ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

«ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΣΚΛΗΡΟΥ ΣΙΤΟΥ RUSTICANO KAI GRAZIA ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΨΥΧΟΥΣ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ Α. ΦΡΑΓΚΟΓΕΩΡΓΗ

AOHNA 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

«ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΣΚΛΗΡΟΥ ΣΙΤΟΥ RUSTICANO KAI GRAZIA ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΨΥΧΟΥΣ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ Α. ΦΡΑΓΚΟΓΕΩΡΓΗ

AOHNA 2014

ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ Α. ΦΡΑΓΚΟΓΕΩΡΓΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ : «Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των ποικιλιών σκληρού σίτου Rusticano και Grazia σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους»

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

Αικ. Χρονοπούλου-Σερέλη, Ομότιμη Καθηγήτρια Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών

MEAH:

Π. Κατινάκης, Καθηγητής Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών

Ι. Τσίρος, Αν. Καθηγητής Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π. Κατινάκης, Καθηγητής Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών

Δ. Μπουράνης, Καθηγητής Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών

Επ. Παπλωματάς, Καθηγητής Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών

Αικ. Χρονοπούλου-Σερέλη, Ομότιμη Καθηγήτρια Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών

Γ. Αϊβαλάκις, Αν. Καθηγητής Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών

Ι. Τσίρος, Αν. Καθηγητής Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών

Α. Καμούτσης, Επικ. Καθηγητής Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών

Η έγκριση της παρούσας διατριβής υπό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν.5343/1932 άρθρο 202,παρ.2).

Περιληψη

Οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις προκαλούν δυσμενείς συνθήκες για την ανάπτυξη των οργανισμών και διακρίνονται σε βιοτικές και αβιοτικές. Οι βιοτικές καταπονήσεις προκαλούνται από παθογόνα, παράσιτα, αρπακτικά, ενώ οι αβιοτικές προέρχονται από ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η αλατότητα και οι χαμηλές θερμοκρασίες θεωρούνται από τους σημαντικότερους αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης των σιτηρών διότι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των φυτών και προκαλούν σοβαρές απώλειες στην γεωργική παραγωγή.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η ανάπτυξη των ποικιλιών σκληρού σίτου (Triticum turgidum var. durum), Rusticano και Grazia, που έχουν εμπορική σημασία για τη χώρα μας, σε συνθήκες αλατότητας (100, 200 mM NaCl) για 5 ημέρες και ψύχους (4°C) για 11 ημέρες. Στη συνέχεια, με τη χρήση υπερυψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (UHPLC-MS) μελετήθηκε то μεταβολομικό πρότυπο του υπέργειου τμήματος των ποικιλιών μετά από 48 ώρες καταπόνησης των φυταρίων τους σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (200 mM NaCl) και ψύχους (4°C). Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης και μετά από αναζήτηση σε γνωστές βάσεις δεδομένων, εντοπίστηκαν τα γονίδια που πιθανά κωδικοποιούν για ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης, και απομονώθηκαν οι cDNA κλώνοι των γονιδίων δ-OAT, P5CS1, P5CS2 and P5CR που κωδικοποιούν για τα ένζυμα αυτά στο σκληρό σιτάρι. Ακολούθως, μελετήθηκε η συσσώρευση των μεταγραφημάτων των γονιδίων σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl) και ψύχους (4°C) με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) καθώς και η συγκέντρωση της προλίνης στο ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia, μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες καταπόνησης.

Από τις μετρήσεις των μορφολογικών παραμέτρων των φυταρίων σκληρού σίτου και των 2 ποικιλιών προέκυψε ότι η ποικιλία Rusticano είναι πιο ανθεκτική από την ποικιλία Grazia και στους 2 παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης. Η μεταβολομική ανάλυση του υπέργειου τμήματος των ανωτέρω ποικιλιών, μετά από εφαρμογή αλατότητας και ψύχους, οδήγησε στην ταυτοποίηση είκοσι εννέα πρωτογενών (αμινοξέα, οργανικά οξέα, λιπίδια) και δευτερογενών μεταβολιτών (κυρίως αζωτούχες και φαινολικές ενώσεις). Σε σύγκριση με την ποικιλία Grazia, η ποικιλία Rusticano παρουσίασε ταχεία ενεργοποίηση του μεταβολισμού της στις συνθήκες καταπόνησης, διαφοροποίηση μεγαλύτερου αριθμού μεταβολιτών, καθώς και υψηλότερα επίπεδα συσσώρευσης μεταβολιτών (αμινοξέων, λιπιδίων, δευτερογενών μεταβολιτών) στο υπέργειο τμήμα της. Εξαίρεση αποτελεί, σε συνθήκες αλατότητας, η μεγαλύτερη συγκέντρωση της προλίνης στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Grazia η οποία, λόγω μεγαλύτερης ευαισθησίας της σε αυτό τον παράγοντα καταπόνησης, συσσωρεύει το συγκεκριμένο μεταβολίτη προκειμένου να επέλθει οσμωρύθμιση και να συνεχιστούν οι μεταβολικές της διεργασίες. Από τη μεταγραφική μελέτη του μονοπατιού βιοσύνθεσης της προλίνης διαπιστώθηκε ότι σε συνθήκες αλατότητας η ανθεκτικότητα της ποικιλίας Rusticano έναντι της Grazia είναι εμφανής λόγω της μεγαλύτερης συσσώρευσης μεταγραφημάτων των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσής της καθώς και από τα υψηλότερα επίπεδα προλίνης στο ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα, μετά από 72 ώρες καταπόνησης. Σε συνθήκες ψύχους, η ανθεκτικότητα της ποικιλίας Rusticano έναντι της Grazia σχετίζεται με την έγκαιρη (μόλις 6 ώρες μετά την έκθεση των φυταρίων στους 4°C) συσσώρευση των μεταγραφημάτων των γονιδίων και τη μεγαλύτερη συσσώρευση της προλίνης στους ιστούς. Τα γονίδια TdP5CS1, TdP5CS2 και Tdδ-OAT είναι πιθανό να δρουν συνεργιστικά στη βιοσύνθεση της προλίνης από το γλουταμινικό οξύ και την ορνιθίνη αντίστοιχα, με το γονίδιο TdP5CS1 να έχει κυρίαρχο ρόλο στη συσσώρευση του μεταβολίτη και στις 2 συνθήκες καταπόνησης, ενώ από τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης σε συνθήκες αλατότητας προκύπτει ότι η ορνιθίνη έχει ενεργό ρόλο και στα μεταβολικά μονοπάτια της αργινίνης και των πολυαμινών. Συμπερασματικά, τα φυτάρια της ποικιλίας Rusticano παρουσιάζουν καλύτερη προσαρμογή από τα αντίστοιχα της Grazia τόσο στην αλατότητα, όσο και το ψύχος.

ABSTRACT

Environmental stresses arise from conditions that are unfavorable for the optimal growth and development of plants and can be classified either as biotic or abiotic. Biotic stresses are caused by pathogens, parasites, predators and other competing organisms while abiotic are produced by inappropriate levels of physical components of the environment. Salinity and temperature extremes have serious effects on the physiology of cereal crops.

Initialy, morphological parameters of two commercial durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum*) cultivars, Rusticano and Grazia, were studied and evaluated for their tolerance to salt and cold stress. Metabolomic analysis based on Ultra-high-pressure liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-TOF-MS) was employed to identify differentially regulated metabolites, 48 h after exposure of cvs Rusticano and Grazia to 200mM NaCl and 4°C. Based on the results of comparative analysis in Rusticano and Grazia cvs under salt and cold stress conditions, it was investigated the molecular regulation of proline biosynthesis after 12, 24, 48 and 72h under both stress conditions. In order to evaluate the relative importance of ornithine (Orn) and glutamate (Glu) as precursors in Pro synthesis, a partial cDNA encoding Orn- δ -aminotransferase (δ -OAT), two partial cDNA encoding δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) were isolated and sequenced from *Triticum turgidum var. durum*.

In the initial screening experiments, it was shown that cv Rusticano exhibited larger root and shoot biomass than cv Grazia. Therefore, cv Rusticano is more tolerant than cv Grazia to salt and cold stress. Metabolomic analysis revealed the importance of twenty nine primary and secondary metabolites in the plants of both cvs subjected to salt and cold stress. In cv Rusticano more metabolites were induced than in cv Grazia, under both stresses and at higher levels than cv Grazia. The only exception was of the amino acid proline that its levels were higher in Grazia compared to Rusticano under salt stress. Real-Time PCR analysis revealed that the genes $Td\delta$ -OAT, TdP5CS1, TdP5CS2 and TdP5CR that are implicated in proline biosynthesis are stress induced in roots and shoots of both cvs under both stress conditions. The expression of the genes was higher in the salt-tolerant cv Rusticano than in the salt-sensitive cv Grazia while the up-regulated expression of TdP5CS1 in roots and shoots was higher than that of TdP5CS2. It's worth mentioning that the higher accumulation of proline in shoots of Grazia after 48 h of salt stress confirmed the results of metabolomic analysis, while cv Rusticano accumulated more proline

later than Grazia (after 72 h of salt stress treatment). Under cold stress conditions, genes were over-expressed (with the exception of *TdP5CR* in shoots of both cvs), yet an earlier and higher response was observed in the cold-tolerant cv Rusticano, while proline accumulation showed a peak at 24 h in tissues (roots and shoots) of cv Rusticano, later than the peak of the genes' expression. The experimental results indicate that glutamate pathway is dominant in salt stress induced proline accumulation, where *TdP5CS1* seems to play more important role than does *TdP5CS2*. The associated work on metabolomics analysis reveals that ornithine seems to serve as a precursor of polyamine biosynthesis. The metabolite profiling and molecular regulation of proline biosynthesis show that cv Rusticano acclimate to both abiotic stresses better than Grazia.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DGDG : Διγαλακτοσυλο-διακυλογλυκερόλη (Digalactosyl-diacylglycerol)

- $\textbf{DIMBOA-GIc}: 2-(2,4-\delta i \dot{u} \delta \rho o \xi u-7-\mu \epsilon \theta o \xi u-1,4-\beta \epsilon v \zeta o \xi \alpha \zeta i v-3- \dot{o} v \eta)-\beta-D-\gamma \lambda u \kappa o \pi u \rho \alpha v \dot{o} \zeta \eta$
 - (2-β-D-glucopyranosyloxy-4-hydroxy-7-methoxy 1,4-benzoxazin-3-one)

Glu : Γλουταμινικό οξύ (Glutamate or Glutamic acid)

GSA : Γλουταμινική-γ-ημιαλδεύδη (Glutamate-semialdehyde)

HDMBOA-GIc : 2-(4,7-διμεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη)-β-D-γλυκοπυρανόζη

 $(2-\beta-D-glucopyranosyloxy-4,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one)$

ΗΜΒΟΑ-GIc : 2-(2-διύδροξυ-7-μεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη)-β-D-γλυκοπυρανόζη

(2-β-D-glucopyranosyloxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one)

MBOA : 6-μεθοξυ-2-βενζοξαζολιόνη (6-methoxy-2-benzoxazolinone)

MDGD : Μονογαλακτοσυλο-διακυκογλυκερόλη (Monogalactosyl-diacylglycerol)

- **Orn** : Ορνιθίνη (Ornithine)
- PCA : Στατιστική Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal component analysis)
- **P5C** : δ^1 -πυρολινο-5–καρβοξυλικό (δ^1 -pyrroline-5-carboxylate)
- **P5CR** : Ρεδουκτάση του δ¹-πυρολινο-5–καρβοξυλικό ή αναγωγάση του δ¹-πυρολινο-5–καρβοξυλικό (δ¹-pyrroline-5-carboxylate reductase)
- **P5CS** : Συνθετάση του δ¹-πυρολινο-5–καρβοξυλικό (δ¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase or synthase)

Pro : Προλίνη (Proline)

Real-Time PCR ή qPCR : Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου ή ποσοτική Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real-Time polymerase chain reaction or quantitative polymerase chain reaction)

ROS : Evɛpyές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species)

- TRIBOA-GIc: 2(4,7-τριύδροξυ-2H-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη)-β-D-γλυκοπυρανόζη
 - (2-β-D-glucopyranosyloxy-4,7-trihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-

one)

UPLC-MS ή UHPLC-MS: Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Ultra high pressure liquid chromatography-mass spectrometry or Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry)

δ-ΟΑΤ : δ-αμινοτρανσφεράση της ορνιθίνης (Ornithine -δ-aminotransferase)

TUB : Τιουμπουλίνη (Tubuline)

Προλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με τίτλο «Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των ποικιλιών σκληρού σίτου Rusticano και Grazia σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους» εκπονήθηκε στα Εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας, Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, Φυτοπαθολογίας και Γενικής και Γεωργικής Μερεωρολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ) καθώς και στο Εργαστήριο Βασικής και Εφαρμοσμένης Έρευνας στη Χημική Οικολογία, του Ινστιτούτου Βιολογίας του Πανεπιστημίου Neuchâtel, Ελβετία. Το θέμα διατριβής, που μου ανατέθηκε, επιλέχθηκε από κοινού από τους Καθηγητές του ΓΠΑ, κκ Π. Κατινάκη και Αικ. Χρονοπούλου-Σερέλη, τους οποίους ευχαριστώ θερμά.

Η διδακτορική διατριβή αποτελείται από τέσσερα Κεφάλαια. Στο 1° κεφάλαιο γίνεται περιγραφή των βασικών εισαγωγικών εννοιών της διατριβής. Γίνεται δηλαδή αναφορά στο σιτάρι, που αποτελεί και το πειραματικό φυτό της παρούσας μελέτης, στις αβιοτικές καταπονήσεις αλατότητα και ψύχος, στις επιδράσεις των καταπονήσεων αυτών στην ανάπτυξη των φυτών, στις τεχνικές μεταβολομικής ανάλυσης καθώς και στις μεταβολομικές αποκρίσεις των φυτών σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους. Το κεφάλαιο αυτό ολοκληρώνεται με την αναλυτική περιγραφή του ρόλου της προλίνης έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων.

Στο 2° κεφάλαιο διερευνάται η ανθεκτικότητα δύο εμπορικών ποικιλιών σκληρού σίτου σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους. Σε νεαρά φυτάρια των δύο ποικιλιών, Rusticano και Grazia, που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (0, 100 και 200 mM NaCl) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες (22 και 4°C), πραγματοποιείται αξιολόγηση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών.

Στο 3° κεφάλαιο μελετάται το μεταβολομικό πρότυπο του υπέργειου τμήματος των δύο ποικιλιών σκληρού σίτου σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (200 mM NaCl) και χαμηλών θερμοκρασιών (4°C). Ενώ το 4° κεφάλαιο εστιάζεται στη μελέτη του μονοπατιού βιοσύνθεσης του μεταβολίτη, προλίνη, στο ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα των δύο ποικιλιών σκληρού σίτου στις ανωτέρω συνθήκες καταπόνησης.

Επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην Επιβλέπουσα Ομότιμη Καθηγήτρια, κ. Αικατερίνη Χρονοπούλου Σερέλη για τη βοήθειά της στο σχεδιασμό, την καθοδήγησή της και τη γόνιμη ανταλλαγή απόψεων που συνέβαλαν καθοριστικά στην επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Την ευχαριστώ επίσης και για την εμψύχωση που μου παρείχε σε όλα τα στάδια εκπόνηση της διατριβής.

Τον κ. Παναγιώτη Κατινάκη, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του ΓΠΑ και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και με δέχτηκε στην εργαστηριακή του ομάδα, ενώ παράλληλα εργαζόμουν στη Γραμματεία του Τμήματος Γ. Βιοτεχνολογίας. Ήξερε ότι θα αργούσα να τελειώσω, λόγω των πολλών υποχρεώσεών μου, αλλά με τούτη τη διατριβή ελπίζω, έστω και μετά από τόσα χρόνια, να τον δικαίωσα για την αρχική του επιλογή.

Ευχαριστώ τον κ. Ιωάννη Τσίρο, Αν. Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μετεωρολογίας του ΓΠΑ και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τις υποδείξεις του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Τον κ. Επαμεινώνδα Παπλωματά, Καθηγητή του ΓΠΑ, μέλος της εξεταστικής επιτροπής και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας που με φιλοξένησε στο εργαστήριο για την ανάπτυξη των φυτών σε συνθήκες ψύχους.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Δημήτριο Μπουράνη, Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του ΓΠΑ και μέλος της εξεταστικής επιτροπής για την πολύτιμη βοήθεια που απλόχερα μου πρόσφερε, όταν αυτή του ζητήθηκε.

Τον κ. Γεώργιο Αϊβαλάκι, Αν. Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του ΓΠΑ και μέλος της εξεταστικής επιτροπής, ευχαριστώ για τη φιλοξενία του στο εργαστήριο, τη βοήθεια στο πείραμα μέτρησης της προλίνης, στη συζήτηση των αποτελεσμάτων της μεταβολομικής ανάλυσης καθώς και για την υπομονή του να ακούει και να δίνει λύσεις σε κάθε είδους πρόβλημα που προέκυπτε. Τον κ. Αθανάσιο Καμούτση, Επικ. Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μετεωρολογίας του ΓΠΑ και μέλος της εξεταστικής επιτροπής ευχαριστώ για την κριτική ανάγνωση του κειμένου της διατριβής.

Tov Dr. Gaétan Glauser, ερευνητή του Εργαστηρίου Βασικής και Εφαρμοσμένης Έρευνας στη Χημική Οικολογία, του Ινστιτούτου Βιολογίας του Πανεπιστημίου Neuchâtel, Ελβετία, για τη μεταβολομική ανάλυση των δειγμάτων, την ταυτοποίηση των μεταβολιτών και τη στατιστική ανάλυση PCA.

Τον κ. Πέτρο Ταραντίλη, Αν. Καθηγητή του Εργαστηρίου Χημείας του ΓΠΑ, για την πολύτιμη βοήθειά του στην απόδοση στα ελληνικά των δευτερογενών μεταβολιτών που προέκυψαν από τη μεταβολομική ανάλυση των δειγμάτων.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη, Επικ. Καθηγητή του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του ΓΠΑ, όπου μαζί με τη διδάκτορα Δανιέλα Τσίκου, με καθοδήγησαν για τον εντοπισμό των γονιδίων που πιθανά κωδικοποιούν για ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης, στην κ. Μαρία Δήμου, Λέκτορα ΓΠΑ και στη Δρ Αναστασία Βενιεράκη, Ε.ΔΙ.Π, για την αισιοδοξία και καλοσύνη τους καθώς και στους διδάκτορες Catalina Stedel, Rodica Efrose, Ευαγγελία (Λία) Κουρή, Χρυσάνθη Καλλονιάτη, Αναστασία Σερμπέζη, Κατερίνα Καλιαμπάκου, Περικλή Διαμαντόπουλο και Μιχάλη Φασσέα που συνέβαλαν στη δημιουργία ευχάριστου κλίματος και εποικοδομητικής συνεργασίας. Ελπίζω να μη ξεχνάω κανένα στα τόσα χρόνια πορείας. Ξεχωριστά ευχαριστώ θερμά για τη στήριξή της, τη φίλη Ευαγγελία Παππά, Χημικό Msc.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου Απόστολο και Διονυσία και την αδελφή μου Ειρήνη γιατί ήταν πάντα δίπλα μου και με εμψύχωναν όταν απογοητευόμουν, το σύζυγό μου Σωτήρη για την υπομονή και την υποστήριξη που μου παρείχε σε όλα τα στάδια εκπόνησης της παρούσας διατριβής καθώς και τους μικρούς μας Ελευθέριο-Λουκά, Απόστολο-Νεκτάριο και Μαρίνα-Πελαγία που ο ερχομός τους στη ζωή μας, μου έδωσαν τη δύναμη και το κουράγιο να ολοκληρώσω τη διατριβή αυτή.

Στην Οικογένειά μου

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°: ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ	. 16
1.1 Γενικά περί Σιτηρών	. 16
1.1.1 Η Σιτοκαλλιέργεια στην Ελλάδα	. 22
1.2 Αβιοτικές Καταπονήσεις	. 25
1.2.1 Αλατότητα	. 25
1.2.1.1 Κατάταξη Ανθεκτικότητας Βασικών Καλλιεργειών στην Αλατότητα Μηχανισμοί Μεταφοράς Αλάτων	και . 29
1.2.1.2 Επιδράσεις Αλατότητας	. 31
1.2.2 Ψύχος	. 34
1.2.2.1 Κατάταξη Ανθεκτικότητας Βασικών Καλλιεργειών στο Ψύχος	. 35
1.2.2.2 Επιδράσεις Ψύχους	. 36
1.3 Μεταβολομική Ανάλυση	. 40
1.3.1 Αλατότητα-Ψύχος και Μεταβολομικές Αποκρίσεις	. 45
1.4 Προλίνη	. 48
1.4.1 Βιοσύνθεση Προλίνης	. 53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙ ΣΚΛΗΡΟΥ ΣΙΤΟΥ, RUSTICANO KAI GRAZIA, ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΨΥΧΟΥΣ	ΩN KAI . 57
2.1 Σκοπός της Έρευνας	
	. 57
2.2 Υλικά & Μέθοδοι	. 57 . 58
2.2 Υλικά & Μέθοδοι 2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano Grazia	. 57 . 58 και . 58
 2.2 Υλικά & Μέθοδοι 2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano Grazia 2.2.2 Μετρήσεις Μορφολογικών Παραμέτρων των Φυταρίων Σκληρού Σίτου 	. 57 . 58 και . 58 . 59
 2.2 Υλικά & Μέθοδοι 2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano Grazia 2.2.2 Μετρήσεις Μορφολογικών Παραμέτρων των Φυταρίων Σκληρού Σίτου 2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση 	. 57 . 58 και . 58 . 59 . 60
 2.2 Υλικά & Μέθοδοι 2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano Grazia	. 57 . 58 . 58 . 59 . 60 . 60
 2.2 Υλικά & Μέθοδοι 2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano Grazia	. 57 . 58 . 58 . 59 . 60 . 60 . 64
 2.2 Υλικά & Μέθοδοι 2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano Grazia	. 57 . 58 και . 58 . 59 . 60 . 60 . 60 . 64 . 64
 2.2 Υλικά & Μέθοδοι 2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano Grazia 2.2.2 Μετρήσεις Μορφολογικών Παραμέτρων των Φυταρίων Σκληρού Σίτου 2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση 2.3.1 Μήκος του Ριζικού Συστήματος και του Υπέργειου Τμήματος των Φυταρ Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Αλατότητας 2.3.2. Ξηρή Μάζα των Φυταρίων Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Αλατότητας. 2.3.3 Μήκος του Ριζικού Συστήματος και του Υπέργειου Τμήματος των Φυταρ Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Φύχους 	. 57 . 58 και . 58 . 59 . 60 . 60 . 60 . 64 . 60 . 64
 2.2 Υλικά & Μέθοδοι 2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano Grazia 2.2.2 Μετρήσεις Μορφολογικών Παραμέτρων των Φυταρίων Σκληρού Σίτου 2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση 2.3.1 Μήκος του Ριζικού Συστήματος και του Υπέργειου Τμήματος των Φυταρ Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Αλατότητας 2.3.2. Ξηρή Μάζα των Φυταρίων Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Αλατότητας. 2.3.3 Μήκος του Ριζικού Συστήματος και του Υπέργειου Τμήματος των Φυταρ Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Ψύχους	. 57 . 58 . και . 58 . 59 . 60 . 60 . 60 . 60 . 64 . 60 . 64 . 66 . 70 . 72
 2.2 Υλικά & Μέθοδοι. 2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano Grazia 2.2.2 Μετρήσεις Μορφολογικών Παραμέτρων των Φυταρίων Σκληρού Σίτου 2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση. 2.3.1 Μήκος του Ριζικού Συστήματος και του Υπέργειου Τμήματος των Φυταρ Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Αλατότητας. 2.3.2. Ξηρή Μάζα των Φυταρίων Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Αλατότητας. 2.3.3 Μήκος του Ριζικού Συστήματος και του Υπέργειου Τμήματος των Φυταρ Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Ψύχους 2.3.4. Ξηρή Μάζα των Φυταρίων Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Ψύχους 2.3.4. Ξηρή Μάζα των Φυταρίων Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Ψύχους 2.3.4. Ξηρή Μάζα των Φυταρίων Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Ψύχους 2.4 Συμπεράσματα. 	. 57 . 58 και . 58 . 59 . 60 . 60 . 60 . 60 . 60 . 64 . 66 . 70 . 72 . 72 . 74
 2.2 Υλικά & Μέθοδοι 2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano Grazia	. 57 . 58 και . 59 . 60 . 60 . 60 . 60 . 60 . 60 . 60 . 60
 2.2 Υλικά & Μέθοδοι 2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano Grazia 2.2.2 Μετρήσεις Μορφολογικών Παραμέτρων των Φυταρίων Σκληρού Σίτου 2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση	. 57 . 58 και . 59 . 60 . 60 . 60 . 60 . 60 . 60 . 60 . 60

3.3.1 Μεταβολομική Ανάλυση Υπέργειου Τμήματος ποικιλιών Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Αλατότητας
3.3.2 Μεταβολομική Ανάλυση Υπέργειου Τμήματος ποικιλιών Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Ψύχους
3.3.3 Στατιστική Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)
3.3.4 Εφαρμογή των Αποτελεσμάτων στο Μεταβολικό Δίκτυο
3.4 Συμπεράσματα
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°: ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΛΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΣΚΛΗΡΟΥ ΣΙΤΟΥ, RUSTICANO KAI GRAZIA, ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ
4.1. Σκοπός της Έρευνας
4.2 Υλικά και Μέθοδοι
4.2.1 In silico μελέτη των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης στο σιτάρι
4.2.2 Μοριακή μελέτη
4.2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς η όργανα
4.2.2.1.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊνικών
οξέων
4.2.2.2 Χειρισμός του ολικού RNA με DΝάση και καθαρισμός με φαινόλη 114
4.2.2.3 Σύνθεση cDNA από ολικό RNA με RT-PCR
4.2.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
4.2.2.5 Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης
4.2.2.6 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης
4.2.2.7 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς
4.2.2.7.1 Ενοποίηση των άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης
4.2.2.8 Μετασχηματισμός <i>Ε. coli</i>
4.2.2.8.1 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων <i>Ε. coli</i> ικανών για μετασχηματισμό
4.2.2.8.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Ε.coli</i>
4.2.2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού
4.2.2.10 Πέψη DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού
4.2.2.11 Real-Time PCR ανάλυση
4.2.3 Προσδιορισμός προλίνης
4.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση
4.3.1 Ενίσχυση ακολουθιών των γονιδίων <i>P5CS1, P5CS2, δ-OAT, P5CR</i> και <i>TUB</i> στο <i>Triticum turaidum var. durum</i>

4.3.4 Μελέτη της συσσώρευσης προλίνης σε συνθήκες καταπόνησης 166

•		 	
4.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	ТА	 	 174
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑ	ΑΣΜΑΤΑ	 	 177
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		 	 178

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°: ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

1.1 Γενικά περί Σιτηρών

Τα σιτηρά ανήκουν στην οικογένεια Gramineae είναι από τα πρώτα φυτά τα οποία καλλιέργησε ο άνθρωπος και τα ίχνη των περισσότερων από αυτά χάνονται στο βάθος των αιώνων. Από τις αρχές της ανθρώπινης ιστορίας η σπουδαιότητα των σιτηρών για το ανθρώπινο γένος υπήρξε σημαντική. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι οι αρχαίοι πολιτισμοί ήκμασαν σε περιοχές όπου καλλιεργούνταν κάποιο σιτηρό. Έτσι, οι πολιτισμοί των Βαβυλωνίων και Αιγύπτιων βασίστηκαν στο σιτάρι, των Κινέζων στο ρύζι, των Ίνκας, Μάγιας και Αζτέκων στον αραβόσιτο (Καραμάνος 1994).

Σήμερα, τα σιτηρά εξακολουθούν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια γεωργία και τα προϊόντα τους αποτελούν τη βάση της διατροφής του πληθυσμού του πλανήτη μας. Σύμφωνα με στατιστικές του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων το έτος 2009 (FAO Stat 2009), το σιτάρι κατείχε τη δεύτερη θέση στην παγκόσμια παραγωγή σιτηρών, μετά το καλαμπόκι και ακολουθούσε στην τρίτη θέση το ρύζι. Η μεγάλη σημασία των σιτηρών παγκόσμια οφείλεται στο ότι σε εντατικές συνθήκες καλλιέργειας έχουν μεγαλύτερη παραγωγή από όλες τις άλλες κατηγορίες φυτών, παρουσιάζουν μεγάλη προσαρμοστικότητα σε διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος, αποτελούν την κυριότερη πηγή τροφίμων, αποθηκεύονται εύκολα γιατί περιέχουν μικρό ποσοστό υγρασίας και δεν απαιτούν μεγάλο χώρο αποθήκευσης (Shewry 2009).

Ταξινόμηση-Ονοματολογία Σίτου

Bασίλειο (Kingdom): Φυτά (Plantae) Υποβασίλειο (Subkingdom): Πράσινα φυτά (Viridaeplantae) Άθροισμα (Division): Τραχεόφυτα (Tracheophyta) Kλάση (Class): Αγγειόσπερμα (Magnoliopsida) Υπερκλάση (Superorder): Μονοκοτυλήδονα (Lilianae) Τάξη (Order): Κυπειρώδη (Poales) Οικογένεια (Family): Ποοειδή (Poaceae) ή Αγρωστώδη (Gramineae) Γένος (Genus): Σίτος (Triticum L.)

Για την ταξινόμηση χρησιμοποιήθηκαν πληροφορίες από τις ιστοσελίδες: (1) <u>URL:http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42</u> 236&print version=PRT&source=to print

⁽²⁾ URL: http://plants.usda.gov

Το σιτάρι ή στάρι ή σίτος (*Triticum spp*), έχει καταγωγή από την περιοχή του Λιβάνου, (Colledge and Conolly 2007),αλλά σήμερα η καλλιέργειά του έχει εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο. Το γένος *Triticum* περιλαμβάνει καλλιεργούμενα ή αυτοφυή είδη. Όλα τα είδη του σιταριού κατατάσσονται σε τρείς ομάδες ανάλογα με το γονιδίωμά τους (Hancock and James 2004) (Πιν. 1.1.1).

Πίνακας 1.1.1 Κατάταξη των καλλιεργούμενων σιτηρών και των στενών άγριων συγγενών ειδών. Οι αστερίσκοι δείχνουν τα άγρια είδη.

Είδος	Γένωμα	Γενετική Ταξινόμηση	Παραδοσιακή Ταξινόμηση
		(1)	(Dorofeev et al. 1979)
Διπλοειδή (2n	=14)	1	
		*Triticum monococcum L. subsp. aegilopoides Thell.	*Triticum boeoticum Boiss.
	AA	*Triticum urartu Tumanian ex Gandilyan	<i>*Triticum urartu Tumanian</i> ex Gandilyan
		Triticum monococcum L. subsp. monococcum	Triticum monococcum L.
Τετραπλοειδή	(2n=28)		
		*Triticum turgidum L. subsp. dicoccoides (Korn ex Asch & Graebn) Thell	*Triticum dicoccoides (Körn. ex Asch & Graebner) Schweinf
Σπόροι με	AABB	Triticum turgidum L. subsp. dicoccum (Schrank ex Schübl.) Thell.	<i>Triticum dicoccum</i> Schrank ex Schübler
πεπορά		Triticum ispahanicum Heslot	Triticum ispahanicum Heslot
		Triticum turgidum L. subsp. paleocolchicum Á. & D. Löve	Triticum karamyschevii Nevski
Τετραπλοειδή	(2n=28)		
	AABB	<i>Triticum turgidum L. subsp. durum</i> (Desf.) Husn.	Triticum durum Desf.
		Triticum turgidum L. subsp. turgidum	Triticum turgidum L.
Σπόροι χωρίς		<i>Triticum turgidum L. subsp. polonicum</i> (<i>L.</i>) Thell.	Triticum polonicum L.
Λέπυρα		<i>Triticum turgidum L. subsp. turanicum</i> (Jakubz.) Á. & D. Löve	Triticum turanicum Jakubz.
		Triticum turgidum L. subsp. carthlicum (Nevski) Á. & D. Löve	Triticum carthlicum Nevski in Kom.
AACC		*Triticum timopheevii (Zhuk.) Zhuk. subsp. armeniacum (Jakubz.) Slageren	*Triticum araraticum Jakubz.
		Triticum timopheevii (Zhuk.) Zhuk. subsp. timopheevii	Triticum timopheevii (Zhuk.) Zhuk.
Εξαπλοειδή (2	n=42)		
5-é a a cura	AABBDD	<i>Triticum aestivum L. subsp. spelta (L.)</i> Thell.	Triticum spelta L.
2ποροι με Λέπυρα		Triticum aestivum L. subsp. macha (Dekapr. & A. M. Menabde) Mackey	Triticum macha Dekapr. & Menabde
		Triticum vavilovii Jakubz.	Triticum vavilovii (Tumanian) Jakubz.
Εξαπλοειδή (2	2n=42)		
		Triticum aestivum L. subsp. aestivum	Triticum aestivum L.
Σπόροι χωρίς	AABBDD	<i>Triticum aestivum L. subsp. compactum</i> (Host) Mackey	Triticum compactum Host
Λέπυρα		Triticum aestivum L. subsp. sphaerococcum (Percival) Mackey	Triticum sphaerococcum Percival

Για την κατάταξη χρησιμοποιήθηκαν πληροφορίες από την ιστοσελίδα:

(1) USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN) National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland USA (URL: http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/index.pl)

Στην Εικόνα 1.1.1 παρουσιάζεται η εξέλιξη των διαφόρων ειδών καλλιεργούμενου σίτου. Σύμφωνα, με την πορεία εξέλιξης στο γένος *Triticum*, το σκληρό σιτάρι είναι αρχαιότερο του μαλακού. Επιπλέον, το μαλακό σιτάρι (*T. aestivum*), του οποίου οι σπόροι είναι χωρίς λέπυρα, προήλθε από τυχαία μετάλλαξη του *T. spelta* (σπόροι με λέπυρα) (Snape and Pankova 2006, Shewry 2009).



Εικόνα 1.1.1 Απεικόνιση της εξέλιξης των διαφόρων ειδών καλλιεργούμενου σίτου (Snape and Pankova 2006)

Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

Το ριζικό σύστημα των σιτηρών διακρίνεται σε εμβρυακό και μόνιμο (Καραμάνος 1994, Σφήκας 1995). Οι εμβρυακές ρίζες έχουν τις καταβολές τους στο έμβρυο. Στο σιτάρι αναπτύσσονται 5-6 ρίζες, οι οποίες άλλοτε είναι πρόσκαιρες και άλλοτε διατηρούνται ενεργές σε όλη τη διάρκεια της ζωής του φυτού. Είναι λεπτές, έχουν ομοιόμορφη διάμετρο και η ανάπτυξή τους είναι ταχύτατη κάτω από ευνοϊκές συνθήκες (Δαλιάνης 1983). Οι μόνιμες ρίζες βγαίνουν αργότερα, από ένα κόμβο του στελέχους που βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια του εδάφους. Οι ρίζες αυτές είναι παχύτερες, σκληρότερες και ισχυρότερες σε σύγκριση με τις εμβρυακές. Τα σιτηρά έχουν θυσσανώδες ριζικό σύστημα, αποτελούμενο από έναν αριθμό ισοδιαμετρικών ριζών που ξεκινούν από το ίδιο περίπου σημείο του φυτού σε μικρό βάθος κάτω από την επιφάνεια του εδάφους.

Στο στέλεχος τα φύλλα διατάσσονται σε φυλλοταξία δίστοιχη. Κάθε φύλλο αποτελείται από τον κολεό, που ξεκινά από το γόνατο και περιβάλλει το στέλεχος και το έλασμα, που είναι το ελεύθερο και ανώτερο μέρος του φύλλου. Στην ένωση με τον κολεό σχηματίζονται συνήθως τα ωτίδια και το γλωσσίδιο, τα οποία αποτελούν διακριτικό γνώρισμα μεταξύ των διαφόρων γενών των σιτηρών. Οι νευρώσεις του φύλλου (ηθμαγγειώδεις δέσμες) είναι παράλληλες χωρίς διακλαδώσεις (Καραμάνος 1994).

Το σιτάρι έχει ταξιανθία στάχυ. Αποτελείται από ένα κύριο αρθρωτό άξονα (τη ράχη), που έχει εναλλάξ μικρούς ποδίσκους (ραχίδια), οι οποίοι φέρουν τα σταχύδια. Κάθε σταχύδιο περιβάλλεται από δύο βράκτεια που ονομάζονται λέπυρα, σε αντιδιαστολή προς τα εσωτερικά λέπυρα (το χιτώνα και τη λεπίδα) που περιβάλλουν κάθε άνθος (Καραμάνος 1994, Σφήκας 1995)

Ο καρπός είναι καρύοψη και περιβάλλεται από το περικάρπιο και μια μεμβράνη (testa). Το έμβρυο βρίσκεται στη νωτιαία πλευρά του σπόρου κοντά στον ποδίσκο και έρχεται σε επαφή με το ενδοσπέρμιο που είναι ο αποταμιευτικός ιστός και αποτελείται από κύτταρα με αμυλόκοκκους και λίγη πρωτεΐνη (Καραμάνος 1994).

Στάδια του Βιολογικού Κύκλου

Τα σιτηρά είναι φυτά καθορισμένου τρόπου ανάπτυξης και επομένως ο βιολογικός τους κύκλος χαρακτηρίζεται από μια σαφώς προδιαγεγραμμένη αλληλουχία σταδίων ανάπτυξης. Για την πληρέστερη περιγραφή της φαινολογίας των σιτηρών (Εικ.1.1.2) έχει γίνει κωδικοποίηση των σταδίων ανάπτυξης με την κλίμακα του Feekes (1941). Αρχικά διακρίνεται η βλάστηση του σπόρου με την ανάδυση του κολεόπτιλου (στάδιο 1) και ακολουθεί ο σχηματισμός πολλών βλαστών, των αδελφιών, από οφθαλμούς οι οποίοι βρίσκονται στα γόνατα του στελέχους λίγο πιο κάτω ή ακριβώς πάνω στην επιφάνεια του εδάφους (Αδέλφωμα: στάδια 2-5). Στη συνέχεια διαφοροποιούνται όλοι οι κόμβοι και τα αντίστοιχα φύλλα, ακολουθεί η επιμήκυνση των μεσογονατίων, η αύξηση των αντίστοιχων φύλλων και το φυτό αυξάνει πολύ σε ύψος και φύλλωμα (Καλάμωμα: στάδια 6-10). Τέλος ολοκληρώνεται η πλήρης έξοδος του στάχυ από τον κολεό του ανώτερου φύλλου (Ξεστάχυασμα: στάδια 10.1-10.5), ακολουθεί η άνθηση με τη γονιμοποίηση και ξεκινάει η διαδικασία εφοδιασμού των γονιμοποιημένων σπερματικών βλαστών με φωτοσυνθετικά προϊόντα (Γέμισμα Καρπών: στάδιο 11) (Large 1954).



Εικόνα 1.1.2 Στάδια ανάπτυξης των σιτηρών σε αντιστοιχία με τα στάδια της κλίμακας Feekes

(Τροποποίηση Εικόνας από <u>http://www.uky.edu/Ag/GrainCrops/Images/2/2.1.JPG</u>)

1.1.1 Η Σιτοκαλλιέργεια στην Ελλάδα

Στις μέρες μας, η πλειοψηφία των καλλιεργούμενων ποικιλιών σίτου ανήκει σε δύο κύρια είδη του γένους *Triticum*. Περίπου το 95% της παγκόσμιας καλλιέργειας καλύπτεται από το εξαπλοειδικό (*T. aestivum*) -παραδοσιακό αρτοποιήσιμο σιτάρι- το πιο σπουδαίο είδος αγρονομικά και εξελικτικά, στο οποίο ανήκουν σχεδόν όλες οι ποικιλίες που είναι τώρα καλά προσαρμοσμένες σ' ένα μεγάλο φάσμα συνθηκών περιβάλλοντος σ' όλο τον κόσμο. Το δεύτερο σε σπουδαιότητα είδος είναι τετραπλοειδικό και αφορά το σκληρό σίτο (*T. turgidum* var. *durum*), που είναι κατάλληλο για τη βιομηχανία σιμιγδαλιού και ζυμαρικών. Το τελευταίο είναι καλύτερα προσαρμοσμένο στο ξηρό κλίμα της Μεσογείου σε σχέση με το αρτοποιήσιμο και μάλιστα αναφέρεται ότι οι χώρες γύρω από τη Λεκάνη της Μεσογείου παράγουν πάνω από το 75% της παγκόσμιας παραγωγής σκληρού σίτου (Nachit 1998, Habash et al 2009).

Στην Ελλάδα, όπως και στις περισσότερες χώρες, ο σίτος (σκληρός και μαλακός) είναι πολύ πιο σπουδαίος από όλα μαζί τα άλλα χειμωνιάτικα σιτηρά και καλλιεργείται εδώ και χιλιάδες χρόνια. Από το έτος 1931 μέχρι σήμερα έγιναν μεγάλες ανακατατάξεις στην καλλιεργούμενη έκταση σκληρού και μαλακού σίτου στη χώρα μας. Έτσι στο έτος αυτό ο σκληρός σίτος κάλυπτε το 66,6% της συνολικής σιτοκαλλιεργούμενης έκτασης (σκληρού και μαλακού σίτου). Η υπεροχή αυτή μειώθηκε σταδιακά το έτος 1947 (47,4% σκληρός σίτος). Στην περίοδο που ακολούθησε συνεχίστηκε η μείωση της καλλιέργειας του σκληρού σίτου με σταθμό το έτος 1976, που η υποχώρηση της έφθασε στο κατώτατο όριο (20,1%) (Εικ.1.1.3). Στη συνέχεια ακολούθησε ραγδαία ανοδική πορεία και σήμερα καλλιεργείται σε 7.000.000 στρ. περίπου. Τα σημερινά επίπεδα της καλλιέργειας του σκληρού σίτου (έκταση, παραγωγή, μέση στρεμματική απόδοση) στην Ελλάδα θεωρούνται πολύ ψηλά. Πρωταγωνιστής στην παραγωγή σκληρού σίτου ανά περιφέρεια είναι η Θεσσαλία, ακολουθεί η περιφέρεια δυτικής και κεντρικής Μακεδονίας, στην τρίτη θέση βρίσκεται η ανατολική Μακεδονία και τελευταία η περιφέρεια Έβρου (Ινστιτούτο Σιτηρών-Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων: http://www.cerealinstitute.gr).





Σύμφωνα FAO Stat (2011) Jμε тŋ στατιστική υπηρεσία (http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx), μετά την παραγωγή ελαιόλαδου που κατείχε την 1^η θέση στον Ελλαδικό χώρο, η παραγωγή σίτου ήταν η 2^η σημαντικότερη, για το έτος 2011. Σε ότι αφορά την παραγωγή σκληρού σίτου στην Ευρώπη των 27, για το έτος 2011, ηγετικό ρόλο έχει η Ιταλία, ακολουθεί η Γαλλία, στην τρίτη θέση βρίσκεται η Ισπανία, ενώ στην Ελλάδα που κατέχει την τέταρτη θέση στην παραγωγή σίτου της Ευρώπης, επισημαίνεται ότι η παραγωγή σκληρού σίτου ανά έτος βαίνει μειούμενη (Ινστιτούτο Σιτηρών-Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Tροφίμων: http://www.cerealinstitute.gr).

Δύο από τις πλέον εμπορικές ποικιλίες σκληρού σίτου Ιταλικής προέλευσης, που καλλιεργούνται στη χώρα μας και συγκαταλέγονται στις ευρέως καλλιεργούμενες ποικιλίες από τους Ιταλούς αγρότες (Royo et al 2009) είναι οι ποικιλίες Rusticano και Grazia, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό υλικό στην παρούσα διατριβή. Η ποικιλία Grazia διατέθηκε στην αγορά το έτος 1986 και χαρακτηρίζεται ως μια παλιά βελτιωμένη ποικιλία, ενώ η ποικιλία Rusticano είναι νέα ποικιλία και καλλιεργείται τις τελευταίες δύο δεκαετίες (από το 1997) (Di Falco et al 2008). Στον Πίνακα 1.1.2 καταγράφονται τα χαρακτηριστικά και οι τελικές αποδόσεις των δύο ποικιλιών. Πίνακας 1.1.2 Χαρακτηριστικά των ποικιλιών Rusticano και Grazia. (http://www.agroservicespa.it)

Rusticano	Grazia
Μεσοπρώιμη ποικιλία σκληρού σίτου	Μεσοόψιμη ποικιλία σκληρού σίτου
Μορφολογικά Χαρακτηριστικά	
Στάχυς συμπαγής με πολύ μακριά καστανόμαυρα άγανα.	Στάχυς μεγάλου μήκους, παράλληλος, με μαύρα άγανα.
Ύψος Φυτού :75-80 cm	Ύψος Φυτού :85-90 cm
Φυσιολογικά Χαρακτηριστικά	
Πολύ πλούσιο αδέλφωμα.	Πλούσιο αδέλφωμα.
Ανθεκτικό σε ψύχος και ξηρασία.	Μέτρια ευαίσθητο στην ξηρασία και Ανθεκτικό στις χαμηλές θερμοκρασίες
Ανθεκτικό στο πλάγιασμα.	Μέτρια ανθεκτικό στο πλάγιασμα
Μέτρια ανθεκτικότητα σε φουζαρίωση, ωίδιο, ανθράκωση, σεπτορίωση και	Ευαισθησία στις ασθένειες : σκωρίαση, σεπτόρια, φουζαρίωση
σκωρίαση	
Αποδόσεις	
Παραγωγικότητα: πολύ υψηλή	Μεγάλο δυναμικό παραγωγής
Βάρος 1000 σπόρων: 53-55 gr	Βάρος 1000 κόκκων : 48-50 gr
Εκατολιτρικό Βάρος: 83-84	Εκατολιτρικό βάρος : 83-85
Περιεκτικότητα σε Πρωτεΐνη: 14-16 %	Περιεκτικότητα σε Πρωτεΐνη : 13-14 %
Περιεκτικότητα σε Γλουτένη: 8,5 %	Περιεκτικότητα σε Γλουτένη : 7-8 %

1.2 Αβιοτικές Καταπονήσεις

Η παγκόσμια γεωργία αντιμετωπίζει αρκετές προκλήσεις και πρέπει να παράγει 70% περισσότερα τρόφιμα για επιπλέον 2.5 δισεκατομμύρια ανθρώπους μέχρι το έτος 2050, ενώ την ίδια χρονική στιγμή έρχεται αντιμέτωπη με τη φτώχια και την πείνα, την εκμετάλλευση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και την κλιματική αλλαγή (FAO 2009). Ωστόσο η παραγωγικότητα των καλλιεργειών δεν αυξάνεται παράλληλα με τη ζήτηση τροφίμων. Η μειούμενη παραγωγικότητα των καλλιεργειών οφείλεται τις περισσότερες φορές σε αβιοτικές καταπονήσεις.

Τα φυτά, κατά τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου, αντιμετωπίζουν αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η αλατότητα, η ξηρασία, οι χαμηλές-υψηλές θερμοκρασίες, η ακτινοβολία, η τοξικότητα των μέταλλων, το όζον (Bhatnagar-Mathur et al 2008, Ahmad and Prasad 2012). Έχει εκτιμηθεί ότι πάνω από 50% της μείωσης της γεωργικής παραγωγής είναι αποτέλεσμα των αβιοτικών καταπονήσεων (Rodrigez et al 2005, Acquaah 2007). Οι κύριες αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η ξηρασία, η υψηλή αλατότητα, το ψύχος και οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες επηρεάζουν αρνητικά την επιβίωση των φυτών, την παραγωγή της βιομάζας, την παραγωγή των βασικών γεωργικών προϊόντων πάνω από 70% (Vorasoot et al 2003, Kaur et al 2008, Ahmad et al 2010, Thakur et al 2010, Martin et al 2012, Ahmad et al 2012), ενώ παράλληλα απειλείται η ασφάλεια των τροφίμων παγκοσμίως.

1.2.1 Αλατότητα

Η αλατότητα είναι από τους πιο επικίνδυνους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγικότητα των καλλιεργειών. Πάνω από 45 εκατ. εκτάρια αρδευόμενης γης, που αντιστοιχούν στο 20% της συνολικής επιφάνειας της γης έχουν υποστεί καταστροφές από την αλατότητα παγκοσμίως και 1,5 εκατ. εκτάρια βγαίνουν εκτός παραγωγής κάθε χρόνο εξαιτίας των υψηλών επιπέδων αλατότητας (Munns and Tester 2008). Επιπλέον, η συνεχώς αυξανόμενη αλατότητα της γεωργικής γης αναμένεται να έχει παγκόσμια καταστρεπτικά αποτελέσματα, καταλήγοντας σε μείωση των καλλιεργούμενων εκτάσεων πάνω από 50% μέχρι τα μέσα του 21^{ου} αιώνα (Mahajan and Touteja 2005).

Η υψηλή αλατότητα προκαλεί υπερ-ωσμωτική, υπερ-ιοντική και οξειδωτική καταπόνηση και είναι δυνατό να οδηγήσει τα φυτά στη νέκρωση (Hasegawa et al 2000). Έχει αναφερθεί ότι τα φυτά που μεγαλώνουν σε συνθήκες αλατότητας επηρεάζονται από αυτή λόγω (ι) του χαμηλού δυναμικού του νερού στην περιοχή της ρίζας που προκαλεί υδατική καταπόνηση, με αποτέλεσμα η πρόσληψη και η

μεταφορά νερού και θρεπτικών στοιχείων να δυσχεραίνεται, (ιι) των ιόντων Νa⁺ και Cl⁻ που προκαλούν τοξικότητα και (ιιι) της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) που συμβάλλουν στην εμφάνιση έντονης οξειδωτικής καταπόνησης στους ιστούς (Hasegawa et al 2000).

Η υψηλή συγκέντρωση αλάτων αυξάνει το ωσμωτικό δυναμικό του εδαφικού περιβάλλοντος, το οποίο περιορίζει την εισροή νερού στα φυτά. Το φυτό, με τη σειρά του, ρυθμίζει το ωσμωτικό του δυναμικό σε χαμηλότερα επίπεδα, έτσι ώστε να έχει την ικανότητα να απορροφά νερό από το έδαφος και να διατηρήσει ανεκτή την πίεση σπαργής του. Ωστόσο σε χαμηλή ή μέτρια συγκέντρωση άλατος, τα φυτά ρυθμίζουν το ωσμωτικό τους δυναμικό (συγκεντρώνουν διαλύτες) με σκοπό να επιτρέπουν την εισροή νερού (Hasegawa et al 2000).

Τα ιόντα Na⁺ ανταγωνίζονται τα K⁺ στις θέσεις πρόσδεσης, χρήσιμες για τις κυτταρικές λειτουργίες (Munns 2002a). Το Na⁺ είναι ένα ιδιαίτερο τοξικό ιόν, διότι δρα ως ανταγωνιστής στην πρόσληψη K⁺, παρεμποδίζει τη λειτουργία των στοματίων και εν τέλει προκαλεί απώλεια νερού και νέκρωση. Από την άλλη τα ιόντα Cl⁻ προκαλούν χαρακτηριστικές χλωρώσεις στην περιφέρεια του ελάσματος καθώς και νεκρώσεις στα παλαιότερα φύλλα (Maas 1993, Marschner 1995). Αν και τόσο τα ιόντα Na⁺ όσο και τα ιόντα Cl⁻ είναι από τα βασικά ιόντα που επιφέρουν στα φυτά σοβαρές διαταραχές σε φυσιολογικό επίπεδο, τα ιόντα Cl⁻ αναφέρονται ως πιο επικίνδυνα από τα ιόντα Na⁺ (Tavakkoli et al 2010). Επιπλέον εμπλέκονται στη σπαργή των κυττάρων και τη ρύθμιση του pH. Ωστόσο, είναι τοξικά για τα φυτά σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ κρίσιμα επίπεδα τοξικότητας αναφέρονται τα 4-7 mg/g για τα ευαίσθητα είδη στα Cl⁻ και τα 15-50 mg/g για τα ανθεκτικά είδη στα Cl⁻ (Xu et al 2000, White and Broadley 2001).

Βιοχημικές και μοριακές μελέτες σχετικά με την αντίδραση των φυτών στην αλατότητα έχουν αποκαλύψει ότι η αλατότητα οδηγεί στο κλείσιμο των στοματίων των φύλλων των φυτών, το οποίο περιορίζει τη διαθεσιμότητα CO₂ στα φύλλα, και κατ' επέκταση τη δέσμευση του άνθρακα, εκθέτει τους χλωροπλάστες σε υπερβολική ενέργεια η οποία αυξάνει τη γένεση ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), συμπεριλαμβανομένου του οξυγόνου στην πρώτη κατάσταση διέγερσης απλότητας (¹O₂), της ρίζας υπεροξειδίου (O₂⁻), της ρίζας υδροξυλίου (OH⁻), του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) (Parida and Das 2005, Ahmad and Sharma 2008, Ahmad et al 2010, 2011). Οι ROS είναι δυνατό να προκαλέσουν αλλοιώσεις στη δομή των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων (Pastori and Foyer 2002, Apel and Hirt 2004, Ahmad et al 2010). Ο σχηματισμός οξειδωμένων μορφών λιπιδίων παρουσία των ROS προκαλεί την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών σε συνθήκες αλατότητας και έχει μελετηθεί σε πολλά καλλιεργούμενα είδη όπως το ρύζι,

26

την τομάτα, στα εσπεριδοειδή, το μπιζέλι και την κράμβη (Gueta-Dahan et al 1997, Dionisio-Sese and Tobita 1998, Mittova et al 2004, Ahmad et al 2009, 2010). Μακράς διάρκειας εφαρμογές αλατότητας (EC 5.4 και 10.6 dS m⁻¹, 60 ημέρες) προκάλεσαν σημαντική αύξηση των επιπέδων του H₂O₂ και σχηματισμό οξειδωμένων μορφών λιπιδίων σε φυτάρια ευαίσθητης ποικιλίας σιταριού σε σχέση με την ανθεκτικότερη ποικιλία (Sairam et al 2002). Πρόσφατα, παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε συνθήκες υψηλής αλατότητας σε φυτά *Brassica napus* (Hasanuzzaman et al 2011) και *T. aestivum* (Hasanuzzaman et al 2011).

Αιτίες και Τύποι Αλατότητας

Η προέλευση των αλάτων στο έδαφος μπορεί να είναι πρωτογενής ή φυσική και δευτερογενής ή ανθρωπογενής :

Η πρωτογενής αλατότητα προέρχεται από μακροχρόνια συγκέντρωση αλάτων στο έδαφος. Πρόκειται για μια φυσιολογική διαδικασία που προκαλείται κυρίως από φυσικές (ιζήματα-πετρώματα) και καιρικές κατακρημνίσεις (άνεμοςβροχόπτωση-φυσικά φαινόμενα) με αποτέλεσμα την εναπόθεση διαλυτών αλάτων και την εισροή τους στον υδροφόρο ορίζοντα. Επιπλέον, η τοπογραφία και το ανάγλυφο της περιοχής φαίνεται να έχει ουσιαστικό ρόλο στο φαινόμενο της αλατότητας (Hasanuzzaman et al 2013).

Η δευτερογενής αλατότητα δημιουργείται λόγω χρήσης ακατάλληλου νερού άρδευσης, υψηλής συγκέντρωσης σε άλατα. Η κακή ποιότητα του νερού άρδευσης (εξαιτίας της υπεράντλησης του υπόγειου νερού και της διείσδυσης του θαλάσσιου νερού), οι κακές συνθήκες στράγγισης και οι ξηροθερμικές συνθήκες που επικρατούν σε πολλές περιοχές ευνοούν το αρνητικό ισοζύγιο του νερού (Garg and Manchanda 2008).

Αναλυτικότερα, μετά την άρδευση, το νερό απορροφάται από την καλλιέργεια ή εξατμίζεται. Η κίνηση των αλάτων στην περιοχή της ρίζας σχετίζεται με την κίνηση του νερού και όταν το ανοδικό ρεύμα εξατμισοδιαπνοής υπερισχύει του καθοδικού ρεύματος της έκπλυσης των υδατοδιαλυτών αλάτων, αυτά συσσωρεύονται και εναποθέτονται στο εδαφικό ή θρεπτικό διάλυμα, Εικόνα 1.2.1 α. Το αλάτι, που πλεονάζει παραμένει στο έδαφος και κάποιες φορές γίνεται αναγνωρίσιμο από την λευκή στρώση ξηρού άλατος, που δημιουργείται στην επιφάνεια του εδάφους. Επιπλέον εξαιτίας της υπερβολικής άρδευσης και της κακής αποστράγγισης των εδαφών, η ύπαρξη υψηλής υπόγειας στάθμης επιτρέπει την ανοδική κίνηση του αλατούχου υπόγειου νερού στη ζώνη του ριζοστρώματος, με

27



Εικόνα 1.2.1 Η αλατότητα στις καλλιέργειες προκαλείται από κακής ποιότητας νερό άρδευσης και από την ανοδική κίνηση νερού και αλάτων από το υπέδαφος. (Τροποποίηση Εικόνας από Hasanuzzaman et al 2013)

αποτέλεσμα να συμβάλλει στην αύξηση της αλατότητας, Εικόνα 1.2.1 β (Hasanuzzaman et al 2013).

Συνεπώς, το αρνητικό ισοζύγιο του νερού δημιουργείται σε περιόδους με μεγάλη ανάγκη σε νερό, δηλαδή κάτω από ξηρές και θερμές συνθήκες όταν η εξατμισοδιαπνοή γίνεται μεγαλύτερη από το άθροισμα βροχόπτωσης και άρδευσης. Ενώ σε υγρές περιοχές ή κατά την ψυχρότερη περίοδο του έτους όπου παρατηρείται υψηλότερη βροχόπτωση και μικρότερη εξατμοσοδιαπνοή το ποσοστό έκπλυσης των συγκεντρωθέντων αλάτων είναι μεγαλύτερο, αμβλύνοντας έτσι τα συμπτώματα της αλατότητας (Hasanuzzaman et al 2013).

Η ποιότητα του νερού άρδευσης αναφορικά με το ποσοστό αλατότητας, εκφράζεται σε μονάδες ηλεκτρικής αγωγιμότητας EC (dS/m). Στον Πίνακα 1.2.1 παρουσιάζεται κατάταξη του νερού με βάση τα περιέχομενα σε αυτό διαλυμένα άλατα (Pitman and Lauchli 2002). Πίνακας 1.2.1 Κατάταξη της ποιότητας του νερού βασισμένη την τελική συγκέντρωση αλάτων (Pitman and Lauchli 2002)

Είδος νερού άρδευσης	Διαλυμένα άλατα (mg L ⁻¹)	Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (dS m ⁻¹)
Καθαρό χωρίς άλατα (Fresh water)	<500	<0.6
Ελάχιστα αλατούχο (Slightly brackish)	500–1,00	0.6–1.5
Ελαφρώς αλατούχο (Brackish)	1,000–2,000	1.5–3.0
Μέτρια αλατούχο (Moderately saline)	2,000–5,000	3.0-8.0
Αλατούχο (Saline)	5,000–10,000	8.0–15.0
Υψηλά αλατούχο (Highly saline)	10,000–35,000	15.0-45.0

1.2.1.1 Κατάταξη Ανθεκτικότητας Βασικών Καλλιεργειών στην Αλατότητα και Μηχανισμοί Μεταφοράς Αλάτων

Η επίδραση της αλατότητας στα φυτά εξαρτάται από τη συγκέντρωση άλατος, το χρόνο έκθεσης, το γονότυπο του φυτού και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ωστόσο μερικές καλλιέργειες είναι πιο ανθεκτικές σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος από κάποιες άλλες και η κατάταξη αυτών ανάλογα με την ευαισθησία τους στην αλατότητα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.2.2. Οι ανθεκτικές καλλιέργειες μπορούν ν' αντιστέκονται σε συγκέντρωση άλατος μέχρι 10 gL⁻¹, οι μέτρια ανθεκτικές μέχρι 5 gL⁻¹ και το όριο για τις ευαίσθητες στην αλατότητα καλλιέργειες είναι τα 2,5 gL⁻¹ (Brouwer et al 1985).

Πίνακας	1.2.2	Κατάταξη	βασικών	καλλιεργειών	ως	προς	την	ευαισθησία	τους	στην
		αλατότητα	(Brouwer e	et al 1985)						

Ανθεκτικά	Μετρίως Ανθεκτικά	Ευαίσθητα
Hordeum vulgare (κριθάρι)	Triticum aestivum (σιτάρι)	<i>Phaseolus</i> spp. (φασόλι)
Beta vulgaris (ζαχαρότευτλο)	Lycopersicon esculentum (τομάτα)	Pyrus communis (αχλαδιά)
Gossypium spp. (βαμβάκι)	Avena sativa (βρώμη)	<i>Trifolium pratense</i> (τριφύλι)
<i>Asparagus</i> spp. (σπαράγγι)	Medicago sativa (μηδική)	<i>Pisum sativum</i> (μπιζέλι)
Spinacia oleracea (σπανάκι)	Oryza sativa (ρύζι)	Saccharum officinarum
		(ζαχαροκάλαμο)
Phoenix dactylifera (χουρμαδιά)	Zea mays (καλαμπόκι)	<i>Malus domestica</i> (μήλο)
	Linum usitatissimum (λινάρι)	Citrus aurantium (πορτοκάλι)
		Prunus spp.
	Solanum tuberosum (πατάτα)	
	<i>Daucus carota</i> (καρότο)	
	Allium cepa (κρεμμύδι)	
	<i>Cucumi</i> s sativus (αγγούρι)	
	<i>Punica granatum</i> (ρόδι)	
	Ficus carica (σύκο)	
	Olea europaea (ελιά)	
	<i>Vitis vinifera</i> (σταφύλι)	

Όπως προαναφέρθηκε στην παρ. 1.2.1, μερικές από τις αρνητικές επιδράσεις της αλατότητας μπορούν να προκληθούν από ιόντα Na⁺ και Cl⁻, διότι τα ιόντα αυτά ανακόπτουν διάφορους μηχανισμούς λειτουργίας των φυτών και δημιουργούν τις καθοριστικές συνθήκες για τη βιωσιμότητα τους. Οι ρίζες των φυτών, είναι εκείνο το τμήμα, που γενικά επηρεάζεται από την παρουσία των ανωτέρω ιόντων. Ωστόσο, η εισροή των ιόντων αυτών εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών, το γονότυπό τους και από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία και η ένταση του φωτός (Hasegawa et al 2000).

Η διαδικασία μεταφοράς αλάτων πραγματοποιείται ως εξής : (ι) επιλεκτική εισροή αλάτων από το εδαφικό διάλυμα προς το φυτό, (ιι) 'εκφόρτωση' στα αγγεία του ξύλου, (ιιι) απομάκρυνση αλάτων από τα αγγεία του ξύλου στο υπέργειο τμήμα του φυτού, (ιν) 'φόρτωση' στον ηθμό και (ν) έκκριση μέρους των αλάτων μέσω αλατωδών αδένων (Munns 2002a,b Εικ. 1.2.2).



Εικόνα 1.2.2 Μεταφορά και ρύθμιση αλάτων στο σύστημα έδαφος-φυτό (Τροποποίηση Εικόνας από Hasanuzzaman et al 2013)

Η πορεία των ιόντων δια μέσω του φλοιώδους παρεγχύματος προς το εσωτερικό της ρίζας ακολουθεί τη συμπλαστική ή την αποπλαστική οδό. Στο συμπλαστικό μονοπάτι, το νερό εισέρχεται στις ρίζες μέσω των πλασματικών μεμβρανών της επιδερμίδας και η περαιτέρω μεταφορά κύτταρο-κύτταρο γίνεται μέσω των πλασμοδεσμάτων έως ότου επέλθει κορεσμός στα αγγεία του ξύλου. Στο αποπλαστικό μονοπάτι το νερό εισέρχεται διαμέσου των κυτταρικών τοιχωμάτων και των μεσοκυττάριων χώρων, χωρίς τη συμβολή του κυτταροπλάσματος, προκειμένου

να εκφορτωθεί το αλάτι στα αγγεία του ξύλου (Εικ. 1.2.2). Η αποπλαστική κίνηση νερού μπορεί να συνεχιστεί απρόσκοπτα τουλάχιστον μέχρι την λωρίδα Gaspari, όπου το νερό εισέρχεται αναγκαστικά στο συμπλάστη. Η συμπλαστική διακίνηση, σε αντίθεση με την αποπλαστική λόγω διαφοράς ωσμωτικού δυναμικού, απαιτεί κατανάλωση ενέργειας (Munns 2002a).

Έχει αναφερθεί ότι σε διαπνέοντα φυτά, το νερό εισέρχεται από το έδαφος στα αγγεία του ξύλου μέσω του αποπλαστικού μονοπατιού εξαιτίας της υδροστατικής πίεσης (Steudle 2000). Ωστόσο, σε συνθήκες καταπόνησης άλατος, η κατάσταση αυτή αλλάζει εξαιτίας της περιορισμένης διαπνοής, οπότε το νερό και τα ιόντα εισέρχονται από κύτταρο σε κύτταρο (συμπλαστική διακίνηση) και ρέουν κατά μήκος των μεμβρανών των ζωντανών κυττάρων (Garciadeblas et al 2003, Vysotskaya et al 2010).

1.2.1.2 Επιδράσεις Αλατότητας

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν μελετηθεί οι αρνητικές επιδράσεις της αλατότητας στη βλάστηση των σπερμάτων, στην ανάπτυξη των φυτών και στο ρυθμό φωτοσύνθεσης.

Η αλατότητα επηρεάζει ποικιλοτρόπως τη διαδικασία της βλάστησης των σπερμάτων διαφόρων καλλιεργούμενων ειδών όπως της *O. sativa* (Xu et al 2011), του *T. aestivum* (Akbarimoghaddam et al 2011), του *Z. mays* (Carpici et al 2009, Khodarahmpour et al 2012), του *Helianthus annuus* (Mutlu and Buzcuk 2007) του *Brassica spp.* (Ibrar et al 2003, Ulfat et al 2007), της *Glycine max* (Essa 2002) και του *Vigna spp.* (Jabeen et al 2003). Υψηλότερα επίπεδα αλατότητας παρεμποδίζουν τη βλάστηση νεκρώνοντας το σπόρο, ενώ σε χαμηλότερα επίπεδα αλατότητας οι σπόροι παραμένουν σε ληθαργική κατάσταση (Khan and Weber 2008). Ωστόσο υπάρχουν διάφοροι εσωτερικοί (ενδογενείς) και εξωτερικοί (περιβαλλοντικοί) παράγοντες που επηρεάζουν τη βλάστηση σε συνθήκες αλατότητας, οι οποίοι σχετίζονται με το περισπέρμιο, την ηλικία και τη μορφολογία των σπόρων, τη θερμοκρασία, το φως, το νερό, το λήθαργο (Wahid et al 2011). Ο ρυθμός βλάστησης και το ποσοστό των σπερμάτων που βλαστάνουν ποικίλει μεταξύ των ειδών και των ποικιλιών (Munns 2002b).

Η αλατότητα επηρεάζει στην ανάπτυξη των φυτών ποικιλοτρόπως. Αρχικά, η παρουσία αλάτων στο έδαφος περιορίζει την εισροή νερού στο φυτό και προκαλεί άμεσα ελάττωση στο ρυθμό ανάπτυξής του. Ο Munns (2002b) κωδικοποίησε τις μορφολογικές και κυτταρικές επιπτώσεις της αλατότητας στα φυτά όταν αυτά εκτεθούν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα σε συνθήκες αλατότητας (Πιν. 1.2.3).

