



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Αγροτικής Παραγωγής, Υποδομών και Περιβάλλοντος

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Επιστήμες και Σύγχρονα Συστήματα Φυτικής Παραγωγής»

Κατεύθυνση: «Γεωργία, Βελτίωση Φυτών & Γεωργικός Πειραματισμός»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας υβριδίων ηλίανθου στις ιμιδαζολιόνες
και διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού της ανθεκτικότητάς τους»**



ΟΥΡΑΝΙΑ Κ. ΡΟΥΣΣΟΥ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Πηνελόπη Μπεμπέλη

ΑΘΗΝΑ, 2016



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Αγροτικής Παραγωγής, Υποδομών και Περιβάλλοντος

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Επιστήμες και Σύγχρονα Συστήματα Φυτικής Παραγωγής»

Κατεύθυνση: «Γεωργία, Βελτίωση Φυτών & Γεωργικός Πειραματισμός»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας υβριδίων ηλίανθου στις ιμιδαζολινόνες και διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού της ανθεκτικότητάς τους»

Εξεταστική επιτροπή

Μπεμπέλη Πηνελόπη, Καθηγήτρια, ως Επιβλέπουσα

Σκαράκης Γεώργιος, Καθηγητής, ως Μέλος

Τάνη Ελένη, Λέκτορας, ως Μέλος

ΟΥΡΑΝΙΑ Κ. ΡΟΥΣΣΟΥ

ΑΘΗΝΑ, 2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ζιζανιοκτόνα της ομάδας των ιμιδαζολινονών έχουν στοχευμένο τρόπο δράσης κι αναστέλλουν τη λειτουργία του ενζύμου συνθετάση του ακετοϋδροξικού οξέος (acetohydroxyacid synthase, AHAS) ή συνθετάση του οξικογαλακτικού οξέος (acetolactate synthase, ALS). Το AHAS καταλύει τη βιοσύνθεση των αμινοξέων βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης, τα οποία είναι απαραίτητα για την κυτταροδιαίρεση και την ανάπτυξη των φυτών. Η τεχνολογία Clearfield ή *Imisun* του ηλίανθου βασίζεται σε μία φυσική μετάλλαξη στο ενεργό κέντρο του AHAS, στην οποία η αλανίνη αντικαθίσταται από την βαλίνη στη θέση 205 (Ala205Val). Σκοπός της εργασίας ήταν η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας υβριδίων ηλίανθου στις ιμιδαζολινονες. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *HaAHAS11*, *HaAHAS12*, *HaAHAS13* που κωδικοποιούν την καταλυτική υπομονάδα του AHAS και η πιθανή συσχέτισή τους με το μοριακό μηχανισμό της ανθεκτικότητας.

Για το σκοπό αυτό ένα ευαίσθητο υβρίδιο (S1) και δύο Clearfield υβρίδια (R2, R3), φυτεύτηκαν σε φυτοδοχεία έως το στάδιο του 2-3^{ου} ζεύγους φύλλων, όπου τα φυτά (12/υβρίδιο/επέμβαση/επανάληψη) δέχτηκαν επεμβάσεις με ψεκαστικό διάλυμα που περιείχε είτε 400μg imazamox/ml ζιζανιοκτόνου είτε 1200μg/ml, ενώ σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φυτά, τα οποία είχαν ψεκαστεί με νερό. Τα υβρίδια αξιολογήθηκαν μετά από 7, 14 και 21 ημέρες από τις επεμβάσεις, σε μία κλίμακα 0 (υγιές) έως 5 (νεκρό φυτό), σύμφωνα με τα φυτοτοξικά συμπτώματα που παρουσίασαν. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα JMP[®]8. Παράλληλα προσδιορίστηκε η μέση αποτελεσματική δόση (ED₅₀) του ζιζανιοκτόνου για το κάθε υβρίδιο. Για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, 36 ώρες μετά τις επεμβάσεις, συλλέχθηκε φυλλικός ιστός από 10 φυτά/υβρίδιο/επανάληψη, απομονώθηκε RNA και πραγματοποιήθηκε σύνθεση του cDNA. Στη συνέχεια έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR και ακολούθησε σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων με τη χρήση της RTqPCR. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού REST[®].

Σύμφωνα με την φαινοτυπική αξιολόγηση, τα υβρίδια R2 και R3 παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην δόση των 400μg/ml ζιζανιοκτόνου ενώ ευαισθησία στην δόση των 1200μg imazamox/ml ζιζανιοκτόνου. Το ευαίσθητο υβρίδιο S1 παρουσίασε ευαισθησία και στις δύο συγκεντρώσεις ζιζανιοκτόνου. Η αξιολόγηση αυτή επιβεβαιώθηκε και με το ED₅₀. Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των δεδομένων στο JMP[®]8, η αλληλεπίδραση μεταξύ υβριδίων και επεμβάσεων δεν ήταν σημαντική, ενώ σημαντική ήταν η επίδραση του γονοτύπου των υβριδίων αλλά και των επεμβάσεων την 7^η ημέρα καθώς και την 21^η παρατηρήσεων.

Όσον αφορά τη γονιδιακή έκφραση, το *HaAHAS11* παρουσίασε σχεδόν 3 φορές αύξηση στα S1 και R3 υβρίδια μετά από τις επεμβάσεις με το imazamox, σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Το γονίδιο *HaAHAS12* παρουσίασε αξιοσημείωτη επαγωγή στο R3 υβρίδιο και στις δύο συγκεντρώσεις του ζιζανιοκτόνου. Τέλος, η έκφραση του γονιδίου *HaAHAS13* δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε κανένα από τα υβρίδια σε όλες τις επεμβάσεις. Το R2 υβρίδιο παρουσίασε μειωμένη έκφραση των γονιδίων *HaAHAS11* και *HaAHAS12* μετά από τις επεμβάσεις με το ζιζανιοκτόνο.

Συμπερασματικά, τα υβρίδια R2 και R3 θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ανθεκτικά στη δραστική ουσία imazamox. Η ανθεκτικότητα φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη και με πιθανή επίδραση του παράγοντα περιβάλλον. Τα γονίδια *HaAHAS11* και *HaAHAS12* πιθανώς να σχετίζονται με τον μηχανισμό της ανθεκτικότητας του ηλίανθου στις μιδαζολινόνες.

Evaluation of resistance to imidazolinone herbicides in sunflower hybrids and investigation of their molecular mechanism of resistance

ABSTRACT

The herbicides of the imidazolinone family inhibit the action of acetohydroxyacid synthase (AHAS) or acetolactate synthase (ALS) enzyme and are associated with target-site resistance. AHAS catalyzes the biosynthesis of the amino acids valine, leucine and isoleucine, which are necessary for protein synthesis, cell division proper plant development. Clearfield technology or *Imisun* in sunflower involves the development of imidazolinone-resistant cultivars or hybrids and is based on a natural mutation in the active site of the AHAS enzyme. In particular, a substitution of an alanine by a valine at amino acid 205 of the enzyme (Ala205Val) confers resistance to imidazolinones. The purpose of this study was (i) the evaluation of resistance of Clearfield sunflower hybrids to imidazolinones, and (ii) the analysis of expression of the *HaAHAS11*, *HaAHAS12*, *HaAHAS13* genes, which code for the catalytic subunit of AHAS, and its putative involvement with the molecular mechanism of resistance.

The sensible hybrid (S1) and the Clearfield hybrids (R2, R3), were planted in pots with substrate, in the greenhouse. The plants (12hybrids/treatment/repeat) were treated with sprayed solution which contained 400µg imazamox/ml herbicide and 1200µg/ml at the stage of 2-3 pair of leaves. Control plants were sprayed with tap water. Visual estimates were recorded at 7, 14 and 21 days after treatments, on a scale 0 (healthy) – 5(dead plants) based on phytotoxic symptoms. Statistical analysis was performed with the JMP[®]8 program. Furthermore, the effective dose (ED₅₀) of herbicide was determined for each hybrid. Regarding the analysis of gene expression, leaf tissue was collected from 10plants/hybrids/repeat, 36 hours after treatment for RNA isolation and subsequent cDNA synthesis. PCR conditions were optimized with end point PCR and quantitative gene expression analysis was performed with Real Time quantitative PCR. The data were analyzed with the REST[®] program.

According to the phenotypic evaluation, the R2 and R3 hybrids presented resistance to the dose of 400µg imazamox/ml herbicide, whereas they exhibited susceptibility at the dose of 1200µg/ml. The susceptible hybrid S1 displayed susceptibility at both doses. This evaluation was confirmed by the ED₅₀. The JMP's statistical analysis showed that the interaction between hybrids and treatments was not significant, in relation to the effect of hybrids genotype and the treatment's on 7th and 21st day.

Regarding gene expression, *HaAHAS11* was increased approximately 3 times fold in S1 and R3 hybrids after imazamox treatments. The *HaAHAS12* gene showed remarkable induction in the R3 hybrid in both treatments. The gene *HaAHAS13* did not show any significant change in any hybrid and at any treatment. All three genes exhibited decreased expression in the R2 hybrid as compared to the untreated control.

In conclusion, the R2 and R3 hybrids could be characterized as resistant. The resistance is dose-dependent and a possible factor of reaction is the environment. The induction of the *HaAHAS11* and *HaAHAS12* genes suggests an association of gene expression with the molecular mechanism of resistance of sunflower to imidazolinones.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Πηνελόπη Μπεμπέλη που δέχτηκε να αναλάβει την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου μελέτης και την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο της Βελτίωσης φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον καθηγητή Γεώργιο Σκαράκη και τη λέκτορα Ελένη Τάνη, οι οποίοι δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή ώστε να αξιολογήσουν και να βαθμολογήσουν την παρούσα μελέτη, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνονται στην PhD Αλίκη Καπάζογλου για την απεριόριστη βοήθεια που μου πρόσφερε με την γνώση και την εμπειρία της στην πραγματοποίηση του πειράματός μου. Η βοήθεια και οι συμβουλές της θα είναι χρήσιμα εφόδια για την μελλοντική μου σταδιοδρομία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την υποψήφια διδάκτορα Ευσταθία Λαζαρίδη για τη βοήθεια της και την συμφοιτήτρια μου Κατερίνα Μαρούλη για την συμβολή της στην εκπόνηση της εργασίας, καθώς και τον Msc Ηρακλή Λιβάνιο για την βοήθεια του στην στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον PhD Παναγιώτη Τερζόπουλο από τον Αγροτικό Οίκο Σπύρου ΑΕΒΕ για την προμήθεια του γενετικού υλικού που χρησιμοποίησα, για τις συμβουλές και την στήριξη του, όπως επίσης και την Άννα Κοντοράβδη για την πολύτιμη υποστήριξη της.

Το πιο μεγάλο και ειλικρινές ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου, Θεώνη, Κώστα, και Γουλιέλμο, οι οποίοι με στήριξαν υλικά και ηθικά σε όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου, καθώς και στο Δημήτρη Λαμπίρη για την υπομονή και την στήριξη που μου έδωσε, χωρίς την αμέριστη συμπαράστασή τους η μελέτη αυτή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Γενικά.....	1
1.2. Ηλίανθος και καταπολέμηση ζιζανίων.....	2
1.3. Ζιζανιοκτόνα αναστολείς του ενζύμου AHAS.....	3
1.4. Ιμιδαζολινόνες.....	4
1.5. Συνθετάση του ακετοϋδροξικού οξέος: Acetohydroxyacid synthase (AHAS).....	6
1.5.1. Ένζυμο AHAS.....	6
1.5.2. Ενεργό κέντρο του ενζύμου AHAS.....	7
1.5.3. Γονίδια AHAS που κωδικοποιούν την καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου.....	8
1.6. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στα ζιζανιοκτόνα.....	10
1.7. Clearfield τεχνολογία.....	12
1.7.1. Δημιουργία του πρώτου ανθεκτικού ηλίανθου στις ιμιδαζολινόνες.....	12
1.7.2. Η Clearfield τεχνολογία στον ηλίανθο.....	13
1.7.3. Άλλες μεταλλάξεις του γονιδίου AHAS που οδηγούν σε ανθεκτικότητα.....	14
1.7.4. Ανάπτυξη άλλων τεχνολογιών για τον έλεγχο των ζιζανίων του ηλίανθου.....	15
1.7.5. Η Clearfield τεχνολογία σε άλλες καλλιέργειες.....	16
1.7.6. Ανάπτυξη ανθεκτικότητας των ζιζανίων στα ζιζανιοκτόνα αναστολείς του ενζύμου AHAS.....	17
1.8. Τρόποι αξιολόγησης της ανθεκτικότητας του ηλίανθου στις ιμιδαζολινόνες.....	18
1.9. Σκοπός της εργασίας.....	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1. Φυτικό Υλικό.....	21
2.2. Εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου.....	21
2.3. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός.....	22
2.3.1. Ανάλυση δεδομένων του φαινοτυπικού χαρακτηρισμού.....	23
2.3.2. Μέση αποτελεσματική δόση (Effective dose 50 -ED ₅₀).....	23
2.4. Μοριακός Χαρακτηρισμός-Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης.....	23
2.4.1. Εξαγωγή RNA.....	24
2.4.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του RNA.....	24
2.4.3. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης για τη δημιουργία cDNA.....	24

2.4.4. Αλληλουχία γονιδίων <i>HaAHAS11</i> , <i>HaAHAS12</i> , <i>HaAHAS13</i> στον ηλίανθο	25
2.4.5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	27
2.4.6. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων – Υπολογισμός των μεγεθών των ενισχυμένων ζωνών	29
2.4.7. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων	30
2.4.8. Ανάλυση δεδομένων ποσοτικοποίησης.....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	33
3.1.1. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων μετά από 7 ημέρες από τις επεμβάσεις.	33
3.1.2. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων μετά από 14 ημέρες από τις επεμβάσεις.	34
3.1.3. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων μετά από 21 ημέρες από τις επεμβάσεις.	35
3.1.4. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης	36
3.1.5. Μέση αποτελεσματική δόση (Effective dose 50 -ED ₅₀)	37
3.2. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ.....	38
3.2.1. Ποιοτικός έλεγχος και ποσοτικός προσδιορισμός του RNA.....	38
3.2.1.1. Με τη χρήση του σπεκτροφωτόμετρου	38
3.2.1.2. Εκτίμηση της ποιότητας του RNA σε πηκτή αγαρόζης	39
3.2.2. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης.....	39
3.2.2.1. Ημιποσοτικοποίηση με την εφαρμογή της PCR	39
3.2.2.2. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων - RTqPCR.....	42
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
4.1. Φαινοτυπική αξιολόγηση των υβριδίων	48
4.2. Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού της ανθεκτικότητας των υβριδίων	52
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	56
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58
6.1. Ξένη βιβλιογραφία	58
6.2. Ελληνική βιβλιογραφία	65
6.3. Ηλεκτρονικές Διευθύνσεις.....	66
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	67
1. Διαδικασία εξαγωγής RNA για κάθε δείγμα	67
2. Διαδικασία χρήσης του σπεκτροφωτόμετρου Nanodrop 1000 και του λογισμικού N.D. -1000 v 3.3.1. για κάθε δείγμα.....	68

3. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των γονιδίων <i>HaAHAS11</i> , <i>HaAHAS12</i> , <i>HaAHAS13</i> και ταυτοποίηση νουκλεοτιδίων με την βοήθεια του προγράμματος ClustalW2.	68
4. Δημιουργία ρυθμιστικού διαλύματος 1 x TAE για τη χρήση του σε πηκτή αγαρόζης και διάλυμα ηλεκτροφόρησης.	76
5. Τιμές Cq μετά το πέρας της RTqPCR	76
6. Ανάλυση δεδομένων με το πρόγραμμα Rest [©]	77
7. Αναλυτικά τα δεδομένα της φαινοτυπικής αξιολόγησης των φυτοτοξικών συμπτωμάτων των τριών υβριδίων S1, R2, R3 σύμφωνα με την κλίμακα αξιολόγησης.....	78
8. Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων με το πρόγραμμα JMP [®]	81

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Διάδοση και εξάπλωση του ηλίανθου (<i>Helianthus annuus</i> L.)	2
Εικόνα 2. Συντακτικός τύπος των imazapyr (1), imazethapyr (2), imazapic (3), imazaquin (4), imazamethabenz methyl (5) και imazamox (6).....	5
Εικόνα 3. Αντιδράσεις βιοσύνθεσης της διακλαδιζόμενης αλυσίδας αμινοξέων τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών (Duggleby et al., 2008).....	6
Εικόνα 4. Οι κωδικοποιημένες περιοχές των γονιδίων <i>AHAS11</i> , <i>AHAS12</i> , <i>AHAS13</i> στον ηλίανθο (1,959–1,977 νουκλεοτίδια στο <i>AHAS11</i> , 1,941–1,947 νουκλεοτίδια στο <i>AHAS12</i> , 1,941 νουκλεοτίδια στο <i>AHAS13</i>). Οι θέσεις των ενθέσεων ή απαλοιφών (insertion-deletions, INDELS) προσδιορίζονται με κενά. Οι θέσεις των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται με τα βέλη κάτω από την ευθυγράμμιση των γονιδίων (Kolkman et al., 2004)	9
Εικόνα 5. Οι τεχνολογίες που οφείλονται σε μεταλλάξεις του γονιδίου <i>HaAhas11</i> του ενζύμου AHAS στον ηλίανθο (Sala et al., 2012a)	16
Εικόνα 6. Η αντιστοιχία μεγέθους κάθε θραύσματος του πρότυπου DNA	29
Εικόνα 7. Ανάλυση του απομονωμένου συνολικού RNA, σε πηκτή αγαρόζης 2,5%, το 1, 3, 5 συμβολίζουν το S1, R2 και το R3 αντίστοιχα, μετά την εφαρμογή του ψεκαστικού υγρού με νερό, ενώ το 2, 4, 6 συμβολίζουν το S1, R2, R3 αντίστοιχα, στην (Α)μετά από ψεκασμό με νερό και 400μg δραστικής ουσίας imazamox και η (Β) μετά την εφαρμογή ψεκαστικού υγρού με νερό και 1200μg δραστικής ουσίας imazamox	39
Εικόνα 8. Ανάλυση των προϊόντων PCR των γονιδίων <i>HaAHAS11</i> , <i>HaAHAS12</i> , <i>HaAHAS13</i> και της <i>b-tubulin</i> σε πηκτή αγαρόζης 2,5%. Το 1, 3, 5 αφορούν τα υβρίδια S1, R2, R3, μετά τη χρήση ψεκαστικού υγρού μόνο νερό και τα 2, 4, 6 τα υβρίδια S1, R2 και R3 με 400μg δραστικής ουσίας imazamox.....	40

Εικόνα 9. Ανάλυση των προϊόντων PCR των γονιδίων *HaAHAS11*, *HaAHAS12*, *HaAHAS13* και της *b-tubulin* σε πηκτή αραρόζης 2,5%. Το 1, 3, 5 αφορούν τα υβρίδια S1, R2, R3, μετά τη χρήση ψεκαστικού υγρού μόνο νερό και τα 2, 4, 6 τα υβρίδια S1, R2 και R3 με 1200μg δραστικής ουσίας imazamox 41

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Κλίμακα αξιολόγησης των φυτών σύμφωνα με τα φυτοτοξικά συμπτώματα που παρουσίασαν	22
Πίνακας 2. Απλότυποι των γονιδίων <i>HaAHAS11</i> , <i>HaAHAS12</i> , <i>HaAHAS13</i>	26
Πίνακας 3. Αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των εκκινητών 5'-3' και θερμοκρασίες πρόσδεσης τους (Temperature annealing, T.an.).....	27
Πίνακας 4. Αντιδραστήρια για την πραγματοποίηση της PCR	28
Πίνακας 5. Συνθήκες βελτιστοποίησης της αντίδρασης της PCR	28
Πίνακας 6. Αντιδραστήρια για την Real Time quantitative PCR (RTqPCR).....	30
Πίνακας 7. Συνθήκες και στάδια της αντίδρασης RTqPCR	31
Πίνακας 8. Ποσοτικοποίηση RNA των δειγμάτων μετά την επέμβαση με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ζιζανιοκτόνου 400μg/ml και 1200μg/ml καθώς και με τον ψεκασμό με νερό	38

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων, 7 ημέρες από την εφαρμογή των επεμβάσεων, στα υβρίδια S1, R2 και R3	33
Γράφημα 2. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων, 14 ημέρες από την εφαρμογή των επεμβάσεων, στα υβρίδια S1, R2 και R3	34
Γράφημα 3. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων, 21 ημέρες από την εφαρμογή των επεμβάσεων, στα υβρίδια S1, R2 και R3	35
Γράφημα 4. Απεικόνιση των 24 φυτών, 21 ημέρες από τις επεμβάσεις, η οποία αντιστοιχεί στην κλίμακα αξιολόγησης 0-5. Διαφορετικό χρώμα αντιστοιχεί σε άλλο επίπεδο φυτοτοξικότητας.	36
Γράφημα 5. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου <i>HaAHAS11</i> , στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 400μg/ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι πράσινες την επέμβαση με 400μg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την <i>b-</i>	

<i>tubulin</i>) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*	42
Γράφημα 6. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου <i>HaAHAS11</i> , στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 1200μg/ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι πράσινες την επέμβαση με 1200μg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την <i>b-tubulin</i>) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*	43
Γράφημα 7. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου <i>HaAHAS12</i> , στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 400μg/ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι μπλε την επέμβαση με 400μg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την <i>b-tubulin</i>) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*	44
Γράφημα 8. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου <i>HaAHAS12</i> , στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 1200μg/ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι μπλε την επέμβαση με 1200μg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την <i>b-tubulin</i>) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*	45
Γράφημα 9. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου <i>HaAHAS12</i> , στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 400μg δ.ο./ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι κόκκινες την επέμβαση με 400μg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την <i>b-tubulin</i>) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*	46
Γράφημα 10. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου <i>HaAHAS12</i> , στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 1200μg/ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι κόκκινες την επέμβαση με 1200μg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την <i>b-tubulin</i>) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*	47

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Οι κωδικοποιούσες περιοχές είναι τα ανοιχτά γκρι ορθογώνια, ενώ τα λευκά είναι 5' αμετάφραστες περιοχές. Τα γραμμοσκιασμένα κουτιά παρουσιάζουν τις διαφορές στις αλληλουχίες. Το σκούρο γκρι κουτί είναι η μετάλλαξη A205V	26
--	----

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά

Τα ζιζάνια αποτελούν έναν από τους κύριους παράγοντες μείωσης των αποδόσεων της γεωργικής παραγωγής (Green, 2014), καθώς αναπτύσσονται και ανταγωνίζονται τα καλλιεργούμενα φυτά με σκοπό να καλύψουν τις ανάγκες τους σε φως, νερό, έδαφος και θρεπτικά συστατικά (Simie et al., 2011). Στην περίπτωση του ηλίανθου τα ζιζάνια αποτελούν σημαντικό ανασταλτικό παράγοντα, με τη μείωση της παραγωγής να προσεγγίζει το 81% (Jaykumar et al., 1988; Simie et al., 2011).

