MB, Chesnokova O, Dahlbeck D, Clark ET, Rossier O, Bonas U, Staskawicz B (2000).** Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:13324–13329
- Mundy J & Chua N-H (1988).** Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J* **7**:2279–2286
- Munns R (2005).** Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytologist*, **167**(3):645–663

- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999).** Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **461**:205–210
- Narberhaus Franz (2002).** α -Crystallin-Type Heat Shock Proteins: Socializing Minichaperones in the Context of a Multichaperone Network Author Affiliations Institut für Mikrobiologie, Eidgenössische Technische Hochschule, CH-8092 Zürich, Switzerland
- Neuenschwander U, Lawton K, Ryals J (1996).** Systemic acquired resistance. In *Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1, G. Stacey and N.T. Keen, eds (New York: Chapman and Hall), pp. 81-106
- Nikiforova VJ et al. (2005).** Integrative gene-metabolite network with implemented causality deciphers informational fluxes of sulphur stress response. *J Exp Bot* **56**:1887–1896
- Noiraud N, Laurence M, Rémi L (2001).** Transport of polyols in higher plants *Plant Physiol Biochem* **39**:717–728
- O'Donnel PJ, Calvert C, Atzorn R, Waternack C, Leyser HMO (1996).** Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274**:1914–1917
- Oh CS & Beer SV (2007).** AtHIPM, an Ortholog of the apple HrpN-Interacting Protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growthenhancing effect of HrpN in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **145**:426–436
- Oliver AE, Hinch DK, Crowe LM. , Crowe JH.(1997).** Interactions of arbutin with dry and hydrated bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1370**:87–97
- Orvar L & Ellis BE (1997).** Transgenic tobacco expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury. *Plant J* **11**:1297-1305
- Patonnier MP, Peltier JP, Marigo G (1999).** Drought induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata, *J. Exp. Bot.* **50**: 1223–1229
- Pavli I O, Athanasouli V, Tampakaki A, Skaracis GN (2008).** Preliminary evaluation of the effect of transgenic harpin expression in plants on resistance to viral diseases. 12th National Congress in Plant Breeding (with full proceedings). 8-10 October 2008, Naousa, p 271-277
- Pearce G, Strydom D, Johnson CA (1991)** A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**:895–897
- Peng JL, Dong HS, Dong HP, Delaney TP, Bonasera JM & Beer SV (2003).** Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the NDR1 and EDS1 genes. *Physiol Mol Plant Pathol* **62**: 317-326
- Penninckx IAMA, Eggermont K, Terras FRG, Thomma BPHJ, De Samblanx GW, Buchala A, Métraux JP, Manners JM, Broekaert WF (1996).** Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**:2309-2323
- Percival GC, Noviss K & Haynes I (2009).** Field evaluation of systemic inducing resistance chemicals at different growth stages for the control of apple (*Venturia inaequalis*) and pear (*Venturia pirina*) scab. *Crop Prot* **28(8)**: 629-633
- Popp M, Smirnoff N (1995).** Polyol accumulation and metabolism during water stress, in: Smirnoff M. (Ed.), *Environment and Plant Metabolism. Flexibility and Acclimatation*, Bioscientific Publishers Ltd, Oxford, pp. 199–215
- Preston G, Deng WL, Huang HC, Collmer A (1998).** Negative regulation of hrp genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV. *J Bacteriol* **180**: 4532-4537

- Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM (2000).** Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporters. *FEBS Lett* **471**:224–228
- Ramamurthi KS, Schneewind O (2005).** A synonymous mutation in *Yersinia enterocolitica* yopE affects the function of the YopE type III secretion signal. *J Bacteriol* **187**:707-15
- Raskin I (1992).** Role of salicylic acid in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**:439-463
- Reiter Wolf-Dieter , Chapple Clint CS , Somerville CR (1993).** Altered Growth and Cell Walls in a Fucose-Deficient Mutant of *Arabidopsis*. *Science* **261(5124)**: 1032-1035
- Ren H, Song T, Wu T, Sun L, Liu Y, Yang F, Chen ZY, Dong H (2006).** Effects of a biocontrol bacterium on growth and defence of transgenic rice plants expressing a bacterial type-III effector. *Ann Microbiol* **56**:281–287
- Rentsch D, Hirner B, Schmelzer E, Frommer WB (1996).** Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell* **8**:1437–1446
- Reymond & Farmer (1998).** Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol* **1**:404–411
- Rizhsky L et al. (2002).** The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* **130**: 1143–1151
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R (2004).** When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* **134**: 1683–1696
- Roine E, Wei W, Yuan J, Nurmiaho-Lassila EL, Kalkkinen N, Romantschuk M, He SY (1997).** Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:3459-3464
- Rosenthal GA & Berenbaum MR (1992).** *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*, Vol II Ecological and evolutionary processes, 2nd edition academic press, San Diego
- Roxas VP, Smith RK Jr, Allen ER, Allen RD (1997).** Overexpression of glutathione S transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat Biotechnol* **15**:988–991
- Ryals A, Neuenschwander H, Willits G, Molina A, York Steiner H, Hunt M (1996).** *The Plant Cell*, Vol. 8, 1809-1819, American Society of Plant Physiologists Systemic Acquired Resistance John Agricultural Biotechnology Research Unit, Ciba-Geigy Corporation, P.O. Box 12257, Research Triangle Park, North Carolina 27709-2257
- Ryan CA & Gurl B (1992).** The organization of the prosystemin gene. *Plant Mol. Biol.* **20**:405–409
- Saito K (2004).** Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiol* **136**:2443–2450
- Sakamoto A, Valverde R, Alia, Chen TH, Murata N (2000)** Transformation of *Arabidopsis* with the *codA* gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. *Plant J* **22**:449– 453
- Salmond GPC (1994).** Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Ann Rev Phytopathol* **32**:181-200
- San Vicente & Javier Plasencia (2011).** Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J Exp Bot* doi: 10.1093/jxb/err031
- Sarvajeet SG & Narendra T (2010).** Polyamines and abiotic stress tolerance in plants *Plant Signal & Behav Land Biosci* **5(1)**:26-33

- Schafer H & Wink M (2009).** Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal* **4(12)**: 1684- 1703
- Schaller A, Bergey DR, Ryan CA (1995).** Induction of wound response genes in tomato leaves by bestatin, an inhibitor of aminopeptidases. *Plant Cell* **7**:1893–98
- Schaller A & Ryan CA (1995).** Systemin a polypeptide defense signal in plants. *Bioassays* **18**:27-33
- Sen Gupta A, Heinen JL, Holady AS, Burke JJ, Allen RD (1993).** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that over-express chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Nat Acad Sci USA* **90**:1629–1633
- Shain DK & Yang SF (1998).** Discoveries in Plant Biology VOLUME I, World Scientific
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK (2000).** The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Nat Acad Sci USA* **97**:6896–6901
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997).** Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* **115**:327–334
- Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (1999).** Molecular responses to drought stress. In: Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (eds) *Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants*. R.G. Landes Co., Austin, pp 11–28
- Shulaev V (2006).** Metabolomics technology and bioinformatics. *Brief Bioinform* **7**:128–139
- Shulaev V et al. (2008).** Metabolomics for plant stress response. *Physiol. Plant.* **132**:199–208
- Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003).** Two different novel cis-acting elements of erd1, a clpA homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J* **33**:259–270
- Skriver K, Mundy J (1990).** Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* **5**:503–512
- Smirnoff N (1996).** The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Ann Bot* **78**: 661±669
- Sonoyama T, Tani H, Matsuda K, Kageyama B, Tanimoto M, Kobayashi K, Yagi S, Kyotani H, Mitsushima K (1982).** Production of 2-Keto-l-Gulonic Acid from d-Glucose by Two-Stage Fermentation. *Appl Env Micro* **43(5)**:1064
- Staskawicz BJ, Dahlbeck D, Keen NT (1984).** Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:6024-6028
- Staswick PE (1994).** Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol* **45**:303–322
- Stepanova AN & Alonso JM (2009).** Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr Opin Plant Biol*, **12(5)**:548-555
- Stoop JMH, Williamson JD, Pharr DM (1996).** Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Sci* **1**:139–144
- 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
- Sweetlove LJ & Fernie AR (2005).** Regulation of metabolic networks: understanding metabolic complexity in the systems biology era. *New Phytol* **168**: 9–23