Πίνακας 1.2.3 Συνέπειες της αλατότητας στην ανάπτυξη των φυτών σε συνάρτηση με το

χρονο παραμονής τους σε συνθήκες αλατότητας (Munns 2002	2b)
---	-----

Χρόνος	Αιτίες	Συνέπειες
Δευτερόλεπτα-Λεπτά	Υδατική Καταπόνηση	<i>Μορφολογικές</i> : Άμεση, αλλά μερικώς αναστρέψιμη ελάττωση του ρυθμού επιμήκυνσης της ρίζας και του φύλλου <i>Κυτταρικές</i> : Συρρίκνωση του κυττάρου, με άμεση αποκατάσταση εξαιτίας της επερχόμενης σπαργής
Ώρες	Υδατική Καταπόνηση, έλλειψη Ca²+	<i>Μορφολογικές</i> : Μόνιμη ελάττωση του ρυθμού επιμήκυνσης της ρίζας και του φύλλου <i>Κυτταρικές</i> : Αλλαγές στη ρευστότητα (rheological changes) του κυτταρικού τοιχώματος
Ημέρες	Υδατική Καταπόνηση, έλλειψη Ca²⁺	<i>Μορφολογικές</i> : Ελάττωση της ικανότητας φυλλογένεσης, αύξηση του λόγου ρίζα/υπέργειο τμήμα του φυτού <i>Κυτταρικές</i> : Παρεμπόδιση της ανάπτυξης του κυττάρου
Εβδομάδες	Υδατική Καταπόνηση, τοξικότητα ιόντων	Μορφολογικές: Ελάττωση του αριθμού των βλαστών/σχηματισμού αδελφιών, «νέκρωση» (ξήρανση) των παλαιότερων φύλλων. Κυτταρικές: Αλλαγές στην ανάπτυξη του κορυφαίου μεριστώματος (επάκρια βλάστηση), υπερβολική συγκέντρωση ιόντων Νa⁺ και CI-
Μήνες	Υδατική Καταπόνηση, τοξικότητα ιόντων	Μορφολογικές: Αλλαγή στο χρόνο άνθησης και μειωμένη σποροπαραγωγή. Πρόωρη «νέκρωση» (ξήρανση) των φυτών Κυτταρικές : Αλλαγές στην ανάπτυξη των αναπαραγωγικών οργάνων, ελάττωση της παραγωγής

Συνοπτικά, όπως προκύπτει από τον Πίνακα 1.2.3, φαίνεται ότι κατά τα πρώτα δευτερόλεπτα ή λεπτά τα κύτταρα χάνουν το νερό τους και συρρικνώνονται. Όταν τα φυτά εκτίθενται σε καταπόνηση άλατος για ώρες, τα κύτταρα επανακτούν τον αρχικό τους όγκο, αλλά ο ρυθμός ανάπτυξής της ρίζας και του φύλλου παραμένει μειούμενος. Η καταπόνηση ημερών, επηρεάζει το ρυθμό κυτταρικής διαίρεσης, η καταπόνηση εβδομάδων παρεμποδίζει την ανάπτυξη, ενώ η αλατότητα για μήνες προκαλεί αλλαγές στην ανάπτυξη των αναπαραγωγικών οργάνων (Munns 2002b).

Στη συνέχεια ο Munns το 2005 ανέπτυξε τη θεωρία «2 φάσεων ανάπτυξης των φυτών στην αλατότητα» (Εικ. 1.2.3). Η πρώτη φάση με άμεση συνέπεια τη μείωση της ανάπτυξης του φυτού είναι μια γρήγορη διαδικασία εξαιτίας του ωσμωτικού φαινομένου. Η δεύτερη φάση, είναι μια πιο αργή διαδικασία εξαιτίας της συγκέντρωσης των αλάτων στα φύλλα και οδηγεί τα φυτά σε τοξικότητα αλατότητας. Η τελευταία μάλιστα είναι πιθανόν να οδηγήσει στη νέκρωση των φύλλων με συνέπεια την ελάττωση της ολικής φωτοσυνθετικής επιφάνειας των φύλλων.

Η ανθεκτικότητα των ετήσιων καλλιεργούμενων φυτικών ειδών εξαρτάται από το είδος του φυτού, τα επίπεδα αλατότητας και το χρόνο έκθεσή του σε συνθήκες αλατότητας. Κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης, η ανάπτυξη 2 γονοτύπων, με διαφορετικό βαθμό ανθεκτικότητας σε συνθήκες αλατότητας, ελαττώνεται εξαιτίας του ωσμωτικού φαινομένου διότι το διάλυμα άλατος έρχεται σε άμεση επαφή με το ριζικό σύστημα. Στη δεύτερη φάση, τα φύλλα του πιο ευαίσθητου γενότυπου νεκρώνονται,

η φωτοσυνθετική ικανότητα του φυτού ελαττώνεται με συνέπεια να δημιουργείται ένας επιπρόσθετος επιβαρυντικός παράγοντας για την ανάπτυξη του φυτού. Σε περίπτωση προσθήκης άλατος κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης, ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται κατακόρυφα φτάνονταςστο μηδέν και χρειάζονται από 1 έως 24 ώρες προκειμένου να σταθεροποιηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης του φυτού (Munns 2002a).



Εικόνα 1.2.3 Απόκριση 2 γονοτύπων με διαφορετική ευαισθησία σε συνθήκες αλατότητας (Τροποποίηση Εικόνας από Munns 2005)

Η ελάττωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης στα φυτά σε συνθήκες αλατότητας οφείλεται στην ελάττωση του υδατικού δυναμικού. Η φωτοσύνθεση παρεμποδίζεται όταν υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Na⁺ και/ή Cl⁻ συσσωρεύονται στους χλωροπλάστες. Καθώς η μεταφορά ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση είναι σχετικά ανθεκτική σε συνθήκες αλατότητας, ο μεταβολισμός του άνθρακα και η φωτοφοσφοριλίωση είναι πιθανόν να επηρεάζονται λόγω της αλατότητας (Sudhir and Murthy 2004). Οι Fisarakis et al (2001) ανέφεραν θετική συσχέτιση μεταξύ της παρεμπόδισης της ανάπτυξης των φυτών σε συνθήκες αλατότητας και της μειούμενης φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυτών στις ανωτέρω συνθήκες καταπόνησης.

1.2.2 Ψύχος

Τα φυτικά είδη, όπως είναι γνωστό, αντιδρούν με διαφορετικό τρόπο στις ημερήσιες μεταβολές της θερμοκρασίας του αέρα. Η αντίδραση αυτή μπορεί να επιδράσει με καθοριστικό τρόπο και στις φυσιολογικές τους λειτουργίες. Έτσι, ανάλογα με τις θερμικές απαιτήσεις των διαφόρων φυτικών ειδών, αυτά μπορούν να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο με επιτυχία ή να υποστούν σημαντικές βλάβες από τις ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, όταν αυτές διαμορφωθούν στο χώρο διαβίωσής τους (Χρονοπούλου-Σερέλη και Φλόκας 2010).

Η ικανότητα ορισμένων φυτών να αντέχουν σε ακραίες θερμομετρικές συνθήκες ποικίλει στα διαφορετικά είδη και ποικιλίες και εξαρτάται από τη γεωγραφική τους εξάπλωση και από το ρυθμό μείωσης ή αύξησης της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος αυτών ατμοσφαιρικού αέρα. Την ικανότητα αντοχής ορισμένων φυτών στις ακραίες τιμές θερμοκρασίας αέρα αντλούν κυρίως από τα γονοτυπικά τους χαρακτηριστικά, σημαντικό όμως ρόλο παίζει και η ηλικία τους (νεαρά φυτάρια είναι ευπαθέστερα από αντίστοιχα μεγαλύτερης ηλικίας), η βλαστική τους φάση, η θρεπτική τους κατάσταση και άλλα επι μέρους χαρακτηριστικά (Χρονοπούλου-Σερέλη και Φλόκας 2010).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η καταπόνηση των φυτών από χαμηλές θερμοκρασίες, η οποία διαχωρίζεται σε δύο καταστάσεις. Στην καταπόνηση από σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, που κυμαίνονται από 0 έως 15°C (chilling stress) και στην καταπόνηση από παγετό, όταν η θερμοκρασία του αέρα είναι μικρότερη ή ίση του μηδενός (freezing stress) (Thomashow 1999).

Η καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών συμβαίνει όταν η θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι χαμηλότερη από την ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης των φυτών, αλλά όχι τόσο χαμηλή ώστε να προκαλέσει το σχηματισμό κρυστάλλων (Levitt 1972). Έχει αναφερθεί ότι φυτά ευαίσθητα σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι εξίσου ευαίσθητα και στον παγετό (Guy 2003).

Στην περίπτωση καταπόνησης από τον παγετό, οι θερμοκρασίες που διαμορφώνονται στο περιβάλλον των φυτών είναι αρνητικές, οπότε ο σχηματισμός παγοκρυστάλλων στον εξωκυττάριο χώρο προκαλεί αφυδάτωση στα κύτταρα (Ruelland et al 2009).

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης πολλά φυτικά είδη ανταπεξέρχονται στο ψύχος και ελαχιστοποιούν τις αρνητικές του επιδράσεις. Η ικανότητα των φυτών να εγκλιματίζονται στο ψύχος (δηλαδή να αντέχουν σε συνθήκες παγετού είναι αποτέλεσμα πρότερης έκθεσής τους σε θερμοκρασίες χαμηλότερες της βέλτιστης) έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας για πάνω από 20 χρόνια, κυρίως στο φυτό

Arabidopsis thaliana και έχουν αναγνωρισθεί μια σειρά από γενετικές και βιοχημικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά τον εγκλιματισμό των φυτών στο ψύχος (Chinnusamy et al 2007, Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki 2006, Thomashow 1999). Στην εύκρατη ζώνη, η σκληραγώγηση (μετά από εγκλιματισμό των φυτών στο ψύχος) γίνεται το φθινόπωρο, όταν οι θερμοκρασίες είναι χαμηλές, αλλά μεγαλύτερες του μηδενός, και η φωτοπερίοδος ελαττώνεται. Η διαφοφοποίηση του μεταβολισμού των κυττάρων και η επερχόμενη μεταγραφομική και πρωτεομική σύνθεση ως αποτέλεσμα της σκληραγώγησης των φυτών γίνεται ακόμη πιο περίπλοκη από την παρουσία των 3 διαφορετικών διαμερισμάτων εντός του κυττάρου (πυρήνα, χλωροπλάστη, μιτοχονδρίου). Επομένως η σωστή κυτταρική λειτουργία μπορεί να διατηρηθεί σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον μέσω της δράσης ενός πολύπλοκου συστήματος το οποίο θα ανταποκρίνεται στη μεταβολική κατάσταση των διαφορετικών διαμερισμάτων του κυττάρου και θα ρυθμίζει την έκφραση των διαφορετικών οργανιδίων με ένα συντονισμένο τρόπο (Ruelland et al 2009).

1.2.2.1 Κατάταξη Ανθεκτικότητας Βασικών Καλλιεργειών στο Ψύχος

Σύμφωνα με τους Ramankutty et al (2008) μόνο το 1/3 της γης δεν καλύπτεται από πάγο και 42% του πλανήτη μας έρχεται αντιμέτωπο με θερμοκρασίες χαμηλότερες των -20 °C. Στον Πίνακα 1.2.4 αναφέρονται κάποια χαρακτηριστικά καλλιεργούμενα είδη, ταξινομημένα ως προς την ευαισθησία τους σε συνθήκες ψύχους. Φυτά των εύκρατων και τροπικών κλιμάτων παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο ψύχος και ως προς τον εγκλιματισμό τους σε αυτόν (Thomashow 1999).

Ανθεκτικά στον πανετό	Ανθεκτικά στις χαμηλές	Ευαίσθητα στις χαμηλές
	θερμοκρασίες	θερμοκρασίες
Triticum aestivum	Pelargonium spp	Zea mays (καλαμπόκι)
(χειμερινές ποικιλίες σιταριού)		
Spinacia oleracea (σπανάκι)		Oryza sativa (ρύζι)
Brassica nappus (κράμβη)		Solanum tuberosum (πατάτα)
Daucus carota (καρότο)		<i>Cucumis sativus</i> (αγγούρι)
Pisum sativum (μπιζέλι)		Phaseolus vulgaris (φασόλι)
Allium cepa (κρεμμύδι)		Lycopersicon esculentum
Hordeum vulgare (κριθάρι)		(τομάτα)
, .,		Gossypium spp. (βαμβάκι)
		Glycine max (σόγια)
		Musa sp. (Μπανάνα)

Πίνακας 1.2.4 Κατάταξη βασικών καλλιεργειών ως προς την ευαισθησία τους στο ψύχος (Ruelland et al 2009)
Τα βασικότερα για τη διατροφή μας καλλιεργούμενα είδη είναι τα *Z. mays* (καλαμπόκι), *O. sativa* (ρύζι), Solanum tuberosum (πατάτα) τα οποία κατάγονται από την εύκρατη και τροπική ζώνη και είναι ευαίσθητα όταν η θερμοκρασία μειωθεί κάτω από τους 15°C (Mckersie and Leshem 1994). Τα πιο ευαίσθητα στάδια ανάπτυξης περιλαμβάνουν το σχηματισμό των αναπαραγωγικών οργάνων, την άνθιση, την καρπόδεση, την αύξηση του καρπού. Παράλληλα, αυτά τα είδη δεν αντέχουν τις χαμηλές θερμοκρασίες και υφίστανται μη αναστρέψιμες μεταβολές όταν η θερμοκρασία πέφτει κάτω από τους 10°C (Kodama et al 1995). Είδη του γένους Pelargonium, αντέχουν τις χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά όχι τον παγετό, ενώ άλλα καλλιεργούμενα είδη από την εύκρατη ζώνη, όπως τα : *S. oleracea* (σπανάκι), *T. aestivum* (χειμερινές ποικιλίες μαλακού σιταριού), *B. napus* (κράμβη) είναι ανθεκτικά και σε συνθήκες παγετού (Ruelland et al 2009).

1.2.2.2 Επιδράσεις Ψύχους

Φυτά που εκτίθενται στο ψύχος, ανάλογα με την έντασή του και το χρόνο παραμονής τους, μπορούν να παρουσιάσουν ελάττωση στο ρυθμό ανάπτυξής τους ή και πλήρη αναστολή της ανάπτυξή τους (Ruelland et al 2009).

Από μορφολογική άποψη, οι χαμηλές θερμοκρασίες επιφέρουν μορφολογικές τροποποιήσεις όπως μείωση στην έκπτυξη των φύλλων, χλώρωση και μάρανση, διότι μειώνεται αισθητά η αγωγιμότητα των μεμβρανών των ριζών, μέσω των οποίων μεταφέρονται τα μόρια νερού, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται το ιξώδες του νερού. Επιπλέον, παρατηρείται παρεμπόδιση των στοματικών κινήσεων λόγω του ελλείμματος σε νερό (Ruelland et al 2009).

Από φυσιολογική άποψη, οι χαμηλές θερμοκρασίες επιδρούν αρνητικά στα φυτά (Εικ. 1.2.4) διότι :

Προκαλούν ακαμψία των μεμβρανών, με συνέπεια τη μετατροπή της ρευστής κρυσταλλικής τους δομής σε ημικρυσταλλική. Άμεση συνέπεια είναι η διαταραχή όλων των μεμβρανικών διεργασιών (πχ μεταφορά μέσω ιοντικών αντλιών) λόγω της αλλοίωσης της περατότητας και ακεραιότητά τους. Οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες, εξαιτίας του σημαντικού τους ρόλου στο διαχωρισμό του εσωτερικού περιβάλλοντος από το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου, θεωρούνται ως το τμήμα εκείνο του κυτάρου που «αντιλαμβάνεται» την οποιαδήποτε αλλαγή στη θερμοκρασία (Wang et al 2006), με αποτέλεσμα η ακαμψία των μεμβρανών να είναι η άμεση αντίδραση στο ψύχος (Vaultier et al 2006).

 Επιφέρουν διαταραχές στη δομή των μεμβρανικών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η ενζυμική δραστηριότητα και να παρεμποδίζεται η

36

αναπνοή και η φωτοσύνθεση (Karnock and Beard 1983, White and Schmidt 1989, Sonoike 1999).

Οδηγούν στη δραματική αύξηση στο ρυθμό σχηματισμού των ROS κυρίως
στις μεμβράνες οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν ανεξέλεγκτη διαρροή
ηλεκτρονίων (Mahajan and Tuteja 2005).

Επιπρόσθετα, ευνοούν τη σύνθεση δευτερογενών δομών RNA, που με τη σειρά τους επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων και σύνθεση πρωτεϊνών (Ruelland et al 2009).

Ωστόσο, ο βαθμός καταπόνησης των φυτών λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών ποικίλει από φυτικό είδος σε είδος, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης των φυτών, τις συνθήκες φωτισμού και θρέψης των φυτών με ιχνοστοιχεία. Σε ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες φυτικά είδη έχει αναφερθεί ότι προκαλείται μεγαλύτερη «βλάβη» στο φως εξαιτίας της αυξημένης σύνθεσης των ROS (Long 1983, Wise 1995, Aroca et al 2001). Επιπλέον φυτά τομάτας που μεγάλωσαν με περιορισμένο εφοδιασμό ιχνοστοιχείων ήταν περισσότερο ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες (Starck et al 2000). Στο σπανάκι συνθήκες έλλειψης αζώτου προκάλεσαν ελάττωση στο ρυθμό προσαρμογής των φυτών στις χαμηλές θερμοκρασίες (Martindale and Leegood 1997).



Εικόνα 1.2.4 Επιδράσεις Χαμηλών Θερμοκρασιών στα Φυτικά Κύτταρα (Ruelland et al 2009)

Αντίθετα, ο παγετός (Εικ. 1.2.5) έχει ακόμη πιο καταστροφικά αποτελέσματα από ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες διότι ευνοεί το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου στα κύτταρα με αποτέλεσμα :

• Τη μετακίνηση νερού από το κυτταρόπλασμα προς τον αποπλάστη.

- Τη σταδιακή αφυδάτωση και συρρίκνωση των κυττάρων που ισοδυναμεί με υδατική καταπόνηση (Dowgert and Steponkus 1984) και τελικά,
- Την εισροή του πάγου στον συμπλάστη (Gusta et al 2004), προκαλώντας επιδείνωση στις κυτταρικές δομές με άμεση συνέπεια τον κυτταρικό θάνατο λόγω μηχανικής καταστροφής της λεπτής τους δομής.



Εικόνα 1.2.5 Επιδράσεις Παγετού στα Φυτικά Κύτταρα (Ruelland et al 2009)

Οι ακραίες θερμοκρασίες αέρα δημιουργούν σχεδόν σε ετήσια βάση προβλήματα στη φυτική παραγωγή στη χώρα μας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βλάβες των φυτών από τις χαμηλές θερμοκρασίες, οι οποίες σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία αποζημιώσεων του Οργανισμού Ελληνικών Γεωργικών Ασφαλίσεων (ΕΛΓΑ) εκφράζουν ποσοστό άνω του 50% των αποζημειωσίμων βλαβών της φυτικής παραγωγής (Οργανισμός Ελληνικών Γεωργικών Ασφαλίσεων 2009).

Η αντιμετώπιση του παγετού αποτελεί πρόβλημα που απασχόλησε τόσο τους καλλιεργητές όσο και την πολιτεία πριν από πολλές δεκαετίες. Έτσι εφαρμόστηκαν άμεσες μέθοδοι αντιμετώπισης του παγετού, που βασίζονται στην ελάττωση του ποσού της αποδιδόμενης από το έδαφος θερμικής ακτινοβολίας ή στην παροχή θερμότητας άμεσα ή έμμεσα στο περιβάλλον των καλλιεργειών. Αντίθετα οι έμμεσες μέθοδοι αποσκοπούν στην επιλογή κατάλληλων θέσεων εγκατάστασης (Χρονοπούλου-Σερέλη και Χρονόπουλος 1994) ή στην εφαρμογή καλλιεργητικών τεχνικών που να δημιουργούν συνθήκες μείωσης της έντασης του παγετού ή στην επιλογή κατάλληλων φυτικών ειδών που να μπορούν να αντιμετωπίσουν τις συνθήκες αυτές (Χρονοπούλου-Σερέλη και Φλόκας 2010).

Για τη δημιουργία φυτών με ανθεκτικότητα σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις σημαντικό ρόλο έχει η επιστήμη της Βιοτεχνολογίας. Ήδη από τη δεκαετία του 1970 άρχισαν πειραματικά να χρησιμοποιούνται βακτήρια (πχ

Pseudomonas syringae) για την προστασία των φυτών από τον παγετό. Τα βακτήρια αυτά, συνήθως διαβιούν στα φύλλα και στους καρπούς και έχουν την ικανότητα να περιορίζουν την παγοποίηση του νερού στους ιστούς των ποωδών φυτών, σε θερμοκρασία μικρότερη από τους -15 C (Geiger et al 2003). Άλλος τρόπος άμυνας των φυτών στις καταπονήσεις αποτελεί η εξωγενής χορήγηση οσμωπροστατευτικών ουσιών (πχ γλυκίνης της βεταΐνης, προλίνης) όπου έχει αναφερθεί ότι συμβάλλει στην ανθεκτικότητα των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις, όπως είναι η ξηρασία, η αλατότητα και το ψύχος (Ashraf and Foolad 2007).

1.3 Μεταβολομική Ανάλυση

Η μεταβολομική θεωρείται η νεότερη από τις ολιστικές τεχνολογίες υψηλής απόδοσης, γνωστές ως –omics στη διεθνή βιβλιογραφία και αποσκοπεί στην εκτενή και διεξοδική ανάλυση όλων των μεταβολιτών που είναι παρόντες σε ένα βιολογικό σύστημα (Feihn 2001). Αποτελεί την πιο πρόσφατη υψηλής απόδοσης τεχνική ανάλυσης μετά τη Γονιδιωματική, τη Μεταγραφομική και την Πρωτεομική και μελετά την αλληλεπίδραση των διαφορετικών επιπέδων πληροφορίας (DNA, RNA, πρωτεϊνών, μεταβολιτών) των βιολογικών συστημάτων (Εικ. 1.3.1).



Εικόνα 1.3.1 Οι υψηλής απόδοσης (hight-throuhput) μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την κατανόηση όλων των επιπέδων λειτουργίας των βιολογικών συστημάτων και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση (Τροποποίηση Εικόνας από Carreno-Quintero et al 2013)

Καθώς οι μεταβολίτες αποτελούν τα τελικά προϊόντα των κυτταρικών διεργασιών, η παρουσία και η σχετική τους συγκέντρωση αποτελούν τους καλύτερους δείκτες του φαινότυπου ενός οργανισμού. Ενώ, δηλαδή η μεταγραφομική ανάλυση υποδεικνύει τι είναι πιθανό να συμβεί, η μεταβολομική ανάλυση αντικατοπτρίζει τα πραγματικά γεγονότα στην υπό μελέτη χρονική στιγμή και αποτελεί το συνδετικό κρίκο του γενότυπου με το φαινότυπο (Feihn 2002). Επιπλέον, οι μεταβολές στα επίπεδα των μεταβολιτών παρουσιάζονται περισσότερο ενισχυμένες έναντι αυτών του γονιδιώματος και του πρωτεόματος (Saito and Matsuda 2010).

Οι φυτικοί μεταβολίτες διαχωρίζονται σε 2 βασικές κατηγορίες, τους πρωτογενείς και τους δευτερογενείς, με ασφαλέστερο κριτήριο διάκρισης το λειτουργικό ρόλο του επί μέρους μορίου. Τα προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού (αμινοξέα, λιπίδια, νουκλεοτίδια, οργανικά οξέα, υδατάνθρακες) συμμετέχουν σε ζωτικής σημασίας λειτουργίες, όπως η αναπνοή, η φωτοσύνθεση, η αφομοίωση θρεπτικών στοιχείων, ενώ η ύπαρξή τους χαρακτηρίζει όλα ανεξαρτήτως των κύτταρα (Fernie and Schauer 2009). Στον αντίποδα, βρίσκονται τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού, (φαινολικές ενώσεις, τερπένια και αζωτούχες ενώσεις), η σύνθεση των οποίων δε σχετίζεται ευθέως με τις ανάγκες της αύξησης και της ανάπτυξης, αλλά αποτελεί το θεμέλιο λίθο της άμυνας των φυτών έναντι βιοτικών ή αβιοτικών καταπονήσεων(Keurentjes 2009).

Τεχνικές Μεταβολομικής Ανάλυσης

Η μεταβολομική ανάλυση των φυτών αποτελεί πρόκληση για τους ερευνητές, διότι εκτιμάται ότι στο φυτικό βασίλειο παράγονται 90.000-200.000 διαφορετικοί μεταβολίτες (Feihn et al 2001), ενώ ο πραγματικός αριθμός των μεταβολιτών που υπάρχει σε κάθε φυτικό είδος παραμένει άγνωστος. Αξίζει να σημειωθεί ότι καμία αναλυτική μέθοδος από μόνη της δεν παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης όλων των κατηγοριών των μεταβολιτών (Dunn 2008, Wolfender et al 2009). Επιπλέον, ενώ οι αναλυτικές μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν μερικές χιλιάδες μοριακών δεικτών, μόνο ένας μικρός αριθμός υπάρχει δυνατότητα να ταυτοποιηθεί (Obata and Fernie 2012), λόγω του ότι οι υπάρχουσες βιβλιοθήκες είναι μικρές και ελλιπείς.

Από τις τεχνικές ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική ανάλυση ξεχωρίζουν η Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) και η τεχνική Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR).

Η MS εμπλέκει τη μεθοδολογία ιονισμού των ενώσεων και τη μέτρηση του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) των ιόντων παρέχοντας πληροφορίες για τη δομή των ανιχνευόμενων μορίων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, συμπεριλαμβανομένης της αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GS), της υγρής χρωματογραφίας (Liquid Chromatography, LS) και της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary Electrophoresis, CE). Αντίθετα με την NMR, η MS μπορεί να χρησιμοποιήσει συνδυασμό πηγών ιονισμού καθώς και πολλαπλούς αναλυτές. Αναφέρεται ότι η NMR έχει εξαιρετική επαναληψιμότητα, αλλά στερείται ευαισθησίας (Colquhoun 2007, Kim et al 2011). Αντίθετα η μεγάλη ευαισθησία της MS καθώς και η ικανότητά της να ανιχνεύει τους μεταβολίτες που βρίσκονται σε ίχνη αποτελούν τα βασικά πλεονεκτήματα της MS έναντι της NMR (Dettmer et al 2007). Ένα ακόμα πλεονέκτημα της Φασματομετρίας Μάζας είναι η ικανότητά της να διαχωρίζει μίγματα μορίων με υψηλή διακριτική ικανότητα. Ωστόσο, ένα από τα μειονεκτήματά της είναι η σχετικά φτωχή επαναληψιμότητά της, που είναι πιθανόν να καταστήσει τη χρήση της σε μακροπρόθεσμες μελέτες προβληματική, διότι τα δείγματα δεν θα μπορούν να διατηρηθούν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (Glauser et al 2013).

Στον Πίνακα 1.3.1 αναγράφονται οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούνται, ανάλογα με τον τύπο των μεταβολιτών που καλούνται να ανιχνεύσουν (Carreno-Quintero et al 2013). Οι αναλυτικές τεχνικές GC-MS και LC-MS χρησιμοποιούνται ευρέως στη μεταβολομική ανάλυση για την ανίχνευση της πλειονότητας των βιολογικών μορίων. Παρόλα αυτά, ένα μεγάλο ποσοστό δευτερογενών μεταβολιτών δεν μπορούν να προσδιοριστούν από το GC-MS. Για παράδειγμα κάποιες σημαντικές κατηγορίες του δευτερογενών μεταβολιτών (όπως φλαβονειδή ή γλυκοσίδια) δεν μπορούν να μετατραπούν σε μίγμα πτητικών παραγώγων, οπότε η χρήση του LC-MS φαίνεται να αποτελεί εναλλακτική επιλογή του GC-MS. Με το LC-MS απαιτείται ελάχιστος χρόνος προετοιμασίας των δειγμάτων και το εύρος των μεταβολιτών που μπορεί να προσδιορίσει είναι θεωρητικά μεγαλύτερο από το GC-MS. Κατά κύριο λόγο, το LC-MS μπορεί να ανιχνεύσει τις περισσότερο οργανικές ενώσεις με εξαίρεση τις πιο πτητικές (Balmer et al 2013).

Ταξινόμηση	Τύπος Μορίου	Μέθοδος Ανίχνευσης	
Υδατάνθρακες	Μονοσακχαρίτες	GC-MS	
	Ολιγοσακχαρίτες	CE-MS	
	Λιπίδια	LC-MS	
Νουκλεικά Οξέα	Βάσεις, Νουκλεοτίδια	CE-MS	
Πεπτίδια	Αμινοξέα/αμίνες	CE-MS/GC-MS/LC-MS	
Συμπαράγοντες	Βιταμίνες (υδρόφιλες)	LC-MS	
	Βιταμίνες (υδρόφοβες)	LC-MS/CE-MS	
	Συνένζυμα	LC-MS/CE-MS	
Στεροειδή		GC-MS/LC-MS	
Ορμόνες		LC-MS	
Χημικές Ενώσεις των Φυτών	Φαινυλοπροπανοειδή	LC-MS	
- Δευτερογενείς Μεταβολίτες	Πολυκετίδια	LC-MS	
	Τερπενοειδή	GC-MS/LC-MS	
	Αλκαλοειδή	GC-MS/LC-MS	

Πίνακας 1.3.1 Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αναλυτικές τεχνικές ανάλογα με το είδος των βιολογικών μορίων(Carreno-Quintero et al 2013)

Τα τελευταία χρόνια η υγρή χρωματογραφία (LC) και συγκεκριμένα η υπερυψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (Ultra-High Pressure LC, UHPLC ή Ultra-Performance LC, HPLC) συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (MS) έχει εξελιχθεί σε τυπική μέθοδο για τις μεταβολομικές αναλύσεις, εξαιτίας της υψηλής διακριτικής ικανότητας πολύπλοκων μιγμάτων και της ταχύτατης (5-15 λεπτά) ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων (Eugster et al 2011). Ο αριθμός των δημοσιευμένων εργασιών, οι οποίες αναφέρουν τη χρήση του UHPLC-MS για τις μεταβολομικές αναλύσεις της τελευταίας 5ετίας (Grata et al 2008, Glauser et al 2008a, Glauser et al 2013, Caseys et al 2013, Marti et al 2013) και η τάση αυτή προβλέπεται να μην αλλάξει στο άμεσο μέλλον. Ωστόσο, πρόκληση για τη συγκεκριμένη μέθοδο παραμένει η μη ταυτοποίηση μικρών βιολογικών μορίων και η δυσκολία δημιουργίας βιβλιοθηκών φασμάτων που βασίζονται στα δεδομένα του LC-MS (Glauser et al 2013).

Οι αλλαγές στα επίπεδα των μεταβολιτών απεικονίζουν την αντίδραση ενός βιολογικού συστήματος σε γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Feihn et al 2002, Ryan και Robarbs 2006). Η εφαρμογή της μεταβολομικής ανάλυσης στα φυτά σκοπό έχει να συνδέσει τις αλλαγές στα επίπεδα των μεταβολιτών με την παραγωγή, την ανθεκτικότητα στις ασθένειες, τα θρεπτικά στοιχεία και τη λειτουργία των γονιδίων. Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί το μεταβολομικό πρότυπο αρκετών φυτικών ειδών που έχουν καταπονηθεί τόσο από αβιοτικούς, όσο και βιοτικούς παράγοντες (Πιν. 1.3.2).

Πίνακας 1.3.2 Μεταβολομικές μελετές που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορες φυτικές οικογένειες σε συνθήκες αβιοτικής και βιοτικής καταπόνησης

Κατηγορίες/Ομάδες Φυτών	Είδος	Παράγοντας Καταπόνησης	Αναφορά
Σιτηρά	Κριθάρι (Hordeum vulgare)	Αλατότητα	Wu et al 2013, Widodo et al 2009
		Βορικό οξύ	Roessner et al 2006
		Μήκυτας (<i>Fusarium spp</i>)	Kumaraswamy et al 2011, Bollina et al 2010
	Ρύζι (Oryza sativa)	Ξηρασία	Degenkolbe et al 2013
		Αλατότητα	Fumagali et al 2009
		Αλατότητα, Ξηρασία	Morsy et al 2007
		Όζον	Cho et al 2008
		Ψυχος	Zhao et al 2013
		Μήκυτας (<i>Magnaporthe grisea</i>)	Jones et al 2011
	Δίκοκκο σιτάρι (<i>Triricum dicoccoides</i>)	Ξηρασία	Krugman et al 2011
	Μαλακό σιτάρι (<i>Triricum aestivum)</i>	Ξηρασία	Bown et al 2011, Hill et al 2013
		Μήκυτας (<i>Fusarium</i>	Gunnaiah et al 2012, Hamzehzarghani et
		graminearum)	al 2005
	Καλαμπόκι (<i>Zea may</i> s)	Ξηρασία	Witt et al 2012, Sun et al 2013
		Αλατότητα	Gavagham et al 2011
		Μήκυτας (<i>Ustilago maydis</i>)	Doehlemann et al 2008
		Εντομο (Spodoptera littoralis)	Marti et al 2013
Σολανώδη	Τομάτα (Solanum lycopersicum)	Αλατότητα	Johnson et al 2003
		Ξηρασία	Semel et al 2007
Ψυχανθή	Lotus japonicus	Αλατότητα	Sanchez et al 2008
		Ξηρασία	Sanchez et al 2011
	Σόγια (<i>Glycine max</i>)	Αλατότητα	Lu et al 2013
Σταυρανθή	Arabidopsis thaliana	Αλατότητα	Kim et al 2007,
		Ψύχος	Hannah et al 2006, Kaplan et al 2007 &
		T (2004, COOK et al 2004
		ι ραυματισμός	Glauser et al 2013
Φρούτα	Σταφύλι (Vitis vinifera)	Αλατότητα, Ξηρασία	Cramer et al 2007
Δένδρα	Λεύκα (Populus euphratica)	Αλατότητα	Broche et al 2005
Φαρμακευτικά Φυτά	Φασκόμηλο (Salvia miltiorrhiza)	Ξηρασία	Dai et al 2010a

1.3.1 Αλατότητα-Ψύχος και Μεταβολομικές Αποκρίσεις

Οι αντιδράσεις των φυτών στις καταπονήσεις εμπλέκουν την πολύπλοκη επικοινωνία και αλληλεπίδραση διαφορετικών βιολογικών συστημάτων, προκειμένου να ρυθμιστεί ο μεταβολισμός καθώς και η έκφραση των γονιδίων για τη φυσιολογική και μορφολογική προσαρμογή των φυτών. Οι μεταβολομικές ανακατατάξεις, σε επίπεδο πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών που προκύπτουν ως αντίδραση των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις, αλατότητα και ψύχος, αναφέρονται παρακάτω:

Πρωτογενής Μεταβολισμός

-Υδατάνθρακες: Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων είναι σημαντικός για την ανθεκτικότητα των φυτών και σχετίζεται απευθείας με την απόδοση της φωτοσυνθετικής λειτουργίας. Κατά την περίοδο της καταπόνησης τα περισσότερα φυτά χρησιμοποιούν το άμυλο ως πηγή ενέργειας αντί της γλυκόζης ενώ αρκετά αγγειόσπερμα, κυρίως από περιοχές με περιόδους ψύχους και ξηρασίας συσσωρεύουν φρουκτάνες (Kaplan and Guy 2004, Hendry 1993). Οι Kaplan et al (2007) ανέφεραν ότι η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη (προϊόντα αποδόμησης του αμύλου μετά τη δράση του ενζύμου β-αμυλάση), ήταν οι πρώτοι υδατάνθρακες, που ανιχνεύθηκαν μετά από έκθεση φυτών Arabidopsis σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτά τα απλά σάκχαρα δρουν ως ωσμωλύτες διατηρώντας τη σπαργή των κυττάρων, σταθεροποιώντας τις μεμβράνες και προστατεύοντας τις πρωτεΐνες από την αφυδάτωση και την περαιτέρω καταστροφή των μορίων τους (Sharp et al 2004). Επιπλέον, φυτά ανθεκτικά σε συνθήκες αφυδάτωσης συσσωρεύουν υψηλές ποσότητες του δισακχαρίτη τρεχαλόζη (Drenman et al 1993). Ωστόσο, επειδή η τρεχαλόζη βρίσκεται σε ίχνη στα περισσότερα αγγειόσπερμα, η αύξηση των επιπέδων της σε συνθήκες καταπόνησης είναι μέτρια (Kaplan et al 2004). Άλλα σάκχαρα, όπως η ραφινόζη και η σταχυόζη έχει αναφερθεί ότι συσσωρεύονται στα φύλλα φυτών που εκτίθενται σε καταπονήσεις ψύχους, ξηρασίας και υψηλής αλατότητας (Kaplan and Guy 2004) και εμπλέκονται στην εξουδετέρωση των ROS (Molinari et al 2004). Ενώ και οι πολυόλες (μανιτόλη, σορβιτόλη) εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα των φυτών στις καταπονήσεις εξαιτίας της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Szabados and Savouré 2009).

-Αμινοξέα: Κατά τη διάρκεια των καταπονήσεων τα φυτά επάγουν τη σύνθεση οσμωλυτών, εκτός των σακχάρων. Στην κατηγορία αυτή αναφέρονται τα αμινοξέα προλίνη, αλανίνη, σερίνη, γλυκίνη, γ-άμινοβουτυρικό οξύ. Η σύνθεση αυτών των αμινοξέων συμβάλλει στην προστασία του πρωτοπλάστη από την απώλεια νερού καθώς και στη σταθεροποίηση των μεμβρανών και των πρωτεϊνών (Korn et al 2008).

-Πολυαμίνες: Διάφορα είδη καταπονήσεων όπως η υδατική, η αλατότητα και το ψύχος παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση των επιπέδων των πολυαμινών στα φυτά, ενώ υψηλά επίπεδα αυτών έχουν θετική συσχέτιση με την ανθεκτικότητα των φυτών στις καταπονήσεις (Bitrián et al 2012, Martin-Tanguy 1997). Αρκετοί ρυθμιστικοί, προστατευτικοί και αντιοξειδωτικοί ρόλοι έχουν αποδοθεί σε αυτά τα μόρια που σχετίζονται με το μεταβολισμό των αμινοξέων (Ruiz 2012). Οι πιο κοινές πολυαμίνες στα φυτά είναι η πουτρεσκίνη, η σπερμιδίνη και σπερμίνη και απαντώνται τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και σε σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα των πολυαμινών, όπως αμίδια του ύδροξυκινναμικού οξέος συμβάλλουν στη ρύθμιση των ελεύθερων πολυαμινών στα φυτά (Hussain et al 2011). Γενικά, η συγκέντρωση των ελεύθερων πολυαμινών σχετίζεται με την εξισορροπημένη βιοσύνθεση, τον καταβολισμό και τη συμπλοκοποίησή τους κατά τη διάρκεια των περιβαλλοντικών καταπονήσεων (Nayyar and Chander 2004). Ο ακριβής τρόπος που αυτές οι ενώσεις συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα των φυτών παραμένει άγνωστος. Ωστόσο ο ρόλος τους ως συμβατοί ωσμωλύτες αμφισβητείται λόγω των χαμηλότερων συγκεντρώσεών τους σε σχέση με τον κλασσικό ωσμωλύτη προλίνη (Verma and Mishra 2005).

Δευτερογενής Μεταβολισμός

-Φαινολικές ενώσεις: Πρόκειται για μια πολυάριθμη, χημικά ετερογενή ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που περιλαμβάνουν τα φαινυλοπροπανοειδή (κινναμικό οξύ, κουμαρικό οξύ, καφεϊκό και φερουλικό οξύ) και τα πολυφαινολικά τους παράγωγα, δηλαδή φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες και ταννίνες. Αυτές οι ενώσεις συντίθενται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος που οδηγεί στη φαινυλαλανίνη. Η απαμίνωση της φαινυλαλανίνης καταλύεται από το ένζυμο αμμώνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης, ενώ αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου καθώς και άλλων ενζύμων του μονοπατιού των φαινυλοπροπανοειδών έχει αναφερθεί υπό την επίδραση διαφορετικών καταπονήσεων Αυτοί οι δευτερογενείς μεταβολίτες θεωρείται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στις παρενέργειες που προκύπτουν από τις περιβαλλοντικές αλλαγές (Wahid et al 2007).

-Καροτενοειδή και παράγωγα Τερπενίων: Αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών και συντίθενται από πρωτογενείς μεταβολίτες με δύο τουλάχιστον τρόπους την οδό του μεβαλονικού οξέος και την οδό της φωσφομεθυλ-ερυθριτόλης. Για τη βιοσύνθεση των κυριότερων υποομάδων των τερπενίων χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ενώσεις το πυροφωσφορικό ισοπεντύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP), προϊόντα της βιοσυνθετικής οδού του μεβαλονικού (Καραμπουρνιώτης 2003). Έχει αναφερθεί ότι η α-τοκοφερόλη εμφανίζει θετική επίδραση έναντι των υψηλών θερμοκρασιών, μέσω της σταθεροποίησης της λιπιδικής φάσης των θυλακοειδών (Demkura and Ballaré 2012). Επιπλέον τα καροτενοειδή προστατεύουν από την UV-B ακτινοβολία, ενώ υπερέκφραση του γονιδίου συνθετάση του φυτοενίου (phytoene synthase) σε διαγονιδιακά φυτά καπνού βελτίωσε την ανθεκτικότητα των φυτών στην υδατική καταπόνηση και την αλατότητα, μεταφέροντας τη ροή των καροτενοειδών προς το αψισικικό οξύ (ABA) αυξάνοντας τα επίπεδα της συγκεκριμένης φυτορμόνης (Cidade et al 2012).

-Αζωτούχες ενώσεις: Περιλαμβάνει ενώσεις που προέρχονται κυρίως από αμινοξέα, όπως μεθειονίνη, αλανίνη, βαλίνη, λευκίνη, φαινυλαλανίνη και τρυπτοφάνη. Οι ενώσεις αυτές φαίνεται ότι ανταποκρίνονται σε διάφορα είδη βιοτικών (Van Poecke et al 2001) και αβιοτικών καταπονήσεων (υδατική καταπόνηση, αλατότητα, ψύχος) (Zandalinas et al 2012, Kaplan et al 2004), ωστόσο η πραγματική τους λειτουργία στην ανθεκτικότητα των φυτών έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων δεν είναι ακόμα γνωστή.



Εικόνα 1.3.2 Κοινό Μονοπάτι Καταπονήσεων Αλατότητας και Ψύχους (Τροποποίηση Εικόνας από Mahajan and Tuteja 2005)

Στην Εικόνα 1.3.2, περιγράφεται η απόκριση των φυτών στους 2 τύπους καταπόνησης (αλατότητα, ψύχος) και παρουσιάζεται κοινό μονοπάτι στρατηγικής για την αντιμετώπισης των 2 αυτών αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Είναι γνωστό

από τη βιβλιογραφία ότι ο συνδετικός κρίκος μεταξύ διαφόρων αβιοτικών καταπονήσεων αποτελεί το δίκτυο εξουδετέρωσης των ROS, το οποίο επιφέρει ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή και την εξουδετέρωσής τους (Torres and Dangl 2005). Τα φυτά αντιλαμβάνονται τις ROS μέσω μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις δομικές πρωτείνες, που εμπλέκονται στην αποκατάσταση της κυτταρικής ομοιόστασης (Mittler et al 2004).

1.4 Προλίνη

Επειδή η συσσώρευση των οσμωλυτών αποτελεί κοινή στρατηγική των φυτών για την αντιμετώπιση τόσο της αλατότητας όσο και του ψύχους, ακολουθεί αναλυτική περιγραφή του ρόλου της προλίνης έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων. Η συσσώρευση της προλίνης έχει αποτελέσει αντικείμενο πολυετούς μελέτης, για πάνω από 50 χρόνια, σε σημαντικό αριθμό ειδών σε συνθήκες υπεροσμωτικής καταπόνησης. Είναι γνωστό ότι ως οσμωλύτης συνεισφέρει στη σταθερότητα των πρωτεϊνών, των μεμβρανών, των υπο-κυτταρικών δομών (Vanrensburg et al 1993) και προστατεύει τις κυτταρικές λειτουργίες εξουδετερώνοντας τις ROS (Bohnert and Shen 1999).

Ο οσμωπροστατευτικός ρόλος της προλίνης μελετήθηκε αρχικά σε βακτήρια, όπου υποστηρίχθηκε η σχέση συσσώρευσης της προλίνης και ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε συνθήκες αλατότητας (Csonka 1988, Csonka and Hanson 1991) και ψύχους (Sleator and Hill 2002). Το αμινοξύ προλίνη έχει αναφερθεί ότι συσσωρεύεται στα ανώτερα φυτά σε διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις, όπως ξηρασία (Choudhary, et al 2005), υψηλή αλατότητα (Yoshiba et al 1995), ψύχος (Patton et al 2007, Kaplan et al 2007, Gothandam et al 2010), υψηλή ένταση φωτός και UV ακτινοβολία (Saradhi et al 1995), βαρέα μέταλλα (Schat et al 1997), οξειδωτική καταπόνηση (Yang et al 2009) και ως αντίδραση βιοτικών καταπονήσεων (Fabro et al 2004, Haudecoeur et al 2009).

Τα ανωτέρω δεδομένα οδήγησαν στην υπόθεση ότι η συγκέντρωση της προλίνης σε καταπονημένα φυτά έχει προστατευτικό ρόλο έναντι των καταπονήσεων, γεγονός το οποίο έχει τονισθεί σε αρκετές εργασίες (Hare and Cress 1997, Kavi Kishor et al 2005, Verbruggen and Hermans 2008), ωστόσο η συσχέτιση αυτή έχει τεθεί και αρκετές φορές σε αμφισβήτηση. Υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία που παρατηρείται θετική συσχέτιση της συσσώρευσης των οσμωλυτών και της ανθεκτικότητας ποικιλιών συγκεκριμένων φυτικών ειδών στις καταπονήσεις (Binzel et al 1987, Hare and Cress 1997, Almansouri et al 1999, Meloni et al 2001, Choudhary et al 2005), ενώ σε άλλες εργασίες η υπερσυσσώρευση αυτών των ενώσεων θεωρείται δείκτης ευαισθησίας των ποικιλιών στην καταπόνηση (Lutts et al 1999, Heuer 2003, Chen et al 2007, Widodo et al 2009). Για παράδειγμα υψηλά επίπεδα προλίνης μπορεί να συσσωρεύουν οι ανθεκτικές στη ξηρασία ποικιλίες ρυζιού (Choudhary et al 2005), αλλά δεν σχετίζονται με την ανθεκτικότητα ποικιλιών κριθαριού στην αλατότητα (Chen et al 2007, Widodo et al 2009) και ποικιλιών φυτών Arabidopsis στο ψύχος (Korn et al 2008). Επιπλέον, υψηλά επίπεδα προλίνης αποτελούν δείκτη υπερευαισθησίας μεταλλαγμένων φυτών A. thaliana στην αλατότητα, ενώ αντίθετα αποτελούν δείκτη ανθεκτικότητας των ίδιων φυτών στο ψύχος (Liu and Zhu 1997, Xin and Browse 1998). Ωστόσο, δεν είναι δυνατό ν' αποκλεισθεί το ενδεχόμενο και οι 2 παραπάνω μηχανισμοί να συνυπάρχουν και από τη μια να εξουδετερώνονται οι ROS στις ευαίσθητες ποικιλίες/φυτικά είδη (Xiong et al 2002, Chen et al 2007) ενώ από την άλλη να συσσωρεύουν προλίνη και οι ανθεκτικές ποικιλίες. Εξάλλου, είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, ότι οι ευαίσθητες στην αλατότητα ποικιλίες περιορίζουν την εισροή των αλάτων και ρυθμίζουν την οσμωτικό τους δυναμικό με τη σύνθεση οσμωλυτών (προλίνης, γλυκίνης της βεταίνης, σάκχαρα) (Tal and Shannon 1983) ενώ οι ανθεκτικές ποικιλίες διαμερισματοποιούν και συσσωρεύουν το αλάτι στα χυμοτόπια, προκειμένου να ελέγχουν τη συγκέντρωση των αλάτων στο κυτταρόπλασμα και να διατηρούν υψηλό λόγο K⁺/Na⁺ σε αυτό (Glenn et al 1999).

Επιπλέον, σε διαγονιδιακά ή μεταλλαγμένα φυτά αναφέρεται ότι ο μεταβολισμός της προλίνης έχει πολυσύνθετες επιδράσεις στην ανάπτυξη των φυτών και στην ανταπόκριση αυτών στην καταπόνηση, καθώς και ότι η συσσώρευση της προλίνης είναι σημαντική για την ανθεκτικότητα των φυτών έναντι δυσμενών περιβαλλοντικών καταπονήσεων (Hong et al 2000, Mattioli et al 2008, Szekely et al 2008, Miller et al 2009).

Διαμερισματοποίηση του Μεταβολισμού της Προλίνης στα φυτά

Τα φυτά συνθέτουν την προλίνη μέσω 2 μεταβολικών οδών, χρησιμοποιώντας πρόδρομες ενώσεις το γλουταμινικό οξύ και την ορνιθίνη (Εικ. 1.4.1). Κατά τη βιοσύνθεση της προλίνης από το γλουταμινικό οξύ, το δεσμευτικό στάδιο αυτής της οδού καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση του δ¹-πυρολινο-5– καρβοξυλικού (P5CS). Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή του γλουταμινικού σε γλουταμινική-γ-ημιαλδεύδη (GSA), η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται αυθόρμητα στο δ¹-πυρολινο-5–καρβοξυλικό (P5C) (Hu et al 1992, Savoure et al 1995). Το ένζυμο αναγωγάση του δ¹-πυρολινο-5–καρβοξυλικό (P5CR) ανάγει το P5C με τελικό προϊόν την προλίνη (Szoke et al 1992, Verbruggen et al 1993). Στα περισσότερα φυτικά είδη η P5CS είναι ένα διλειτουργικό ένζυμο και κωδικοποιείται από 2 γονίδια ενώ η P5CR από ένα γονίδιο (Verbruggen et al 1993, Strizhov et al 1997, Armengaud et al 2004). Εναλλακτικά, οι φυτικοί οργανισμοί έχουν την ικανότητα βιοσύνθεσης της προλίνης χρησιμοποιώντας ως πρόδρομη ένωση το αμινοξύ ορνιθίνη. Σε αυτή την περίπτωση η ορνιθίνη μετατρέπεται σε P5C μέσω της δράσης του ενζύμου δ-αμινοτρανσφεράση της ορνιθίνης (δ-OAT) με τελικό προϊόν την L-προλίνη μέσω της δράσης του ενζύμου P5CR (Delauney et al 1993, Roosens et al 1998).

Η διαδικασία αποδόμησης της προλίνης καταλύεται από το ένζυμο αφυδρογονάση ή οξειδάση της προλίνης (PDH ή POX), η οποία και καταλύει τη μετατροπή της προλίνης σε P5C και από την αφυδρογονάση του δ¹-πυρολινο-5– καρβοξυλικό (P5CDH) η οποία μετατρέπει το P5C σε γλουταμινικό οξύ. Το *PDH* είναι ένα διλειτουργικό γονίδιο, ενώ ένα μόνο γονίδιο έχει απομονωθεί από τα φυτά *A. thaliana* και *Nicotiana tabacum* (Verbruggen et al 1993, Strizhov et al 1997, Armengaud et al 2004, Kiyosue et al 1996, Verbruggen et al 1996, Deuschle et al 2001, Ribarits et al 2007).

Σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης και αλατότητας έχει αναφερθεί ότι σε φυτά Arabidopsis το ένζυμο P5CS1-GFP συσσωρεύεται στους χλωροπλάστες, ενώ το ένζυμο P5CS2-GFP εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα (Szekely et al 2008). Η δραστηριότητα του ενζύμου P5CR ανιχνεύθηκε σε φυτά G. max (Savoure et al 1995, Kohl et al 1988) στο κυτταρόπλασμα, και στα πλαστίδια των φύλλων, των ριζών και των φυματίων ενώ σε φυτά P. sativum το P5CR εντοπίζεται στους χλωροπλάστες, προτείνοντας ότι το ένζυμο P5CR συσσωρεύεται στα πλαστίδια σε συνθήκες υπερ-οσμωτικής καταπόνησης (Rayapati et al 1989). Γενικότερα, η βιοσύνθεση της προλίνης στο φυτό Arabidopsis πιθανόν να λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα και ελέγχεται από το γονίδιο P5CS2 (Szekely et al 2008). Κατά τη διάρκεια ωσμωτικής καταπόνησης η βιοσύνθεση της προλίνης γίνεται στους χλωροπλάστες και ελέγχεται από το γονίδιο P5CS1 (Szekely et al 2008, Savoure et al 1995, Strizhov et al 1997). Συνεπώς, η προλίνη μπορεί να συντίθεται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα, λαμβάνοντας κάθε φορά υπόψη τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Εικ. 1.4.1). Τα ένζυμα αποδόμησης της προλίνης, PDH και P5CDH, καθώς και το ένζυμο δ-OAT είναι μιτοχονδριακά (Deuschle et al 2001, Boggess and Koeppe 1978, Rayapati and Stewart 1991, Funck et al 2008). Έχει αναφερθεί ότι, μετά από πρωτεωμική ανάλυση, το P5CDH έχει εντοπισθεί και στους χλωροπλάστες, προτείνοντας ότι το P5C μετατρέπεται σε γλουταμινικό οξύ στα πλαστίδια (Kleffmann et al 2004).

Η βιοσύνθεση της προλίνης από το αμινοξύ ορνιθίνη είναι σημαντική κατά την ανάπτυξη σε επίπεδο φυταρίου (seedling development) και σε μερικά φυτά για τη συσσώρευση της προλίνης σε συνθήκες καταπόνησης (Armengaud et al 2004, Roosens et al 1998, Xue et al 2009). Πρόσφατα η σημασία του μονοπατιού αυτού τέθηκε υπό αμφισβήτηση, διότι τα επίπεδα της προλίνης δεν επηρεάστηκαν σε μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis* στα οποία απαλείφτηκε το γονίδιο δ-OAT. Αντίθετα, το ένζυμο δ-OAT διευκολύνει την ανακύκλωση του αζώτου, το οποίο μετατρέπεται σε γλουταμινικό οξύ μέσω του ενζύμου P5CDH (Funck et al 2008).

Γενικότερα η διαμερισματοποίηση του μεταβολισμού της προλίνης υπονοεί εκτενή ενδοκυτταρική μεταφορά προλίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος, των χλωροπλαστών και των μιτοχονδρίων (Εικόνα 1.4.1). Η εισροή της προλίνης στα μιτοχόνδρια είναι μια ενεργή διαδικασία, που προϋποθέτει την ύπαρξη συγκεκριμένων μεταφορέων (Yu et al 1983). Μεμβρανικοί μεταφορείς της προλίνης έχουν ταυτοποιηθεί σε αρκετά φυτά (Rentsch et al 1996 Grallath et al 2005, Ueda et al 2001). Πρόσφατα 2 μεταφορείς προλίνης εντοπίστηκαν στα μιτοχόνδρια του T. durum ο ένας μεταφορέας διευκολύνει τη μεταφορά προλίνης στο μιτοχόνδριο και ο δεύτερος εμφανίζεται να έχει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά Pro/Glu μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος (Di Martino et al 2006). Βασικοί μεταφορείς αμινοξέων (BAC transporters) μεταφέρουν αργινίνη και ορνιθίνη μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Palmieri et al 2006). Στο αλλόφυτο Limonium latifolium, η προλίνη εντοπίστηκε στο χυμοτόπιο μη καταπονημένων φυτών, ενώ σε συνθήκες αλατότητας, υψηλά επίπεδα προλίνης ανιχνεύθηκαν στο κυτταρόπλασμα, υπονοώντας τη σημαντικότητα της de novo βιοσύνθεση της προλίνης, καθώς και τη μεταφορά της (Gagneul et al 2007).



Εικόνα 1.4.1 Προτεινόμενο μοντέλο μεταβολισμού της προλίνης στα ανώτερα φυτά, αν και τα περισσότερα δεδομένα προέκυψαν από το φυτό Arabidopsis, είναι όμως πιθανό να ισχύουν και σε άλλα φυτικά είδη. Το μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης είναι με πράσινες γραμμές, ενώ το μονοπάτι αποδόμησης με κόκκινο. Τα ένζυμα απεικονίζονται σε ελλειψοειδές σχήμα και οι πρωτεΐνες μεταφοράς σε μπλε οκτάγωνα. Με το σύμβολο απεικονίζονται πιθανοί μεταφορείς. Σε συνθήκες καταπόνησης το ένζυμο P5CS1 συσσωρεύεται στους χλωροπλάστες, με συνέπεια αυξημένα επίπεδα προλίνης στα πλαστίδια. Η αποδόμηση της προλίνης λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Το μονοπάτι της ορνιθίνης παράγει P5C και γλουταμινικό οξύ στα μιτοχόνδρια. (Τροποποίηση Εικόνας από το Szabados and Savoure 2009)

1.4.1 Βιοσύνθεση Προλίνης Συνθετάση του δ¹-πυρολινο-5–καρβοξυλικό (*P5CS*)

Στο φυτό *V. aconitifolia* απομονώθηκε για πρώτη φορά cDNA κλώνος, 2417 βάσεων που κωδικοποιεί το γονίδιο *P5CS* και περιέχει ένα αναγνωστικό πλαίσιο το οποίο κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 73.2 kDa (Hu et al 1992). Πρόκειται για το γονίδιο που θεωρείται ότι καταλύει το σημαντικότερο στάδιο βιοσύνθεσης της προλίνης και περιέχει την ενζυμική δραστικότητα τόσο της γλουταμινικής-γ-κινάσης όσο της αφυδρογονάσης της γλουταμινικής-γ-ημιαλδεύδης. Οι 2 αυτές ενζυμικές περιοχές του P5CS αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες ProB και ProA του βακτηρίου *Escherichia coli* (Hu et al 1992).

Στη συνέχεια, οι Savoure et al 1995 κλωνοποίησαν και αλληλούχισαν έναν ισότυπο του γονιδίου *P5CS* στο φυτό *Arabidopsis*. Το γονίδιο *AtP5CS* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 717 αμινοξέων και παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την P5CS της *V. aconitifolia*. Το γονίδιο *AtP5CS* χαρτογραφήθηκε στο δεύτερο χρωμόσωμα του φυτού *Arabidopsis* και οι ανωτέρω ερευνητές χαρακτήρισαν τις περιοχές πρόσδεσης ATP και NAD(P)H στην πρωτεΐνη AtP5CS.

Ένας cDNA κλώνος που κωδικοποιεί για το γονίδιο *P5CS* απομονώθηκε στο ρύζι (Igarashi et al 1997), όπου τα επίπεδα mRNA του *OsP5CS* και της προλίνης μελετήθηκαν σε συνθήκες αλατότητας σε 2 ποικιλίες με διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας στο αλάτι. Η έκφραση του γονιδίου και η συγκέντρωση της προλίνης αυξήθηκαν σταθερά στην ανθεκτική ποικιλία, ενώ παρατηρήθηκε μικρότερη αύξηση στην ευαίσθητη στην αλατότητα ποικιλία ρυζιού.

Ακολούθως 2 ισότυποι του γονιδίου *P5CS* απομονώθηκαν στα φυτά *A.thaliana, M. sativa* και *L. esculentum* (Strizhov et al 1997, Ginzberg et al 1998, Fujita et al 1998). Στο φυτό *Arabidopsis*, το *P5CS2* χαρακτηρίζεται ως ένα γονίδιο σταθερής έκφρασης (Szekely et al 2008, Strizhov et al 1997), ενώ το *P5CS1* εκφράζεται σε συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης, αλατότητας και εφαρμογής ABA (Yoshiba et al 1995). Από τη συγκριτική ανάλυση των 2 αλληλουχιών του *L. esculentum* με άλλα αντίστοιχα γονίδια, προέκυψε ότι το *tomPRO1* παρουσιάζει ομοιότητες με το *P5CS* των προκαρυωτικών οργανισμών, ενώ το *tomPRO2* με γονίδια *P5CS* ευκαρυωτικών οργανισμών. Επιπλέον, σε συνθήκες αλατότητας, τα επίπεδα mRNA του *tomPRO2* ήταν πάνω από 3 φορές υψηλότερα σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ του *tomPRO1* δεν ανιχνεύθηκαν στις ανωτέρω συνθήκες. Οι Fujita et al (1998) έδειξαν ότι η μεταγραφική ρύθμιση των 2 γονιδίων δεν είναι σημαντική για τη βιοσύνθεση της προλίνης. Παρόμοιες διαφοροποιήσεις στη βιοχημική λειτουργία

και των 2 ισότυπων του *P5CS* παρατηρήθηκαν και στο φυτό *M. sativa* (Ginzberg et al 1998).

Ακολούθως, 2 ισότυποι του P5CS στο φυτό M. truncatula, έδειξαν έκφραση σε μεταγραφικό επίπεδο, η οποία διέφερε ως προς τα υπό μελέτη φυτικά όργανα σε συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης (αλατότητας) (Armengaud et al 2004). Το MtP5CS1 χαρακτηρίζεται ως ένα γονίδιο σταθερής έκφρασης, ενώ το MtP5CS2 είναι σημαντικό για την βιοσύνθεση της προλίνης στα φύλλα σε συνθήκες αλατότητας. Σε φυτά B. napus και οι 2 ισότυποι BnP5CS1 και BnP5CS2 εκφράζονται σε συνθήκες αλατότητας και μετά από εφαρμογή ABA, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του BnP5CS1 ήταν υψηλότερα από του BnP5CS2 (Xue et al 2008). Σε φυτάρια P. vulgaris, που καταπονήθηκαν σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους παρατηρήθηκε έκφραση των γονιδίων PvP5CS1 και PvP5CS2, η οποία σχετίστηκε με τα επίπεδα της προλίνης (Chen et al 2008, 2009). Σε φυτάρια Sorghum bicolor τα γονίδια P5CS1 και P5CS2 εκφράστηκαν σε συνθήκες αλατότητας στη ρίζα και το υπέργειο τμήμα των φυταρίων, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του SbP5CS1 είναι υψηλότερα από του SbP5CS2 και η συγκέντρωση της προλίνης σχετίζεται με την έκφραση των γονιδίων (Sua et al 2011). Αντίθετα, σε φυτά H. tuberosus αναφέρεται ότι το γονίδιο HtP5CS2 παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από το *HtP5CS1* σε συνθήκες αλατότητας(Huang et al 2013). Γίνεται λοιπόν σαφές από τη βιβλιογραφία, ότι η ρύθμιση των μεταγραφημάτων του P5CS ποικίλει από το ένα φυτικό είδος στο άλλο.

Πρόσφατα, έχει αναφερθεί η απομόνωση ενός κλώνου που κωδικοποιεί για το *P5CS* στα φυτά *Opuntia streptacantha* (Silva Ortega et al 2008) και *H. vulgare* (Abu-Romman et al 2011) σε συνθήκες αλατότητας, στα φυτά *Jatropha curcas* (Zhuang et al 2011) και *Festuca arundinacea* (Martin et al 2012) σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους, στα φυτά *Capsicum annuum* (Patade et al 2012) και *S. Iycopersicum* (Patade et al 2013) σε συνθήκες ψύχους.

Αξίζει να αναφερθεί ότι πειράματα υπερέκφρασης της συνθετάσης του P5C αύξησαν την ανθεκτικότητα των διαγονιδιακών φυτών καπνού (Hmida-Sayari et al 2005), ρυζιού (Anoop and Gupta 2003, Su and Wu 2004), πετούνιας (Yamada et al 2005) και μαλακού σιταριού (Vendruscolo et al 2007) σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, ως αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων της προλίνης.

Ρεδουκτάση του δ¹-πυρολινο-5–καρβοξυλικό ή Αναγωγάση του δ¹-πυρολινο-5–καρβοξυλικό (*P5CR*)

Το γονίδιο *P5CR* ήταν το πρώτο που κλωνοποιήθηκε από το μονοπάτι της προλίνης στο φυτό *G. max* (Delauney and Verma 1990). Πρόκειται για γονίδιο 1.2 kb, που κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 29 kDa που η αμινοξική του αλληλουχία παρουσιάζει 39% ομολογία με την αλληλουχία της βακτηριακής P5CR. Γενωματική ανάλυση έδειξε ότι υπάρχουν 2-3 αντίγραφα του *P5CR* στο γένωμα της *G. max.*

Στη συνέχεια κλώνοι του γονιδίου απομονώθηκαν και από άλλα φυτά, όπως από το *P. sativum* (Williamson and Slocum 1992), από το *A. thaliana* (Verbruggen et al 1993) και το *Actinidia deliciosa* (Walton et al 1998) και *S. oleracea* (Murahama et al 2001). Το γονίδιο *AtP5CR* αποτελείται από 2.6 kb και η αλληλουχία αυτή περιέχει ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο 28.6 kDa (276 αμινοξέων). Τόσο τα μεταγραφήματα του γονιδίου, όσο και η δραστηριότητα του ενζύμου αναφέρθηκαν ότι αυξήθηκαν σε συνθήκες καταπόνησης στο φυτό *Arabidopsis* (Verbruggen et al 1993). Ομοίως, οι Hua et al (1997), ανέφεραν υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AtP5CR*, στο φυτό *Arabidopsis*, στο κορυφαίο μερίστωμα, στη ρίζα και στα σπέρματα.

Ωστόσο είναι υπό αμφισβήτηση εάν η αναγωγάση του P5C είναι σημαντική στη βιοσύνθεση της προλίνης σε συνθήκες καταπόνησης, διότι υπερέκφρασή της δεν είχε επίδραση στα επίπεδα προλίνης, παρόλο που αυξήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου, σε διαγονιδιακά φυτά *Ν. tabacum* (LaRosa et al 1991) και *G. max* (De Ronde et al 2000).

δ-Αμινοτρανσφεράση της Ορνιθίνης (δ-ΟΑΤ)

προαναφέρθηκε, Όπως στα φυτά ŋ βιοσύνθεση της προλίνης πραγματοποιείται όχι μόνο από το γλουταμινικό οξύ αλλά και από την αργινίνη/ορνιθίνη. Η αργινίνη μετατρέπεται σε ορνιθίνη μέσω της δράσης του ενζύμου αργινάση. Οι Delauney et al 1993 απομόνωσαν ένα cDNA κλώνο που κωδικοποιεί για την δ-ΟΑΤ στο φυτό V. aconitifolia. Πρόκειται για ένα κλώνο 1559 βάσεων που κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο 48.1 kDa. Ευθυγράμμιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του VaOAT με άλλες γνωστές χαρακτηρισμένες OAT επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του γονιδίου στη V. aconitifolia και έδειξαν ότι το γονίδιο VaOAT παρουσιάζει υψηλή ομολογία με τις δ-OAT από τον άνθρωπο και τις ζύμες καθώς και με τις ω-αμινοτρανσφεράσες από βακτήρια και μύκητες. Οι ανωτέρω ερευνητές μελέτησαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων VaOAT και VaP5CS σε συνθήκες αλατότητας και έλλειψης αζώτου. Οι ανωτέρω συνθήκες είχαν ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του VaP5CS, αλλά και την ελάττωση των επιπέδων έκφρασης του VaOAT. Αντιθέτως, όταν στα φυτά χορηγήθηκε άζωτο τα επίπεδα mRNA του γονιδίου VaOAT αυξήθηκαν. Τα αποτελέσματα, δηλαδή της εργασίας αυτής, υπέδειξαν ότι το μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης από το

γλουταμινικό οξύ είναι κυρίαρχο σε συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης, ενώ το μονοπάτι της ορνιθίνης είναι λειτουργικό σε συνθήκες περίσσιας αζώτου.