Η αντιμετώπιση των ζιζανίων μπορεί να επιτευχθεί τόσο με προληπτικά μέτρα (ηλιοαπολύμανση, αμειψισπορά), όσο με διάφορες καλλιεργητικές τεχνικές (βοτάνισμα, κοπή και κάψιμο ζιζανίων) και εφαρμογή βιολογικών μέσων (βιοζιζανιοκτόνα), αλλά κυρίως γίνεται με χημικά μέσα (ζιζανιοκτόνα) (Πασπάτης, 2004), όπου θεωρούνται η πιο δραστική και η πιο αποτελεσματική μέθοδος (Green, 2014).

Η μακροχρόνια χρήση των ζιζανιοκτόνων με σκοπό την καταπολέμησή των ζιζανίων οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας πολλών από αυτών, τόσο στον Ευρωπαϊκό χώρο, όσο και στην Αμερική (De Prado et al., 1997; Shaner, 1997). Η ανθεκτικότητα αυτή προέκυψε είτε από την ικανότητά τους να μεταβολίζουν το ζιζανιοκτόνο, είτε από την ικανότητα παρεμπόδισης των ζιζανιοκτόνων να προσδένονται στην ενεργό θέση των χρήσιμων για την ανάπτυξή τους ενζύμων (Tan et al., 2005).

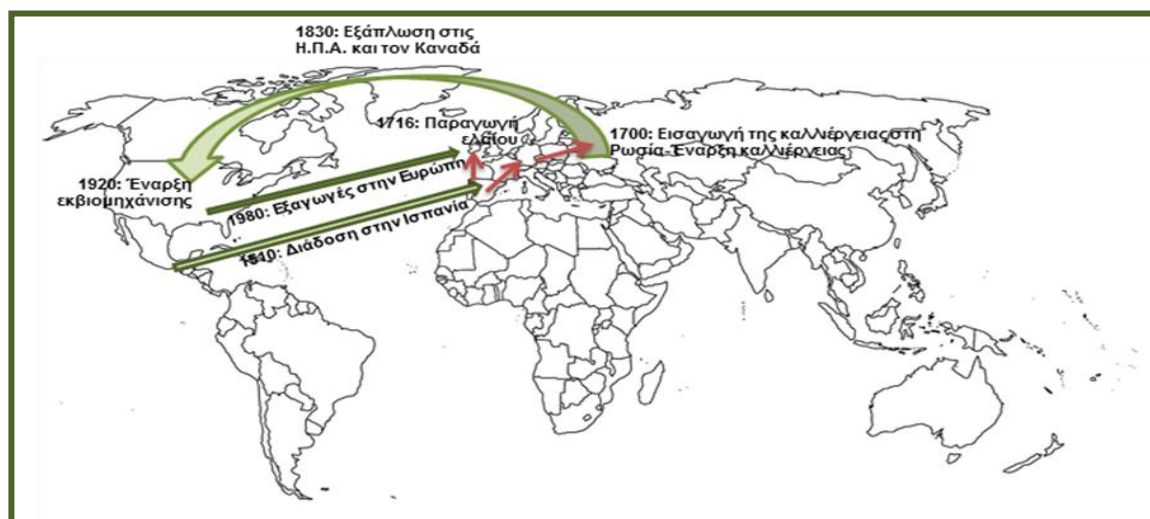
Στην Ελλάδα, το 1986, διάφοροι πληθυσμοί *Echinochloa crus galli* (μουχρίτσα) σε καλλιέργειες ρυζιού εμφανίστηκαν να είναι ανθεκτικοί στην ουσία propanil (Giannopolitis and Vassilou, 1989; De Prado et al., 1997), ενώ το 1998, το ζιζάνιο *Papaver rhoeas* (παπαρούνα) παρουσίασε ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα που αναστέλλουν το ένζυμο AHAS σε καλλιέργεια σκληρού σιταριού (www.weedscience.org).

Η προαγόμενη ανθεκτικότητα των ζιζανίων στα ζιζανιοκτόνα οδήγησε στη δημιουργία ζιζανιοκτόνων νέας γενιάς, όπου δρουν εκλεκτικά, με στοχευμένη δράση στη φωτοσύνθεση, στο μεταβολισμό του κυττάρου, αλλά και στη διαίρεση ή αύξηση του κυττάρου των φυτών, παρεμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη των ζιζανίων χωρίς ζημιωγόνες επιδράσεις στις καλλιέργειες (Ελευθεροχωρινός, 2009). Παράλληλα έμφαση δόθηκε στο να δημιουργηθούν νέες ποικιλίες και υβρίδια με ανθεκτικότητα στα εφαρμοζόμενα ζιζανιοκτόνα, μέσω της επιλογής (κλασικής βελτίωσης) ή της γενετικής τροποποίησης των φυτών (Tan et al., 2005). Απώτερο στόχο των ερευνών αυτών αποτέλεσε και αποτελεί η επίτευξη της γρηγορότερης, αποτελεσματικότερης και οικονομικότερης αντιμετώπισης των ζιζανίων μέσω του συνδυασμού των ανθεκτικών καλλιεργειών

στα ζιζανιοκτόνα και της εφαρμογής ζιζανιοκτόνων νέας γενιάς, η ανακάλυψη νέων τρόπων δράσης των ζιζανιοκτόνων, αλλά και πιο φιλικών ζιζανιοκτόνων στο περιβάλλον (Green, 2014; Renton et al., 2014; Shaner and Beckie, 2014).

1.2. Ηλίανθος και καταπολέμηση ζιζανίων

Ο ηλίανθος (*Helianthus annuus* L.) αποτελεί σταυρογονιμοποιούμενο φυτό, διπλοειδές με $2n = 34$ (Kaya et al., 2012), της οικογένειας Compositae ή Asteraceae. Ως κέντρο καταγωγής του είδους θεωρείται η περιοχή της Κεντρικής Αμερικής, όπου κατά τα προϊστορικά χρόνια χρησιμοποιούνταν ως τροφή από το γηγενή πληθυσμό. Η διάδοσή του στον Ευρωπαϊκό χώρο φαίνεται να έλαβε χώρα από τους Ισπανούς εξερευνητές, κατά την ανακάλυψη της Αμερικής, όπου και χρησιμοποιήθηκε αρχικά κυρίως ως καλλωπιστικό φυτό (Εικόνα 1). Έπειτα από την εξάπλωση της καλλιέργειάς του στην πρώην Σοβιετική ένωση, μετά το 1830 ξεκίνησε η παραγωγή ηλιέλαιου, όπου αποτέλεσε την κύρια πηγή ελαίου στην πρώην Σοβιετική Ένωση, την Ανατολική Ευρώπη και την Αργεντινή και ακολούθως εξαπλώθηκε στον Καναδά και τις Η.Π.Α. (Γαλανοπούλου-Σενδούκα, 2002; Kaya et al., 2012).



Εικόνα 1. Διάδοση και εξάπλωση του ηλίανθου (*Helianthus annuus* L.)

Στην Ελλάδα, ο ηλίανθος αρχικά καλλιεργήθηκε, κυρίως στη Βόρεια Ελλάδα, στην περιοχή της Θράκης για το σπόρο του, ενώ αύξηση της καλλιέργειάς του παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη περιοχή αλλά και στη Μακεδονία, με σκοπό την παραγωγή ελαίου (Γαλανοπούλου-Σενδούκα, 2002). Τα τελευταία χρόνια, η καλλιέργεια του παρουσιάζει αύξηση ως ενεργειακή καλλιέργεια, κυρίως με σκοπό την παραγωγή βιοκαύσιμου, λόγω της κοινοτικής οδηγίας (2030/30ΕΚ) που θέλει να υποκαταστήσει τα συνολικά καύσιμα έως και 10% μέχρι το 2020 με βιοκαύσιμα. Επίσης, καλλιεργείται και για την παραγωγή βιομάζας (pellets), παράλληλα με άλλα ενεργειακά φυτά, όπως η αγριαγκινάρα, η ελαιοκράμβη κ.ά..

Ο έλεγχος των ζιζανίων στην καλλιέργεια του ηλίανθου θεωρείται πολύ σημαντικός λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζει ιδιαίτερα κατά τα νεαρά στάδια ανάπτυξής του. Σε αυτά τα στάδια ο ηλίανθος έχει αργή ανάπτυξη μέχρι το στάδιο της ανάπτυξης του άνθους. Τα ζιζάνια είναι πολύ ανταγωνιστικά ως προς την υγρασία, τα θρεπτικά συστατικά και ανάλογα το είδος, ως προς το φως και το χώρο, με αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης του ηλίανθου σε ένα ποσοστό 20-70% (Blamey et al., 1997)

Ένας τρόπος αντιμετώπισης των ζιζανίων του ηλίανθου είναι η εφαρμογή μεταφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων με κύρια δράση τους την αντιμετώπιση των αγρωστωδών ζιζανίων (Pfenning et al., 2008). Επίσης, συνίσταται η εφαρμογή των ζιζανιοκτόνων των ομάδων των Dinitroanilines ή των Chloroacetamides προφυτρωτικά, καθώς και η εφαρμογή τους σε συνδυασμό με το όργανο. Αυτά τα ζιζανιοκτόνα αντιμετωπίζουν στενά πλατύφυλλα αγρωστώδη αλλά δεν αντιμετωπίζουν επαρκώς ζιζάνια όπως το *Xanthium strumarium*, *Datura stramonium*, *Ambrosia artemisiifolia* και *Sonchus spp.*

Η οροβάγχη (*Orobanche spp.*) αποτελεί έναν από τους βασικούς εχθρούς της καλλιέργειας του ηλίανθου. Πρόκειται για ένα ολοπαράσιτο, το οποίο προσκολλάται στη ρίζα του φυτού ξενιστή, απορροφώντας θρεπτικά συστατικά για την επιβίωσή του με αποτέλεσμα τη νέκρωση του φυτού. Μία αποτελεσματική προσέγγιση καταπολέμησης των ζιζανίων σήμερα που καθιστά εφικτό το δραστικό έλεγχο ζιζανίων, σαν την οροβάγχη, τα οποία δεν μπορούσαν στο παρελθόν να καταπολεμηθούν, είναι να αλλάξουν τα φυτά γενετικά με παραδοσιακές ή διαγονιδιακές τεχνικές.

Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει στο ζιζανιοκτόνο να δρα στα ζιζάνια, ενώ δεν επηρεάζει την καλλιέργεια, λόγω της μη πρόσδεσης στο ένζυμο-στόχο του εκάστοτε ζιζανιοκτόνου. Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι αυτή κατά την οποία το τροποποιημένο φυτό υποβαθμίζει το ζιζανιοκτόνο για παράδειγμα με ταχεία αποδόμηση πριν το ζιζανιοκτόνο φτάσει στο ένζυμο στόχο. Αυτές οι καλλιέργειες προσδιορίζονται σαν «Ανθεκτικές Καλλιέργειες» στο ζιζανιοκτόνο (Pfenning et al., 2008).

1.3. Ζιζανιοκτόνα αναστολείς του ενζύμου AHAS

Τα ζιζανιοκτόνα αναστολείς του ενζύμου AHAS άρχισαν να χρησιμοποιούνται στις αρχές της δεκαετίας του 1980 (Yu and Powles, 2014; Pandolfo et al., 2015), όπου αποτέλεσαν και αποτελούν πολύ σημαντικά εργαλεία για τον έλεγχο των ετήσιων και πολυετών ζιζανίων τόσο προφυτρωτικά όσο και μεταφυτρωτικά σε διάφορες καλλιέργειες ή σε μη γεωργικές εκτάσεις (Ελευθεροχωρινός, 2009, Yu and Powles, 2014), αντιμετωπίζοντας αποτελεσματικά ακόμα και έναν από τους πιο σοβαρούς εχθρούς τους την οροβάγχη.

Η πρώτη δραστική ουσία ανακαλύφθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1970 και ήταν το chlorsulfuron της ομάδας των σουλφονουριών (Ελευθεροχωρινός, 2009; Yu and Powles, 2014), ενώ σήμερα η ομάδα αυτή περιλαμβάνει συνολικά πέντε χημικές ομάδες ζιζανιοκτόνων: των σουλφονουριών (SUs), των ιμιδαζολινονών (IMIs), των τριαζολοπυριμιδίνων (TP), των πυριμιδινυλιοβενζοϊκών (PTBs) και των σουλφολαμινοκαρβονυλοτρίαζολινονών (SACTs). Τα ζιζανιοκτόνα αυτά έχουν εξειδικευμένη δράση στις κυτταρικές ή τις μεταβολικές λειτουργίες και συγκεκριμένα παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση των αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού.

Η αναστολή του ενζύμου AHAS επιφέρει στο φυτό τη σταδιακή νέκρωσή του, αφού παρεμποδίζει την παραγωγή των αμινοξέων, βαλίνης, ισολευκίνης και λευκίνης, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή του. Επίσης, με την επακόλουθη αναστολή της πρωτεϊνικής δράσης, διαταράσσεται και η λειτουργία της φωτοσύνθεσης των φυτών (Shaner and Singh, 1991). Οι ομάδες αυτές των ζιζανιοκτόνων-αναστολέων του AHAS έχουν το πλεονέκτημα ότι ελέγχουν ένα πολύ μεγάλο αριθμό ζιζανίων (περίπου 101 είδη). Επίσης, παρέχουν πρόσθετα πλεονεκτήματα, όπως είναι η χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά, η εκλεκτική δράση, η χρήση μικρών δόσεων δραστικής ουσίας καθώς και ο μη περιορισμός στο χρόνο εφαρμογής τους (Bulos et al., 2013).

1.4. Ιμιδαζολινόνες

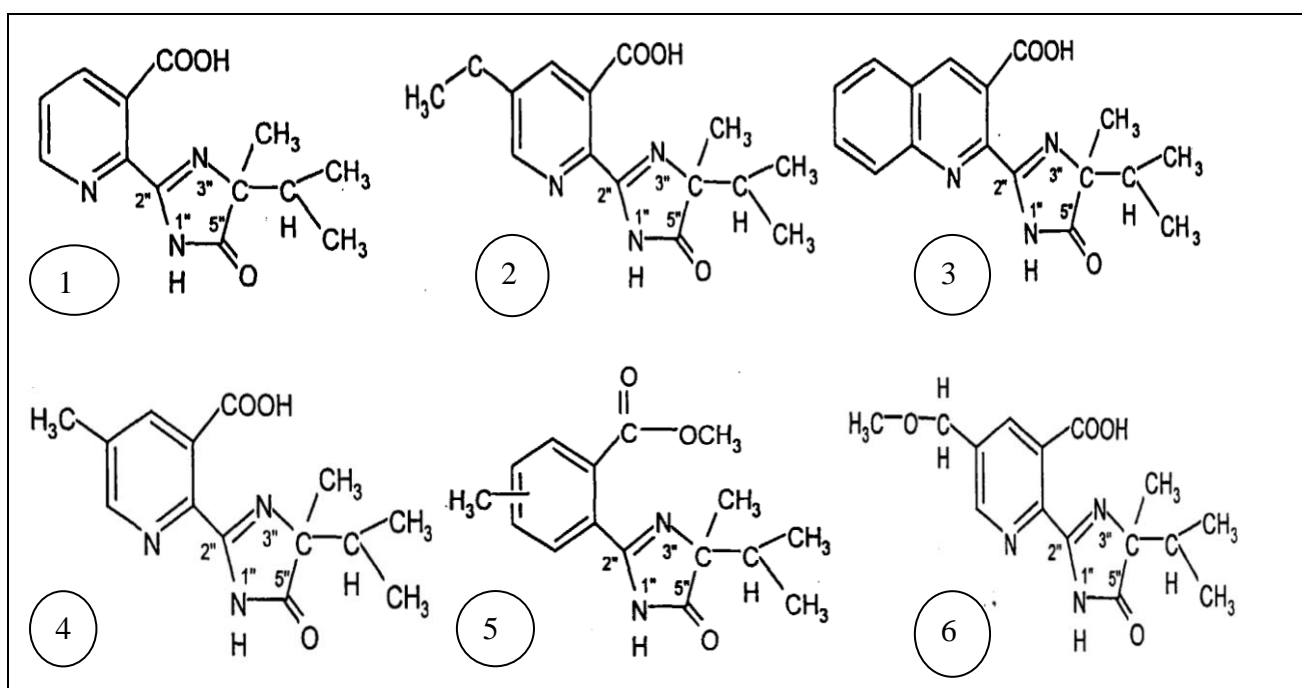
Οι ιμιδαζολινόνες αποτελούν μία ομάδα των ζιζανιοκτόνων αναστολέων του ενζύμου AHAS. Η ομάδα των ιμιδαζολινονών ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '80 και άρχισε να χρησιμοποιείται στις αρχές του '90 για την καταπολέμηση των πλατύφυλλων και αγρωστωδών ζιζανίων.

Η απορρόφησή τους είναι δυνατή τόσο από τις ρίζες όσο και από τα φύλλα των φυτών, ενώ μετακινούνται στους μεριστωματικούς ιστούς τόσο αποπλαστικά όσο και συμπλαστικά. Η δράση τους στο φύλλωμα εκδηλώνεται εντός ολίγων ημερών από την εφαρμογή τους, ενώ η δράση τους μετά από την απορρόφησή τους από τις ρίζες εκδηλώνεται εντός ολίγων ημερών από το φύτεμα των ζιζανίων.

Μειονέκτημα της ομάδας αυτής θεωρείται ο χρόνος παραμονής τους στο έδαφος, όπου συχνά είναι μεγαλύτερος από 12 μήνες και συνεπώς δεν μπορούν να αναπτυχθούν καλλιέργειες οι οποίες είναι ευαίσθητες σε αυτές, όπως είναι τα τέυτλα, η τομάτα, η πιπεριά, το κρεμμύδι και τα κουκιά (Alister and Kogan, 2004) με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εγκατασταθούν στον αγρό την επόμενη καλλιεργητική περίοδο (Ramezani, 2007). Σημαντικό ρόλο για την αποικοδόμησή τους, όπου γίνεται κατά κύριο λόγο μέσω φωτοαποδόμησης και λιγότερο μέσω υδρόλυσης, φαίνεται να παίζει

το pH του εδάφους, η φωτεινότητα της ηλιακής ακτινοβολίας και η παρουσία μικροοργανισμών (Ramezani, 2007; Alister and Kogan, 2004).

Στην ομάδα των ζιζανιοκτόνων αυτή ανήκουν οι δραστικές ουσίες imazamethabenz methyl, imazapic, imazapyr, imazaquin, imazethapyr και imazamox, ενώσεις που αποτελούνται από έναν αρωματικό δακτύλιο (συνήθως πυριδίνη), την καρβοξυλική ομάδα και τον ιμιδαζολινικό δακτύλιο (Εικόνα 2). Εξαιρέση αποτελούν η ένωση imazaquin όπου έχει μία κινολίνη και η ένωση imazamethabenz methyl που αποτελείται από ένα βενζολικό δακτύλιο. Οι ιμιδαζολινόνες με πυριδινικό δακτύλιο διαφέρουν μεταξύ τους στη θέση 5 του πυριδινικού δακτυλίου, με τα imazapyr, imazapic, imazethapyr και imazamox να έχουν αντίστοιχα στη θέση αυτή υδρογόνο, μεθύλιο, αιθύλιο και μεθοξυμέθυλο (Tan et al., 2005).



Εικόνα 2. Συντακτικός τύπος των imazapyr (1), imazethapyr (2), imazapic (3), imazaquin (4), imazamethabenz methyl (5) και imazamox (6)

Το imazamox με χημική ονομασία (\pm) -2-[4,5-dihydro-4-methyl-4-(1-methylethyl)-5-oxo-1H-2,3-imidazol-2-yl]-5-(methoxymethyl)-3-pyridinecarboxylic acid εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στη γεωργία το 1995 και πλέον χρησιμοποιείται σε μεγάλη κλίμακα σε καλλιέργειες κυρίως ψυχανθών, όπως είναι τα φασόλια, η σόγια, η μηδική, καθώς και σε άλλες καλλιέργειες όπως είναι το καλαμπόκι, η ελαιοκράμβη, το ρύζι, το σιτάρι και ο ηλίανθος (Pfenning et al., 2008). Το imazamox χρησιμοποιείται μεταφυτρωτικά για την καταπολέμηση πληθώρας ζιζανίων αλλά και της οροβάγλης στη φακή, τον ηλίανθο, τον καπνό και την τομάτα (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010), με τη μικρή υπολειμματική του δραστηριότητα σε σύγκριση με την υπόλοιπη ομάδα των

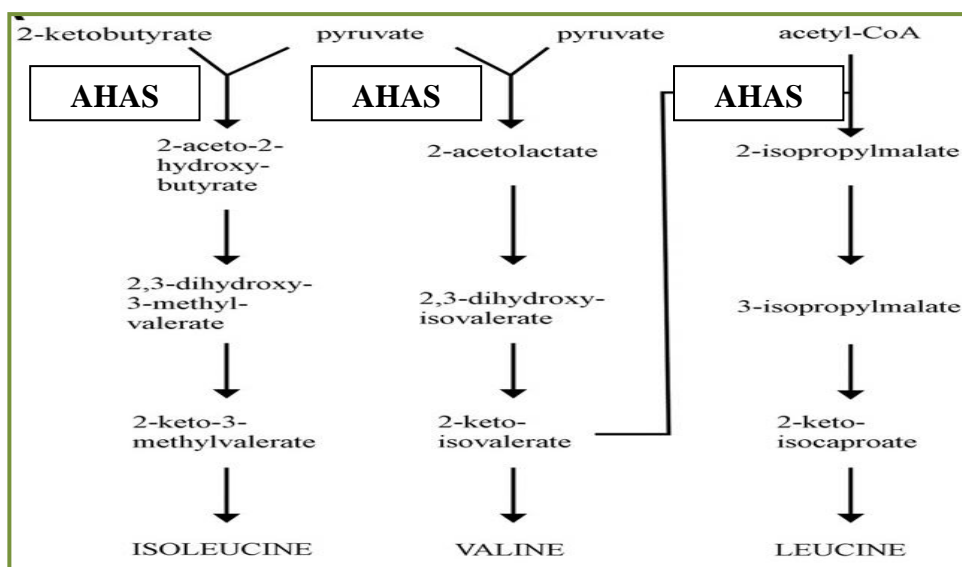
μιδαζολινονών να αποτελεί το κυριότερο πλεονέκτημά του (Pfenning et al., 2008; Zhou et al., 2007).

1.5. Συνθετάση του ακετοϋδροξικού οξέος: Acetohydroxyacid synthase (AHAS)

1.5.1. Ένζυμο AHAS

Τα φυτά και πολλοί μικροοργανισμοί, όπως μύκητες, άλγη και βακτήρια, οι οποίοι είναι αυτότροφοι οργανισμοί, έχουν την ικανότητα σύνθεσης από ανόργανες ενώσεις όλων των απαραίτητων αμινοξέων και μεταβολιτών που χρειάζονται για την επιβίωση τους. Αυτό σημαίνει ότι εμπεριέχουν ένα πλήρες σύστημα βιοσύνθεσης αυτών των ενώσεων και των ενζύμων που τις συνθέτουν. Τα μονοπάτια της σύνθεσης των αμινοξέων, όπως και τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές είναι στόχος πολλών ζιζανιοκτόνων (Duggleby and Pang, 2000; Duggleby et al., 2008).