- Taji Teruaki, Chieko Ohsumi, Satoshi Iuchi, Motoaki Seki, Mie Kasuga, Masatomo Kobayashi, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki (2002).** Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J* **29(4)**:417–426
- Takamura Y, Ishida Y, Inoue Y, Tsutsumi F & Kuwata S (2004).** Induction of a hypersensitive response-like reaction in transgenic tobacco expressing harpinPss. *Physiol Mol Plant Pathol* **64**: 83-89
- Tampakaki AP & Panopoulos NJ (2000).** Elicitation of Hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZPspH Produced In planta. *MPMI* **13(12)**:1366-1374
- Tardif G et al. (2007).** Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat. *Plant Mol Biol* **63**:703–718
- Tester M & Davenport R (2003).** Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann Bot* **91(5)**:503-527
- Tilahun A, Guenzi A, Bjorn M, Cushman J (2003).** Tolerance of Mannitol-Accumulating Transgenic Wheat to Water Stress and Salinity. *Plant Physiol* **131**:1748–1755
- Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dincher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E, Ryals J (1992).** Acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **4**:645-656
- Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, Inze´ D, Slooten L (1996).** Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol* **112**:1703–1714
- Van Etten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE (1994).** Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus “phytoanticipins”. *Plant Cell* **6**:1191-1192
- Van Wees, de Swart, van Pelt, van Loon, Pieterse (2000).** Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate and jasmonate bacterial dependent defense pathways in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Dis Acad Sci USA* **97**:8711–8716
- Vanderauwera S, Zimmermann P, Rombauts S, Vandenameele S, Langebartels C, Gruijssem W, Inze D, Van BF (2005).** Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in Arabidopsis reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol* **139(2)**:806-821
- Vernooij B, Friedrich L, Ahl-Goy P, Staub T, Kessmann H, Ryals J (1995).** 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens does not require the accumulation of salicylic acid. *MOI. Plant-Microbe Interact.* **8**:228-234
- Vierling E (1991).** The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**:579–620
- Vincour B & Altman A (2005)** Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol* **16**:123–132
- Waie B & Rajam MV (2003).** Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Sci* **164**:727–734
- Wangelnik K, Rossier O, Bonas U (1999).** Mutations in the regulatory gene hrpG of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria result in constitutive expression of all hrp genes. *J Bacteriol* **181**:6828-6831
- Wangelnik & Bonas (1996).** HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Bacteriol.* **178(12)**:3462-3469
- Ward ER Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Métraux JP, Ryals JA (1991).** Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**:1085-1094