Στη συνέχεια οι Roosens et al (1998), απομόνωσαν ένα δ-OAT cDNA κλώνο από το φυτό *A. thaliana* και μελετήθηκε η έκφρασή του σε συνθήκες αλατότητας. Παρατηρήθηκε, λοιπόν, ότι σε συνθήκες αλατότητας η έκφραση των γονιδίων δ-OAT και *P5CS*, η δραστηριότητα του ενζύμου δ-OAT καθώς και τα επίπεδα προλίνης ήταν υψηλότερα σε νεαρά φυτάρια από ότι σε μεγαλύτερης ηλικίας φυτά. Σε αντίθεση, δηλαδή, με τα αποτελέσματα της εργασίας στο φυτό *V. aconitifolia*, σε νεαρά φυτάρια *A. thaliana* και τα 2 μονοπάτια τόσο από την ορνιθίνη όσο και από το γλουταμινικό οξύ φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση της προλίνης, σε συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης. Ομοίως, οι Armengaud et al (2004), υποστήριξαν τη λειτουργικότητα και των 2 μονοπατιών βιοσύνθεσης της προλίνης σε συνθήκες αλατότητας, ανεξαρτήτως ηλικίας και σταδίου ανάπτυξης των φυτών *M. truncatula*. Οι Huang et al 2013, ανέφεραν τη λειτουργικότητα του μονοπατιού της ορνιθίνης σε φυτά *H. elianthus tuberosus* σε συνθήκες αλατότητας, ωστόσο ανέφεραν ότι μονοπάτι του γλουταμινικού οξέος έχει κυρίαρχο ρόλο στη βιοσύνθεσης της προλίνης.

Επιπλέον, πειράματα υπερέκφρασης της δ-OAT αύξησαν την ανθεκτικότητα των διαγονιδιακών φυτών καπνού (Roosens et al 2002) και ρυζιού (Wu et al 2003, Qu et al 2005) σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης και βελτίωσαν την παραγωγικότητα των καλλιεργειών, ως αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων της προλίνης.

Ωστόσο, ο ρόλος του δ-OAT, όσον αφορά στη βιοσύνθεση της προλίνης σε συνθήκες καταπόνησης δεν είναι ξεκάθαρος και χρήζει περαιτέρω έρευνας, διότι οι Funk et al (2008) αναφέρουν ότι τα επίπεδα προλίνης δεν επηρεάστηκαν σε μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana* στο γονίδιο OAT (knockout mutants). Οι παραπάνω ερευνητές πρότειναν ότι το ένζυμο δ-OAT δε συμμετέχει στη βιοσύνθεση της προλίνης σε φυτά *Arabidopsis* σε συνθήκες αλατότητας. Ενώ, ενδιαφέρον παρουσιάζει η εργασία των You et al (2012), οι οποίοι παρατήρησαν ότι υπερέκφραση του Osδ-OAT στο ρύζι οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου δ-OAT και συσσώρευση προλίνης σε συνθήκες υψηλής αλατότητας.

56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΣΚΛΗΡΟΥ ΣΙΤΟΥ, RUSTICANO KAI GRAZIA, ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΨΥΧΟΥΣ

2.1 Σκοπός της Έρευνας

Έχει διαπιστωθεί ότι αν και τα φυτά σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους παρουσιάζουν ευαισθησία στην αλατότητα, το στάδιο ανάπτυξης των φυτών σε επίπεδο φυταρίου (seedling stage) θεωρείται το πιο ευαίσθητο στα περισσότερα φυτικά είδη (Munns et al 2002). Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι καλλιεργούμενα φυτά, που ανταποκρίνονται στην αλατότητα σ΄ αυτό το στάδιο ανάπτυξης θα ανταποκριθούν με επιτυχία στη συγκεκριμένη καταπόνηση και στα επερχόμενα στάδια ανάπτυξης και θα δώσουν καλή παραγωγή (Ahmadi et al 2006).

Οι Kingsbury et al (1984) αναφέρουν ότι η συγκέντρωση των 100 mM NaCl, μετά από 7 ημέρες εφαρμογής της στο ριζικό διάλυμα φυταρίων 2 ποικιλιών μαλακού σίτου, προκάλεσε διαφοροποίηση ως προς την ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος ανάμεσα στις ποικιλίες, ενώ η συγκέντρωση των 250 mM NaCl μείωσε σημαντικά την παραγωγή ποικιλιών μαλακού σιταριού στον αγρό (Maas and Hoffman 1977). Επειδή το σκληρό σιτάρι (*T. turgidum var. durum*) είναι πιο ευαίσθητο στην αλατότητα από το μαλακό (*T. aestinum*) (Salinity Tolerance Database on USDA-ARS 2005) η συγκεκριμένη εργασία εστιάστηκε στην ανάπτυξη φυταρίων σκληρού σίτου, των ποικιλιών Rusticano και Grazia, σε συνθήκες διαφορετικών συγκεντρώσεων άλατος για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Εκτός από την καταπόνηση αλατότητας στην παρούσα εργασία μελετήθηκε και ένας δεύτερος παράγοντας καταπόνησης, το ψύχος, όπου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Levitt 1980, Pollock and Eagles 1988) προκαλεί μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης των φυτών που ενδημούν σε θερμά κλίματα, καθώς και πρόσκαιρες ή και μόνιμες επιδράσεις σε όλα τα επίπεδα φυσιολογικής λειτουργίας των φυτών. Ωστόσο, το μαλακό σιτάρι όπως και αρκετά αγρωστώδη που καλλιεργούνται στην Εύκρατη ζώνη έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο ψύχος και κατ' επέκταση στον παγετό (Fowler and Gusta 1979, Monroy et al 2007). Η ικανότητα των φυτών αυτών ν' ανταπεξέρχονται σε θερμοκρασίες κάτω των 0°C προκύπτει από τη βαθμιαία έκθεσή τους κατά τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου σε χαμηλές θερμοκρασίες, δηλαδή λίγο πάνω από τους 0°C, προκειμένου να αποκτήσουν ανθεκτικότητα σε συνθήκες παγετού. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως σκληραγώγηση και έχει ως αποτέλεσμα την αντιμετώπιση της καταπόνησης από την πλευρά των φυτών και κατά συνέπεια τον εγκλιματισμό τους σε θερμοκρασίες κάτω των 0°C. Σύμφωνα με τους Sung and Amasino (2005), 1 ή 2 ημέρες χαμηλών θερμοκρασιών είναι συχνά ικανές να προκαλέσουν σκληραγώγηση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης ψύχους. Οι Koike et al (2002) αναφέρουν εγκλιματισμό φυταρίων μαλακού σιταριού στους 4°C σε διάστημα 14 ημερών, ενώ οι Zhu et al (2005) εγκλιματισμό φυτών *A. thaliana* στους 4°C σε διάστημα 8 ημερών.

Στο Κεφάλαιο αυτό αναλύεται η μεθοδολογία και τα αποτελέσματασυμπεράσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας νεαρών φυταρίων των ποικιλιών σκληρού σίτου Rusticano και Grazia σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl, για διάστημα 5 ημερών) και ψύχους (4^oC, για διάστημα 11 ημερών).

2.2 Υλικά & Μέθοδοι

2.2.1 Βλάστηση και Καλλιέργεια με Υδροπονικό Σύστημα Φυταρίων Rusticano και Grazia

Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι των ποικιλιών Rusticano και Grazia, που ήταν μια ευγενική προσφορά της Εταιρίας «Αγροτικός Οίκος ΣΠΥΡΟΥ». Οι σπόροι της ποικιλίας Rusticano απολυμάνθηκαν με εμβάπτισή τους σε διάλυμα 2% υποχλωριώδους νατρίου για 20 λεπτά, στη συνέχεια το διάλυμα αφαιρέθηκε και οι σπόροι ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Οι σπόροι της ποικιλίας Grazia ήταν επενδεδυμένοι από την εταιρία με μίγμα δύο μυκητοκτόνων και ενός εντομοκτόνου γι' αυτό ξεπλύθηκαν μόνο με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια οι σπόροι και των 2 ποικιλιών τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν νωπό διηθητικό χαρτί και παρέμειναν για προφύτρωση σε σκοτεινό θάλαμο εντός πλαστικών δοχείων σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας και θερμοκρασίας.

Για την καταπόνηση των νεαρών φυταρίων, και των 2 ποικιλιών Rusticano και Grazia, σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους, χρησιμοποιήθηκαν 6 και 4 πλαστικά δοχεία αντίστοιχα, χωρητικότητας 3,5 L το καθένα στα οποία εφαρμόστηκαν αντλίες οξυγόνου. Για την περίπτωση της αλατότητας, τα πλαστικά δοχεία ανά δύο περιείχαν διάλυμα με διαφορετική συγκέντρωση άλατος δηλαδή 0 (μάρτυρας), 100 και 200 mM NaCl και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θαλάμους ανάπτυξης με θερμοκρασία 22°C, φωτοπεριόδο 16 ώρες φώς/8 ώρες σκοτάδι και πυκνότητα ροής φωτονίων φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας 90μmolm-²s-¹.

Για το πείραμα της καταπόνησης των φυτών στο ψύχος τα 2 πλαστικά δοχεία, που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στον οποίο επικρατούσε θερμοκρασία 22°C ενώ τα υπόλοιπα 2 μεταφέρθηκαν σε ψυχόμενο θάλαμο με θερμοκρασία 4°C. Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε στις 16 ώρες φώς/8 ώρες σκοτάδι και η πυκνότητα ροής φωτονίων φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας στα 90μmolm-²s-¹.

Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και για τις 2 κατηγορίες πειραμάτων στο υπόγειο (ριζικό σύστημα) και το υπέργειο τμήμα (βλαστός) μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες και για την περίπτωση του ψύχους επιπλέον μετά 6 ώρες παραμονής των φυταρίων και των 2 ποικιλιών στις ανωτέρω συνθήκες. Τα υπόγεια και υπέργεια τμήματα και των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου που επιλέχθηκαν τοποθετήθηκαν αμέσως σε πλαστικούς σωλήνες που περιείχαν υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Στο πείραμα της αλατότητας, σε κάθε δειγματοληψία (μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες) συλλέχθηκαν 5 φυτάρια για κάθε χειρισμό (στα 0, 100, 200 mM NaCl). Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις οπότε συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 180 φυτάρια από κάθε ποικιλία. Επίσης για την περίπτωση του ψύχους, σε κάθε δειγματοληψία (μετά από 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες) συλλέχθηκαν 5 φυτάρια για κάθε χειρισμό (στους 22 και 4^oC). Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις και συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 150 φυτάρια από κάθε ποικιλία.

2.2.2 Μετρήσεις Μορφολογικών Παραμέτρων των Φυταρίων Σκληρού Σίτου

Για την αξιολόγηση των μορφολογικών παραμέτρων των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia, σε συνθήκες αλατότητας πραγματοποιήθηκαν 4 δειγματοληψίες για τη μέτρηση του μήκους του ριζικού συστήματος και του υπέργειου τμήματος των φυταρίων, (μετά από 1, 2, 3, 5 ημέρες παραμονής των φυταρίων στα 0, 100 και 200 mM NaCl) και 1 δειγματοληψία την τελευταία ημέρα (5η) για τον υπολογισμό του ξηρού βάρους των ανωτέρω τμημάτων. Ενώ για την αξιολόγηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ποικιλιών Rusticano και Grazia σε συνθήκες ψύχους πραγματοποιήθηκαν 6 δειγματοληψίες για τη μέτρηση του μήκους του υπέργειου υπέργειου τμήματος και του ριζικού συστήματος των ανωτέρω τμημάτων. Ενώ για την αξιολόγηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ποικιλιών Rusticano και Grazia σε συνθήκες ψύχους πραγματοποιήθηκαν 6 δειγματοληψίες για τη μέτρηση του μήκους του υπέργειου τμήματος και του ριζικού συστήματος των φυταρίων, (μετά από 1, 3, 5, 7, 9 και 11 ημέρες παραμονής των φυτών στους 22°C και 4°C) και 4 δειγματοληψίες (μετά από 1, 5, 7 και 11 ημέρες), για τη μέτρηση του ξηρού βάρους των ανωτέρω τμημάτων.

Υπολογίστηκε το μήκος του ριζικού συστήματος και του υπέργειου τμήματος των φυτών και των 2 ποικιλιών σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους, τις χρονικές στιγμές που προαναφέρθηκαν, εκφράστηκε σε cm και στη συνέχεια σε ποσοστό (%) σε σχέση με το μάρτυρα. Συγκεκριμένα, από την κάθε ποικιλία σκληρού σίτου συλλέχθηκαν 10 δείγματα για κάθε συγκέντρωση άλατος (μετά από 1, 2, 3 και 5 ημέρες) και άλλα 10 δείγματα για κάθε θερμοκρασία (μετά από 1, 3, 5, 7, 9 και 11 ημέρες). Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις και συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 720 φυτάρια από κάθε ποικιλία.

Για την περίπτωση του ξηρού βάρους, απομακρύνθηκε το νερό που είχε απομείνει στο ριζικό σύστημα των φυταρίων με απορροφητικό χαρτί, έτσι ώστε να μην υπάρχει υδατικό φορτίο στα δείγματα και ξεχωρίστηκαν τα μελετώμενα μέρη του φυτού, δηλαδή το ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα των φυταρίων. Για την καταγραφή του ξηρού βάρους, τα δείγματα παρέμειναν για 3 ημέρες σε κλίβανο στους 75°C ώστε να ξηρανθούν μέχρι σταθερού βάρους και ακολούθησε εκτίμηση του βάρους τους με ζυγαριά ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων (Sartorius BA61). Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις των 5 δειγμάτων για κάθε χειρισμό. Δηλαδή, για κάθε ποικιλία σκληρού σίτου συλλέχθηκαν την 5η ημέρα 5 δείγματα ανά συγκέντρωση άλατος και άλλα 2 δείγματα για κάθε θερμοκρασία μετά από 1, 5, 7 και 11 ημέρες. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 165 φυτάρια από την κάθε ποικιλία.

2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

2.3.1 Μήκος του Ριζικού Συστήματος και του Υπέργειου Τμήματος των Φυταρίων Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Αλατότητας



Από την παραμονή για 5 ημέρες των φυτών σίτου των ποικιλιών, Rusticano και Grazia, σε διαλύματα άλατος 0, 100, 200 mM NaCl, διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην ανάπτυξή τους (Εικ. 2.3.2, 2.3.3, 2.3.5, 2.3.6) και εμφανή συμπτώματα, όπως μάρανση και επάκρια ξήρανση, στα νεαρά φυτάρια μετά από 5 ημέρες παραμονής στην υψηλότερη συγκέντρωση άλατος (200 mM NaCl), Εικόνα 2.3.1. Η ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, όπως φαίνεται στις Εικόνες 2.3.2

και 2.3.3 διαφοροποιείται και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος (100 και 200 mM NaCl), σε σχέση με το μάρτυρα (0 mM NaCl) και τις 5 ημέρες παραμονής των φυταρίων σε συνθήκες καταπόνησης. Το μήκος του ριζικού συστήματος στην ποικιλία Rusticano φαίνεται να επηρεάζεται ελάχιστα τις 3 πρώτες ημέρες τόσο στα 100 όσο και στα 200mM NaCl, ενώ την 5^η ημέρα μειώνεται, απότομα, κατά 28% στα 100 mM NaCl και κατά 30% στα 200 mM NaCl σε σύγκριση με το μάρτυρα. Αντίθετα με την ποικιλία Rusticano, στην Grazia το μήκος του ριζικού συστήματος παρουσιάζει μια ομαλή μείωση καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος φτάνοντας την 5^η ημέρα η μείωση σε σχέση με το μάρτυρα το 44% στα 100 mM NaCl και το 49% στα 200 mM NaCl.



Εικόνα 2.3.2 Επίδραση της αλατότητας στο μήκος του ριζικού συστήματος των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 1, 2, 3, 5 ημέρες παραμονής στα 100 mM NaCl. Το μήκος του ριζικού συστήματος των φυταρίων έχει εκφραστεί σε ποσοστό % σε σχέση με το μάρτυρα. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με το t-test.





Όσον αφορά το υπέργειο τμήμα των πειραματικών φυτών, όπως προκύπτει από τα Εικόνες 2.3.5 και 2.3.6, η ανάπτυξή του παρεμποδίστηκε περισσότερο από αυτή του ριζικού συστήματος και στις 2 ποικιλίες σίτου κατά την παραμονή τους στις 2 συγκεντρώσεις άλατος. Έτσι παρουσιάζεται προοδευτική μείωση στο μήκος του υπέργειου τμήματος και των 2 ερευνώμενων ποικιλιών σκληρού σίτου από την 1^η μέχρι και την 5^η ημέρα. Οι τιμές στο μήκος του βλαστού των ποικιλιών Rusticano και Grazia διαφέρουν στατιστικά σε όλες τις περιπτώσεις παραμονής των φυταρίων τόσο στα 100 όσο και στα 200 mM NaCI.



Γενικότερα, το υπέργειο τμήμα των φυτών παρουσίασε μικρότερη ανάπτυξη στην ποικιλία Grazia σε σχέση με την ποικιλία Rusticano και η ανάπτυξη αυτή διαπιστώθηκε ότι είναι μικρότερη στην υψηλότερη συγκέντρωση άλατος (Εικ. 2.3.4). Την 5^η ημέρα η καταπόνηση των φυταρίων σε 100 mM NaCl προκάλεσε μείωση κατά 48 και 68% στο μήκος του βλαστού στις ποικιλίες Rusticano

και Grazia αντίστοιχα, ενώ στη συγκέντρωση των 200 mM NaCl παρατηρήθηκε μείωση κατά 77% στην Grazia και 60% στην ποικιλία Rusticano.







Εικόνα 2.3.6 Επίδραση της αλατότητας στο μήκος του υπέργειου τμήματος των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 1, 2, 3, 5 ημέρες παραμονής στα 200 mM NaCl. Το μήκος υπέργειου των φυταρίων έχει εκφραστεί σε ποσοστό % σε σχέση με το μάρτυρα. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με το t-test.

Όπως ήδη αναφέρθηκε και οι 2 συγκεντρώσεις άλατος στο υδατικό διάλυμα προκάλεσαν μείωση στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και του υπέργειου τμήματος στα φυτάρια και των 2 ποικιλιών, Rusticano και Grazia, σε σχέση με το μάρτυρα. Ωστόσο, η ανάπτυξη του βλαστού και στις 2 ποικιλίες επηρεάστηκε περισσότερο από αυτή του ριζικού συστήματος. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο ρύζι από τους Zerihum et al (2000), στο βαμβάκι από τους Meloni et al (2001) και Jiang et al (2006), στο κεχρί από τους Veeranagamallaiah et al (2007), και στο μαλακό σιτάρι από τους Shahzad et al (2012).

Σύμφωνα με τους Munns et al (2006) η παρουσία αλάτων στο περιβάλλον του ριζικού συστήματος δημιουργεί χαμηλό υδατικό δυναμικό (οσμωτική καταπόνηση) με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται στις συνθήκες αυτές η πρόσληψη νερού και άλλων θρεπτικών συστατικών από την περιοχή της ριζόσφαιρας. Παρόλο όμως που η ρίζα, είναι το πιο ευάλωτο τμήμα του φυτού καθώς βρίσκεται σε άμεση επαφή με υδατικό διάλυμα άλατος υψηλής συγκέντρωσης, έχει την ικανότητα ν' αναπτύσσεται ταχύτερα από το βλαστό. Ως εκ τούτου, σε συνθήκες υδατικήςωσμωτικής καταπόνησης δίδεται προτεραιότητα στην ανάπτυξη του οργάνου το οποίο είναι υπεύθυνο για την άντληση νερού, δηλαδή στη ρίζα, με τελικό αποτέλεσμα αυτή ν' αναπτύσσεται προς βαθύτερα στρώματα. Επιπλέον, η ελάπωση στην ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος σε σχέση με τη ρίζα πιθανόν να οφείλεται σε ορμονικά σήματα που παράγονται στη ρίζα και κατευθύνονται προς το βλαστό (Munns 2002).

2.3.2. Ξηρή Μάζα των Φυταρίων Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Αλατότητας

Η διερεύνηση της ξηρής μάζας των πειραματικών φυταρίων αποτελεί μία από τις παραμέτρους που σχετίζονται με την ανθεκτικότητά τους στην αλατότητα και η οποία μπορεί να ληφθεί και ως κριτήριο για την αξιολόγηση των ποικιλιών σχετικά με την ανταπόκρισή τους σε αντίξοα από άποψη αλατότητας περιβάλλοντα (Ashraf et al 1986 και 1989).

Στον Πίνακα 2.3.1 παρουσιάζεται η ξηρή μάζα του ριζικού συστήματος και του υπέργειου τμήματος των φυταρίων σκληρού σίτου και των 2 ποικιλιών (Rusticano και Grazia) την τελευταία ημέρα (5^η) καταπόνησής τους σε διάλυμα συγκεντρώσεων 100 και 200 mM NaCl. Από τον Πίνακα αυτό φαίνεται ότι η ξηρή μάζα του ριζικού συστήματος διαφοροποιείται ανά ποικιλία και συγκέντρωση άλατος. Αναλυτικότερα, η ελάττωση της ξηρής μάζας στην ποικιλία Rusticano ανέρχεται στο 20% και 26% σε σχέση με το μάρτυρα στα 100 και 200 mM NaCl αντίστοιχα, ενώ στην ποικιλία Grazia, η μείωση στην ξηρή μάζα του ριζικού συστήματος κυμαίνεται περίπου στα

ίδια επίπεδα και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος δηλαδή από 54-59% και η μείωση αυτή φαίνεται να είναι σχεδόν διπλάσια από την αντίστοιχη της Rusticano και στις 2 συγκεντρώσεις.

Πίνακας 2.3.1 Επίδραση της αλατότητας στο ξηρό βάρος του ριζικού συστήματος (R), του υπέργειου τμήματος (S) και στο λόγο ξηρή μάζα ριζικού συστήματος προς υπέργειο τμήμα (R/S) των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου. Οι ποικιλίες παρέμειναν σε 100 και 200 mM NaCl, για 5 ημέρες και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό (%) σε σχέση με το μάρτυρα (0 mM NaCl). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05).

Συγκέντρωση άλατος (mM)	Ποικιλία	Ξηρή μάζα (%) ριζικού συστήματος (R)	Ξηρή μάζα (%) υπέργειου (S)	R/S
100	Rusticano	80,33±0,055 a	72,29±0,011 a	1,11±0,007 a
	Grazia	44,56±0,033 b	44,08±0,050 b	1,01±0,004 b
200	Rusticano	73,63±0,1 a	48,13±0,050 a	1,53±0,02 a
	Grazia	41,24±0,019 b	30,9±0,018 b	1,33±0,018 b

Παρόμοια δεδομένα προέκυψαν και για το υπέργειο τμήμα των φυταρίων και των 2 ποικιλιών την 5^η ημέρα καταπόνησης με αλάτι, με τη διαφορά ότι η ξηρή μάζα του υπέργειου τμήματος των φυταρίων ελαττώνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από αυτή του ριζικού συστήματος. Συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση των 200 mM NaCl, η ελάττωση της ξηρής μάζας του υπέργειου τμήματος, σε σχέση με το μάρτυρα, ανέρχεται στο 52% και 69% για την Rusticano και την Grazia αντίστοιχα. Η αλατότητα, δηλαδή, επηρέασε όχι μόνο το μήκος των φυταρίων των 2 ποικιλιών (Ενότητα 2.3.1), αλλά και το ξηρό τους βάρος, το οποίο αποτελεί συχνά δείκτη ανθεκτικότητας στην καταπόνηση με αλάτι σε ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (Maas 1986, Meneguzzo et al 2000).

Μία επιπλέον παράμετρος, η οποία έχει ιδιαίτερη σημασία στην ανθεκτικότητα των πειραματικών φυτών στην αλατότητα, είναι ο λόγος ξηρής μάζας του ριζικού συστήματος προς τη ξηρή μάζα του βλαστού. Έχει διαπιστωθεί ότι μεγάλες αριθμητικές τιμές του λόγου αυτού πιθανόν να σχετίζονται με τη προσαρμογή των φυτών στην αλατότητα, με αποτέλεσμα την καλύτερη απορρόφηση νερού σε συνθήκες καταπόνησης με αλάτι (Gorham et al 1999). Άλλοι συγγραφείς αναφέρουν ότι υψηλός λόγος ριζιζικού συστήματος προς υπέργειο τμήμα αποτελεί δείκτη ανθεκτικότητας των ποικιλιών στην καταπόνηση και συνεπώς είναι ένας καλός μορφο-φυσιολογικός χαρακτήρας ανθεκτικότητας σε συνθήκες καταπόνησης (Alberico και Cramer 1993). Από την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων προέκυψε ότι η ποικιλία Rusticano εμφανίζει μεγαλύτερο λόγο ξηρής μάζας ριζικού συστήματος προς ξηρή μάζα υπέργειου τμήματος από ότι η ποικιλία Grazia, και μάλιστα ο λόγος αυτός μεγαλώνει καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση άλατος από τα 100 στα 200 mM NaCl. Διαπιστώθηκε δηλαδή, ότι ο παραπάνω λόγος παρουσίασε θετική συσχέτιση με την αύξηση της συγκέντρωσης άλατος από τα 100 στα 200 mM NaCl και στις 2 ποικιλίες (Rusticano r=0,908325-Grazia r=0,905218, *P=0,05*). Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Mulholland et al (2003), οι οποίοι πειραματίστηκαν με φυτάρια τομάτας. Στην περίπτωση αυτή διαπιστώθηκε επίσης θετική συσχέτιση μεταξύ του λόγου ξηρής μάζας ριζικού συστήματος προς ξηρή μάζα υπέργειου τμήματος και της συγκέντρωσης άλατος.

Όσον αφορά στη σχέση η οποία πιθανόν να υπάρχει μεταξύ της αντοχής των φυτών στην αλατότητα και της αντίστοιχης στην ξηρασία επικρατούν αντικρουόμενες απόψεις. Δηλαδή οι Simane et al (1993) υποστηρίζουν ότι εύρωστη ρίζα και υψηλός λόγος ριζικού συστήματος προς υπέργειο τμήμα πιθανόν να σχετίζεται με ανθεκτικότητα φυτών σκληρού σίτου στην ξηρασία. Λαμβάνοντας δε υπόψη ότι η ποικιλία Rusticano είναι ανθεκτική στην ξηρασία, και η Grazia μετρίως ευαίσθητη, (http://www.agroservicespa.it) και ότι τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι η πρώτη είναι ανθεκτικότερη της δεύτερης σε συνθήκες αλατότητας είναι δυνατόν να υποθέσει κανείς ότι πρέπει να υπάρχει συσχέτιση για την περίπτωση του σκληρού σίτου μεταξύ των μηχανισμών που συμμετέχουν στην αλατότητα και στην ξηρασία. Αυτό όμως απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση διότι, οι Almansouri et al (1999) αναφέρουν ότι η παρεμπόδιση στην ανάπτυξη φυταρίων σε συνθήκες αλατότητας ήταν πολύ μεγαλύτερη στην ανθεκτική στην ξηρασία ποικιλία, υποστηρίζοντας ότι η ανθεκτικότητα στην ξηρασία και στην αλατότητα δεν συνδέονται απαραίτητα στην περίπτωση του σκληρού σίτου.

2.3.3 Μήκος του Ριζικού Συστήματος και του Υπέργειου Τμήματος των Φυταρίων Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Ψύχους

Επιχειρώντας τη σκληραγώγησή των ποικιλιών Rusticano και Grazia, οι οποίες γενικά είναι ανθεκτικές στο ψύχος (<u>http://www.agroservicespa.it</u>), για χρονικό διάστημα 11 ημερών προέκυψαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Όταν τα φυτάρια εκτέθηκαν στους 4°C, σε θερμοκρασία δηλαδή χαμηλότερη από τη βέλτιστη (θερμοκρασία ανάπτυξης φυτών μάρτυρα 22°C) η αξιολόγηση των μορφολογικών τους παραμέτρων έδειξε από την πρώτη ημέρα μέχρι και την 5η ότι παρεμποδίστηκε η ανάπτυξή τους, αλλά στην πορεία και μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος τα φυτάρια αντέδρασαν στην καταπόνηση ψύχους και συνεχίστηκε η ανάπτυξή τους.



Παρά ταύτα τα φυτάρια και 2 ποικιλιών των που εκτέθηκαν 4°C στους παρουσίασαν μειωμένη δυνατότητα έκπτυξης του 1° φύλλου, Εικόνα 2.3.7. Από την αξιολόγηση της μεταβολής του μήκους του ριζικού συστήματος και του υπέργειου τμήματος των πειραματικών φυταρίων

διαπιστώθηκε ότι το μήκος του ριζικού συστήματος στην ποικιλία Rusticano (Εικ. 2.3.8) μειώνεται ελάχιστα τις πρώτες 3 ημέρες (1^η ημέρα 0,5%, 3^η ημέρα 4,5%) παραμονής των φυταρίων σε συνθήκες ψύχους σε σχέση με το μάρτυρα, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και σε συνθήκες αλατότητας. Την 5^η ημέρα διαπιστώθηκε μια σχετικά απότομη μείωση στο μήκος του ριζικού συστήματος των φυταρίων της Rusticano, που φτάνει το 22,5% σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ από την 7^η ημέρα το μήκος μειώνεται σταθερά και φτάνει το 45,5% την 11^η ημέρα. Αντίθετα με την ποικιλία Rusticano, η Grazia παρουσιάζει μια πιο σταθερή πορεία στη μείωση του μήκος του ριζικού συστήματος των φυταρίων τας φυταρίων της που ξεκινάει από το 23,5% την 1^η ημέρα και φτάνει το 55,5% την 11^η ημέρα.

Ανάλογη συμπεριφορά ως προς τη μείωση του μήκους του ριζικού συστήματος φυταρίων που εκτίθενται σε χαμηλές θερμοκρασίες συναντάται και σε φυτάρια μαλακού σιταριού, μετά από 14 ημέρες παραμονής τους στους 3°C (Akladious 2012). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15°C παρεμποδίζουν και καθυστερούν την ανάπτυξη των φυτών (Sharifi 2010).





Το μήκος του υπέργειου τμήματος των πειραματικών φυταρίων και των 2 ποικιλιών (Εικ. 2.3.9) παρουσιάζει μια ομαλή μείωση μέχρι την 5^η ημέρα, φτάνοντας το 42% για την ποικιλία Rusticano και το 58% για την ποικιλία Grazia, του μεγέθους των φυτών μαρτύρων. Από την 7^η όμως ημέρα ο ρυθμός αύξησης των φυταρίων που βρίσκονται σε περιβάλλον χαμηλών θερμοκρασιών (4^oC) αυξάνει με αποτέλεσμα την 11^η ημέρα η μείωση στο υπέργειο τμήμα για την Rusticano να έχει φτάσει το 34% σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ για την Grazia το 46%. Δηλαδή παρατηρήθηκε αντιστροφή στο ρυθμό αύξησης του μήκους του υπέργειου τμήματος των φυταρίων και των 2 ποικιλιών (Rusticano και Grazia) μετά την 7^η ημέρα παραμονής τους στους 4^oC.





Ο χρόνος κατά τον οποίο τα φυτάρια αντιστρέφουν το ρυθμό αύξησής τους, όταν βρεθούν σε συνθήκες ψύχους, πρέπει να συναρτάται με την ικανότητα προσαρμογής και εγκλιματισμού τους στο νέο περιβάλλον. Έχει αναφερθεί (Carbero et al 2012) ότι η αύξηση σε σχέση με το μάρτυρα του μήκους του υπέργειου τμήματος του είδους γρασιδιού, *Digitaria eriantha*, παρατηρήθηκε 6 ώρες μετά την παραμονή των φυταρίων σε συνθήκες ψύχους (θερμοκρασία 5°C). Είναι, λοιπόν, πιθανόν ο εγκλιματισμός (σκληραγώγηση) των ποικιλιών στο ψύχος να επιφέρει μεταβολικές τροποποιήσεις, έτσι ώστε η ομοιόσταση σε κυτταρικό επίπεδο να ανταποκρίνεται στις νέες συνθήκες (Καραμπουρνιώτης 2003).

Από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων διαπιστώθηκε ότι το ψύχος προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση στο μήκος τόσο του ριζικού συστήματος όσο και του υπέργειου τμήματος στις 2 ποικιλίες, σε σχέση με το μάρτυρα, όλες τις ημέρες παραμονής των φυταρίων στους 4°C. Μελετώντας τα παραπάνω δεδομένα, ως προς το μήκος του ριζικού συστήματος και του υπέργειου τμήματος των φυταρίων, συμπεραίνεται ότι η ποικιλία Rusticano ανταποκρίνεται καλύτερα στο ψύχος σε σχέση με την ποικιλία Grazia στα πρωταρχικά στάδια ανάπτυξης.

2.3.4. Ξηρή Μάζα των Φυταρίων Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Ψύχους

Σε πολλούς φυτικούς οργανισμούς οι χαμηλές θερμοκρασίες σχετίζονται με αυξημένο λόγο ξηρής μάζας ριζικού συστήματος προς ξηρή μάζα υπέργειου τμήματος (Korner and Lachet 1988, Sharrat 1991, Equiza et al 1997 και 2001). Δεδομένου ότι στο ψύχος μειώνεται αισθητά η αγωγιμότητα των μεμβρανών των ριζών (Kramer 1983, Fennell and Markhart III 1997) μέσω των οποίων μεταφέρονται τα μόρια νερού με επακόλουθο τη διαμόρφωση χαμηλού δυναμικού του νερού (και επομένως υστέρηση νερού) στους φυτικούς ιστούς (Fennell et al 1990), οι μεταβολές στο λόγο ξηρής μάζας ριζικού συστήματος προς υπέργειου τμήματος θεωρούνται ως ένας μηχανισμός ο οποίος βοηθά ώστε να ξεπεραστεί το παρατηρούμενο έλλειμμα νερού (Wilson 1988).

Αναλυτικότερα από τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας εργασίας (Πιν. 2.3.2) διαπιστώθηκε ότι η ξηρή μάζα του ριζικού συστήματος στην ποικιλία Rusticano παρουσιάζει μείωση κατά 34,5% μετά από 5 ημέρες παραμονής των φυταρίων της στους 4°C. Ωστόσο, από την 5^η μέχρι την 11^η ημέρα η ξηρή μάζα του ριζικού συστήματος ακολουθεί αύξουσα πορεία και η ελάττωσή της σε σχέση με το μάρτυρα ανέρχεται στο 30% την 11^η ημέρα. Όσον αφορά στην ελάττωση της ξηρής μάζας του ριζικού συστήματος από την αντίστοιχη της Rusticano και την 5^η ημέρα η μείωση αγγίζει περίπου το 50% σε σχέση με το μάρτυρα. Την 7^η ημέρα η ξηρή μάζα του ριζικού συστήματος παρουσιάζει μια πολύ μικρή ελάττωση σε σχέση με την 5^η ημέρα, που ανέρχεται στο 53%, ενώ από την 7^η έως την 11^η ημέρα παρατηρείται και για την 11^η ημέρα ν' ανέρχεται στο 49% σε σχέση με το μάρτυρα.

Οι τιμές της ξηρής μάζας του υπέργειου τμήματος των φυταρίων και στις 2 ποικιλίες παρουσιάζουν την ίδια διακύμανση με τις αντίστοιχες τιμές του ριζικού συστήματος. Δηλαδή από την 5^η μέχρι την 11^η ημέρα οι τιμές της ξηρής μάζας του υπέργειου τμήματος για την ποικιλία Rusticano βρίσκονται στα ίδια περίπου επίπεδα, με τη ξηρή μάζα να μειώνεται κατά 38% την 11^η ημέρα, ενώ για την Grazia σημειώνεται σχετικά μικρή αύξηση στην ξηρή μάζα του υπέργειου τμήματος από την 7^η μέχρι την 11^η ημέρα. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν όταν φυτάρια σόργου καλλιεργήθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (2, 5 και 8°C) αρχικά για διάστημα 4 ημερών και στη συνέχεια επεκτάθηκε η παραμονή τους σε συνθήκες ψύχους για άλλες 4 ημέρες (Ercoli et al 2004). Σύμφωνα με την εργασία αυτή, τα φυτά σόργου, τις πρώτες 4 ημέρες σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών, παρουσίασαν μεγάλη μείωση στο ξηρό τους βάρος, η οποία αποδόθηκε σε μεταβολική δυσλειτουργία που περιλαμβάνει περιορισμό της δραστηριότητας της φωτοσύνθεσης, ενώ επέκταση παραμονής στο ψύχος μέχρι την 8^η μέρα προκάλεσε αντίδραση των φυτών σόργου στο ψύχος και θετικό ρυθμό ανάπτυξής τους.

Πίνακας 2.3.2 Επίδραση του ψύχους στη ξηρή μάζα του ριζικού συστήματος (R), του υπέργειου (S) και στο λόγο ριζικού συστήματος/υπέργειο (R/S) των 2 ποικιλιών σκληρού σιταριού. Οι ποικιλίες παρέμειναν στους 4°C, για 11 ημέρες και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό μείωσης σε σχέση με το μάρτυρα (22°C). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με το t-test.

Διάρκεια Ψύχους (Ημέρες)	Ποικιλία	Ξηρή μάζα (%) ριζικού συστήματος (R)	Ξηρή μάζα (%) υπέργειου (S)	R/S
1	Rusticano	81,17±0,050 a	77,72±0,029 a	1,04±0,002 a
	Grazia	65,34±0,021 b	65,70±0,007 b	0,99±0,012 b
5	Rusticano	66,41±0,01 a	63,57±0,020 a	1,04±0,004 a
	Grazia	49,64±0,025 b	49,37±0,015 b	1,005±0,008 b
7	Rusticano	68,94±0,062 a	63,07±0,015 a	1,09±0,012 a
	Grazia	47,58±0,013 b	45,24±0,015 b	1,05±0,013 b
11	Rusticano	69,85±0,043 a	62,25±0,015 a	1,12±0,018 a
	Grazia	50,89±0,036 b	47,27±0,022 b	1,08±0,02 b

Επιπλέον όπως προκύπτει από την Εικόνα 2.3.10 ο λόγος ξηρή μάζα ριζικού συστήματος προς ξηρή μάζα υπέργειου παρουσιάζει θετική συσχέτιση με το χρόνο παραμονής των φυταρίων σε συνθήκες ψύχους (Rusticano r=0,701695-Grazia r= 0,646104, *P=0,05*). Για την ποικιλία Rusticano ο λόγος ριζικό σύστημα προς υπέργειο τμήμα παραμένει σταθερός τις πρώτες 5 ημέρες και στη συνέχεια αυξάνεται μέχρι την 11^η ημέρα, ενώ στην ποικιλία Grazia ο λόγος ριζικό σύστημα προς υπέργειο τμήμα αυξάνεται σταθερός τις πρώτες 5 ημέρες και στη συνέχεια αυξάνεται μέχρι την 11^η ημέρα, ενώ στην ποικιλία Grazia ο λόγος ριζικό σύστημα προς υπέργειο τμήμα αυξάνεται σταθερό από την 1^η μέχρι την 11^η ημέρα. Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας έρχονται σε συμφωνία με τους Equiza et al (1997 and 2001), οι οποίοι μελέτησαν ανοιξιάτικες ποικιλίες μαλακού σίτου για διάστημα 40 ημερών σε χαμηλές θερμοκρασίες. Οι ποικιλίες αυτές κατά την παραμονή των φυτών στους 5°C εμφάνισαν αυξημένο λόγο ξηρής μάζας ριζικού συστήματος προς ξηρή μάζα υπέργειου τμήματος. Είναι πιθανό η αύξηση στην ξηρή μάζα του ριζικού συστήματος σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών να οφείλεται σε εκτεταμένη επιφάνεια ριζικού συστήματος, ως αποτέλεσμα του σχηματισμού αυξημένου αριθμού δευτερευουσών ριζών (Stone and Taylor 1983).




2.4 Συμπεράσματα

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προηγήθηκαν προέκυψε ότι η ποικιλία Rusticano είναι πιο ανθεκτική στην αλατότητα και το ψύχος σε σύγκριση με την ποικιλία Grazia, στο υπό μελέτη στάδιο ανάπτυξης των φυταρίων τους. Αναλυτικότερα, τα συμπεράσματα, σχετικά με τη συμπεριφορά των φυταρίων των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου, Rusticano και Grazia, έναντι της αλατότητας και του ψύχους έχουν ως ακολούθως :

Καταπόνηση φυταρίων σε συνθήκες αλατότητας

- Η ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος και του ριζικού συστήματος των φυταρίων διαφοροποιείται στις 2 ποικιλίες σκληρού σίτου, Rusticano και Grazia, και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος, 100 και 200 mM NaCl, με την ανάπτυξη να είναι μικρότερη στην υψηλότερη συγκέντρωση άλατος (200 mM NaCl). Επισημαίνεται ότι η ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος επηρεάστηκε περισσότερο από την αντίστοιχη του ριζικού συστήματος και στις 2 ποικιλίες. Έτσι στη συγκέντρωση των 200 mM NaCl το μήκος του υπέργειου τμήματος των ποικιλιών Rusticano και Grazia μειώθηκε κατά 59 και 66%, ενώ του ριζικού συστήματος κατά 30 και 49% αντίστοιχα.
- Η ανάπτυξη τόσο του ριζικού συστήματος όσο και του υπέργειου τμήματος των φυταρίων επηρεάστηκε σε μικρότερο βαθμό στην ποικιλία Rusticano απ'

ότι στην ποικιλία Grazia και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος. Έτσι η ποικιλία Rusticano εμφανίζει σχετικά μεγαλύτερο λόγο ξηρής μάζας ριζικού συστήματος προς ξηρή μάζα υπέργειου τμήματος από ότι η ποικιλία Grazia και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος (Πιν. 2.3.1).

Καταπόνηση φυταρίων σε συνθήκες ψύχους

- Το μήκος του ριζικού συστήματος παρουσίασε ομαλή μείωση σε σχέση με το μάρτυρα (22°C) στις 2 ποικιλίες, Rusticano και Grazia, και τις 11 ημέρες παραμονής των φυταρίων στους 4°C. Αντίθετα, το υπέργειο τμήμα των φυταρίων και των 2 ποικιλιών μειώθηκε μέχρι την 5^η ημέρα, αλλά από την 7^η έως την 11^η παρουσίασε θετικό ρυθμό αύξησης.
- Το μήκος του ριζικού συστήματος και του υπέργειου τμήματος των φυταρίων, καθώς και το ξηρό τους βάρος διαφοροποιήθηκε στις 2 ποικιλίες, με την ποικιλία Rusticano να έχει επηρεαστεί σε μικρότερο ποσοστό σε σχέση με το μάρτυρα από την ποικιλία Grazia (Πιν. 2.3.2). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο λόγος ξηρή μάζα ριζικού συστήματος προς ξηρή μάζα υπέργειου τμήματος και των 2 ποικιλιών, Rusticano και Grazia, παρουσιάζει μικρή προοδευτική αύξηση με το χρόνο παραμονής των φυταρίων τους σε συνθήκες ψύχους

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°: ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΣΚΛΗΡΟΥ ΣΙΤΟΥ, RUSTICANO KAI GRAZIA, ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΨΥΧΟΥΣ

3.1 Σκοπός της Έρευνας

Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει προσελκύσει η καλλιέργεια του σίτου (*Triticum sp*), διότι είναι ένα φυτό που καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο, έχει μεγάλη βιολογική σημασία και αποτελεί τη βάση της διατροφής του πληθυσμού του πλανήτη μας. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι τρέχουσες κλιματικές αλλαγές αυξάνουν τη συχνότητα και την ένταση ακραίων φαινομένων, το επιστημονικό ενδιαφέρον δεν έχει εστιαστεί μόνο σε γενετικές παρεμβάσεις, προκειμένου να αυξηθεί η προσαρμογή της καλλιέργειας του σιταριού σ' ένα μεγάλο φάσμα συνθηκών περιβάλλοντος, αλλά και σε ολιστικές τεχνικές που μας δείχνουν την ανταπόκριση του φυτού στις συνθήκες αυτές.

Συγκεκριμένα, την τελευταία τριετία, έχουν πραγματοποιηθεί ολιστικές τεχνικές, όπως μεταγραφομική (Rampino et al 2012, Secenji et al 2010, Krugman et al 2011, Szucs et al 2010), πρωτεομική (Bazargani et al 2011, Yang et al 2011, Ford et al 2011, Irar et al 2010) και μεταβολομική (Hill et al 2013, Krugman et al 2011, Bowne et al 2011) ανάλυση σε διάφορα είδη του γένους *Triticum* σε συνθήκες ξηρασίας. Ο συνδυασμός των ανωτέρω ομικών τεχνολογιών μπορεί να συμβάλλει στην κατανόηση των συστημάτων απόκρισης και να δώσει δεδομένα υψηλής ποιότητας που θα κατευθύνουν σε γονότυπους καλύτερους που θα προσαρμόζονται σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και θα υπερνικούν τις καταπονήσεις.

Στην ενότητα αυτή διερευνάται το μεταβολομικό πρότυπο του υπέργειου τμήματος των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης άλατος (200 mM NaCl) και ψύχους (4°C).

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

Ως πειραματικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν νεαρά φυτάρια των ποικιλιών Rusticano και Grazia, τα οποία αναπτύχθηκαν σε υδροπονική καλλιέργεια (Κεφ. 2, παρ. 2.2.1). Για τη μεταβολομική ανάλυση επιλέχθηκε μόνο το υπέργειο τμήμα των φυταρίων και των 2 ποικιλιών μετά από 48 ώρες καταπόνησης σε διάλυμα 200 mM NaCl και θερμοκρασία 4°C. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φυτάρια και των 2 ποικιλιών που αναπτύχθηκαν σε 0 mM NaCl και θερμοκρασία 22°C. Τα δείγματα του υπέργειου τμήματος των ποικιλιών Rusticano και Grazia που συλλέχθηκαν, ζυγίστηκαν, έτσι ώστε το νωπό βάρος να είναι 1gr και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις της κάθε εφαρμογής (μάρτυρας, 200 mM NaCl και 4°C) και συνολικά αναλύθηκαν 9 δείγματα από κάθε ποικιλία.

Η υγροχρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βασικής και Εφαρμοσμένης Έρευνας στη Χημική Οικολογία, του Ινστιτούτου Βιολογίας του Πανεπιστημίου Neuchâtel, Ελβετία, με όργανο υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (Ultra Performance Liquid Chromatography, Waters), συνδεδεμένο με φασματόμετρο μάζας, με υβριδικό αναλυτή τετραπόλου – χρόνου πτήσης ιόντων (Quadrupole – Time of Flight, Q-TOF) ως ανιχνευτή (Synapt G2 QTOF, Waters). Επιπλέον, η ταυτοποίηση των μεταβολιτών και η στατιστική ανάλυση PCA πραγματοποιήθηκε στο ίδιο Εργαστήριο από τον Dr. Gaétan Glauser.

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, μετά την ταυτοποίηση των μεταβολιτών, πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος t-test και χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Fire (Garcion and Applimath 2006), το οποίο αναπτύχθηκε από το Πανεπιστήμιο του Fribourg, Ελβετία, με αρχικό σκοπό την ανάλυση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης (microarrays), αλλά επιτρέπει και την ανάλυση δεδομένων μεταβολομικής έκφρασης.

Εκχύλιση μεταβολιτών από το υπό εξέταση βιολογικό δείγμα

Το δείγμα (υπέργειο τμήμα) κονιορτοποιήθηκε αφού προηγουμένως είχε ψυχθεί σε υγρό άζωτο. Η σκόνη του εκάστοτε δείγματος ζυγίστηκε και προστέθηκε άμεσα διάλυμα ισο-προπανόλης για την εκχύλιση των μεταβολιτών. Ακολούθησε ανακίνηση, εμβάπτιση σε λουτρό υπερήχων για 20', ξανά ανακίνηση και στη συνέχεια φυγοκέντρηση (10000 στροφές ανά λεπτό) για 2'. Το υπερκείμενο παρελήφθη και επαναλήφθηκε η διαδικασία της εκχύλισης. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό και επαναδιασπορά του δείγματος σε μίγμα μεθανόλης/νερού (85/15) και απομάκρυνση των μη-πολικών ενώσεων με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας στήλη C18 (100mg Sep-Pack ®). Τα φιλτραρισμένα εκχυλίσματα, ξηράνθηκαν και διαλύθηκαν σε μίγμα μεθανόλης/νερού (85/15) με τελική συγκέντρωση (1mg/mL) για την περαιτέρω ανάλυσή τους και τον χαρακτηρισμό τους μέσω της υβριδικού συστήματος UHPLC QTOF-MS (Marti et al 2013).

3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.3.1 Μεταβολομική Ανάλυση Υπέργειου Τμήματος ποικιλιών Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Αλατότητας

Σε συνθήκες αλατότητας αναγνωρίστηκαν στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia 17 μεταβολίτες του πρωτογενούς μεταβολισμού που περιλαμβάνουν 9 αμινοξέα, 3 οργανικά οξέα, 1 σάκχαρο 3 λιπίδια και 1 λιπαρό οξύ (Πιν. 3.3.1), καθώς και 11 δευτερογενείς μεταβολίτες που περιλαμβάνουν 10 αζωτούχες ενώσεις και 1 φαινολική ένωση (Πιν. 3.3.2).

Στον Πίνακα 3.3.1 αναγράφονται οι πρωτογενείς μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης άλατος, η σχετική τους συγκέντρωση στα 0 και 200 mM NaCl καθώς και οι φορές που μεταβλήθηκαν σε σχέση με το μάρτυρα. Από τους πρωτογενείς μεταβολίτες, μόνο δύο αμινοξέα και ένα οργανικό οξύ παρουσίασαν αύξηση στη συγκέντρωσή τους (P<0.05) και στις 2 ποικιλίες, ενώ ένα οργανικό οξύ, ένα σάκχαρο και ένα λιπίδιο παρουσίασαν μείωση (P<0.05) και στις 2 ποικιλίες. Για την επεξεργασία και περιγραφή των αποτελεσμάτων της μεταβολομικής ανάλυσης κρίθηκε σκόπιμη η αναφορά των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν ανά κατηγορία, δηλαδή των αμινοξέων, των οργανικών οξέων, των σακχάρων και των λιπιδίων.

Αμινοξέα: Η αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοξέων έχει παρατηρηθεί μετά από έκθεση των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις (Barnett and Naylor 1966, Handa et al 1983, Fougere et al 1991, Kaplan et al 2004, Sanchez et al 2008, Lugan et al 2010) και είναι πιθανό να οφείλεται στην αυξημένη πρωτεόλυση λόγω των καταπονήσεων (Ingram and Bartels 1996, Obata and Fernie 2012). Έχει αναφερθεί ότι η συσσώρευση συγκεκριμένων αμινοξέων και ιδιαίτερα της προλίνης έχει θετική επίδραση στον εγκλιματισμό των φυτών στις καταπονήσεις (Krasensky and Jonak 2012).

Στην παρούσα εργασία, η καταπόνηση άλατος είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση μόνο δύο αμινοξέων, από τα εννέα που ταυτοποιήθηκαν, και στις 2 ποικιλίες, της προλίνης και φαινυλαλανίνης. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα της προλίνης ήταν υψηλότερα στην ποικιλία Grazia (16,84 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) απ' ότι στην ποικιλία Rusticano (11,74 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) (Πιν. 3.3.1). Παρόμοια αποτελέσματα στα επίπεδα της προλίνης έχουν αναφερθεί από τους Widodo et al (2009) στο κριθάρι, όπου η ευαίσθητη ποικιλία συσσώρευσε περισσότερη προλίνη απ' ότι η ανθεκτική, σε συνθήκες αλατότητας. Στη συγκεκριμένη εργασία αναφέρεται ότι αυξημένα επίπεδα αμινοξέων στην ευαίσθητη ποικιλία κριθαριού είναι πιθανόν να σχετίζονται με τη γήρανση των φυτών εξαιτίας της καταστροφής των κυττάρων. Επιπλέον, αύξηση στη συγκέντρωση της προλίνης παρατηρήθηκε μετά από μεταβολομική ανάλυση στα φύλλα διαφορετικών ειδών κριθαριού, του αυτοφυούς και του καλλιεργούμενου, όπου και σε αυτή τη μελέτη τα επίπεδα της προλίνης ήταν ελαφρώς υψηλότερα στο καλλιεργούμενο κριθάρι που θεωρείται και πιο ευαίσθητο στην αλατότητα από το αυτοφυές (Wu et al 2013). Οι Alia et al (1997) αναφέρουν ότι η προλίνη μπορεί να ελαττώσει τα ποσά ¹O₂ (singlet oxygen), τα οποία προκαλούν οξείδωση των λιπιδίων στις θυλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλαστών, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην οξειδωτική εξισορρόπηση των κυττάρων (Shabados and Savoure 2010). Είναι πιθανόν, η προλίνη πέραν της οσμωτικής ρύθμισης που προσφέρει στην ποικιλία Grazia, να λειτουργεί και ως αντιοξειδωτική ουσία, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

Εκτός από την προλίνη και η φαινυλαλανίνη αυξήθηκε και στις 2 ποικιλίες μετά από 48 ώρες καταπόνησης με 200 mM NaCl, με τα επίπεδα της φαινυλαλανίνης στην ποικιλία Rusticano (2,94 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) να είναι σχεδόν διπλάσια από ότι στην Grazia (1,61 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) (Πιν. 3.3.1). Τα αρωματικά αμινοξέα (τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη) συντίθενται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος και χρησιμεύουν ως πρόδρομες ενώσεις ενός μεγάλου αριθμού δευτερογενών μεταβολιτών, όπως γλυκοσιδίων, τερπενονειδών, λιγνίνης (Korkina 2007, Less and Galili 2008). Αυξημένα επίπεδα της λιγνίνης συμβάλλουν στην ενδυνάμωση των κυτταρικών τοιχωμάτων και στην ανθεκτικότητα από τις αβιοτικές καταπονήσεις (Pedersen et al 2005). Επιπλέον, υψηλή συγκέντρωση φαινυλαλανίνης έχει αναφερθεί σε 2 ποικιλίες φασολιού, μετά από καταπόνηση άλατος (Misra et al 2006) καθώς και στο σιτάρι (Bowne et al 2011) και το καλαμπόκι (Witt et al 2012) σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης (ξηρασία).

Αντίθετα με τη φαινυλαλανίνη, η τρυπτοφάνη παρουσιάζει μειωμένα επίπεδα στις 48 ώρες καταπόνησης στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano (Πιν. 3.3.1). Η τρυπτοφάνη θεωρείται ως η πρόδρομη ένωση για την παραγωγή του ινδολοξικού οξέος (ΙΑΑ) (Ramaih et al 2003). Έχει αναφερθεί ότι οι αβιοτικές καταπονήσεις επηρεάζουν τη βιοσύνθεση της τρυπτοφάνης και κατ΄επέκταση του ινδιλοξικού οξέος, με άμεση συνέπεια τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και της παραγωγής των φυτών (Steif 1988). Επιπλέον, από τα αρωματικά αμινοξέα, η τρυπτοφάνη έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στη σύνθεση της φαινυλαλανίνης που με τη σειρά της οδηγεί και πάλι στη σύνθεση της τρυπτοφάνης (Bentley 1990). Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης σε κυτταροκαλλιέργειες φυτών *Α. thaliana* σε συνθήκες αλατότητας, 100 mM NaCl, έδειξαν ότι στις πρώτες 2 ώρες εφαρμογής άλατος τα αρωματικά αμινοξέα τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη παρουσίασαν το μέγιστο της συσσώρευσής τους, ενώ μετά τις 48 ώρες καταπόνησης η τρυπτοφάνη είχε ελαττωθεί σημαντικά και η φαινυλαλανίνης άρχισε και πάλι να αυξάνει τη συγκέντρωσή της (Kim et al 2007).

Το γλουταμινικό οξύ παρουσιάζει μείωση στη συγκέντρωσή του στην ποικιλία Grazia (λιγότερο ανθεκτική), ενώ στην ποικιλία Ruticano (ανθεκτική στην αλατότητα) φαίνεται να μην επηρεάζεται από την αλατότητα (Πιν. 3.3.1). Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι το γλουταμινικό οξύ είναι από τους βασικούς μεταβολίτες για τη σύνθεση της χλωροφύλλης στα φυτά και συμβάλλει στο άνοιγμα των στοματίων των φυτών μετά από αβιοτικές καταπονήσεις. Χαμηλή συγκέντρωσή του στην ποικιλία Grazia είναι πιθανόν να οφείλεται στο ότι το γλουταμινικό οξύ ως πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση της προλίνης οδήγησε στη συσσώρευση μεγάλης συγκέντρωσης του ωσμωπροστατευτικού αυτού μορίου. Σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης (ξηρασίας) παρατηρείται συνεχής ροή του γλουταμινικού οξέως στη βιοσύνθεση της προλίνης και του γ-αμινοβουτυρικού οξέως (GABA), στη σύνθεση δηλαδή ωσμωλυτών που θα προστατεύσουν τα κύτταρα από την αφυδάτωση (Shelp et al 1999, Szekely et al 2008, Silva-Ortega et al 2008). Ομοίως οι Liu et al (2011), επιβεβαίωσαν αυτή τη μεταβολική ροή του γλουταμινικού οξέος σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης, όπου τα επίπεδα του γλουταμινικού οξέως σε φύλλα καπνού εμφάνισαν μια μειούμενη τάση, η οποία συνοδεύτηκε από αυξητική τάση των επιπέδων της προλίνης και του γ-άμινοβουτυρικού οξέως.

Ομοίως χαμηλή συγκέντρωση της βαλίνης και ισολευκίνης παρατηρήθηκαν στην ποικιλία Grazia (Πιν. 3.3.1). Είναι γνωστό ότι μαζί με τη λευκίνη και τη βαλίνη, η ισολευκίνη, ανήκει στα τρία (3) πρωτεϊνικά αμινοξέα που έχουν διακλάδωση στην ανθρακική τους αλυσίδα. Η ισολευκίνη συντίθενται από το μονοπάτι της ασπαραγινικού οξέος, ενώ η βαλίνη και η λευκίνη από το πυροσταφυλικό οξύ. Τα 3 αυτά αμινοξέα αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά (Lea και Ireland 1999). Η μείωση στη συγκέντρωση αυτών των μεταβολιτών οδηγεί στη μη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών στο υπέργειο τμήμα της Grazia είναι πιθανόν να σχετίζεται και με τα χαμηλά επίπεδα σακχάρων λόγω της καταπόνησης άλατος.

Οργανικά Οξέα: Τα οργανικά οξέα είναι η πηγή σκελετών άνθρακα και ενέργειας για τα κύτταρα και χρησιμοποιούνται στον κύκλο της αναπνοής και σε άλλα βιοχημικά μονοπάτια. Ο μεταβολισμός των οργανικών οξέων δεν είναι ακόμη γνωστός, ωστόσο έχει αναφερθεί ότι τα οργανικά οξέα συντελούν στη βιοσύνθεση της προλίνης και άλλων αμινοξέων σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης, συμβάλλοντας στην ανθεκτικότητα των φυτών στις καταπονήσεις (Venekamp et al 1989). Επιπλέον, ο κύκλος του κιτρικού οξέος συνδέει τη γλυκόλυση με τη βιοσύνθεση των αμινοξέων και έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αναπνοής και στην παραγωγή ενέργειας μέσω του ΑΤΡ και ΝΑDH (Venekamp et al 1989).

78

Η μεταβολομική ανάλυση έδειξε αύξηση του ισοκιτρικού οξέος στο υπέργειο τμήμα και των 2 ποικιλιών (Πιν. 3.3.1), με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην ποικιλία Rusticano σε σχέση με την Grazia, μείωση του μηλικού οξέως και στις 2 ποικιλίες καθώς και μείωση του ασκορβικού οξέος στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano. Το ισοκιτρικό οξύ αποτελεί βασικό οργανικό οξύ για την ανάπτυξη των φυτών και έχει αναφερθεί η σημαντικότητά του στην ανθεκτικότητα των φυτών από τα βαρέα μέταλλα (Zeng et al 2008, Mailloux et al 2008) και την αλατότητα (Fougere et al 1991). Η αυξημένη ζήτηση για ενέργεια που με τη σειρά της οδηγεί στην αύξηση των οργανικών οξέων κυρίως του κύκλου του κιτρικού οξέος έχει προταθεί ως ένας μηχανισμός προσαρμογής των φυτών, για μικρό χρονικό διάστημα, στην αλατότητα (Bloom and Epstein 1984, Lambers et al 1998). Επιπλέον το ισοκιτρικό οξύ μπορεί να λειτουργεί ως δότης σκελετών άνθρακα για τη βιοσύνθεση του γλουταμινικού και της γλουταμίνης. Εκτός του ισοκιτρικού οξέος, το μηλικό οξύ, ως ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου του κιτρικού οξέος, σχετίζεται με την παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια και αποτελεί τη βασική πηγή σκελετών άνθρακα που εξέρχονται από τα μιτοχόνδρια προκειμένου να υποστηρίξουν τη βιοσύνθεση των αμινοξέων (Schneidereit et al 2006). Χαμηλή συγκέντρωση του μηλικού οξέος καθώς και άλλων οργανικών οξέων παρατηρήθηκαν στο υπέργειο τμήμα φυτών L. japonicus (Sanchez et al 2008) και ποικιλιών κριθαριού (Widodo et al 2009, Wu et al 2013). Αξίζει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι αν και ο ρόλος του κύκλου του κιτρικού οξέος στα φύλλα δεν είναι ξεκάθαρος (Tcherkez et al 2008), καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος, που καταλήγει στην παραγωγή του μηλικού οξέος, σε φυτά τομάτας οδήγησε σε απρόσμενη αύξηση του ρυθμού της φωτοσύνθεσης (Nunes-Nesi et al 2005), ενώ η παρεμπόδιση άλλων ενζύμων στον κύκλο του κιτρικού οξέος δε φαίνεται να έχει απαραίτητα το ίδιο αποτέλεσμα (Nunes-Nesi et al 2008).

Το γεγονός ότι το ασκορβικό οξύ ως αντιοξειδωτική ουσία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση των ROS ακόμα και στις συνήθεις συνθήκες φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, δεν αποτελεί έκπληξη να έχει καθοριστικό ρόλο και στην ανθεκτικότητα των φυτών έναντι πολυάριθμων περιβαλλοντικών παραγόντων (ψύχους, υδατικής καταπόνησης, αλατότητας, βαρέα μέταλλα) (Mittler 2002). Στην παρούσα εργασία μείωση της συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος παρατηρείται στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano (ανθεκτική στην αλατότητα ποικιλία), ενώ στην Grazia η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος παραμένει αμετάβλητη (Πιν. 3.3.1). Μείωση στα επίπεδα του ασκορβικού οξέος έχουν αναφερθεί πρόσφατα στο κριθάρι τόσο στο αυτοφυές (ανθεκτικό), όσο και στο καλλιεργούμενο (ευαίσθητο) μετά από καταπόνηση άλατος (Wu et al 2013). Επιπλέον σε 2 ποικιλίες κριθαριού με

79

διαφορετική ανθεκτικότητα στην αλατότητα η αύξηση στα επίπεδα του ασκορβικού οξέος ήταν παροδική στην ανθεκτική ποικιλία (Widodo et al 2009). Ενώ, μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis*, χωρίς ασκορβικό, παρουσίασαν μεγάλη ευαισθησία στην αλατότητα (Huang et al 2005).

Σε συνθήκες αλατότητας και υδατικής καταπόνησης συνήθως παρατηρείται μείωση στη συγκέντρωση των οργανικών οξέων στα φύλλα, η οποία πιθανό να αντικατοπτρίζει μια αυξανόμενη ενεργειακή ζήτηση λόγω της εντεινόμενης αναπνοής, της κατανομής του άνθρακα στο σχηματισμό αμινοξέων (που λειτουργούν ως ωσμωλύτες), ή της μεταφοράς τους από το υπέργειο τμήμα στις ρίζες ως πηγή άνθρακα (Sanchez et al 2008, Sun et al 2013). Ενδιαφέρον, ωστόσο παρουσιάζει το γεγονός ότι τα οργανικά οξέα εξισορροπούν την ακανόνιστη απορρόφηση ιόντων (Hinsinger et al 2003, Marschner 1995). Επομένως, συσσώρευση οργανικών οξέων σε αρκετά φυτικά είδη σε διάφορες συνθήκες καταπόνησης, όπως υδατική καταπόνηση, αλατότητα, ψύχος, συμβαίνει εξαιτίας της ιοντικής ανισορροπίας και όχι λόγω της ελάττωσης του άνθρακα σε συνθήκες καταπόνησης (Kaplan et al 2004, Timpa et al 1986).

Σάκχαρα: Αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση σχεδόν όλων των οργανικών ενώσεων (Valluru and Van de Ende 2008) και έχουν βασικό ρόλο στο μεταβολισμό των φυτών (Couee et al 2006). Η συσσώρευσή τους αποτελεί κοινή αντίδραση των φυτών στη ξηρασία, στην αλατότητα και στο ψύχος (Gupta and Kaur 2005, Wingler and Roitsch 2008). Δεν δρουν μόνο ως ωσμωπροστατευτικές ουσίες συμβάλλοντας στην ωσμωτική εξισορρόπηση σε συνθήκες καταπόνησης, αλλά αποτελούν και μια ενδιάμεση πηγή ενέργειας για τα φυτά, προκειμένου να συνεχίσουν την ανάπτυξη μετά το λήθαργο που έχει προκληθεί από τις ανεπιθύμητες περιβαλλοντικές συνθήκες (Yancey 2005). Ωστόσο, η καταπόνηση άλατος επιφέρει αλλαγές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, ελαττώνοντας σημαντικά τα επίπεδα του αμύλου και αρκετών σακχάρων (Arbona et al 2005, Kawasaki 2001).

Στην παρούσα μελέτη, η μεταβολομική ανάλυση του υπέργειου τμήματος των ποικιλιών Rusticano και Grazia οδήγησε στην ταυτοποίηση μόνο ενός σακχάρου, της σακχαρόζης, η συγκέντρωση της οποίας ελαττώθηκε και στις 2 ποικιλίες, ενώ η μείωσή της εμφανίζεται μεγαλύτερη στο υπέργειο τμήμα της πιο ευαίσθητης στην αλατότητα ποικιλίας, Grazia (Πιν. 3.3.1). Είναι λοιπόν εμφανές ότι και στις 2 μελετώμενες ποικιλίες η σακχαρόζη μάλλον δε συμπεριφέρεται ως ωσμωλύτης. Ωστόσο επειδή η σακχαρόζη αποτελεί τη βασική μορφή μεταφοράς του άνθρακα σε πολλά φυτά (Nguyen-Quoc and Foyer 2001), η μείωσή της είναι αναμενόμενη, διότι είναι γνωστό ότι η υδατική καταπόνηση και η αλατότητα παρεμποδίζουν τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα με αποτέλεσμα το κλείσιμο των στοματίων, την

περιορισμένη παροχή και αφομοίωση του φωτοσυνθετικού άνθρακα από τα φυτά και τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των φυτών. Επιπλέον, σε συνθήκες καταπόνησης, η αποδόμηση του αμύλου στα πλαστίδια οδηγεί στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων σακχαρόζης (Geigenberger et al 1997, Sparla et al 2006, Harb et al 2010), ενώ η τελευταία αποδομείται προς γλυκόζη και φρουκτόζη (Koch et al 2004). Ωστόσο, η αδυναμία της μεθόδου της υγρής χρωματογραφίας να ταυτοποιήσει άλλους υδατάνθρακες δε μας παρέχει αρκετές πληροφορίες για το μεταβολισμό του άνθρακα στα καταπονημένα από το αλάτι φυτά σκληρού σίτου. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι το μονοπάτι της γλυκόλυσης οδηγεί στην παραγωγή των αμινοξέων, όπως της αλανίνης, της γλυκίνης της ισολευκίνης, της σερίνης, της βαλίνης και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ενέργειας ATP (Bar-Even et al 2012). Επομένως, η δραματική πτώση της σακχαρόζης στο υπέργειο τμήμα της Grazia, είναι πιθανό να συμβάλλει και στα μειωμένα επίπεδα των αμινοξέων ισολευκίνης και βαλίνης.