Η συνθετάση του ακετοϋδροξικού οξέος, **acetohydroxyacid synthase (AHAS; EC 4.1.3.18)**, γνωστή και σαν συνθετάση του οξικογαλακτικού οξέος ή οξικογαλακτική συνθετάση, **acetolactatesynthase (ALS)**, είναι το πρώτο ένζυμο στη βιοσύνθεση της διακλαδιζόμενης αλυσίδας των αμινοξέων βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, τα οποία φέρουν διακλαδιζόμενη αλυσίδα ατόμων άνθρακα απαραίτητα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών (Εικόνα 3). Επίσης αποτελούν πρόδρομες ουσίες κατά τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών (κυανογενή γλυκοζίδια, γλυκοζινολικά, ακυλιωμένα σάκχαρα).



Εικόνα 3. Αντιδράσεις βιοσύνθεσης της διακλαδιζόμενης αλυσίδας αμινοξέων τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών (Duggleby et al., 2008)

Το ένζυμο AHAS απαντάται στα προπλαστίδια των μεριστωματικών ιστών των φυτών και τους χλωροπλάστες των φύλλων, ενώ συναντάται και στα μιτοχόνδρια των μυκήτων (Chipman et al., 1998). Το AHAS καταλύει την αντίδραση συμπύκνωσης δύο μορίων πυροσταφυλικού οξέος για την παραγωγή α-οξικογαλακτικού οξέος ή/και την αντίδραση συμπύκνωσης ενός μορίου πυροσταφυλικού οξέος και ενός μορίου α-κετοβουτυρικού οξέος για την παραγωγή CO₂ και α-ακετουδροξυβουτυρικού οξέος. Οι δύο αυτές ουσίες είναι απαραίτητες για τη μετέπειτα βιοσύνθεση των αμινοξέων βαλίνης και ισολευκίνης. Η βιοσύνθεση της λευκίνης πραγματοποιείται μέσω τριών διαδοχικών ενζυμικών αντιδράσεων χρησιμοποιώντας τη βαλίνη σαν πρόδρομο και το α-κετο-ισοβαλερικό οξύ (Ελευθεροχωρινός, 2009; Duggleby and Pang, 2000).

Το ένζυμο AHAS αποτελείται από δύο υπομονάδες, την καταλυτική και τη ρυθμιστική. Η καταλυτική υπομονάδα συντίθεται σαν μία μεγάλη πρόδρομη πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 59-66kDa, ανάλογα με τον ευκαρυωτικό οργανισμό (Chipman et al., 1998). Η ρυθμιστική υπομονάδα δεν συμμετέχει στην κατάλυση της βιοσύνθεσης της διακλαδιζόμενης αλυσίδας των αμινοξέων, αλλά βοηθά στη δράση της καταλυτικής υπομονάδας. Το μοριακό βάρος της καταλυτικής υπομονάδας διαφέρει ανάλογα με το είδος καθώς στα βακτήρια έχει μέγεθος 10-20 kDa, στους μύκητες περίπου 34 kDa, ενώ στα φυτά είναι μεγαλύτερη από 50 kDa. Η καταλυτική υπομονάδα ονομάζεται αλλιώς μεγάλη υπομονάδα (large subunit) και η ρυθμιστική ονομάζεται μικρή υπομονάδα (small subunit) (Duggleby et al., 2008; Chipman et al., 2005; Yu and Powles, 2014).

1.5.2. Ενεργό κέντρο του ενζύμου AHAS

Η κρυσταλλική δομή του AHAS έχει μελετηθεί εκτενώς στο ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* παρουσία ή απουσία του προσδεμένου ζιζανιοκτόνου (Chipman et al., 2005). Παρομοίως, η κρυσταλλική δομή του AHAS, έχει αναλυθεί και στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, με ή χωρίς την εφαρμογή ζιζανιοκτόνων της ομάδας των σουλφονουριών και των ιμιδαζολινονών (Yu and Powles, 2014). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η καταλυτική υπομονάδα αποτελείται από ένα διμερές σύμπλοκο, το οποίο περιέχει δύο μονομερή με δύο ενεργά κέντρα.

Η καταλυτική υπομονάδα του AHAS απαιτεί τρεις ενώσεις για να δραστηριοποιηθεί, τη διφωσφορική θειαμίνη (Thiamine diphosphate -ThDP), το δισθενές ιόν του μαγνησίου (Mg²⁺) και το δινοουκλεοτίδιο φλαβινοαδενίνη FAD (Flavinadenine dinucleotide), με πιο σημαντικό παράγοντα για τον καταλυτικό μηχανισμό να είναι η ThDP, όπου βρίσκεται στο κέντρο της ενεργού θέσης του ενζύμου, όπου κάθε C2 άτομο προκαλεί κατάλυση και καθορίζει το ενεργό κέντρο. Σε όλα τα ένζυμα, στα οποία η δράση τους εξαρτάται από την ThDP, δημιουργείται μία αντίδραση γνωστή ως V-διαμόρφωση στο ενεργό κέντρο. Η διαμόρφωση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα η 4'-NH₂ ομάδα, να έρχεται πολύ κοντά στο C2-H άκρο της ομάδας του θειαζολίου (Chipman et al., 2005).

Όταν υπάρχει πυκνότητα ηλεκτρονίων μεταξύ των πυριμιδίνων και του θειαζόλιου δακτυλίου, συγκεκριμένα μεταξύ του C5 και C7 δακτυλίου των πυριμιδινών και του N3 ατόμου του θειαζόλιου δακτυλίου δημιουργείται η V-διαμόρφωση (Duggleby et al., 2008). Επομένως, παρουσιάζεται ένα ογκώδες υδρόφοβο υπόλειμμα, το οποίο βρίσκεται κάτω από το ένζυμο. Η αντίδραση αυτή πιθανολογείται ότι είναι η αιτία στην εκκίνηση της κατάλυσης.

Το ιόν Mg^{2+} βοηθά στην καταλυτική δραστηριότητα του AHAS, δεσμεύοντας το συνένζυμο ThDP, στο AHAS (Duggleby et al., 2008). Το δινουκλεοτίδιο φλαβινοαδενίνη (FAD), βοηθά στη λειτουργία του ThDP και συγκεκριμένα όταν γίνεται οξειδωση του υδροξυαιθυλενίου, χωρίς το FAD να έχει οξειδοαναγωγικές λειτουργίες (Duggleby et al., 2008; Chipman et al., 1998).

Οι σουλφονουρίες και οι ιμιδαζολινόνες δε μπορούν να προσδεθούν ακριβώς πάνω στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά προσδέονται σε ένα κανάλι κοντά σε αυτό που αποτελείται από 18 γειτνιακά αμινοξέα (McCourt et al., 2006) εμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση του υποστρώματος, δηλαδή του προδρόμου των αμινοξέων, στο ενεργό κέντρο και ως εκ τούτου να αναστέλλεται η καταλυτική δραστηριότητα του AHAS. Η αντικατάσταση αυτών των αμινοξέων με άλλα (μεταλλάξεις), έχει ως αποτέλεσμα τα ζιζανιοκτόνα να μη μπορούν να προσδεθούν στη θέση αυτή, συνεπώς το ένζυμο να συνεχίζει τη φυσιολογική του λειτουργία και ως εκ τούτου να επιτυγχάνεται η ανθεκτικότητα των φυτών αυτών στο ζιζανιοκτόνο (Yu and Powles, 2014).

1.5.3. Γονίδια AHAS που κωδικοποιούν την καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου

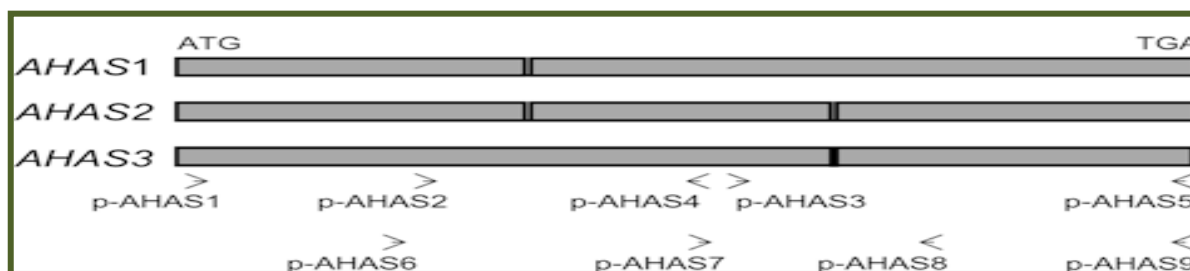
Το ένζυμο AHAS φαίνεται ότι έχει μεγάλο εύρος όσον αφορά τον αριθμό των γονιδίων (ομόλογα) που το κωδικοποιούν, όπως και τον τρόπο έκφρασης τους στα διάφορα φυτικά είδη. Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα με το είδος και το επίπεδο πλοειδίας του φυτού, μπορούν να διαφέρουν ως προς τον αριθμό γονιδίων AHAS που κωδικοποιούν την καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου AHAS, καθώς επίσης η πλοειδία του οργανισμού μπορεί να κάνει πιο δύσκολη την εύρεση και κατανόηση των γονιδίων αυτών.

Πολλαπλά AHAS γονίδια έχουν βρεθεί σε πολλά φυτικά είδη που διαφέρουν σε γένος και αριθμό πλοειδίας (Mestanza et al., 2015). Στην *Arabidopsis thaliana*, το ένζυμο AHAS κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο (Mazur et al., 1987), το ίδιο συμβαίνει και στα είδη *Beta vulgaris*, *Cichorium intybus*, *Papaver rhoeas*. Στον καπνό (*Nicotiana tabacum*) (Keeler et al., 1993), το ένζυμο κωδικοποιείται από δύο γονίδια AHAS, όπως και στο καλαμπόκι (*Zea mays*). Στο σιτάρι (*Triticum aestivum*), το ένζυμο AHAS κωδικοποιείται από τρία γονίδια AHAS αλλά μόνο τα δύο έχουν γνωστό μεταγράφημα, ενώ στη σόγια (*Glycine max* (L) Merr.) έχουν βρεθεί τέσσερα γονίδια AHAS

αλλά ένα μόνο μεταγράφημα παρατηρείται στα φύλλα ενώ τα άλλα δεν έχουν ανιχνευτεί ή εξεταστεί ακόμα σε κανέναν ιστό (Ghio et al., 2013).

Αντίθετα, στην ελαιοκράμβη (*Brassica napus*) και το βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*) έχει πραγματοποιηθεί μία πιο ολοκληρωμένη μοριακή μελέτη των αντίστοιχων γονιδίων. Η ελαιοκράμβη έχει πέντε γονίδια *AHAS* (Rutledge et al., 1991), ενώ το βαμβάκι έχει έξι γονίδια *AHAS* (Gula et al., 1995), από τα οποία τα τέσσερα θεωρούνται λειτουργικά (Ochogavía et al., 2014). Πρόσφατα, στο ρεβύθι (*Cicer arietinum* L.) βρέθηκαν δύο γονίδια (Thompson and Taran, 2014). Τέλος, πολλαπλά *AHAS* γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί σε άλλα ζιζάνια (Intanon et al., 2011; Iwakami et al., 2012, Uchino et al., 2007; Uchino and Watanabe, 2002; Warwick et al., 2010).

Η μελέτη των γονιδίων που κωδικοποιούν την καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου *AHAS* στον ηλίανθο, άρχισε το 2004, εξετάζοντας άγριους και καλλιεργούμενους τύπους ηλίανθου, οι οποίοι παρουσίαζαν ευαισθησία ή ανθεκτικότητα μετά από επεμβάσεις με ζιζανιοκτόνα των σουλφονουριών και των ιμιδαζολινονών (Kolkman et al., 2004). Η ταυτοποίηση των γονιδίων *AHAS* έγινε με τη χρήση εκκινητών DNA από αλληλουχίες του φυτού *Xanthium strumarium* L. και από άλλα είδη *Lactuca*. Πολλαπλοί συνδυασμοί εκκινητών που είχαν χρησιμοποιηθεί σε αυτά τα φυτά δοκιμάστηκαν για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του *AHAS* ευαίσθητων και ανθεκτικών καθαρών σειρών ηλίανθου. Όταν οι DNA αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν, τότε παρατηρήθηκαν τα τρία ομόλογα *AHAS* γονίδια του ηλίανθου, τα οποία ονομάστηκαν *AHAS1*, *AHAS2*, *AHAS3*.



Εικόνα 4. Οι κωδικοποιημένες περιοχές των γονιδίων *AHAS1*, *AHAS2*, *AHAS3* στον ηλίανθο (1,959–1,977 νουκλεοτίδια στο *AHAS1*, 1,941–1,947 νουκλεοτίδια στο *AHAS2*, 1,941 νουκλεοτίδια στο *AHAS3*). Οι θέσεις των ενθέσεων ή απαλοιφών (insertion-deletions, INDELS) προσδιορίζονται με κενά. Οι θέσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται με τα βέλη κάτω από την ευθυγράμμιση των γονιδίων (Kolkman et al., 2004)

Η πλήρης ταυτοποίηση έγινε με έλεγχο της αλληλουχίας από το 5' και το 3' άκρο. Αξιοσημείωτο ήταν ότι στην αλληλουχία των *AHAS* γονιδίων του ηλίανθου δεν υπήρχαν ιντρόνια. Οι αμινοξέϊκές αλληλουχίες των γονιδίων του ηλίανθου ευθυγραμμίστηκαν με τα *AHAS* γονίδια της καταλυτικής

υπομονάδας της *Arabidopsis* και του *Xanthium strumarium*. Η αριθμοδότηση έγινε σύμφωνα με την αλληλουχία της *Arabidopsis*.

Τα τρία γονίδια *AHAS* του ηλιάνθου παρουσίασαν διαφορετικό βαθμό ομοιότητας μεταξύ τους. Το *AHAS11* και το *AHAS12* παρουσίασαν 92% ομοιότητα μεταξύ τους, σε αντίθεση με το *AHAS13* που ήταν 72% όμοιο με το *AHAS11* και 73% όμοιο με το *AHAS12*. Το *AHAS12* διέφερε από το *AHAS11* στην απαλοιφή εννέα ζευγαριών βάσεων στα κωδικόνια 435-437. Παρομοίως το *AHAS13* φάνηκε να διαφέρει επίσης από το *AHAS11* και το *AHAS2* στην απαλοιφή τριών ζευγαριών βάσεων, στην ίδια θέση και την εισαγωγή εννέα ζευγαριών βάσεων μεταξύ των κωδικονίων 268-269 (Kolkman et al., 2004)(Εικόνα 4).

1.6. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στα ζιζανιοκτόνα

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα διακρίνονται σε δύο τύπους, ο ένας περιλαμβάνει τους μηχανισμούς μη στοχευμένης δράσης (non target-site resistance / NTSR), ενώ ο άλλος τους μηχανισμούς στοχευμένης δράσης (target-site resistance / TSR) (Powles and Yu, 2010; Delye et al., 2015; Yu and Powles, 2014).

Πιο συγκεκριμένα η **ανθεκτικότητα μη στοχευμένης δράσης (NTSR)** προκαλείται είτε από μείωση της πρόσληψης ή της μετακίνησης του ζιζανιοκτόνου στο φυτό, την αποτοξικοποίηση, την αποδόμηση και το μεταβολισμό του ζιζανιοκτόνου, είτε μέσω της παγίδευσης του ζιζανιοκτόνου στα χυμοτόπια ή στον αποπλάστη των κυττάρων (Yuan et al., 2006; Powles and Yu, 2010; Yu and Powles, 2014; Delye et al., 2015). Ένα παράδειγμα ανθεκτικότητας τέτοιου τύπου σε ζιζανιοκτόνα είναι αυτών που αναστέλλουν τη δράση του κυτοχρώματος μονοοξυγονάση P450 (P450s) το οποίο εμπλέκεται στο μεταβολισμό του φυτού, ένα τέτοιο ζιζανιοκτόνο είναι το diclofop-methyl και φυτά ανθεκτικά σε αυτό φάνηκαν να είναι το *Lolium rigidum* και το *Avena sterilis*. Οι μελέτες που αφορούν το P450 είναι μέχρι στιγμής πολύ περιορισμένες (Yuan et al., 2006; Powles and Yu, 2010). Ένας άλλος μηχανισμός μη στοχευμένης δράσης, που έχει παρατηρηθεί, είναι αυτός της οικογένειας των ενζύμων των τρανσφερασών της γλουταθειόνης S (Glutathione S- Transferases/GSTS), οι οποίες δρουν προστατευτικά κατά της οξειδωσης στα κενοτόπια ή τις άκρες των ριζών, συμμετέχοντας στην αποτοξικοποίηση του ζιζανιοκτόνου. Επίσης, οι γλυκοζυλοτρασφεράσες έχουν βρεθεί πολλές φορές να συμμετέχουν στην αποτοξικοποίηση των ζιζανιοκτόνων. Φυτά που έχουν τέτοιο μηχανισμό είναι τα ζιζάνια *Lolium spp.* και *Alopecurus myosuroides*, παρουσιάζοντας ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα των αρυλοξυφαινοξυαλκανοϊκών και κυκλοεξανδιονών. Οι μεταφορείς ABC δρουν διαχωρίζοντας τα ζιζανιοκτόνα και τους μεταβολίτες τους με αποτέλεσμα την αποτοξικοποίησή τους, για παράδειγμα αυτό συμβαίνει σε ανθεκτικούς ψεκάσμούς *Conyza spp.* μετά από εφαρμογή του glyphosate (Tani et al., 2015; Yuan et al., 2006). Τέλος, η μετατόπιση της

μεταφοράς του paraquat, μέσω της ενεργοποίησης του δραστικού οξυγόνου των ειδών οδηγεί κι αυτή σε ανθεκτικότητα του ζιζανιοκτόνου αυτού (Powles and Yu, 2010).

Η **ανθεκτικότητα στοχευμένης δράσης (TSR)** οφείλεται σε ζιζανιοκτόνα που στοχεύουν σε συγκεκριμένο ένζυμο ή πρωτεΐνη. Η ανθεκτικότητα που προσδίδει αυτή η δράση μπορεί να οφείλεται στη μείωση της ευαισθησίας του στόχου του ζιζανιοκτόνου, η οποία επιτυγχάνεται είτε με μετάλλαξη σε κάποιο γονίδιο με συνέπεια την αλλαγή της αμινοξείκης αλληλουχίας του ενζύμου-στόχου στο ζιζανιοκτόνο (Tranel and Wright, 2002) και την αποτροπή της δέσμευσης του ζιζανιοκτόνου σε αυτό, είτε με αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου, ακόμα και με υπερπαραγωγή του (Powles and Yu, 2010; Delye et al., 2015). Στην ομάδα των σουλφονουριών και των ιμιδαζολινονών, το ένζυμο AHAS στην καταλυτική του υπομονάδα έχει υποστεί μετάλλαξη στο γονίδιο *AHAS1* με αποτέλεσμα να προκύπτουν φυτά ανθεκτικά σε αυτά τα ζιζανιοκτόνα (Sala et al., 2012a; Yu and Powles, 2014). Τα ζιζανιοκτόνα με στοχευμένη δράση έπαιζαν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη διαχείριση των ζιζανίων, ακόμα και πριν την ανάπτυξη ανθεκτικών καλλιεργειών σε αυτά (Tan et al., 2005; 2006).

Παρόμοιο μηχανισμό ανθεκτικότητας παρουσίασαν τα φυτά στα ζιζανιοκτόνα της ομάδας των τριαζιनों, τριαζινοनों, ουρακιλών, παραγώγων ουρίας, όπου παρεμποδίζουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο φωτοχημικό κέντρο του φωτοσυστήματος PSII. Τα ανθεκτικά φυτά έχουν την μετάλλαξη Ser264Gly στο χλωροπλαστικό γονίδιο *psbA*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη D1, με αποτέλεσμα να συνεχίζεται η ροή των ηλεκτρονίων στο PSII. Άλλες μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα αυτή είναι η Ser264Thr, η Val219Ile, η Asn266Thr, Ala251Val και η Phe255Ile. Για παράδειγμα τέτοιοι ανθεκτικοί βιότυποι είναι τα ζιζάνια *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Senecio vulgaris*, *Conyza spp.* (Powles and Yu, 2010; Ελευθεροχωρινός, 2009; Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010).

Επίσης, φυτά με ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα αναστολείς της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων, με στόχο το ένζυμο καρβοξυλάση του Ακετυλο-CoA (ACCCase). Τα ζιζανιοκτόνα αυτά περιλαμβάνουν τις ομάδες των αρυλοξυφαινολικών οξέων, τις κυκλοεξανδιόνες και τις φαινυλοπυραζολιόνες. Η ανθεκτικότητα των φυτών στις ομάδες αυτές οφείλεται σε μεταλλάξεις όπως οι Leu1781Ile, Asp2078Gly, Cys2088Arg. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε ζιζάνια όπως είναι το *Lolium rigidum*, *Alopecurus myosuroides*, *Avena sterilis* και *Setaria viridis* κ.α. (Powles and Yu, 2010; Ελευθεροχωρινός, 2009; Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010).

Ένα άλλο παράδειγμα είναι φυτών ανθεκτικών στο glyphosate, όπου η ανθεκτικότητά τους οφείλεται στο ανθεκτικό ένζυμο συνθετάση του 5-ενολο-πυροσταφυλοσικιμικού-3-φωσφορικού (EPSPS). Η αναστολή του ενζύμου αυτού αναστέλλει τη σύνθεση των αρωματικών αμινοξέων,

τροπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη και οδηγεί στη νέκρωση του φυτού, ενώ η μετάλλαξη που προκαλεί την ανθεκτικότητα είναι η Pro106Ser, η οποία γενικά προτείνεται ότι ελέγχει την ανθεκτικότητα. Οι μεταλλάξεις αυτές βρέθηκαν για παράδειγμα στα ζιζάνια *Eleusine indica*, *Lolium rigidum* κ.α.. Επίσης, η υπερέκφραση του ενζύμου EPSPS και η αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας έχει συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα στο glyphosate (Tani et al. 2015; Powles and Yu, 2010; Ελευθεροχωρινός, 2009; Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010).

Ακόμα έχει παρουσιαστεί ανθεκτικότητα των φυτών στα ζιζανιοκτόνα των ομάδων των δινιτροανιλινών, βενζαμιδιών, φωσφοροαμιδικών, πυριδινών και βενζοϊκών οξέων, όπου παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης, προκαλώντας ανάσχεση της αύξησης και της ανάπτυξης των ριζών. Η ανθεκτικότητα των φυτών έχει βρεθεί ότι οφείλεται στη μετάλλαξη Thr239Ile ή την Leu136Phe, ενώ μειωμένη ανθεκτικότητα παρουσιάζεται όταν υπάρχει η μετάλλαξη Met268Thr. Παραδείγματα τέτοιων μεταλλάξεων έχουν βρεθεί σε ζιζάνια όπως είναι τα *Eleusine indica* και *Setaria viridis* (Powles and Yu, 2010; Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010).

Υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στοχευμένης δράσης, όπως αυτές όπου προάγουν την ανθεκτικότητα των φυτών σε ζιζανιοκτόνα που αναστέλλουν τη βιοσύνθεση των αμινοξέων με διακλαδιζόμενη αλυσίδα που έχουν στόχο το ένζυμο AHAS ή ALS, όπου μετάλλαξη στη θέση δράσης τους οδηγεί στην ανθεκτικότητα των φυτών. Η ανθεκτικότητα που προκαλείται στην ομάδα αυτή περιγράφεται λεπτομερώς σε επόμενο κεφάλαιο.