- Webb RP & Allen RD (1996).** Overexpression of pea cytosolic ascorbate peroxidase confers protection against oxidative stress in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol (suppl.)* **111(2)**:529-537
- Wei CF, Deng WL, Huang HC (2005).** A chaperone-like HrpG protein acts as a suppressor of HrpV in regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* type III secretion system. *Mol Microbiol* **57**:520-536
- Von Wettstein D, Gough S, Kannangara CG (1995).** Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell* **7**:1039-1057
- Wienkoop S, Morgenthal K, Wolschin F, Scholz M, Selbig J, Weckwerth W (2008).** Integration of metabolomic and proteomic phenotypes: analysis of data covariance dissects starch and RFO metabolism from low and high temperature compensation response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics* **7(9)**:1725-1736
- Wilkinson S & Davies WJ (2009).** Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell Environ* **33(4)**:510-525
- Williamson J, Jennings D, Guo W, Pharr M (2002).** Sugar alcohols, Salt stress, and Fungal Resistance: Polyols-Multifunctional Plant Protection *J Amer Hort Sci* **127(4)**:467-473
- Winicov I & Bastola DR (1997).** Salt tolerance in crop plants: new approaches through tissue culture and gene regulation. *Acta Physiol Plant* **19**:435-449
- Wu X, Wu T, Long J, Yin Q, Zhang Y, Chen L, Liu RX, Gao TC, Dong H (2007).** Productivity and biochemical properties of green tea in response to a bacterial type-III effector protein and its variants full length and functional fragments of HpaGXoo, a harpin protein from the bacterial rice leaf streak pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *J Biosci* **32**:1119-1131
- Wuyts N, De waele D, Swennen R (2006).** Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* grandr naine) roots. *Plant Physiol Biochem* **44**:308-314
- Wyn JR & Gorham J (2002).** Intra- and inter-cellular compartmentation of ions. In Lauchli, A., & Lutge, U. eds. *Salinity: Environment-Plants-Molecules*. Springer, Netherlands, 159-180
- Xiao Y, Hue J, Yi J, Lu Y, Hutcheson SW (1994).** Identification of a putative alternative factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 hrp and hrmA genes. *J Bacteriol* **176**:1025-1036
- Xiong L, Ishitani M, Zhu J-K (1999).** Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **119**:205-211
- Xu Y, Chang PFL, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG et al. (1994).** Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**:1077-85
- Yamada M, Morishita H, Urano K, Shiozaki N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Yoshida Y (2005).** Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *J Exp Bot* **56**:1975-1981
- Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (2006).** Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**:781-803
- Yan Z, Reddy MS, Yu CM, McInroy JA, Wilson M, Kloepper JW (2002).** Induced systemic protection against tomato late blight by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. *Plant Cell* **92(12)**:1329-1333
- Yuan SJ, Galbraith WD, Dai YS, Griffin P, Neal S (2008).** Plant systems biology comes of age. *Trends Plant Sci* **13(4)**:165-171
- Zhang C, Qian J, Bao Z, Hong X, Dong H (2007).** Abscisic acid mediates *Arabidopsis* drought tolerance induced by HrpNEa in the absence of ethylene signaling. *Plant Mol Biol Rep* **25**:98-114

Zhang H-X & Blumwald E (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol* **19**:765–768

Zhang JY, Broeckling CD, Blancaflor EB, Sledge MK, Sumner LW, Wang ZY (2005). Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J* **42**:689–707

Zhang L, Wang Y, Picking WL, Picking WD, De Guzman RN (2006). Solution structure of monomeric BsaL, the type III secretion needle protein of *Burkholderia pseudomallei*. *J Mol Biol* **359**:322-330

Zhu B, Su J, Chang M, Verma DPS, Fan YL, Wu R (1998). Overexpression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci* **199**:41–48

Zhu L, Tang GS, Hazen SP, Kim HS, Ward RW (1999). RFLP-based genetic diversity and its development in Shaanxi wheat lines. *Acta Bot Boreali Occident Sin* **19**:13

Zimmerman C & Vick B (1984). Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species. *Plant Physiol* **75**(2):458-461

Zobayed et al. (2005). Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. *Plant Physiol Biochem* **43**(10-11):977–984

Zulak et al. (2007). Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta* **225**:1085–1106

Βακαλουνάκης ΔΙ & Φραγκιαδάκης ΓΑ (2003). Φυτοπαθοβελτίωση με έμφαση στην τομάτα και τα κολοκυνθοειδή. Εκδόσεις Τυποκρέτα Α.Ε., σελ 518

Καραμπουρνιώτης ΑΓ (2003). Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών. Οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες. Εκδόσεις Έμβρυο, σελ. 46-51, 109-111,172-180

Μοσχογιάννη Μ (2010). Αξιολόγηση επιφανειοδραστικών ουσιών στην ενεργοποίηση του αμυντικού μηχανισμού της ανοσοποίησης των φυτών. Μεταπτυχιακή διατριβή

Ταμπακάκη Α (1999). Μοριακή και βιοχημική μελέτη πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola και διερεύνηση του ρόλου τους στην αντίδραση υπερευαισθησίας των φυτών . Διδακτορική διατριβή

Τζάμος Ε (2007). ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ. Εκδόσεις Σταμούλης, σελ. 406-408