Επιπρόσθετα, η μικρή διαθεσιμότητα σακχάρων, η αλατότητα, το ψύχος, το σκοτάδι, η υδατική καταπόνηση, η προσβολή από παθογόνα και έντομα αποτελούν μερικούς από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη γήρανση των φύλλων (Yoshiba 2003, Lim et al 2003). Το γεγονός ότι η ποικιλία Grazia εμφανίζει στο υπέργειο τμήμα της εντονότερα συμπτώματα από τη Rusticano είναι πιθανό να σχετίζεται με τη μικρότερη συγκέντρωση σακχαρόζης στο υπέργειο τμήμα της. Τα αποτελέσματα της εργασίας έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης ποικιλιών ρυζιού, σόγιας και κριθαριού σε συνθήκες αλατότητας (Zuther et al 2007, Lu et al 2013, Wu et al 2013) όπου παρατηρήθηκε ελάπωση στα επίπεδα της σακχαρόζης και άλλων υδατανθράκων μετά από καταπόνηση άλατος. Αντίθετα, στο υπέργειο τμήμα φυτών καλαμποκιού (Gavaghan et al 2011) και ποικιλιών κριθαριού (Widodo et al 2009), σε φυτάρια *L. japonicus* (Sanchez et al 2008b) και φυτάρια *Arabidopsis* και *Thellungiella* (Gong et al 2005) η σακχαρόζη παρουσίασε αυξημένα επίπεδα και θεωρήθηκε ως ωσμωτικά ενεργή ουσία λόγω επαγωγής της σε συνθήκες αλατότητας.

Λιπίδια-Λιπαρά Οξέα: Ως λιπίδια ορίζονται οι βιολογικές οργανικές ενώσεις που είναι διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες (Buchanan et al 2000). Τα πιο άφθονα λιπίδια των βιολογικών μεμβρανών είναι τα γλυκεροφωσφολιπίδια (φωσφατιδοχολίνη, PC, φωσφατιδυλογλυκερόλη, PG, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PE, φωσφατιδικό οξύ, PA) και τα γλυκερογλυκολιπίδια ή γαλακτολιπίδια (μονογαλακτοσυλο-διακυλογλυκερόλη, MGDG, διγαλακτοσυλο-διακυλογλυκερόλη, DGDG) (Κατινάκης 1999). Στα λιπίδια συμπεριλαμβάνονται και μόρια όπως λιπαρά οξέα. Αναφέρεται ότι είναι σημαντικά για τα φυτά, γιατί λειτουργούν ως αποθήκες ενέργειας και ως προστατευτικές «κέρινες» επιφάνειες στα κύτταρα, στα φύλλα, στους βλαστούς και στις ρίζες (Graham et al 2003). Επιπλέον, τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των φυτών και ιδιαίτερα τα πολικά γλυκερολιπίδια μεταβάλουν τη σύστασή τους (δηλαδή την αναλογία ακόρεστων προς κορεσμένα) προκειμένου να διατηρείται η ρευστότητα των μεμβρανών σε συνθήκες καταπόνησης (Mikami and Murata 2003).

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρείται μείωση στη συγκέντρωση του λινολενικού οξέος, στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano, ενώ παραμένει αμετάβλητη η συγκέντρωση του ακόρεστου αυτού λιπαρού οξέος στην ποικιλία Grazia (Πιν. 3.3.1). Το λινολενικό οξύ είναι το πιο άφθονο ακόρεστο λιπαρό οξύ που κυτταρική μεμβράνη μεγαλύτερη ρευστότητα. προσφέρει στην Ωστόσο, παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωσή του στην ανθεκτική ποικιλία κίτρου, όπως ακριβώς συνέβη και στην ποικιλία Rusticano, αλλά όχι στην ευαίσθητη (Gueta-Dahan et al 1997). Το λινολενικό οξύ ως πολυακόρεστο λιπαρό οξύ των κυτταρικών μεμβρανών είναι επιρρεπές στην οξείδωση και αποδόμηση, επομένως σημαντική ελάττωση παρουσία άλατος μόνο στα κύτταρα της ανθεκτικής ποικιλίας έχει ως συνέπεια να ελαχιστοποιούνται οι αρνητικές συνέπειες των ενεργών μορφών οξυγόνου (Gueta-Dahan et al 1997). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν στα φυτά Crambe sp (Francois and Kleinman 1990) και P. sativum (Olsson 1995), μετά από υδατική καταπόνηση (ξηρασία). Πρόσφατα, οι Chalbi et al (2013) αναφέρουν ότι η αύξηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, παρόλο που είναι σημαντική για τη διατήρηση της ρευστότητας των μεμβρανών, δεν φαίνεται να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα ανθεκτικότητας στην αλατότητα, ειδών κριθαριού με διαφορετικό δείκτη ανθεκτικότητας σε αυτό τον παράγοντα καταπόνησης. Επιπρόσθετα, και άλλες μελέτες αναφέρουν ότι οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις επάγουν αλλαγές στη σύνθεση των λιπαρών οξέων και κυρίως στο λινολενικού οξέος. Υπάρχουν αναφορές όπου παρατηρείται μείωση στη συγκέντρωση του λινολενικού οξέος μετά από καταπόνηση άλατος και υδατική καταπόνηση σε φυτά B. napus, T. aestivum, G. max, Pachyrhizus ahipa και N. tabacum (Dakhma et al 1995; Mansour et al 1994, Matos et al 2002, Surjus and Durand 1996, Zhang et al 2005). Ωστόσο, υπάρχουν και αναφορές όπου παρατηρείται αύξηση του λινολενικού οξέος κυρίως στα λιπίδια των χλωροπλαστών σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης (Repellin et al 1997, Sgherri et al 1996). Ευλόγως τίθεται το ερώτημα, αν η αύξηση στη συγκέντρωση του ανωτέρω λιπαρού οξέος εκφράζει ένα μηχανισμό άμυνας των φυτών σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης, ενώ στις περιπτώσεις που παρατηρείται μείωση του λινολενικού οξέος σημαίνει και ευπάθεια των φυτών στις καταπονήσεις. Οι Zhang et al (2005), προτείνουν ότι η χαμηλή συγκέντρωση του ακόρεστου αυτού λιπαρού οξέος σε φυτά καπνού αντικατοπτρίζει και ευπάθεια των φυτών στην αλατότητα και στην υδατική

καταπόνηση. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη παρατηρείται συσσώρευση της φωσφατιδοχολίνης, PC στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano, ενώ η συγκέντρωση της παρέμεινε αμετάβλητη στην Grazia (Πıv. 3.3.1). Н φωσφατιδοχολίνη αποτελεί βασικό φωσφολιπίδιο της μεμβράνης των ευκαρυωτικών κυττάρων και έχει βασικό δομικό και λειτουργικό ρόλο. Συνεισφέρει στο σχηματισμό των πολυακόρεστων οξέων (Browse and Somerville 1999) και αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση γλυκερολιπιδίων στις μεμβράνες των πλαστιδίων (Ohlrogge and Browse 1995). Έχει αναφερθεί ότι φυτικά είδη που δε συνθέτουν τον ωσμωλύτη βεταίνη της γλυκίνη συσσωρεύουν φωσφατιδοχολίνη σε συνθήκες καταπόνησης. Σε φυτά και κυτταροκαλλιέργειες A. thaliana (Tasseva et al 2004, Pical et al 1999) παρατηρήθηκε σύνθεση του συγκεκριμένου φωσφολιπιδίου, το οποίο πιθανόν να έχει βασικό ρόλο στην προσαρμογή φυτών και κυττάρων σε συνθήκες αλατότητας, συμβάλλοντας στη διατήρηση της δομής και λειτουργίας των κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη τις ανωτέρω μελέτες, η επαγωγή της σύνθεσης της φωσφατιδοχολίνης στο υπέργειο τμήμα μόνο της ποικιλίας Rusticano (Πιν. 3.3.1) είναι πιθανό να σχετίζεται με την καλύτερη προσαρμογή της Rusticano, σε σχέση με της Grazia, στις συνθήκες αλατότητας. Σε αντίθεση με τη φωσφατιδοχολίνη, μείωση παρατηρήθηκε στο γαλακτολιπίδιο, MDGD, στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano. Το συγκεκριμένο γλυκερογλυκολιπίδιο αποτελεί το βασικό λιπίδιο των πλαστιδίων (Douce and Joyard 1990) και συντίθεται στα θηλακοειδή των χλωροπλαστών (Miège et al 1999). Παρόμοια αύξηση της συγκέντωσης της φωσφατιδοχολίνης με μείωση του MGDG παρατηρήθηκε σε φυτά Arabidopsis, υπό την επίδραση εξαιρετικά υψηλής συγκέντρωσης άλατος 400 mM NaCl (Konig et al 2007). Η αύξηση αυτή του φωσφολιπιδίου είναι πιθανό να αποτελεί μηχανισμό επιβίωσης των φυτών και προτείνεται από τους συγγραφείς ανακύκλωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από τα πλαστίδια προς την πλασματική μεμβράνη, προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση του ακόρεστου φωσφολιπιδίου και να διατηρηθεί με αυτό τον τρόπο η ρευστότητα των μεμβρανών (Kinnunen 2000). Επιπλέον, μείωση στη συγκέντρωσή της παρουσίασε η λυσοφωσφατιδογλυκερόλη (LPG) (Πιν. 3.3.1). Πρόκειται για ένα λυσο-φωσφολιπίδιο το οποίο βρίσκεται σε ίχνη στις μεμβράνες των κυττάρων και τα επίπεδά του αλλάζουν άμεσα μετά από έκθεση των φυτών σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, κυρίως όμως σε αλλαγές της θερμοκρασίας (Cowan 2006). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις λυσοφωσφολιπιδίων (όπως η LPG) που προέρχονται από τη δράση των φωσφολιπασών A (PLA) υποδεικνύουν ότι τα ένζυμα αυτά δε φαίνεται να παίζουν ενεργό ρόλο στους φυτικούς ιστούς σε συνθήκες ψύχους (Wang et al 2006, Li et al 2008). Είναι λοιπόν, πιθανό η δράση αυτών των ενζύμων να μην είναι ενεργή και σε συνθήκες αλατότητας.

Πίνακας 3.3.1 Σχετική συγκέντρωση πρωτογενών μεταβολιτών και μεταβολή αυτών στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης άλατος, 200 mM NaCl. Η σχετική συγκέντρωση κάθε μεταβολίτη είναι ο μέσος όρος 3 βιολογικών επαναλήψεων Οι τιμές με έντονη γραφή (bold) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά των ποικιλιών σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα. Τα σύμβολα (* και **) δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά των εφαρμογών της ίδιας ποικιλίας, σύμφωνα με το t-test, ενώ τα διαφορετικά σύμβολα (a, b) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05), μεταξύ των 2 ποικιλιών, σύμφωνα με το t-test.

Πρωτογενείς Μεταβολίτες		Rusticano		Gra	azia	200 / 0 mM NaCl				
		Μάρτυρας (0 mM NaCl)	Αλατότητα (200 mM NaCl)	Μάρτυρας (0 mM NaCl)	Αλατότητα (200 mM NaCl)	Rusticano	Grazia			
Αμινοξέα										
1	Αλανίνη	0,36	0,35	1,15	0,39	0,97	0,34			
2	Γλουταμινικό Οξύ	8,13	5,86	8,66	4,56	0,72	0,53*			
3	Γλουταμίνη	9,59	5,17	8,25	10,27	0,54	1,24			
4	Γλουταθειόνη	0,39	1,19	2,64	1,9	3,05	0,72			
5	Ισολευκίνη	0,22	2,69	5,59	1,35	12,23	0,24*			
6	Φαινυλαλανίνη	53,33	156,54	60,79	97,96	2,94*a	1,61**b			
7	Προλίνη	1,16	13,65	2,33	39,17	11,74**a	16,84*b			
8	Τρυπτοφάνη	71,50	50,75	63	37,90	0,71*	0,61			
9	Βαλίνη	80,32	47,88	114,50	67,76	0,60	0,59*			
Οργανικά Οξέα										
1	Ασκορβικό Οξύ	157,94	0,74	64,02	2,3	0,005**	0,036			
2	Ισοκιτρικό οξύ	3,06	36,59	1,41	12,83	11,95*a	9,10*b			
3	Μηλικό Οξύ	86,32	0,0	181,98	0,705	0,00** (-86,32)a	0,004*b			
Σάκχα	Σάκχαρα									
1	Σακχαρόζη	0,95	0,48	1,81	0,39	0,50**a	0,22**b			
Λιπίδ	Λιπίδια-Λιπαρά Οξέα									
1	Λινολενικό οξύ	26,00	0,00	88,24	0,63	0,00* (-26)	0,00			
2	Φωσφατιδοχολίνη	90,28	201,49	170,41	118,45	2,23**	0,70			
3	Λυσοφωσφατιδογλυκε ρόλη	121,13	0,80	203,67	0,47	0,007*a	0,002*b			
4	Μονογαλακτοσυλο- διακυλογλυκερόλη	45,70	0,28	0,02	0,00	0,006*	0,00			

Στον Πίνακα 3.3.2 αναγράφονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης άλατος, η σχετική τους συγκέντρωση στα 0 και 200 mM NaCl καθώς και οι φορές που μεταβλήθηκαν σε σχέση με το μάρτυρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τους δευτερογενείς μεταβολίτες, μόνο μία αζωτούχος ένωση παρουσίασε αύξηση στη συγκέντρωσή της (P<0.05) και στις 2 ποικιλίες. Επιπλέον, οι δευτερογενείς μεταβολίτες στην ποικιλία Rusticano εμφάνισαν διαφοροποίηση (P<0.05) σε σχέση με την ποικιλία Grazia, στην οποία η πλειοψηφία των μεταβολιτών φαίνεται να μην επηρεάστηκε από την καταπόνηση άλατος. Στη συνέχεια γίνεται περιγραφή και ανάλυση των δευτερογενών μεταβολιτών, δηλαδή των αζωτούχων και των φαινολικών ενώσεων.

Αζωτούχες Ενώσεις

-Κυανογόνα και μη-Κυανογόνα Γλυκοσίδια: Πρόκειται για αζωτούχα γλυκοσίδια και περιέχουν σάκχαρο στο μόριό τους. Τα κυανογόνα γλυκοσίδια (διουρίνη, λιναμαρίνη, λοτοστραλίνη, αμυγδαλίνη κ.α.) υπό την επίδραση κατάλληλων ενζύμων απελευθερώνουν τοξικές ρίζες κυανίου (Conn 1980, Poulton 1990, Muller and Seigler 1999, Morant et al 2003), ενώ τα μη-κυανογόνα γλυκοσίδια (νεολινουστατίνη) δεν απελευθερώνουν τοξικές ρίζες κυανίου και είναι γνωστά ως ροδιοκυανοσίδια (Forslund et al 2004). Η βιοσύνθεση των γλυκοσιδίων έχει μελετηθεί εκτενώς στο φυτό L. japonicus και ως πρόδρομες ενώσεις χρησιμοποιούνται τα αμινοξέα: βαλίνη (πρόδρομη ένωση της λιναμαρίνης), λευκίνη (πρόδρομη ένωση της επιδερμίνης), ισολευκίνη (πρόδρομη ένωση της λοτοστραλίνης, тης νεολινουστατίνης), φαινυλαλανίνη (πρόδρομη ένωση της αμυγδαλίνης) και τυροσίνη (πρόδρομη ένωση της διουρίνης) (Forslund et al 2004, Morant et al 2007). Ο κύριος ρόλος τους είναι η ενίσχυση της άμυνας των φυτών εναντίον αρπακτικών και εντόμων (Zagrobelnya et al 2004), ενώ έχουν αναφερθεί και ως αποθησαυριστικές ενώσεις αζώτου (Forslund and Jonnson 1997, Busk and Moller 2002, Sanchez-Pirez et al 2008).

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση των κυανογόνων γλυκοσιδίων, λιναμαρίνη και λοτοστραλίνη στο υπέργειο τμήμα της ανθεκτικής στην αλατότητα ποικιλίας Rusticano, ενώ τα επίπεδα των ανωτέρω γλυκοσιδίων παρέμειναν αμετάβλητα στην ποικιλία Grazia (Πιν. 3.3.2). Η συγκέντρωση των 2 αυτών γλυκοσιδίων έχει μελετηθεί σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης σε νεαρά φυτάρια *L. usitatissimum,* όπου και παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση τους, θέτοντας υπό αμφισβήτηση τον πιθανό προστατευτικό και λειτουργικό ρόλο των ανωτέρω κυανογόνων γλυκοσιδίων σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης (Siegien and Gierasimiuk 2001). Αντίθετα, η μεταβολομική ανάλυση

στα φύλλα φυτών *L. usitatissimum* μετά από 48 ώρες υδατικής καταπόνησης έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις της λιναμαρίνης και της λοτοστραλίνης παρέμειναν αμετάβλητες ενώ αυξήθηκαν σημαντικά μετά από 72 ώρες (Quero et al 2013).

-Κυκλικά Υδροξαμικά Οξέα (Hxs): Τα κυκλικά υδροξαμικά οξέα 2,4-διυδροξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-óvn (2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one, DIBOA) και 2.4διυδροξυ-7-μεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one, DIMBOA), τα οποία αναφέρονται και ως βενζοξαζινοειδή (benzoxazinoids, Bxs), αποτελούν χημικές ενώσεις, με αμυντική δράση, ευρέως διαδεδομένα στα αγροστώδη (Niemeyer 1988), διότι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη βακτηρίων, μυκήτων και αποτρέπουν την κατανάλωση των φυτικών ιστών από έντομα (Argandona et al 1980, Bravo et al 1997, Corcuera et al 1978, Glenn et al 2001, Klun and Robinson 1969, Niemeyer 1988, Marti et al 2013). Επειδή όμως οι ενώσεις DIBOA και DIMBOA είναι ασταθείς αποδομούνται εύκολα προς 1,4 βενζοξαζιν-3ονη (1,4-benzoxazin-3-one, BOA) και 6-μέθοξυ-2- βενζοξαζολινονη (6-methoxy- 2benzoxazolinone, MBOA) αντίστοιχα (Hashimoto and Shudo 1996, Woodward et al 1978). Έχει αναφερθεί ότι οι ενώσεις ΜΒΟΑ και ΒΟΑ παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων και μυκήτων του γένους Fusarium spp. (Glenn et al 2001, Niemeyer 1988). Στα φυτά, τα Bxs απαντώνται στη γλυκοζιλιομένη τους μορφή (BxGlc), δηλαδή μετατρέπονται σε γλυκοσίδια με την προσθήκη γλυκόζης. Τα γονίδια και τα ένζυμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης των ενώσεων DIBOA-Glc και DIMBOA-Glc έχουν απομονωθεί και χαρακτηρισθεί στο καλαμπόκι (Frey et al 1997, 2003, von Rad et al 2001, Jonczyk et al 2008) και μερικώς στο σιτάρι (Nomura et al 2002). Επιπλέον θεωρείται ότι το μονοπάτι βιοσύνθεσης των ανωτέρω γλυκοσιδίων παρεκκλίνει του μονοπατιού βιοσύνθεσης της τρυπτοφάνης (Melanson et al 1997).

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μεταβολή στη συγκέντρωση των γλυκοσιδίων DIMBOA-Glc, HDMBOA-Glc, HMBOA-Glc και MBOA στο υπέργειο τμήμα μόνο της ποικιλίας Rusticano μετά από 48 ώρες καταπόνησης στα 200 mM NaCl (Πιν. 3.3.2). Επειδή το γλυκοσίδιο HDMBOA-Glc πιστεύεται ότι συντίθεται από το γλυκοσίδιο DIMBOA-Glc (Oikawa and Ishihara & Iwamura 2002), το HMBOA-Glc από το DIBOA-Glc (Meihls et al 2013) και το MBOA από το DIMBOA-Glc και το DIMBOA-Glc και πιθανό ν' αντικατοπτρίζει τη μεθυλίωση στη θέση της καρβοξυλομάδας του βενζοϊκού οξέος (Marti et al 2013, Meihls et al 2013). Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι το γλυκοσίδιο HDMBOA-Glc εμφανίζει υψηλή συγκέντρωση στα φύλλα *Ζ. mays* μετά από εφαρμογή γιασμονικού οξέος (Oikawa et al 2001),σε φυτά *Arabidopsis* μετά από τραυματισμό (Glauser et al 2011) σε φυτά *Ζ*.

86

mays μετά από επίθεση από φυτοφάγα έντομα (Marti et al 2013, Meihls et al 2013), ενώ υψηλές συγκεντρώσεις του γλυκοσιδίου MBOA παρατηρήθηκαν σε φυτάρια *T.* aestivum παρουσία ζιζανίων (Lu et al 2012). Ωστόσο, υπάρχει μόνο μία μελέτη που συνδέει τη συσσώρευση των γλυκοσιδίων αυτών με την ανθεκτικότητα φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις και πιο συγκεκριμένα σε φυτάρια *Ζ. mays* που έχουν υποστεί υδατική καταπόνηση (Richardson and Bacon 1993).

-Αμίδια του Υδρόξυκινναμικού οξέος (HCAAs) ή Φαινολοαμίδια: Oı πολυαμίνες είναι αλειφατικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους και χαρακτηρίζονται ως αζωτούχα πολυκατιόντα τα οποία απαντώνται σε ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα. Χαρακτηριστικές είναι η διαμίνη πουτρεσκίνη (Put), η τριαμίνη σπερμιδίνη (Spd) και τετραμίνη σπερμίνη (Spms). Στα φυτά οι πολυαμίνες έχουν σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως την κυτταροδιαίρεση, την άνθηση, τη γήρανση και εμπλέκονται τόσο σε αβιοτικές (υδατική καταπόνηση, αλατότητα) όσο και βιοτικές καταπονήσεις (Kumar et al 1997, Walden et al 1997, Kusano et al 2008, Alcázar et al 2010, Gill and Tuteja 2010). Απαντώνται σε ελεύθερη μορφή ή ως σύμπλοκα του υδρόξυκινναμικού οξέος (HCAAs) (πχ. κουμαροϋλπουτρεσκίνη, κουμαροϋλαγματίνη, φερουοϋλπουτρεσκίνη) σχηματίζοντας φαινολικά αμίδια. Έχει αναφερθεί ότι η βιοσύνθεση, ο καταβολισμός καθώς και η συμπλοκοποίηση των πολυαμινών στη μορφή των αμιδίων του υδρόξυκινναμικού οξέος συμβάλλει στη ρύθμιση των ελεύθερων πολυαμινών στα φυτά (Martin-Tanguy 1997). Παρόλο που οι ενώσεις αυτές έχουν ανακαλυφθεί εδώ και πολλά χρόνια, ο φυσιολογικός τους ρόλος παραμένει ακόμα άγνωστος. Πρόσφατα έχουν μελετηθεί στα άνθη, τα σπόροι και τα φύλλα φυτών Arabidopsis (Böttcher et al 2008, Fellenberg et al 2008, Luo et al 2009, Muroi et al 2009) αν και έχουν περιγραφεί στα αναπαραγωγικά όργανα αρκετών φυτικών ειδών (Meurer et al 1988). Στα σπόροι έχει παρατηρηθεί ότι συσσωρεύονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και έχει αναφερθεί ότι χρησιμεύουν ως αποθήκες αζώτου για τη βλάστηση των σπερμάτων (Facchini et al 2002). Ενώ θεωρούνται τα τελικά προϊόντα στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των πολυαμινών, έχει προταθεί ότι ίσως αποτελούν ενδιάμεσους μεταβολίτες στο μεταβολισμό των φαινολικών και πιθανόν να εμπλέκονται στο μεταβολισμό του αζώτου (Matsuno et al 2009, Bassard et al 2010). Βασικά το πρώτο συνθετικό η Υδρόξυκινναμόϋλ προέρχεται από την απαμίνωση της φαινυλαλανίνης και είναι προϊόν της οδού του σικιμικού οξέος, ενώ το δεύτερο συνθετικό η αμίνη προέρχεται από το μονοπάτι των πολυαμινών από τα σύμπλοκα της πουτρεσκίνης, της σπεριμιδίνης και της σπερμίνης (Bassard et al 2010).

Η μεταβολομική ανάλυση στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά 48 ώρες καταπόνησης άλατος, 200 mM NaCl, έδειξε την παρουσία των φαινολοαμιδίων, κουμαροϋλπουτρεσκίνη και κουμαροϋλαγματίνη (Πιν. 3.3.2). Η κουμαροϋλπουρεσκίνη παρουσίασε πολύ μεγάλη συσσώρευση (46 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano, ενώ μικρότερη συσσώρευση παρουσιάστηκε στο υπέργειο τμήμα της Grazia (9,63 φορές σε σχέση με το μάρτυρα). Η κουμαροϋλαγματίνη εμφάνισε μεγάλη συγκέντρωση στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano, ενώ ο ανωτέρω μεταβολίτης παρέμεινε αμετάβλητος στην ποικιλία Grazia. Είναι γνωστό ότι η αγματίνη είναι πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση της Put από την αργινίνη (Evans and Mamlberg 1989, Tiburcio et al 1997). Ο ρόλος των ΗCAAs στις αβιοτικές καταπονήσεις δεν είναι ξεκάθαρος εξαιτίας των φαινολικών ενώσεων και των πολυαμινών στη σύνθεσή τους (Bouchereau et al 1999; Groppa and Benavides 2008). Ωστόσο η κύρια λειτουργία τους βασίζεται στην αντιοξειδωτική τους δράση και την εξουδετέρωση των ενεργών μορφών οξυγόνου. Όσα φαινολοαμίδια θεωρούνται κατάλληλα υποστρώματα για τις υπεροξειδάσες είναι πιθανό να συμμετέχουν στην εξάλειψη του Η2O2 και να ενισχύουν την άμυνα του κυτταρικού τοιχώματος (Edreva et al 2007). Επιπλέον είναι γνωστή η αντιμικροβιακή τους δράση (Martin-Tanguy 1985, Rajam 1997, Walters 2003a, b), ενώ συμβάλλουν στην αμυντική θωράκιση των κυτταρικών τοιχωμάτων, με αποτέλεσμα τα τελευταία να γίνονται πιο ανθεκτικά στις βιοτικές καταπονήσεις (Walters 2003a, b). Συσσώρευση φαινολικών συμπλόκων έχει αναφερθεί μετά από διάφορα είδη αβιοτικών καταπονήσεων, όπως ανεπάρκεια Κ, Ca, Mg και P (Deletang 1974), S (Klapheck 1983), κατάκλιση (Edreva et al 2007) και υπερθέρμανση (Edreva et al 1998). Αντίθετα, η αλατότητα αναφέρθηκε ότι μειώνει τη σύνθεση των ανωτέρω ενώσεων στις ρίζες του αλόφυτου Mesembryanthemum crystallinum (Shevyakova et al 2006).

Πίνακας 3.3.2 Σχετική συγκέντρωση δευτερογενών μεταβολιτών στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης άλατος, 200 mM NaCl.

		Rusticano		Gr	azia	200 mM NaCl / 0 mM NaCl	
Δει	υτερογενείς Μεταβολίτες	Μάρτυρας (0 mM NaCl)	Αλατότητα (200 mM NaCl)	Μάρτυρας (0 mM NaCl)	Αλατότητα (200 mM NaCl)	Rusticano	Grazia
Αζωτούχες Ενώσεις							
Κυανογόνα και μη-Κυανογόνα Γλυκοσίδια							
1	Λιναμαρίνη	57,30	0,00	0,00	0,00	0,00* (-57,30)	0,00
2	Λοτοστραλίνη	167,11	1,00	0,00	0,97	0,006**	0,00
3	Νεολινουστατίνη	0,91	0,08	0,015	0,20	0,09	13,33
Κυκλικά Υδροξαμικά Οξέα					· · · ·	· ·	
1	HMBOA-GIC	15,56	0,00	0,00	0,00	0,00** (-15,56)	0,00
2	TRIBOA-Glc	1,70	1,05	0,30	0,00	0,62	0,00
3	DIMBOA-GIC	4,86	0,03	1,84	1,06	0,006**	0,58
4	HDMBOA-Glc	0,41	1,90	0,48	0,38	4,63**	0,79
5	MBOA	100,05	142,08	137,70	114,79	1,42*	0,83
Αμίζ	δια του Υδρόξυκινναμικού οξέο <u>ς</u>						
1	4-Κουμαροϋλπουτρεσκίνη	12,25	568,14	8,79	84,67	46,38**a	9,63*b
2	ρ-Κουμαροϋλαγματίνη	20,75	273,88	41,28	114,15	13,20**	2,77
Φαινολικές Ενώσεις							
Εστέρες του σιναπικού οξέος							
1	1-Ο-Σιναποϋλογλυκόζη	9,49	0,00	6,05	0,74	0,00	0,12

Η σχετική συγκέντρωση κάθε μεταβολίτη είναι ο μέσος όρος 3 βιολογικών επαναλήψεων. Οι τιμές με έντονη γραφή (bold) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά των ποικιλιών σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα. Τα σύμβολα (* και **) δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05 και P<0,01 αντίστοιχα) μεταξύ των εφαρμογών της ίδιας ποικιλίας, σύμφωνα με το t-test, ενώ τα διαφορετικά σύμβολα (a, b) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05), μεταξύ των 2 ποικιλιών, σύμφωνα με το t-test.

HMBOA-Glc : 2-(2-διύδροξυ-7-μεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη)-β-D-γλυκοπυρανόζη

TRIBOA-Glc: 2 (4,7-τριύδροξυ-2H-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη)-β-D-γλυκοπυρανόζη

DIMBOA-Glc : 2-(2,4-διύδροξυ-7-μεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη)-β-D-γλυκοπυρανόζη

HDMBOA-Glc :2-(4,7-διμεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη)-β-D-γλυκοπυρανόζη

ΜΒΟΑ : 6-μεθοξυ-2-βενζοξαζολιόνη

3.3.2 Μεταβολομική Ανάλυση Υπέργειου Τμήματος ποικιλιών Rusticano και Grazia σε Συνθήκες Ψύχους

Σε συνθήκες ψύχους αναγνωρίστηκαν στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia, 29 μεταβολίτες. Από αυτούς, οι 18 μεταβολίτες είναι πρωτογενείς και περιλαμβάνουν 9 αμινοξέα, 3 οργανικά οξέα, 1 σάκχαρο, 4 λιπίδια και 1 λιπαρό οξύ (Πιν.3.3.3), ενώ οι υπόλοιποι 11 είναι δευτερογενείς και περιλαμβάνουν 10 αζωτούχες ενώσεις και 1 φαινολική ένωση (Πιν. 3.3.4).

Στον Πίνακα 3.3.3 αναγράφονται οι πρωτογενείς μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης ψύχους, η σχετική συγκέντρωση των μεταβολιτών σε κάθε ποικιλία στους 4°C και 22°C καθώς και οι φορές που μεταβλήθηκαν σε σχέση με το μάρτυρα. Από τους πρωτογενείς μεταβολίτες, μόνο δύο αμινοξέα παρουσίασαν αύξηση στη συγκέντρωσή τους (P<0.05) και στις 2 ποικιλίες, ενώ ένα οργανικό οξύ παρουσίασε μείωση (P<0.05) και στις 2 ποικιλίες. Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή των πρωτογενών μεταβολιτών, δηλαδή των αμινοξέων, των οργανικών οξέων, των σακχάρων και των λιπιδίων που ταυτοποιήθηκαν στο υπέργειο τμήμα και των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου σε συνθήκες ψύχους.

Αμινοξέα: Έχει αναφερθεί ότι η συσσώρευση συγκεκριμένων αμινοξέων, όπως της προλίνης έχει θετική επίδραση στον εγκλιματισμό των φυτών στις καταπονήσεις (υδατική καταπόνηση, αλατότητα, βαρέα μέταλλα) (Krasensky and Jonak 2012), με εξαίρεση την καταπόνηση από υψηλές θερμοκρασίες (Dobra et al 2010, Lv et al 2011).

Η καταπόνηση ψύχους είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση δύο αμινοξέων, από τα εννέα που ταυτοποιήθηκαν, και στις 2 ποικιλίες, της προλίνης και φαινυλαλανίνης. Ωστόσο, τα επίπεδα της προλίνης ήταν σχεδόν 4 φορές υψηλότερα στην ποικιλία Rusticano (5,74 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) απ' ότι στην ποικιλία Grazia (1,60 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) απ' ότι στην ποικιλία Grazia (1,60 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) (Πιν.3.3.3). Ελαφρώς υψηλότερη συγκέντρωση προλίνης εμφάνισε και η ανθεκτική ποικιλία ρυζιού μετά από 48 ώρες καταπόνησης ψύχους σε σχέση με την ευαίσθητη ποικιλία, μετά από μεταβολομική ανάλυση 2 ποικιλιών ρυζιού, με διαφορετικό βαθμό ανθεκτικότητας στο ψύχος (Zhao et al 2013). Αναλύσεις στο μεταβολομικό προφίλ φυτών *Arabidopsis* αναφέρουν το σημαντικό ρόλο της προλίνης καθώς και άλλων οσμωπροστατευτικών μεταβολιτών (πχ. ραφινόζη) σε συνθήκες ψύχους (Hannah et al 2006, Korn et al 2010).

Εκτός από την προλίνη και η φαινυλαλανίνη αυξήθηκε και στις 2 ποικιλίες μετά από 48 ώρες στους 4°C, με τα επίπεδα της φαινυλαλανίνης στην ποικιλία Rusticano (4,43 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) να είναι υψηλότερα από ότι στην Grazia (3,11 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) (Πιν.3.3.3). Ομοίως ανθεκτική στο ψύχος ποικιλία ρυζιού συσσώρευσε φαινυλαλανίνη, ενώ στην ευαίσθητη ποικιλία τα επίπεδα του συγκεκριμένου

αμινοξέος παρέμειναν αμετάβλητα (Zhao et al 2013). Επιπλέον, η φαινυναλανίνη θεωρείται το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών, όπου μαζί με την προλίνη και ορισμένα σάκχαρα (γλυκόζη, σακχαρόζη, φρουκτόζη και ραφινόζη) μετέχουν στην ανθεκτικότητα των φυτών στο ψύχος και τον παγετό (Hannah et al 2006, Sharma et al 2007, Korn et al 2008). Επιπλέον η αμμώνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης, που καταλύει την απαμίνωση της φαινυλαλανίνης, αποτελεί ένζυμο κλειδί για τη βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων και επάγεται σε συνθήκες ψύχους για την ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων με την εναπόθεση λιγνίνης Η εναπόθεση λιγνίνης καθιστά τα κυτταρικά τοιχώματα ανθεκτικά στις μηχανικές καταπονήσεις και στη διείσδυση παθογόνων, ενώ τα αδιαβροχοποιεί μειώνοντας τις απώλειες νερού (Jeong et al 2012).

Εκτός της προλίνης και της φαινυλαλανίνης, στην ποικιλία Rusticano, αυξημένη συγκέντρωση στις 48 ώρες καταπόνησης παρουσιάζουν και τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και γλουταμίνη (Πιν.3.3.3). Ομοίως, έχει παρατηρηθεί ότι τρυπτοφάνη συσσώρευσε μόνο η ανθεκτική στο ψύχος ποικιλία ρυζιού, ενώ στην ευαίσθητη ποικιλία τα επίπεδα του συγκεκριμένου αμινοξέος παρέμειναν αμετάβλητα (Zhao et al 2013). Σε διαγονιδιακά φυτά ρυζιού τα οποία συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες τρυπτοφάνης, είναι πιθανό η τρυπτοφάνη να λειτουργεί ως αντιοξειδωτική ουσία προστατεύοντας τις πρωτεΐνες των χλωροπλαστών από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (λόγω του ότι τόσο το συγκεκριμένο αμινοξύ όσο και οι ενεργές μορφές οξυγόνου συντίθενται στους χλωροπλάστες) με αποτέλεσμα να παρατηρούνται λίγες αρνητικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των φυτών (Doubouzet et al 2007). Πρωτεομική ανάλυση των ίδιων φυτών έδειξε συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην εξουδετέρωση των ROS και της οξειδωτικής καταπόνησης (Ford et al 2011). Χορήγηση τρυπτοφάνης σε φυτά σιταριού και καλαμποκιού είχε ως συνέπεια την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης και της παραγωγής των ανωτέρω καλλιεργειών (Martens and Frankenberger 1994, Sarwar and Frankenberger 1994). Στο φυτό Arabidopsis το μονοπάτι βιοσύνθεσης της τρυπτοφάνης οδηγεί στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών (πχ αυξινών, φυτοαλεξινών κ.α.), οι οποίοι λειτουργούν ως ρυθμιστές στην ανάπτυξη των φυτών, στην άμυνα ενάντια στα παθογόνα και σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Kutchan 1995, Radwanski and Last 1995). Επομένως στην παρούσα εργασία, η βιοσύνθεση της τρυπτοφάνης σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών είναι πιθανό να σχετίζεται με την ανάγκη των φυτών της ποικιλίας Rusticano να συνθέσουν δευτερογενείς μεταβολίτες ή η τρυπτοφάνη να λειτουργεί ως αντιοξειδωτική ουσία στην ανωτέρω ανθεκτική ποικιλία.

Η γλουταμίνη αποτελεί την κύρια πηγή αζώτου στα φυτά και συντίθεται από το γλουταμινικό οξύ και την αμμωνία μέσω του ενζύμου συνθετάση της γλουταμίνης (GS). Στη συνέχεια, ακολουθεί αναγέννηση του γλουταμινικού οξέος μέσω της συνθάσης του γλουταμινικού (GOGAT), με τη μεταφορά της αμινομάδας της γλουταμίνης στο ακετογλουταρικό οξύ (Temple et al 1998, Ireland and Lea 1999). Τα φυτά είναι πιθανό να χρησιμοποιούν το γλουταμινικό οξύ και τη γλουταμίνη ως δότες αζώτου για τη βιοσύνθεση και άλλων χρήσιμων αμινοξέων, νουκλεοτιδίων και χλωροφύλλης (Coruzzi 2003). Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι εκτός από την προλίνη και η γλουταμίνη εμφανίζεται να έχει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των φυτών ενάντια στην καταπόνηση ψύχους (Taji et al 2002, Cook et al 2004, Kaplan and Guy, 2004). Επομένως, είναι πιθανό η συσσώρευση της γλουταμίνης στην ανθεκτική ποικιλία Rusticano να σχετίζεται με τον εγκλιματισμό της στο ψύχος.

Όπως προκύπτει από τη μεταβολομική ανάλυση των 2 μελετώμενων ποικιλιών σκληρού σίτου, η συσσώρευση των αμινοξέων αποτελεί δείκτη ανταπόκρισης του σκληρού σίτου στις χαμηλές θερμοκρασίες σε επίπεδο φυταρίου. Επιπλέον συγκριτικά με την ποικιλία Grazia, η ποικιλία Rusticano εμφάνισε μεγαλύτερο αριθμό αμινοξέων που αύξησαν τη συγκέντρωσή τους μετά από 48 ώρες καταπόνησης στους 4°C.

Οργανικά Οξέα: Στις περισσότερες μελέτες τα οργανικά οξέα καθώς και τα ενδιάμεσα παράγωγα του κύκλου του κιτρικού οξέος αυξάνουν τη συγκέντρωσή τους μετά από καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών (Kaplan et al 2004, Usadel et al 2008, Urano et al 2009). Αυτό συμβαίνει επειδή τα οργανικά οξέα είναι πιθανό να λειτουργούν ως ενδιάμεσα μόρια στο μεταβολισμό του άνθρακα και ως σημαντικά μόρια στην ανταπόκριση των φυτών στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Lopez-Bucio et al 2000, Korn et al 2010).

Στην παρούσα μελέτη, η μεταβολομική ανάλυση έδειξε μείωση της συγκέντρωσης του ισοκιτρικού οξέος στο υπέργειο τμήμα και των 2 ποικιλιών, ενώ τα επίπεδα των άλλων 2 μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν, του μηλικού και του ασκορβικού οξέως παρέμειναν αμετάβλητα και στις 2 ποικιλίες (Πιν.3.3.3). Μειωμένα επίπεδα του ισοκιτρικού οξέος παρατηρήθηκαν και στις 2 ποικιλίες ρυζιού μετά από 48 ώρες καταπόνησης ψύχους (Zhao et al 2013). Είναι πιθανό η παραγωγή ενέργειας να παρουσίασε μείωση στο σκληρό σιτάρι, όπως και το ρύζι μετά την καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών. Αντίθετα, όπως προαναφέρθηκε στην περίπτωση της αλατότητας, η αύξηση των οργανικών οξέων κυρίως του κύκλου του κιτρικού οξέος έχει προταθεί ως ένας μηχανισμός προσαρμογής των φυτών, για μικρό χρονικό διάστημα, στην αλατότητα (Zuther et al 2007, Sanchez et al 2008).

Το ασκορβικό οξύ, τόσο στις 2 ποικιλίες σκληρού σίτου, διατήρησε τη συγκέντρωσή του σε φυσιολογικά επίπεδα, μετά από 48 ώρες καταπόνησης στους 4°C (Πιν.3.3.2.1). Ωστόσο, μελέτη που έχει γίνει στο ρύζι έδειξε συσσώρευση του ασκορβικού οξέος αμέσως μετά την εφαρμογή της καταπόνησης, δηλαδή μετά από 8 ώρες παραμονής των φυταρίων στους 4°C. Άλλη μελέτη σε 4 ποικιλίες ρυζιού που καταπονήθηκαν για 5 ημέρες στους 8°C έδειξε ότι η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (καταλάση, δεσμουτάση του υπεροξειδίου και υπεροξειδάση του ασκορβικού) καθώς και οι αντιοξειδωτικές ουσίες ασκορβικό οξύ και γλουταθειόνη αυξήθηκαν μετά τις 3 ημέρες καταπόνησης στις ανθεκτικές ποικιλίες και στη συνέχεια ελαττώθηκαν μέχρι το τέλος της καταπόνησης (Guo et al 2006). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη παραμένει αμετάβλητη μετά από 48 ώρες καταπόνησης στους 4°C (Πιν.3.3.3). Επομένως, στην παρούσα μελέτη παρατηρείται ισορροπία στη λειτουργία του κύκλου ασκορβικού οξέος-γλουταθειόνης και στις 2 ποικιλίες σκληρού σίτου μετά από 48 ώρες καταπόνησης ψύχους. Είναι γνωστό ότι ο ανωτέρω κύκλος αποτελεί τη σημαντικότερη βιοχημική οδό εξουδετέρωσης των ενεργών μορφών οξυγόνου και διαδραματίζει ρόλο ανακύκλωσης και αναγέννησης των συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών ουσιών (Mittler 2002).

Σάκχαρα: Έχει αναφερθεί ότι ο μεταβολισμός των υδατανθράκων έχει κρίσιμο ρόλο στην προσαρμογή των φυτών στο ψύχος (Maruyama et al 2009). Είναι γνωστό ότι τα σάκχαρα σχετίζονται με την προσαρμογή/ανθεκτικότητα των φυτών στο ψύχος, διότι λειτουργούν ως ωσμωπροστατευτικές ουσίες και παρέχουν ενέργεια στα φυτά, προκειμένου να αντιμετωπίσουν αυτό τον παράγοντα καταπόνησης (Guy et al 2008). Επιπλέον, οι Kaplan et al (2007) αναφέρουν ότι η αποδόμηση του αμύλου, σε φυτά *Arabidopsis* που καταπονήθηκαν από χαμηλές θερμοκρασίες, οδήγησε στη βιοσύνθεση της σακχαρόζης και μετέπειτα της φρουκτόζης και της γλυκόζης. Οι προαναφερθέντες υδατάνθρακες καθώς και ο ολιγοσακχαρίτης, ραφινόζη, σχετίζονται με την ανθεκτικότητα φυτών *Arabidopsis* στο ψύχος (Hannah et al 2006, Korn et al 2010).

Όπως και στην περίπτωση της καταπόνησης άλατος, μόνο η σακχαρόζη ταυτοποιήθηκε από τη μεταβολομική ανάλυση του υπέργειου τμήματος των 2 μελετώμενων ποικιλιών σκληρού σίτου (Πιν.3.3.3). Η συγκέντρωση της σακχαρόζης ελαττώθηκε στην ποικιλία Rusticano, ενώ παρέμεινε αμετάβλητη στην ποικιλία Grazia. Ομοίως, χαμηλή συγκέντρωση σακχάρων αναφέρεται στο ρύζι, όπου αρκετά σάκχαρα, μεταξύ αυτών και η σακχαρόζη, παρουσίασαν δραματική μείωση λόγω του ψύχους, κυρίως μετά τις 2, 8, 24 ώρες από την έναρξη της καταπόνησης και άρχισαν να επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα ή και να αυξάνεται η συγκέντρωσή τους μετά τις 48 ώρες καταπόνησης καθώς και μετά από επαναφορά των φυτών σε φυσιολογικές συνθήκες (Zhao et al 2013). Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα των ανωτέρω ερευνητών είναι πιθανό οι 48 ώρες καταπόνησης να αποτελούν οριακό χρονικό διάστημα για την επαναφορά του συγκεκριμένου σακχάρου στα φυσιολογικά επίπεδα ή ακόμα και την αύξηση της συγκέντρωσής του, που θα σήμαινε ότι και αυτός ο μεταβολίτης εκτός της προλίνης σχετίζεται με τον εγκλιματισμό των φυταρίων σκληρού σίτου στις συνθήκες ψύχους. Δυστυχώς η ταυτοποίηση και μόνο της σακχαρόζης από την κατηγορία των υδατανθράκων μας δίνει λίγα δεδομένα σχετικά με την ανταπόκριση των σακχάρων στο

ψύχος. Επιπλέον, οι Fuller et al (1999) κατέληξαν ότι τόσο το άμυλο, όσο και η σακχαρόζη δεν αποτελούν αξιόπιστους δείκτες ανθεκτικότητας στο ψύχος φυτών Zoysia japonica.

Λιπίδια-Λιπαρά Οξέα: Η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελεί το τμήμα του φυτικού κυττάρου με το οποίο εξασφαλίζεται η επικοινωνία του με το εξωτερικό περιβάλλον. Στις άμεσες αντιδράσεις της αλληλεπίδρασης των φυτών με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι η μεταβίβαση σήματος μέσα στα κύτταρα μέσω της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνικών κινασών, η διακυτταρική επικοινωνία μέσω των φυτορμονών και η παραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου στην κυτταρική μεμβράνη (Maffei et al 2007). Κατά τη διάρκεια αυτών των αλληλεπιδράσεων η σύνθεση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης μεταβάλλεται. Υπάρχουν έρευνες που αναφέρουν τις αλλαγές στη σύνθεση των λιπιδίων υπό την επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων και κυρίως σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών (Cyril et al 2002, Welti et al 2002, Wang et al 2006).

Στην παρούσα μελέτη η συγκέντρωση του λινολενικού οξέος παρέμεινε αμετάβλητη και στις 2 ποικιλίες σκληρού σίτου (Πιν.3.3.3) αν και υψηλή συγκέντρωση του ανωτέρω οξέος έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με προσαρμογή των φυτών στο ψύχος (Graham και Patterson 1982, Iba 2002, Welti et al 2002) διότι επηρεάζει τη ρευστότητα των μεμβρανών και την ικανότητα των φυτών ν' αντέχουν στις ακραίες θερμοκρασίες. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι μεμβράνες του φύλλου του σιταριού δεν παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές στη ρευστότητά τους σε ένα σχετικά μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 0-40°C (Κατινάκης 1999). Επιπλέον, η παραμονή των φυτών και των 2 μελετώμενων ποικιλιών σκληρού σίτου για 48 ώρες στους 4°C προκάλεσε αύξηση στη συγκέντρωση της μονογαλακτοσυλο-διακυλογλυκερόλης (MGDG), ενώ μείωση στη συγκέντρωση της φωσφατιδοχολίνης (PC) στο υπέργειο τμήμα των 2 ποικιλιών. Επειδή тα γλυκερογλυκολιπίδια (MGDG, DGDG) αποτελούν τα κύρια στοιχεία των μεμβρανών των χλωροπλαστών και είναι τα πιο άφθονα στα φύλλα των φυτών έχει αναφερθεί ότι σε φυτά Arabidopsis, είναι απαραίτητα κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης (Aronsson 2008). Για παράδειγμα, σε μεταλλαγμένα mgd1 φυτά Arabidopsis (~40% μικρότερη συσσώρευση MGDG) η δραστηριότητα του ενζύμου συνθάση της MGDG ελαττώθηκε κατά 50% σε σχέση με φυτά μάρτυρες, ενώ τα επίπεδα του γλυκερογλυκολιπιδίου MGDG και της χλωροφύλλης μειώθηκαν (Jarvis et al 2000). Είναι πιθανό, η αύξηση του συγκεκριμένου γλυκερολιπιδίου στην ανθεκτική στο ψύχος, ποικιλία Rusticano (Πιν.3.3.3), να σχετίζεται με διατήρηση της φωτοσυνθετικής της δραστηριότητα ή μετά από αποδόμησή της να ακολουθεί ανακύκλωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από τα πλαστίδια προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη, προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση του ακόρεστου φωσφολιπιδίου φωσφατιδοχολίνη και να διατηρηθεί με αυτό τον τρόπο η ρευστότητα των μεμβρανών (Konig et al 2007). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η λυσοφωσφατιδογλυκερόλη

(LPG) δε φαίνεται να παίζει ενεργό ρόλο στους φυτικούς ιστούς σε συνθήκες ψύχους (θερμοκρασίες >0°C) (Wang et al 2006, Li et al 2008), ενώ σε συνθήκες παγετού (θερμοκρασίες <0°C) η συγκέντρωση των λυσοφωσφολιπιδίων αυξάνεται από 5 έως 10 φορές (Welti et al 2002, Wang et al 2006).

Πίνακας 3.3.3 Σχετική συγκέντρωση πρωτογενών μεταβολιτών και μεταβολή αυτών στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης ψύχους, στους 4°C. Η σχετική συγκέντρωση κάθε μεταβολίτη είναι ο μέσος όρος 3 βιολογικών επαναλήψεων Οι τιμές με έντονη γραφή (bold) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά των ποικιλιών σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα. Τα σύμβολα (* και **) δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά των εφαρμογών της ίδιας ποικιλίας, σύμφωνα με το t-test, ενώ τα διαφορετικά σύμβολα (a, b) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05), μεταξύ των 2 ποικιλιών, σύμφωνα με το t-test.

	Rusticano		Grazia		4°C / 22°C	
Πρωτογενείς Μεταβολίτες	Μάρτυρας (22°C)	Ψύχος (4°C)	Μάρτυρας (22°C)	Ψύχος (4°C)	Rusticano	Grazia
Αμινοξέα						
1 Αλανίνη	0,36	0,44	1,15	0,62	1,22	0,54
2 Γλουταμινικό Οξύ	8,13	8,30	8,66	9,93	1,02	1,15
3 Γλουταμίνη	9,59	20,09	8,25	11,97	2,1*	1,45
4 Γλουταθειόνη	0,39	2,85	2,64	4,64	7,3	1,75
5 Ισολευκίνη	0,22	0,78	5,59	2,65	3,54	0,47*
6 Φαινυλαλανίνη	53,33	236,57	60,79	189,37	4,43**a	3,11*b
7 Προλίνη	1,16	6,68	2,33	3,73	5,74**a	1,60*b
8 Τρυπτοφάνη	71,50	123,86	63	48,31	1,73*	0,77
9 Βαλίνη	80,32	51,62	114,50	90,57	0,64	0,79
Οργανικά Οξέα						
1 Ασκορβικό Οξύ	157,94	98,88	64,02	123,93	0,62	1,94
2 Ισοκιτρικό οξύ	3,063	0,58	1,41	0,23	0,20*a	0,16*b
3 Μηλικό Οξύ	86,32	82,14	181,98	61,47	0,95	0,34
Σάκχαρα						
1 Σακχαρόζη	0,95	0,70	1,81	1,16	0,74*	0,64
Λιπίδια-Λιπαρά Οξέα						
1 Λινολενικό οξύ	26,00	39,33	88,24	18,91	1,5	0,21
2 Φωσφατιδοχολίνη	121,13	56,29	203,67	24,19	0,46*a	0,12*b
3 Λυσοφωσφατιδογλυκερόλη	45,70	7,60	0,02	0,00	0,16*	0,00
4 Μονογαλακτοσυλο-διακυλογλυκερόλη	90,28	516,37	170,41	526,02	5,71*a	3,09*b
5 Διγαλακτοσυλο-διακυλογλυκερόλη	6,1	7,04	10,35	2,19	1,15	0,21*

Στον Πίνακα 3.3.4 αναγράφονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης ψύχους, η σχετική συγκέντρωση των μεταβολιτών σε κάθε ποικιλία στους 4°C και 22°C καθώς και το πόσο μεταβλήθηκαν σε σχέση με το μάρτυρα. Όπως και στην καταπόνηση άλατος, έτσι και στην περίπτωση των χαμηλών θερμοκρασιών οι δευτερογενείς μεταβολίτες στην ποικιλία Rusticano εμφάνισαν διαφοροποίηση (P<0.05) σε σχέση με την ποικιλία Grazia, στην οποία η πλειοψηφία μεταβολιτών φαίνεται να μην επηρεάστηκε από την καταπόνηση ψύχους. Στη συνέχεια γίνεται περιγραφή και ανάλυση των δευτερογενών μεταβολιτών, δηλαδή των αζωτούχων και των φαινολικών ενώσεων, που ταυτοποιήθηκαν στους 4°C.

Αζωτούχες Ενώσεις

<u>Κυανογόνα και μη-Κυανογόνα Γλυκοσίδια</u>. Όπως προαναφέρθηκε και στην περίπτωση της καταπόνησης άλατος τα γλυκοσίδια προέρχονται από πρόδρομα μόρια αμινοξέων και ενισχύουν αμυντικά τα φυτικά κύτταρα εναντίον κυρίως φυτοφάγων οργανισμών. Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι σε διάφορα είδη της οικογένειας *Poaceae* (Kriechbaumer et al 2007), χρησιμεύουν ως αποθήκες αζώτου παρέχοντας τη δυνατότητα ανακύκλωσης του αζώτου για τη σύνθεση αμινοξέων του πρωτογενούς μεταβολισμού (Jenrich et al 2007). Επομένως δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε αύξηση των γλυκοσιδίων, λοτοστραλίνη και νεολινουστατίνη στο υπέργειο τμήμα της ανθεκτικής στο ψύχος ποικιλίας Rusticano, ενώ τα επίπεδά τους παρέμειναν αμετάβλητα στην ποικιλία Grazia (Πιν. 3.3.4). Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν εργασίες σχετικά με τη σύνθεση γλυκοσιδίων σε συνθήκες καταπόνησης ψύχους. Μόνο σε μία εργασία αναφέρεται ότι παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της λοτοστραλίνης, σε νερά φυτάρια *L. usitatissimum* μετά από παραμονή των φυταρίων στους 30°C (Siegien and Gierasimiuk 2001). Ωστόσο οι Kaplan et al (2004) αναφέρουν ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από αμινοξέα που έχουν διακλάδωση στην ανθρακική τους αλυσίδα (βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη) σχετίζονται με την άμυνα των φυτών εναντίον των παθογόνων κατά τη διάρκεια καταπόνησης ψύχους. Δηλαδή η σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών είναι πιθανό να αποτελεί ένα προληπτικό αμυντικό μηχανισμό των φυτών έναντι παθογόνων μικροοργανισμών τη στιγμή που τα φυτά καταπονούνται από χαμηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον τα ανωτέρω γλυκοσίδια με τη διάσπασή τους είναι πιθανό να ανατροφοδοτήσουν τον πρωτογενή μεταβολισμό με άζωτο για τη σύνθεση αμινοξέων και την περαιτέρω ανάπτυξη των φυτών.

<u>Κυκλικά Υδροξαμικά Οξέα (Hxs)</u>: Στις 48 ώρες καταπόνησης ψύχους των μελετώμενων φυταρίων σκληρού σίτου παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση όλων των γλυκοσιδίων που ανιχνεύθηκαν (DIMBOA-Glc, HDMBOA-Glc, HMBOA-Glc και

TRIBOA-Glc) μόνο στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων της ποικιλίας Rusticano (Πιν. 3.3.4). Επιπρόσθετα, στις 48 ώρες καταπόνησης παρατηρήθηκε και συσσώρευση του αμινοξέος τρυπτοφάνη στην ίδια ποικιλία, πιθανόν ως αποτέλεσμα της αυξημένης δραστηριότητας του μονοπατιού του σικιμικού οξέος, το οποίο με τη σειρά του τροφοδοτεί τη σύνθεση των Hxs (Bxs). Σε φυτά *Arabidopsis* που έχουν υποστεί καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών (4°C) αναφέρεται ότι η σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών, που προέρχονται από τα αρωματικά αμινοξέα καθιστά τα φυτά πιο ανθεκτικά στις βιοτικές καταπονήσεις (Kaplan et al 2004). Ωστόσο, μικρός αριθμός εργασιών υπάρχει σχετικά με την επίδραση των αβιοτικών καταπονήσεων στη σύνθεση των Ανωτέρω γλυκοσιδίων υπό την επίδραση υψηλής έντασης φωτός (Manuwoto and Scriber 1986), μεγάλης φωτοπεριόδου (Epstein et al 1986) και υψηλών θερμοκρασιών (Epstein et al 1986).

<u>-Αμίδια του Υδρόξυκινναμικού οξέος (HCAAs) ή Φαινολοαμίδια</u>: Μετά από 48 ώρες καταπόνησης των φυταρίων των 2 ποικιλίων Rusticano και Grazia στους 4°C δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στη συγκέντρωση των φαινολοαμιδίων κουμαροϋλπουτρεσκίνη και κουμαροϋλαγματίνη (Πιν. 3.3.4). Ομοίως, έχει αναφερθεί ότι η κουμαροϋλπουτρεσκίνη δεν παρουσίασε μεταβολή στη συγκέντρωσή της κατά την περίοδο εγκλιματισμού στο ψύχος φυτών *T. aestivum*, ενώ παρουσίασε συσσώρευση σε συνθήκες παγετού (Jin et al 2003). Επιπλέον, υπάρχει μία αναφορά σχετικά με τη συγκέντρωση ενός άλλου συμπλόκου του υδρόξυκινναμικού οξέος, της φερουϋλαγματίνης σε φυτά *T. aestivum* για μικρό χρονικό διάστημα σε χαμηλές θερμοκρασίες (Jin and Yoshiba 2000).

Φαινολικές Ενώσεις

Εστέρες του σιναπικού οξέος: Έχει αναφερθεί ότι τόσο οι αβιοτικές όσο και οι βιοτικές καταπονήσεις επάγουν τη συσσώρευση των φαινολικών ενώσεων (Dixon et al 2002, Naoumkina et al 2010). Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις συντίθενται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος όπου λαμβάνει χώρα απαμίνωση του αρωματικού αμινοξέος, φαινυλαλανίνη και παραγωγή του κινναμικού οξέος. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο αμμώνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης (Dixon and Paiva 1995). Η ομάδα των φαινολικών περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλομορφία συμπλόκων, όπως εστέρες του υδρόξυκινναμικού οξέος, λιγνάνες, φλαβονοειδή και ανθοκυάνες, ως αντίδραση στη δράση διαφορετικών ενζύμων, των οποίων τα μεταγραφικά επίπεδα αυξάνονται ανάλογα με τον ιστό, και το στάδιο ανάπτυξης των φυτών (Dixon et al 2002, Naoumkina et al 2010, Hichri et al 2011). Στο φυτό *Arabidopsis*, τα τελικά προϊόντα του μονοπατιού των φαινολοπροπανοειδών είναι οι εστέρες του σιναπικού οξέος που συντίθενται από ακυλτρανσφεράσες που έχουν ως υπόστρωμα το μεταβολίτη 1-Ο-σιναποϋλο-γλυκόζη (1-Ο-sinapoyl-b-glucose, SG) (Fraser et al 2007). Η αφθονία των εστέρων αυτών ρυθμίζεται αναπτυξιακά κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής των φυτών. Η SG αποτελεί πρόδορομη

ένωση για τη σύνθεση του σιναποϋλομηλικού (sinapoyl-malate, SM) που συσσωρεύεται στα φύλλα (Landry et al 1995), της σιναποϋλοχολίνης (sinapoyl-choline, SC) που βρίσκεται στα έμβρυα και παρέχει σιναπικό οξύ και χολίνη τα νεαρά φυτάρια (Milkowski et al 2004) και της ανθοκυανίνης του σινναπικού οξέος, που συσσωρεύεται σε φυτά που έχουν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, προστατεύοντας τους φυλλώδεις ιστούς από τις φωτοξειδωτικές ζημιές (Steyn et al 2002).

Κατά τη μεταβολομική ανάλυση των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου προέκυψε συσσώρευση της σιναποϋλο-γλυκόζης στο υπέργειο τμήμα μόνο της ποικιλίας Rusticano, ενώ στην Grazia η συγκέντρωση του μεταβολίτη δε μεταβλήθηκε μετά από 48 ώρες καταπόνησης στους 4°C (Πιν. 3.3.4). Η σιναποϋλο-γλυκόζη αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση του σιναποϋλο-μηλικού στα φύλλα των φυτών, μέσω της 1-Οσιναποϋλογλυκόζης: μηλικής σιναποϋλοτρανσαφεράσης (sinapoylglucose: malate sinapoyltransferase, SMT). Μειωμένη συγκέντρωση του σιναποϋλο-μηλικού σχετίζεται με λιγότερη σύνθεση λιγνίνης, μέσω της δράσης του ενζύμου μεθυλοτρανσφεράσης του καφεϊκού οξέος (COMT) (που οδηγεί στη σύνθεση της σιναπαλδεύδης) σε φυτά Arabidopsis (Goujon et al 2003). Μεταβολομική ανάλυση σε διαγονιδιακά φυτά Arabidopsis στα οποία υπερεκφράστηκε το γονίδιο Osmyb4 (έχει σημαντικό ρόλο στον εγκλιματισμό φυτών στο ψύχος) έδειξε υψηλή συγκέντρωση του σιναποϋλο-μηλικού στα φύλλα του ανωτέρω φυτού σε σχέση με το μάρτυρα, μετά από 48 ώρες καταπόνησης στους 4°C (Mattana et al 2005). Οι ανωτέρω συγγραφείς υποστηρίζουν ότι το συγκεκριμένο σύμπλοκο, μεταξύ άλλων μεταβολιτών, αποτελεί δείκτη ανθεκτικότητας των φυτών στο ψύχος. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι καταστολή της έκφρασης σιναπικών εστέρων σε διαγονιδικά φυτά Arabidopsis, είχε ως αποτέλεσμα την ευαισθησία των φυτών στην υπεριώδη ακτινοβολία, με αποτέλεσμα να δέχονται τη ζημιογόνο δράση της UV-B ακτινοβολίας (Jin et al 2000, Landry et al 1995).

Πίνακας 3.3.4 Σχετική συγκέντρωση δευτερογενών μεταβολιτών στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης

ψύχους, στους 4°C.

	Rusticano		Grazia		4°C / 22°C		
Δευτερογενείς Μεταβολίτες	Μάρτυρας (22°C)	Ψύχος (4°C)	Μάρτυρας (22°C)	Ψύχος (4°C)	Rusticano	Grazia	
Αζωτούχες Ενώσεις							
<u>Κυανογόνα και μη-Κυανογόνα Γλυκοσίδια</u>							
1 Λιναμαρίνη	57,30	160,38	0,00	0,00	2,80	0,00	
2 Λοτοστραλίνη	167,11	395,98	0	0,03	2,37**	0,00	
3 Νεολινουστατίνη	0,91	21,33	0,015	0,02	23,51*	1,33	
Κυκλικά Υδροξαμικά Οξέα							
1 HMBOA- Glc	15,56	102,46	0,00	0,01	6,58*	0,00	
2 TRIBOA-Glc	1,70	17,45	0,30	1,58	10,27**	5,27	
3 DIMBOA-GIC	5,30	48,29	1,84	2,67	9,11**	1,43	
4 HDMBOA-Glc	1,07	27,75	0,48	0,38	25,86**	0,79	
5 MBOA	100,05	136,14	137,70	170,00	1,36	1,23	
Αμίδια του Υδρόξυκινναμικού οξέος							
1 4-Κουμαροϋλπουτρεσκίνη	12,25	34,58	8,78	3,15	2,82	0,36**	
2 ρ-Κουμαροϋλαγματίνη	20,75	38,61	41,28	19,23	1,86	0,47	
Φαινολικές Ενώσεις							
Εστέρες του Σιναπικού οξέος							
1 1-Ο-Σιναποϋλογλυκόζη	9,49	66,31	6,05	10,61	6,98**	1,75	

Η σχετική συγκέντρωση κάθε μεταβολίτη είναι ο μέσος όρος 3 βιολογικών επαναλήψεων. Οι τιμές με έντονη γραφή (bold) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά των ποικιλιών σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα. Τα σύμβολα (* και **) δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05 και P<0,01 αντίστοιχα) μεταξύ των εφαρμογών της ίδιας ποικιλίας, σύμφωνα με το t-test, ενώ τα διαφορετικά σύμβολα (a, b) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05), μεταξύ των 2 ποικιλιών, σύμφωνα με το t-test.

ΗΜΒΟΑ-Glc : 2-(2-διύδροξυ-7-μεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη)-β-D-γλυκοπυρανόζη

TRIBOA-Glc: 2 (4,7-τριύδροξυ-2H-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη)-β-D-γλυκοπυρανόζη

DIMBOA-Glc : 2-(2,4-διύδροξυ-7-μεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη)-β-D-γλυκοπυρανόζη

HDMBOA-Glc :2-(4,7-διμεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη)-β-D-γλυκοπυρανόζη

ΜΒΟΑ : 6-μεθοξυ-2-βενζοξαζολιόνη

3.3.3 Στατιστική Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)

Στην περίπτωση των πειραμάτων της έκθεσης των φυτών σε υψηλή συγκέντρωση άλατος (200 mM NaCl) για 48 ώρες, η στατιστική ανάλυση των κύριων συνιστωσών έδειξε ότι οι επαναλήψεις των εφαρμογών της ποικιλίας Rusticano ομαδοποιούνται στο ίδιο σημείο του κάθε άξονα, ενώ οι επαναλήψεις των εφαρμογών της ποικιλίας Grazia παρουσιάζουν διαφοροποίηση ως προς τον άξονα t1 στην περίπτωση του μάρτυρα και τον άξονα t2 για τα φυτά που είχαν εκτεθεί σε υψηλή συγκέντρωση άλατος. Ο t1 άξονας επεξηγεί το 30 % της διακύμανσης των τιμών ενώ ο t2 άξονας το 20 %. Όπως παρατηρείται από την Εικ. 3.3.1 ο t1 άξονας διαχωρίζει τις δύο ποικιλίες και ο t2 άξονας τις εφαρμογές της υψηλής συγκέντρωσης άλατος (200 mM NaCl) και του μάρτυρα (0 mM NaCl). Συνεπώς πρωτεύον ρόλο στη διακύμανσης των τιμών έχει η ποικιλία και δευτερεύουσα σημασία η συγκέντρωση άλατος.