1.7. Clearfield τεχνολογία

1.7.1. Δημιουργία του πρώτου ανθεκτικού ηλιάνθου στις ιμιδαζολινόνες

Ο ηλιάνθος πέραν της χρήσης του ως καλλιεργούμενο είδος, απαντάται και ως ζιζάνιο σε πολλά φυτά μεγάλης καλλιέργειας, όπως το καλαμπόκι, η σόγια, το σιτάρι και το ζαχαρότευτλο, με ανταγωνιστική δράση στην πρωιμότητα, στο ύψος και στη φυλλική επιφάνειά τους, σε πολλές περιοχές του κόσμου (White et al., 2002).

Στα μέσα της δεκαετίας του '90, η καλλιέργεια σόγιας [*Glycine max* (L) Merr.] στην περιοχή Rosville, βορειανατολικά του Κάνσας, αντιμετώπιζε σοβαρό πρόβλημα με τον ηλιάνθο ως ζιζάνιο. Για το λόγο αυτό, επί επτά συνεχόμενα χρόνια έγιναν εντατικές προσπάθειες αντιμετώπισης του προβλήματος με εφαρμογή ενός ζιζανιοκτόνου της ομάδας των ιμιδαζολινονών, το οποίο είχε ως δραστική ουσία το imazethapyr. Έπειτα από χρόνιους ψεκασμούς παρατηρήθηκε ότι κάποια φυτά ηλιάνθου άντεχαν μετά την επέμβαση και συνέχιζαν φυσιολογικά την ανάπτυξη τους, άρχισε δηλαδή να παρατηρείται ανθεκτικότητα των φυτών ηλιάνθου στο ζιζανιοκτόνο (Al-Khatib et al., 1998; Baumgartner et al., 1999).

Από τον άγριο πληθυσμό του ηλίανθου αυτού, έγινε διαχωρισμός των ανθεκτικών φυτών και επιλογή αυτών με το μεγαλύτερο βαθμό ανθεκτικότητας. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των σπόρων των ανθεκτικών φυτών και αυτοί φυτεύτηκαν για βλάστηση. Ακολούθως, ψεκάστηκαν τα φυτά ηλίανθου με imazethapyr, στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης της σόγιας, κατά το οποίο γινόταν προηγουμένως εφαρμογή με ζιζανιοκτόνο, για την καταπολέμηση του ηλίανθου-ζιζανίου. Ένα μέρος των φυτών ηλίανθου που ψεκάστηκαν παρουσίασε πλήρη ανθεκτικότητα. Τα φυτά που επιβίωσαν διασταυρώθηκαν με καλλιεργούμενους ηλίανθους, οι οποίοι καλλιεργούνται είτε για την παραγωγή ελαίου, είτε για την παραγωγή ηλίόσπορου.

Στη συνέχεια ακολούθησε εμβρυοκαλλιέργεια στα φυτά απογόνους και εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου, με δραστική ουσία το imazamox, στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης, όπως προηγουμένως. Συλλέχθηκε η γύρη των φυτών που παρουσίασαν ανθεκτικότητα και χρησιμοποιήθηκε για τεχνητή αυτογονιμοποίηση στους ήδη υπάρχοντες γονείς.

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για πολλά χρόνια, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός αποθέματος ηλίανθου, ο οποίος παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην ομάδα των ιμιδαζολινονών. Αυτές οι σειρές ονομάστηκαν *IMISUN-1*, *IMISUN-2* και *IMISUN-3* (Al-Khatib et al., 2000). Με τη χρήση σπόρων της F2 γενιάς, κατέστη δυνατός ο έλεγχος της ανθεκτικότητας των φυτών στο imazamox, τόσο στο θερμοκήπιο στις εγκαταστάσεις του USDA Northern Crop Science Laboratory όσο και στον αγρό και το θερμοκήπιο του Περγαμίνου, της Αργεντινής (Bruniard et al., 2001).

Οι γονότυποι των φυτών του ηλίανθου, οι οποίοι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις ιμιδαζολινονές, έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιούνται πλέον από πολλές εταιρείες για την παραγωγή ανθεκτικών καθαρών σειρών και ποικιλιών. Έτσι δημιουργήθηκαν οι πρώτες καθарές σειρές με μια φυσική μετάλλαξη στο γονίδιο *AHAS1*, γνωστές ως «Clearfield» ηλίανθοι στις ΗΠΑ, την Αργεντινή και την Τουρκία το 2003 (Tan et al., 2005; Pfenning et al., 2008).

Σήμερα υπάρχουν κι άλλες καλλιέργειες, ανθεκτικές στα ζιζανιοκτόνα αναστολείς του ενζύμου AHAS, όπου η ανθεκτικότητα τους έχει προκύψει από εμβρυοκαλλιέργεια, επιλογή σωματικών κυττάρων, μεταλλάξεις, γενετική τροποποίηση, διειδικό υβριδισμό ή από επιλογή (Sala et al., 2008; 2012d), όπως το καλαμπόκι (*Zea mays* L.), η ελαιοκράμβη (*Brassica napus* L.), τα ζαχαρότευτλα (*Beta vulgaris* L.), το ρύζι (*Oryza sativa* L.), το βαμβάκι (*Gossypium hirsutum* L.), το λινάρι (*Linum usitatissimum* L.), η σόγια (*Glycine max* (L.) Merr.) και το σιτάρι (*Triticum aestivum* L.).

1.7.2. Η Clearfield τεχνολογία στον ηλίανθο

Ο περιορισμένος αριθμός ζιζανιοκτόνων που μπορούσαν να αντιμετωπίσουν τα ζιζάνια του ηλίανθου καθώς και το υψηλό τους κόστος οδήγησε στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας του

ηλίανθου στα ζιζανιοκτόνα. Για το λόγο αυτό άρχισε η ταυτοποίηση γονιδίων και η ανάπτυξη τεχνικών, ώστε να επιτευχθεί ο έλεγχος των ζιζανίων της καλλιέργειας.

Η Clearfield® τεχνολογία ή αλλιώς *IMISUN*, άρχισε να αναπτύσσεται το 1996, βασιζόμενη στην εκμετάλλευση της εύρεσης ανθεκτικότητας φυτών ηλίανθου κατά τον ψεκάσμο του ως ζιζάνιο, όπως προαναφέρθηκε. Το ένζυμο *AHAS* στον ηλίανθο έχει βρεθεί ότι κωδικοποιείται από τρία γονίδια, το *HaAhas11*, το *HaAhas12* και το *HaAhas13*, όπου *Ha* είναι τα αρχικά του *Helianthus annuus*.

Το αλληλόμορφο *HaAhas11*, όπου βιβλιογραφικά αναφέρεται και ως *Imr1* ή *Ar_{pur}*, περιέχει μία σημειακή αλλαγή του DNA (η κυτοσίνη έχει μεταλλαχθεί σε θυμίνη στη θέση 205), η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση της αλανίνης, Ala, με βαλίνη, Val, στο αμινοξύ 205 της πρωτεΐνης. Αυτή η αντικατάσταση (Ala205Val) φάνηκε να προσδίδει ανθεκτικότητα στις μιδαζολιόνες (Sala et al., 2012a; Sala and Bulos, 2012b) και χρησιμοποιήθηκε ως βάση για την ανάπτυξη της Clearfield® τεχνολογίας, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στις δραστικές ουσίες imazethapyr και imazamox, μέτρια ανθεκτικότητα στο trifluralin και το chlorimuron, ενώ δεν κατέστη ικανό να προσδώσει ανθεκτικότητα στο chloransulam-methyl, το pyridithiobac και σε υψηλές δόσεις μιδαζολιόνων.

Η κληρονομικότητα της ανθεκτικότητας του ηλίανθου στις μιδαζολιόνες έχει προταθεί ότι ελέγχεται από δύο αλληλόμορφα, το ένα εκ των οποίων ημικυρίαρχο και γνωστό ως *Imr1* (*HaAhas11*), και το άλλο καλούμενο ως *Imr2*, το οποίο αλληλεπιδρά με το *Imr1* (Bruniard and Miller, 2001; Vega et al., 2012). Η πλήρης ανθεκτικότητα του ηλίανθου προκύπτει λοιπόν, εφόσον τα αλληλόμορφα αυτά βρίσκονται σε πλήρη ομοζυγωτία, είτε πρόκειται για καθαρή σειρά, είτε για υβρίδιο (*I_{mr1}I_{mr1}I_{mr2}I_{mr2}*). Η ανθεκτικότητα είναι ενδιάμεση όταν είναι ημικυρίαρχα τα γονίδια δηλαδή *I_{mr1}i_{mr1}I_{mr2}i_{mr2}* και αυτό μπορεί να συμβεί και στην περίπτωση της αναδιασταύρωσης.

Για το λόγο αυτό πρέπει να δίνεται προσοχή στην ποσότητα του ζιζανιοκτόνου που χρησιμοποιείται και το διαχωρισμό των φυτών (Bruniard and Miller, 2001). Για να παραχθούν ανθεκτικά *Imisun* ή Clearfield υβρίδια ανεκτικά σε εμπορικό επίπεδο, θα πρέπει και τα δύο αλληλόμορφα να είναι ομόζυγα και κυρίαρχα (Sala et al., 2012c).

1.7.3. Άλλες μεταλλάξεις του γονιδίου *AHAS* που οδηγούν σε ανθεκτικότητα

Μία άλλη φυσική μετάλλαξη του γονιδίου *HaAHAS11* υπάρχει σε ένα άλλο αλληλόμορφο του ίδιου γονιδίου γνωστό σαν *HaAhas11-2* ή *Ar_{kan}* παρατηρήθηκε ότι το κωδικόνιο 197 που φέρει τη μετάλλαξη της κυτοσίνης σε θυμίνη, με αποτέλεσμα την μετατροπή της προλίνης σε λευκίνη (Pro197Leu), προσδίδει ανθεκτικότητα στις σουλφονουρίες στα παρακάτω είδη: *Lactuca*, *Kochia*, *Brassica*, *Sisymbrium*, *Amarathus* και στην *Arabidopsis*. Επίσης, μία τεχνητή μεταλλαξιγένεση με

χρήση του μεθανοσουλφονικού αιθυλεστέρα (EMS) έχει οδηγήσει στην τεχνητή μετάλλαξη Pro197Leu, η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα του ηλίανθου, καθώς κι άλλων ειδών όπως το *Xanthium strumarium* και η *Arabidopsis*, στις σουλφονουρίες (Sala et al., 2012a).

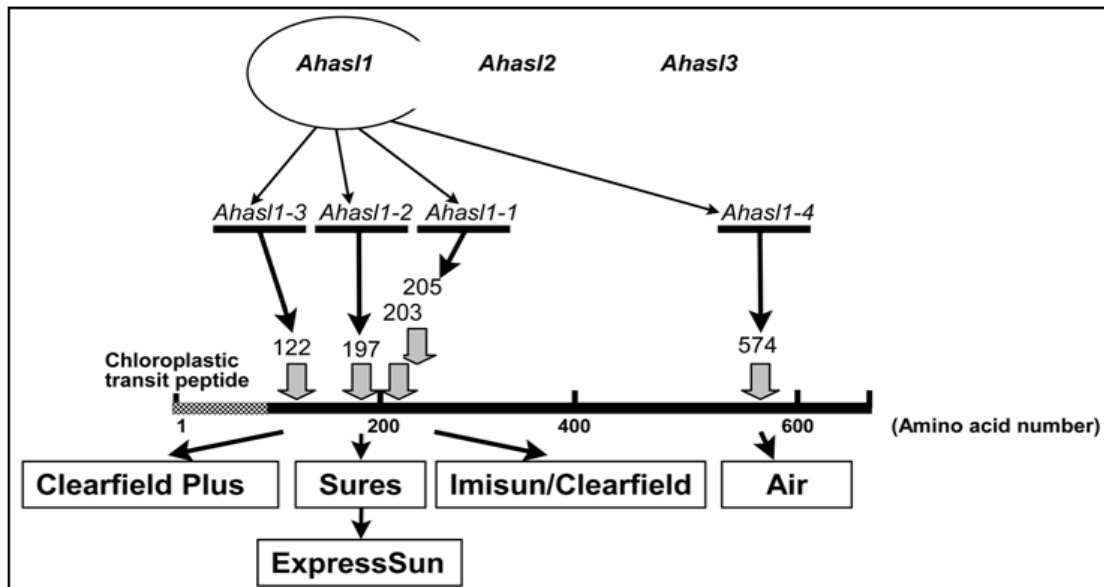
Ένα ακόμα παράδειγμα αποτελεί ένα άλλο αλληλόμορφο του γονιδίου *HaAhasI1-3*, το οποίο παρουσιάζει μετάλλαξη στη θέση του κωδικονίου 122, στο οποίο η γουανίνη αντικαθίσταται από αδενίνη, η οποία οδηγεί στην μετατροπή της αλανίνης σε θρεϊονίνη (Ala122Thr) και προσδίδει υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στις ιμιδαζολινόνες. Η μετάλλαξη αυτή έχει προσδώσει ανθεκτικότητα σε πολλά είδη όπως: *X. strumarium*, *Solanum ptycanthum* Dun., *Amaranthus retroflexus*, *A. hybridus* L., *Nicotiana tabacum* L., *Zea mays* L., *Beta vulgaris* και *A. thaliana*. Τα αλληλόμορφα αυτά των *HaAhasI1-1* και *HaAhasI1-3* έχουν προταθεί για την παραγωγή υβριδίων ανθεκτικών στις ιμιδαζολινόνες (Sala et al., 2012d).

Τέλος, στο αλληλόμορφο *HaAhasI1-4*, στο κωδικόνιο στη θέση 574, έχει παρατηρηθεί μία ακόμη φυσική μετάλλαξη, κατά την οποία η γουανίνη αντικαθίσταται από θυμίνη, με αποτέλεσμα η τρυπτοφάνη να μετατρέπεται σε λευκίνη (Trp574Leu). Αυτή η μετάλλαξη προσδίδει ανθεκτικότητα σε όλο το εύρος των ζιζανιοκτόνων αναστολέων του AHAS (Sala et al., 2008; 2012a; Sala and Bulos, 2012b; Bulos et al., 2013, Kolkman et al., 2004). Μία ακόμη φυσική μετάλλαξη που μελετάται, είναι στο κωδικόνιο 203, η οποία προκαλεί μικρή ανθεκτικότητα στις ιμιδαζολινόνες αλλά ευαισθησία στις σουλφονουρίες (Leon et al., 2007; Sala et al., 2012a).

1.7.4. Ανάπτυξη άλλων τεχνολογιών για τον έλεγχο των ζιζανίων του ηλίανθου

Οι εταιρείες χημικών φαρμάκων και σποροπαραγωγής βασιζόμενες στις διάφορες μεταλλάξεις ανέπτυξαν τεχνολογίες που αξιοποιούνται για την δημιουργία ανθεκτικότητας του ηλίανθου στις ιμιδαζολινόνες και τις σουλφονουρίες (Εικόνα 5).

Μία από αυτές αποτελεί η μέθοδος ExpressSun/Sures που βασίζεται στο αλληλόμορφο *HaAHASII-2*. Τα φυτά που παρουσιάζουν ομοζυγωτία σε αυτό το αλληλόμορφο, έχουν ανθεκτικότητα στην ομάδα των σουλφονουριών και παράλληλα ευαισθησία στην ομάδα των ιμιδαζολινονών. Ακόμα η ExpressSun[®] τεχνολογία έχει προκύψει από τεχνητή μετάλλαξη με μεθανοσουλφονικό αιθυλεστέρα (EMS) της καθαρής σειράς HA89, ενώ η Sures τεχνολογία (Sures) στον ηλίανθο είναι φυσική μετάλλαξη και προσδίδει ανθεκτικότητα στις σουλφονουρίες.



Εικόνα 5. Οι τεχνολογίες που οφείλονται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *HaAhas1* του ενζύμου AHAS στον ηλιάνθο (Sala et al., 2012a)

Επιπροσθέτως, ανθεκτικά φυτά ηλιάνθου έχουν προκύψει έπειτα από ψεκασμό με τη δραστική ουσία tribenuron, αναδιασταύρωση και επιλογή φυτών όπου παρατηρείται η μετάλλαξη Pro197Leu στο γονίδιο *HaAhas1-2*. Ανάμεσα στις τεχνολογίες συγκαταλέγεται και η μέθοδος Clearfield plus, που βασίζεται στην μετάλλαξη Ala122Thr στο αλληλόμορφο *HaAHAS1-3*, μέσω μεταλλαξιγένεσης στο σπόρο (τεχνητά) και επιλογή με imazapyr. Τα φυτά που παρουσιάζουν ομοζυγωτία στο *HaAHAS1-3* είναι ανθεκτικά σε υψηλές δόσεις ιμιδαζολινονών, αλλά παρουσιάζουν και μεγαλύτερη αντοχή σε διάφορα περιβάλλοντα (Sala and Bulos, 2012b). Τέλος, η Air τεχνολογία έχει στηριχτεί στην τεχνητή μετάλλαξη, που έχει προκύψει από EMS μεταλλαξιγένεση στο γονίδιο *Ahas1-4* στη θέση 574, όπου η τριπτοφάνη μετατρέπεται σε λευκίνη προσδίδοντας ανθεκτικότητα σε όλα τα ζιζανιοκτόνα.

1.7.5. Η Clearfield τεχνολογία σε άλλες καλλιέργειες

Πέρα από το γενετικό υλικό του ηλιάνθου που φέρει την τεχνολογία Clearfield, η τεχνολογία αυτή εφαρμόζεται σήμερα και σε άλλες καλλιέργειες, όπως σε ποικιλίες μαλακού σιταριού (*Triticum aestivum* L.), οι οποίες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα των ιμιδαζολινονών και εμπορευματοποιούνται κάτω από την ονομασία Clearfield (Newhouse et al., 1992; Jimenez et al., 2015). Οι ποικιλίες αυτές προέκυψαν μετά από μετάλλαξη, επιλογή, αναδιασταύρωση με elite καλλιέργειες και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις δραστικές ουσίες imazethapyr, imazaquin, imazapyr (Newhouse et al., 1992) και το imazamox (Jimenez et al., 2015).

Μία άλλη καλλιέργεια όπου εφαρμόζεται η Clearfield τεχνολογία είναι το ρύζι (*Oryza sativa* L.). Οι ανθεκτικές στις ιμιδαζολινονές ποικιλίες προέκυψαν μετά από χημική μεταλλαξογένεση με

χρήση του μεθανοσουλφονικού αιθυλεστέρα (EMS) και μετέπειτα από επιλογή και αναδιασταυρώσεις. Οι ποικιλίες αυτές έδειξαν ανθεκτικότητα στο imazethapyr, imazapyr και imazapic (Tan et al., 2005; Sudianto et al., 2013) καθώς και στο imazamox (Andres et al., 2014). Οι μεταλλάξεις που παρουσιάστηκαν στο ενζύμο AHAS ήταν οι Gln654Glu και η Ser653Asn (Tan et al., 2005; Sudianto et al., 2013). Τα Clearfield υβρίδια πέρα από την ανθεκτικότητα, παρουσίασαν και αύξηση της απόδοσής τους (Sudianto et al., 2013).

Στο *Brassica napus* L. η ανθεκτικότητα προέκυψε έπειτα από μικροσποριογένεση και μετάλλαξη με αιθυλονιτροσουρία, διπλασιασμό των απλοειδών με κολχικίνη και επιλογή με τη χρήση του imazethapyr. Δύο καθαρές σειρές που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται στην αναδιασταύρωση, είναι αυτές που φέρουν τις μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 653 όπου η σερίνη μετατρέπεται σε ασπαραγγίνη και στο κωδικόνιο 574 όπου η τρυπτοφάνη μετατρέπεται σε λευκίνη (Krato et al., 2012; Tan et al., 2005). Ανθεκτικότητα έχει αναφερθεί επίσης κι έπειτα από τη χρήση του imazamox (Krato et al., 2012).

Τέλος, η Clearfield τεχνολογία άρχισε να εφαρμόζεται και στη φακή (*Lens culinaris* Medic.), όπου η ανθεκτικότητα προέκυψε έπειτα από μεταλλαξιγένεση στο σπόρο, μετά από επέμβαση με διάλυμα EMS, παρουσιάζοντας αυξημένη ανθεκτικότητα στο imazapic και το imazethapyr, σε σύγκριση με άλλες ποικιλίες, οι οποίες δεν έφεραν ανθεκτικότητα (Tan and Bowe, 2012).

1.7.6. Ανάπτυξη ανθεκτικότητας των ζιζανίων στα ζιζανιοκτόνα αναστολείς του ενζύμου AHAS

Η υπερβολική χρήση των ζιζανιοκτόνων είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία πληθυσμών ζιζανίων, ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα. Στο γεγονός αυτό συντέλεσε και ο τρόπος διαχείρισης των ζιζανίων, ο οποίος δεν διαφοροποιούνταν, ενώ συνήθως γινόταν μόνο μέσω ψεκασμών (Gressel and Segel, 1978). Πολλά ζιζάνια, κυρίως άγριοι πληθυσμοί, έχουν επιλεγθεί ύστερα από χρόνια εφαρμογή ζιζανιοκτόνων και έχουν καταστεί ανθεκτικά στα διάφορα ζιζανιοκτόνα-αναστολείς του ενζύμου AHAS, λόγω τυχαίων μεταλλάξεων που δεν επιτρέπουν στο ζιζανιοκτόνο να προσδεθεί στην καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου AHAS (Sala et al., 2012a; Sala and Bulos, 2012b).

Ο πρώτος ανθεκτικός πληθυσμός, ανακαλύφθηκε πέντε χρόνια μετά τη χρήση των ζιζανιοκτόνων και παρατηρήθηκε σε ένα πληθυσμό του ζιζανίου *Lactuca serriola* L. (Mallory-Smith, 1990). Η ανθεκτικότητα αυτή δημιουργήθηκε ύστερα από πέντε γενιές εφαρμογής του ζιζανιοκτόνου με δραστική ουσία γλωροσουλφουρόνη σε κάθε γενιά. Με τις ίδιες μεθόδους έχουν πλέον δημιουργηθεί πολλοί πληθυσμοί ζιζανίων, οι οποίοι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις

μιδαζολινόνες και περιλαμβάνουν περισσότερα από 100 είδη (Kolkman et al., 2004; www.weedscience.org) όπως τα *Amaranthus sp.*, *Bromus sp.* και *Oryza sativa*. Έκτοτε, πάνω από 100 είδη ζιζανίων προέκυψαν που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα (Hear, 2005). Παγκοσμίως, η ανθεκτικότητα των ζιζανίων στα ζιζανιοκτόνα έχει φτάσει τα 139 είδη. Μερικά από αυτά είναι το *Lolium rigidum*, *Raphanus raphanistrum*, *Kochia scoparia* και το *Amaranthus spp.* (Yu and Powles, 2014).