Εικόνα 3.3.1 Απεικόνιση της στατιστικής ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) του μεταβολικού προτύπου του υπέργειου τμήματος των ποικιλιών Rusticano και Grazia σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες αλατότητας για 48 ώρες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μεταβολομικό πρότυπο ενός δείγματος.

Η στατιστική ανάλυση των κύριων συνιστωσών στα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης των φυτών των 2 ποικιλιών που είχαν εκτεθεί σε 4°C και 22°C (μάρτυρας) για 48 ώρες έδειξε ότι οι επαναλήψεις της κάθε εφαρμογής ομαδοποιούνται στο ίδιο σημείο του κάθε άξονα και οι εφαρμογές διαφοροποιούνται μεταξύ τους ως προς τον t1 ή t2 άξονα. Ο t1 άξονας επεξηγεί το 31 % της διακύμανσης των τιμών ενώ o t2 άξονας το 19 %. Όπως παρατηρείται από την Εικ. 3.3.2 o t1 άξονας διαχωρίζει τις εφαρμογές του ψύχους (4°C) και του μάρτυρα (22°C) και o t2 άξονας τις δύο ποικιλίες. Συνεπώς πρωτεύον ρόλο στη διακύμανση των τιμών έχει η θερμοκρασία και δευτερεύουσα σημασία η ποικιλία.



Εικόνα 3.3.2 Απεικόνιση της στατιστικής ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) του μεταβολικού προτύπου του υπέργειου τμήματος των ποικιλιών Rusticano και Grazia σε φυσιολογικές συνθήκες ψύχους για 48 ώρες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μεταβολομικό πρότυπο ενός δείγματος.

3.3.4 Εφαρμογή των Αποτελεσμάτων στο Μεταβολικό Δίκτυο

Μετά τη στατιστική επεξεργασία των μεταβολιτών ακολούθησε η απεικόνισή τους στο μεταβολικό δίκτυο. Ο σχεδιασμός του μεταβολικού δικτύου έγινε βάσει των πληροφοριών της διαδικτυακής βάσης δεδομένων KEGG PATHWAY Datadase (<u>http://www.genome.jp/kegg/pathway.html</u>). Στις Εικόνες 3.3.3 και 3.3.4 παρουσιάζονται οι 29 πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες, που ταυτοποιήθηκαν, σε πλαίσιο. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες επισημαίνονται με μαύρη έντονη γραφή (bold), ενώ οι δευτερογενείς με κόκκινη έντονη γραφή (bold). Η στατιστικά σημαντική αύξηση ή μείωση στη συγκέντρωση των μεταβολιτών σε επίπεδο ποικιλιών, όπως αναφέρονται στους Πίνακες 3.3.1, 3.3.2 για την καταπόνηση άλατος και στους Πίνακες 3.3.3, 3.3.4 για την καταπόνηση ψύχους, παρουσιάζεται με κόκκινη ή κίτρινη επισήμανση αντίστοιχα, ενώ ο διαχωρισμός ανάμεσα στις ποικιλίες ανάλογα με τα επίπεδα συσσώρευσης των μεταβολιτών παρουσιάζεται με υπογράμμιση της εκάστοτε ποικιλίας.

Στην περίπτωση της καταπόνησης άλατος, το μονοπάτι βιοσύνθεσης των αμινοξέων που φέρουν πλευρικές αλειφατικές αλυσίδες επηρεάζεται στην ποικιλία Grazia. Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζει η μεγάλη συσσώρευση του αμινοξέος, προλίνη, στην ίδια ποικιλία. Επιπλέον, η βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών στην ίδια ποικιλία δεν επηρεάζεται από την καταπόνηση άλατος. Αντίθετα, η ποικιλία Rusticano συσσωρεύει περισσότερους μεταβολίτες (αμινοξέα, δευτερογενείς μεταβολίτες, φωσφολιπίδια) από την ποικιλία Grazia, και η έγκαιρη αντίδρασή της την καθιστά πιο ανθεκτική σε αυτόν τον παράγοντα καταπόνησης (Εικ. 3.3.3).

Η καταπόνηση ψύχους αποτυπώνει την ανθεκτικότητα της ποικιλίας Rusticano έναντι της ποικιλίας Grazia, με τη βιοσύνθεση περισσότερων αμινοξέων και δευτερογενών μεταβολιτών στο υπέργειο τμήμα της Rusticano. Η ικανότητα των φυταρίων της Rusticano να εγκλιματίζεται σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών είναι πιθανό να σχετίζεται με το μέγεθος των επαγόμενων, λόγω ψύχους, αλλαγών στο μεταβολομικό της προφίλ (Εικ. 3.3.4).

Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων που είναι σημαντικός για την ανθεκτικότητα των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις δεν μπορεί να αποτυπωθεί στο μονοπάτι της γλυκόλυσης διότι η μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε δεν επιτρέπει την ανίχνευση αυτών των μεταβολιτών.



Εικόνα 3.3.3 Χαρτογράφηση των επιπέδων των 29 μεταβολιτών, που ταυτοποιήθηκαν στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης άλατος (200mM NaCl), στα μονοπάτια του μεταβολικού δικτύου. Οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται σε πλαίσιο. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες επισημαίνονται με μαύρη γραφή, ενώ οι δευτερογενείς με κόκκινη γραφή. Η στατιστικά σημαντική αύξηση ή μείωση στη συγκέντρωση των μεταβολιτών σε επίπεδο ποικιλιών, όπως αναφέρονται στους Πίνακες 3.3.1.1, 3.3.1.2 παρουσιάζεται με κόκκινη ή κίτρινη επισήμανση αντίστοιχα, ενώ ο διαχωρισμός των ποικιλιών ανάλογα με τα επίπεδα συσσώρευσης των μεταβολιτών παρουσιάζεται με υπογράμμιση της ποικιλίας. Όπου R: ποικιλία Rusticano και G: ποικιλία Grazia.



Εικόνα 3.3.4 Χαρτογράφηση των επιπέδων των 29 μεταβολιτών, που ταυτοποιήθηκαν στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης ψύχους (4°C), στα μονοπάτια του μεταβολικού δικτύου. Οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται σε πλαίσιο. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες επισημαίνονται με μαύρη γραφή, ενώ οι δευτερογενείς με κόκκινη γραφή. Η στατιστικά σημαντική αύξηση ή μείωση στη συγκέντρωση των μεταβολιτών σε επίπεδο ποικιλιών, όπως αναφέρονται στους Πίνακες 3.3.2.1, 3.3.2.2 παρουσιάζεται με κόκκινη ή κίτρινη επισήμανση αντίστοιχα, ενώ ο διαχωρισμός των ποικιλιών ανάλογα με τα επίπεδα συσσώρευσης των μεταβολιτών παρουσιάζεται με υπογράμμιση της ποικιλίας. Όπου R: ποικιλία Rusticano και G: ποικιλία Grazia.

3.4 Συμπεράσματα

Ο καλύτερος εγκλιματισμός των φυτών της ποικιλίας Rusticano έναντι της Grazia μετά από 48 ώρες καταπόνησης άλατος και ψύχους μπορεί να σχετίζεται με την πιο έγκαιρη ενεργοποίηση του μεταβολισμού των φυτών της Rusticano, τη διαφοροποίηση μεγαλύτερου αριθμού μεταβολιτών στο υπέργειο τμήμα της και τα υψηλότερα επίπεδα συσσώρευσης αυτών. Εξαίρεση αποτελεί, σε συνθήκες αλατότητας, η μεγαλύτερη συγκέντρωση της προλίνης στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Grazia όπου, λόγω μεγαλύτερης ευαισθησίας της σε αυτό τον παράγοντα καταπόνησης, συσσωρεύει το συγκεκριμένο μεταβολίτη προκειμένου να επέλθει οσμωρύθμιση και να συνεχιστούν οι μεταβολικές της διεργασίες.

Ωστόσο, η μη ταυτοποίηση υδατανθράκων (πλην της σακχαρόζης), της βασικής αυτής κατηγορίας μεταβολιτών που λειτουργούν ως ωσμωπροστατευτικές ουσίες και παράλληλα παρέχουν ενέργεια και αλυσίδες άνθρακα στα φυτά, δε μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κινητοποίηση αποθεμάτων άνθρακα σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους, στις 2 ποικιλίες.

Αναλυτικότερα, τα συμπεράσματα, σχετικά με τη μεταβολομική ανάλυση του υπέργειου τμήματος των ποικιλιών Rusticano και Grazia σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους έχουν ως ακολούθως :

Καταπόνηση φυταρίων σε συνθήκες ψύχους

- Η ποικιλία Rusticano διαπιστώθηκε ότι συσσωρεύει περισσότερους μεταβολίτες από την Grazia στο υπέργειο τμήμα της, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του 2^{ου} Κεφαλαίου, όπου η ποικιλία Rusticano παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από την Grazia. Διαπιστώθηκε επίσης, ότι και τα επίπεδα συσσώρευσης των μεταβολιτών, που διαφοροποιήθηκαν σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες, είναι μεγαλύτερα στην ποικιλία Rusticano από ότι στην ποικιλία Grazia. Έτσι, η ανθεκτικότητα της ποικιλίας Rusticano έναντι της Grazia, σε συνθήκες ψύχους (4^oC), μπορεί να σχετίζεται με τη συσσώρευση κυρίως δευτερογενών μεταβολιτών (κατά πλειοψηφία αζωτούχων ενώσεων), αλλά και αμινοξέων στο υπέργειο τμήμα της, σε αντίθεση με την ποικίλια Grazia που δε συσσώρευσε δευτερογενείς μεταβολίτες.
- Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών στην ανθεκτικότητα των φυτών έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων δεν είναι ακόμα γνωστός. Ωστόσο η συσσώρευσή τους στην παρούσα μελέτη στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano μπορεί να αποτελέσει ένα προληπτικό αμυντικό μηχανισμό των φυτών της, έναντι πιθανής προσβολής από παθογόνους μικροοργανισμούς

(βιοτική καταπόνηση), όταν αυτά είναι ήδη «αδύναμα» λόγω τηςυφιστάμενης καταπόνησης ψύχους (αβιοτική καταπόνηση).

- Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών νεολινουστατίνη (αύξηση 23,51 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) και λοτοστραλίνη (αύξηση 2,37 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) που παρατηρήθηκαν στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano μπορεί να σχετίζονται με την ανατροφοδότηση του πρωτογενούς μεταβολισμού με άζωτο για τη σύνθεση αμινοξέων και την περαιτέρω ανάπτυξη των φυτών της Rusticano, μετά από διάσπασή τους.
- Τα Κυκλικά Υδροξαμικά Οξέα που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, HMBOA-Glc (αύξηση 6,58 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) TRIBOA-Glc (αύξηση 10,27 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) DIMBOA-Glc (αύξηση 9,11 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) και HDMBOA-Glc (αύξηση 25,86 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) ως δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από το αρωματικό αμινοξύ τρυπτοφάνη φαίνεται ότι αποτελούν δείκτες ανθεκτικότητας των φυτών της Rusticano στο ψύχος, καθιστώντας την και πιο ανθεκτική στις βιοτικές καταπονήσεις.
- Η συσσώρευση της φαινολικής ένωσης, 1-Ο-σιναποϋλο-γλυκόζης (αύξηση 6,98 φορές σε σχέση με το μάρτυρα), που προέρχεται από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη, φαίνεται να αποτελεί μια ακόμα στρατηγική προσαρμογής της ποικιλίας Rusticano έναντι του ψύχους, διότι οι εστέρες του σιναπικού οξέος μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα από τις υπεροξειδάσες (αντιοξειδωτικά ένζυμα) προκειμένου να προστατεύσουν τα κύτταρα από τις ενεργές μορφές οξυγόνου.
- Ο ανθρακικός σκελετός του μορίου της γλυκόζης κινητοποιήθηκε, κατά τη διαδικασία της γλυκόλυσης, στο υπέργειο τμήμα της Rusticano με αποτέλεσμα την παραγωγή των αρωματικών αμινοξέων, φαινυλαλανίνη (αύξηση 4,43 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) και τρυπτοφάνη (αύξηση 1,73 φορές σε σχέση με το μάρτυρα), για τη σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών που προαναφέραμε.
- Το αμινοξύ προλίνη παρουσίασε σημαντική αύξηση (5,74 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) στην ποικιλία Rusticano. Η αυξημένη αυτή συγκέντρωσή του, όπως είναι γνωστό, αποτελεί δείκτη ανθεκτικότητας παρέχοντας οσμωρύθμιση σε συνθήκες ψύχους.
- Ο μεταβολισμός του αζώτου είναι πιθανό να μην επηρεάστηκε από την καταπόνηση ψύχους στην ποικιλία Rusticano, διότι εκτός της προλίνης, αυξημένη συγκέντρωση παρουσιάζει και η γλουταμίνη (αύξηση 2,1 σε σχέση με
το μάρτυρα) στο υπέργειο τμήμα του φυτού, που αποτελεί την κύρια πηγή αζώτου στα φυτά.

- Είναι γνωστό ότι το μονοπάτι αφομοίωσης του αζώτου, συνθετάση της γλουταμίνης(GS)/συνθάση του γλουταμινικού οξέος (GOGAT) είναι λειτουργικό, διότι η γλουταμίνη και το γλουταμινικό οξύ που παράγονται από τον παραπάνω κύκλο αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση άλλων αμινοξέων. Η σταθερή συγκέντρωση του γλουταμινικού οξέος, που παρατηρήθηκε στα πειραματικά φυτά (Πιν. 3.3.3) μπορεί να αποδοθεί στη δράση των ενζύμων GS/GOGAT και του ενζύμου αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέος (GDH) που καταλύει την αντίδραση της απαμίνωσης του γλουταμινικού οξέος προς ακετογλουταρικό οξύ, με αποτέλεσμα την ισορροπία C/N και την προμήθεια του κύκλου του κιτρικού οξέος με σκελετούς άνθρακα και την παραγωγή ενέργειας σε συνθήκες ψύχους.
- Η υψηλή συσσώρευση του γλυκερογλυκολιπιδίου MGDG (αύξηση 5,71 σε σχέση με το μάρτυρα) που παρατηρήθηκε στην ποικιλία Rusticano μπορεί να σχετίζεται με τη διατήρηση της φωτοσυνθετικής της δραστηριότητας. Επιπλέον, ο μικρότερος λόγος MGDG/DGDG στην ποικιλία Rusticano σε σχέση με την ποικιλία Grazia μπορεί να συσχετισθεί με την καλύτερη προσαρμογή της ποικιλίας Rusticano στο ψύχος, λόγω διατήρησης της ακεραιότητας των κυτταρικών της δομών.

Καταπόνηση φυταρίων σε συνθήκες αλατότητας

- Σε αντίθεση με την καταπόνηση ψύχους όπου και οι 2 ποικιλίες Rusticano και Grazia εμφανίζουν έντονη διαφοροποίηση στους μεταβολίτες τους σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες, στην περίπτωση καταπόνησης άλατος (200 mM για 48 ώρες), οι 2 μελετώμενες ποικιλίες αντιδρούν σε μικρότερο βαθμό.
- Ωστόσο, η μεγαλύτερη συσσώρευση της προλίνης (αύξηση 16,84 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) που διαπιστώθηκε στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Grazia σε σχέση με της Rusticano αποτελεί μία πρώτη αντίδραση των φυτών της Grazia στην αλατότητα με σκοπό να διατηρήσει τη μεταβολική της δραστηριότητα. Αντίθετα, η ποικιλία Rusticano φαίνεται ν' αντιμετωπίζει την αλατότητα, εκτός από τη συσσώρευση προλίνης, με τη συσσώρευση περισσότερων μεταβολιτών κυρίως δευτερογενών και ενός φωσφολιπιδίου στο υπέργειο τμήμα της.
- Οι εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις των αζωτούχων ενώσεων,
 κουμαροϋλπουτρεσκίνη (αύξηση 46,38 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) και
 κουμαροϋλαγματίνη (αύξηση 13,20 φορές σε σχέση με το μάρτυρα), που

διαπιστώθηκαν στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano μπορεί να λειτουργήσουν ως αποθησαυριστικές ενώσεις αζώτου. Ωστόσο η κύρια λειτουργία τους βασίζεται στην αντιοξειδωτική τους δράση και την εξουδετέρωση των ενεργών μορφών οξυγόνου. Είναι γνωστό, ότι τα φαινολοαμίδια που θεωρούνται κατάλληλα υποστρώματα για τις υπεροξειδάσες είναι πιθανό να συμμετέχουν στην εξάλειψη του H₂O₂ και να ενισχύουν την άμυνα του κυτταρικού τοιχώματος.

Τέλος η αύξηση της συγκέντρωσης της φωσφατιδοχολίνης (2,23 σε σχέση με το μάρτυρα), που διαπιστώθηκε στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων της ποικιλίας Rusticano φαίνεται να σχετίζεται με την καλύτερη προσαρμογή των φυταρίων της ανωτέρω ποικιλίας στην υψηλή συγκέντρωση άλατος συμβάλλοντας στη διατήρηση της δομής και λειτουργίας των κυττάρων της, δεδομένου ότι η φωσφατιδοχολίνη αποτελεί βασικό φωσφολιπίδιο της μεμβράνης των ευκαρυωτικών κυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°: ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΛΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΣΚΛΗΡΟΥ ΣΙΤΟΥ, RUSTICANO KAI GRAZIA, ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ

4.1. Σκοπός της Έρευνας

Η συσσώρευση της προλίνης θεωρείται ως μια βασική στρατηγική προστασίας των φυτών και επιβίωσης αυτών σε συνθήκες αλατότητας, ψύχους και υδατικής καταπόνησης (Shabala and Cuin 2006, Kaplan et al 2007, Hoekstra et al 2001). Έχει αναφερθεί ότι ποικιλίες ενός συγκεκριμένου φυτικού είδους οι οποίες εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό ανθεκτικότητας στην αλατότητα και το ψύχος συγκεντρώνουν και διαφορετικά επίπεδα προλίνης και άλλων οσμωλυτών (Wyn and Storey, 1978, Rhodes et al 1989, Colmer et al 1995, Yang et al 2003, Bowne et al 2011, Zhao et al 2013). Αποτελεί, ωστόσο, αντικείμενο μελέτης αν η συγκέντρωση αυτών των οσμωλυτών είναι δείκτης ανθεκτικότητας (Binzel et al 1987, Hare and Cress 1997, Almansouri et al 1999, Meloni et al 2001, Kumar et al 2003, Kamata and Uemura 2004, Veeranagamalliaiah et al 2007,) ή ευαισθησίας (Delauney and Verma 1993, Lutts et al 1999, Heuer 2003, Chen et al 2007, Widodo et al 2009) των ποικιλιών στις καταπονήσεις.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης, όπου η συσσώρευση της προλίνης διαφοροποιείται στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia σε δύο συνθήκες καταπόνησης (αλατότητα και ψύχους), στο συγκεκριμένο Κεφάλαιο αναλύεται η διερεύνηση της βιοσύνθεσης του ανωτέρω μεταβολίτη στις δύο ποικιλίες σκληρού σίτου (Rusticano και Grazia) σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

Πραγματοπιείται εντοπισμός των γονιδίων που πιθανά κωδικοποιούν για ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης, μετά από αναζήτηση σε γνωστές βάσεις δεδομένων του φυτού *Α. thaliana* και του *Τ. aestivum*. Ακολουθεί, απομόνωση των cDNA κλώνων των γονιδίων που κωδικοποιούν για αυτά τα ένζυμα στο σκληρό σιτάρι και μελετάται η συσσώρευση των μεταγραφημάτων των γονιδίων και η συγκέντρωση του μεταβολίτη σε ιστούς των ποικιλιών Rusticano και Grazia σε συνθήκες καταπόνησης.

4.2.1 In silico μελέτη των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης στο σιτάρι

Για την εύρεση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα ένζυμα βιοσύνθεσης της προλίνης στο σκληρό σιτάρι, πραγματοποιήθηκαν αρχικά αναζητήσεις στη βάση δεδομένων του φυτού *A. thaliana,* TAIR, <u>http://www.arabidopsis.org/</u>. Η βάση αυτή περιέχει ολόκληρο το γονιδίωμα του φυτού, με πληροφορίες για ομολογίες νουκλεϊνικών και αμινοξικών αλληλουχιών τόσο εντός του γονιδιώματος του *A. thaliana* όσο και με άλλους οργανισμούς. Εμφανίζονται φυλογενετικά δέντρα, τρισδιάστατες απεικονίσεις ορισμένων πρωτεϊνών, προβλέψεις για υποκυτταρικό εντοπισμό, πρότυπα έκφρασης και αλληλεπιδράσεις. Για κάθε ένα από τα υπό μελέτη γονίδια επιλέξαμε τη σελίδα πρωτεϊνες και με την εισαγωγή των κατάλληλων κριτηρίων αναζήτησης, καταλήξαμε στους γενετικούς τόπους (Locus) που κωδικοποιούν για τα συγκεκριμένα ένζυμα στο *A. thaliana*. Στη συνέχεια από την υπερσύνδεση του κάθε γενετικού τόπου έγινε η εύρεση του πεδίου στοιχείων της αντίστοιχης πρωτεϊνης (Protein Data) και επιλέξαμε την υπερσύνδεση με το όνομα αυτής.

Ακολούθως έχοντας επιλέξει την αμινοξική αλληλουχία από το *A. thaliana* οδηγηθήκαμε στο δικτυακό τόπο http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html για την αναζήτηση cDNA κλώνων (TCs) που κωδικοποιούν για κάθε ένα από τα ένζυμα βιοσύνθεσης της προλίνης στο μαλακό σιτάρι (*T. aestivum*). Αφού επιλέχθηκε ως μελετούμενο φυτό το σιτάρι επικολλήθηκε η αμινοξική αλληλουχία από το *A. thaliana.* Χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο tBLASTn προέκυψαν οι κωδικοί αριθμοί των συναινετικών αλληλουχιών cDNA στο σιτάρι (TCs), που παρουσιάζουν ομολογία με την πρωτεΐνη αναζήτησης, καθώς και η ευθυγράμμιση των αντίστοιχων αμινοξικών αλληλουχιών με την αλληλουχία αναζήτησης. Επιλογή της υπερσύνδεσης του κάθε TC παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία, τη σχηματική παράσταση της θέσης των ESTs (expressed sequences tags) αλληλουχιών που συμμετέχουν στο TC με αντίστοιχη καταχώρηση της κάθε αλληλουχία ξST, αποτελέσματα πειραμάτων και τυχόν βιβλιογραφικές αναφορές.

Στη συνέχεια, έχοντας συλλέξει πολλαπλές πληροφορίες για τη συγκεκριμένη cDNA αλληλουχία στο μαλακό σιτάρι ακολούθησε μετάφραση του κάθε cDNA κλώνου (TC) μέσω του δικτυακού τόπου <u>http://www.expasy.org/</u>, όπου επιτρέψε την επαλήθευση του κωδικοποιημένου πολυπεπτιδίου στο σιτάρι καθώς και την εύρεση των κωδικών αριθμών των πολυπεπτιδίων, σε άλλα φυτά, που παρουσιάζουν ομολογία με το πολυπεπτίδιο αναζήτησης.

Με το πρόγραμμα DNASTAR πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις αμινοξικών και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών για την επιβεβαίωση cDNA κλώνων και προϊόντων PCR και υποκλωνοποίησης (μετά από αλληλούχιση).

Για το σχεδιασμό, έλεγχο και επιλογή εκκινητών για το Real-Time PCR, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems), και για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του Real-Time PCR χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MxPro-3005P (Stratagene).

4.2.2 Μοριακή μελέτη

Στο κεφάλαιο αυτό προσδιορίζεται η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης και περιγράφονται τα βήματα που χρησιμοποιήθηκαν :

- 1. Απομόνωση RNA από τους φυτικούς ιστούς που μας ενδιαφέρουν, ενότητα 4.2.2.1.
- 2. Καθαρισμός RNA από τυχόν ίχνη DNA με τη χρήση DNάσης, ενότητα 4.2.2.2.
- 3. Μετατροπή σε cDNA με τη χρήση RT-PCR, ενότητα 4.2.2.3.
- Αντίδραση PCR για την ενίσχυση των κωδικών περιοχών των γονιδίων, ενότητα
 4.2.2.4. Προηγήθηκε σχεδιασμός εκφυλισμένων εκκινητών για τα γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης, Πίνακα 4.2.4.
- 5. Διαχωρισμός προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης, ενότητα 4.2.2.5.
- Καθαρισμός προϊόντων με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen), ενότητα 4.2.2.6.
- 7. Αντίδραση λιγοποίησης (συνένωση τμημάτων DNA), ενότητα 4.2.2.7.1.
- Εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε επιδεκτικά κύτταρα (competent cells) του βακτηρίου *E. coli,* παρουσία αντιβιοτικών, για την επιλογή αυτών που φέρουν το πλασμίδιο, ενότητα 4.2.2.8.2.
- Απομόνωση DNA με τη μέθοδο βρασμού από κύτταρα υγρής καλλιέργειας, ενότητα
 4.2.2.9.
- 10. Πέψη του πλασμιδιακού DNA με περιοριστικό ένζυμο και ανάλυση σε πηκτή για την επιβεβαίωση της παρουσίας του ένθετου DNA, ενότητα 4.2.2.10 και απομόνωση του πλασμιδίου (από νέα καλλιέργεια) με το πρωτόκολλο Miniprep(Qiagen).

11. Αλληλούχιση (sequencing) για την επιβεβαίωση της ακεραιότητας της ένθεσης.

Μετά την επιβεβαίωση της ύπαρξης των γονιδίων, που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της προλίνης στο σκληρό σιτάρι, ενισχύθηκε με PCR το 3 άκρο αυτών των γονιδίων, Πίνακας 4.2.5. Ακολούθησε εκ νέου η διαδικασία υποκλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς και η αλληλούχιση πλασμιδίων για την επιβεβαίωση της ένθεσης (βήματα 4-11), με τελικό αποτέλεσμα να γίνει γνωστή η αλληλουχία των γονιδίων από την κωδική περιοχή μέχρι το 3΄άκρο.

Υπολογισμός της συγκέντρωσης των μεταγραφημάτων με τη χρήση qPCR, ενότητα
 4.2.2.11

Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά τα βήματα της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκαν.

4.2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς η όργανα

Για την απομόνωση του ολικού RNA ακολουθήθηκε η διαδικασία που προτείνεται από τους Brusslan και Tobin (1992). Σύμφωνα με αυτήν:

- 0.2 g νωπού φυτικού ιστού ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως με υγρό άζωτο.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα (*eppendorf*) στον οποίο προστίθεται 400 μl διαλύματος εκχύλισης RNA (Extraction Buffer) και 200 μl μίγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο 1:1, pH: 8.3.
- Ακολουθεί καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά, στους 4°C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με 200 μl μίγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο 1:1, pH: 8.3.
- Γίνεται εκ νέου ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά, στους 4°C.
- Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο *eppendorf* και γίνεται προσθήκη 1/10 όγκου 3 M CH₃COONa pH: 5.2 και ενός όγκου ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων. Ανάμειξη δείγματος.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα των νουκλεϊνικών οξέων επαναδιαλύεται σε 562.5 μΙ διαλύματος 10Τ/10Ε
 και το RNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 187.5 μΙ διαλύματος 8 M LiCl.
 Ακολουθεί ανάμειξη του δείγματος και επώαση στους 4°C, για τουλάχιστον 12 ώρες.
- Το ολικό RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% (ν/ν) αιθανόλη, αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 20 μΙ όγκο διαλύματος 10Τ/1Ε.

 Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά ενώ η ακεραιότητα διαπιστώνεται με ανάλυση δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.

4.2.2.1.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμά τους γίνεται φωτομετρικά με τη χρήση συσκευής Nanodrop.

- 1 μl dH₂0 από το δείγμα τοποθετείται στην υποδοχή της συσκευής Nanodrop για μηδενισμό (blank measurement)
- Στη συνέχεια 1 μΙ από το δείγμα μεταφέρεται στην υποδοχή της συσκευής Nanodrop η οποία μετρά την οπτική πυκνότητα (Optical Density, O.D.) του δείγματος σε μήκη κύματος 240, 260 και 280nm.

Η συσκευή εμφανίζει τη συγκέντρωση του DNA ή RNA και τους λόγους O.D.260/O.D.280 και O.D.240/O.D.260

Η καθαρότητα ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων υπολογίζεται από το λόγο O.D.260/O.D.280 και O.D.240/O.D.260. Όταν οι τιμές τους είναι 1.8-2.0 και 0,5, αντίστοιχα, τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

4.2.2.2 Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση και καθαρισμός με φαινόλη

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA από τους φυτικούς ιστούς απομονώνεται και μέρος του γονιδιωματικού DNA, επομένως, απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται σε ένζυμα που κόβουν - καταστρέφουν το DNA, ενώ ταυτόχρονα αφήνουν ανέπαφο το RNA. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Λαμβάνεται δείγμα 5 μg RNA και μεταφέρεται σε σωλήνα eppendorf στον οποίο έχουν προστεθεί:
 - 10Χ ρυθμιστικό διάλυμα DNase.
 - RNA DNase (2 units/µl)
 - RNase OUT (παρεμποδιστής RNασών) (40 units/μl)
 - ddH₂O μέχρις όγκου 30 μl.
- Το δείγμα επωάζεται στους 37°C (υδατόλουτρο) για 45 λεπτά, με σκοπό την καταστροφή γονιδιωματικού DNA, που μπορεί να υπάρχει στο δείγμα.

- Προστίθενται ddH₂O και γίνεται ανάμιξη με ίσο όγκο φαινόλης, ακολουθεί ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf. Η ίδια διαδικασία, με ανάδευση και φυγοκέντρηση στις παραπάνω συνθήκες, επαναλαμβάνεται μετά την ανάμιξη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης/χλωροφόρμιου σε αναλογία 1:1, και μετά την ανάμιξη με ίσου όγκου χλωροφόρμιου.
- Η κατακρήμνιση του RNA γίνεται με προσθήκη 1/10 του όγκου του διαλύματος με 3 M CH₃COONa pH: 5.2 και προσθήκη 2.5 όγκων αιθανόλης. Ακολουθεί ανάμειξη δείγματος.
- Το δείγμα διατηρείται στους -20°C για τουλάχιστον 12 ώρες. Επιπλέον, κατακρημνίζεται το RNA με διατήρηση του δείγματος στους -80°C για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, αφήνεται να στεγνώσει και τέλος επαναδιαλύεται σε 25 μl ddH₂O.

4.2.2.3 Σύνθεση cDNA από ολικό RNA με RT-PCR

Το RNA μετά από απομόνωση και καθαρισμό μεταγράφεται σε cDNA με τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Για τη μεταγραφή στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές poly-dT αποτελούμενοι από 17T.

Για τη σύνθεση του cDNA τοποθετούνται σε ένα σωλήνα eppendorf τα κάτωθι :

- oligo(dT)17 (500 μg/ml) : 1,5 μl

- RNA : 2.5 µg
- μίγμα dNTPs (10 mM) : 2 μl
- ddH₂O : μέχρις όγκου 12 μΙ

Αρχικά γίνεται αποδιάταξη ποσότητας ολικού RNA με εκκινητή oligo(dT)₁₇ και μείγμα νουκλεοτιδίων στους 65°C για 5 λεπτά και ακολούθως η αντίδραση τοποθετείται στον πάγο, για να διατηρηθεί το RNA σε μονόκλωνη κατάσταση.

Στη συνέχεια, μετά από σύντομη φυγοκέντρηση, προστίθενται τα κάτωθι αντιδραστήρια:

- 5x ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης πρώτης αλυσίδας : 4 μΙ

- DTT (0,1M) : 2 µl

- Rnase OUT (40 units/µl) : 1µl

Αναμιγνύονται τα παραπάνω συστατικά και επωάζονται στους 42°C για 2 λεπτά.

- Γίνεται προσθήκη SuperScript II RT (Invitrogen 200 units/μI) : 1 μΙ Ακολουθεί επώαση στους 42°C για 50 λεπτά και η αντίδραση διακόπτεται με θέρμανση στους 70°C για 15 λεπτά. Τα δείγματα διατηρούνται στους -20°C.

4.2.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την in vitro ενίσχυση ακολουθιών DNA. Ο πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών του DNA γίνεται με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Τα απαραίτητα συστατικά μιας αντίδρασης PCR είναι:

- Το δίκλωνο μόριο DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε.
- Ένα ζεύγος κατάλληλων εκκινητών που υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA και προσδιορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής (0.1-1 μM).
- Μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (20-25 units/ml).
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (200 μΜ από το καθένα) και
- Ιόντα Mg⁺²

Μια τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει σε πρώτη φάση την αποδιάταξη του DNA στόχου σε υψηλή θερμοκρασία. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Στην συνέχεια αυξάνεται η θερμοκρασία για να γίνει η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων από την πολυμεράση. Οι τρεις αυτές διαδικασίες επαναλαμβάνονται από 20 έως 35 φορές με αποτέλεσμα η αλληλουχία στόχος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά.

Στην παρούσα εργασία το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμήματος της κωδικής περιοχής των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα ένζυμα βιοσύνθεσης της προλίνης στο σκληρό σιτάρι, δ-OAT, P5CR, P5CS1, P5CS2 και TUB αναφέρεται στον Πίνακα 4.2.1. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε, DyNAzyme II (FINNZYMES), παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό λαθών κατά την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.

Σε σωλήνα φυγοκέντρησης 0.5 ml προστίθενται τα παρακάτω σε τελικό όγκο 50 μl :

-ddH₂O : 40.5 µl

-10Χ ρυθμιστικό διάλυμα DNAzyme : 5 μΙ

-μίγμα dNTPs (10 mM) : 1 μl

-Έμπροσθεν εκκινητής (30 μΜ) : 1 μΙ

```
-Ανάστροφος εκκινητής (30 μΜ): 1 μΙ
```

-DNA πολυμεράση (2units/μl) : 0.5 μl -Μήτρα DNA : 1 μl

Πίνακας 4.2.1 Το πρόγραμμα θερμοκρασιών, χρόνων και κύκλων κατά την αντίδραση PCR

Συνθήκες ενίσχυσης PCR	
Αρχική αποδιάταξη	94ºC για 3 λεπτά
Αποδιάταξη	94ºC για 1 λεπτό
Υβριδισμός Εκκινητών	56-60°C για 1 λεπτό
Επιμήκυνση	72⁰C για 1 λεπτό
Τελική Επιμήκυνση	72ºC για 10 λεπτά

Ωστόσο, για κάθε γονίδιο σχεδιάστηκαν εκφυλισμένοι εκκινητές σε συντηρημένες περιοχές μετά από αλληλούχιση των κωδικών περιοχών των αντίστοιχων γονιδίων σε άλλα μονοκότυλα φυτά και περιγράφονται στον Πίνακα 4.2.1. Για το σχεδιασμό των εκκινητών των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι ακολουθίες:

P5CS1 : Πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση κωδικών περιοχών των ακολουθιών από το μαλακό σιτάρι (AB193551, AY888045, TC262839) και το ρύζι (AC111016, AY574031, D49714).

P5CS2 : Πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση κωδικών περιοχών των ακολουθιών από το μαλακό σιτάρι (TC236001, TC235999) και το ρύζι (AP004127).

δ-ΟΑΤ: Πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση κωδικών περιοχών των ακολουθιών από το μαλακό σιτάρι (TC248538, TC248213, TC259776) και το ρύζι (AC145383).

P5CR : Πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση κωδικών περιοχών των ακολουθιών από το μαλακό σιτάρι (AY880317, TC254523), το κριθάρι (AY177684), το καλαμπόκι (DQ026301) και το ρύζι (AP003259).

TUB: Πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση κωδικών περιοχών των ακολουθιών από το μαλακό σιτάρι (TAU76558) και το κριθάρι (Y08490).

Στη συνέχεια ενισχύθηκε το 3΄ άκρο των γονιδίων P5CS1, P5CS2, δ-OAT, P5CR. Για την ενίσχυση του 3΄ άκρο των γονιδίων δ-OAT, P5CR χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PCR και οι εκκινητές που αναγράφονται στους Πίνακες 4.2.2 και 4.2.5 αντίστοιχα. Ενώ για την ενίσχυση του 3΄ άκρο των γονιδίων των γονιδίων P5CS1 και P5CS2 χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της κλασσικής PCR, η "touchdown" PCR (Πίνακες 4.2.3 και 4.2.5). Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αυτού του είδους αποφεύγεται η ενίσχυση ανεπιθύμητων προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα στα πρώτα στάδια της "touchdown" PCR οι θερμοκρασίες σύνδεσης των εκκινητών είναι υψηλές. Στη συνέχεια η θερμοκρασία σύνδεσης μειώνεται σταδιακά όσο περνούν τα στάδια της αντίδρασης. Οι εκκινητές υβριδίζονται σε υψηλή θερμοκρασία, η οποία επιτρέπει την ελάχιστη δυνατή μη ειδική σύνδεση. Στους επόμενους κύκλους με τη χαμηλότερη θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών, η ακολουθία αυτή θα ενισχυθεί περαιτέρω και θα αποκλείσει την ενίσχυση ανεπιθύμητων προϊόντων (Korbie 2008).

Πίνακας 4.2.2 Το πρόγραμμα θερμοκρασιών, χρόνων και κύκλων κατά την αντίδραση PCR για την ενίσχυση του 3΄άκρο των γονιδίων δ-OAT & P5CR

Συνθήκες ενίσχυσης PCR	
Αρχική αποδιάταξη	94ºC για 3 λεπτά
Αποδιάταξη	94ºC για 1 λεπτό
Υβριδισμός Εκκινητών	48 & 54°C για 1 λεπτό 35
Επιμήκυνση	72ºC για 1 λεπτό
Τελική Επιμήκυνση	72ºC για 10 λεπτά

Πίνακας 4.2.3 Το πρόγραμμα θερμοκρασιών, χρόνων και κύκλων κατά την touchdown PCR για την ενίσχυση του 3΄άκρο των γονιδίων *P5CS1* και *P5CS2*

Συνθήκες ενίσχυσης "touchdown" PCR		
Αρχική αποδιάταξη	95ºC για 2 λεπτά	
		4
Αποδιάταξη	94ºC για 20 δευτερόλεπτα	
Υβριδισμός Εκκινητών	56ºC για 30 δευτερόλεπτα	2
Βαθμιδωτή αύξηση Θερμοκρασίας	0,5⁰C ανά δευτερόλεπτο	κύκλοι
Επιμήκυνση	72ºC για 2.5 λεπτά	
Αποδιάταξη	94∘C για 20 δευτερόλεπτα	-1 °C
Υβριδισμός Εκκινητών	56-49°C για 30 δευτερόλεπτα	ανά κύκλο
Βαθμιδωτή αύξηση Θερμοκρασίας	0,5ºC ανά δευτερόλεπτο	7 κύκλοι
Επιμήκυνση	72ºC για 2.5 λεπτά	
		٨
Αποδιάταξη	94ºC για 20 δευτερόλεπτα	\mathcal{M}
Υβριδισμός Εκκινητών	48ºC για 30 δευτερόλεπτα	20
Βαθμιδωτή αύξηση Θερμοκρασίας	0,5ºC ανά δευτερόλεπτο	κύκλοι
Επιμήκυνση	72ºC για 2.5 λεπτά	
Τελική Επιμήκυνση	72ºC για 10 λεπτά	

Πίνακας 4.2.4 Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το PCR, ο αριθμός των βάσεων που ενίσχυσαν και η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών.

Ένζυμο	Γονίδιο	Όνομα	Αλληλουχία	Αναμενόμενο	Tm (°C)
		Εκκινητή		μέγεθος	
δ-αμινοτρανσφεράση της ορνιθίνης	$\delta_{-} \cap AT$	OATF1	5'-CTTTGATTGTCTCTTGCTGTGG-3'	370bn	5600
	0-041	OATR1	5'-CTAGAATCACCAYATCAGGTCG-3'	37000	30.0
Αναγωγάση του δ ¹-πυρολινο-5-καρβοξυλικό		P5CRF2	5'-GACAAGCWGCATCAGTSATGTG-3'	201bp	5600
	FJOR	P5CRR1	5'-CCAGCAGCAACTCCACCATCAG-3'	20100	50.0
	5500/	P5CS1F1	5'-CGAAGTGGTAATGGTCTTCTCC-3'	005	56°C
Συνθετασή του ο'-πυρολινο-5-καρβοξυλικό	P5CS1	P5CS1R	5'-CATCCTTGTCACCATTCACCAC-3'	835bp	
	05000	P5CS2F1	5'-GGACCCTATYTCMCATACACTG-3'	0046-	58°C
Συνθετάση του ο'-πυρολινο-5-καρβοξυλικό	P5052	P5CS2R	5'-TCACTACTTGTCCACTYCCTCG-3'	90100	
	TUD	TUBF1	5'-ACCGCCAGCTCTTCCACCCT-3'	570bp	600C
	108	TUBR1	5'-TCACTGGGGCATAGGAGGAA-3'	9790b	00°C

Πίνακας 4.2.5 Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το PCR, ο αριθμός των βάσεων που ενίσχυσαν μέχρι την 3' περιοχή των γονιδίων και η θερμοκρασία υβριδισμού (Tm) των εκκινητών. Η "touchdown" PCR πραγματοποιήθηκε στο εύρος θερμοκρασιών υβριδισμού 56-48°C.

Ένζυμο	Γονίδιο	Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία	Αναμενόμενο μέγεθος	Tm (°C)
δ-αμινοτοανσφεράση της οργιθίνης	δ-ΟΑΤ	OATF1	5'-CTTTGATTGTCTCTTGCTGTGG-3'	> 1000bp	48°C
	0 0/11	Oligo(dT) _{17T} 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'		100000	
Αναγωγάση του δ ¹-πυρολινο-5-καρβοξυλικό	P5CR	P5CRF2	P5CRF2 5'-GACAAGCWGCATCAGTSATGTG-3'		540C
	FJOR	Oligo(dT) _{17T}	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	> 337 bp	54 0
Συνθετάση του δ¹-πυρολιγο-5-καρβρευλικό	P5CS1	P5CS1F1	5'-CGAAGTGGTAATGGTCTTCTCC-3'	> 1000bp	56-48°C
		Oligo(dT) _{17T}	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	> 100000	00 40 0
Συνθετάση του δ¹-πυρολινο-5-καρβοξυλικό	P5CS2	P5CS2F1	5'-GGACCCTATCCCCCATACACTG-3'	> 1300 bp	56-48°C
		Oligo(dT) _{17T}	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	2 1000 bp	

4.2.2.5 Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους σε πηκτή αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση. Ο διαχωρισμός των μορίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής. Για παράδειγμα, μεγαλύτερη συγκέντρωση πηκτής έχει ως αποτέλεσμα καλύτερο διαχωρισμό μικρών μορίων και αντιστρόφως, μεγαλύτερα μόρια διαχωρίζονται καλύτερα σε μικρότερης συγκεντρώσεως πηκτές. Για την πιστοποίηση του μεγέθους χρησιμοποιείται μάρτυρας DNA γνωστού μοριακού βάρους. Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθίδιου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός.

Η προετοιμασία της πηκτής γίνεται ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (συνήθως 1%) προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 1Χ ΤΑΕ και θερμαίνεται στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το μίγμα να ομογενοποιηθεί.
- Στο υγρό μίγμα προστίθεται 0.001% (v/v) διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).
- Ακολουθεί μεταφορά σε καλούπι συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται για 30 λεπτά να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συσκευή εφαρμόζεται κατάλληλη «χτένα» ώστε να σχηματισθούν στην πηκτή οι θέσεις φόρτωσης.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνεται η «χτένα», προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 1Χ ΤΑΕ, τοποθετούνται τα δείγματα DNA στις θέσεις φόρτωσης και συμπληρώνεται στη συσκευή ρυθμιστικό διάλυμα 1Χ ΤΑΕ.
- Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V, ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού και την περιεκτικότητά της σε αγαρόζη.

4.2.2.6 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

Μετά την ηλεκτροφόρηση, το τμήμα που περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA αφαιρείται με τη χρήση κοπιδίου. Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκε η στήλη καθαρισμού QuickSpin της εταιρίας Qiagen ακολουθώντας το QIAquick Gel Extraction Kit Protocol.

- Ζυγίζεται το κομμάτι της πηκτής σε ένα eppendorf και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα QG σε αναλογία 3:1.
- Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 10 λεπτά ώστε η πηκτή να λιώσει πλήρως. Γι' αυτό συνιστάται η ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (*vortex*) ανά 2-3 λεπτά κατά τη διάρκεια της επώασης. Στο τέλος της επώασης το χρώμα του μίγματος είναι κίτρινο.
- Προστίθεται ίσος όγκος με την πηκτή ισοπροπανόλη και αναδεύεται καλά.
- Προσαρμόζεται η στήλη, που διατίθεται από το kit, στο eppendorf, ώστε να συλλεχθεί το DNA, και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
- Απομακρύνεται το διάλυμα, που συλλέχτηκε στο eppendorf και αυτό ξαναπροσαρμόζεται στη στήλη.
- Προστίθενται 500 μΙ DNA ρυθμιστικού διαλύματος QG και η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται.
- Προκειμένου το DNA να ξεπλυθεί, προστίθενται 0.75 ml ρυθμιστικού διαλύματος
 PE και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
- Απομακρύνεται το διάλυμα, που συλλέχθηκε στο eppendorf και φυγοκεντρείται και πάλι για 1 λεπτό στις 13.000 στροφές.
- Προσαρμόζεται η στήλη σε νέο eppendorf και προκειμένου να συλλεχθεί το DNA προστίθενται 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος EB και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 15.000 στροφές.

Το υγρό που συγκεντρώνεται περιέχει το προς απομόνωση DNA.

4.2.2.7 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το πλασμίδιο pGEM[®]-T Easy (Promega) (Εικ. 4.2.1). Σημαντικά χαρακτηριστικά αυτού του φορέα είναι ο υψηλός αριθμός αντιγράφων ανά κύτταρο, το γονίδιο amp^r που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, οι προαγωγείς που αναγνωρίζονται από τις SP6 και T7 RNA πολυμεράσες. Επιπλέον, περιέχουν τμήμα του γονιδίου *lacZ* που κωδικοποιεί για τα πρώτα 146 αμινοξέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης και χρησιμοποιείται για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων, μέσω του μηχανισμού της α-συμπληρωματικότητας. Ο φορέας αυτός είναι κατάλληλος για υποκλωνοποίηση προϊόντων PCR, εφόσον διαθέτουν άκρα πολυΑ, τα οποία υβριδίζουν με τα άκρα πολυΤ του πλασμιδιακού φορέα.



Εικόνα 4.2.1 Ο κυκλικός χάρτης του φορέα pGEM[®]-Τ Easy με τα ένζυμα περιορισμού.

4.2.2.7.1 Ενοποίηση των άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης

Προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων η αναλογία άκρων φορέα προς ένθετο DNA θα πρέπει να είναι 1:3. Για να υπολογίσουμε την ποσότητα DNA ένθεσης σε ng χρησιμοποιούμε τον τύπο:

<u>ng πλασμιδιακού φορέα × kb DNA ένθεσης</u> × <u>3</u> kb πλασμιδιακού φορέα 1

Η αντίδραση της DNA λιγάσης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl. Σε σωλήνα *eppendorf* τοποθετούνται τα εξής συστατικά:

- 2Χ ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης : 5 μΙ

- T4 DNA λιγάση (1 unit/μl) : 1 μl
- pGEM T-Easy φορέα : 1 μΙ
- Ένθετο DNA : 3 μΙ

Το δείγμα επωάζεται στους 4°C για 14-16 ώρες.

4.2.2.8 Μετασχηματισμός *Ε. coli*

4.2.2.8.1 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *Ε. coli* ικανών για μετασχηματισμό

Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων ήταν τα XL1 Blue. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- 10 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία *E. coli* και επωάζονται για περίπου 18 ώρες στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση.
- 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό
 200ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι O.D.₆₀₀=0.2-0.3.
- Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται με 50 ml παγωμένου διαλύματος 0.1 M MgCl₂.
- Η επαναδιάλυση γίνεται πάντα με ανακίνηση μέσα σε πάγο ώστε τα κύτταρα να παραμένουν παγωμένα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα που σχηματίζεται επαναδιαλύεται σε 25 ml παγωμένου διαλύματος
 0.1 M CaCl₂ και αφήνεται στον πάγο για 20 λεπτά.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C και επαναδιαλύονται σε 10 ml παγωμένου διαλύματος 0.1 M CaCl₂.
- Τέλος προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% v/v και γίνεται απαλή ανάμειξη.

Τα ικανά κύτταρα αποθηκεύονται σε έτοιμα προς χρήση κλάσματα των 100 μl, σε σωλήνες *eppendorf* και διατηρούνται στους -80°C.

4.2.2.8.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E.coli

- Σε σωλήνα eppendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl ικανά προς μετασχηματισμό κύτταρα *E. coli*.
- Αφού τα κύτταρα ξεπαγώσουν, προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακό DNA σε όγκο που δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των κυττάρων που χρησιμοποιούνται.
- Το μείγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Υποβάλλουμε τα κύτταρα σε θερμική καταπόνηση στους 42°C για 1-2 λεπτά, ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου.
- Προστίθενται 200 μΙ θρεπτικού διαλύματος LB και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 1 ώρα.

- Τα κύτταρα στρωματώνονται σε τρυβλία, με θρεπτικό υλικό LB και αντιβιοτικό αμπικιλίνη, για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων
- Ακολουθεί επώαση στους 37°C για περίπου 18 ώρες.
- Προστίθεται 200 μΙ υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται για 40-50 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 37°C.
- Φύλαξη των τρυβλίων στο ψυγείο στους 4°C.

Για την επιλογή των αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προσθέτουμε στα κύτταρα, προτού απλωθούν σε τρυβλία, 10 μl 100 mM IPTG και 50 μl 2% X-Gal. Μετά την επώαση, θα επιλεχθούν οι άσπρες και όχι οι μπλε αποικίες, στις οποίες το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης δεν διακόπηκε και επομένως το πλασμίδιο δεν ήταν ανασυνδυασμένο.

4.2.2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού

Για την απομόνωση του ολικού RNA ακολουθήθηκε η διαδικασία που προτείνεται από τους Holmes and Quigley (1981). Σύμφωνα με αυτήν:

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό, εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E. coli,* τα οποία έχουν μετασχηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C με συνεχή ανακίνηση για 12 με 16 ώρες.
- 1.5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα eppendorf και φυγοκεντρούνται στις 6.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 μl διαλύματος STET. Προσθέτουμε 1 μl λυσοζύμη (50 mg/ml) και αναδεύουμε.
- Επωάζεται το δείγμα στους 100°C για 45 δευτερόλεπτα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το ίζημα απομακρύνεται με την βοήθεια αποστειρωμένου τεμαχίου ξύλου και το πλασμιδιακό DNA, που βρίσκεται στο υπερκείμενο, κατακρημνίζεται με την προσθήκη 180 μl ισοπροπανόλης.
- Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για την συλλογή του πλασμιδιακού DNA.
- Ακολουθεί ξέπλυμα με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος ΤΕ ή ddH₂O.

4.2.2.10 Πέψη DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι πέψεις δειγμάτων DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες γίνονται σε όγκους που κυμαίνονται μεταξύ 20 μl και 100 μl, γεγονός που εξαρτάται από την ποσότητα DNA, που υποβάλλεται σε πέψη. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *EcoRl*, με αλληλουχία αναγνώρισης G/AATTC και με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 37°C.

- Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μΙ και περιλαμβάνει : -Δείγμα DNA : 2 μΙ
 -Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου : 2 μΙ
 -RNάση A (2.5mg/ml) : 0.3 μΙ
 -Ένζυμο περιοριστικής ενδονουκλεάσης (*EcoRl*) : 0.5
 -dH₂O : 15.2 μΙ
- Το διάλυμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 2 ώρες στους 37°C (στη βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης).

• Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

Τέλος, ακολουθεί απομόνωση του πλασμιδίου (από νέα καλλιέργεια) με το Πρωτόκολλο Miniprep (Qiagen) και το καθαρό DNA ηλεκτροφορείται, υπολογίζονται τα ng DNA/μΙ και αποστέλλεται για αλληλούχιση, ποσότητα σε μΙ που αντιστοιχεί περίπου σε 1000 ng DNA.

4.2.2.11 Real-Time PCR ανάλυση

Οι αντιδράσεις του ποσοτικού Real-Time PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα MX3005P (Stratagene), με αντιδραστήρια της Applied Biosystems. Η αντίδραση PCR περιλαμβάνει :

-Μίγμα της Power SYBR Green (Applied Biosystems)

-Εξειδικευμένους εκκινητές

-Μήτρα cDNA

Τα cDNA-στόχοι ενισχύθηκαν με εξειδικευμένους εκκινητές (Πιν. 4.2.6) που σχεδιάστηκαν στη μεταγραφόμενη περιοχή του κάθε γονιδίου με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν κοντά στην περιοχή του 3' άκρου των γονιδίων και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 60 έως 70 ζεύγη βάσεων.

Το πρόγραμμα του PCR περιλαμβάνει 10 λεπτά επώαση στους 95°C και ακολούθησαν 40 κύκλοι με 95°C για 15 δευτερόλεπτα και 60°C για 1 λεπτό. Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός διμερών των εκκινητών ελέγχθηκε για κάθε ζεύγος χωριστά από την ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης στο τέλος της αντίδρασης.

Τα επίπεδα έκφρασης ενός γονιδίου του *Τ. aestivum* που κωδικοποιεί για την τιουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικός έλεγχος για να γίνει κανονικοποίηση στις μικρές διαφορές που παρουσιαζόταν στις ποσότητες του cDNA.

Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου (Χ) υπολογίστηκαν σε αναλογία προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της τιουμπουλίνης (TUB). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν από τον τύπο (1+E)^{-ΔCt}, όπου ΔC_t είναι η διαφορά Ct^X-Ct^{TUB} και Ε είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR. Η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR (Ε) για κάθε γονίδιο υπολογίστηκε από την γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της απορρόφησης ανά κύκλο αντίδρασης, χρησιμοποιώντας το λογισμικό LinRegPCR (Ramakers el al 2003). Όλες οι αντιδράσεις qPCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκαν σε τρείς βιολογικές επαναλήψεις.

Ένζυμο	Γονίδιο	Όνομα	Αλληλουχία
		Εκκινητή	
	δ-ΟΑΤ	TdOAT-854F	5'-GCAGATCAAGAAGCCAGAATCG-3'
		TdOAT-917R	5'-TAAATCCCGACCGCACCTATC-3'
	P5CR	TdP5CR-158F	5'-TTTCTTGGCAATAGAGGCCATG-3'
Αναγωγαση του σ'-πυρολίνο-δ-καρβοςυλικό		TdP5CR-229R	5′-AGACCAAGAGCAAGATCCCGA-3′
	P5CS1	TdP5CS1-739F	5'-CGTATACATGCACGTGGACCTG-3'
Συνθετάση του δ¹-πυρολινο-5-καρβοξυλικό		TdP5CS1-809R	5'- CCTTTCCCTCGTAAGAGCCATC-3'
		TdP5CS2-665F	5'-TGCACCCTCGAATTTGTTGA-3'
Συνθετασή του ο'-πυρολινο-5-καρβοξυλικό	P5032	TdP5CS2-736R	5'-TGTGTGTGCACTTCCATAACGA-3'
Τιομμπομλίνη		TdTUB-415F	5'-GCCCAACATACACCAACCTCA-3'
	IUD	TdTUB-475R	5'-GAAGCTGTCAGCGATGAAATGA-3'

4.2.3 Προσδιορισμός προλίνης

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της ελεύθερης προλίνης εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας της μέθοδο της όξινης νινυδρίνης (Bates et al 1973):

-500mgr φρέσκου φυτικού ιστού (υπέργειο & υπόγειο τμήμα) ομογενοποιήθηκε με 10ml σουλφοσαλικυλικού οξέος (3%).

-Το δείγμα επωάστηκε σε υδατόλουτρο για 10λεπτά στους 100°C.

-Ακολούθησε διήθηση του δείγματος με διηθητικό χαρτί.

- -Σε 2ml του διηθημένου δείγματος προστίθενται 2ml οξικό οξύ + 2ml όξινη νινυδρίνη.
- -Το δείγμα επωάστηκε σε υδατόλουτρο για 1 ώρα στους 100°C. Μετά το πέρας της ώρας η αντίδραση τερματίστηκε με την τοποθέτηση των δειγμάτων σε πάγο.
- -Εν συνεχεία, έγινε προσθήκη 4ml τολουένιο και πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση για 15-20 δευτερόλεπτα, προκειμένου να διαχωριστεί η οργανική από την ανόργανη φάση.

-Το εκχύλισμα της οργανικής φάσης μετρήθηκε σε μήκος κύματος 520nm σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2800 Tokyo, Japan).

Η καμπύλη αναφοράς πραγματοποιήθηκε με γνωστές συγκεντρώσεις προλίνης και η συγκέντρωση της προλίνης υπολογίστηκε σε σχέση με το νωπό βάρος των δειγμάτων ως εξής :

[(μg προλίνης/ml x ml τολουένιο)/115 μg/μmol]/[(g δείγματος)/5] =μmol προλίνης/g νωπού βάρους δείγματος

Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για τον υπολογισμό της προλίνης.

Διαλύματα και θρεπτικά υλικά ανάπτυξης μικροοργανισμών

<u>Διαλύματα απομόνωσης RNA από φυτικούς ιστούς</u>

Διάλυμα εκχύλισης (Extraction Buffer) RNA

50 mM Tris-HCl pH: 8.3, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Lauryl sarcosine.

3Μ Οξικό νάτριο (CH₃COONa) pH:5.2

Σε τελικό όγκο 1 lt H₂O διαλύονται 246,09 gr άνυδρο οξικό νάτριο. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 5,2 με την προσθήκη πυκνού οξικού οξέος. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

10T/10E

10 mM Tris-HCl pH: 8.3, 10 mM EDTA.

8 Μ Χλωριούχο λίθιο (LiCl)

Σε τελικό όγκο 100ml dH₂O διαλύονται 33.9 gr LiCl.

10T/1E

10 M Tris-HCl pH: 8.0, 1 mM EDTA.

<u>Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων</u>

1x TAE

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50x ΤΑΕ το οποίο αραιώνεται 50 φορές, 50x ΤΑΕ: 242 gr Tris base, 57.1 ml οξικού οξέος και 0.5 ml EDTA pH: 8.0 σε ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1 lt.

Διάλυμα βρωμιούχου αιθίδιου 10mg/ml.

0.5 gr βρωμιούχου αιθιδίου προστίθεται σε 100 ml dH₂O και αναδεύεται καλά. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό δοχείο στους 4°C. Η τελική συγκέντρωση του στην πηκτή αγαρόζης είναι 0.5 μg/ml.

Διάλυμα φόρτωσης

0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.

Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

LB

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *E. coli* : 0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 1%(w/v) NaCl, 1% (w/v) πεπτόνη.

Στην περίπτωση στερεού υποστρώματος, προστίθεται 1.5% (w/v) άγαρ.

Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδίων

Buffer EB 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 STET buffer 8% Σακχαρόζη, 5% Triton X 100, 50 mM Tris-HCl pH: 8.0, 50 mM EDTA

Διάλυμα λυσοζύμης

50 mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1 ml dH2O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C

<u>Διαλύματα μετασχηματισμού κυττάρων Ε. coli</u>

100 mM IPTG

23.8 g IPTG (ισοπρόπυλ-β-D- θειογαλακτοπυρανοσίδη, Boehringer Mannheim) διαλύονται σε 1 ml dH₂O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.

2% X-Gal

0.02 gr X-Gal (5-βρώμο-4-χλώρο-3-ινοδυλ-β-D-γαλακτοσιδάση, Boehringer-Mannheim) προστίθενται σε 1 ml διμέθυλ-φορμαμίδιο.

<u>Αντιβιοτικά</u>

Αμπικιλίνη

Μητρικό διάλυμα: 50 mg/ml σε απιονισμένο νερό. Τελική συγκέντρωση: 50 μg/ ml θρεπτικού διαλύματος

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.3.1 Ενίσχυση ακολουθιών των γονιδίων *P5CS1, P5CS2, δ-OAT, P5CR* και *TUB* στο *Triticum turgidum var. durum*

Λαμβάνοντας υπόψη την *in silico* έρευνα που αποκάλυψε την ύπαρξη δύο γονιδίων που πιθανά κωδικοποιούν για την συνθετάση του δ¹-πυρολινο-5καρβοξυλικό (P5CS), ενός γονιδίου που πιθανά κωδικοποιεί για την αναγωγάση του δ¹-πυρολινο-5-καρβοξυλικό (δ-OAT) και ενός γονιδίου που πιθανά κωδικοποιεί για την ρεδουκτάση του δ¹-πυρολινο-5-καρβοξυλικό (P5CR) στο μαλακό σιτάρι, ενισχύθηκαν τμήματα των κωδικών περιοχών των γονιδίων *P5CS1*, *P5CS2*, δ-OAT, P5CR και *TUB* στο σκληρό σιτάρι. Αναλυτικά, για τις μελετούμενες ποικιλίες σκληρού σίτου Rusticano και Grazia, με το πρόγραμμα PCR και τη χρήση των εκκινητών (Πίνακες 4.2.1 & 4.2.4) ενισχύθηκαν για τα γονίδια *TdP5CS1*, *TdP5CS2*, *Td*δ-OAT, *TdP5CR* και *TdTUB* κωδικές περιοχές μεγέθους 835, 962, 375, 202 και 580 βάσεων αντίστοιχα.

Τα υψηλά ποσοστά ομολογίας των κλώνων που προέκυψαν με τα αντίστοιχα τμήματα των ακολουθιών της P5CS1, P5CS2, OAT και P5CR από το μαλακό σιτάρι, το ρύζι, το κριθάρι και το καλαμπόκι αντίστοιχα, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι κλώνοι που απομονώθηκαν αντιστοιχούν στη P5CS1, τη P5CS2, την OAT και τη P5CR από το σκληρό σιτάρι (*T. turgidum var. durum*).

Στη συνέχεια ενισχύθηκε το 3΄ άκρο των γονιδίων (Πίνακας 4.2.5) *TdP5CS1*, *TdP5CS2*, *Tdδ-OAT* και *TdP5CR* ακολουθώντας την ίδια διαδικασία (αντίδραση λιγοποίησης, εισαγωγή πλασμιδίου σε επιδεκτικά κύτταρα *E.coli*, απομόνωση πλασμιδιακού DNA, πέψη πλασμιδιακού DNA, αλληλούχιση) με αποτέλεσμα για τα παραπάνω γονίδια να έχουν αλληλουχηθεί τα κάτωθι τμήματα :

TdP5CS1: 1080 νουκλεοτίδια που πιθανά κωδικοποιούν 275 αμινοξέα και επιπλέον αντιστοιχούν σε 210 νουκλεοτίδια του 3΄ άκρο του γονιδίου. Με κόκκινο συμβολίζονται οι εκκινητές, με μπλε η κωδική περιοχή, και με μαύρο το 3΄ άκρο των γονιδίων.

CGAAGTGGTAATGGTCTTCTCCTAAAAGGTGGAAAAGAAGCAATGAGATCAA ACGCAATATTGCATAAGGTTATAACCAATGCTATTCCTGACAATGTTGGCGAA AAATTGATTGGCCTTATTACAACTAGAGATGAAATTGCGGATTTGCTAAAGCAT GATGATGTCATTGATCTTGTCATTCCAAGAGGGAGTAATAAGCTTGTTGCTCAA ATCAAATCATCAACAAAGATTCCTGTTCTTGGCCATGCTGATGGTGTTTGTCAT GTATATATTGACAAATCAGCAGACATGGATATGGCAAAACGTATTGTGATGGA TGCAAAAATTGATTACCCAGCTGCCTGCAACGCAATGGAGACGTTGCTTGTTC

TdP5CS2: 1309 νουκλεοτίδια που πιθανά κωδικοποιούν 316 αμινοξέα και επιπλέον αντιστοιχούν σε 297 νουκλεοτίδια του καρβόξυ-τελικού άκρου. Με κόκκινο συμβολίζονται οι εκκινητές, με μπλε η κωδική περιοχή, και με μαύρο το 3΄ άκρο των γονιδίων.

GGACCCTATCCCCCATACACTGAAAAAAACAGAGGTTGCCAAGGATTTAGTTT TCGAGAAGATGTACTGCCCATTAGGTGTTCTTCTAATTATTTTGAGTCTCGTC **CTGATGCCCTGGTCCAGATTGCAGCTCTAGCAATCCGAAGTGGAAATGGCCTT CTTCTGAAAGGAGGAAAAGAAGCTATGAGATCAAACACAATATTACATAAGGT** CATAACCAGTGTGATTCCAGATGCTGTTGGTAAAAAGCTTATTGGCCTTGTGA TTATTCCAAGAGGCAGTAACAGGCTTGTTTCTCAAATCAAAGCACAAACCAAG ATTCCCGTTCTTGGTCATGCTGATGGTATCTGCCATGTTTATATTGATAAATCA GCTGACATGGACATGGCAAAACGTATCGTATTGGATGCAAAGGTTGATTATCC TGCAGCGTGTAATGCTATGGAAACACTACTTGTTCATAAAGATCTGAACAAGA CAGAGGGTCTTGATGATTTATTGATGGAACTTGCGAAAGAAGGAGTTGTTATTT ATGGTGGGCCTGTCGCACATGACACACTGAAAGTACCAAAGGTAGATTCATTT CATCATGAGTATAGCTCAATGGCATGCACCCTCGAATTTGTTGATGATGTGCA **TCACAACTGATAAGAAGTCAGCAGATACTTTTCTACAACAAGTTGACAGTGCT** GCTGTGTTCCATAATGCAAGCACAAGGTTCTGTGATGGGACTCGCTTCGGTCT AGGTGCAGAGGTTGGCATAAGTACAGGGCGCATACATGCTCGTGGACCTGTT

Τα τελευταία χρόνια, έχουν απομονωθεί 2 ισότυποι της συνθετάσης του δ¹πυρολινο-5-καρβοξυλικό σε αρκετά φυτικά είδη : *A. thaliana, L. esculentum, M.* sativa, O. sativa, M. truncatula, P. vulgaris, B. nappus, S. bicolor και H. tuberosus.

Τάδ-OAT: 1114 νουκλεοτίδια που πιθανά κωδικοποιούν 287 αμινοξέα και επιπλέον αντιστοιχούν σε 194 νουκλεοτίδια του καρβοξυ-τελικού άκρου. Ομοίως στα φυτά: *A. thaliana, O. sativa, B. nappus* και *H. tuberosus* έχει απομονωθεί ένας κλώνος που πιθανά κωδικοποιεί για την αναγωγάση του δ¹-πυρολινο-5-καρβοξυλικό, ενώ στη *M. truncatula* εντοπίστηκαν 2 ισότυποι του ενζύμου. Με κόκκινο συμβολίζονται οι εκκινητές, με μπλε η κωδική περιοχή, και με μαύρο το 3΄ άκρο των γονιδίων.

CTTTGATTGTCTCTTGCTGTGGATGTTTCCATGGTCGGACATTGGGGGGTCATTT CTATGAGCTGTGACAATGATGCAACTCGTGGTTTTGGTCCTTTGGTTCCTGGTC ATCTTAAAGTTGATTTTGGAGACATTGATGGGTTGGAGAAAATCTTTAAAGAGC ATGGGGATCGTATATGTGGTTCTTTGTTTGAACCAATCCAAGGAGAAGCTGGG **GTAATAATCCCACCAGATGGTTATTTGAAAGCTGTCAGAGATTTGTGCTCTAG** GCACAACATTCTGATGATTGATGAGATCCAAACAGGCATAGCTCGAACTG **GCAAAATGTTGGCATGCGATTGGGAAGGTGTACGACCTGATATGGTGATTCTA G**GCAAGGCACTTGGTGCTGGAGTAGTTCCGGTCAGTGCAGTTCTCGCGGATA AGGATATCATGCTGTGTATCAAGCCAGGAGAACATGGAAGTACCTTTGGTGGA AACCCGTTGGCAAGTGCTGTGGCAATTGCATCTCTGAAAGTGGTCAAGGATGA AGGTCTTGTTGAAAGAGCCGCGGAGTTAGGTCAGGAGTTCAGAGACCAGTTA CGAAAGGTTCAACAGAAATTTCCTGATATTATTAGGGAAATACGTGGGAGAGG TTTGCTTAATGCAGTAGACCTAAGCGGCAAAGCTCTATACCCTGCTTCTGCATA TGATATTTGCATCAAGCTAAAGGAGAGGGGGCATTCTTGCAAAGCCCACGCATG ACACCATAATCCGATTAGCCCCTCCCATTTCAATCAGTCCCGAGGAGCTCACA GAAGCATCGAAGGCACTCAGCGATGTGCTCGAGCATGACTTGCCGCAGTTGC

TdP5CR: 564 νουκλεοτίδια που πιθανά κωδικοποιούν 137 αμινοξέα και επιπλέον αντιστοιχούν σε 211 νουκλεοτίδια του καρβόξυ-τελικού άκρου. Το γονίδιο *P5CR* ήταν το πρώτο που απομονώθηκε από το μονοπάτι της προλίνης στη *G. max*, όπου προέκυψαν 2-3 αντίγραφα του γονιδίου. Αργότερα απομονώθηκε ένας κλώνος που πιθανά κωδικοποιεί για την ρεδουκτάση του δ¹-πυρολινο-5-καρβοξυλικό από το *P. sativum, A. thaliana* και *A. deliciosa*. Ακολούθως, σε φύλλα *S. oleracea* εντοπίστηκαν 2 ισότυποι της συνθετάσης του δ¹-πυρολινο-5-καρβοξυλικό. Με κόκκινο συμβολίζονται οι εκκινητές, με μπλε η κωδική περιοχή, και με μαύρο το 3΄ άκρο των γονιδίων.

4.3.2 Συγκριτική μελέτη των P5CS, OAT και P5CR στο σκληρό σιτάρι και άλλα φυτά

Η ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών που πιθανά κωδικοποιούν για τη P5CS1 και P5CS2 στο σκληρό σιτάρι με άλλες χαρακτηρισμένες συνθετάσες εμφανίζεται στην Εικόνα 4.3.1. Οι αλληλουχίες αυτές κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμφανίζουν μεταξύ τους ομολογία 86,7%. Η συγκριτική ανάλυση αυτών των αλληλουχιών έδειξε ότι το γονίδιο P5CS1 από το T. turgidum var. durum κωδικοποιεί πρωτεΐνη που παρουσιάζει 89% ομολογία με την P5CS1 του *O. sativa,* 86% με τη P5CS2 του *S. bicolor* και 74% με τη P5CS1 των *A. thaliana* και *B. nappus.* Αντίστοιχη ανάλυση για το γονίδιο *TdP5CS2* έδειξε ότι κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που παρουσιάζει ομοιότητα 90% με τη OsP5CS2, 89% με τη SbP5CS1, 85% με τη BnP5CS2 και 75% με τη P5CS2 του *A. thaliana.* Επιπλέον τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης έδειξαν ότι ανάμεσα στις προαναφερθείσες αμινοξικές ακολουθίες υπάρχουν έντονα συντηρημένες περιοχές, συμπεριλαμβανομένου του συντηρημένου μοτίβου πρόσδεσης NAD(P)H και οι πιθανές περιοχές της Leu και της GSA-DH, Εικόνα 4.3.1.

Η φυλογενετική ανάλυση των P5CSs που έχουν απομονωθεί έως σήμερα από διάφορα φυτά, παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.3.4. Όπως προκύπτει από το δενδρόγραμμα όλες οι φυτικές πρωτεΐνες με εξαίρεση την TomPRO1 (L. esculentum PRO1) που παρουσιάζει ομοιότητα με την προκαρυωτική GSH ή GPK (Fujita et al 1998), χωρίζονται σε 2 κύριες ομάδες, που διαχωρίζουν τις P5CSs των μονοκότυλων φυτών από τις αντίστοιχες των δικότυλων. Οι 2 υπό μελέτη πρωτεΐνες του *T. turgidum var. durum* έχουν ενταχθεί στον κλάδο των μονοκότυλων, με την πρωτεΐνη TdP5CS1 να έχει ιδιαίτερη σχέση με τη TaP5CS1 (*T.aestivum* P5CS) και τη OsP5CS1 (*O. sativa* P5CS1). Η πρωτεΐνη TdP5CS2 παρουσιάζει σημαντική ομολογία με τη SbP5CS1 (*S. bicolor* P5CS1), ZmP5CS (*Z. mays* P5CS) και OsP5CS2 (*O. sativa* P5CS2).

1 1 1 1 1 1 1 1	ME E - L D R S R A F A R D V K R I V V K V G T A V V T G K G G R L A L G R L G A L C E Q L A E L N S D G P E V I L V S S G M T - E - I D R S R A F A K D V K R V I I V V K V G T A V V T G K G G R L A L G R L G A L C E Q L A E L N S D G P E V I L V S S G M E	AtP5CS1.PR(AtP5CS2.PR(BnP5CS1.PR(BnP5CS2.PR(OSP5CS1.PR(OSP5CS2.PR(SbP5CS1.PR(SbP5CS2.PR(TdP5CS1.PR(TdP5CS2.PR(
62 63 63 62 81 75 62 1 1	A V G L G R Q R L R Y R Q L V N S S F A D L Q K P Q T E L D G K A C A G V G Q S S L M A Y Y E T M F D Q L D V T A A Q L L V N D S S F A D L Q K P Q M E L D G K A C A G V G Q S S L M A Y Y E T M F D Q L D V T V A A Q M L V T D S S F R D K D F R K Q L N E T Y A V G L G R Q R L R Y R Q L V N S S F A D L Q K P Q M E L D G K A C A V G Q N S L M A Y Y E T M F D Q L D V T V A A Q M L V T D S S F R D K D F R K Q L N E T Y A V G I G R Q R L R Y R Q L V N S S F A D L Q K P Q M E L D G K A C A V G Q N S L M A Y Y E T M F D Q L D V T V A A Q M L V T D S S F R D K D F R K Q L S E T Y A V G I G R Q R L R Y R L I H S S F A D L Q K P Q L L D G K A C A A V G Q N S L M A L Y D T L F T Q L D V T S A Q L L V T D N D F R D K D F R K Q L T E T Y A V G U G Q R Q R L R Y R K L Y N S S F A D L Q K P Q M E L D G K A C A A V G Q N S L M A L Y D T L F T Q L D V T S A Q L L V T D N D F R D K D F R K Q L T E T Y A V G V G R Q R L R Y R K L V N S S F A D L Q K P Q M E L D G K A C A A V G Q S G L M A L Y D M L F N Q L D V T S S Q L L V T D S D F R N P K F R E Q L T E T Y A V G V G R Q R L K Y K L V N S S F A D L Q K P Q M E L D G K A C A A V G Q S G L M A L Y D M L F N Q L D V S S Q L L V T D S D F P N P K F R E Q L T E T Y A V G V G R Q R L K Y K L V N S S F A D L Q N P Q M M D M D G K A C A A V G Q S G L M A L Y D M L F N Q L D V S S Q L L V T D S D F M D P S F G D Q L R E T Y A V G V G R Q R L Q Y R K L V N S S F A D L Q N P Q M N F D G K A C A A V G Q S G L M A I Y D M L F T Q L D V S S Q L L V T D R D F R D P S F G D Q L R E T Y A V G V G R Q R L Q Y R K L V N S S F A D L Q N P Q M D G K A C A A V G Q S G L M A I Y D M L F T Q L D V S S S Q L L V T D R D F R D P S F G D Q L R E T Y A V G V G R Q R L Q Y R K L V N S S F A D L Q K P Q M E L D G K A C A A V G Q S G L M A I Y D M L F T Q L D V S S S Q L L V T D S D F N P N F R E R L R E T Y A V G V G R Q R L Q Y R K L V N S S F A D L Q K P Q M E L D G K A C A A V G Q S G L M A I Y D M L F T Q L D V S S S Q L L V T D S D F N P N F R E R L R E T Y A V G V G R Q R L Q R R K L Y N S S F A D L Q	AtP5CS1.PR(AtP5CS2.PR(BnP5CS1.PR(BnP5CS2.PR(OSP5CS1.PR(OSP5CS2.PR(SbP5CS2.PR(SbP5CS2.PR(TdP5CS2.PR(TdP5CS2.PR(
142 142 143 143 142 161 155 142 1	K S M L D L R V I P T F N E N D A I S T R R A P Y Q D S S G I F W D N D S L A A L L A L E L K A D L L I L L S D V E G L Y T G P P S D E N S K L I H T F V K E K K A M L R M R V I P V F N E N D A I S T R R A P Y K D S T G I F W D N D S L A A L L S L E L K A D L L I L L S D V E G L Y T G P P S D B N S K L I H T F I K E K E S L L A L K V I P V F N E N D A V S T R K A P Y E D S S G I F W D N D S L S A L L A L E L K A D L L V L S D V E G L Y S G P P S D P H S K L I H T F I K E K E S L L A L K V I P V F N E N D A V S T R K A P Y E D S S G I F W D N D S L S A L L A L E L K A D L L V L S D V E G L Y S G P P S D P H S K I T M T Y N K E K E S L L A L K V I P V F N E N D A V S T R K A P Y E D S S G I F W D N D S L S A L L A L E L K A D L L V L L S D V E G L Y S G P P S D P H S K I T M T Y N K E K E S L L A L K V I P V F N E N D A I S T R K A P Y E D S S G I F W D N D S L S A L L A L E L K A D L L I L L S D V E G L Y S G P P S D P H S K I T M T Y N K E K N S L L D L K V I P V F N E N D A I S T R K A P Y E D S S G I F W D N D S L A R L L A Q E L K A D L L I L L S D V E G L Y S G P P S D P S S K I I H T Y H K E K N S L L D L K V I P V F N E N D A I S T R K A P Y E D S S G I F W D N D S L A R L L A Q E L K A D L L I M L S D V E G L Y S G P P S D P O S K I I H T Y H K E K F A L N L K V I P U F N E N D A I S T R K A P Y E D S S G V F W D N D S L A R L L A Q E L K A D L L I M L S D V E G L Y S G P P S D P O S K I I H T Y H K E K F A L L N L K V I P U F N E N D A I S T R K A P Y E D S S G I F W D N D S L A Z L L A E L M A D L L I M L S D V E G L Y S G P P S D P O S K I I H T Y H K E K E S L L D L K V V P I F N E N D A I S T R K A P Y E D S S G I F W D N D S L A Z L A A E L N A D L L I M L S D V E G L Y S G P P S D P O S K I I H T Y H K E K E S L L D L K V V P I F N E N D A I S T R K A P Y E D S S G I F W D N D S L A G L L A I E L K A D L L V L S D V D G L Y S G P P S D P O S K I I H T Y T K E K E S L L D L K V V P I F N E N D A I S T R K A P Y E D S S G I F W D N D S L A G L L A I E L K A D L L V L S D V D G L Y S G P P S D P O S	AtP5CS1.PRG AtP5CS2.PRG BnP5CS1.PRG BnP5CS2.PRG OSP5CS2.PRG SD5CS2.PRG SD5CS2.PRG Td95CS2.PRG Td95CS2.PRG
222 223 223 222 241 235 222 1 1	H Q D E I T F G D K S R L G R G G M T A K V K A A V N A Y A G I P V I I T S G Y S A E N I D K V L R G L R V G T L F H Q D A R L W A P I T D S N A R D M A V A H Q D E I T F G D K S K L G R G G M T A K V K A V N A Y G G V P V I I T S G Y A A E N I S K V L R G L R V G T L F H Q D A H L W A P V O T T S R D M A V A Q D V I T S G F A A E N I I S K V L R G L R V G T L F H Q D A H L W A P V O T T S R D M A V A H Q N E I T F G D K S K V G R G G M T A K V K A V N A Y G G V P V I I T S G Y A A E N I I S K V L R G L R V G T L F H Q D A H L W A P V O T T S R D M A V A H Q N E I T F G D K S R V G R G G M T A K V K A V H A A E A G I P V V I T S G F A A E N I I N V L Q G K R I G T L F H K D A H E W A O V K E V D A R E M A V A H Q N E I T F G D K S R V G R G G M T A K V K A A V H A A E A G I P V V I T S G F A A E N I I N V L Q G K R I G T L F H K D A H E W A O V K E V D A R E M A V A H Q O E I T F G D K S R V G R G G M T A K V K A A V L A S N S G I P V V I T S G F A A E N I I N V L Q G K R I G T L F H K D A H E W A O V K E V D A R E M A V A H Q O E I T F G D K S R V G R G G M O A K V K A A V L A S N S G I P V V I T S G F A T N I N V L Q G K R I G T L F H K N A N L W E S S K D V S T R E M A V A H Q O E I T F G D K S R V G R G G M O A K V K A A V L A S N S G I P V V I T S G F A T I D S I I K V L M G E K I G T L F H K N A N L W E S S K D V S T R E M A V A H G K L I S F G E K S R V G R G G M O A K V A A F T A S S K G I P V V I T S G F A T I D S I I K V L M G E K I G T L F H K N A N L W E S K E A T A R E M A V A H G K L I S F G E K S N V G R G G M O A K V A A A N A A S K G V P V V I A S G F A T D S I I K V L K G E K I G T L F H K D A S L W E O S K E A T A R E M A V A H G K L I S F G E K S N W G R G G M O A K V A A A N A A S K G V P V V I A S G F A T D S I I K V L K G E K I G T L F H K D A S L W E P S K D V S A R E M A V A H H N E I T F G D K S R V R R G G M T A K V K A A F N A S K G V P V V I T R - F A S Q S I V R V L Q G E K I G T L F H K D A S L W E P S K D V S A R E M A L G M A V A H H N E I T F G D K S R V R R G G M T A K V K A	AtP5CS1.PR(AtP5CS2.PR(BnP5CS1.PR(BnP5CS2.PR(OSP5CS1.PR(OSP5CS2.PR(SbP5CS2.PR(SbP5CS2.PR(TdP5CS2.PR(TdP5CS2.PR(
302 303 303 302 321 315 301 1 1	A R E S S R K L Q A L S S E D R K K I L L D I A D A L E A N V T T I K A E N E L D V A S A Q E A G L E E S M V A R L V M Y P G K I S S L A A S V R K L A D M E D A R E S S R K L Q A L S S E D R K Q I L H D I A N A L E V N E K T I K A E N D L D V A A A Q E A G Y E E S L V A R L V M K P G K I S S L A A S V R K L A D M E D A R E C S R R L Q A L S S E E R K Q I L L K I A D A L E N E K I I R I E N E A D V T A Q E A G Y E K S L V A R L V M K P G K I S S L A A S V R K V A R V M K P G K I S S L A A S V R K V A R V M K P G K I S S L A A S V R K V A R V M K P G K I S S L A A S V R K V A R V M K P G K I S S L A N S V R K V A R M D D A R E C S R R L Q A L S S E E R K Q I L L K I A D A L E A N E K I I R I E N E A D V T A Q E A G Y E K S L V A R L A L K P G K I A S L A N M R V I A N M D D A R E C S R R L Q A L S S E E R K I L L D Y A D A L E A N E K I I R I E N E A D V T A Q E A G Y E K S L V A R L A L K P G K I A S L A N M R V I A N M D D A R D C S R H L Q K I S S E E R K K I L L D Y A D A L E A N E D L I R S E N E A D V A A Q V A G Y E K F L V A R L T T R P G K I A S L A S L A S S R R L A N M R V I A N M D D A R D C S R H L Q K L S S E E R K K I L L D I A D A L E A N E D L I R S E N E A D V A A A Q V A G Y E K F L V A R L T T R P G K I A S L A S S R R L A N M R V I A N M E D A R D C S R R L Q N L S S E E R K K I L L D I A D A L E A N E D L I R S E N E A D V E A A Q G A G Y E K S L V A R M T I K P G K I K S L A G S I R T A A M E D A R D C S R R L Q N L S S D E R K K I L L D I A D A L E A N E G A I R S E N E A D V E A A Q G A G Y E K S L V A R M T I K P G K I A S L A S I R A I A D M E D A R D C S R R L Q N L S S D E R K K I L L D V A D A L E E N V D L I R T E N E I D V S A A Q E A G Y E P S L V A R L T L K P G K I A S L A K S I R T L A Y M E D A R E S S R R L Q N L S S D E R K K I L L D V A D A L E E N V D L I R T E N E I D V S A A Q E A G Y E P S L V A R L T L K P G K I A S L A K S I R T L A Y M E D NAD (P) H binding domain	AtP5CS1. PR AtP5CS2. PR BnP5CS1. PR BnP5CS2. PR OsP5CS1. PR SbP5CS1. PR SbP5CS2. PR TdP5CS1. PR TdP5CS2. PR
382 383 383 382 401 395 381 1 2	P I G R V L K K T E V A D C L V L E K T S S P L G V L L I V F E S R P D A L V Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E A R R S N A I L H K V I T D A I P E T V G P I G R V L K K T C V A D D L I L E K T S S P L G V L L V F E S R P D A L V Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E A R R S N A I L H K V I T D A I P E T V G P I G R V L K K T E I S D C L I L E K T S S P L G V L L V F E S R P D A L V Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E A R R S N A I L H K V I T D A I P E T V G P I G R V L K K T E I S D C L I L E K T S S P L G V L I V F E S R P D A L V Q I A S L A I R S G N G L L K G G K E A K R S N A I L H K V I T D A I P D N V G P I G R V L K K T E V A D D L V L E K T S C P L G V L I V F E S R P D A L V Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E A K R S N A I L H K V I T D A I P D N V G P I N Q I L K K T E V A D D L V L E K T S C P L G V L L I V F E S R P D A L V Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E A K R S N A I L H K V I T D A I P D N V G P I N Q I L K K T E V A D D L V L E K T S C P L G V L L I V F E S R P D A L V Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E A M R S N T I L H K V I T G A I P D V V G P I S H T L K R T E V A K D L V F E K T Y C P L G V L L I I F E S R P D A L V Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E A M R S N T I L H K V I T G A I P D V V G P I S H T L K R T E V A K D L V F E K A Y C P L G V L L I I F E S R P D A L V Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E A M R S N T I L H K V I T S A I P S N Y G P I N Q I I K R T E V A E D L V L E K T S C P L G V L L I V F E S R P D A L V Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E A M R S N T I L H K V I T S A I P S N Y G P I N Q I I K R T E V A E D L V L E K T S C P L G V L L I V F E S R P D A L V Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E A M R S N T I L H K V I T S A I P S N Y G P I N Q I I K R T E V A E D L V L E K T S C P L G V L L I V F E S R P D A L V Q I A A L A I R S G N G L L L K G G K E A M R S N T I L H K V I T S V I P D A V G	AtP5CS1.PR(AtP5CS2.PR(BnP5CS1.PR(OsP5CS1.PR(OSP5CS1.PR(SbP5CS1.PR(SbP5CS1.PR(SbP5CS1.PR(TdP5CS1.PR(TdP5CS2.PR(
462 463 463 462 481 475 461 21 62	G K L I G L V T S R E E I P D L L K L D D V I D L V I P R G S N K L V T Q I K N T T K I P V L G H A D G I C H V Y V D K S C K L D M A K R I V S D A K L D Y P A G K L I G L V T S R E E I P D L L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K N S T K I P V L G H A D G I C H V Y V D K S C K L D M A K R I V S D A K L D Y P A G K L I G L V T S R E E I P E L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K N S T K I P V L G H A D G I C H V Y V D K S C K L D M A K R I V L D A K V D Y P A G K L I G L V T S R E E I P E L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K S S T K I P V L G H A D G I C H V Y V D K S A N V E M A R I V L D A K V D Y P A G K L I G L V T S R E E I P E L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K S S T K I P V L G H A D G I C H V Y V D K S A N V E M A R I V L D A K V D Y P A E K L I G L V T S R E E I A D L L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K S S T K I P V L G H A D G I C H V Y I D K S A N V E M A R I V L D A K V D Y P A K K L I G L V T S K E E I A D L L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K A S T K I P V L G H A D G I C H V Y I D K S A D M D M A K R I V L D A K V D Y P A K K L I G L V T S K D E I A D L L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K A T T K I P V L G H A D G I C H V Y I D K S A D M D M A K R I V L D A K V D Y P A K K L I G L V T S K D E I A D L L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K A T T K I P V L G H A D G I C H V Y I D K S A D M D M A K R I V L G A K V D Y P A E K L I G L V T S K D E I A D L L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K S T K I P V L G H A D G I C H V Y I D K S A D M D M A K R I V L G A K V D Y P A E K L I G L V T S K D E I A D L L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K S T K I P V L G H A D G I C H V Y I D K S A D M D M A K R I V L D A K I D H P A E K L I G L V T S K D E I A D L L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K S T K I P V L G H A D G I C H V Y I D K S A D M D M A K R I V L D A K I D H P A K K L I G L V T S K D E I A D L L K L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K A Q T K I P V L G H A D G I C H V Y I D K S A D M D M A K R I V L	AtP5CS1.PR(AtP5CS2.PR(BnP5CS2.PR(BnP5CS2.PR(OSP5CS1.PR(OSP5CS1.PR(SbP5CS2.PR(SbP5CS2.PR(TdP5CS2.PR(TdP5CS2.PR(
542 543 543 542 561 555 541 101 142	A C N A M E T L L V H K D L E C N A V L N E L I F A L Q S N G V T L Y G G P R A S K I L N I P E A R S F N H E Y C A K A C T V E V V E D V Y G A I D H I H R H G A C N A M E T L L V H K D L E C N G F L D D L I Y V L Q T K G V T L Y G G P R A S A K L N I P E T K S F H H E Y S S K A C T V E I V E D V Y G A I D H I H R H G A C N A M E T L L U H K D L I Z (G W L N D I I L A L R T E G V V L Y G G P V A S S L L N I P Q A H S F H H E Y S S K A C T V E I V D D V Y A A I D H I H R H G A C N A M E T L L I H K D L I Z K G W L N D I I L A L R T E G V V L Y G G P V A S S L L N I P Q A H S F H H E Y S S L A C T V E I V D D V Y A A I D H I N L H G A C N A M E T L L I H K D L I Z K G W L N D I I L A L R T E G V V L Y G G P V A S S L L N I P Q A H S F H H E Y S S L A C T V E I V D D V Y A A I D H I N L H G A C N A M E T L L V H K D L N K S P G L D D I L V A L K T E G V N L Y G G P V A S S L L N I P Q A H S F H H E Y S S M A C T V E F V D D V Q S A I D H I N L H G A C N A M E T L L V H K D L N K S P G L D D I L V A L K T E G V N I Y G G P V A H D X L K L V D S F H H E Y S S M A C T V E F V D D V Q S A I D H I N R Y G A C N A M E T L L V H K D L N K S E G L D D L L V E L E K E G V V I Y G G P V A H D K L K V P K V D S F H H E Y S S M A C T I E F V D D V Q S A I D H I N R Y G A C N A M E T L L V H K D L N K S E G L D D L L V E L E K E G V V I Y G G P V A H D K L K V P K V D S F H H E Y S S M A C T I E F V D D V Q S A I D H I N R Y G A C N A M E T L L V H K D L L M A P G L D D L L K L K T E G V N I Y G G P V A H E L L C I P K A D S L H H E Y S S M A C T I E F V D D V Q S A I D H I N R Y G A C N A M E T L L V H K D L L M A P G L D D L L K A K F G V N I Y C G P V A H H E L C L P K A D S L H H E Y S S M A C T I E F V D D V Q S A I D H I H R Y G A C N A M E T L V H K D L M K I P D L N L K T A G V N L Y C G P V A H E L C L G Y P K A D S L H H E Y S S M A C T I E F V D D V Q S A I D H I H R Y G A C N A M E T L L V H K D L M K T P D L N L L L A K E G V Y I Y G G P V A H E L C G Y P A H S S F H H E Y S S M A C T I E F V D D V Q S A I D H I H	AtP5CS1.PR(AtP5CS2.PR(BnP5CS1.PR(BnP5CS2.PR(OSP5CS1.PR(OSP5CS2.PR(SbP5CS1.PR(SbP5CS2.PR(TdP5CS1.PR(TdP5CS2.PR(
622 623 623 622 641 635 621 181 222	S A H T D C I V T E D H E V A E L F L R Q V D S A A V F H N A S T R F S D G F R F G L G A E V G V S T G R I H A R G P V G V E G L L T T R W I M R G K G Q V V D S A A V F H N A S T R F S D G F R F G L G A E V G V S T G R I H A R G P V G V E G L L T T R W I M R G K G Q V V D S A A V F H N A S T R F S D G F R F G L G A E V G I S T S R I H A R G P V G V E G L L T T R W I M R G K G Q V V D S A A V F H N A S T R F S D G A R F G L G A E V G I S T S R I H A R G P V G V E G L L T T R W I M R G K G Q V V D S A A V F H N A S T R F S D G A R F G L G A E V G I S T S R I H A R G P V G V E G L L T T R W I L K G T G H V V D S A A V F H N A S T R F S D G A R F G L G A E V G I S T S R I H A R G P V G V E G L L T T R W I L K G T G H V V D S A A V F H N A S T R F S D G A R F G L G A E V G I S T S R I H A R G P V G V E G L L T T R W I L K G T G H V V D S A A V F H N A S T R F S D G A R F G L G A E V G I S T S R I H A R G P V G V E G L L T T R W I L K G R G Q V V N S A H T D C I V T T D D K V A E T F L R V D S A A V F H N A S T R F S D G A R F G L G A E V G I S T S R I H A R G P V G V D G L L T T R W I L R G R G Q V V N S A H T D C I T T D G K A R E T L Q Q V D S A A V F H N A S T R F C D G A R F G L G A E V G I S T G R I H A R G P V G V D G L L T T R W I L R G S G Q V V N S A H T D C I I T T D E S A A E A F L Q Q V D S A A V F H N A S T R F C D G A R F G L G A E V G I S T G R I H A R G P V G V D G L L T T R C I L R G S G Q V V N S A H T D C I I T T D E S A A E A F L Q Q V D S A A V F H N A S T R F S D G A R F G L G A E V G I S T G R I H A R G P V G V D G L L T T R C I L R G S G Q V V N S A H T D C I V T T D D K V A E T F L R Q V D S A V F W A S T R F S D G A R F G L G A E V G I S T G R I H A R G P V G V E C L L T T R W I M R G S G Q V V N S A H T D C I V T T D D K V A E T F L R Q V D S A V F W N A S T R F S D G A R F G L G A E V G I S T G R I H A R G P V G V E G L L T T R W I M R G S G Q V V N S A H T D C I V T T D D K V A E T F L R Q V D S A A V F W N A S T R F S D G A R F G L G A E V G I S T G R I H A R G P V G V E G L L T T R W	AtP5CS1. PRG AtP5CS2. PRG BnP5CS1. PRG DsP5CS2. PRG OSP5CS2. PRG SbP5CS1. PRG SbP5CS2. PRG TdP5CS1. PRG TdP5CS2. PRG
702 703 703 702 721 715 701 261 302	G D N G I VYTH Q D I P I Q A G D N G I VYTH K D L A T G D R G VYTH K D L A T G D R G VYTH K D L A T G D R G VYYTH K S L P L Q G D K G VYYTH K S L P L Q G D K G VYTH K D L P L Q G D K G VYTH K D L P L Q G D K G VYTH K S L P L Q G D K G VYTH K S L P L Q G D K G VYTH K S L P L Q	AtP5CS1.PR(AtP5CS2.PR(BnP5CS1.PR(OSP5CS1.PR(OSP5CS1.PR(SbP5CS1.PR(SbP5CS2.PR(TdP5CS1.PR(TdP5CS2.PR(

Εικόνα 4.3.1 Ευθυγράμμιση των 2 αμινοξικών ακολουθιών που κωδικοποιούν πιθανές P5CSs του *T. turgidum var. durum* και χαρακτηρισμένων P5CSs άλλων φυτικών οργανισμών. *AtP5CS1: A. thaliana* (NM_129539), *AtP5CS2: A. thaliana* (NM_115419.4), *BnP5CS1: B. nappus* (AAK01360), *BnP5CS2: B. nappus* (EEF38154), *OsP5CS1: O. sativa* (BAA19916), *OsP5CS2: O. sativa* (BAB64280), *SbP5CS1: S. bicolor* (ACU65226), *SbP5CS2: S. bicolor* (ACU6522). Το πιθανά συντηρημένο μοτίβο πρόσδεσης NAD(P)H και οι πιθανές περιοχές της Leu και της GSA-DH περικλείονται σε κουτιά με κόκκινο περίγραμμα.

Εν συνεχεία, συγκριτική μελέτη της πρωτεΐνης ΟΑΤ μεταξύ των φυτών (Εικ. 4.3.2) έδειξε ότι η ομολογία της πρωτεΐνης μεταξύ *T. turgidum var. durum* και *O. sativa* κυμαίνεται στο 90%, ενώ μεταξύ *T. turgidum var. durum, A. thaliana* και *M. truncatula* στο 71 και 66% αντίστοιχα. Η ομοιότητα των ανωτέρω αμινοξικών ακολουθιών επέτρεψε την αναγνώριση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων (Glu 46, Asp 79 και Lys 108 της πρωτεΐνης TdOAT) που είναι σημαντικά στην καταλυτική δράση του ενζύμου TdOAT. Επιπλέον, το μοτίβο πρόσδεσης PLP φαίνεται να είναι έντονα συντηρημένο και να παρουσιάζει υψηλή ομολογία μεταξύ των μονοκότυλων *T. turgidum var. durum* και *O. sativa*.

Ομοίως η φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης ΟΑΤ (Εικ. 4.3.5) που έχει απομονωθεί από διάφορους φυτικούς οργανισμούς εμφανίζει τον ίδιο διαχωρισμό σε 2 διακριτούς κλάδους με μονοκότυλα και δικότυλα φυτά. Η υπό μελέτη πρωτεΐνη TdOAT εμφανίζεται να έχει πολύ στενή σχέση με την *TuOAT (T. urartu* OAT), ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρείται σαφής διαχωρισμός στις πρωτεΐνες ΟΑΤ στα δικότυλα φυτά, μιας οι ΟΑΤ από τα ψυχανθή (*G.max και M. truncatula*) σχηματίζουν ένα ξεχωριστό διακριτό κλάδο και διαφοροποιούνται από τις αντίστοιχες πρωτεΐνες των *A. thaliana* και *B. nappus*.



Εικόνα 4.3.2 Ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας που κωδικοποιεί πιθανή ΟΑΤ του *T. turgidum var. durum* και χαρακτηρισμένων OATs άλλων φυτικών οργανισμών. *AtOAT: A. thaliana* OAT (BAB08263), *MtOAT: M. truncatula* OAT (CAC82185), *OsOAT: O. sativa* OAT (BAG94132). Η πιθανά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης PLP περικλείεται σε κουτί με κόκκινο περίγραμμα, ενώ με κόκκινο κύκλο επισημαίνονται τα συντηρημένα αμινοξέα (Ε: Glu, D: Asp, K: Lys) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενζυματική κατάλυση με το PLP.

Αντίστοιχη σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών χαρακτηρισμένων ρεδουκτασών του P5C από διάφορα φυτά εμφανίζεται στην Εικόνα 4.3.3. Το γονίδιο *P5CR* στο σκληρό σιτάρι κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που παρουσιάζει ομολογία 99, 90, 75 και 70% με τις ρεδουκτάσες του *T. aestivum*, του *O. sativa* και *S. bicolor*, του *A. thaliana* και *V. Unguiculata*, και *G. max* αντίστοιχα. Αν και οι λειτουργίες των καλά συντηρημένων περιοχών στις πρωτεΐνες P5CR είναι ακόμη υπό μελέτη, ωστόσο η περιοχή από το 96-127 στο ένζυμο TdP5CR είναι πιθανό να συνδέεται με το μοτίβο πρόσδεσης NAD(P)H (Szoke et al 1992).

Τέλος η φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης P5CR (Εικόνα 4.3.6) που έχει απομονωθεί από διάφορους φυτικούς οργανισμούς εμφανίζει τον ίδιο διαχωρισμό σε 2 διακριτούς κλάδους με μονοκότυλα και δικότυλα φυτά. Έκπληξη, ωστόσο αποτελεί η θέση της υπό μελέτης πρωτεΐνης TdP5CR, ο διαχωρισμός της οποίας από τον υποτιθέμενο κοινό πρόγονο έγινε πολύ νωρίς κατά την εξελικτική διαδικασία, σχηματίζοντας ουσιαστικά έναν ξεχωριστό κλάδο στην ομάδα των μονοκότυλων φυτών, ενώ η ομοιότητά της με την TaP5CR και HvP5CR είναι 99 και 100% αντίστοιχα.



Εικόνα 4.3.3 Ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί πιθανή P5CR του *T. turgidum var. durum* και χαρακτηρισμένων P5CRs άλλων φυτικών οργανισμών. *AtP5CR; A. thaliana* (AAA61346), *VuP5CR: V. unguiculata* (BAB33038), *GmOAT: G. max* (XP_003521138), *SbP5CS: S. bicolor* (EES04210), *OsP5CR: O. sativa* (BAC15792), *TaP5CR: T. aestivum* (AAW82908). Η πιθανά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης NAD(P)Η περικλείεται σε κουτί με κόκκινο περίγραμμα.



Εικόνα 4.3.4 Φυλογενετική σχέση των πιθανών P5CSs (έντονη γραφή) του T. turgidum var. durum με P5CSs από άλλους φυτικούς οργανισμούς. TaP5CS: T. aestivum P5CS (AAX35536), OsP5CS1: O. sativa P5CS1 (BAA19916), SaP5CS: S. arundinaceum P5CS (ABV03819), SoP5CS: S. officinarum P5CS (ABS32296), SbP5CS2: S. bicolor P5CS2 (ACU65227), SbP5CS1: S. bicolor P5CS1 (ACU65226), ZmP5CS: Z. mays P5CS (AFW84589), OsP5CS2: O. sativa P5CS2 (BAB64280), BnP5CSB: B. nappus P5CSB (EEF38154), PvP5CS1: P. vulgaris P5CS1 (ABY61079), MtP5CS1: M. truncatula P5CS1 (CAC82184), PvP5CS2: P. vulgaris P5CS2 (ABY89287), CbP5CS: C. bungeana P5CS (EEF38154), AtP5CS1: A. thaliana P5CS1 (NM_129539), BnP5CSA: B. nappus P5CSA (AAK01360), AtP5CS2: A. thaliana P5CS2 (NM_115419.4), TomPRO2: L. esculentum PRO2 (AAB67875), MtP5CS2: M. truncatula P5CS2 (CAC82186), TomPRO1: L. esculentum PRO1 (AAB67877). OI P5CSs συνθέτουν 2 κύριες διακριτές ομάδες (I) μονοκότυλα φυτά (II) δικότυλα φυτά.



Εικόνα 4.3.5 Φυλογενετική σχέση του OAT ενζύμου (έντονη γραφή) του T. turgidum var. durum με OATs από άλλους φυτικούς οργανισμούς. TuOAT: T. urartu OAT (EMS55823), OsOAT: O. sativa OAT (BAG94132), SaP5CS: S. arundinaceum OAT (ABV03818), AtOAT: A. thaliana OAT (BAB08263), BnOAT: B. nappus OAT (ACA63476), GmOAT: G.max OAT (NP_001237150), MtOAT: M. truncatula OAT (CAC82185), NtOAT: N. tabacum OAT (ADM47437). Oι OATs συνθέτουν 2 κύριες διακριτές ομάδες (Ι) μονοκότυλα φυτά. (ΙΙ) δικότυλα φυτά.



Εικόνα 4.3.6 Φυλογενετική σχέση του P5CR ενζύμου (έντονη γραφή) του T. turgidum var. durum με P5CRs από άλλους φυτικούς οργανισμούς. SbP5CR: S. bicolor P5CR (EES04210), ZmP5CR: Z. mays P5CR (AAY45745), OsP5CR: O. sativa P5CR (BAC15792), TaP5CR: T. aestivum P5CR (AAW82908), VuP5CR: V. unguiculata P5CR (BAB33038), GmOAT: G. max P5CR (XP_003521138), MtOAT: M. truncatula P5CR (AES81244), PsP5CR: P. sativum P5CR (CAA44646), AtP5CR; A. thaliana P5CR (AAA61346), HvP5CR: H. vulgare P5CR (BAK03374). OI P5CRs συνθέτουν 2 κύριες διακριτές ομάδες (Ι) μονοκότυλα φυτά (ΙΙ) δικότυλα φυτά. 4.3.3 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της προλίνης στο σκληρό σιτάρι σε συνθήκες καταπόνησης

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων με qPCR, επιβεβαίωσαν ότι η έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης επηρεάζεται από την αλατότητα και το ψύχος, που εξετάζουμε στην παρούσα εργασία. Αρχικά, απομονώθηκε mRNA από το ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα φυταρίων Rusticano και Grazia που καλλιεργήθηκαν σε υδροπονική καλλιέργεια σε διαφορετική συγκέντρωση άλατος (0 mM NaCl, 100 mM NaCl και 200 mM NaCl) και σε διαφορετική θερμοκρασία (22°C και 4°C). Στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την τιουμπουλίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με το μάρτυρα.

4.3.3.1 Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS1* στο ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους

Το μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης από το γλουταμινικό οξύ έχει ευρέως μελετηθεί σε πολλά φυτικά είδη αρκετές δεκαετίες και έχει αναφερθεί ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *P5CS* σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης (ξηρασία, αλατότητα) αυξάνει τα επίπεδα της προλίνης με πιθανό ρόλο τον εγκλιματισμό και κατά συνέπεια την ανθεκτικότητα των φυτών στις ανωτέρω συνθήκες καταπόνησης.

Αναλυτικότερα, στην παρούσα μελέτη, η έκφραση του γονιδίου *TdP5CS1* στο ριζικό σύστημα και των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου, Rusticano και Grazia, σε συνθήκες καταπόνησης άλατος (100 και 200 mM NaCl), παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.3.7. Όπως προκύπτει από την Εικόνα 4.3.7 τα μεταγραφήματα του *TdP5CS1* εμφανίζουν σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση των 200 mM NaCl και στις 2 ποικιλίες, σε σχέση με τη χαμηλότερη συγκέντρωση άλατος των 100 mM NaCl. Συγκεκριμένα, στα 200 mM NaCl, το γονίδιο *TdP5CS1* παρουσιάζει το μέγιστο της έκφρασης του (μέση τιμή 269) σε σχέση με το μάρτυρα, 24 ώρες μετά την καταπόνηση, στην ποικιλία Rusticano, ενώ στην Grazia το μέγιστο της έκφρασης του γονιδίου παρατηρείται μετά από 12 ώρες καταπόνησης (μέση τιμή 83) και στη συνέχεια μέχρι τις 72 ώρες παρατηρείται σταδιακή μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου και στις 2 ποικιλίες. Στη χαμηλότερη συγκέντρωση των 100 mM NaCl, το γονίδιο *TdP5CS1* εμφανίζει αύξηση στην έκφρασή του, 51.2 φορές σε σχέση με το μάρτυρα, 24 ώρες μετά την εφαρμογή καταπόνησης άλατος στην ποικιλία Rusticano, ενώ στην ποικιλία Grazia, τα μεταγραφήματα του *TdP5CS1* κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα (14 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) τις περισσότερες χρονικές στιγμές μέτρησης. Γενικότερα, η έκφραση του *TdP5CS1* είναι υψηλότερη στις ρίζες της ανθεκτικής στην αλατότητα ποικιλίας Rusticano από ότι στις ρίζες της πιο ευαίσθητης ποικιλίας Grazia, στην υψηλότερη συγκέντρωση άλατος των 200 mM NaCl.



Εικόνα 4.3.7 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS1* στο ριζικό σύστημα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (0 mM NaCl). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b,c,d) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση Duncan.

Η έκφραση του γονιδίου *P5CS1* στο ριζικό σύστημα ποικιλιών με διαφορετική ανθεκτικότητα σε συνθήκες καταπόνησης άλατος δεν έχει μελετηθεί σε κάποιο φυτικό οργανισμό. Υπάρχουν, ωστόσο, αναφορές για την έκφραση του *P5CS1* σε διάφορα φυτικά είδη. Συγκεκριμένα, σε φυτά *A. thaliana,* ηλικίας 3-4 εβδομάδων μελετήθηκε η έκφραση του *AtP5CS1* για 1, 2, 5, 10 και 24 ώρες παραμονής των φυτών σε συνθήκες αλατότητας (250 mM NaCl) και παρατηρήθηκε συσσώρευση των επιπέδων mRNA του *AtP5CS1* μετά από 1 ώρα στα 250 mM NaCl (Yoshiba et al 1995). Το μέγιστο της έκφρασης του ανωτέρω γονιδίου *AtP5CS1*, που παρουσίασε το μέγιστο της
έκφρασης μετά από 12 και 24 ώρες στις ποικιλίες Grazia και Rusticano αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της παρούσα εργασίας στη χαμηλή συγκέντρωση άλατος, των 100 mM NaCl, προέκυψαν σε φυτάρια *M. sativa*, ηλικίας 6 ημερών, (Ginzberg et al 1998) όπου το *MsP5CS1* παρουσίασε σχετικά σταθερή έκφραση στις ρίζες μετά από καταπόνηση για 6, 24, 48 και 72 ώρες σε συγκέντρωση άλατος 90 mM NaCl. Αντίθετα με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, σε φυτάρια *M. truncatula*, που καταπονήθηκαν για 72 ώρες στα 200 mM NaCl, παρατηρήθηκε σταθερή έκφραση του *MtP5CS1* τις παραπάνω χρονικές στιγμές (Armengaud et al 2004). Επιπρόσθετα, στο ριζικό σύστημα φυταρίων *S. bicolor,* ηλικίας 10 ημερών, το μέγιστο της έκφρασης του *SbP5CS1* παρατηρήθηκε μετά από 4 ώρες καταπόνησης στα 250 mM NaCl, στη συνέχεια τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου παρέμειναν σταθερά μέχρι τις 12 ώρες και σταδιακά μειώθηκαν μέχρι 48 ώρες καταπόνησης (Su et al 2011).

Η έκφραση του γονιδίου *TdP5CS1* στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia, σε συνθήκες αλατότητας, παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.3.8. Η αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του *TdP5CS1* στο υπέργειο τμήμα και των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου εντοπίζεται μόλις 12 ώρες μετά την καταπόνηση και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος. Μια απότομη αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου παρατηρείται στην ποικιλία Rusticano, 24 ώρες μετά την καταπόνηση με 200 mM NaCl και 48 ώρες μετά από καταπόνηση με 100 mM NaCl. Αντίθετα, στην ποικιλία Grazia η αύξηση στην έκφραση του *TdP5CS1* συνεχίζεται με πιο αργούς ρυθμούς μέχρι τις 72 ώρες, όπου παρατηρείται το μέγιστο της έκφρασης και στις 2 ποικιλίες ανά συγκέντρωση άλατος (μέση τιμή για την ποικιλία Rusticano: 57,66 και 89 σε σχέση με το μάρτυρα στα 100 και 200 mM NaCl αντίστοιχα, μέση τιμή για τη ποικιλία Grazia: 42,15 και 56,75 σε σχέση με το μάρτυρα στα 100 και 200 mM NaCl αντίστοιχα).



Εικόνα 4.3.8 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS1* στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (0 mM NaCl). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b,c) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση Duncan.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, φυτάρια *P. vulgaris*, ηλικίας 10 ημερών, τα οποία καταπονήθηκαν για 48 ώρες σε συνθήκες αλατότητας, 200 mM NaCl, το γονίδιο PvP5CS1 παρουσίασε το μέγιστο της έκφρασής του στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων μόλις μετά από 2 ώρες καταπόνησης (Chen et al 2009), γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου το γονίδιο TdP5CS1 παρουσίασε μέγιστη έκφραση και στις 2 ποικιλίες σκληρού σίτου και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος μετά από 72 ώρες καταπόνησης. Η αξιοσημείωτη αυτή μείωση στα επίπεδα έκφρασης του PvP5CS1, μετά τις 2 μέχρι και τις 48 ώρες καταπόνησης εξηγήθηκε από τους παραπάνω συγγραφείς ως αποτέλεσμα της καταστροφής των πρωτεϊνών οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση του PvP5CS1 σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης. Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά στα φυτάρια P. vulgaris, αλλά σε αντίθεση με τα δεδομένα της παρούσας εργασίας προέκυψαν και σε φυτάρια S. bicolor ηλικίας 10 ημερών, τα οποία καταπονήθηκαν σε συνθήκες αλατότητας, 250 mM NaCl, για 48 ώρες. Συγκεκριμένα, στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων τα μεταγραφήματα του SbP5CS1 ανιχνεύθηκαν μετά από 4 ώρες καταπόνησης, παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα μέχρι τις 8 ώρες και διατηρήθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα μετά τις 12, 24 και 48 ώρες καταπόνησης (Su et al 2011).

Παρατηρείται δηλαδή αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *P5CS1* λίγες ώρες μετά την έναρξη καταπόνησης.

Σημειώνεται ότι παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της μελέτης στο T. turgidum var. durum προέκυψαν και σε φυτάρια O. sativa, όπου μελετήθηκε η έκφραση του OsP5CS1 σε 2 ποικιλίες, με διαφορετικό βαθμό ανθεκτικότητας σε συνθήκες αλατότητας (Igarashi et al 1997). Στην εργασία αυτή, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του OsP5CS1 καθώς και η συγκέντρωση της προλίνης σε ολόκληρο το φυτάριο και παρατηρήθηκε ότι τόσο η έκφραση του γονιδίου όσο και τα επίπεδα της προλίνης ήταν υψηλότερα στην ανθεκτική ποικιλία σε σχέση με την ευαίσθητη. Αναλυτικότερα, τα μεταγραφήματα του OsP5CS1 ανιχνεύθηκαν μετά από 10 ώρες παραμονής των φυταρίων και των 2 ποικιλιών σε συγκέντρωση άλατος 250 mM NaCl και παρουσίασαν το μέγιστο της έκφρασης μετά από 72 ώρες (Igarashi et al 1997). Ομοίως, σε φυτά *B. napus*, ηλικίας 3 εβδομάδων που εκτέθηκαν για 0, 2, 6, 12, 24 και 48 ώρες σε συνθήκες αλατότητας 250 mM NaCl το γονίδιο BnP5CS1 ανιχνεύθηκε 2 ώρες μετά την καταπόνηση άλατος, παρουσίασε το μέγιστο της έκφρασης στις 6 ώρες, αλλά διατήρησε τα μεταγραφήματά του σε υψηλά επίπεδα μέχρι τις 48 ώρες (Xue et al 2008). Στην συγκεκριμένη εργασία φαίνεται το μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης από το γλουταμινικό οξύ να είναι κυρίαρχο σε συνθήκες αλατότητας, σε σχέση με το αντίστοιχο της ορνιθίνης και το γονίδιο BnP5CS1 είναι πιθανό να έχει πρωταρχικό ρόλο, μιας και τα επίπεδα έκφρασης του BnP5CS1 ήταν υψηλότερα από του BnP5CS2. Τέλος, σε αντίθεση με όλες τις παραπάνω αναφορές όπου εντοπίζεται έκφραση του P5CS1 στους ιστούς διαφόρων φυτικών ειδών, οι Fujita et al (1998), αναφέρουν ότι δεν ανιχνεύθηκαν μεταγραφήματα της tomPro1 σε συνθήκες αλατότητας 200 mM NaCl ούτε στη ρίζα ούτε στα φύλλα φυτών L. esculentum. Πρόσφατα, οι Huang et al (2013), ανέφεραν ότι η έκφραση του HtP5CS1 κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα σε σχέση με το μάρτυρα, τόσο στη ρίζα όσο και στα φύλλα φυτών H. tuberosus μετά από 12 ώρες καταπόνησης στα 100 mM NaCl.

Σε συνθήκες καταπόνησης ψύχους, η έκφραση του γονιδίου *TdP5CS1* στις ρίζες των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia, παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.3.9, με τα μεταγραφήματα του *TdP5CS1* στην ποικιλία Rusticano να εμφανίζονται 6 ώρες νωρίτερα από τα αντίστοιχα στη Grazia. Αναλυτικότερα, αυξημένα επίπεδα έκφρασης στο ριζικό σύστημα των φυταρίων της ποικιλίας Rusticano παρατηρούνται μετά από 6 ώρες καταπόνησης ψύχους (9,2 φορές σε σχέση με το μάρτυρα), τα οποία μειώνονται στις 12 ώρες (8,3 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) και στη συνέχεια μειώνονται απότομα μέχρι τις 72 ώρες (0,84 σε σχέση με το μάρτυρα). Αντίθετα, στην ποικιλία Grazia, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS1* αυξάνονται σημαντικά μετά από 12 ώρες (7,4 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) παραμονής των φυταρίων στους 4°C. Στις 72 ώρες το *TdP5CS1* υποεκφράζεται στο ριζικό σύστημα και λαμβάνει τιμή 0,52 σε σχέση με το μάρτυρα. Το γονίδιο *TdP5CS1* παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασής του μεταξύ των 2 ποικιλιών στις 6, 24, και 48 ώρες σε συνθήκες ψύχους σε σχέση με το μάρτυρα. Η έκφραση του *TdP5CS1* είναι υψηλότερη στις ρίζες της ποικιλίας Rusticano.

Τα επίπεδα έκφρασης της *P5CS1* σε συνθήκες ψύχους έχουν μελετηθεί στη ρίζα φυτών *A. thaliana*, ηλικίας 3-4 εβδομάδων, για 1, 2, 5, 10 και 24 ώρες παραμονής των φυτών σε συνθήκες ψύχους (4°C) (Yoshiba et al 1995). Όπως προέκυψε από την εργασία στο φυτό *Arabidopsis* το γονίδιο *AtP5CS1* παρουσίασε μικρή συσσώρευση 24 ώρες μετά την έναρξη της καταπόνησης, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου το γονίδιο *P5CS1* εκφράστηκε λίγες ώρες μετά την έναρξη καταπόνησης.



Εικόνα 4.3.9 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS1* στο ριζικό σύστημα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ψύχους (4°C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (22°C). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση t-test.

Σε συνθήκες ψύχους, η έκφραση του γονιδίου *TdP5CS1* στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών σκληρού σιταριού παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.3.10. Στις 6 ώρες το *TdP5CS1* εμφάνισε παρόμοια αύξηση στα επίπεδα έκφρασής του στις ποικιλίες Rusticano και Grazia, με μέση τιμή 3,3 και 4,1 αντίστοιχα. Στη συνέχεια στις 12 ώρες το *TdP5CS1* εμφανίζει την υψηλότερη έκφραση (21 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) στο υπέργειο τμήμα των παραπάνω φυταρίων της Rusticano, ενώ στην Grazia το *TdP5CS1* εμφανίζει σχετικά σταθερά επίπεδα έκφρασης, με μέση τιμή 4,8. Στις 24 ώρες, και ενώ παρατηρείται μείωση στην έκφραση του γονιδίου *TdP5CS1* στην ποικιλία Rusticano (μέση τιμή 4,3), στην ποικιλία Grazia εμφανίζονται υψηλά επίπεδα έκφρασης (16 φορές σε σχέση με το μάρτυρα). Στη συνέχεια μέχρι τις 72 ώρες παρατηρείται πτώση στην έκφραση του *TdP5CS1* στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων και των 2 ποικιλιών.



Εικόνα 4.3.10 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS1* στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ψύχους (4°C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (22°C). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση t-test.

Τα αποτελέσματα της έκφρασης του γονιδίου *P5CS1* στην παρούσα μελέτη έρχονται σε αντίθεση με τα αντίστοιχα σε φυτάρια *P. vulgaris*, ηλικίας 10 ημερών που καταπονήθηκαν για 48 ώρες σε συνθήκες ψύχους (4°C) (Chen et al 2009). Στη συγκεκριμένη μελέτη το γονίδιο *PvP5CS1* παρουσίασε το μέγιστο της έκφρασής του στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων μόλις μετά από 2 ώρες καταπόνησης στις ανωτέρω συνθήκες, ενώ εμφάνισε κατακόρυφη πτώση στα επίπεδα έκφρασής του μετά από 4, 6, 9, 12, 24 και 48 ώρες. Η αξιοσημείωτη μείωση στα επίπεδα έκφρασης του *PvP5CS1*, μετά τις 2 μέχρι και τις 48 ώρες πιθανόν να είναι αποτέλεσμα της

καταστροφής των πρωτεϊνών οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση του PvP5CS1 σε συνθήκες ψύχους.

4.3.3.2 Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS2* στο ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους

Μελετώντας τα σχετικά επίπεδα έκφρασης για το γονίδιο *TdP5CS2* στο ριζικό σύστημα και των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου παρατηρείται παρόμοιο πρότυπο έκφρασης σε σχέση με το γονίδιο *TdP5CS1*, αλλά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης από το *TdP5CS1* (Εικ.4.3.11). Συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση των 100 mM NaCl το γονίδιο *TdP5CS2* εκφράζεται στο ριζικό σύστημα και των 2 ποικιλιών μετά από 24 ώρες καταπόνησης (μέση τιμή για την ποικιλία Rusticano: 10, μέση τιμή για την ποικιλία Grazia: 9) και παραμένει στα ίδια επίπεδα μέχρι τις 72 ώρες. Αντίθετα στη συγκέντρωση των 200 mM NaCl τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *TdP5CS2* εμφανίζονται στο ριζικό σύστημα της ποικιλίας Grazia μετά από 48 ώρες, διατηρώντας τα ίδια περίπου επίπεδα έκφρασης μέχρι τις 72 ώρες.



Εικόνα 4.3.11 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS2* στο ριζικό σύστημα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (0 mM NaCl). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b,c) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση Duncan.

Μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση προέκυψε ότι τα δεδομένα των αναφορών που αφορούν στην έκφραση του γονιδίου P5CS2 στη ρίζα διαφόρων φυτικών ειδών είναι σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Αναλυτικότερα, σε φυτά L. esculentum, σε συνθήκες αλατότητας 200 mM NaCl, το tomPro2 παρουσίασε σταθερά επίπεδα έκφρασης στη ρίζα και αναφέρεται ότι δε συμμετέχει στη ρύθμιση της προλίνης σε συνθήκες αλατότητας (Fujita et al 1998). Ομοίως, σε φυτάρια *M. sativa*, ηλικίας 6 ημερών, παρατηρήθηκε σταθερή έκφραση του γονιδίου MsP5CS2 στις ρίζες μετά από καταπόνηση για 6, 24, 48 και 72 ώρες σε συγκέντρωση άλατος 90 mM NaCl, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο εκφράζεται σε συνθήκες αλατότητας, με υψηλότερη την έκφραση του MsP5CS2 από του MsP5CS1 (Ginzberg et al 1998). Σε φυτά M. truncatula, ηλικίας 8 εβδομάδων που καταπονήθηκαν για 72 ώρες σε 250 mM NaCl, το γονίδιο MtP5CS2 εκφράστηκε στη ρίζα ανεξαρτήτως συνθηκών καταπόνησης των φυτών (Armengaud et al 2004). Επιπλέον, σε φυτάρια *P. vulgaris,* το γονίδιο *PvP5CS2* παρουσίασε το μέγιστο της έκφρασής του στη ρίζα (6,14 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) μετά από 6 ώρες καταπόνησης στα 200 mM NaCl (Chen et al 2008). Ομοίως σε φυτάρια S. bicolor, ηλικίας 10 ημερών που καταπονήθηκαν σε συνθήκες αλατότητας 250 mM NaCl, το μέγιστο της έκφρασης του SbP5CS2 στη ρίζα των φυταρίων παρατηρήθηκε μετά από 8 ώρες καταπόνησης (Su et al 2011).

Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με το γονίδιο *TdP5CS1* παρατηρείται μελετώντας και τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS2* στο υπέργειο τμήμα των 2 ποικιλιών (Εικ. 4.3.12), με τη διαφορά ότι το *TdP5CS2* εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα από το *TdP5CS1*. Αναλυτικότερα, στις 72 ώρες, όπου παρατηρείται το μέγιστο της έκφρασης του γονιδίου και στις 2 ποικιλίες, τα επίπεδα έκφρασης του *TdP5CS2* και στις 2 ποικιλίες είναι 7 φορές χαμηλότερα από επίπεδα έκφρασης του *TdP5CS1* στη συγκέντρωση των 100 mM NaCl και 9 φορές χαμηλότερα από επίπεδα έκφρασης του *TdP5CS1* στη συγκέντρωση των 200 mM NaCl. Γενικότερα, η έκφραση του *TdP5CS2* είναι υψηλότερη στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano από ότι στις ρίζες της ποικιλίας Grazia, και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος.



Εικόνα 4.3.12 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS2* στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (0 mM NaCl). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b,c) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση Duncan.

Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και σε φυτάρια O. sativa όπου και μελετήθηκε η χρησιμότητα του γονιδίου OsP5CS2 στην ανθεκτικότητά τους σε συνθήκες αλατότητας (Hur et al 2004). Συγκεκριμένα, στα 250 mM NaCl, το γονίδιο OsP5CS2 εκφράστηκε στα φύλλα μετά από 6 ώρες καταπόνησης και τα μεταφραφήματά του αυξήθηκαν σταθερά μέχρι το τέλος του πειράματος (48 ώρες). Ομοίως, σε φυτά M. truncatula, ηλικίας 8 εβδομάδων που καταπονήθηκαν για 72 ώρες σε 250 mM NaCl, το γονίδιο MtP5CS2 εκφράστηκε στο υπέργειο τμήμα των φυτών μετά από 24 ώρες και παρουσίασε το μέγιστο της έκφρασης του στις 72 ώρες καταπόνησης (Armengaud et al 2004). Αντίθετα, σε φυτάρια P. vulgaris, το γονίδιο PvP5CS2 παρουσίασε το μέγιστο της έκφρασής του στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων (7,67 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) μετά από 2 ώρες καταπόνησης στα 200 mM NaCl (Chen et al 2008). Ομοίως, σε φυτάρια S. bicolor, ηλικίας 10 ημερών που καταπονήθηκαν σε συνθήκες αλατότητας 250 mM NaCl, ανιχνεύθηκε το μέγιστο της έκφρασης του SbP5CS2 στο υπέργειο των φυταρίων μετά από 8 ώρες καταπόνησης, ενώ μέχρι τις 48 ώρες τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σταδιακά ελαττώθηκαν (Su et al 2011). Σε φυτά *B. napus*, ηλικίας 3 εβδομάδων που εκτέθηκαν για 0, 2, 6, 12, 24 και 48 ώρες σε συνθήκες αλατότητας 250 mM NaCl, το γονίδιο

BnP5CS2 ανιχνεύθηκε 2 ώρες μετά την καταπόνηση άλατος και η έκφρασή του κυμάνθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα μετά τις 6 ώρες καταπόνησης μέχρι και το τέλος του πειράματος (48 ώρες). (Xue et al 2008). Σε φυτά *L. esculentum,* το γονίδιο *tomPro2* εμφάνισε στα φύλλα σταθερά επίπεδα έκφρασης καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (2, 6, 16, 31 ημέρες) σε συνθήκες αλατότητας 100 και 200 mM NaCl (Fujita et al 1998) και αναφέρεται ότι δε συμμετέχει στη ρύθμιση της προλίνης σε συνθήκες αλατότητας. Αντίθετα στη ρίζα και στα φύλλα φυτών *H. tuberosus* παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της *HtP5CS2*, 2 φορές σε σχέση με το μάρτυρα, μετά από 12 ώρες καταπόνησης στα 100 mM NaCl (Huang et al 2013).

Τέλος, σημειώνεται ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με την έκφραση των γονιδίων *TdP5CS1 και TdP5CS2* στους ιστούς (ριζικό σύστημα και υπέργειο τμήμα) των φυταρίων σκληρού σίτου είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Su et al 2011, στο σόργο, όπου τα επίπεδα έκφρασης του *SbP5CS1* είναι υψηλότερα από του *SbP5CS2*. Στην παρούσα διατριβή το γονίδιο *TdP5CS1* εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από το γονίδιο *TdP5CS2* και στους 2 υπό μελέτη ιστούς.

Μελετώντας τα σχετικά επίπεδα έκφρασης για το γονίδιο TdP5CS2 στις ρίζες των φυταρίων σε συνθήκες ψύχους, (Εικόνα 4.3.13) παρατηρείται παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με το γονίδιο TdP5CS1, με τη διαφορά ότι το TdP5CS2 εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα. Αναλυτικότερα, 6 ώρες μετά την καταπόνηση ψύχους στο ριζικό σύστημα των φυταρίων της ποικιλίας Rusticano εμφανίζεται αύξηση στην έκφραση του TdP5CS2 (3 φορές σε σχέση με το μάρτυρα), η οποία μειώνεται στις 12 και 24 ώρες (0,58 και 0,11 αντίστοιχα σε σχέση με το μάρτυρα) και φτάνει στα φυσιολογικά επίπεδα τις 48 και 72 ώρες. Αντίθετα, στην ποικιλία Grazia το γονίδιο TdP5CS2 εμφανίζει αύξηση στην έκφρασή του 12 ώρες μετά την καταπόνηση ψύχους και μειώνεται σταδιακά η έκφρασή του μέχρι τις 72 ώρες (0,27 σε σχέση με το μάρτυρα). Η έκφραση του TdP5CS2 διαφοροποιείται στις 2 ποικιλίες και στα 5 χρονικά διαστήματα μετρήσεων. Στις 6, 48 και 72 ώρες εμφανίζονται τα υψηλότερα επίπεδα στην έκφραση του TdP5CS2 στην ποικιλία Rusticano, ενώ στις 12 και 24 ώρες στην ποικιλία Grazia. Σε φυτάρια P. vulgaris, το γονίδιο PvP5CS2 παρουσίασε το μέγιστο της έκφρασής του στη ρίζα των φυταρίων (7,55 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) μετά από 2 ώρες στους 4°C (Chen et al 2008), δηλαδή αμέσως μετά την έναρξη καταπόνησης ψύχους. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να συγκριθούν με την έκφραση του TdP5CS2 στη ρίζα των φυταρίων της ποικιλίας Rusticano μετά από 6 ώρες (3 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) στους 4°C.



Εικόνα 4.3.13 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS2* στο ριζικό σύστημα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ψύχους (4°C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (22°C). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση t-test.

Όσον αφορά το γονίδιο *TdP5CS2* στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών σκληρού σίτου σε συνθήκες ψύχους (Εικόνα 4.3.14), ακολουθεί διαφορετικό μοτίβο έκφρασης από το *TdP5CS1*, δηλαδή εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα μετά τις 24 ώρες και στις 2 ποικιλίες Rusticano (μέση τιμή 7.79) και Grazia (μέση τιμή 5.22) ενώ εμφανίζει πτώση μετά τις 48 μέχρι τις 72 ώρες, στους 4°C. Σύμφωνα, με τους Hur et al (2004), στα φύλλα φυταρίων *O. sativa* αναφέρεται ανίχνευση των μεταγραφημάτων του *OsP5CS2* σε συνθήκες ψύχους μετά από 12 ώρες καταπόνησης, αλλά το μέγιστο της έκφρασης του *OsP5CS2* παρουσιάζεται μετά από 48 ώρες στους 4°C. Αντίθετα, σε φυτάρια *P. vulgaris*, το γονίδιο *PvP5CS2* παρουσίασε το μέγιστο της έκφρασής του στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων (2,38 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) μετά από 2 ώρες παραμονής των φυταρίων στους 4°C (Chen et al 2008).



Εικόνα 4.3.14 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CS2* στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ψύχους (4°C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (22°C). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση t-test.

4.3.3.3 Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *ΤdOAT* στο ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους

Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν λίγες αναφορές σχετικά με το ρόλο του γονιδίου δ-OAT στη βιοσύνθεση της προλίνης, ενώ τα δεδομένα των αναφορών αυτών που συνδέουν το ρόλο της ορνιθίνης με τη συγκέντρωση της προλίνης σε συνθήκες καταπόνησης είναι αντικρουόμενα. Ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν τη λειτουργικότητα του μονοπατιού βιοσύνθεσης της προλίνης από την ορνιθίνη σε συνθήκες αλατότητας (Hervieu et al 1995, Roosens et al 1998 και 2002, Armengaud et al 2004, Xue et al 2009), ενώ άλλοι υποστηρίζουν ότι το γονίδιο δ-OAT δε συμμετέχει στη βιοσύνθεση της προλίνης σε συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης (Delauney et al 1993, Yang and Kao 1999, Funck et al 2008). Είναι γνωστό, ότι η ορνιθίνη θεωρείται πρόδρομη ένωση κι άλλων μεταβολικών μονοπατιών στα φυτά, εκτός από τη βιοσύνθεσης της προλίνης. Εμπλέκεται δηλαδή στον κύκλο της ουρίας και παίζει σημαντικό ρόλο στα μεταβολικά μονοπάτια της αργινίνης και των πολυαμινών, που θεωρούνται ότι επιτελούν ουσιαστικό δομικό και ρυθμιστικό ρόλο

στις λειτουργίες των φυτών (Kusano et al 2008) καθώς και στην ανθεκτικότητα αυτών σε συνθήκες καταπόνησης (Bouchereau et al 1999 Alcazar et al 2006). Επομένως, ο ρόλος του γονιδίου δ-OAT στην ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, καθώς και η λειτουργικότητα της βιοσυνθετικής οδού της προλίνης από την ορνιθίνη είναι ακόμα υπό μελέτη (Kalamaki et al 2009).

Στην παρούσα εργασία τα αποτελέσματα των μετρήσεων του γονίδιου Τάδ-ΟΑΤ στο ριζικό σύστημα των 2 ποικιλιών παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.3.15. Συγκεκριμένα, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του Τάδ-ΟΑΤ εμφανίζονται στο ριζικό σύστημα της ανθεκτικής ποικιλίας Rusticano μετά από 48 ώρες καταπόνησης και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος (μέση τιμή: 26 στα 100 mM NaCl και 45.6 στα 200 mM NaCl), ενώ στο ριζικό σύστημα της ευαίσθητης ποικιλίας Grazia μετά από 72 ώρες καταπόνησης στα 200 mM NaCl (25 φορές σε σχέση με το μάρτυρα). Στη συγκέντρωση των 100 mM NaCl παρατηρούνται χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης για το γονίδιο *Τdδ-OAT*, με τα μεταγραφήματα στην ποικιλία Rusticano να παρουσιάζουν σημαντική αύξηση 12 ώρες μετά την καταπόνηση και το μέγιστο της έκφρασης στις 48 ώρες (26 φορές σε σχέση με το μάρτυρα). Σε σύγκριση με την ποικιλία Rusticano, η έκφραση του γονιδίου στην ποικιλία Grazia κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα με το μέγιστο της έκφρασης στις 24 ώρες καταπόνησης (10 φορές σε σχέση με το μάρτυρα). Γενικότερα, η έκφραση του Τάδ-ΟΑΤ είναι υψηλότερη στο ριζικό σύστημα της ποικιλίας Rusticano από ότι στο ριζικό σύστημα της ποκιλίας Grazia, και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος.