1.8. Τρόποι αξιολόγησης της ανθεκτικότητας του ηλίανθου στις μιδαζολινόνες

Απώτερο στόχο της αξιολόγησης φυτών ηλίανθου στις μιδαζολινόνες αποτελεί η ανάπτυξη ανθεκτικών elite καθαρών σειρών, μέσω της ενσωμάτωσης γονιδίων ανθεκτικότητας στο γενετικό υλικό των elite σειρών έπειτα από αναδιασταυρώσεις, με μία ή περισσότερες γενιές αυτογονιμοποίησης και έλεγχο των απογόνων (Bruniard and Miller 2001). Ο έλεγχος των ανθεκτικών γονοτύπων ηλίανθου απαιτεί χρόνο ιδίως όταν γίνεται σε συνθήκες αγρού (Vega et al., 2009). Για το λόγο αυτό και για πιο γρήγορο έλεγχο της ανθεκτικότητας άρχισαν να χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως τα φυτοδοχεία, τα τριβλία petri και άλλοι *in vitro* έλεγχοι, για παράδειγμα με υπόστρωμα Murashige and Skoog (Beckie et al., 2000; Vega et al., 2009; Breccia et al., 2011) καθώς και άλλες *in planta* μέθοδοι (Bulos et al., 2013).

Ο φαινοτυπικός προσδιορισμός της ανθεκτικότητας του ηλίανθου, όπως και άλλων φυτών, αποτελεί σήμερα την πιο κοινή προσέγγιση και περιλαμβάνει συνήθως την επέμβαση με ψεκασμό στα φυτά, είτε στον αγρό, είτε το θερμοκήπιο και επιλογή των ανθεκτικών φυτών στις μιδαζολινόνες βάση την επιβίωσή τους και την ανάπτυξη φυτοτοξικών συμπτωμάτων (Sala and Bulos, 2012b, Sala et al., 2012c; 2012d).

Η επίδραση της ανθεκτικότητας και του ενζύμου AHAS δεν έχει μελετηθεί αρκετά όσον αφορά την εμφάνιση και την υγεία του ηλίανθου (Darmency, 2013) μόνο οι Sala et al. (2012a) αναφέρουν ότι υπάρχει μία μείωση στην απόδοση του ελαίου και μείωση της βιομάζας (Sala et al., 2012d). Σε μία άλλη μελέτη δεν είχε βρεθεί διαφορά στην παραγωγή σπόρου μεταξύ ανθεκτικού και ευαίσθητου ηλίανθου ή μεταξύ των προγόνων και των υβριδίων τους. Το μόνο που είχε παρατηρηθεί ήταν μία μείωση του μεγέθους του φύλλου τους και μείωση του ανταγωνισμού τους όταν είχαν φυτευτεί όλα μαζί ανάμικτα (Darmency, 2013; Massinga et al., 2005; Marshall et al., 2001).

Τα τελευταία χρόνια, οι προσπάθειες διερεύνησης του μοριακού μηχανισμού που ελέγχει την ανθεκτικότητα του ηλίανθου έχουν ενταχθεί και αναμένεται να αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο για τη διαδικασία εύρεσης και ενσωμάτωσης της ανθεκτικότητας στον ηλίανθο. Έως σήμερα έχει επιτευχθεί ο χαρακτηρισμός της αλληλουχίας των γονιδίων *AHAS1*, *AHAS2*, *AHAS3* που

κωδικοποιούν το ένζυμο AHAS, καθώς και ο χαρακτηρισμός του *AHAS1* σε ανθεκτικές και ευαίσθητες καθарές σειρές και η εύρεση της μετάλλαξης Ala205Val με τη χρήση της δραστικής ουσίας imazamox (Kolkman et al., 2004).

Πρόοδος έχει συντελεστεί και όσον αφορά τη μελέτη της δραστηριότητας του ενζύμου AHAS κατά τον ψεκάσμο με τις δραστικές ουσίες imazamox (Baumgartner et al., 1999), imazethapyr (Al-Khatib et al., 1998) και imazapyr (Breccia et al., 2013) τόσο σε ανθεκτικές όσο και σε ευαίσθητες καθарές σειρές ηλιάνθου, με τη δραστηριότητα του ενζύμου να παρατηρείται εντονότερη στις ανθεκτικές σειρές και συγκεκριμένα στα φύλλα των φυτών.

Τέλος, η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *AHAS1*, *AHAS2* και *AHAS3* σε ευαίσθητες, ανθεκτικές και ενδιάμεσης ανθεκτικότητας καθарές σειρές ηλιάνθου έχει αναφερθεί, έπειτα από ψεκάσμο με τη δραστική ουσία imazapyr, με την έκφραση του *AHAS2* να φαίνεται να επάγεται στα φύλλα των φυτών σειρών ενδιάμεσης ανθεκτικότητας, ενώ το *AHAS3* στις ρίζες ευαίσθητων καθάρως και ενδιάμεσης ανθεκτικότητας σειρών. Η έκφραση του γονιδίου *AHAS1* δεν φαίνεται να επάγεται σημαντικά στις ανθεκτικές σειρές.

1.9. Σκοπός της εργασίας

Η μελέτη της ανθεκτικότητας των υβριδίων ηλιάνθου είναι σημαντική για τις εταιρείες που έχουν ως αντικείμενό τους είτε την παραγωγή υβριδίων ηλιάνθου, είτε την παραγωγή ζιζανιοκτόνων στοχευμένης δράσης, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της γνώσης όσον αφορά τον τρόπο δράσης και τη συνιστώμενη δόση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί, με απώτερο σκοπό τη βέλτιστη χρήση και τη φιλικότητα των ζιζανιοκτόνων προς το περιβάλλον.

Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας τριών υβριδίων ηλιάνθου σύμφωνα με τα φυτοτοξικά συμπτώματα που παρουσίασαν, έπειτα από διαφορετικές επεμβάσεις με ζιζανιοκτόνο της ομάδας των ιμιδαζολινονών και συγκεκριμένα της δραστικής ουσίας imazamox. Παράλληλα, έγινε προσπάθεια καθορισμού της κατάλληλης αξιολόγησης των φυταρίων και ο προσδιορισμός της μέσης αποτελεσματικής δόσης (ED₅₀) του ζιζανιοκτόνου. Τέλος, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το ένζυμο AHAS στα υβρίδια ηλιάνθου, μετά από τις επεμβάσεις με το imazamox και η πιθανή συσχέτιση της έκφρασής τους με το μοριακό μηχανισμό της ανθεκτικότητας.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δύναται να χρησιμέψουν ως μία επιπρόσθετη πληροφορία για την ανθεκτικότητα των υβριδίων ηλιάνθου στις ιμιδαζολιόνες και συγκεκριμένα στη δραστική

ουσία imazamox, καθώς τα υβρίδια είναι αυτά που θα χρησιμοποιήσει εν τέλει ο γεωργός. Επιπροσθέτως η μελέτη, μέσω της πρώτης προσπάθειας μελέτης της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν το ένζυμο AHAS σε υβρίδια ηλίανθου και παράλληλα πιθανής συσχέτισής τους με το μηχανισμό ανθεκτικότητας στις ιμιδαζολινόνες, αναμένεται να συμβάλει στη δημιουργία λειτουργικών μοριακών δεικτών, οι οποίοι θα συμβάλλουν στην ταχεία και οικονομική ταυτοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών ηλίανθου και συνεπώς στη γρήγορη εκτίμηση γονοτύπων ηλίανθου σε βελτιωτικά προγράμματα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Φυτικό Υλικό

Για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής, χρησιμοποιήθηκαν τρία υβρίδια ηλίανθου. Το γενετικό αυτό υλικό παραχωρήθηκε από την εταιρεία Αγροτικός Οίκος Σπύρου ΑΕΒΕ, όπου το ένα υβρίδιο ήταν ευαίσθητο (S1) και τα άλλα δύο υβρίδια ήταν Clearfield®(R2/R3).

Η σπορά έγινε σε ποτήρια από φελιζόλ, όγκου 350ml, ύψους 10cm και διαμέτρου 7,5cm. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μείγμα τύρφης με περλίτη σε αναλογία 2:1. Το βάθος σποράς ήταν σχεδόν διπλάσιο του μεγέθους τους. Το πότισμα γινόταν ανά 2 μέρες με νερό βρύσης. Τα υβρίδια φυτεύτηκαν στο θερμοκήπιο, η μέγιστη θερμοκρασία ημέρας ήταν 35°C και η ελάχιστη νύχτας 25°C.

2.2. Εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου

Μετά από 20 ημέρες από την φύτευση των υβριδίων ηλίανθου, έγινε ψεκασμός με το ζιζανιοκτόνο “Pulsar® 40 SL” της εταιρείας BASF. Το Pulsar® 40SL, έχει τη μορφή του πυκνού διαλύματος, το οποίο περιέχει 4% β/ο δραστική ουσία (δ.ο.) imazamox, 4,22% άλας αμμωνίου και 96% β/β βοηθητικές ουσίες. Η δράση του είναι διασυστηματική, και αποτελεί μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο με δράση από το φύλλωμα και το έδαφος για την καταπολέμηση πλατύφυλλων και αγρωστωδών ζιζανίων στη μηδική, στο ρύζι και στον ηλίανθο. Αναστέλλει τη δράση της συνθετάσης του ακετουϋδροξικού οξέος (AHAS).

Τα φυτά ψεκάστηκαν στο στάδιο του δεύτερου με τρίτου ζεύγους φύλλων (V4-V6). Χρησιμοποιήθηκε ψεκαστήρας προπίεσεως 1,5L, με ωφέλιμο τα 1,3L. Η ποσότητα του ψεκαστικού υγρού που χρησιμοποιήθηκε, ήταν 1200ml ανά επέμβαση.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις επεμβάσεις. Κατά την πρώτη επέμβαση έγινε με νερό βρύσης και συνιστά τον μάρτυρα. Η δεύτερη έγινε με διάλυμα που περιείχε 400μg της δραστικής ουσίας, imazamox (δ.ο.)/ml ζιζανιοκτόνου (8g δ.ο./στρ. ή 80g a.i./ha), η οποία ήταν 2 φορές μεγαλύτερη της συνιστώμενης δόσης, ενώ η τρίτη επέμβαση έγινε με διάλυμα που περιείχε 1200μg imazamox/ml (24g δ.ο./στρ. ή 240g a.i./ha). Οι επεμβάσεις με τις συγκεκριμένες ποσότητες δραστικής ουσίας, επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων, τα οποία είχαν δείξει μεταξύ των φυτών μορφολογικές διαφορές και διαφορές στην ανθεκτικότητα τους (Mezili et al., 2014; unpublished data).

2.3. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός

Αρχικά τα φυτά αξιολογήθηκαν με βάση ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά, βάση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων που παρουσίασαν. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις των 12 φυτών ανά υβρίδιο και ανά επέμβαση, δηλαδή 24 φυτά ανά υβρίδιο και επέμβαση. Φυτεύτηκαν με τον ίδιο τρόπο και στις ίδιες συνθήκες.

Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των φυτών έγινε ύστερα από 7, 14 και 21 ημέρες από τον ψεκασμό. Παρατηρήθηκε η γενική ανάπτυξη του φυτού, ο βλαστός, τα φύλλα, η εμφάνιση χλώρωσης ή νέκρωσης ή κάποιο άλλο χαρακτηριστικό που προκλήθηκε εξαιτίας της εφαρμογής του ζιζανιοκτόνου, συγκριτικά πάντα με τα φυτά του μάρτυρα (Mezili et al., 2014; Sala and Bulos, 2012b; Kolkman et al., 2004; White et al., 2002; Massinga et al., 2003; Baumgartner et al., 1999;). Στη συνέχεια δημιουργήθηκε μία κλίμακα αξιολόγησης των φυτών σύμφωνα με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, η οποία παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Κλίμακα αξιολόγησης των φυτών σύμφωνα με τα φυτοτοξικά συμπτώματα που παρουσίασαν

ΚΛΙΜΑΚΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ	
ΒΑΘΜΙΔΑ	ΦΥΤΟΤΟΞΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ
5	ΝΕΚΡΩΣΗ ΟΛΟΥ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ
4	ΞΕΡΑ ΦΥΛΛΑ
3	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΕΣ ΝΕΚΡΩΤΙΚΕΣ ΚΗΛΙΔΕΣ ΣΤΑ ΦΥΛΛΑ
2	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΣΤΑ ΦΥΛΛΑ, ΣΥΣΤΡΟΦΗ, ΠΙΘΑΝΗ ΧΛΩΡΩΣΗ
1	ΕΛΑΦΡΑ ΧΛΩΡΩΣΗ ΣΤΑ ΦΥΛΛΑ
0	ΥΓΙΕΣ ΦΥΤΟ

2.3.1. Ανάλυση δεδομένων του φαινοτυπικού χαρακτηρισμού

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα JMP[®]8, όπου έγινε ανάλυση διασποράς ANOVA, με δύο παράγοντες, τον κύριο που ήταν τα υβρίδια και ο άλλος ήταν οι επεμβάσεις. Ακολούθησε η σύγκριση μέσω της μέθοδο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD), σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος *Microsoft Excel 10*[®].

2.3.2. Μέση αποτελεσματική δόση (Effective dose 50 -ED₅₀)

Μετά την τελευταία παρατήρηση 21 ημέρες μετά τις επεμβάσεις και αφού είχε γίνει η αξιολόγηση σύμφωνα με την κλίμακα (Πίνακα 1), υπολογίστηκε η μέση αποτελεσματική δόση του ζιζανιοκτόνου, ED₅₀.

Το ED₅₀ δείχνει την αποτελεσματικότητα των δόσεων που χρησιμοποιήθηκαν στο 50% των φυτών, δηλαδή αν πάνω από το 50% των φυτών έχει επηρεαστεί σοβαρά με ξεραμένα φύλλα, σοβαρές νεκρώσεις και δεν τους επιτρέπει να συνεχίσουν να αναπτύσσονται.

2.4. Μοριακός Χαρακτηρισμός-Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τον μοριακό χαρακτηρισμό ήταν δύο επαναλήψεις των δέκα φυτών ανά υβρίδιο, δηλαδή σύνολο 20 φυτά ανά υβρίδιο. Οι επεμβάσεις που είχαν δεχθεί τα φυτά περιγράφηκαν προηγουμένως.

Για την μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, συλλέχθηκε φυλλικός ιστός από τα φυτά του ηλίανθου, 36 ώρες μετά τις επεμβάσεις με την χρήση του υγρού αζώτου, ώστε να γίνει απομόνωση του RNA. Τα φύλλα συλλέχθηκαν ανά επέμβαση και ανά υβρίδιο σε μικρές πλαστικές σακούλες, οι οποίες είχαν επισημανθεί και είχαν προψυχθεί στο υγρό άζωτο.

Το υγρό άζωτο (Liquid N₂) χρησιμοποιείται στην απομόνωση του κυτταρικού και γενετικού υλικού καθώς στους -196°C παγώνουν τα κύτταρα χωρίς προηγούμενη λύση τους με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η αποδόμηση του γενετικού υλικού (νουκλεϊκά οξέα).

Στη συνέχεια, οι πλαστικές σακούλες φυλάχθηκαν σε θάλαμο στους -80°C μέχρι να γίνει το λειοτρίβισμα του ιστού.

Η λειοτρίβηση του ιστού έγινε με μικρά γουδιά διαμέτρου 8cm, τα οποία είχαν απολυμανθεί σε χύτρα αποστείρωσης.

Η σκόνη (~100mg) από τη λειοτριβήση είτε μεταφερόταν με αποστειρωμένες σπάτουλες σε μικροσωληνίσκους (tubes) των 1,5ml (αποστειρωμένοι) και γινόταν άμεση τοποθέτηση τους στο υγρό άζωτο και στους -80°C, είτε χρησιμοποιείτο απευθείας στην απομόνωση του RNA.

2.4.1. Εξαγωγή RNA

Πριν την εξαγωγή του RNA, έγινε καθαρισμός των πιπετών με οινόπνευμα και στη συνέχεια οι πιπέττες μαζί με τα ακρορύγχια και τους μικροσωληνίσκους αποστειρώθηκαν με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) για 10 λεπτά. Η εξαγωγή του RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του “Nucleospin® RNA Plant” της εταιρείας Macherey-Nagel. Αναλυτικά η διαδικασία αναφέρεται στο Παράρτημα 1.

Στη συνέχεια ακολούθησε αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C μέχρι την επαναχρησιμοποίηση τους στο επόμενο στάδιο.

2.4.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του εκλούόμενου RNA έγινε με τη χρήση του σπεκτροφωτόμετρου Nanodrop 1000 και του λογισμικού N.D.-1000 v 3.3.1.. Η διαδικασία περιγράφεται λεπτομερώς στο Παράρτημα 2.

Με τη χρήση του σπεκτροφωτόμετρου έγινε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος στα 230, 260 και 280 nm. Η καθαρότητα ενός δείγματος εκτιμήθηκε από το λόγο $OD_{A_{260}}/A_{280}$, δείχνοντας την επιμόλυνση με πρωτεΐνες και $OD_{A_{260}}/A_{230}$, δείχνοντας την επιμόλυνση με υψηλή συγκέντρωση άλατος ή φαινολικών.

Τιμές 1.8-2.0 για τον λόγο $OD_{A_{260}}/A_{280}$ και γύρω στο 1.0 για τον λόγο $OD_{A_{260}}/A_{230}$, αντίστοιχα, υπέδειξαν ικανοποιητική καθαρότητα δείγματος.

Ο έλεγχος της ποιότητας του RNA, όσον αφορά την ακεραιότητα του, έγινε στη συνέχεια σε 2,5% w/v πηκτή αγαρόζης, στην οποία είδαμε αν το RNA ήταν ακέραιο ή είχε αποδομηθεί.

2.4.3. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης για τη δημιουργία cDNA

Αφού έγινε αποστείρωση των μικροσωληνίσκων 1,5ml και 0,2ml, των πιπετών και των ακρορυγχιών σε UV ακτινοβολία, έγινε η προετοιμασία για την δημιουργία του cDNA (complementary DNA), η οποία είναι μία μονόκλωνη αλληλουχία DNA, συμπληρωματική του mRNA του φυτού, δηλαδή του μεταγραφήματος.

Το πρώτο βήμα ήταν η καταγραφή των μέσων όρων των επαναλήψεων των συγκεντρώσεων του RNA, που μετρήθηκαν για κάθε δείγμα των μετρήσεων στο Nanodrop.

Ακολούθησε ο υπολογισμός του όγκου που χρησιμοποιήθηκε για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση RNA, 600ng/μl. Ο τελικός όγκος του RNA εκμαγείου ήταν 11μl. Όταν η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν λιγότερη από 11μl, τότε προστέθηκε η ποσότητα που έλειπε με RNase free νερό που δίνεται με την συσκευασία και ανακατεύθηκε καλά με την πιπέτα αλλά και με φυγοκέντρηση. Ακολούθησε θέρμανση του εκμαγείου στους 65°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια τοποθέτηση τους στον πάγο για τουλάχιστον 10 λεπτά. Τα υλικά της αντίδρασης εμπεριέχονται στο “PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit” της TAKARA BIO INC.

Το κύριο μείγμα της κάθε αντίδρασης προετοιμάστηκε σε ένα μικροσωληνίσκο 1,5ml, σύμφωνα με τις οδηγίες του προϊόντος και περιείχε:

- 5x PrimeScript™ buffer: 4μl (περιέχει τα άλατα που χρειάζεται η αντίδραση)
- 10mM dNTPs mixture: 1μl της εταιρείας HT Biotechnology
- 40 U/ μl RNase Inhibitor: 1μl
- 50 μM Oligo dt Primer: 2μl
- 200 U/ μl PrimeScript RTase: 1μl (Reverse Transcriptase)

Όλα μαζί είχαν όγκο 9μl. Ακολούθησε φυγοκέντρηση.

Στη συνέχεια προστέθηκε στους μικροσωληνίσκους (0,2ml) με το RNA εκμαγείο το μείγμα της αντίδρασης, έτσι ο τελικός όγκος ήταν 20μl. Έγινε ελαφριά πρόσμιξη. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και μεταφέρεται στο μηχάνημα της PCR που είχε προγραμματιστεί στους 42°C για 2 ώρες. Στο τέλος της διαδικασίας γινόταν αποθήκευση τους στους -20°C.

Κάθε φορά, η αντίδραση ετοιμαζόταν για το σύνολο των δειγμάτων που υπήρχαν εκείνη τη στιγμή και χωριζόταν αντίστοιχα στο RNA εκμαγείο.

Το προϊόν που προέκυπτε από αυτήν την αντίδραση ήταν μία μονόκλωνη αλληλουχία DNA που ήταν συμπληρωματική του mRNA του φυτού (complementary DNA- cDNA) και χρησιμοποιήθηκε σαν εκμαγείο στην PCR αντίδραση.

2.4.4. Αλληλουχία γονιδίων *HaAHAS11*, *HaAHAS12*, *HaAHAS13* στον ηλίανθο

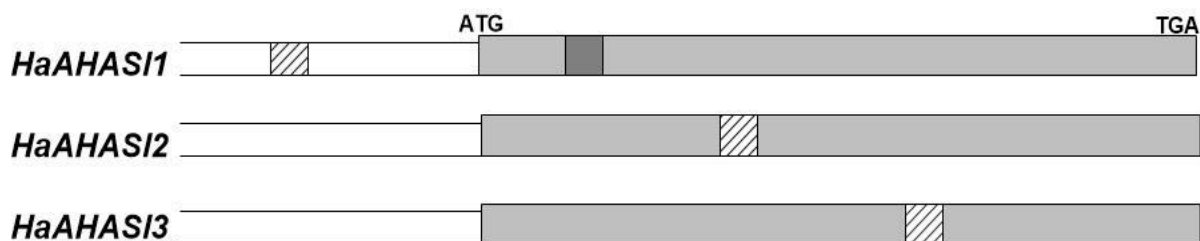
Οι αλληλουχίες των γονιδίων *HaAHAS11*, *HaAHAS12*, *HaAHAS13* του ηλίανθου ταυτοποιήθηκαν μετά από ανίχνευση των βάσεων δεδομένων στο εθνικό κέντρο πληροφοριών βιοτεχνολογίας (NCBI GenBank) με βάση τους κωδικούς καταχώρησης AY541451-AY541458 που αναφέρουν οι συγγραφείς Breccia et al. (2013), Ochogavia et al. (2014) και Kolkman et al. (2004).

Για κάθε γονίδιο *HaAHAS11*, *HaAHAS12*, *HaAHAS13* υπάρχουν διαφορετικοί απλότυποι όπως φαίνεται στον Πίνακα 2..

Πίνακας 2. Απλότυποι των γονιδίων *HaAHAS1*, *HaAHAS2*, *HaAHAS3*

ΓΟΝΙΔΙΑ	Αριθμός Καταχώρησης Γονιδίων (Απλότυποι)	Κωδικός Καταχώρησης Απλοτύπων
<i>HaAHAS1</i>	46948845	AY541451
	46948847	AY541452
	46948849	AY541453
	46948851	AY511454
	46948853	AY511455
<i>HaAHAS2</i>	46948855	AY511456
	46948857	AY511457
<i>HaAHAS3</i>	46948859	AY511458

Πραγματοποιήθηκε η ευθυγράμμιση όλων των αλληλουχιών των γονιδίων *HaAHAS1*, *HaAHAS2*, *HaAHAS3* με τη βοήθεια του προγράμματος CLUSTALW2 για τον προσδιορισμό των διαφορών τους και απεικονίζονται στο Παράρτημα 3.