Σημειώνεται ότι δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές, στις οποίες γίνεται συγκριτική μελέτη της έκφρασης του δ-ΟΑΤ σε 2 ποικιλίες με διαφορετική ανθεκτικότητα σε συνθήκες καταπόνησης. Ωστόσο υπάρχουν αναφορές για την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου σε συνθήκες αλατότητας. Συγκεκριμένα, οι Roosens et al (1998) ανέφεραν ότι φυτάρια A. thaliana, ηλικίας 12 ημερών, εμφάνισαν αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του δ-ΟΑΤ μετά από 24 ώρες παραμονής τους στα 200 mM NaCl ενώ το μέγιστο της έκφρασης του δ-OAT εμφανίστηκε μετά από 72 ώρες καταπόνησης στις παραπάνω συνθήκες. Ομοίως, στην ίδια συγκέντρωση άλατος, οι Armengaud et al (2004) υποστήριξαν ότι το γονίδιο δ-OAT εκφράστηκε στη ρίζα φυταρίων της *Μ. truncatula*, ηλικίας 10 ημερών και 8 εβδομάδων και εμφάνισε το μέγιστο της έκφρασής του μετά από 48 ώρες καταπόνησης άλατος. Τα αποτελέσματα αυτά στις ρίζες των φυταρίων μηδικής είναι παρόμοια με τα δεδομένα της παρούσας εργασίας, όπου στην ανθεκτική ποικιλία Rusticano το γονίδιο δ-OAT παρουσιάζει το μέγιστο της έκφρασης μετά από 48 ώρες καταπόνησης και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος (100 και 200 mM NaCl). Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε φυτάρια T. turgidum var. durum, τα

αποτελέσματα σε φυτάρια *A.thaliana* (Roosens et al 1998) και *M. truncatula* (Armengaud et al 2004), όπου παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου δ-OAT σε συνθήκες αλατότητας, άλλοι ερευνητές (Delauney et al 1993 και Xue et al 2009) ανέφεραν ότι σε φυτά *B. napus* και *V. aconitifolia*, το γονίδιο δ-OAT δεν εκφράστηκε ή υπο-εκφράστηκε σε σχέση με το μάρτυρα σε συνθήκες αλατότητας, 250 και 400 mM NaCl, αντίστοιχα.



Εικόνα 4.3.15 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Τάδ-ΟΑΤ* στο ριζικό σύστημα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (0 mM NaCl). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b,c,d) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση Duncan.

Όσον αφορά στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων των 2 ποικιλιών Rusticano και Grazia το γονίδιο *Tdδ-OAT* παρουσιάζει αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του σε σχέση με το χρόνο και το μέγιστο της έκφρασής τους παρατηρείται μετά από 72 ώρες καταπόνησης και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος (Εικ. 4.3.16). Επιπλέον, η έκφραση του *Tdδ-OAT* είναι υψηλότερη στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano από ότι στην ποικιλία Grazia. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων της *M. truncatula*, όπου το γονίδιο *δ-OAT* εμφάνισε το μέγιστο της έκφρασής του μετά από 72 ώρες καταπόνησης στα 200 mM NaCl (Armengaud et al 2004). Επιπλέον, οι Xue et al (2009) μελέτησαν την έκφραση του γονιδίου σε διάφορους ιστούς φυτών *B. napus*, ηλικίας 12 εβδομάδων και παρατήρησαν

σημαντική αύξηση στα παλαιότερα φύλλα μετά από 7 ημέρες καταπόνησης στα 200 mM NaCl.



Εικόνα 4.3.16 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Td*δ-OAT στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (0 mM NaCl). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b,c) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση Duncan.

Στn βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές και νια τη δραστικότητα του ενζύμου ΟΑΤ, εκτός από τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, σε συνθήκες αλατότητας. Συγκεκριμένα, οι Madan et al (1995) ανέφεραν αύξηση στη δραστικότητα του ενζύμου ΟΑΤ σε συνθήκες αλατότητας σε φυτά μιας ανθεκτικής ποικιλίας B. juncea και επομένως συμμετοχή της ορνιθίνης στη βιοσύνθεση της προλίνης, σε συνθήκες αλατότητας. Αντίθετα, οι Lutts et al (1999) παρατήρησαν αύξηση στη δραστικότητα του ενζύμου ΟΑΤ στη ρίζα και τα φύλλα φυταρίων μόνο της ευαίσθητης ποικιλίας της O. sativa και όχι της ανθεκτικής ποικιλίας, επισημαίνοντας ότι περισσότερη ορνιθίνη θα είναι διαθέσιμη για την ανθεκτική ποικιλία για τη σύνθεση της πουτρεσκίνης (Put) μιας εκ των πολυαμινών (Lutts et al 1996c). Οι Roosens et al (2002) ανέφεραν υπερέκφραση του γονιδίου δ-OAT σε διαγονιδιακά φυτάρια A. thaliana σε συνθήκες αλατότητας, η οποία συνδέεται με αύξηση στη δραστικότητα του ενζύμου, αύξηση στα επίπεδα προλίνης και ανθεκτικότητα των φυτών σε καταπόνηση άλατος. Επιπλέον, οι Lin et al (2002)

παρατήρησαν αύξηση στη δραστικότητα του ενζύμου ΟΑΤ σε φύλλα φυτών της *O.* sativa με παράλληλη αύξηση των επιπέδων της προλίνης. Οι Funck et al (2008) απέδειξαν, σε φυτά *A. thaliana,* ότι η ΟΑΤ είναι χρήσιμη για την ανακύκλωση του αζώτου από την αργινίνη και όχι για τη βιοσύνθεση της προλίνης σε συνθήκες καταπόνησης. Ομοίως, οι Zhen et al (2009) ανέφεραν ότι συγκέντρωση άλατος, 200 mM NaCl, δεν επηρέασε τη δραστικότητα του ενζύμου ΟΑΤ σε φυτά *Phragmites australis*, αντίθετα αύξησε τη δραστικότητα της P5CS και τα επίπεδα προλίνης, καταλήγοντας ότι το μονοπάτι του γλουταμινικού οξέος και όχι της ορνιθίνης έχει πρωτεύοντα ρόλο στη βιοσύνθεση της προλίνης.

Σε συνθήκες ψύχους, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Tdδ-OAT* στο ριζικό σύστημα των φυταρίων και των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου εμφανίζονται στην Εικόνα 4.3.17. Το γονίδιο *Tdδ-OAT* επάγεται μετά από 6 ώρες παραμονής των φυταρίων και των 2 ποικιλιών στους 4°C (2 φορές περισσότερο στο ριζικό σύστημα των φυταρίων της ποικιλίας Rusticano απ' ότι της Grazia, σε σχέση με το μάρτυρα) και το μέγιστο της έκφρασης παρουσιάζεται στις 12 ώρες στο ριζικό σύστημα και των 2 ποικιλιών (1,5 φορά περισσότερο στο ριζικό σύστημα των φυταρίων της ποικιλίας Rusticano απ' ότι της Grazia, σε σχέση με το μάρτυρα). Σε όλες τις μετρήσεις με εξαίρεση στις 12 ώρες, τα μεταγραφήματα του *Tdδ-OAT* είναι υψηλότερα στην ποικιλία Rusticano σε σύγκριση με την Grazia.



Εικόνα 4.3.17 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Τάδ-ΟΑΤ* στο ριζικό σύστημα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ψύχους (4°C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (22°C). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση t-test.

Μελετώντας το πρότυπο έκφρασης του *Τάδ-OAT* στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών σκληρού σιταριού (Εικ. 4.3.18), για την ποικιλία Rusticano προκύπτει επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου αμέσως μετά τις 6 ώρες (3,2 φορές σε σχέση με το μάρτυρα), ενώ στις 12 ώρες παρατηρείται το μέγιστο της έκφρασης (μέση τιμή 6,9) σε σχέση με το μάρτυρα και στη συνέχεια μέχρι τις 72 ώρες παρατηρείται σταδιακή μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου (μέση τιμή 0,6). Αντίθετα με την ποικιλία Rusticano, το γονίδιο *Τάδ-OAT* στο υπέργειο τμήμα της Grazia ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Αυτό σημαίνει ότι η έκφρασή του κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα μέχρι τις 12 ώρες (0,69 σε σχέση με το μάρτυρα), ενώ στις 24 ώρες παρατηρείται το μέγιστο της έκφρασης (10 φορές σε σχέση με το μάρτυρα), στις 48 ώρες εμφανίζεται το μέγιστο της έκφρασης (10 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) και στις 72 ώρες επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα. Σε όλες τις μετρήσεις με εξαίρεση στις 72 ώρες, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του γονιδίου στις 2 ποικιλίες, ενώ τα μεταγραφήματα του *Τάδ-OAT* είναι υψηλότερα στην ποικιλία Rusticanο μέχρι τις 24 ώρες και στη στο Γαλεία αυ χροτές σε σχέση με το μάρτυρα του γονιδίου στις 2 ποικιλίες, ενώ τα μεταγραφήματα του *Τάδ-OAT* είναι



Εικόνα 4.3.18 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdOAT* στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ψύχους (4°C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (22°C). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση t-test.

Σε συνθήκες ψύχους δεν έχει μελετηθεί η έκφραση του γονιδίου δ-OAT, ενώ λίγες αναφορές από άλλους συγγραφείς συνδέουν την ενεργότητα του ενζύμου OAT με τη βιοσύνθεση της προλίνης σε συνθήκες ψύχους (4°C). Οι Charest και Phan (1990) υποστήριξαν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ ενζυμικής ενεργότητας της OAT και συγκέντρωσης της προλίνης σε φυτά *T. aestivum*. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από τους Ruiz et al (2002), οι οποίοι παρατήρησαν σε φύλλα φυταρίων *P. vulgaris*, ηλικίας 15 ημερών, αύξηση στην ενεργότητα του ενζύμου OAT με παράλληλη αύξηση στη συγκέντρωση της προλίνης. Επιπλέον, στην ίδια εργασία παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της δραστικότητας του ενζύμου P5CS και της συγκέντρωσης της προλίνης, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι σε συνθήκες ψύχους λειτουργεί το μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης από την ορνιθίνη και όχι το γλουταμινικό οξύ.

4.3.3.4 Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *TdP5CR* στο ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ότι το γονίδιο P5CS και όχι το P5CR αποτελεί το βασικό ένζυμο βιοσύνθεσης της προλίνης από το γλουταμινικό οξύ. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές που αναφέρονται και στο ρόλο του P5CR στη συγκέντρωση του συγκεκριμένου μεταβολίτη (Verbruggen et al 1996, Kumar et al 2003, Veeranagamalliaiah et al 2007, Wang et al 2007).

Στην παρούσα εργασία, η έκφραση του γονιδίου *P5CR* στο ριζικό σύστημα των ποικιλιών σκληρού σίτου, σε συνθήκες αλατότητας, παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.3.19. Το *TdP5CR* εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα μετά από 48 ώρες στα 200 mM NaCl (μέση τιμή για τη ποικιλία Rusticano: 15, μέση τιμή για τη ποικιλία Grazia: 10) και στις 2 ποικιλίες, ενώ στη συγκέντρωση των 100 mM NaCl παρουσιάζει το μέγιστο της έκφρασης στην ποκιλία Grazia μετά από 24 ώρες καταπόνησης (μέση τιμή: 4.6) και στην ποικιλία Rusticano μετά από 48 ώρες (μέση τιμή: 7.8). Γενικά, τα μεταγραφήματα του *TdP5CR* στο ριζικό σύστημα των φυταρίων της Rusticano είναι υψηλότερα από τα αντίστοιχα της Grazia.



Εικόνα 4.3.19 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CR* στο ριζικό σύστημα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (0 mM NaCl). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b,c,d) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση Duncan.

Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές, στις οποίες γίνεται συγκριτική μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *P5CR* σε ποικιλίες/είδη με διαφορετικό δείκτη ανθεκτικότητας σε συνθήκες καταπόνησης άλατος, υπάρχει ωστόσο μία αναφορά για τη δραστικότητα του ενζύμου από τους Rout et al (1998), οι οποίοι μελέτησαν τη δραστικότητα του ενζύμου σε 3 είδη υδρόβιων φυτών με διαφορετικό δείκτη ανθεκτικότητας σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας (0, 50, 150 και 200 mM NaCl). Στη συγκεκριμένη εργασία το ανθεκτικότερο στην αλατότητα είδος παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστικότητα του P5CR σε σχέση με τα άλλα 2 είδη. Ομοίως στην παρούσα μελέτη η ποικιλία Rusticano (ανθεκτική στην αλατότητα) παρουσιάζει μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου *P5CR* από τη Grazia (λιγότερο ανθεκτική στην αλατότητα). Επιπλέον, έχει μελετηθεί εδώ και δεκαετίες η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στις ρίζες φυταρίων σε συνθήκες άλατος. Συγκεκριμένα, οι Delauney και Verma (1990) αναφέρουν ότι το γονίδιο *P5CR* παρουσιάζει συταρίων *G. max* στα 400 mM NaCl και τα επίπεδα mRNA του *P5CR* παρουσιάζουν 6 φορές αύξηση σε σχέση με το μάρτυρα στις ανωτέρω συνθήκες.

Σε επίπεδο φυταρίου, οι LaRosa et al (1991) και Szoke et al (1992) παρατήρησαν αύξηση στη δραστικότητα του P5CR σε φυτά *Ν. tabacum* και *G. max* αντίστοιχα, ωστόσο αναφέρουν ότι η βιοσύνθεση της προλίνης δε ρυθμίζεται από τα επίπεδα του ενζύμου P5CR, αλλά του P5CS. Οι Williamson και Slocum (1992) αναφέρουν ότι σε φυτάρια *P. sativum* τα επίπεδα του ενζύμου P5CR δε διαφοροποιήθηκαν από την αλατότητα παρόλο που η έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου *P5CR* αυξήθηκε 5 φορές σε σχέση με το μάρτυρα στις ίδιες συνθήκες αλατότητας. Σε φυτά *A. thaliana* τόσο τα μεταγραφήματα όσο και η δραστικότητα του P5CR αυξήθηκαν σε συνθήκες καταπόνησης, προτείνοντας ότι το *P5CR* είναι πιθανό να έχει σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση της προλίνης στο φυτό *A. thaliana* (Verbruggen et al 1996). Σε άλλη μελέτη αναφέρθηκε ότι αν και τα μεταγραφήματα των γονιδίων *P5CR* και *P5CS* επάχθηκαν σε συνθήκες καταπόνησης σε συνθήκες καταπόνησης της προλίνης στο φυτά *A. thaliana* των γονιδίων *P5CR* και *P5CS* επάχθηκαν σε συνθήκες καταπόνησης της πολίνης στο φυτά *Α. thaliana* του ενζύμου P5CR πιθανόν δεν έχει ρόλο στη αύξηση της συγκέντρωσης της προλίνης, αλλά στη μεταβολική ρύθμιση κυτταρικού ωσμωτικού δυναμικού (Hua et al 1997).

Στο υπέργειο τμήμα των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου και στις ίδιες συνθήκες αλατότητας η έκφραση του γονιδίου παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.3.20. Όπως προκύπτει από την Εικόνα 4.3.20, το *TdP5CR* διατήρησε φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος μέχρι τις 24 ώρες, ενώ μετά από 48 ώρες, άρχισαν να αυξάνονται τα μεταγραφήματα του *TdP5CR*. Στις 72 ώρες καταπόνησης με 100 mM NaCl, παρατηρείται το μέγιστο της έκφρασης του *TdP5CR* και υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του γονιδίου ανάμεσα στις 2 ποικιλίες (μέση τιμή για την ποικιλία Rusticano: 3 και μέση τιμή για την ποικιλία Grazia: 2), ενώ στα 200 mM NaCl το γονίδιο *TdP5CR* δεν παρουσιάζει διαφορά στην έκφρασή του στις 2 ποικιλίες σκληρού σίτου.



Εικόνα 4.3.20 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CR* στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (0 mM NaCl). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση Duncan.

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της παρούσας εργασίας στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών T. turgidum var. durum, όπου παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης του P5CR μετά από 72 ώρες καταπόνησης στα 100 και 200 mM NaCl προέκυψαν και στα φύλλα των φυταρίων της O. sativa, όπου το γονίδιο P5CR εμφάνισε αύξηση στην έκφρασής του μετά από 6 ημέρες καταπόνησης στα 100 mM NaCl και 200 mM NaCl (Nounjan et al 2012), ωστόσο υποστηρίχθηκε ότι το P5CR δε θεωρείται ότι έχει σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση της προλίνης. Αντίθετα, οι Mattioni et al (1997), ανέφεραν ότι η έκφραση του γονιδίου P5CR δε διαφοροποιήθηκε σε σχέση με το μάρτυρα, στα φύλλα φυταρίων T. turgidum var. durum, μετά από 8, 24, 48 και 72 ώρες παραμονής τους σε συνθήκες αλατότητας 200 mM NaCl. Ενώ στις ίδιες συνθήκες η δραστικότητα του P5CR σημείωσε αύξηση 2 φορές σε σχέση με το μάρτυρα, προτείνοντας ότι η δραστικότητα του ενζύμου δε σχετίζεται με την έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου στο σκληρό σιτάρι. Επιπρόσθετα, οι Murahama et al (2001), αναφέρουν ότι η παρουσία άλατος (50 mM NaCl) έδρασε παρεμποδιστικά στη δραστικότητα του ενζύμου P5CR σε φύλλα S. oleracea. Άλλοι ερευνητές παρατήρησαν θετική συσχέτιση ανάμεσα στη δραστικότητα του P5CR και στα επίπεδα της προλίνης μετά από παραμονή 2 ποικιλιών Morus alba (Kumar et al 2003) και Setaria italica (Veeranagamalliaiah et al 2007) με διαφορετικό δείκτη ανθεκτικότητας, σε συνθήκες αλατότητας. Στις παραπάνω εργασίες η δραστικότητα του ενζύμου και τα επίπεδα της προλίνης παρουσίασαν σημαντική αύξηση στα φύλλα της ανθεκτικής ποικιλίας *M alba* και στα φυτάρια (ηλικίας 5 ημερών) της ανθεκτικής ποικιλίας *S. italica* μετά από καταπόνηση στα 100, 150 και 200 mM NaCl, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η σύνθεση της προλίνης είναι πιθανό να οφείλεται στη δραστικότητα του ενζύμου P5CR. Ομοίως σε φύλλα *T. aestivum* αναφέρθηκε ότι το P5CR και όχι το P5CS είναι πιθανό να έχει το βασικό ρόλο για τη βιοσύνθεση της προλίνης στο μαλακό σιτάρι στην υψηλή συγκέντρωση άλατος των 300 mM NaCl (Wang et al 2007). Πρόσφατα, οι Dong et al 2010 αναφέρουν αύξηση στην έκφραση του γονιδίου *P5CR* σε κυτταρο-καλλιέργεια *T. aestivum*, η οποία συμβαδίζει και με την αύξηση της ολικής συγκέντρωσης της προλίνης μετά από 24 ώρες καταπόνησης στα 100 mM NaCl.

Σε συνθήκες ψύχους, όπως προκύπτει από την Εικόνα 4.3.21, το γονίδιο *TdP5CR*, στο ριζικό σύστημα, παρουσιάζει το ίδιο μοτίβο έκφρασης και στις 2 ποικιλίες σκληρού σίτου, με την ποικιλία Grazia να εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από τη Rusticano. Στις 6 ώρες παραμονής των φυταρίων και των 2 ποικιλιών, στους 4°C, παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου, ενώ στις 12 ώρες τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου εμφανίζουν τη μέγιστη τιμή τους τόσο για τη Rusticano όσο και τη Grazia (2,7 και 4,2 φορές σε σχέση με το μάρτυρα).



Εικόνα 4.3.21 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CR* στο ριζικό σύστημα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ψύχους (4°C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (22°C). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση t-test.

Η έκφραση του *TdP5CR*, στους 4°C, στο υπέργειο τμήμα των 2 ποικιλιών σκληρού παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.3.22. Συγκεκριμένα, στην ποικιλία Rusticano το γονίδιο διατήρησε φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης στις 6, 12 και 24 ώρες, ενώ η έκφρασή του μειώθηκε σημαντικά μέχρι τις 72 ώρες (μέση τιμή 0,15 σε σχέση με το μάρτυρα). Στην ποικιλία Grazia οι μέσες τιμές που καταγράφηκαν είναι χαμηλότερες από τις αντίστοιχες του μάρτυρα σε όλες τις μετρήσεις.



Εικόνα 4.3.22 Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TdP5CR* στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ψύχους (4°C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (22°C). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση t-test.

Μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση διαπιστώθηκε ότι δεν έχει αναφερθεί εργασία στην οποία να γίνεται αναφορά στην έκφραση του γονιδίου *TdP5CR* σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών.

4.3.4 Μελέτη της συσσώρευσης προλίνης σε συνθήκες καταπόνησης4.3.4.1 Μελέτη της συσσώρευσης προλίνης σε συνθήκες αλατότητας

Στην παρούσα εργασία, για τη μελέτη της προλίνης σε συνθήκες αλατότητας και στις 2 ποικιλίες σκληρού σίτου, Rusticano και Grazia, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της προλίνης στο ριζικό σύστημα και στο υπέργειο τμήμα και των 2 ποικιλιών μετά από 12, 24, 48, και 72 ώρες παραμονής των φυταρίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (0, 100 και 200 mM NaCl). Όπως προκύπτει από τη συγκέντρωση της προλίνης στο ριζικό σύστημα των φυταρίων (Εικ. 4.3.23) παρατηρείται διαφοροποίησή της ανάμεσα στις 2 ποικιλίες. Χαρακτηριστική είναι η κατανομή της προλίνης στο ριζικό σύστημα της ποικιλίας Grazia όπου, μετά από 12 ώρες παραμονής των φυταρίων σε διαφοροποίησή της ανάμεσα στις 2 ποικιλίες. Χαρακτηριστική είναι η κατανομή της προλίνης στο ριζικό σύστημα της ποικιλίας Grazia όπου, μετά από 12 ώρες παραμονής των φυταρίων στην υψηλότερη συγκέντρωση άλατος (200 mM

προλίνης στο ριζικό σύστημα είναι 3 και 2 φορές υψηλότερα στην Grazia από ότι στη Rusticano μετά την 1^η και 2^η ημέρα παραμονής των φυταρίων στα 200 mM NaCl αντίστοιχα. Αυτή η διαφοροποίηση στις τιμές της προλίνης ανάμεσα στις 2 ποικιλίες δεν είναι τόσο ισχυρή την 3^η ημέρα παραμονής των φυταρίων στα 200 mM NaCl, ωστόσο είναι στατιστικά σημαντική ανάμεσα στις 2 ποικιλίες. Αντίθετα, στη συγκέντρωση των 100 mM NaCl, παρατηρείται διαφοροποίηση στη συγκέντρωση του μεταβολίτη μετά από 24 ώρες καταπόνησης, με την ποικιλία Grazia να συσσωρεύει και πάλι υψηλότερα επίπεδα προλίνης από τη Rusticano. Στις 48 ώρες καταπόνησης, η συγκέντρωση της προλίνης κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα ανάμεσα στις 2 ποικιλίες, ενώ στις 72 ώρες παρατηρείται ελάττωση στη συγκέντρωσή της στο ριζικό σύστημα της ποικιλίας Grazia, με αντίστοιχη αύξησή της στο ριζικό σύστημα της ποικιλίας Rusticano.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας στη συγκέντρωση των 100 mM NaCl είναι παρόμοια με αυτά σε φυτά *Η. vulgare* (Chen et al 2007), όπου οι ανθεκτικές στην αλατότητα ποικιλίες συγκέντρώσαν στη ρίζα περισσότερη προλίνη από τις ευαίσθητες. Αντίθετα σε φυτά *Ο. sativa* (Lutss et al 1999), οι ευαίσθητες στην αλατότητα ποικιλίες συσώρευσαν περισσότερη προλίνη από τις ανθεκτικές ποικιλίες, μετά από 3 ημέρες στη συγκέντρωση των 100 mM NaCl.





Όσον αφορά στη συγκέντρωση της προλίνης στο υπέργειο τμήμα των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου, αυτή παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.3.24. Συγκεκριμένα, σημαντική αύξηση στα επίπεδα της προλίνης παρατηρείται μετά τις 48 ώρες καταπόνησης, με την ποικιλία Grazia να συσσωρεύει στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων της περισσότερη προλίνη από τη Rusticano. Αντίθετα, στις 72 ώρες καταπόνησης και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος τα επίπεδα της προλίνης στην ποικιλία Rusticano είναι υψηλότερα από τα αντίστοιχα της Grazia.



Εικόνα 4.3.24 Επίπεδα προλίνης στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες ώρες σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση της προλίνης κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (0 mM NaCl). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b,c,d) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση Duncan.

Ομοίως σε φύλλα φυτών *M* alba η ανθεκτική ποικιλία συγκέντρωσε περισσότερη προλίνη σε σχέση με την ευαίσθητη μετά από 4, 8 και 12 ημέρες παραμονής των φυτών σε συνθήκες αλατότητας (0, 50, 100 και 150 mM NaCl) (Kumar et al 2003). Επίσης, σε φυτά *H. annus* αναφέρεται ότι οι ανθεκτικές στην αλατότητα ποικιλίες συσσώρευσαν περισσότερη προλίνη από τις ευαίσθητες (Shahbaz et al 2011). Αντίθετα, άλλοι ερευνητές ανέφεραν υψηλότερα επίπεδα προλίνης στα φύλλα ευαίσθητων ποικιλιών φυτών *T. aestivum* (Colmer et al 1995), *L. esculentum* (Balibrea et al 1997), *O. sativa* (Lutts et al 1999), και *H. vulgare* (Chen et al 2007) και υποστήριξαν ότι οι ανθεκτικές ποικιλίες ενεργοποιούν άλλους μηχανισμούς για να αντιμετωπίσουν την αλατότητα, σε σχέση με τις πιο ευαίσθητες ποικιλίες που συγκεντρώνουν περισσότερη προλίνη για να επιβιώσουν.

Όπως προκύπτει από τις Εικόνες 4.3.23 & 4.3.24, η συγκέντρωση της προλίνης στο υπέργειο τμήμα και των 2 ποικιλιών είναι μεγαλύτερη από ότι στο ριζικό σύστημα και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος. Αναλυτικότερα, στις 48 ώρες καταπόνησης, η συγκέντρωση της προλίνης στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia είναι περίπου 5 και 10 φορές μεγαλύτερη από της ρίζας αντίστοιχα και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος. Ομοίως στις 72 ώρες, τα επίπεδα της προλίνης στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Rusticano είναι 6 φορές υψηλότερα από ότι στις ρίζες και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος, ενώ στην ποικιλία Grazia η συγκέντρωση του μεταβολίτη είναι 12 και 4 φορές ψηλότερη από ότι στις ρίζες στα 100 και 200 mM NaCl αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με την υψηλότερη συγκέντρωση της προλίνης στα φύλλα σε σχέση με τις ρίζες παρατηρήθηκαν και σε φυτά O. sativa (Lutts et al 1996, 1999) P. aureus (Misra et al 2005), P. vulgaris (Bremont et al 2006), H. vulgare (Chen et al 2007) και H. tuberosus (Huang et al 2013). Η μεγαλύτερη κατανομή της προλίνης στα φύλλα σε αντίθεση με τις ρίζες, μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στις ρίζες είναι δυνατό να λαμβάνει χώρα η βιοσύνθεση της προλίνης όχι όμως και η συσσώρευσή της, μιας και μεταφέρεται από τις ρίζες σε άλλα μέρη του φυτού μέσω της διαπνοής (Hua et al 1997). Επιπλέον, τα φύλλα συγκεντρώνουν περισσότερη προλίνη, προκειμένου να διατηρήσουν τα επίπεδα χλωροφύλλης και τη σπαργή των κυττάρων τους ώστε να προστατεύσουν τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης σε συνθήκες καταπόνησης άλατος (Silva-Ortega et al 2008).

Σε επίπεδο φυταρίου οι Veeranagamalliaiah et al (2007), ανέφεραν σημαντική αύξηση στα επίπεδα προλίνης στα φυτάρια *S. italica* της ανθεκτικής ποικιλίας σε σχέση με την πιο ευαίσθητη, μετά από 5 ημέρες καταπόνησης στα 100 και 200 mM NaCl, παρατηρώντας μεταξύ άλλων ότι τα διαφορετικά επίπεδα προλίνης μεταξύ των ποικιλίων μπορεί να είναι ένας από τους λόγους ανθεκτικότητας των φυτών τους στην αλατότητα. Ομοίως οι Tripathi et al (2007), παρατήρησαν ότι σε υδρόβια φυτά, η ανθεκτική ποικιλία στην αλατότητα συγκέντρωσε υψηλότερα επίπεδα προλίνης σε σχέση με την πιο ευαίσθητη, μετά από 12 ώρες στα 100 και 150 mM NaCl, τα οποία βέβαια δεν συνδέθηκαν με τα μεταγραφήματα του γονιδίου *P5CS* στην ίδια ποικιλία. Αντίθετα, οι Rout και Shaw (1998), ανέφεραν ότι ευαίσθητες στην αλατότητα ποικιλίες υδροβίων φυτών, οι οποίες καταπονήθηκαν για 12 ώρες σε 0, 50, 150, 250 mM NaCl συγκέντρωσαν περισσότερη προλίνη από τις πιο ανθεκτικές ποικιλίες. Οι παραπάνω ερευνητές υποστήριξαν ότι η σύνθεση και συσσώρευση της προλίνης στις ευαίσθητες στην αλατότητα ποικιλίες επιφέρει οσμωρύθμιση και είναι αποτέλεσμα της ενδοκυτταρικής ιοντικής ρύθμισης η οποία λαμβάνει χώρα σε συνθήκες καταπόνησης προκειμένου να συνεχιστούν οι μεταβολικές διεργασίες.

Από τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων TdP5CS1, TdP5CS2 και του μεταβολίτη προέκυψαν διαφοροποιήσεις μεταξύ των 2 ποικιλιών Rusticano και Grazia, οι οποίες διαφέρουν ως προς την ανθεκτικότητά τους σε συνθήκες αλατότητας. Σημειώνεται, ότι τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στο ριζικό σύστημα (Εικ. 4.3.7 και 4.3.11) της ανθεκτικής ποικιλίας, Rusticano, δε συμβαδίζουν με τη μεγαλύτερη συσσώρευση της προλίνης (Εικ. 4.3.23) στην ευαίσθητη ποικιλία, Grazia, στην υψηλή συκέντρωση άλατος των 200 mM NaCl. Ομοίως, αρνητική συσχέτιση μετάξυ των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων P5CS και της συγκέντρωσης της προλίνης, στο ριζικό σύστημα στην ίδια συγκέντρωση άλατος, παρατηρήθηκε και σε ποικιλίες O. sativa, οι οποίες διέφεραν ως προς το βαθμό ανθεκτικότητας τους στην αλατότητα (Hien et al 2003). Αντίθετα, στη χαμηλή συγκέντρωση άλατος των 100 mM NaCl στο ριζικό σύστημα και τις 2 συγκεντρώσεις άλατος, 100 και 200 mM NaCl στο υπέργειο τμήμα, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συσσώρευση τόσο των μεταγραφημάτων των TdP5CS1 (Εικ. 4.3.7, 4.3.8) και TdP5CS2 (Εικ. 4.3.11, 4.3.12) όσο και της προλίνης (Εικ. 4.3.23 και 4.3.24) στην ανθεκτική ποικιλία Rusticano, σε σχέση με την πιο ευαίσθητη Grazia. Παρόμοια αποτελέσματα ανέφεραν και οι Igarashi et al (1997), σε φυτά O. sativa, όπου τόσο τα επίπεδα mRNA των γονιδίων P5CS, όσο και τα επίπεδα προλίνης ήταν υψηλότερα στις ανθεκτικές ποικιλίες σε σχέση με τις ευαίσθητες.

Επιπρόσθετα, όπως περιγράφεται στον Πίνακα 4.3.1, παρατηρείται θετική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της ελεύθερης προλίνης και στις συγκεντρώσεις άλατος (0, 100 και 200 mM NaCl), τόσο στο ριζικό σύστημα όσο και στο υπέργειο τμήμα φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia.

Πίνακας 4.3.1 Βαθμός συσχέτισης (r) της προλίνης και της συγκέντρωσης άλατος (0, 100 και 200 mM NaCl) στο ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48, και 72 ώρες. Τα σύμβολα ***,** και * δηλώνουν σημαντική συσχέτιση σε βαθμό σημαντικότητας P=0,001, P=0,01 και P=0,05 αντίστοιχα.

Ριζικό σύστημα (τιμές r)		
	Rusticano	Grazia
12 ώρες	0,689*	0,881**
24 ώρες	0,806**	0,990***
48 ώρες	0,944***	0,943***
72 ώρες	0,983***	0,918***
Υπέργειο Τμήμα (τιμές r)		
	Rusticano	Grazia
12 ώρες	0,704*	0,902**
24 ώρες	0,983***	0923**
48 ώρες	0,975***	0,980***
72 ώρες	0,987***	0,997***

Ομοίως οι τιμές της προλίνης αυξήθηκαν με την κλιμάκωση των διαφορετικών συγκεντρώσεων άλατος σε φυτά *O. sativa* (Lutts et al 1996, 1999), *B. vulgaris* (Ghoulam et al 2002), *M. alba* (Kumar et al 2003), *P. aureus* (Misra et al 2005) και *S. italica* (Veeranagamalliaiah et al 2007).

4.3.4.2 Μελέτη της συσσώρευσης προλίνης σε συνθήκες ψύχους

Η συγκέντρωση της προλίνης στο ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα των 2 ποικιλιών μελετήθηκε μετά από 12, 24, 48, και 72 ώρες παραμονής των φυταρίων σε φυσιολογικές συνθήκες (22 °C) και σε συνθήκες ψύχους (4°C). Όπως προκύπτει από την Εικόνα 4.3.25, παρατηρείται διαφοροποίηση στη συγκέντρωση της προλίνης στο ριζικό σύστημα των φυταρίων και των 2 ποικιλιών, με την ποικιλία Rusticano να συσσωρεύει περισσότερη προλίνη σε σχέση με την Grazia καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ωστόσο, 24 ώρες μετά την εφαρμογή χαμηλών θερμορασιών και οι 2 ποικιλίες συγκεντρώνουν τα υψηλότερα επίπεδα προλίνης ενώ στη συνέχεια παρατηρείται σταδιακή μείωση των επιπέδων του μεταβολίτη μέχρι τις 72 ώρες.



Εικόνα 4.3.25 Επίπεδα προλίνης στο ριζικό σύστημα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες ώρες σε συνθήκες ψύχους (4°C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση της προλίνης κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (22°C). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση t-test.

Η προλίνη, στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών Rusticano και Grazia (Εικ. 4.3.26), εμφανίζει το ίδιο πρότυπο διαφοροποίησης, όπως και στο ριζικό σύστημα με τη διαφορά ότι τα επίπεδα της προλίνης στο υπέργειο τμήμα των ποικιλιών είναι υψηλότερα από ότι στις ρίζες. Επιπλέον, η συγκέντρωση της προλίνης στην ποικιλία Rusticano είναι περίπου 2,5 φορές υψηλότερη απ' ότι στην Grazia μετά από 24 και 48 ώρες παραμονής των φυταρίων στους 4°C. Μεταβολομική ανάλυση στο υπέργειο τμήμα φυταρίων 2 ποικιλιών *Ο. sativa* έδειξε ότι η ανθεκτική ποικιλία ρυζιού συσσώρευσε περισσότερη προλίνη από την ευαίσθητη μετά από 2, 8, 24 και 48 ώρες καταπόνησης στους 4°C. Ωστόσο, οι 2 ποικιλίες ρυζιού συγκέντρωσαν υψηλότερα επίπεδα προλίνης μετά από 24 ώρες καταπόνησης, με τα επίπεδα της προλίνης να είναι διπλάσια στην ανθεκτική απ' ότι στην ευαίσθητη ποικιλία (Zhao et al 2013). Ομοιως, σε φυτάρια *P. vulgaris* και *J. curcas* η προλίνη σε χαμηλές θερμοκρασίες (Zhuang et al 2011).



Εικόνα 4.3.26 Επίπεδα προλίνης στο υπέργειο τμήμα των φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia μετά από 12, 24, 48 και 72 ώρες ώρες σε συνθήκες ψύχους (4°C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση της προλίνης κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (22°C). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων (± τιμή στατιστικού σφάλματος). Διαφορετικά σύμβολα (a,b) για την ίδια χρονική στιγμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0.05), σύμφωνα με την ανάλυση t-test.

4.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εντοπίστηκαν, ενισχύθηκαν και προσδιορίστηκαν τμήματα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων, P5CS1, P5CS2, δ-OAT και P5CR, που πιθανά κωδικοποιούν τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες στο σκληρό σιτάρι (Triticum turgidum var. durum). Η σύγκριση των παραπάνω αλληλουχιών με τις ήδη υπάρχουσες στις βάσεις δεδομένων (EMBL, GeneBank, Swiss-Prot), έδειξε ότι οι TdP5CSs, Tdδ-OAT και TdP5CR εμφανίζονται συντηρημένες σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Το ποσοστό ομολογίας σε αμινοξικό επίπεδο, μεταξύ των φυτών, κυμαίνεται για τις P5CSs από 90-74%, για την δ-ΟΑΤ μεταξύ 90-66% και τη P5CR από 99-74%. Η ομοιότητα αυτή έκανε φανερή την ύπαρξη πολλών συντηρημένων μοτίβων μεταξύ των πρωτεϊνών καθώς και το διαχωρισμό τους κατά τη φυλογενετική ανάλυση σε ξεχωριστές διακλαδώσεις από τις αντίστοιχες πρωτεΐνες των δικότυλων Φυτών.

Από τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που μετέχουν στη βιοσύνθεση της προλίνης, από τις πρόδρομες ενώσεις γλουταμινικό οξύ και ορνιθίνη, στις ποικιλίες σκληρού σίτου, Rusticano (ανθεκτική) και Grazia (ευαίσθητη) σε συνθήκες αλατότητας και ψύχους, προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

Καταπόνηση φυταρίων σε συνθήκες αλατότητας

- Τα μεταγραφήματα των γονιδίων, TdP5CS1, TdP5CS2 και Tdδ-OAT TdP5CR, που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης διαπιστώθηκε ότι ήταν σταθερά υψηλότερα τόσο στο ριζικό σύστημα όσο και στο υπέργειο τμήμα της πιο ανθεκτικής στην αλατότητα ποικιλίας, Rusticano, σε σχέση με την πιο ευαίσθητη ποικιλία, Grazia, με τα μεταγραφήματα του TdP5CS1 να είναι υψηλότερα από τα αντίστοιχα των Tdδ-OAT και TdP5CS2 και στους 2 υπό μελέτη ιστούς (σύστημα και υπέργειο τμήμα).
- Στοριζικό σύστημα των 2 ποικιλιών, η συσσώρευση των μεταγραφημάτων των γονιδίων προηγήθηκε της συσσώρευσης του μεταβολίτη, ενώ στο υπέργειο τμήμα των 2 ποικιλιών, τα μεταγραφήματα των γονιδίων ακολούθησαν τη συσσώρευση της προλίνης στις 72 ώρες καταπόνησης.
- Η συγκέντρωση της προλίνης στο υπέργειο τμήμα και των 2 ποικιλιών είναι μεγαλύτερη από ότι στο ριζικό σύστημα και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος, ενισχύοντας την υπόθεση ότι στο ριζικό σύστημα είναι δυνατό να λαμβάνει χώρα η βιοσύνθεση της προλίνης όχι όμως και η συσσώρευσή της. Επιπλέον, παρατηρείται θετική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της προλίνης και στις

συγκεντρώσεις άλατος (0, 100 και 200 mM NaCl), τόσο στο ριζικό σύστημα όσο και στο υπέργειο τμήμα φυταρίων των ποικιλιών Rusticano και Grazia.

- Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *TdP5CS1* (Εικ. 4.3.7), *TdP5CS2* (Εικ. 4.3.11) και *Tdδ-OAT* (Εικ. 4.3.15), στο ριζικό σύστημα της ανθεκτικής ποικιλίας, Rusticano, δεν συσχετίζονται με τη μεγαλύτερη συσσώρευση της προλίνης (Εικ. 4.3.23) στην ευαίσθητη ποικιλία, Grazia, στη συγκέντρωση των 200 mM NaCl. Αντίθετα, στη χαμηλότερη συγκέντρωση άλατος, 100 mM NaCl, παρατηρείται συσχέτιση των μεταγραφημάτων των γονιδίων και της προλίνης στην ανθεκτική ποικιλία, Rusticano, μετά τις 72 ώρες καταπόνησης. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *TdP5CS1* (Εικ. 4.3.8), *TdP5CS2* (Εικ. 4.3.12), *Tdδ-OAT* (Εικ. 4.3.16), και προλίνης (Εικ. 4.3.24), στο υπέργειο τμήμα της Rusticano, παρατηρήθηκαν μετά τις 72 ώρες καταπόνησης και στις 2 συγκεντρώσεις άλατος.
- Τέλος, το μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης από το γλουταμινικό οξύ και την ορνιθίνη φαίνεται να είναι λειτουργικό σε συνθήκες αλατότητας. Και τα 2 γονίδια TdP5CS1 και TdP5CS2 είναι πιθανό να δρουν συνεργιστικά στη βιοσύνθεση της προλίνης από το γλουταμινικό οξύ, ενώ το γονίδιο TdP5CS1 πιθανόν να έχει κυρίαρχο ρόλο στη βιοσύνθεση της προλίνης, στο σκληρό σιτάρι.

Καταπόνηση φυταρίων σε συνθήκες ψύχους

- Τα γονίδια TdP5CS1, TdP5CS2 και Tdδ-OAT εκφράζονται τόσο στο ριζικό σύστημα όσο και στο υπέργειο τμήμα των 2 ποικιλιών Rusticano και Grazia. Εξαίρεση αποτελεί το γονίδιο TdP5CR, όπου δεν παρατηρείται συσσώρευση των μεταγραφημάτων του στο υπέργειο τμήμα και των 2 ποικιλιών σκληρού σίτου. Ομοίως, όπως και στην περίπτωση της καταπόνησης άλατος, τα μεταγραφήματα του TdP5CS1 είναι υψηλότερα από των TdP5CS2 και Tdδ-OAT και στους 2 μελετώμενους ιστούς.
- Η έγκαιρη αντίδραση της ποικιλίας Rusticano στο ψύχος φαίνεται και από την έγκαιρη συσσώρευση των μεταγραφημάτων των γονιδίων και στους 2 μελετώμενους ιστούς.
- Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η συσσώρευση της προλίνης στους ιστούς της ποικιλίας Rusticano είναι μεγαλύτερη από τη συσσώρευση του μεταβολίτη στους ιστούς της ποικιλίας Grazia. Τόσο στο ριζικό σύστημα όσο και στο υπέργειο τμήμα των 2 ποικιλιών η συγκέντρωση της προλίνης γίνεται μέγιστη μετά από 24 ώρες καταπόνησης, ενώ η συγκέντρωσή της στο υπέργειο τμήμα και των 2 ποικιλιών είναι μεγαλύτερη από ότι στο ριζικό σύστημα.

 Ομοίως, όπως και στην περίπτωση της καταπόνησης άλατος, το μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης από το γλουταμινικό οξύ και την ορνιθίνη φαίνεται να είναι λειτουργικό σε συνθήκες ψύχους, με το γονίδιο TdP5CS1 να έχει σημαντικότερο ρόλο από το TdP5CS2 στη βιοσύνθεση της προλίνης.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τις μετρήσεις των μορφολογικών παραμέτρων των φυταρίων σκληρού σίτου και των 2 ποικιλιών, σε συνθήκες αλατότητας (100 και 200 mM NaCl) και ψύχους (4°C), προέκυψε ότι η ποικιλία Rusticano είναι πιο ανθεκτική από την ποικιλία Grazia και στους 2 παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης. Η μεταβολομική ανάλυση του υπέργειου τμήματος των ανωτέρω ποικιλιών, μετά από 48 ώρες καταπόνησης άλατος (200 mM NaCl) και ψύχους (4°C), οδήγησε στην ταυτοποίηση είκοσι εννέα πρωτογενών (αμινοξέα, οργανικά οξέα, λιπίδια) και δευτερογενών μεταβολιτών (κυρίως αζωτούχες και φαινολικές ενώσεις). Σε σύγκριση με την ποικιλία Grazia, η ποικιλία Rusticano παρουσίασε ταχεία ενεργοποίηση του μεταβολισμού της στις συνθήκες καταπόνησης, διαφοροποίηση μεγαλύτερου αριθμού μεταβολιτών, καθώς και υψηλότερα επίπεδα συσσώρευσης μεταβολιτών (αμινοξέων, λιπιδίων, δευτερογενών μεταβολιτών) στο υπέργειο τμήμα της. Εξαίρεση αποτελεί, σε συνθήκες αλατότητας, η μεγαλύτερη συγκέντρωση της προλίνης στο υπέργειο τμήμα της ποικιλίας Grazia η οποία, λόγω μεγαλύτερης ευασθησίας της σε αυτό τον παράγοντα καταπόνησης, συσσωρεύει το συγκεκριμένο μεταβολίτη προκειμένου να επέλθει οσμωρύθμιση και να συνεχιστούν οι μεταβολικές της διεργασίες. Από τη μεταγραφική μελέτη του μονοπατιού βιοσύνθεσης της προλίνης διαπιστώθηκε ότι σε συνθήκες αλατότητας η ανθεκτικότητα της ποικιλίας Rusticano έναντι της Grazia είναι εμφανής λόγω της μεγαλύτερης συσσώρευσης μεταγραφημάτων των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσής της καθώς και από τα υψηλότερα επίπεδα προλίνης στο ριζικό σύστημα και το υπέργειο τμήμα, μετά από 72 ώρες καταπόνησης. Σε συνθήκες ψύχους, η ανθεκτικότητα της ποικιλίας Rusticano έναντι της Grazia σχετίζεται με την έγκαιρη (μόλις 6 ώρες μετά την έκθεση των φυταρίων στους 4°C) συσσώρευση των μεταγραφημάτων των γονιδίων και τη μεγαλύτερη συσσώρευση της προλίνης στους ιστούς της. Τα γονίδια TdP5CS1, TdP5CS2 και Tdδ-OAT είναι πιθανό να δρουν συνεργιστικά στη βιοσύνθεση της προλίνης από το γλουταμινικό οξύ και την ορνιθίνη αντίστοιχα, με το γονίδιο TdP5CS1 να έχει κυρίαρχο ρόλο στη συσσώρευση του μεταβολίτη και στις 2 συνθήκες καταπόνησης, ενώ από τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης σε συνθήκες αλατότητας προκύπτει ότι η ορνιθίνη έχει ενεργό ρόλο και στα μεταβολικά μονοπάτια της αργινίνης και των πολυαμινών. Συμπερασματικά, τα φυτάρια της ποικιλίας Rusticano παρουσιάζουν καλύτερη προσαρμογή από τα αντίστοιχα της Grazia τόσο στην αλατότητα, όσο και το ψύχος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abu-Romman SM., Ammari TG., Irshaid LA., Salameh NM., Hasan MK., Hasan HS. (2011) Cloning and expression patterns of the *HvP5CS* gene from barley (*Hordeum vulgare*). Journal Food Agric Environ 9: 279-284.

Acquaah G. (2007) Principles of plant genetics and breeding. Blackwell, Oxford, p 385.

Ahmad P. and Sharma S. (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. Plant Soil Environ 54: 89–99.

Ahmad P., Jeleel CA., Azooz MM., Nabi G. (2009) Generation of ROS and nonenzymatic antioxidants during abiotic stress in Plants. Bot Res Intern 2: 11–20.

Ahmad P., Jaleel CA., Salem MA., Nabi G., Sharma S. (2010) Roles of Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. Crit Rev Biotechnol 30: 161–175.

Ahmad P., Nabi G., Ashraf M. (2011) Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid. South Afr J Bot 77: 36–44.

Ahmad P., Hakeem KR., Kumar A., Ashraf M., Akram NA. (2012) Salt-induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). Afr J Biotechnol 11: 2694–2703.

Ahmad P. and Prasad MNV. (2012) Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. Springer, New York Science, Business Media, LLC; 10.1007/978-1-4614-0634-1.

Ahmadi SH., Ardekani JN. (2006) The effect of water salinity on growth and physiological stages of eight Canola (*Brassica napus*) cultivars. Irrigation Sci. 25: 11-20.

Akbarimoghaddam H., Galavi M., Ghanbari A., Panjehkeh N. (2011) Salinity effects on seed germination and seedling growth of bread wheat cultivars. Trakia J Sci 9: 43–50.

Akladious SA. (2012) Influence of different soaking times with selenium on growth, metabolic activities of wheat seedlings under low temperature stress Afr J Biotechnol 11: 14792-14804.

Alberico GL. and Cramer GR. (1993) Is the salt tolerance of maize related to sodium exclusion? I. Preliminary screening of seven cultivars. J Plant Nutr 16: 2289–2303.

Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortoletti C., Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcin AF. (2010) Polyamines; molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. Planta 231: 1237–1249.

Alcazar R., Marco F., Cuevas JC., Patron M., Ferrando A. (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. Biotechnol Lett. 28: 1867-1876.

Alet AI., Sánchez DH., Cuevas JC., Marina M., Carrasco P., Altabella T., Tiburcio AF., Ruiz OA. (2012) New insights into the role of spermine in *Arabidopsis thaliana* under long-term salt stress. Plant Sci. 182: 94–100.

Almansouri M., Kinet JM., Lutts S. (1999) Compared effects of sudden and progressive impositions of salt stress in three durum wheat (*Triticum durum Desf.*) cultivars. J Plant Physiol 154: 743-752.

Anoop N. and Gupta AK. (2003) Transgenic indica rice cv IR-50 overexpressing *Vigna aconitifolia* $\delta(1)$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase cDNA shows tolerance to high salt. J. Plant Biochem. Biotechnol 12: 109–116.

Apel K. and Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annu Rev Plant Biol 55: 373–399.

Arbona V., Marco AJ., Iglesias DJ., López-Climent MF., Talon M., Gómez-Cadenas A .(2005) Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L. Plant Growth Regul 46: 153-160.

Argandona VH., Luza JG., Niemeyer HM., Corcuera LJ. (1980) Role of hydroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. Phytochemistry 19: 1665–1668.

Armengaud P., Thiery L., Buhot N., Grenier-de March G., Savoure A. (2004) Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. Physiol Plant 120: 442-450.

Aroca R., Irigoyen JJ., Sanchez-Diaz M. (2001) Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity. Plant Sci. 161: 719–726.

Ashraf M. and Foolad MR. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. Exp. Bot. 59: 206-216.

Ashraf M., McNeilly T., Bradshaw AD. (1986) The response of selected salt-tolerant and normal lines of four grass species to NaCl in sand culture. New Phytol 104: 453-461.
Aronsson H. (2008) The galactolipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) contributes to photosynthesis-related processes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Signaling & Behavior 3: 12, 1093-1095.

Balibrea ME., Rus-Alvárez AM., Bolarín MC., Pérez-Alfocea F. (1997) Fast changes in soluble carbohydrates and proline contents in tomato seedlings in response to ionic and non-ionic iso-osmotic stresses. J. Plant Physiol 151: 221-226.

Balmer D., Flors V., Glauser G., Mauch-Mani B. (2013) Metabolomics of cereals under biotic stress: current knowledge and techniques. Frontiers in Plant Sciences, 4: 82.

Bar-Even A., Flamholz A., Noor E., Milo R. (2012) Rethinking glycolysis: on the biochemicallogicof metabolic pathways. Nat Chem Biol 8: 509-517.

Barnett NM. and Naylor AW. (1966) Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. Plant Physiol 41: 1222-1230.

Bassard JE., Ullmann P., Bernier F., Werck-Reichhart D. (2010) Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. Phytochemistry 71: 1808–1824.

Bates LS. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205–207.

Bazargani MM., Sarhadi E., Bushehri AA. (2011) Aproteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. J Proteomics 74 (10): 1959–1973.

Bentley R. (1990) The shikimate pathway: a metabolic tree with many branches. CRC Crit Rev Biochem Mol Biol 25: 307–384.

Bhatnagar-Mathur P., Vadez V., Sharma KK. (2008) Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. Plant Cell Rep 27: 411–424.

Bies-Ethe`ve N., Gaubier-Comella P., Debures A., Lasserre E., Jobet E., Raynal M., Cooke R., Delseny M. (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol 67: 107–124.

Binzel ML., Hasegawa PM., Rhodes D., Handa S., Handa AV., Bressan RA. (1987) Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. Plant Physiol 84: 1408–1415. Bitrián M., Zarza X., Altabella T., Tiburcio AF., Alcázar R. (2012) Polyamines under abiotic stress: Metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants. Metabolites 2: 516–528.

Bloom A. and Epstein E. (1984) Varietal differences in salt-induced respiration in barley. Plant Sci Lett 35: 1-3.

Boggess SF. and Koeppe DE. (1978) Oxidation of proline by plant mitochondria. Plant Physiol 62: 22–25.

Bohnert HJ. and Jensen RG. (1996) Strategies for engineering waterstress tolerance in plants. Trends Biotechnol 14: 89–97.

Bohnert HJ. and Shen B. (1999) Transformation and compatible solutes. Sci. Hortic. 78: 237–260.

Bollina V., Kumaraswamy GK., Kushalappa AC., Choo TM., Dion Y., Rioux S. (2010) Mass spectrometry based metabolomics application to identify quantitative resistance related metabolites in barley against *Fusarium* head blight. Mol Plant Pathol 11: 769– 782.

Bors W., Langebartels C., Michel C., Sandermann H. Jr (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. Phytochemistry 28: 1589–1595

Böttcher C., vonRoepenack-Lahaye E., Schmidt J., Schmotz C., Neumann S., Scheel D., Clemens S. (2008) Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 147: 2107–2120.

Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. Plant Sci 140: 103–125

Bowne JB., Erwina TA., Juttnerb J., Schnurbuschb T., Langridgeb P., Bacica A., Roessnera U. (2011) Drought Responses of Leaf Tissues from Wheat Cultivars of Differing Drought Tolerance at the Metabolite Level. Molecular Plant Pages 5: 418– 429

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal Biochem 72: 248–54.

Bravo HR., Copaja SV., Lazo W. (1997) Antimicrobial activity of natural 2benzoxazolinones and related derivatives. J. Agric. Food Chem. 45: 3255–3257. Broschi M., Vinocur B., Alatalo ER., Lamminmaki A., Teichmann T., Ottow EA., Djilianov D., Afif D., Bogeat-Triboulot M-B., Altman A., Polle A., Dreyer E., Rudd S., Paulin L., Auvinen P., Kangasjarvi J. (2005) Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. Genome Biol, 6: 1465-6914

Brouwer C., Goffeau A., Heibloem M. (1985) Irrigation water management: Training Manual No.1 – Introduction to irrigation. FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Browse J. and Somerville CR (1991) Glycerolipid metabolism: biochemistry and regulation. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol 42: 467–506.

Brusslan JA, Tobin EM. (1992) Light-independent developmental regulation of *cab* gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. P Natl Acad Sci U.S.A. 89: 7791-7795.

Buchanan B., Gruissem W., Jones RL (2000) Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Chapter 12. Rockville, MD, USA: American Society of Plant Biologists.

Busk PK. and Møller BL. (2002) Dhurrin synthesis in sorghum is regulated at the transcriptional level and induced by nitrogen fertilization in olderplants. Plant Physiol 129: 1222–1231

Campos PS., Quartin V., Ramahlo JC., Nunes MA. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea sp.* plants. Journal of Plant Physiol 160: 283-292

Carpici EB., Celik N., Bayram G. (2009) Effects of salt stress on germination of some maize (*Zea mays* L.) cultivars. Afr J Biotechnol 8: 4918–4922

Carreno-Quintero N., Acharjee A., Maliepaard C., Bachem CW., Mumm R., Bouwmeester H., Visser RG., Keurentjes JJ. (2012) Untargeted metabolic quantitative trait loci analyses reveal a relationship between primary metabolism and potato tuber quality. Plant Physiol 158: 1306–1318

Caseys C., Glauser G., Stölting KN., Christe C., Albrectsen BR., Lexer C. (2012) Effects of interspecific recombination on functional traits in trees revealed by metabolomics and genotyping-by-resequencing. Plant Ecology and Diversity 5: 457-471

Chalbi N., Hessini K., Gandour M., Mohamed SN., Smaoui A., Abdelly C., Youssef NB. (2013) Are changes in membrane lipids and fatty acid composition related to salt-stress resistance in wild and cultivated barley? J Plant Nutr Soil Sc 176 : 38–147

Charest C. and Phan CT. (1990) Cold acclimation of wheat: Properties of enzymes involved in proline metabolism. Physiol Plant 80: 159–168.

Chen JB., Wang SM., Jing RL., Mao XG. (2009) Cloning the *PvP5CS* gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its expression patterns under abiotic stresses. J Plant Physiol 166: 12-9.

Chen J-B., Jing RL., Mao XG., Chang X-P., Wang SM. (2008) A Response of *PvP5CS2* Gene to Abiotic Stresses in Common Bean. Acta Agron Sin. 34: 1121-1127

Chen Z., Cuin TA., Zhou M., Twomey A., Naidu BP., Shabala S (2007) Compatible solute accumulation and stress mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. J. Exp. Bot. 58: 4245–4255

Chinnusamy V., Zhu J., Zhu JK (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends Plant Sci 12: 444–451.

Cho K., Shibato J., Agrawal GK., Jung Y-H., Kubo A., Jwa N-S., Tamogami S., Satoh K., Kikuch S., Higashi T., Kimura S., Saji H., Tanaka Y., Iwahashi H., Masuo Y., Rakwal R. (2008) Integrated transcriptomics, proteomics, and metabolomics analyses to survey ozone responses in the leaves of rice seedling. J Proteome Res 7: 2980–2998

Choudhary NL., Sethi GS., Singh S., Pratap A., Sharma S. (2005) Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa L*.). Ind J Biochem Biophys 42: 366–370

Cidade LC., de Oliveira TM., Mendes AFS., Macedo AF., Floh EIS., Gesteira AS., Soares-Filho WS., Costa MGC. (2012) Ectopic expression of a fruit phytoene synthase from *Citrus paradisi Macf.* promotes abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. Mol Biol Rep 39: 10201–10209.

Colledge S. and Conolly J. (2007) The origins and spread of domestic plants in southwest Asia and Europe. Left Coast Press. p 40.

Colmer TD., Epstein E., Dvorak J. (1995) Differential solute regulation in leaf blades of various ages in salt-sensitive wheat and a salt-tolerant wheat×*Lophopyrum elongatum* (Host) A Love amphiploid. Plant Physiol 108: 1715-1724.

Colquhoun IJ. (2007) Use of NMR for metabolic profiling in plant systems J. Pestic. Sci. 200: 32.

Conn EE. (1980) Cyanogenic Compounds. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol 31: 433–451.

Cook D., Fowler S., Fiehn O., Thomashow MF. (2004) A prominent role for the CBFcold re sponse pathway in configuring the low temperature metabolome of *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 101: 15243–15248.

Corcuera LJ., Woodward MD., Helgeson JP., Kelman A., Upper CD. (1978) 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, an inhibitor from *Zea mays* with differential activity against soft rotting *Erwinia* species. Plant Physiol 61: 791–795.

Coruzzi GM. (2003) Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. In CRSomerville, EM Meyerowitz, eds, The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi: 10.1199/tab.0010.

Couée I., Sulmon C., Gouesbet G., El Amrani A. (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants.J Exp Bot. 57: 449-459

Cowan AK. (2006) Phospholipids as Plant Growth Regulators. Plant Growth Regul 48: 97-109

Cramer GR., Ergul A., Grimplet J., Tillett RL., Tattersall EA., Bohlman MC., Vincent D., Sonderegger J., Evans J., Osborne C., Quilici D., Schlauch KA., Schooley DA., Cushman JC. (2007) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. Funct Integr Genomics 7: 111–134

Csonka LN., Gelvin SB., Goodner BW., Orser CS., Siemieniak D., Slightom JL. (1988) Nucleotide sequence of a mutation in the proB gene of Escherichia coli that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress. Gene 64: 199–205

Csonka LN., Hanson AD. (1991) Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. Annu Rev Microbio 45: 569–606

Cyril J., Powell GL., Duncan RR., Waird WV. (2002) Changes in membrane polar lipid fatty acids of seashore paspalum in response to low temperature exposure. Crop Sci. 42: 2031–2037.

Dai H., Xiao C., Liu H., Hao F., Tang H. (2010a) Combined NMR and LC-DAD-MS analysis reveals comprehensive metabonomic variations for three phenotypiccultivars of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge. J Proteome Res 9: 1565-1578.

Dakhma WS., Zarrouk M., Cherif A. (1995) Effects of drought stress on lipids in rape leaves. Phytochemistry 40: 1383–1386.

De Ronde JA., Spreeth MH., Cress WA. (2000) Effect of antisense- 1 pyrroline-5carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. Plant Growth Regul 32: 13–26.

Degenkolbe T., Do PT., Kopka J., Zuther E., Hincha DK., Kohl KL. (2013) Identification of drought tolerance markers in a diverse population of rice cultivars by expression and metabolite profiling. PLoS ONE 6(5): 63637.

Delauney AJ., Hu C-A., Kavi Kishor PB., Verma DPS. (1993) Cloning of ornithine *d*aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by transcomplementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. J Biol Chem 268: 18673– 18678.

Delauney AJ., Verma DPS. (1990) A soybean gene encoding D1-pyrroline-5carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. Mol Gen Genet 221: 299–305.

Delauney AJ. and Verma DPS. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant J 4: 215-223

Deletang J. (1974) Presence de caffeoylputrescine, de caffeoylspermidine et de dicaffeoyl spermidine chez *Nicotiana tabacum*. Ann Tobacco 11: 124–130.

Demkura PV., Ballaré CL. (2012) UVR8 mediates UV-B-induced Arabidopsis defense responses against Botrytis cinerea by controlling sinapate accumulation. Mol Plant 5: 116–126.

Dettmer K., Aronov PA., Hammock BD. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrom. Rev. 26: 51–78.

Deuschle K., Funck D., Hellmann H., Däschner K., Binder S., Frommer WB. (2001) A nuclear gene encoding mitochondrial Delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. Plant J 27: 345–356

Di Falco S., Smale M., Perrings C. (2008) The Role of Agricultural Institutions in Sustaining Wheat Diversity and Productivity: The Case of Cooperatives in Southern Italy. Environ Resour Econ 39: 161-174.

Di Martino C., Pizzuto R., Pallotta ML., De Santis A., Passarella S. (2006) Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. Planta 223: 1123–1133.

Dionisio-Sese ML. and Tobita S. (1998) Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. Plant Sci 135: 1–9.

Dixon RA. and Paiva NL. (1995) Stress induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell 7: 1085–1097.

Dixon RA., Achnine L., Kota P., Liu CJ., Reddy MSS., Wang L. (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence a genomics perspective. Mol Plant Pathol 3: 371–390.

Dobra J., Motyka V., Dobrev P., Malbeck J., Prasil IT., Haisel D., Gaudinova A., Havlova M., Gubis J., Vankova R. (2010) Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content. J Plant Physiol 167: 1360-1370.

Doehlemann G., Wahl R., Horst RJ., Voll LM., Usadel B., Poree F. (2008) Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph Ustilago maydis. Plant J 56: 181–195.

Dorofeev VF., Filatenko AA., Migushova EF., Udaczin RA., Jakubziner MM. (1979) Wheat. vol. 1. In: Flora of Cultivated Plants (Dorofeev VF and Korovina ON, Eds.) Leningrad (St. Petersburg), Russia. Kolos (in Russian). 346 pp.

Douce R. and Joyard J. (1990) Biochemistry and function of the plastid envelope. Annu Rev Cell Biol 6: 173–216.

Dowgert MF., Steponkus PL. (1984) Behavior of the plasma membrane of isolated protoplasts during a freez-thaw cycle. Plant Physiol 75: 1139–1151.

Drennan PM., Smith MT., Goldsworthy D., van Staden J. (1993) The occurence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm Myrothamnus flabellifolius Welw. J Plant Physiol 142: 493–496.

Dubouzet JG., Ishihara A., Matsuda F., Miyagawa H., Iwata H., Wakasa K. (2007) Integrated metabolomic and transcriptomicanalyses of high-tryptophan rice expressing a mutant anthranilate synthase alpha subunit. J Exper Bot 58: 3309– 3321.

Dunn WB. (2008) Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. Phys Biol 5: 011001.

Edreva A., Yordanov I., Kardjieva R., Gesheva E. (1998) Heat shock responses of bean plants: involvement of free radicals, antioxidants and free radical/active oxygen scavenging systems. Biol Plant 41: 185–191.

Edreva AM., Velikova VB., Tsonev TD. (2007) Phenylamides in plants. Russian J. Plant Physiol 54: 287–301.

Epstein WW., Rowsemitt CN., Berger PJ., Negus NC. (1986) Dynamics of 6methoxybenzoxazolinone in winter wheat—Effects of photoperiod and temperature. J Chem Ecol 12: 2011–2020.

Equiza MA., Miravéa JP., Tognetti JA. (1997) Differential root versus shoot growth inhibition and its relationship with carbohydrate accumulation at low temperature in different wheat cultivars. Ann Bot 80: 657-663.

Equiza MA., Miravéa JP., Tognetti JA. (2001) Morphological, anatomical and physiological responses related to differential shoot root growth inhibition at low temperature in spring and winter wheat. Ann Bot 87: 67–76

Ercoli L., Mariotti M., Masoni A., Arduini I. (2004) Growth responses of sorghum plants to chilling temperature and duration of exposure. Eur J Agro 21: 93-103.

Essa TA. (2002) Effect of salinity stress on growth and nutrient composition of three soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars. J Agron Crop Sci 88: 86–93.

Eugster PJ., Guillarme D., Rudaz S., Veuthey JL., Carrupt PA., Wolfender JL. (2011) Ultra high pressure liquid chromatography for crude plant extract profiling. J AOAC Int 94: 51-70.

Evans PT. and Mamlberg RL. (1989) Do polyamines have roles in plant development? Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 40: 235-269.

Fabro G., Kovács I., Pavet V., Szabados L., Alvarez ME. (2004) Proline accumulation and *AtP5CS2* gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. Mol Plant–Microbe Interact 17: 343–350

Facchini PJ., Hagel J., Zulak KG. (2002) Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. Can J Botany 80: 577–589.

FAO (2009) High level expert forum – how to feed the world in 2050. Economic and Social Development Department, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome

FAO Stat (2009) World Wheat, Corn and Rice. Oklahoma State University

Feekes W. (1941) De Tarwe en haar milieu.Vers. XVII Tech. Tarwe Comm. Groningen 560-1

Fellenberg C., Milkowski C., Hause B., Lange PR., Böttcher C., Schmidt J., Vogt T. (2008) Tapetum-specific location of a cation dependent O-methyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 56: 132–145.

Fennell A., Li PH., Markhart AH. (1990) Influence of air and soil temperature on Water relations and freezing tolerance of spinach (*Spinacia oieracea*). Physiol Planterum 78: 85-56.

Fennell A. and Markhart AH. (1997) Rapid acclimation of root hydraulic conductivity at low temperature. J Exp Bot 49: 879-884.

Fernie AR. and Schauer N. (2009) Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement ? Trends Genet 25: 39–48.

Fiehn O. (2001) "Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks". Comp Funct Genomics 2 (3): 155–68.

Fiehn O. (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol 48: 155–171.

Fiehn O., Kloska K., Altmann T. (2001) Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. Curr Opin Biotechnol 12: 82–86.

Fisarakis I., Chartzoulakis K., Stavrakas D. (2001) Response of Sultana vines (*V. vinifera* L.) on six rootstocks to NaCl salinity exposure and recovery. Agric Water Manage 51: 13–27

Ford KL., Cassin A., Bacic A. (2011) Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. Frontiers Plant Sci 2: 44.

Forslund K., Jonsson L. (1997) Cyanogenic glycosides and their metabolicenzymes in barley, in relation to nitrogen levels. Physiol Plant 101: 367–372

Forslund K., Morant M., Jurgensen B., Olsen CE., Asamizu E., Sato S., Tabata S., Bak S., (2004) Biosynthesis of the nitrile glucosides rhodiocyanoside A and D and the cyanogenic glucosides lotaustralin and linamarin in *Lotus japonicus*. Plant Physiol 135: 71–84.

Fougere F., Le-Rudulier D., Streeter JG. (1991) Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Physiol 96: 1228-1236.

Fowler D.B. and Gusta LV. (1979) Selection for winterhardiness in wheat. Identification of genotypic variability. Crop Sci 19: 769-772.

Foyer CH. and Noctor G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, Physiol Plantarum 119: 355–364.

Francois LE. and Kleiman R. (1990) Salinity effects on vegetative growth, seed yield, and fatty acid composition of crambe. Agron J 82: 1110–1114.

Fraser CM., Thompson MG., Shirley AM., Ralph J., Schoenherr JA., Sinlapadech T. (2007) Related Arabidopsis serine carboxypeptidase-like sinapoylglucose acytransferases display distinct but overlapping substrate specificities. Plant Physiol 144: 1986–1999.

Frey M., Chomet P., Glawischnig E., Stettner C., Grun S., Winklmair A., Eisenreich W., Bacher A., Meeley RB., Briggs SP., Simcox K., Gierl A. (1997) Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. Science 277: 696–699.

Frey M., Huber K., Park WJ., Sicker D., Lindberg P., Meeley RB., Simmons CR., Yalpani N., Gierl A. (2003) A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis. Phytochemistry 62: 371–376.

Fujita T., Maggio A., Garcfa-Rfos M., Bressan RA., Csonka LN. (1998) Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. Plant Physiol 118: 661-674

Fuller RL., Dunn JH., Warmund MR., Bughara SS., Fresenburg BS. (1999) Low temperature tolerance and carbohydrate and nitrate content of zoysiagrass.1998 Turfgrass Res. Info. Rpt (Univ. Missouri Turfgrass Ctr, Columbia).

Fumagalli E., Baldoni E., Abbruscato P., Piffanell P., Genga A., Lamanna R., Consonni R. (2009) NMR techniques coupled with multivariate statistical analysis: tools to analyse *Oryza sativa* metabolic content under stress conditions. J Agron Crop Sci195: 77–88.

Funck D., Stadelhofer B., Koch W. (2008) Ornithine-a-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. BMC Plant Biol 8: 40.

Gagneul D., Aïnouche A., Duhazé C., Lugan R., Larher FR., Bouchereau A. (2007) A reassessment of the function of the socalled compatible solutes in the halophytic plumbaginaceae *Limonium latifolium*. Plant Physiol 144: 1598–1611.

Garbero M., Andrade A., Reinoso H., Ferna'ndez B., Cuesta C., Granda V., Escudero C., Abdala G., Pedranzani H. (2012) Differential effect of short-term cold stress on growth, anatomy, and hormone levels in cold-sensitive versus -resistant cultivars of *Digitaria eriantha*. Acta Physiol Plant 33: 497–507.

Garciadeblas B., Senn ME., Banuelos MA., Rodriquez-Navarro A. (2003) Sodium transport and HKT transporters: the rice model. Plant J 34: 788–801.

Garcion C. and Applimath JP. (2006) FiRe and microarrays: a fast answer to burning questions. Trends Plant Sci 11: 320–322.

Garg N. and Manchanda G. (2008) Salinity and its effects on the functional biology of legumes. Acta Physiol Plant 30: 595–618.

Gavaghan CL., Li JV., Hadfield ST., Hole S., Nicholson JK., Wilson ID., Howe PWA., Stanley PD., Holmes E. (2011) Application of NMR-based metabolomics to the investigation of salt stress in maize (*Zea mays*). Phytochem Analysis 22: 214-224.

Gaxiola RA., Rao R., Sherman A., Grisa WP., Alper S., Fink GR. (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxiWcation in yeast. P Natl Acad Sci USA 96: 1480–1485.

Geigenberger P., Reimholz R., Geiger M., Merlo L., Canale V., Stitt M. (1997) Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to shortterm water deficit. Planta 201: 502-518.

Geiger R., Aron RH., Todhunter P (2003) The Climate Near the Ground. Lanham, MD: Rowman & Littlefield Publishers.

Ghoulam C., Foursy A., Fares K. (2002) Effects of salt stress on growth inorgank ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. Environ Exp Bot 47: 39-50.

Gibon Y., Usadel B., Blaesing OE., Kamlage B., Hoehne M., Trethewey RN., Stitt M. (2006) Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes. Genome Biol 7: R76.1–R76.23.

Ginzberg I., Stein H., Kapulnik Y., Szabados L., Strizhov N., Schell J., Koncz C., Zilberstein A. (1998) Isolation and characterization of two different cDNAs of delta1pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. Plant Mol Biol 38: 755–764

Glauser G., Boccard J., Wolfender JL., Rudaz S. (2013) Metabolomics: application in plant sciences, in Wiley-VCH book project "Metabolomics in Practice" eds

Laemmerhofer M., Weckwerth W., editors. (Weinheim: Wiley VCH Verlag GmbH & Co).

Glauser G., Veyrat N., Rochat B., Wolfender JL., Turlings TCJ. (2013) Ultra-high pressure liquid chromatography–mass spectrometry for plant metabolomics: A systematic comparison of high-resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers J Chromatography A 1292: 151–159.

Glenn AE., Hinton DM., Yates IE., Bacon CW. (2001) Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. Appl Environ Microbiol 67: 2973–2981.

Glenn EP., Brown JJ., Blumwald E. (1999) Salt tolerance and crop potential of halophytes. Crit Rev Plant Sci 18: 227-255.

Gong Q., Li P., Ma S., Rupassara SI., Bohnert H. (2005) Salinity stress adaptation competence in the exptremophile Thellungiella halophila incomparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 44: 826–839.

Gorham J., Wyn Jones RG., McDonell R. (1999) Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. Plant Soil 8915-40.

Gothandam KM., Nalini E., Karthikeyan S., Shin JS. (2010) OsPRP3, a flower specific proline-rich protein of rice, determines extracellular matrix structure of floral organs and its overexpression confers cold-tolerance. Plant Mol Biol 72: 125–135.

Graham LE., Graham JM., Wilcox LW. (2003) Four types of primary compounds are the molecules of life. Plant Biology. Pearson Education New Jersey 55–59.

Grallath S., Weimar T., Meyer A., Gumy C., Suter-Grotemeyer M., Neuhaus JM., Rentsch D. (2005) The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns. Plant Physiol 137: 117–126.

Gueta-Dahan Y., Yaniv Z., Zilinskas BA., Ben-Hayyim G. (1997) Salt and oxidative stress: similar and speci fi c responses and their relation to salt tolerance in citrus. Planta 204: 460–469.

Gunnaiah R., Kushalappa AC., Duggavathi R., Fox S., Somers DJ. (2012) Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against Fusarium graminearum. PLoS ONE 7: e40695.

Guo Z., Ou W., Lu S., Zhong Q. (2006) Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Plant Physiol Biochem. 44: 828-3.

Gupta AK. and Kaur N. (2005) Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. J Bioscience 30: 761-776.

Gusta LV., Wisniewski M., Nesbitt NT., Gusta ML (2004). The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. Plant Physiol 135: 1642–1653.

Guy C., Kaplan F, Kopka J., Selbig J., Hincha DK (2008) Metabolomics of temperature stress. Physiol Plant 132: 220–235.

Guy CL. (2003) Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. Can J Bot 81: 1216–1223.

Habash DZ., Kehe Z., Nachit M. (2009) Genomic approaches for designing durum wheat ready for climate change with a focus on drought. J Exp Bot 60: 2805-2815

Hamzehzarghani H., Kushalappa AC., Dion Y., Rioux S., Comeau A., Yaylayan V., (2005) Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against fusarium head blight. Physiol Mol Plant Pathol 66: 119–133.

Hancock JF. (2004) Plant Evolution and the Origin of Crop Species. CABI Publishing.

Handa S., Bressan RA., Handa AK., Carpita NC., Hasegawa PM. (1983) Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant-cells adapted to water-stress. Plant Physiol 73: 834-843.

Hannah MA., Wiese D., Freund S., Fiehn O., Heyer AG., Hincha DK. (2006) Natural genetic variation of freezing tolerance in Arabidopsis. Plant Physiol 142: 98–112.

Hanson AD. and Hitz WD. (1982) Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. Ann Rev Plant Physiol 33: 163–203.

Harb A., Krishnan A., Ambavaram MM., Pereira A. (2010) Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. Plant Physiol 154: 1254-1271.

Hare P. and Cress W. (1997) Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regul 21: 79–102.

Hasanuzzaman M., Hossain MA., Fujita M. (2011a) Nitric oxide modulates antioxidant defense and the methylglyoxal detoxi fi cation system and reduces salinity-induced damage of wheat seedlings. Plant Biotechnol Rep 5: 353–365.

Hasanuzzaman M., Hossain MA., Fujita M. (2011b) Selenium-induced up-regulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxi fi cation system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings. Biol Trace Elem Res 143: 1704–1721.

Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M. (2013) Plant Response to Salt Stress and Role of Exogenous Protectants to Mitigate Salt-Induced Damages. In: Ahmad et al. (eds.), Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress, Springer Science+Business Media, LLC 2013.

Hasegawa P., Bressan RA., Zhu JK., Bohnert HJ. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 51: 463–499.

Hashimoto Y. and Shudo K. (1996) Chemistry of biologically active benzoxazinoids. Phytochemistry 43: 551–559.

Haudecoeur E., Planamente S., Cirou A., Tannières M., Shelp BJ., Moréra S., FaureD. (2009) Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing inAgrobacterium tumefaciens. P Natl Acad Sci U.S.A. 106: 14587–14592.

Hendrickson L., Vlckova A., Selstam E., Huner N., Oquist G., Hurry V. (2006) Cold acclimation of the Arabidopsis dgd1 mutant results in recovery from photosystem I-limited photosynthesis. FEBS Letters 580: 4959–4968.

Hendry GAF. (1993) Evolutionary origins and natural functions of fructans: a climatological, biogeography and mechanistic appraisal. New Phytol 123: 3–14.

Hervieu F., Le Dily L., Huault C., Billard J-P. (1995) Contribution of ornithine aminotransferase to proline accumulation in NaCl-treated radish cotyledons. Plant Cell Environ 18: 205–210.

Heuer B. (2003) Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. Plant Sci165: 693–699.

Hichri I., Barrieu F., Bogs J., Kappel C., Delrot S., Lauvergeat V. (2011) Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. J Exp Bot 62: 2465–2483.

Hien DT., Jacobs M., Angenon G., Hermans C., Thu T., van Son L., Roosens NH. (2003) Proline accumulation and Δ 1-pyrroline-5- carboxylate synthetase gene

properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. Plant Sci 165: 1059–1068.

Hill CB., Taylor JD., Edwards J., Mather D., Bacic A., Langridge P., Roessner U. (2013) Whole-Genome Mapping of Agronomic and Metabolic Traits to Identify Novel Quantitative Trait Loci in Bread Wheat Grown in a Water-Limited Environment. Plant Physiol 162: 1266–1281.

Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B. (2003) Origins of root-induced pH changes in the rhizosphere and 494 their responses to environmental constraints: a review. Plant Soil 248: 43-59.

Hmida-Sayari A., Gargouri-Bouzid R., Bidani A., Jaoua L., Savoure A., Jaoua S. (2005) Overexpression of Δ_1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. Plant Sc. 169: 746–752.

Hoekstra FA., Golovina EA., Buitink J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends Plant Sci 6: 431–438.

Holmes DS., Quigley M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem 114: 193–197.

Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z., Verma DPS. (2000) Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physio. 122: 1129–1136.

Hu CAA., Delauney AJ., Verma DPS. (1992) A bifunctional enzyme (D1-pyrroline-5carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. P Natl Acad Sci USA 89: 9354–9358.

Hua X-J., Van De Cotte B., Van Montagu M., Verbruggen N. (1997) Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. Plant Physiol 114: 1215–1224.

Huang C., He W., Guo J., Chang X., Su P., Zhang L. (2005) Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-defficient *Arabidopsis* mutant. J Exp Bot 56: 3041–3049.

Huang Z., Zhao L., Chen D., Liang M., Liu Z., Shao H., Long X. (2013) Salt Stress Encourages Proline Accumulation by Regulating Proline Biosynthesis and Degradation in Jerusalem Artichoke Plantlets. PLoS ONE 8(4): e62085. Hur J., Jung KH., Lee CH., An GH. (2004) Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. Plant Sci 167: 417–426

Hussain SS., Ali M., Ahmad M., Siddique KHM. (2011) Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. Biotechnol Adv 29: 300–311.

Ibrar M., Jabeen M., Tabassum J., Hussain F., Ilahi I. (2003) Salt tolerance potential of *Brassica juncea* Linn. J Sci Tech Univ Peshawar 27: 79–84.

Igarashi Y., Yoshiba Y., Sanada Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Wada K., Shinozaki K. (1997) Characterization of the gene for delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. Plant Mol Biol 33: 857–865.

Ingram J. and Bartels D. (1996) The molecular basis of degradation tolernace in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol47: 377-403.

Irar S., Brini F., Goday A., Masmoudi K., Pag`es M. (2010) Proteomic analysis of wheat embryos with 2-DE and liquid-phase chromatography (Proteome Lab PF-2D)—a wider perspective of the proteome. J Proteomics 73: 1707–1721.

Ivanov AG., Hendrickson L., Krol M., Selstam E., Oquist G., Hurry V., Huner NPA. (2006) Digalactosyl-diacylglycerol deficiency impairs the capacity for photosynthetic intersystem electron transport and state transitions in *Arabidopsis thaliana* due to photosytem I acceptor-side limitations. Plant Cell Physiol 47: 1146–1157.

Jabeen M., Ibrar M., Azim F., Hussain F., Ilahi I. (2003) The effect of sodium chloride salinity on germination and productivity of Mung bean (*Vigna mungo* Linn.). J Sci Tech Univ Peshawar 27: 1–5

Jarvis P., Do["]rmann P., Peto CA., Lutes J., Benning C., Chory J. (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. P Natl Acad Sci USA 97: 8175–8179.

Jenrich R., Trompetter I., Bak S., Olsen CE., Muller BL., Piotrowski M. (2007) Evolution of heteromeric nitrilase complexes in Poaceae with new functions in nitrile metabolism. P Natl Acad Sci USA 104: 18848–18853.

Jeong MJ., Choi BS., Bae DW., Shin SC., Park SU., Lim HS., Kim J., Kim JB., Cho BK., Bae H. (2012) Differential expression of kenaf phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) ortholog during evelopmental stages and in response to abiotic stresses. POJ 5(4): 392-399.

Jiang L., Duan L., Tian X., Wang B., Zhang H., Li Z. (2006) NaCl salinity stress decreased Bacillus thuringiensis (Bt) protein content of transgenic Bt cotton (*Gossypium hirsutum L.*) seedlings. Environ Exp Bot 55: 315–320.

Jin A., Yoshida (2000) Antifungal compound, feruloylagmatine, induced in winter wheat exposed to a low temperature. Biosci Biotechnol Biochem 64: 1614-1617.

Jin H., Cominelli E., Bailey P., Parr A., Mehrtens F., Jones J., Tonelli C., Weisshaar B., Martin C. (2000) Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. EMBO J 19: 6150–6161.

Jin S., Yoshid M., Nakajima A., Murai A. (2003) Accumulation of Hydroxycinnamic Acid Amides in Winter Wheat under Snow. Biosci Biotech Bioch 67: 1245-1249.

Johnson HE., Broadhurst D., Goodacre R., Smith AR. (2003) Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. Phytochemistry 62: 919–928.

Jonczyk R., Schmidt H., Osterrieder A., Fiesselmann A., Schullehner K., Haslbeck M., Sicker D., Hofmann D., Yalpani N., Simmons C., Frey M., Gierl A. (2008) Elucidation of the final reactions of DIMBOA-glucoside biosynthesis in maize: Characterization of Bx6 and Bx7. Plant Physiol 146: 1053–1063.

Jones OAH., Maguire ML., Griffin JL., Jung YH., Shibato J., Jwa NS. (2011) Using metabolic profiling to assess plant–pathogen interactions: an example using rice (*Oryza sativa*) and the blast pathogen Magnaporthe grisea. Eur J Plant Pathol 129: 539–554.

Kalamaki MS., Alexandrou D., Lazari D., Merkouropoulos G., Fotopoulos V., Pateraki I., (2009) Overexpression of a tomato N-acetyl-L-glutamate synthase gene (*SINAGS1*) in *Arabidopsis thaliana* results in high ornithine levels and increased tolerance in salt and drought stresses. J Exp Bot 60: 1859–1871.

Kamata T. and Uemura M. (2004) Solute accumulation in wheat seedlings during cold acclimation: contribution to freezing tolerance. Cryo Letters 25: 311–322.

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: 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. Kaplan F. and Guy CL. (2004) Beta-amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. Plant Physiol 135: 1674-1684.

Karnok KJ. and Beard JB. (1983) Effects of gibberellic acid on the CO₂ exchange rates of bermudagrass and St. Augustinegrass when exposed to chilling temperature Crop Sci 23: 514–517.

Kaur G., Kumar S., Nayyar H., Upadhyaya HD. (2008) Cold stress injury during the pod- fi lling phase in chickpea (*Cicer arietinum* L.): effects on quantitative and qualitative components of seeds. J Agron Crop Sci 194: 457–464.

Kavi Kishor PB., Sangam S., Amrutha RN., Sri-Laxmi P., Naidu KR., Rao KRSS., Rao S., Reddy KJ., Theriappan P., Sreenivasulu N. (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Curr Sci 88: 424–438.

Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D., Bohnert HJ. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. Plant Cell 13: 889-905.

Keurentjes JJB. (2009) Genetical metabolomics: closing in on phenotypes. Curr Opin Plant Biol 12: 223–230.

Khan MA. and Weber DJ. (2008) Ecophysiology of high salinity tolerant plants (tasks for vegetation science) 1st edn. Springer, Amsterdam.

Khodarahmpour Z., Ifar M., Motamedi M. (2012) Effects of NaCl salinity on maize (*Zea mays* L.) at germination and early seedling stage. Afr J Biotechnol 11: 298–304.

Kim HK., Choi YH., Verpoorte R. (2011) NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? Trends Biotechnol 29: 267.

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.

Kingsbury R., Epstein E., Pearcy R. (1984) Physiological responses to salinity in selectedlines of wheat. Plant Physiol 74: 417-423.

Kinnunen PK. (2000) Lipid bilayers as osmotic response elements. Cell Physiol Biochem 10: 243–250.

Klapheck S. (1983) Polyamines and cinnamoyl-putrescines in normal and sulfurstarved suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. Z Pflanzenphysiol 112: 275–279.

197

Kleffmann T., Russenberger D., von Zychlinski A., Christopher W., Sjolander K., Gruissem W., Baginsky S. (2004) The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. Curr Biol 14: 354–62.

Klotke J., Kopka J., Gatzke N., Heyer AG. (2004) Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation—evidence for a role of raynose in cold acclimation. Plant, Cell Environ 27: 1395–1404.

Klun JA. and Robinson JF. (1969) Concentration of two 1,4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to resistance of the host plant to the European corn borer. J EconEntomol 62: 214–220.

Konig S., Mosblech A., Heilmann I. (2007) Stress-inducible and constitutive phosphoinositide pools have distinctive fatty acid patterns in *Arabidopsis thaliana* Faseb J 21: 1958.

Koch K. (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. Curr Opin Plant Biol 7: 235-246.

Kodama H., Horiguchi G., Nishiuchi T., Nishimura M., Iba K. (1995) Fatty acid Desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. Plant Physiol 107: 1177–1185.

Kohl DH., Schubert KR., Carter MB., Hagedorn CH., Shearer G. (1988) Proline metabolism in N2-fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis. P Natl Acad Sci U.S.A. 85: 2036–2040.

Koike M., Okamoto T., Tsuda S., Imai R. (2002) A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. Biochem Biophys Res Commun 298: 46–532.

Komatsu S., Yang G., Khan M., Onodera H., Toki S., Yamaguchi M. (2007) Overexpression of calcium-dependent protein kinase 13 and calreticulin interacting protein 1 confers cold tolerance on rice plants. Mol Genet Genomics 227: 713–723.

Korbie DJ. and Mattick JS. (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nat Protoc 3: 1452-1456.

Korkina LG. (2007) Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. Cell Mol Biol 53: 15–25.

Korn M., Gärtner T., Erban A., Kopka J., Selbig J., Hincha DK. (2010) Predicting Arabidopsis freezing tolerance and heterosis in freezing tolerance from metabolite composition. Mol Plant 3: 224–235.

Korn M., Peterek S., Mock HP., Heyer AG., Hincha DK. (2008) Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between *Arabidopsis thaliana* accessions of widely varying freezing tolerance. Plant, Cell Environ31: 813–827.

Korner CH., Larcher W. (1988) Plant life in cold climates. In: Long S.P. and Woodward, F.L. (Eds) Plant and temperature.Symposia of the Society for Experimental Biology, Cambridge: The Company of the Biologist Limited.

Kramer PJ. (1983) Water relations of plants. New York. Academic Press

Krasensky J. and Jonak C. (2012) Drought salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangement and regulatory net works. J Exp Bot 4: 1593-1608.

Kriechbaumer V., Park WJ., Piotrowski M., Meeley RB., Gierl A., Glawischnig E. (2007) Maize nitrilases have a dual role in auxin homeostasis and bcyanoalanine hydrolysis. J Exp Bot 58: 4373–4386.

Krugman T., Peleg Z., Quansah L. (2011) Alteration in expression of hormonerelated genes in wild emmer wheat roots associated with drought adaptation mechanisms. Funct Integr Genomics 11: 565–583.

Kumar A., Taylor M., Triburcio A.F (1997) Recent advances in polyamine research. Trends Plant Sci 2: 124–130.

Kumar SG., Reddy AM., Sudhakar C. (2003) NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. Plant Sci 165: 1245-1251.

Kumaraswamy KG., Kushalappa AC., Choo TM., Dion Y., Rioux S. (2011) Mass spectrometry based metabolomics to identify potential biomarkers for resistance in barley against fusarium head blight (*Fusarium graminearum*). J Chem Ecol 37: 846–856.

Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. Planta 228: 367-381.

Lambers H. and Chapin FS., Pons TL. (1998) Plant physiological ecology. New York: Springer-Verlag.

Landry LG., Chapple CCS., Last R. (1995) Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. Plant Physiol 109: 1159–1166.

Large EC. (1954) Growth stages in cereals illustration of the feekes scale Plant Pathol 3: 128–129.

LaRosa PC., Rhodes D., Rhodes JC., Bressan RA., Csonka LN. (1991) Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered D1-pyrroline-5-carboxylate reductase. Plant Physiol 96: 245–250.

Less H. and Galili G. (2008) Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses. Plant Physiol 147: 316–330.

Levitt J. (1972) Responses of Plants to Environmental Stresses. New York: Academic Press.

Levitt J. (1980) Responses of plants to environmental stresses. vol. I. Chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic, New York 101-107.

Li W., Wang R., Li M., Li L., Wang C., Welti R., Wang X. (2008) Differential Degradation of Extraplastidic and Plastidic Lipids during Freezing and Post-freezing Recovery in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 283: 461–468.

Lim P., Woo HR., Nam HG. (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. Trends Plant Sci 8: 272–278.

Lin LJ., Tai SS., Peng CC., Tzen JT. (2002) Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies. Plant Physiol 128: 1200-1211.

Liu J. and Zhu JK. (1997) Proline accumulation and salt-stress induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of Arabidopsis. Plant Physiol 114: 591–596.

Liu J. and Zhu JK. (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance, Science 280: 1943–1945.

Long SP. (1983) C4 photosynthesis at low temperatures Plant Cell Environ 6: 345–363

López-Bucio J., Nieto-Jacobo MF., Ramírez-Rodríguez V., Herrera-Estrella L. (2000) Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. Plant Sci 160: 1–13. Lu H., Liu XG., Xu J., Dong FS., Zhang CP., Tian YY., Zheng YQ. (2012) Enhanced Exudation of DIMBOA and MBOA by Wheat Seedlings Alone and in Proximity to Wild Oat (*Avena fatua*) and Flixweed (*Descurainia sophia*) Weed Sci 60: 360-365.

Lu Y., Lam H., Pi E., Zhan Q., Tsai S., Wang C., Kwan Y., Ngai S. (2013) Comparative Metabolomics in *Glycine max* and *Glycine soja* under Salt Stress To Reveal the Phenotypes of Their Offspring. J Agric Food Chem 61: 8711–8721.

Lugan R., Niogret MF., Leport L., Guegan JP., Larher FR., Savoure A., Kopka J., Bouchereau A. (2010) Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. Plant J 64: 215-229.

Luo J, Fuell C, Parr A, Hil L, Bailey P, Elliott K, Fairhurst SA, Martin C and Michael AJ (2009) A novel polyamine acyltransferase responsi- ble for the accumulation of spermidine conjugates in *Arabidopsis* seed. Plant Cell 21: 318–333.

Lutts S., Majerus V., Kinet JM. (1999) NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa L.*) seedlings. Physiol Plantarum 105: 450–458.

Lutts S., Kinet JM., Bouharmont J. (1996) Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa L.*) cultivars differing in salinity tolerance. J Plant Grow Regul 19: 207-218.

Lv WT., Lin B., Zhang M., Hua XJ. (2011) Proline accumulation is inhibitory to *Arabidopsis* seedlings during heat stress. Plant Physiol 156: 1921-1933.

Maas EV. and Hoffman GJ. (1977) Crop salt tolerance current assessment. J Irrig & Drain Div Asce 103: 115-134.

Maas EV. (1993) Salinity in citriculture. Tree Physiol 12: 195-216.

Madan S., Nainawatee HS., Jain RK., Chowdhury JB. (1995) Proline and proline metabolising enzymes in in-vitro selected NaCI-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. Ann Bot 76: 51–57.

Maffei ME., Mithofer A., Boland W. (2007) Before gene expression: early events in plant–insect interaction. Trends Plant Sci 12: 310–316.

Mahajan S. and Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. Arch Biochem Biophys 444: 139–158.

Mailloux RJ., Lemire J., Kalyuzhnyi S., Appanna V. (2008) A novel metabolic network leads to enhanced citrate biogenesis in *Pseudomonas* fluorescens exposed to aluminum toxicity. Extremophiles 12: 451–459.

Mansour MMF., van Hasselt PR., Kuipe PJ. (1994) Plasma membrane lipid alterations induced by NaCl in winter wheat roots. Physiol Plant 92: 473–478.

Manuwoto S. and Scriber JM. (1986) Effects of hydrolyzable and condensed tannin on growth and development of two species of polyphagous lepidoptera: *Spodoptera eridania* and *Callosamia promethea*. Oecologia 69: 225–230.

Marschner H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic Press, London. p 889.

Martens DA. and Fankenberger WTJr. (1994) Assimilation of exogenous 2' - 14C - 1000 indole -3 -acetic acid and 3' - 14C tryptophan exposed to the roots of three wheat varieties. Plant Soil 166: 281–90.

Marti G., Erb M., Boccard J., Glauser G., Doyen GR., Villard N., Robert CA., Turlings TC., Rudaz S., Wolfender JL. (2013) Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. Plant, cell Environ 36: 621-639.

Martin RC., Glover-Cutter K., Baldwin JC., Dombrowski JE. (2012) Identification and characterization of a salt stress-inducible zinc finger protein from *Festuca arundinacea*. BMC Research Notes 5: 66.

Martindale W. and Leegood RC. (1997) Acclimation of photosynthesis to low temperature in *Spinacia oleracea* L. II. Effects of nitrogen supply J Exp Bot 48: 481–487.

Martin-Tanguy J. (1985) The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amines in plants. Plant Growth Regul 3: 381–399.

Martin-Tanguy J. (1997) Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches, Physiol Plant 100: 675-688.

Maruyama K., Takeda M., Kidokoro S., Yamada K., Sakuma Y., Urano K., Fujita M., Yoshiwara K., Matsukura S., Morishita Y., Sasaki R., Suzuki H., Saito K., Shibata D., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2009) Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. Plant Physiol 150: 1972–1980.

Mass EV. (1986) Salt tolerance of plant. Appl Agric Res 1: 12-26.

Matos MC., Campos PS., Ramalho JC., Medeira MC., Maia MI., Semedo JM., Marques A., Matos NM. (2002) Photosynthetic activity and cellular integrity of the Andean legume *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi under heat and water stress. Photosynthetica 40: 493–501.

Matsuno M., Compagnon V., Schoch G., Schmitt M., Debayle D., Bassard JE., Pollet B., Hehn A., Heintz D., Ullmann P., Lapierre C., Bernier F., Ehlting J., Werck-Reichhart D. (2009) Retroposition and positive selection led to evolution of a novel phenolic pathway for pollen development. Science 225: 1688–1692.

Mattana M., Biazzia E., Consonnib R., Locatellia F., Vanninic C., Proverad I., Coraggioa I (2005) Overexpression of Osmyb4 enhances compatible solute accumulation and increases stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. Physiol Plantarum 125: 212–223.

Mattioli R., Marchese D., D'Angeli S., Altamura MM., Costantino P., Trovato M. (2008) Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. Plant Mol Biol 66: 277–288.

Mattioni C., Lacerenza NG., Troccoli A., De Leonardis AM., Di Fonzo N. (1997) Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. Physiol Plant 101: 787–792.

McCue KF. and Hanson AD. (1990) Drought and salt tolerance: towards understanding and application. Biotechnology 8: 358–362.

McKersie BD. and Leshem YY. (1994) 'Chilling Stress. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Meihls CWLN., Handrick V., Glauser G., Barbier H., Kaur H., Haribal MM., Lipka AE., Gershenzon J., Buckler ES., Erb M., Köllner TG., Jandera G. (2013) Natural Variation in Maize Aphid Resistance Is Associated with 2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-One Glucoside Methyltransferase Activity. Plant Cell 25: 2341– 2355

Melanson D., Chilton MD., Masters-Moore D., Chilton WS. (1997) A deletion in an indole synthase gene is responsible for the DIMBOA-deficient phenotype of bxbx maize .P Natl Acad Sci USA. 94: 13345–13350.

Meloni DA., Oliva MA., Ruiz HA., Martinez CA. (2001) Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. J Plant Nutr 24: 599-612.

Meneguzzo S., Navari-Izzo F., Izzo R. (2000) NaCl effects on water relations and accumulation of mineral nutrients in shoots, roots and cell sap of wheat seedlings. J. Plant Physiol 155: 274–280.

Meurer B., Wiermann R., Strack D. (1988) Phenylpropanoid pattern in Fagales pollen and their phylogenetic relevance. Phytochemistry 27: 803–828.

Miège C., Maréchal E., Shimojima M., Awai K., Block MA., Ohta H., Takamiya K., Douce R., Joyard J. (1999) Biochemical and topological properties of type A MGD, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. Eur J Biochem 265: 1–13.

Mikami K. and Murata N. (2003) Membrane fluidity and the perception of environmental signals in cyanobacteria and plants. Prog. Lipid Res. 42: 527–543.

Milkowski C., Baumert A., Schmidt D., Nehlin L., Strack D (2004) Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. Plant J 38: 80–92.

Miller G., Honig A., Stein H., Suzuki N., Mittler R., Zilberstein A. (2009) Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylateproline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. J Biol Chem 284: 26482–26492.

Misra N. and Gupta AK. (2005) Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. Plant Sci 169: 331–339.

Misra N., Gupta AK., Dwivedi UN. (2006) Changes in Free Amino Acids and Stress Protein Synthesis in Two Genotypes of Green Gram under Salt Stress. J Plant Sci 1: 56-66.

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci 9: 490–498.

Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci 7: 405–410.

Mittova V., Guy M., Tal M., Volokita M. (2004) Salinity upregulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii* .J Exp Bot 55: 1105–1113.

Molinari HBC., Marur CJ., Filho JCB., Kobayashi AK., Pileggi M., Júnior RPL., Pereira LFP., Vieira LGE. (2004) Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis Osb.* × *Poncirus trifoliata L. Raf.*) overproducing proline. Plant Sci 167: 1375–1381.

Møller BL. and Seigler DS. (1999) Plant Amino Acids, Biochemistry and Biotechnology. In BK Singh, ed, Marcel Dekker, New York 563–609.

Monroy A.F, Dryanova A., Malette B., Oren DH., Farajalla MR., Liu W., Danyluk J., Ubayasena LWC., Kane K., Scoles GJ., Sarhan F., Gulick PJ. (2007) Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat. Plant Mol Biol 64: 409–423.

Morant AV., Jurgensen K., Jurgensen B., Dam W., Olsen CE., Muller BL., Bak S. (2007) Lessons learned from metabolic engineering of cyanogenic glucosides. Metabolomics 3: 383–398.

Morant M., Bak S., Muller BL., Werck-Reichhart D. (2003) Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. Curr Opin Biotechnol 14: 151–162.

Morsy MR., Jouve L., Hausman JF., Hoffmann L., Stewart JM. (2007) Alteration of oxidative and carbohydratemetabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa L.*) genotypes contrasting in chilling tolerance. J Plant Physiol 164: 157–167.

Mulholland BJ., Taylor IB., Jackson AC., Thompson AJ. (2003) Can ABA mediate responses of salinity stressed tomato. Environ exp Bot 50: 17–28.

Munns R. (2002a) Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ 25: 239–250.

Munns R. (2002b) Salinity, growth and phytohormones. In: Lauchli A, Luttge U (eds) Salinity: environment – plants – molecules. Kluwer, The Netherlands, 271–290.

Munns R. (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. New Phytol 167: 645–663.

Munns R., James RA., Lauchli A. (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. J Exp Bot 57: 1025-1043.

Munns R. and Tester M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annu Rev Plant Biol 59: 651–681.

Munns R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress, Plant Cell Environ 25: 239-250.

Murahama M., Yoshida T., Hayashi F., Ichino T., Sanada Y., Wada K. (2001) Purification and characterization of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase isoenzymes, indicating differential distribution in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. Plant Cell Physiol 42: 742–750.

Muroi A., Ishihara A., Tanaka C., Ishizuka A., Takabayashi J., Miyoshi H., Nishioka T. (2009) Accumalation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatinecoumaroyl transferasein *Arabidopsis thaliana*. Planta 230: 517–527.

Mutlu F. and Buzcuk S. (2007) Salinity induced changes of free and bound polyamine levels in Sun flower (*Helianthus annuus* L.) roots differing in salt tolerance. Pak J Bot 39: 1097–1102.

Nachit MM. (1998) Durum breeding research to improve dry-land productivity in the Mediterranean region. In: Rao SC. Ryan J. et al. *eds.* SEWANA durum research network. ICARDA editions, 1–15.

Nakashima K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2006) Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. Physiol Plantarum 126: 62–67.

Naoumkina MA., Zhao Q., Galleco-Giraldo L., Dai X., Zhao PX., Dixon RA. (2010) Genome-wide analysis of phenylpropanoid defense pathways. Mol Plant Pathol 11: 829–846.

Nayyar H. and Chander S. (2004) Protective effects of polyamines against oxidative stress induced by water and cold stress in chickpea. J Agron Crop Sci 190: 355–365.

Nguyen-Quoc B. and Foyer CH. (2001) A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. J Exp Bot 52: 881-889.

Niemeyer HM. (1988) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defense chemicals in the Gramineae. Phytochemistry 27: 3349–3358.

Nounjan N., Nighia PT., Theerakulpisut P. (2012) Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. J Plant Physiol 169: 596-604.

Nunes-Nesi A., Carrari F., Lytovchenko A., Smith AM., Loureiro ME., Ratcliffe RG., Sweetlove LJ., Fernie AR. (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. Plant Physiol 137: 611–622.

Nunes-Nesi A., Sulpice R., Gibon Y., Fernie AR. (2008) The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. J Exp Bot 59: 1675-1684.

Obata T. and Fernie AR. (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. Cell Mol Life Sci 69: 3225-3243.

Ohlrogge J. and Browse J. (1995) Lipid biosynthesis. Plant Cell 7: 957-970.

Olsson M. (1995) Alteration in lipid composition, lipid peroxidation and anti-oxidative protection during senescence in drought stressed plants of *Pisum sativum*. Plant Physiol Biochem 33: 547–553.

Palmieri L., Todd CD., Arrigoni R., Hoyos ME., Santoro A., Polacco JC., Palmieri F. (2006) Arabidopsis mitochondria have two basic amino acid transporters with partially overlapping specificities and differential expression in seedling development. Biochim. Biophys. Acta 1757: 1277–1283.

Parida AK. and Das AB. (2005) Salt tolerance and salinity effect on plants: a review. Ecotoxicol Environ Saf 60: 324–349.

Pastori GM. and Foyer CH. (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "Redox" and abscisic acid-mediated controls. Plant Physiol 129: 460–468.

Patade VY., Khatri D., Kumari M., Grover A., Gupta SM. Ahmed Z. (2013) Cold tolerance in Osmotin transgenic tomato (*Solanum lycopersicum L.*) is associated with modulation in transcript abundance of stress responsive genes. SpringerPlus 2: 117.

Patade VY., Khatri D., Manoj K., Kumari M., Ahmed Z. (2012) Cold tolerance in thiourea primed capsicum seedlings is associated with transcript regulation of stress responsive genes. Mol Biol Rep 39: 10603–10613.

Patton AJ., Cunningham SM., Volenec JJ., Reicher ZJ. (2007) Differences in freeze tolerance of zoysiagrasses: II. Carbohydrate and proline accumulation Crop Sci 47: 2170–2181.

Pedersen JF., Vogel KP., Funnell DL. (2005) Impact of reduced lignin on plant fitness, Crop Sci 45: 812–819.

Pical C., Westergren T., Dove SK., Larsson C., Sommarin M. (1999) Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in Arabidopsis *thaliana* cells. J Biol Chem 274: 38232–38240.

Pitman MG. and Lauchli A. (2002) Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: Lauchli A, Luttge U (eds) Salinity: environment – plants – molecules. Kluwer, Dordrecht, p 3–20.

Pollock CJ. and Eagles CF. (1988) Low temperature and the growth of plants. In: Plants and temperature. Long, S.P. & Woodward, F.I., eds, The Company of Biologists Ltd, Cambridge. p 157-180.

Poulton JE. (1990) Cyanogenesis in Plants. Plant Physiol 94: 401–405.

Qu LJ., Wu LQ., Fan ZM., Guo L., Li YQ., Chen ZL. (2005) Overexpression of the bacterial nhaA gene in rice enhances salt and drought tolerance. Plant Sci 168: 297–302.

Quintero FJ., Ohta M., Shi H., Zhu JK., Pardo JM. (2002) Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na+ homeostasis. P Natl Acad Sci USA 99: 9061–9066.

Radwanski ER. and Last RL. (1995) Tryptophan biosynthesisand metabolism: Biochemical and molecular genetics. Plant Cell 7: 921–934.

Rajam MV. (1997) Polyamines. Plant ecophysiology. In: Prasad MNV (ed) Wiley, New York, p 343–374.

Ramaih S., Guedira M., Paulsen GM. (2003) Relationship of indoleacetic acid and tryptophan dormancy and preharvest sprouting of wheat. Funct Plant Biol 30: 939–45.

Ramakers C., Ruijter JM., Deprez RH., Moorman AF. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci Lett 339: 62–66.

Ramankutty N., Evan AT., Monfreda C., Foley JA. (2008) Farming the planet: 1.Geographic distribution of global agricultural lands in the year 2000. Global Biogeochem. Cycles 22, GB 1003.

Rampino P., Mita G., Fasano P. (2012) Novel durum wheat genes up-regulated in response to a combination of heat and drought stress, Plant Physiol Bioch 56: 72–78.

Rayapati PJ. and Stewart CR. (1991) Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays L.*) mitochondria. Plant Physiol 95: 787–791.

Rayapati PJ., Stewart CR., Hack E. (1989) Pyrroline-5-carboxylate reductase is in pea (*Pisum sativum L.*) leaf chloroplasts. Plant Physiol 91: 581–586.

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.

Repellin A., Pham Thi AT., Tashakorie A., Sahsah Y., Daniel C., Zuily-Fodil Y. (1997) Leaf membrane lipids and drought tolerance in young coconut palms (*Cocos nucifera L*.). Eur J Agron 6: 25–33.

Rhodes D., Pich PJ., Brunk DG., Ju GC., Rhodes JC., Pauly MH., Hansen LA. (1989) Development of two isogenic sweet corn hybrids differing for glycine betaine content. Plant Physiol 91: 112-1121.

Ribarits A., Abdullaev A., Tashpulatov A., Richter A., Heberle-Bors E., Touraev A. (2007) Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development. Planta 225: 1313–1324.

Richardson MD. and Bacon CW. (1993) Cyclic hydroxamic acid accumulation in corn seedlings exposed to reduced water potencials before, during and after germination. J Chem Ecol 19: 1613-1624.

Rodriguez M., Canales E., Borras-Hidalgo O. (2005) Molecular aspects of abiotic stress in plants. Biotecnol Aplic 22: 1–10.

Rohde P., Hincha DK., Heyer AG. (2004) Heterosis in the freezing tolerance of crosses between two *Arabidopsis thaliana* accessions (Columbia- 0 and C24) that show diVerences in non-acclimated and acclimated freezing tolerance. Plant J 38: 790–799.

Roosens NHCJ., Thu TT., Iskandar HM., Jacobs M. (1998) Isolation of ornithine-*d*-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabiodipsis thaliana*. Plant Physiol 117: 263–271.

Roosens NHCJ., Bitar FA., Loenders K., Angenon G., Jacobs M. (2002) Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. Mol Breeding 9: 73-80.

Rout NP. and Shaw BP. (1998) Salinity tolerance in aquatic macrophytes: probable role of proline, the enzymes involved in its synthesis and C4 type of metabolism. Plant Sci 136: 121–130.

Royo C., Elias EM., Manthey FA. (2009) Durum wheat breeding. in: Handbook of Crop Breeding. Prohens J., Carena M.J., Nuez F. eds. Kluwer Academic Publishers.

Ruelland E., Vaultier MN., Zachowski A., Hurry V. (2009) Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants Advances in Botanical Research 49 Elsevier Ltd.

Ruiz JM., Sánchez E., Garcia PC., López-Lefebre LR., Rivero RM., Romero L. (2002) Proline metabolism and NAD kinase activity in greenbean plants subjected to cold-shock. Phytochemistry 59: 473–478.

Ryan D. and Robards K. (2006) Metabolomics: The Greatest Omics of Them All? Anal Chem 78: 7954-7958.

Sairam RK., Roa KV., Srivastava GC. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Sci 163: 1037–1046.

Saito K. and Matsuda F. (2010) Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. Annu Rev Plant Biol 61: 463–489.

Sakamoto A. and Murata N. (2000) Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. J Exp Bot 51: 81–88.

Sanchez DH., Pieckenstain FL., Escaray F., Erban A., Kraemer U., Udvardi MK., Kopka J. (2011) Comparative ionomics andmetabolomics in extremophile and glycophytic Lotus species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis. Plant Cell Environ 34: 605–617.

Sanchez DH., Schwabe F., Erban A., Udvardi MK., Kopka J. (2011) Comparative metabolomics of drought acclimation in model and forage legumes. Plant Cell Environ 35: 136-149.

Sanchez DH., Lippold F., Redestig H., Hannah MA., Erban A., Krämer U., Kopka J., Udvardi MK. (2008) Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. Plant J 53: 973-987.

Sarad PP., Alia P., Arora S., Prasad KV. (1995) Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. Biochem Biophys Res Commun 209: 1–5.

Sarwar M. and Frankenberger WTJr. (1994) Influence of L– tryptophan and auxin applied to the rhizosphere on the vegetative growth of *Zea mays* L. Plant Soil 160: 97–10.

Savoure A., Jaoua S., Hua X., Ardiles W., Montagu MV., Verbruggen N. (1995) Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the D1pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 372: 13–19. Schat H., Sharma SS., Vooijs R. (1997) Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of Silene vulgaris. Physiol Plant. 101: 477–482.

Schneidereit J., Ha[•]usler RE., Fiene G., Kaiser WM., Weber APM. (2006) Antisense repression reveals a crucial role of the plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator DiT1 at the interface between carbon and nitrogen metabolism. Plant J 45: 206–224.

Secenji M., Hideg E., Bebes A., Gy[°]orgyey J (2010). Transcriptional differences in gene families of the ascorbate-glutathione cycle in wheat during mild water deficit. Plant Cell Rep 29: 37–50.

Semel Y., Schauer N., Roessner U., Zamir D., Fernie AR. (2007) Metabolite analysis for the comparison of irrigated and non-irrigated field grown tomato of varying genotype. Metabolomics 3: 289-295.

Sgherri CLM., Pinzino C., Navari-Izzo F. (1996) Sunflower seedlings subjected to increasing stress by water deficit: changes in O⁻² production related to the composition of thylakoid membranes.Physiol Plant 96: 446–452.

Shabala S. and Cuin TA. (2006) Osmoregulation versus osmoprotection: reevaluating the role of compatible solutes. In: Teixeira da Silva J, ed. Floriculture, ornamental and plant biotechnology – advances and topical issues. Tokyo, Japan: Global Science Books 405–416.

Shahzad M., Ahmad M., Iqbal I., Ahmed J., Ali GM. (2012) Evaluation of wheat landrace genotypes for salinity tolerance at vegetative stage by using morphological and molecular markers Gen Mol Res 11: 679-692.

Sharifi P. (2010) Evaluation on sixty-eight rice germplasms in cold tolerance at germination stage. Rice Sci 17: 77–81.

Sharma H., Behl RK., Singh KP., Narula N., Jain P. (2007) Root and plant characters in wheat under low input field conditions with dual inoculation of mycorrhiza and *Azotobacter chroococcum*: Gene effects. Cereal Res Commun 35: 1573-1582.

Sharp RE., Poroyko V., Hejlek LG., Spollen WG., Springer GK., Bohnert HJ., Nguyen HT. (2004) Root growth maintenance during water deficits: Physiology to functional genomics. J Exp Bot 55: 2343–2351.

Sharrat BS. (1991) Shoot growth, root length density and water use of barley grown at different soil temperatures. Agronomy J 83: 237-239.

Sherwy PR. (2009) Wheat. J Exp Bot 60: 1537-1553.

Shevyakova NI., Rakitin VY., Stetsenko LA., Aronova EE., Kuznetsov VV. (2006) Oxidative stress and fluctuations of free and conjugated polyamines in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum L*. under NaCl salinity. Plant Growth 50: 69-78.

Shulaev V., Cortes D., Miller G., Mittler R. (2008) Metabolomics for plant stress response. Physiol Plant 132: 199-208.

Siegien I-N. and Gierasimiuk A. (2001) Environmental factors affecting the cyanogenic potential of flax seedlings. A. Physiol plantarum 23: 383-390.

Silva-Ortega CO., Ochoa-Alfaro AE., Reyes-Agüero JA., Aguado-Santacruz GA., Jiménez-Bremont JF. (2008) Salt stress increases the expression of P5CS gene and induces proline accumulation in cactus pear. Plant Physiol Bioch 46: 82–92.

Simane B., Struik PC., Nachit M., Peacock JM. (1993) Ontogenic analysis of yield compinents and yield stability of durum wheat in water limited environment. Euphytica 71: 211-219.

Singh BK., Ireland RJ., Lea PJ. (1999) The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine, and aspartate metabolism. in Plant Amino Acids, Biochemistry and Biotechnology. ed Singh BK (Marcel Dekker, New York) 49–109.

Sleator RD. and Hill C. (2006) Patho-biotechnology; using bad bugs to do good things. Curr Opin Biotechnol 17: 211–216.

Snape J. and Pánková K. (2006) *Triticum aestivum* (Wheat) In: Marquart L, Jacobs DR Jr, McIntosh GH, Poutanen K, Reicks M, editors. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons Ltd

Sonoike K. (1999) The different roles of chilling temperatures in the photoinhibition of photosystem I and photosystem II. J Photochem Photobiol B: Biol 48: 136–141.

Sparla F., Costa A., Lo Schiavo F., Pupillo P., Trost P. (2006) Redox regulation of a novel plastid-targeted beta-amylase of Arabidopsis. Plant Physiol 141: 840-850.

Staggenborg SA. and Vanderlip RL. (1996) Sorghum grain yield reductions caused by duration and timing of freezing temperatures. Agron. J 88: 473–477.

Steif M. (1988) Isoenzymes tryptophan synthase (Serine hydrolase adding indolglycerol phosphate) of higher plants and their role in growthregulation. Agron Rost 49: 83–107

Steudle E. (2000) Water uptake by roots: effects of water deficit. J Exp Bot 51: 1531– 1542 Steyn WJ., Wand SJE., Holcroft DM., Jacobs G. (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified functionin photoprotection. New Phytol 155: 349–361.

Stone JA. and Taylor HM. (1983) Temperature and the development of the taproot and lateral roots of our indeterminate soybean cultivars. Agron J 75: 613–618.

Strand A., Foyer CH., Gustafsson P., Gardestro^m P., Hurry V. (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. Plant, Cell Environ 26: 523–535.

Strand A., Hurry V., Gustafsson P., Gardestro^m P. (1997) Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. Plant J 12: 605–614.

Strand A., Hurry V., Henkes S., Huner N., Gustafsson P., Gardestro⁻⁻m P., Stitt M. (1999) Acclimation of Arabidopsis leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway.Plant Physiol 119: 1387–1398.

Strizhov N., Abraham E., Okresz L., Blickling S., Zilberstein A., Schell J., Koncz C., Szabados L. (1997) Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA, ABII and AXR2 in Arabidopsis. Plant J 12: 557-569.

Su J., Wu R. (2004) Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. Plant Sci 166: 941–948.

Sua M., Li X-F., Maa X-Y., Penga X-J., Zhaoa A-G., Chenga L-Q., Chena S-Y., Liua G-S. (2011) Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. Plant Sci 181: 652–659.

Sudhir P. and Murthy SDS. (2004) Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. Photosynthetica 42: 481–486

Sun CB., Fan XW., Hu HY., Liang Y., Huang ZB., Pan JL., Wang L., Li YZ. (2013) Pivotal metabolic pathways related to water deficit tolerance and growth recovery of whole maize plant. POJ 6: 377-387.

Sung S. and Amasino RM. (2005) Remembering winter: Toward a molecular understanding of vernalization. Annu Rev Plant Biol 56: 491–508.

213

Surjus A. and Durand M. (1996) Lipid changes in soybean root membranes in response to salt treatment. J Exp Bot 47: 17–23.

Szabados L. and Savoure' A. (2009) Proline: a multifunctional amino acid. Trends Plant Sci 15: 89–97.

Szekely G., A'braha'm E., Cse'pso A. (2008) Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. Plant J 53: 11–28.

Szekely G., Abraham E., Cseplo["] A., Rigo G., Zsigmond L., Csiszar J., Ayaydin F., Strizhov N., Jasik J., Schmelzer E., Koncz C., Szabados L. (2008) Duplicated *P5CS* genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. Plant J 53: 11–28.

Szoke A., Miao GH., Hong Z., Verma DPS. (1992) Subcellular location of delta1pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. Plant Physiol 99: 1642-1649.

Szucs A., J"ager K., Jurca ME. (2010) Histological and microarray analysis of the direct effect of water shortage alone or combined with heat on early grain development in wheat (*Triticum aestivum*), Physiol Plantarum 140: 174–188.

Sαnchez-Perez R., Jurgensen K., Olsen CE., Dicenta F., Muller BL. (2008) Bitterness in almonds. Plant Physiol 46: 1040–1052.

Taji T., Ohsumi C., Iuchi S., Seki M., Kasuga M., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 294: 417-426.

Takagi T., Nakamura M., Hayashi H., Inatsugi R., Yano R., Nishida I. (2003) The leaf-order-dependent enhancement of freezing tolerance incold-acclimated Arabidopsis rosettes is not correlated with the transcriptlevels of the cold-inducible transcription factors of CBF/DREB1. Plant Cell Physiol 44: 922–931.

Tal M. and Shannon MC. (1983) Salt tolerance in the wild relatives of cultivated tomato: Responses of *Lycopersicon esculentum L. cheesmanii, L. peruvianum, Solanum pennelli* and F1 hybrids to high salinity. Aust J Plant Physiol 10: 109-117.

Tasseva G., Davy de Virville J., Cantrel C., Moreau F., Zachowski A. (2004) Changes in the endoplasmic reticulum lipid proprieties in response to low temperature in Brassica napus. Plant Physiol Bioch 42: 811-822. Tavakkoli E., Rengasamy P., McDonald GK. (2010) High concentrations of Na⁺ and Cl⁻ ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. J Exp Bot 61: 4449–4459.

Tcherkez G., Cornic G., Bligny R., Gout E., Mahé A., Hodges M. (2008) Respiratory metabolism of illuminated leaves depends on CO₂ and O₂ conditions. P Natl Acad Sci USA 105: 797–802.

Temple SJ., Bagga S., Sengupta-Gopalan C. (1998a) Down-regulation of specific members of the glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense RNA technology. Plant Mol Biol 37: 535–547.

Thakur P., Kumar S., Malik JA., Berger JD., Nayyar H. (2010) Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. Environ Exp Bot 67: 429–443.

Thomashow MF. (1999) Plant cold acclimation, freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 571–599.

Tiburcio AF., Altabella T., Borrell A., Masgrau C. (1997) Polyamine metabolism and its regulation. Physiol Plant 100: 664-674.

Timpa JD., Burke JJ., Quisenberry JE., Wendt C. (1986) Effects of water stress on the organic acid and carbohydrate compositions of cotton plants. Plant Physiol 82: 724–728.

Ting CS., Owens TG., Wolfe DW. (1991) Seedling growth and chilling stress effects on photosynthesis in chilling-sensitive and chilling-tolerant cultivars of *Zea mays* J Plant Physiol 137: 559–564.

Torres MA. and Dangl JL. (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. Curr Opin Plant Biol 8: 397–403.

Ueda A., Shi W., Sanmiya K., Shono M., Takabe T. (2001) Functional analysis of salt-inducible proline transporter of barley roots. Plant Cell Physiol 42: 1282–1289.

Ulfat M., Athar H., Ashraf M., Akram NA., Jamil A. (2007) Appraisal of physiological and biochemical selection criteria for evaluation of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). Pak J Bot 39: 1593–1608.

Urano K., Maruyama K., Ogata Y., Morishita Y., Takeda M., Sakurai N., Suzuki H., Saito K., Shibata D., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2009) Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. Plant J 57: 1065–1078.
Usadel B., Blasing OE., Gibon Y., Poree F., Hohne M., Gunter M., Trethewey R., Kamlage B., Poorter H., Stitt M. (2008) Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in *Arabidopsis* rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. Plant, Cell Environ 31: 518-547.

Valluru R. and Van den Ende W. (2008) Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects.J Exp Bot 59: 2905-2916.

Van Poecke RMP., Posthumus MA., Dicke M. (2001) Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid Cotesia rubecula: Chemical, behavioral, and gene-expression analysis. J Chem Ecol 27: 1911–1928.

Vanrensburg L., Kruger GHJ., Kruger RH. (1993) Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultra structure in *Nicotiana tabacum* L. J Plant Physiol 141: 188–194.

Vaultier MN., Cantrel C., Vergnolle C., Justin AM., Demandre C., Benhassaine-Kesri G., Ciçek D., Zachowski A., Ruelland E. (2006) Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in Arabidopsis cells. FEBS Lett. 580: 4218–4223.

Veeranagamallaiah G., Chandraobulreddy P., Jyothsnakumari G., Sudhakar C. (2007) Glutamine synthetase expression and pyrroline-5-carboxylate reductase activity influence proline accumulation in two cultivars of foxtail millet (*Setaria italica L.*) with differential salt sensitivity. Environ Exp Bot 60: 239-244.

Vendruscolo ECG., Schuster I., Pileggi M., Scapim CA., Molinari HBC., Marur CJ., Vieira LGE. (2007) Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. J Plant Physiol 164: 1367–1376.

Venekamp JH. Lampe JEM., Koot JTM. (1989) Organic acids as sources of drought induced proline synthesis in field bean plants, *Vicia faba* L. J Plant Physiol 133: 654-659.

Verbruggen N., Hua XJ., May M., Van Montagu M. (1996) Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. P Natl Acad Sci USA 93: 8787-8791.

Verbruggen N. and Hermans C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. Amino Acids 35: 753–759.

Verbruggen N., Villarroel R., Van M. (1993) Osmoregulation of a pyrroline-5carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 103: 771–781.

Verbruggen N., Hua XJ., May M. Van Montagu M. (1996) Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: Evidence for a negative transcriptional regulator. P Nat Acad Sci USA 93: 8787–8791.

Verheul MJ., Picatto C., Stamp P. (1996) Growth and development of maize (*Zea mays L.*) seedlings under chilling conditions in the field Eur J Agron 5: 31–43.

Verma S. and Mishra SN. (2005) Putrescine alleviation of growth in salt stressed Brassica juncea by inducing antioxidative defense system. J Plant Physiol 162: 669– 677.

von Rad U., Huttl R., Lottspeich F., Gierl A., Frey M. (2001) Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. Plant J 28: 633–642.

Vorasoot N., Songsri P., Akkasaeng C., Jogloy S., Patanothai A. (2003) Effect of water stress on yield and agronomic characters of peanut. Songklanakarin J Sci Technol 25: 283–288.

Vysotskaya L., Hedley PE., Sharipova G., Veselov D., Kudoyarova G., Morris J., Jones HG. (2010) Effect of salinity on water relations of wild barley plants differing in salt tolerance. AoB Plant http://aobplants.oxfordjournals.org/

Wahid A., Farooq M., Basra SMA., Rasul E., Siddique KHM. (2011) Germination of seeds and propagules under salt stress. In: Pessarakli M (ed) Handbook of plant and crop stress, 3rd edn.CRC Press, Boca Raton p 321–337.

Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M. (2007) Heat tolerance in plants: An overview. Environ Exp Bot 61: 199–223.

Walden R., Cordeiro A., Tiburcio AF. (1997) Polyamines:small molecules triggering pathway sinplant growthanddevelopment. Plant Physiol 113: 1009–1013.

Walters D. (2003a) Resistance to plant pathogens: possible role for free polyamines and polyamine metabolism. New Phytol 159:109–115

Walters DR. (2003b) Polyamines and plant disease. Phytochemistry 64: 97–107.

Walton EF., Podivinsky E., Wu RM., Reynolds PHS., Young LW. (1998) Regulation of proline biosynthesis in kiwifruit buds with and without hydrogen cynamide treatment. Physiol Plant 102: 171–178.

Wang X., Li W., Li M., Welti R. (2006) Profiling lipid changes in plant response to low temperature. Physiol Plantarum 126: 90-96.

Wang Z-Q., Yong ZY., Ou J-Q., Lin Q-H., Zhang C-F. (2007) Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. J Plant Physiol 164: 695-701.

Welti R., Li W., Li M., Sang Y., Biesiada H., Zhou HE., Rajashekar CB., Williams TD., Wang X. (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezinginduced lipid changes in Arabidopsis. J Biol Chem 277: 31994–32002.

White PJ. and Broadley MR. (2001) Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. Ann Bot 88: 967–988.

White RH. and Schmidt RE. (1989) Bermudagrass response to chilling temperatures as influenced by iron and benzyladenine. Crop Sci 29: 768–773.

Widodo PJH., Newbigin E., Tester M., Bacic A., Roessner U. (2009) Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. J Exp Bot 60: 4089–4103.

Williamson CL. and Slocum RD. (1992) Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the D1-pyrroline-5-carboxylate reductase (*proC*) gene in pea (*Pisum sativum* L.). Plant Physiol 100: 1464–1470.

Wilson JB. (1988) A review of evidence on the control of shoot : root ratio, in relation to models. Ann Bot 75: 533-539.

Wingler A. and Roitsch T. (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. Plant Biol 10: 50-62.

Wise RR. (1995) Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light Photosynth Res 45: 79–97.

Witt S., Galicia L., Lisec J., Cairns J., Tiessen A., Araus JL., Palacios-Rojas N., Fernie AR. (2012) Metabolic and phenotypic responses of greenhouse-grown maize hybrids to experimentally controlled drought stress. Mol Plant 5: 401-417.

Wolfender JL., Glauser G., Boccard J., Rudaz S. (2009) MS-based plant metabolomic approaches for biomarker discovery. Nat Prod Commun 4: 1417–1430.

Woodward MD., Corcuera LJ., Helgeson JP., Upper CD. (1978) Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one in aqueous solutions. Plant Physiol 61: 796–802.

Wu D., Cai S., Chen M., Ye L., Chen Z., Zhang H. (2013) Tissue metabolic responses to salt stress in wild and cultivated barley. PLoS One. a8:e55431.

Wu LQ., Fan ZM., Guo L., Li YQ., Zhang WJ., Qu LJ., Chen ZL. (2003) Overexpression of an Arabidopsis *delta-OAT* gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. Chin Sci Bull 48: 2594–2600.

Wyn Jones RG. and Storey R. (1978) Salt stress and comparative physiology in the Gramineae. II. Glycine betaine and proline accumulation in two salt- and water-stressed barley cultivars. Aust J Plant Physiol 5: 817-829.

Xin Z. and Browse J. (1998) Eskimo1 mutants of Arabidopsis are constitutively freezing-tolerant. P Natl Acad Sci U.S.A. 95: 7799–7804.

Xiong L., Schumaker KS., Zhu J-K. (2002) Cell signalling for cold, drought, and salt stresses. Plant Cell 14: 165–S183.

Xu G., Magen H., Tarchitzky J., Kafkafi U. (2000) Advances in chloride nutrition of plants. Adv Agron 68: 97–150.

Xu S., Hu B., He Z., Ma F., Feng J., Shen W., Yan J. (2011) Enhancement of salinity tolerance during rice seed germination by presoaking with hemoglobin. Int J Mol Sci 12: 2488–2501.

Xue X., Liu A., Hua X. (2009) Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. BMB reports 42: 28–34.

Yamada M., Morishita H., Urano K., Shiozaki N., Yamaguchi- Shinozaki K., Shinozaki K., Yoshiba Y. (2005) Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. J Exp Bot 56: 1975–1981.

Yang CW., Kao CH. (1999) Ammonium in relation to proline accumulation in detached rice leaves. Plant Growth Regul 30: 139–144.

Yang F., Jorgensen AD., Li H. (2011) Implications of hightemperature events and water deficits on protein profiles in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Vinjett) grain, Proteomics 11: 1684–1695.

Yang W-J., Rich PJ., Axtell JD., Wood KV., Bonham CC., Ejeta G., Mickelbart MV., Rhodes D. (2003) Genotypic variation for glycine betaine in *Sorghum bicolor*. Crop Sci 43: 162-169. Yang SL., Lan SS., Gong M. (2009) Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. J Plant Physiol 166: 1694–1699.

Yoshiba Y., Kiyosue T., Katagiri T., Ueda H., Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Wada K., Harada Y., Shinozaki K. (1995) Correlation between the induction of a gene for D1- pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. Plant J 7: 751–760.

Yoshida S. (2003) Molecular regulation of leaf senescence. Curr Opin Plant Biol 6: 79–84.

You J., Hu H., Xiong L. (2012) An ornithine d-aminotransferase gene OsOAT confers drought and oxidative stress tolerance in rice. Plant Sci 197: 59–69.

Yu C., Claybrook DL., Huang AH. (1983) Transport of glycine, serine, and proline into spinach leaf mitochondria. Arch Biochem Biophys 227: 180–187.

Zagrobelny M., Bak S., Rasmussen AV., Jurgensen B., Naumann CM., Muller BL., (2004) Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. Phytochemistry 65: 293–306.

Zandalinas SI., Vives-Peris V., Gómez-Cadenas A., Arbona V. (2012) A fast and precise method toidentify indolic glucosinolates and camalexin in plants by combining mass spectrometric andbiological information. J Agric Food Chem 60: 8648–8658.

Zeng F., Chen S., Miao Y. (2008) Changes of organic acid exudation and rhizosphere pH in rice plants under chromium stress. Environ Poll 155: 284-289.

Zerihun A., Gutschick VP., Bassirirad H. (2000) Compensatory roles of nitrogen uptake and photosynthetic N2 use efficiency in determining plant growth response to elevated CO2: evaluation using a functional balance model. Ann Bot 86: 723-730.

Zhang M., Barg R., Yin M., Gueta-Dahan Y., Leikin-Frenkel A. (2005) Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct v-3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. Plant J 44: 361–371.

Zhang Q, Fry J, Rajashekar C, Bremer D and Engelke M (2009) Membrane Polar Lipid Changes in Zoysiagrass Rhizomes and Their Potential Role in Freezing Tolerance. J Amer Soc Hort Sci 134: 322–328 Zhang C-S., Lu Q., Verma DPS. (1995) Removal of feedback inhibition of Δ 1pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. J Biol Chem 270: 20491–20496.

Zhao XQ., Wang WS., Zhang F., Zhang T., Zhao W., Fu BY., Li ZK. (2013) Temporal profiling of primary metabolites under chilling stress and its association with seedling chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) Rice 6: 23.

Zhen WB. and Ma QH. (2009) Proline metabolism in response to salt stress in common reed [*Phragmites australis* (Cav.) Trin. *ex* Steud]. Bot Mar 52: 341–347.

Zhu JK. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol 53: 247–273.

Zhu JK., Liu J., Xiong L. (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. Plant Cell 10: 1181–1191.

Zhuang GQ., Li B., Guo HY., Liu JL., Chen F. (2011) Molecular cloning and characterization of P5CS gene from *Jatropha curcas* L. Afri J Biotechnol 10: 14803–14811.

Zuther E., Koehl K., Kopka J. (2007) Comparative metabolome analysis of the salt response in breeding cultivars of rice. In: Jenks MA., Hasegawa PM., Jain SM., eds. Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerance crops. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag 285–315.

Δαλιάνης Κ. (1983) Χειμερινά Σιτηρά. Οργανισμός Εκδόσεως Διδακτικών Βιβλίων. Αθήνα.

Καραμάνος Α. (1994) Τα σιτηρά των Εύκρατων Κλιμάτων. Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών. Αθήνα

Καραμπουρνιώτης Γ. (2003) Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο

Κατινάκης Π. (1999) Εισαγωγή στη Βιοχημεία. Ενδιάμεσος Μεταβολισμός στα ζώα τα φυτά και τα βακτήρια. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Οργανισμός Ελληνικών Γεωργικών Ασφαλίσεων (2003) Κέντρο Μετεωρολογικών Εφαρμογών. Εθνικό Πρόγραμμα Χαλαζικής Προστασίας. Ετήσια Έκθεση 2007, Εκδόσεις Αινείας Θεσσαλονίκη.

Σφήκας Α. (1995) Ειδική Γεωργία Ι. Σιτηρά, Ψυχανθή και Χορτοδοτικά Φυτά. Εκδόσεις: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Θεσσαλονίκη. Χρονοπούλου-Σερέλη Α., Φλόκας Α. (2010) Μαθήματα Γεωργικής Μετεωρολογίας και Κλιματολογίας. Εκδόσεις Ζήτη.

Χρονοπούλου-Σερέλη Α., Χρονόπουλος Ι. (1994) Τοποκλιματική Έρευνα στην Πεδιάδα της Μεσογαίας (Αττική) και Αξιολόγησή της για Γεωργική Χρήση. Πρακτικά 2^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού Συνεδρίου Μετεωρολογίας-Κλιματολογίας-Φυσικής της Ατμόσφαιρας, ΑΠΘ.

http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html

http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx

http://plants.usda.gov

http://www.agroservicespa.it

http://www.arabidopsis.org/

http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908

http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/index.pl

http://www.cerealinstitute.gr

http://www.expasy.org/

http://www.genome.jp/kegg/pathway.html

http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42

236&print_version=PRT&source=to_print

http://www.uky.edu/Ag/GrainCrops/Images/2/2.1.JPG