Διάγραμμα 1. Οι κωδικοποιούσες περιοχές είναι τα ανοιχτά γκρι ορθογώνια, ενώ τα λευκά είναι 5' αμετάφραστες περιοχές. Τα γραμμοσκιασμένα κουτιά παρουσιάζουν τις διαφορές στις αλληλουχίες. Το σκούρο γκρι κουτί είναι η μετάλλαξη A205V

Όπως φαίνεται λόγω της υψηλής ομοιότητας των αλληλουχιών των *HaAHAS1*, *HaAHAS2*, *HaAHAS3* είναι δύσκολος ο σχεδιασμός εκκινητών για τη σαφή διάκριση και ενίσχυση του κάθε γονιδίου/προϊόντος σε ανάλυση PCR, καθώς μόνο η κωδικοποιούσες περιοχές είναι κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων και όχι οι αμετάφραστες 5' και 3' περιοχές, στις οποίες συναντάται και η μεγαλύτερη απόκλιση μεταξύ των αλληλουχιών. Συνεπώς χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που

είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες εργασίες (Kolkman et al., 2004; Breccia et al., 2013; Ochogavia et al., 2014) και παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των εκκινητών 5'-3' και θερμοκρασίες πρόσδεσης τους (Temperature annealing, T.an.)

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΑΝΟΔΙΚΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ FORWARD PRIMER 5'-3'	ΚΑΘΟΔΙΚΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ REVERSE PRIMER 5'-3'	T.an. °C
<i>HaAHAS11</i>	CGAACGGTAACCCTAGAACAC	AAGTGATGGGTAATGCGAAAC	64
<i>HaAHAS12</i>	GCCGCCATACATCCTCCCC	CCGGTGGTGGTGGTGGAGTC	65
<i>HaAHAS13</i>	GTTGTTGGCGTTTGGCGTCCG	GATCGCGTTCACCCGTCAC	65
<i>b-tubulin</i>	TCTGCCACCATGTCGGGAGTT	GTAACGCCCGTGTCTGGGTC	64-65

2.4.5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction/PCR), επιτυγχάνεται με τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA *in vitro*, με αποτέλεσμα την δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων όμοιων με το αρχικό.

Στην παρούσα μελέτη, η απλή PCR χρησιμοποιήθηκε για τον αρχικό έλεγχο των εκκινητών πριν την χρησιμοποίησή τους στη Real-Time PCR, δηλαδή για να επιβεβαιωθεί ότι ήταν εξειδικευμένοι για τις αλληλουχίες που είχαμε επιλέξει και θα παρήγαγαν εξειδικευμένο PCR προϊόν. Όλες οι παρατηρήσεις όσον αφορά την ημιποσοτικοποίηση τους μεταξύ των εφαρμογών έγιναν συγκριτικά με τον μάρτυρα. Η *b-tubulin* χρησιμοποιήθηκε ως ενδογενής μάρτυρας για τον έλεγχο της ποιότητας του cDNA και την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης.

Η αντίδραση της PCR αποτελούνταν από το DNA εκμαγείο, τους εκκινητές, τα τριφωσφορικά δεσοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), και την Taq πολυμεράση, η οποία είναι μία θερμοανεκτική πολυμεράση και προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Τα συστατικά αυτά εμπεριέχονται στο KAPATaq HotStart kit της εταιρείας KaraBiosystems. Τα dNTPS προέρχονται από την εταιρεία HT Biotechnology.

Η βελτιστοποίηση της αντίδρασης επιτεύχθηκε με την χρήση των παρακάτω αντιδραστηρίων και συνθηκών (Πίνακας 4 και Πίνακας 5).

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια για την πραγματοποίηση της PCR

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση	Όγκος για 25 μl αντίδρασης
H ₂ O ^{*1}		
5 x PCR buffer	1x	5
25mM MgCl ₂	1,5mM	0,5 μl για κάθε 0,5mM MgCl ₂
dNTPs (mix dNTP 10mM each)	0,2mM	0,5 μl
Ανοδικός εκκινητής 10μM	1μM	0,4 μM
Καθοδικός εκκινητής 10μM	1μM	0,4 Mμ
Kapa Hot start DNA polymerase (5units/μl)	0,10 μl for each 0,5 U needed	0,5 units/25μl rxn
Εκμαγείο DNA ^{*2}		1μl
Συνολικός όγκος		25μl

^{*1}Το H₂O είναι νερό μοριακής καθαρότητας, Rnase-Dnase free

^{*2}Το DNA εκμαγείο είναι το cDNA του κάθε δείγματος σε αραιωση με H₂O, μοριακής καθαρότητας, Rnase-Dnase free, σε αναλογία 1:4

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι θερμοκρασίες πρόσδεσης τους περιγράφονται στον Πίνακα 4 παραπάνω. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η MJ Research PTC-200 Thermal Cycler. Οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφονται παρακάτω στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Συνθήκες βελτιστοποίησης της αντίδρασης της PCR

Στάδια	Θερμοκρασία (° C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη αλυσίδων	95	2 min	1
Αποδιάταξη αλυσίδας και ενεργοποίηση της HotStart Taq Polymerase	95	15 sec	35
Υβριδισμός εκκινητών	Ανάλογα τον εκκινητή	30 sec	
Επιμήκυνση νέας αλυσίδας	72	40 sec	

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για τα τρία γονίδια, *HaAHAS11*, *HaAHAS12*, *HaAHAS13*, την *b-tubulin* καθώς και για τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος περιείχε όλα τα συστατικά της αντίδρασης

εκτός από το εκμαγείο. Η *b-tubulin* χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων και την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης.

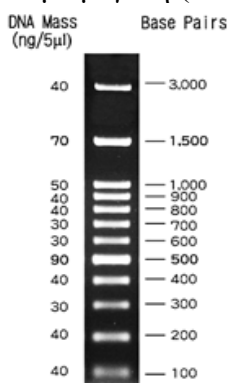
Η *b-tubulin* χρησιμοποιήθηκε σαν ενδογενής μάρτυρας στις αντιδράσεις της PCR, ώστε να παρατηρείται και να επιβεβαιώνεται η περίπτωση λάθους που μπορεί να οφειλόταν είτε στην ποσότητα που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις είτε στην χρήση των υλικών της αντίδρασης είτε στην ποσότητα του εκμαγείου, ώστε την επόμενη φορά να μπορέσει να αποφευχθεί και να διορθωθεί. Ένας ακόμα μάρτυρας ήταν ο αρνητικός μάρτυρας, ο οποίος δεχόταν χειρισμό σαν κανονικό δείγμα, χωρίς να μπει όμως κάποιο cDNA εκμαγείο. Έτσι μπορούσε κάποιος να δει αν το μίγμα που χρησιμοποιούνταν στην PCR ήταν καθαρό ή είχε δεχθεί κάποια μόλυνση.

2.4.6. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων – Υπολογισμός των μεγεθών των ενισχυμένων ζωνών

Η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 2,5% w/v πηκτή αγαρόζης που περιείχε 1,5μl βρωμιούχο αιθύδιο (Ethidium Bromide, EtBr), σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE. Η διαδικασία παρασκευής του ρυθμιστικού διαλύματος περιγράφεται λεπτομερώς στο Παράρτημα 4.

Το βρωμιούχο αιθύδιο, παρεμβάλεται σε μόρια DNA, όπου δένεται μεταξύ των δύο αλυσίδων και χρησιμεύει ως φθορίζουσα σήμανση, όταν τα νουκλεϊνικά οξέα ηλεκτροφορούνται μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης και στη συνέχεια εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Το κάθε κελί του πηκτώματος περιείχε 10μl δείγματος. Το δείγμα αποτελείται από 4μl από την αντίδραση, 1μl ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (10x) και 5μl dH₂O. Στο ακριανό κελί του πηκτώματος τοποθετήθηκαν 5μl του μάρτυρα (100bp DNA ladder της Nippon Genetics), ώστε να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος (M.B.) των ζωνών (προϊόντων της αντίδρασης) με βάση πρότυπα μεγέθη DNA και έδινε 12 θραύσματα με μεγέθη (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Η αντιστοιχία μεγέθους κάθε θραύσματος του πρότυπου DNA

Ο χρόνος που απαιτούταν για την ηλεκτροφόρηση ήταν περίπου 45 λεπτά για εφαρμοζόμενη τάση 110Volt και 76mA.

Μετά από κάθε ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα τοποθετούνταν σε τράπεζα UV για την οπτικοποίηση των ζωνών του DNA. Η φωτογράφιση έγινε σε συσκευή φωτογράφισης του τύπου MiniBis Pro, της εταιρείας DNR Bio Imaging Systems. Η συσκευή ήταν συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και οι φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

2.4.7. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων

Η αντίστροφη μεταγραφή (RT) σε συνδυασμό με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι ένα δυνατό εργαλείο για την ποσοτικοποίηση του mRNA. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της Real Time quantitative PCR (RTqPCR), η οποία μετρά το προϊόν της PCR σε κάθε κύκλο με την χρήση φθορίζοντων χρωστικών, ο φθορισμός αυξάνεται σε αναλογία με την ενίσχυση του προϊόντος. Με την RTqPCR επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση του mRNA.

Η σχετική ποσοτικοποίηση που έγινε στο πείραμα αυτό, βασίζεται στο γονίδιο αναφοράς *b-tubulin*, όπως έχει προαναφερθεί και βοηθά στον προσδιορισμό των διαφορών στην έκφραση του γονιδίου στόχου, το οποίο στην περίπτωση μας είναι το *HaAHAS*. Η ποσοτικοποίηση αυτή δείχνει την μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του mRNA, το οποίο ερμηνεύεται ως συμπληρωματικό DNA (cDNA). Στην σχετική ποσοτικοποίηση, η ποσότητα του γονιδίου στόχου μελετάται σε σύγκριση με την ποσότητα του μάρτυρα γονιδίου αναφοράς.

Για την πραγματοποίηση της RTqPCR χρησιμοποιήθηκαν τα συστατικά που φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια για την Real Time quantitative PCR (RTqPCR)

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση	Όγκος για 20μl αντίδραση
H ₂ O ^{*1}		
Kapa Sybr [®] Fast qPCR Master Mix (2x) Universal	1x	10
Forward Primer (10μM)	200nM	0,4
Reverse Primer (10μM)	200nM	0,4
Εκμαγείο DNA ^{*2}		1μl
Συνολικός Όγκος		20

^{*1}Το H₂O είναι νερό μοριακής καθαρότητας, Rnase-Dnase free

^{*2}Το DNA εκμαγείο είναι το cDNA του κάθε δείγματος σε αραιωση με H₂O, μοριακής καθαρότητας, Rnase-Dnase free, σε αναλογία 1:4

Τα παραπάνω συστατικά εμπεριέχονται στο Kara Sybr[®]Fast qPCR kit της εταιρείας KaraBiosystems. Η φθορίζουσα χρωστική είναι η Sybr[®]Green I. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ίδιοι με την απλή PCR, αφού με αυτήν βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες και ελέγχθηκε η εξειδίκευση των εκκινητών.

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η MJ mini Real Time Thermal Cycler της εταιρείας BioRad. Οι συνθήκες και τα στάδια της RTqPCR φαίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Συνθήκες και στάδια της αντίδρασης RTqPCR

Στάδια	Θερμοκρασία (° C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη αλυσίδων	95	2 min	1
Αποδιάταξη αλυσίδας και ενεργοποίηση της HotStart Taq Polymerase	95	15 sec	40
Υβριδισμός εκκινητών	Ανάλογα τον εκκινητή	20 sec	
Επιμήκυνση νέας αλυσίδας	72	20 sec	
Για την επιβεβαίωση του προϊόντος PCR μία καμπύλη τήξης εκτελέστηκε από τους 65°C έως τους 95 °C με παρατήρηση κάθε 0,2°C προσαύξησης και 10 δευτερόλεπτα αναμονής μεταξύ των παρατηρήσεων.			

Οι αντιδράσεις εφαρμόστηκαν σε τριπλέτες και η σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίστηκε με την χρήση της *b-tubulin*.

2.4.8. Ανάλυση δεδομένων ποσοτικοποίησης

Μετά το πέρας της RTqPCR, βλέπουμε τις τιμές C_q(quantitation cycle) ή C_t (threshold cycle) οι οποίες είναι το σημείο τομής μεταξύ της καμπύλης ενίσχυσης και της τιμής κατωφλίου. Είναι μία σχετική μέτρηση της συγκέντρωσης του στόχου στην PCR αντίδραση (Παράρτημα 5).

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού REST[®](Relative Expression Software Tool) (Pfaffl, 2001; 2002). Με το εργαλείο αυτό επιτυγχάνεται σχετική ποσοτικοποίηση μεταξύ των ομάδων σύγκρισης και ένας μετέπειτα έλεγχος της σημαντικότητας των αποτελεσμάτων με ένα κατάλληλο στατιστικό μοντέλο. Για το λόγο αυτό προγραμματίστηκε να τρέχει σε ένα Microsoft Excel[®], όπως φαίνεται στο Παράρτημα 6. Τα αποτελέσματα που δίνει αφορούν: Το μέσο όρο CP (=C_q ή C_t) του γονιδίου αναφοράς, το CP του δείγματος, το ποσοστό έκφρασης του κάθε δείγματος κατόπιν κανονικοποίησης σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς, τα αντίστοιχα p-Values. Τέλος, οι

τιμές τις σχετικής έκφρασης για το κάθε δείγμα συγκρινόντουσαν πάντα με την τιμή του μάρτυρα S1, που ορίζεται ως 1.

Στη συνέχεια, οι μέσες τιμές από δύο ανεξάρτητα πειράματα καταγράφηκαν στο πρόγραμμα Microsoft Excel 10[®], υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (standard deviations) και δημιουργήθηκαν τα γραφήματα. Οι τιμές που διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$) από τα φυτά μάρτυρες, επισημάνθηκαν με έναν αστερίσκο.

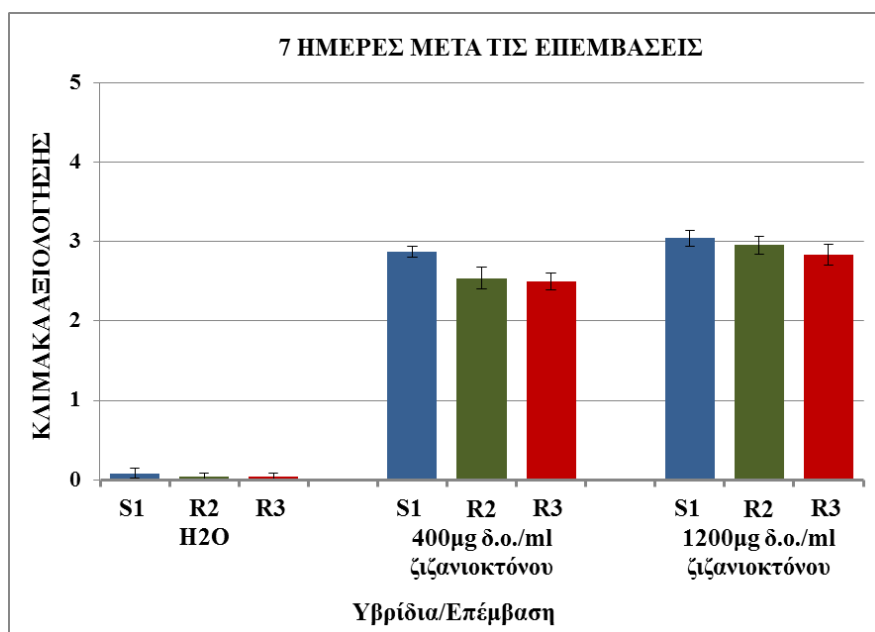
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα τους στο ζιζανιοκτόνο, ύστερα από την εφαρμογή των τριών επεμβάσεων: με νερό (μάρτυρας), με 400 μg δραστικής ουσίας (δ.ο.) imazamox /ml ζιζανιοκτόνου και με 1200μg δ.ο./ml μετά από 7, 14, 21 ημέρες από την μεταχείριση τους στο δεύτερο με τρίτο ζεύγος φύλλων (V4-V6).

3.1.1. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων μετά από 7 ημέρες από τις επεμβάσεις.

Κατά τη λήψη της πρώτης παρατήρησης (7^η ημέρα), ήταν εμφανείς οι πρώτες διαφορές μεταξύ των υβριδίων και των επεμβάσεων (Πίνακας 1-Παράρτημα 7), εκτιμήθηκαν οι δύο επαναλήψεις των φυτών σύμφωνα με την κλίμακα αξιολόγησης (Πίνακας 1), όπου 0 χαρακτηρίζονται τα υγιή φυτά και 5 τα νεκρά φυτά. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των φυτών ανά επέμβαση, η τυπική απόκλιση και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Γράφημα 1.



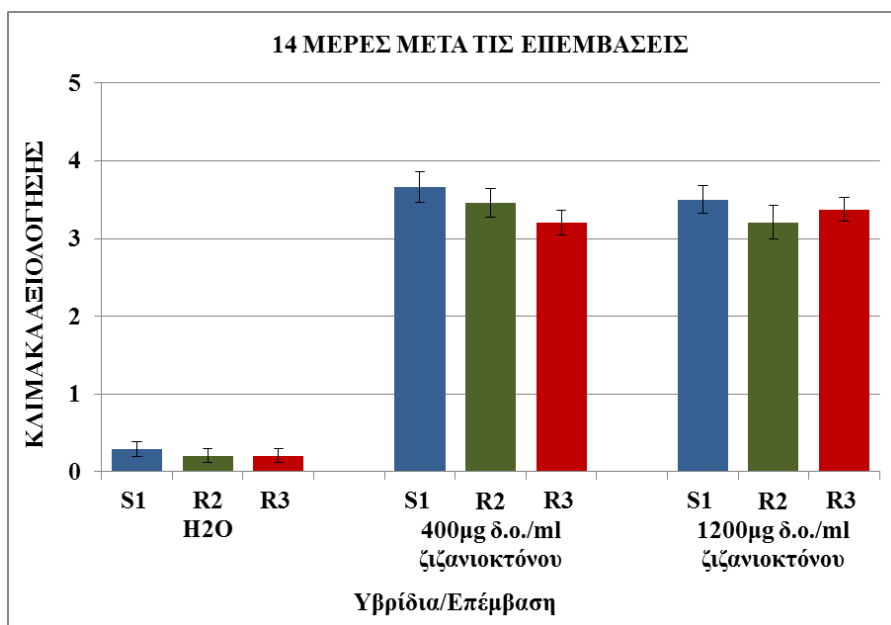
Γράφημα 1. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων, 7 ημέρες από την εφαρμογή των επεμβάσεων, στα υβρίδια S1, R2 και R3

Τα τρία υβρίδια S1, R2 και R3 στην επέμβαση με νερό, δεν εμφάνισαν κανένα φυτοτοξικό σύμπτωμα και χαρακτηρίστηκαν ως υγιή. Το ευαίσθητο υβρίδιο S1 παρουσίασε τα πιο έντονα συμπτώματα σε σχέση με τα ανθεκτικά υβρίδια R2 και R3 και στις δύο επεμβάσεις, με 400 και

1200μg δ.ο./ml. Το S1 παρουσίασε εκτεταμένες νεκρωτικές κηλίδες σχεδόν σε όλα τα φυτά και στις δύο επεμβάσεις. Τα R2 και R3 στην επέμβαση με 400μg δ.ο./ml, εμφάνισαν παρόμοια συμπτώματα σε κάποια φυτά, παρουσιάζοντας νεκρωτικά σημεία στα φύλλα και συστροφή στα φύλλα τους, ενώ στην επέμβαση με 1200μg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου, εμφάνισαν πιο έντονα φυτοτοξικά συμπτώματα, παρουσιάζοντας εκτεταμένες νεκρωτικές κηλίδες.

3.1.2. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων μετά από 14 ημέρες από τις επεμβάσεις.

Η δεύτερη παρατήρηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων έγινε την 14^η ημέρα μετά την εφαρμογή των επεμβάσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Γράφημα 2.

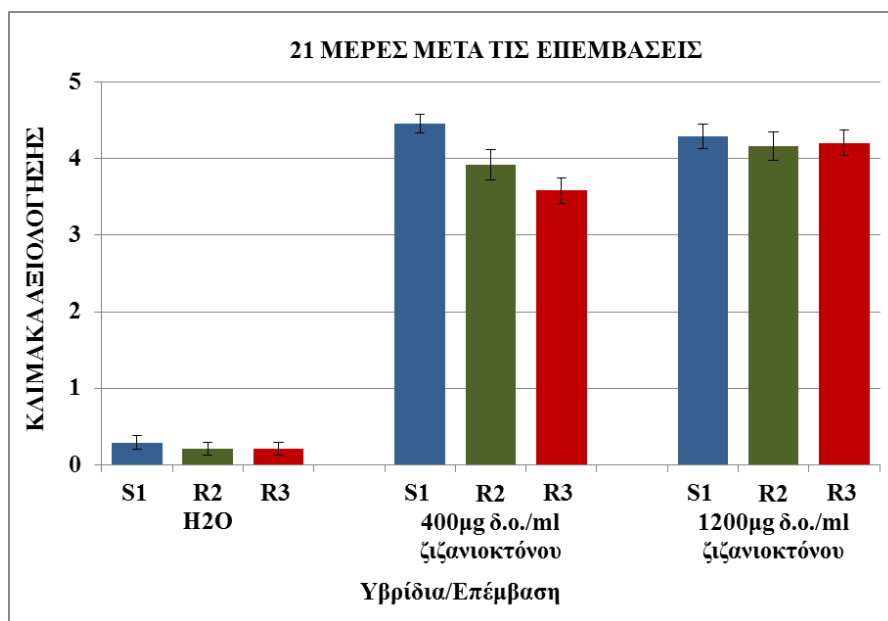


Γράφημα 2. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων, 14 ημέρες από την εφαρμογή των επεμβάσεων, στα υβρίδια S1, R2 και R3

Τα τρία υβρίδια S1, R2 και R3 στην επέμβαση με νερό, δεν εμφάνισαν κανένα φυτοτοξικό σύμπτωμα και είναι υγιή. Όλα τα φυτά, των τριών υβριδίων που είχαν δεχτεί επέμβαση με ζιζανιοκτόνο, είτε με 400μg δ.ο./ml, είτε με 1200μg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου, ανήκουν στην κλίμακα αξιολόγησης 3 με 4. Μερικά από αυτά εμφάνιζαν εκτεταμένες νεκρωτικές κηλίδες και ήταν λίγο χειρότερα σε σχέση με την 7^η ημέρα παρατήρησης (Πίνακας 2-Παράρτημα 7). Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα υβρίδια μεταξύ των επεμβάσεων με το ζιζανιοκτόνο, ενώ τα φυτά των τριών υβριδίων του μάρτυρα συνέχισαν να αναπτύσσονται κανονικά.

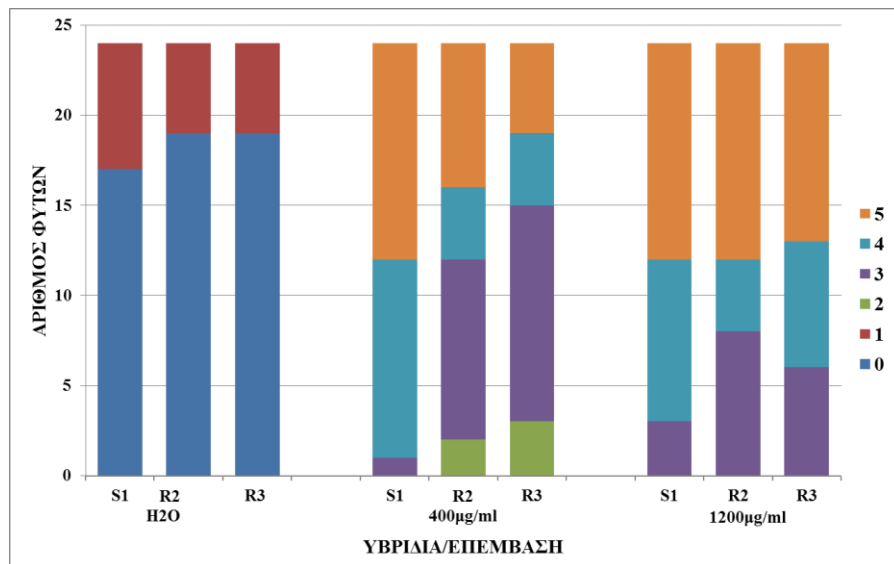
3.1.3. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων μετά από 21 ημέρες από τις επεμβάσεις.

Η τελευταία παρατήρηση έγινε την 21^η ημέρα. Τα τρία υβρίδια αξιολογήθηκαν σύμφωνα με την κλίμακα 0 (υγιή) – 5 (νεκρά) (Πίνακας 1), στις 3 επεμβάσεις, με το νερό (μάρτυρας), με 400μg δ.ο./ml και με 1200μg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Στο Γράφημα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, στο οποίο φαίνονται ότι τα υβρίδια διαφοροποιούνται σύμφωνα με τις επεμβάσεις, ενώ λεπτομερώς παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 του Παραρτήματος 7.



Γράφημα 3. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων, 21 ημέρες από την εφαρμογή των επεμβάσεων, στα υβρίδια S1, R2 και R3

Στην δόση των 400μg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου, το ευαίσθητο υβρίδιο (S1) παρουσίασε σχεδόν σε όλα τα φυτά εκτεταμένες νεκρωτικές κηλίδες σε όλα τα ζεύγη φύλλων και τελείως νεκρά φύλλα ενώ χαρακτηρίστηκε σε κλίμακα μεταξύ 4 με 5. Το R3 σε σχέση με το S1 υβρίδιο παρουσίασε μεγαλύτερη ανεκτικότητα και χαρακτηρίστηκε από φυτά που είχαν εκτεταμένες νεκρωτικές κηλίδες. Το R2 παρουσίασε και αυτό ανεκτικότητα σε σχέση με το S1 αλλά έδειξε μία πιο μικρή ευαισθησία σε σχέση με το R3. Στην επέμβαση με τα 1200μg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου, τα υβρίδια S1, R2 και R3 παρουσίασαν ευαισθησία, αξιολογώντας τα σε κλίμακα πάνω από 4, με έντονες νεκρωτικές κηλίδες ή και τελείως ξεραμένα φύλλα σχεδόν σε όλα τα φυτά.



Γράφημα 4. Απεικόνιση των 24 φυτών, 21 ημέρες από τις επεμβάσεις, η οποία αντιστοιχεί στην κλίμακα αξιολόγησης 0-5. Διαφορετικό χρώμα αντιστοιχεί σε άλλο επίπεδο φυτοτοξικότητας.

Συμπερασματικά λοιπόν, σύμφωνα με τα Γραφήματα 1, 2 και 3, τα ανθεκτικά υβρίδια R2 και R3 παρουσίασαν ανεκτικότητα στη δόση των 400µg imazamox/ml ζιζανιοκτόνου και ευαισθησία στη δόση των 1200µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Το ευαίσθητο υβρίδιο S1 παρουσίασε ευαισθησία και στις δύο επεμβάσεις των 400 και 1200 µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Η 21^η ημέρα θεωρείται η πιο κατάλληλη μέρα παρατήρησης λόγω του ακριβή διαχωρισμού των υβριδίων μετά τις επεμβάσεις και της παρουσίας των πιο έντονων συμπτωμάτων.

Επίσης στο Γράφημα 4, 21 ημέρες μετά τις επεμβάσεις, φαίνεται ότι τα φυτά μάρτυρες συνέχισαν να αναπτύσσονται με ελαφριές χλωρώσεις στα φύλλα, ενώ στην επέμβαση με 400µg/ml ζιζανιοκτόνου, το S1 υβρίδιο παρουσίασε ευαισθησία, παρουσιάζοντας ολική ανάσχεση της ανάπτυξης και νέκρωση του, ενώ τα υβρίδια R2 και R3 φάνηκαν ανθεκτικά παρουσιάζοντας ελαφρύτερα συμπτώματα, δηλαδή κάποια νεκρωτικά σημεία στα φύλλα ή κάποιες έντονες νεκρωτικές κηλίδες. Τέλος, στην επέμβαση με 1200µg δ.ο./ml, τα φυτά δεν μπορούσαν να ανακάμψουν.

3.1.4. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα JMP®8 και παρουσιάζονται στο Παράρτημα 8.

Στην αρχή έγινε έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων για τις παρατηρήσεις των 7ημερών, των 14 ημερών και 21 ημερών, ο οποίος έδειξε ότι τα δεδομένα ακολουθούσαν την κανονική κατανομή.

Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση διασποράς η οποία έδειξε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των υβριδίων και των επεμβάσεων δεν ήταν σημαντική κατά την λήψη και των τριών παρατηρήσεων, ενώ σημαντική ήταν η επίδραση του γονοτύπου των υβριδίων αλλά και των επεμβάσεων την 7^η ημέρα καθώς και την 21^η. Την 14^η ημέρα, η επίδραση προερχόταν από τις επεμβάσεις.

Στη συνέχεια ακολούθησε σύγκριση των μέσων όρων με την μέθοδο Student's (LSD) για τα τρία υβρίδια και τις τρεις επεμβάσεις κατά τα τρία χρονικά διαστήματα. Την 7^η ημέρα το ευαίσθητο υβρίδιο S1 διέφερε σημαντικά από τα R2 και R3, οι επεμβάσεις διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους με την επέμβαση 1200μg/ml να είναι στο πρώτο επίπεδο σημαντικότητας. Την 14^η ημέρα τα υβρίδια δεν διέφεραν μεταξύ τους, ενώ οι επεμβάσεις 400 και 1200μg/ml δεν διέφεραν μεταξύ τους αλλά με τον μάρτυρα, δηλαδή την επέμβαση με το νερό. Την 21^η ημέρα, τα ανθεκτικά υβρίδια δεν διέφεραν μεταξύ τους αλλά με το ευαίσθητο, οι επεμβάσεις με 400 και 1200μg/ml δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους αλλά με την επέμβαση με το νερό.

3.1.5. Μέση αποτελεσματική δόση (Effective dose 50 -ED₅₀)

Μετά την τελευταία παρατήρηση 21^η ημέρα, αξιολογήθηκε η μέση αποτελεσματική δόση (ED₅₀) του ζιζανιοκτόνου στα φυτά, δηλαδή η επέμβαση του ζιζανιοκτόνου κατά την οποία τα φυτά παρουσίασαν τα λιγότερα εκτενή φυτοτοξικά συμπτώματα και επιβίωσαν.

Τα αποτελέσματα λοιπόν έδειξαν ότι κατά την επέμβαση με 400μg imazamox/ml ζιζανιοκτόνου, τα φυτά των υβριδίων R2 και R3 ήταν ανεκτικά, ενώ το ευαίσθητο υβρίδιο S1 παρουσίασε ευαισθησία. Στην επέμβαση με 1200μg imazamox/ml ζιζανιοκτόνου, όλα τα υβρίδια S1, R2 και R3 δεν εμφάνισαν ανθεκτικότητα.

3.2. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν το ένζυμο AHAS πραγματοποιήθηκε σε φυλλικό ιστό, 36 ώρες μετά την εφαρμογή του ψεκαστικού υγρού. Απομονώθηκε συνολικό RNA από τον φυλλικό ιστό του κάθε υβριδίου, προσδιορίστηκε η ποιότητα και η ποσότητα του και εν συνέχεια έγινε η σύνθεση συμπληρωματικού cDNA και τέλος πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των *HaAHAS11*, *HaAHAS12* και *HaAHAS13* με PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR).

3.2.1. Ποιοτικός έλεγχος και ποσοτικός προσδιορισμός του RNA

3.2.1.1. Με τη χρήση του σπεκτοφωτόμετρου

Μετά την εξαγωγή του RNA ελέγχθηκε ποιοτικά και ποσοτικά το RNA με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου Nanodrop 1000 και του προγράμματος N.D.-1000 v 3.3.1.

Πίνακας 8. Ποσοτικοποίηση RNA των δειγμάτων μετά την επέμβαση με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ζιζανιοκτόνου 400μg/ml και 1200μg/ml καθώς και με τον ψεκασμό με νερό

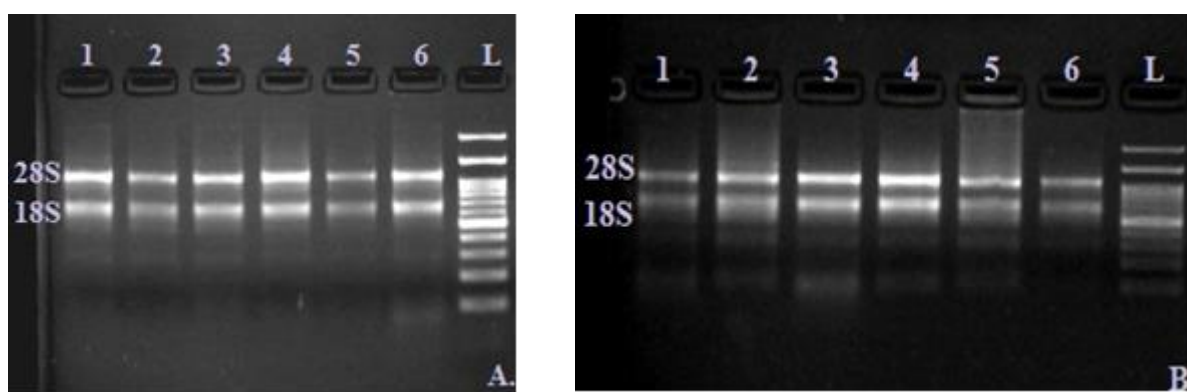
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ng/ul	Μέσος Όρος (ng/ul)	A260	A280	260/280	260/230
S1 H ₂ O A	36,64	37,82	0,92	0,44	2,07	1,77
S1 H ₂ O B	39,00		0,98	0,47	2,09	1,86
S1 400 A	67,39	67,87	1,69	0,73	2,30	0,84
S1 400 B	68,35		1,71	0,76	2,26	0,84
S1 1200 A	66,23	66,61	1,66	0,76	2,17	1,32
S1 1200 B	66,99		1,68	0,78	2,14	1,29
R2 H ₂ O A	85,03	86,34	2,13	1,02	2,09	2,16
R2 H ₂ O B	87,65		2,19	1,08	2,03	2,16
R2 400 A	82,67	82,72	2,07	0,91	2,27	1,61
R2 400 B	82,76		2,07	0,90	2,29	1,65
R2 1200 A	61,50	61,93	1,54	0,69	2,23	1,32
R2 1200 B	62,36		1,56	0,71	2,19	1,29
R3 H ₂ O B	71,42	71,33	1,79	0,79	2,25	0,81
R3 H ₂ O A	71,24		1,78	0,80	2,23	0,80
R3 400 A	88,27	88,24	2,21	0,95	2,32	1,37
R3 400 B	88,20		2,21	0,95	2,32	1,39

R3 1200 A	29,21	28,91	0,73	0,35	2,11	1,36
R3 1200 B	28,61		0,72	0,32	2,23	1,40

Σύμφωνα με τον Πίνακα 8, παρατηρείται ότι η συγκέντρωση των δειγμάτων κυμάνθηκε από 28,91ng/ul έως 88,24 ng/ul. Η συγκέντρωση αυτή θεωρείται ικανή για το επόμενο στάδιο, τη σύνθεση του cDNA. Επίσης, ο λόγος 260/280 επιβεβαίωσε ότι τα δείγματα δεν περιείχαν αυξημένη ποσότητα πρωτεΐνης. Παρομοίως τα δείγματα είχαν ικανοποιητικό λόγο 260/230.

3.2.1.2. Εκτίμηση της ποιότητας του RNA σε πηκτή αγαρόζης

Επιπρόσθετα, η ποιότητα του RNA αναλύθηκε σε 2,5% πηκτή αγαρόζης.



Εικόνα 7. Ανάλυση του απομονωμένου συνολικού RNA, σε πηκτή αγαρόζης 2,5%, το 1, 3, 5 συμβολίζουν το S1, R2 και το R3 αντίστοιχα, μετά την εφαρμογή του ψεκαστικού υγρού με νερό, ενώ το 2, 4, 6 συμβολίζουν το S1, R2, R3 αντίστοιχα, στην (A) μετά από ψεκασμό με νερό και 400μg δραστικής ουσίας imazamox και η (B) μετά την εφαρμογή ψεκαστικού υγρού με νερό και 1200μg δραστικής ουσίας imazamox

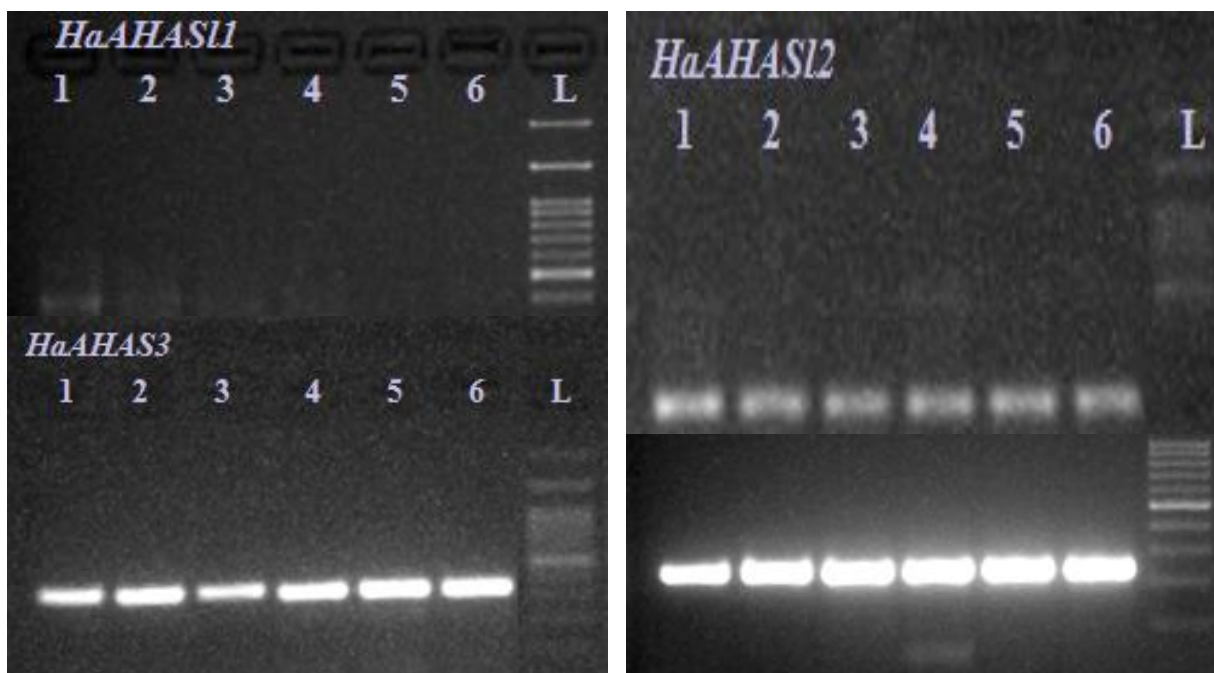
Από την Εικόνα 7, παρατηρείται ότι το RNA ήταν ανέπαφο και δεν είχε αποδομηθεί. Οι ενδεικτικές ζώνες του ριβοσωμικού RNA 28S και 18S ήταν ευδιάκριτες. Επίσης, ήταν ορατές οι ενδεικτικές ζώνες του χλωροπλαστικού, ριβοσωμικού RNA 23S και 16S. Μία αναλογία περίπου 2:1 του 28S:18S μας έδειξε ότι το RNA ήταν ανέπαφο και δεν είχε αποδομηθεί. Το αποτέλεσμα αυτό ανέδειξε και την αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Macherey-Nagel kit) που χρησιμοποιήθηκε.

3.2.2. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης

3.2.2.1. Ημιποσοτικοποίηση με την εφαρμογή της PCR

Πριν την σχετική ποσοτικοποίηση με την quantitative PCR (qPCR), έπρεπε να σταθεροποιηθούν οι συνθήκες της PCR αντίδρασης για το κάθε γονίδιο και να επιβεβαιωθεί η σύνθεση εξειδικευμένου προϊόντος στο αναμενόμενο μέγεθος. Συνεπώς, στην αρχή πραγματοποιήθηκε απλή *end point PCR*,

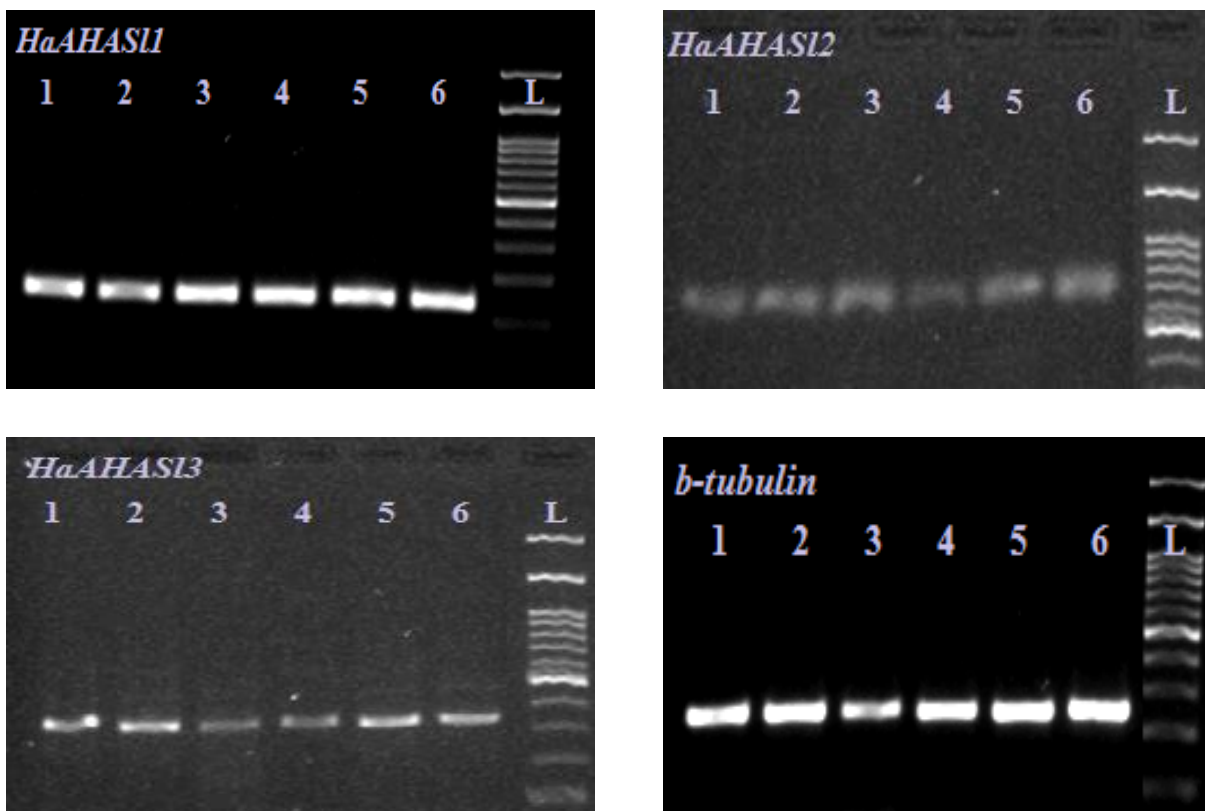
με τις συνθήκες που αναφέρθηκαν στα Υλικά και Μέθοδοι, με εκμαγείο το cDNA που προήλθε από το RNA όλων των δειγμάτων. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 2,5%.



Εικόνα 8. Ανάλυση των προϊόντων PCR των γονιδίων *HaAHAS1*, *HaAHAS2*, *HaAHAS3* και της *b-tubulin* σε πηκτική αγαρόζης 2,5%. Το 1, 3, 5 αφορούν τα υβρίδια S1, R2, R3, μετά τη χρήση ψεκαστικού υγρού μόνο νερό και τα 2, 4, 6 τα υβρίδια S1, R2 και R3 με 400μg δραστικής ουσίας imazamox

Στην Εικόνα 8, παρουσιάζονται τα προϊόντα της PCR για τα γονίδια *HaAHAS1*, *HaAHAS2*, *HaAHAS3* και της *b-tubulin*.

Μετά την οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR για το *HaAHAS1*, ήταν ορατή μία ευδιάκριτη ζώνη μεγέθους περίπου 150bp και στα τρία υβρίδια, στα φυτά μάρτυρες όπως και μετά την επέμβαση με 400μg δραστικής ουσίας imazamox. Μονή ζώνη διακρίθηκε επίσης και για το γονίδιο *HaAHAS2* στο αναμενόμενο μέγεθος 167bp, όπως και για το *HaAHAS3* στο αναμενόμενο μέγεθος 337bp. Επίσης, μονή ζώνη διακρίθηκε και στο PCR προϊόν της *b-tubulin* (250bp).

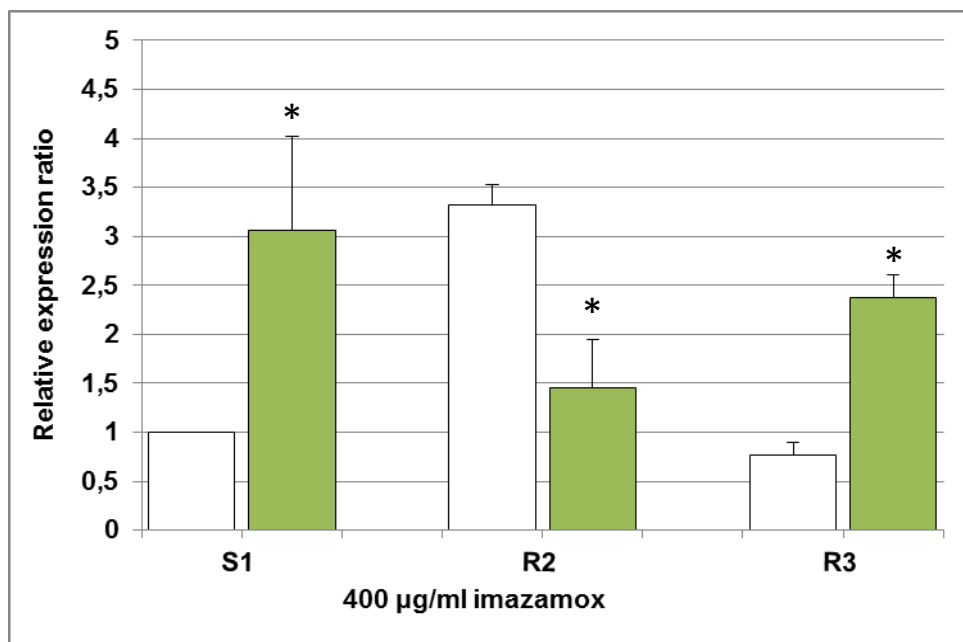


Εικόνα 9. Ανάλυση των προϊόντων PCR των γονιδίων *HaAHAS1*, *HaAHAS2*, *HaAHAS3* και της *b-tubulin* σε πηκτή αγαρόζης 2,5%. Το 1, 3, 5 αφορούν τα υβρίδια S1, R2, R3, μετά τη χρήση ψεκαστικού υγρού μόνο νερό και τα 2, 4, 6 τα υβρίδια S1, R2 και R3 με 1200μg δραστικής ουσίας imazamox

Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και η ανάλυση των προϊόντων PCR για τα γονίδια *HaAHAS1*, *HaAHAS2*, *HaAHAS3* και της *b-tubulin* (Εικόνα 9). Οι διαφορές στο επίπεδο των μεταγραφημάτων επιβεβαιώθηκαν με τη Real Time quantitative PCR.

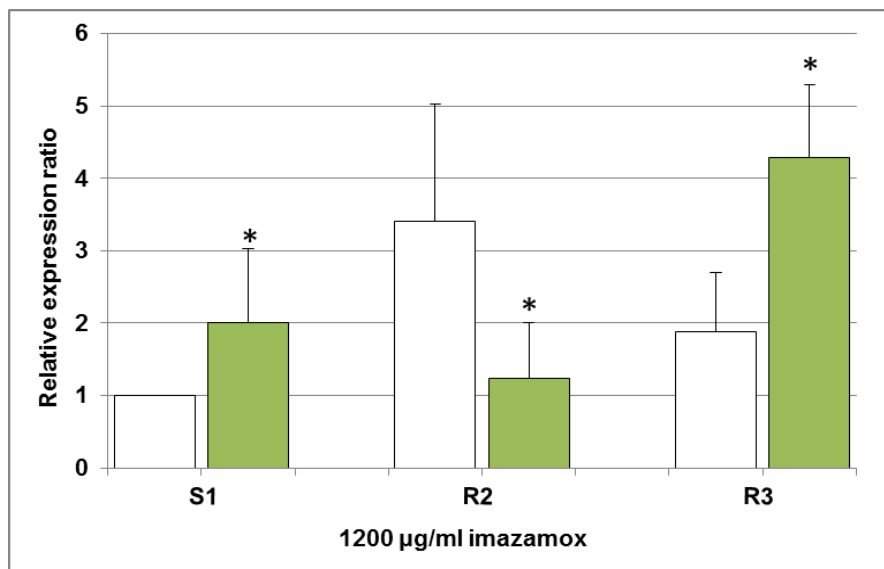
3.2.2.2. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων - RTqPCR

Μετά την εφαρμογή της τεχνικής RTqPCR, αναλύθηκαν τα δεδομένα, με το λογισμικό REST[®] και με τη χρήση του προγράμματος Microsoft Excel 10[®], δημιουργήθηκαν τα παρακάτω γραφήματα.



Γράφημα 5. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *HaAHAS11*, στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 400µg/ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι πράσινες την επέμβαση με 400µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την *b-tubulin*) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*

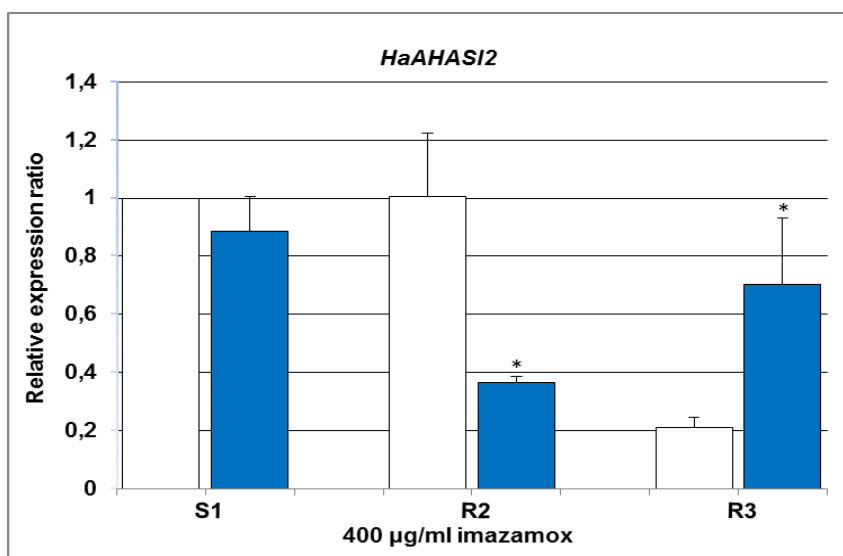
Στο Γράφημα 5, η έκφραση του γονιδίου *HaAHAS11*, στο S1 υβρίδιο που έχει δεχτεί επέμβαση με 400µg δ.ο./ml έδειξε μία σημαντική αύξηση της έκφρασης του κατά 3 φορές περισσότερη σε σχέση με το S1 μάρτυρα. Στο υβρίδιο R3, το οποίο είχε δεχτεί επέμβαση υπήρξε περίπου η ίδια αύξηση της έκφρασης του γονιδίου σε σχέση με το R3 που είχε δεχτεί επέμβαση με νερό (μάρτυρας). Αντίθετα, το υβρίδιο R2 που είχε δεχτεί επέμβαση, εμφάνισε μικρότερη επαγωγή σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου στο μάρτυρα, αλλά και σε σχέση με τα υβρίδια S1 και R3 που είχαν δεχτεί την ίδια επέμβαση.



Γράφημα 6. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *HaAHAS11*, στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 1200µg/ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι πράσινες την επέμβαση με 1200µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την *b-tubulin*) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*

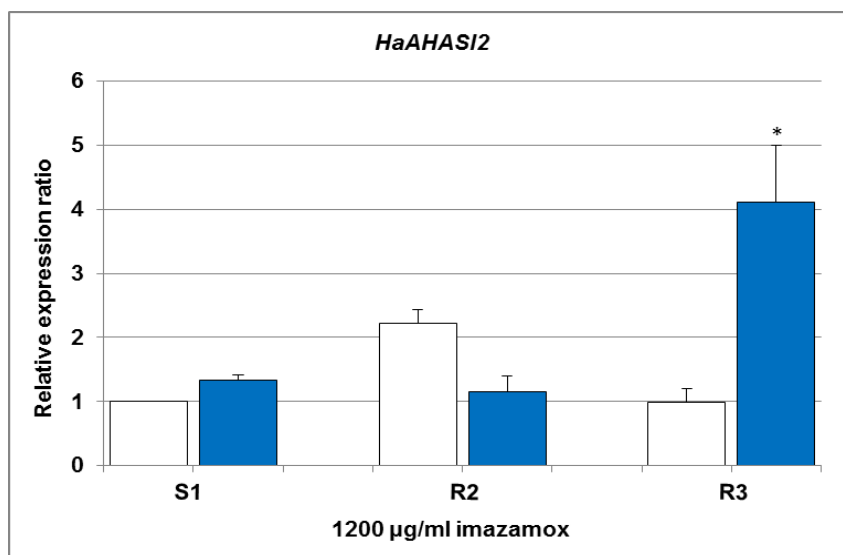
Στην επέμβαση με 1200µg/ml με imazamox (Γράφημα 6), το S1 υβρίδιο παρουσίασε αύξηση της επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου *HaAHAS11* σε σχέση με το μάρτυρα κατά 2 φορές. Στο R2 υβρίδιο που είχε δεχτεί την επέμβαση με 1200µg/ml, η έκφραση παρέμεινε κοντά στο 1 σε σχέση με τον μάρτυρα που ήταν κοντά στο 3,5. Το R3 υβρίδιο που είχε δεχτεί την επέμβαση, έδειξε ότι υπήρξε επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου περίπου 2,5 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης, σημαντικά στατιστικώς διαφορές παρουσίασαν το S1 και R2, τα οποία είχαν δεχτεί επέμβαση με 1200µg/ml.

Συνοψίζοντας λοιπόν για το γονίδιο *HaAHAS11*, παρατηρώντας το Γράφημα 5 και το Γράφημα 6, υπάρχει μία σημαντική επαγωγή της έκφρασης του στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στο ανθεκτικό R3 και στις δύο επεμβάσεις, 400 και 1200 µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου σε σχέση με την έκφραση του στα φυτά που είχαν δεχτεί ψεκασμό με νερό (μάρτυρας).



Γράφημα 7. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *HaAHAS12*, στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 400µg/ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι μπλε την επέμβαση με 400µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την *b-tubulin*) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*

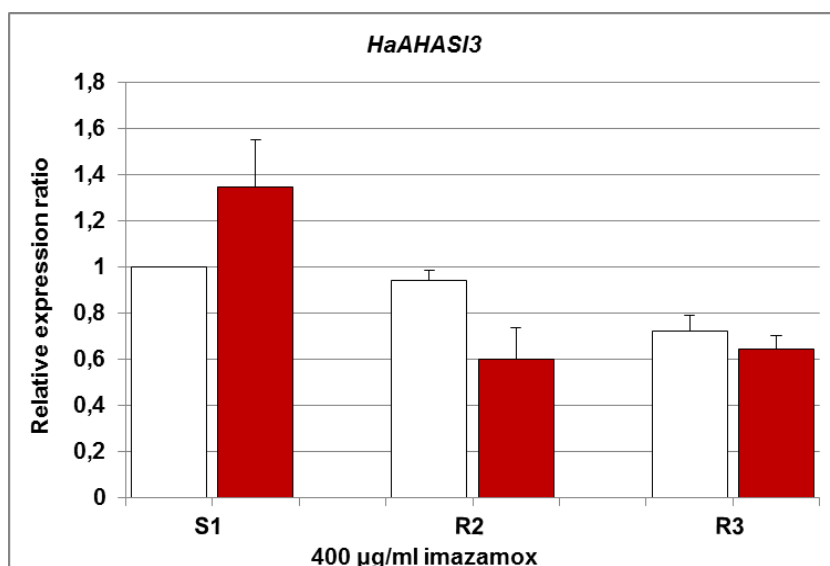
Στο Γράφημα 7, η έκφραση του *HaAHAS12*, δεν έδειξε σημαντική μεταβολή στο υβρίδιο S1 μετά την επέμβαση με 400µg/ml σε σχέση με το μάρτυρα που βρισκόταν στο 1. Στο R2 υβρίδιο, η έκφραση του γονιδίου, ήταν μειωμένη σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίθετα, σημαντική επαγωγή παρατηρήθηκε στο υβρίδιο R3 μετά την επέμβαση με 400µg/ml, περίπου 3,5 φορές περισσότερο σε σχέση με τον μάρτυρα. Σημαντικά στατιστικά διαφορές παρουσίασαν τα R2 και R3 που είχαν δεχτεί επέμβαση με 400µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνο, σε σχέση με τα R2 και R3 που είχαν δεχτεί ψεκάσμο με νερό.



Γράφημα 8. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *HaAHAS12*, στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 1200µg/ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι μπλε την επέμβαση με 1200µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την *b-tubulin*) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*

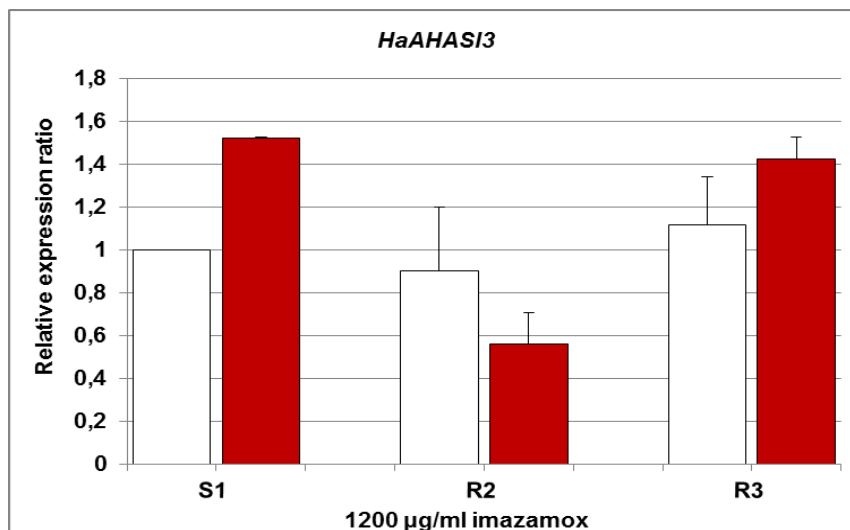
Στο Γράφημα 8, η έκφραση του γονιδίου *HaAHAS12*, δεν έδειξε μεγάλη επαγωγή στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 μετά την επέμβαση με 1200µg/ml σε σχέση με τον μάρτυρα. Το ανθεκτικό υβρίδιο R2 δεν παρουσίασε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίθετα, το υβρίδιο R3 παρουσίασε υπερέκφραση του γονιδίου *HaAHAS12*, σχεδόν 4 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την επέμβαση με το νερό.

Συνοψίζοντας για το γονίδιο *HaAHAS12*, σύμφωνα με τα Γραφήματα 7 και 8, η έκφραση του ήταν αξιοσημείωτη για το ανθεκτικό υβρίδιο R3, η οποία ήταν 4 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το μάρτυρα, στα 400 και 1200µg/ml. Το S1 υβρίδιο δεν παρουσίασε καμία σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των επεμβάσεων, ενώ το ανθεκτικό υβρίδιο R2 παρουσίασε μειωμένη έκφραση σε σχέση με το μάρτυρα.



Γράφημα 9. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *HaAHAS12*, στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 400µg δ.ο./ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι κόκκινες την επέμβαση με 400µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την *b-tubulin*) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*

Σύμφωνα με το Γράφημα 9, η έκφραση του γονιδίου *HaAHAS13*, δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε κανένα από τα τρία υβρίδια στην επέμβαση με 400µg/ml.



Γράφημα 10. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *HaAHAS12*, στο ευαίσθητο υβρίδιο S1 και στα ανθεκτικά υβρίδια R2, R3 μετά από μεταχείριση με 1200µg/ml imazamox. Οι λευκές στήλες δείχνουν την επέμβαση με το νερό (μάρτυρας) και οι κόκκινες την επέμβαση με 1200µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (κανονικοποιημένης ως προς την *b-tubulin*) για το κάθε δείγμα συγκρίνεται με την τιμή του μάρτυρα S1 (νερό), που ορίζεται ως 1. Σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με αστερίσκο*

Σύμφωνα με το Γράφημα 10, η έκφραση του γονιδίου *HaAHAS13*, δεν παρουσίασε καμία σημαντική μεταβολή μεταξύ των επεμβάσεων, με νερό (μάρτυρας) και με 1200µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου.

Συνοψίζοντας το Γράφημα 9 και 10, η έκφραση του γονιδίου *HaAHAS13*, δεν παρουσίασε καμία σημαντική αλλαγή στα υβρίδια S1, R2 και R3, σε καμία από τις επεμβάσεις, 400 και 1200µg δ.ο./ml ζιζανιοκτόνου.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Φαινοτυπική αξιολόγηση των υβριδίων

Η απόκριση του ηλίανθου σε ζιζανιοκτόνα αναστολείς του ενζύμου AHAS έχει μελετηθεί αρκετά όσον αφορά καθαρές σειρές αλλά όχι σε υβρίδια (Jursik et al., 2014). Τα υβρίδια όμως είναι αυτά που προμηθεύονται από τις διάφορες εταιρείες και χρησιμοποιούν τελικά οι παραγωγοί (Jocic et al., 2011). Επειδή οι ανθεκτικές καλλιέργειες στις ιμιδαζολιόνες δεν είναι γενετικά τροποποιημένες αλλά βασίζονται σε εκμετάλλευση της μετάλλαξης αυτής μέσω παραδοσιακών μεθόδων βελτίωσης και επιλογής, είναι αποδεχτές σε πολλές χώρες (Tan et al., 2006). Η κατανόηση του τρόπου δράσης των ζιζανιοκτόνων αποτελεί βασικό παράγοντα για το σχεδιασμό ζιζανιοκτόνων βασισμένων στον έλεγχο των ζιζανίων (Forouzesh et al., 2015) και για μεγαλύτερη περιβαλλοντική ασφάλεια σε σχέση με το παρελθόν (Green, 2014).

Η φαινοτυπική αξιολόγηση του ηλίανθου *in planta* σε φυτοδοχεία, σε συνθήκες θερμοκηπίου, μπορεί να θεωρηθεί μία γρήγορη και ασφαλής μέθοδος, για την επιλογή και τον έλεγχο του γενετικού υλικού, ενώ αποτελεί και προσομοίωση της ανάπτυξης των φυτών σε εξωτερικό περιβάλλον, όπως είναι ο αγρός. Ταυτόχρονα, έχουν γίνει και άλλες μελέτες *in vitro*, όπως με τριβλία petri (Vega et al., 2009; 2012; Breccia et al., 2011; Sala et al., 2012e).

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για τη φαινοτυπική αξιολόγηση των υβριδίων, επιλέχθηκαν βάση προηγούμενων πειραμάτων (Mezili et al., 2014, unpublished data), τα οποία είχαν δείξει ότι στην συγκέντρωση των 400 μg δ.ο./ml, τα ανθεκτικά υβρίδια παρουσίασαν σημαντική διαφοροποίηση, ενώ στην δόση των 1200 μg δ.ο./ml το ποσοστό επιβίωσης των φυτών ήταν πολύ μικρό. Οι επεμβάσεις έγιναν στο στάδιο δευτέρου με τρίτου ζεύγους φύλλων και οι παρατηρήσεις έγιναν κατά την πρώτη μέχρι και την τρίτη εβδομάδα μετά από τις επεμβάσεις, σύμφωνα με τους Burgos et al. (2013).

Οι Sala et al. (2012b), σε αντίστοιχο πείραμα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας υβριδίων ηλίανθου, F1 και F2 γενιάς, που είχαν παραχθεί από διασταύρωση ανθεκτικών καθαρών σειρών με ευαίσθητες, έδειξαν ότι η F1 γενιά χαρακτηρίστηκε ως ημιανθεκτική, ενώ στην F2 παρουσιάστηκε η αναλογία 1:2:1 (ανθεκτικά:ευαίσθητα:ημιανθεκτικά) των υβριδίων, έπειτα από ψεκασμό των φυτών με τη δραστική ουσία imazapyr (80 gai/ha).

Το imazapyr ανήκει και αυτό στην ομάδα των ιμιδαζολιόνων όπως το imazamox, ενώ τα 80 gr ai/ha που χρησιμοποιήθηκαν από τους Sala et al. (2012b) αντιστοιχούν στην επέμβαση των 400μg δραστικής ουσίας/ml του πειράματος μας. Οι παρατηρήσεις που λήφθηκαν κατά την 14^η ημέρα του

πειράματος, θα μπορούσαν να ανταποκριθούν στην ταξινόμηση των Sala et al. (2012b) χαρακτηρίζοντας τα R2 και R3 ως ημιανθεκτικά, όπως χαρακτηρίστηκε η F1 γενιά στο πείραμά τους, λόγω της εμφάνισης σε αρκετά από τα φυτά χλωρωτικών και νεκρωτικών σημείων και της μη ύπαρξης διαφορών του ύψους τους σε σχέση με τους μάρτυρες.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από τους Massinga et al. (2003), οι οποίοι μελέτησαν την F1 γενιά που προέκυψε έπειτα από τη διασταύρωση ενός εξημερωμένου IMI-ανθεκτικού ηλίανθου είτε με τον κοινό ηλίανθο, *Helianthus annuus* είτε με τον *Helianthus petiolaris* (prairie ηλίανθου). Ο ψεκασμός εφαρμόστηκε στο ίδιο στάδιο και στα δύο πειράματα, δηλαδή στο τέταρτο φύλλο και με την ίδια δραστική ουσία, σε διάφορες συγκεντρώσεις, από τις οποίες οι 0 και οι 80 g a.i./ha ήταν κοινές με το παρόν πείραμα. Τα υβρίδια κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 επίπεδα: ανθεκτικά, εάν η ζημία ήταν μικρότερη του 20%, ημιανθεκτικά, εάν ήταν μεταξύ 20 με 80% και ευαίσθητα εάν η ζημία ήταν μεγαλύτερη του 80%. Σύμφωνα με αυτή την κατάταξη τα R2 και R3 υβρίδια κατατάχθηκαν ως ημιανθεκτικά ή ανεκτικά γιατί τα συμπτώματά τους έδειξαν ζημία μεταξύ 50-60% στην συγκέντρωση 400 μg imazamox/ml ενώ ως ευαίσθητα στην δόση των 1200 μg imazamox/ml, αποτελέσματα που συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Τα υβρίδια R2 και R3 στην παρούσα εργασία θα μπορούσαν να θεωρηθούν ανθεκτικά γιατί πέρα από κάποιες έντονες νεκρωτικές κηλίδες (επίπεδο 3) που εμφάνισαν στα φύλλα, τα φυτά είχαν ζωντανό ακραίο μερίστωμα και άντεξαν ακόμα και μετά από τις 21 ημέρες από τις επεμβάσεις περισσότερα από το 50% των φυτών, σε δόση η οποία ήταν 2 φορές μεγαλύτερη της συνιστώμενης (400μg/ml), ενώ στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 6 φορές μεγαλύτερη της συνιστώμενης το 20% των φυτών είχε επιβιώσει. Το ύψος τους σαν γενική εικόνα είχε παραμείνει σταθερό.

Σύμφωνα με τη Weed Science Society of America (WSSA), ως ανθεκτικότητα ορίζεται η κληρονομούμενη ικανότητα ενός φυτού να επιβιώνει και να αναπαράγεται μετά την εφαρμογή συγκέντρωσης ζιζανιοκτόνου που είναι κανονικά θανατηφόρα για το άγριο είδος, δηλαδή το ζιζάνιο (Vencill et al., 2012). Για το λόγο αυτό στην εργασία αυτή αναφερθήκαμε σε ανθεκτικότητα και όχι σε ανεκτικότητα όσον αφορά τον χαρακτηρισμό των υβριδίων.

Οι Bozic et al. (2012), συγκρίνοντας ανθεκτικά και ευαίσθητα υβρίδια ηλίανθου στις μιδαζολινόνες, ψέκασαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον, στο 4 με 6^ο πραγματικό φύλλο, με 0-24-48-72-96-144 και 240g imazamox/ha, ενώ οι παρατηρήσεις λήφθηκαν 29 με 32 ημέρες μετά τις επεμβάσεις. Η ευαισθησία των ανθεκτικών υβριδίων ηλίανθου φάνηκε να αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του ζιζανιοκτόνου. Συγκεκριμένα μεταξύ της δόσης των 72 και 96 g imazamox/ha παρατηρήθηκε η διαφοροποίηση των υβριδίων, ενώ τα σοβαρότερα συμπτώματα εμφανίστηκαν κατά τη μεγαλύτερη εφαρμοζόμενη δόση. Το αποτέλεσμα αυτό συμπίπτει με τη

χρήση της συγκέντρωσης των 400μg/ml (80g a.i./ha) στο παρόν πείραμα. Η παρουσία συμπτωμάτων στα ευαίσθητα υβρίδια ήταν ορατή και ήταν όμοια με την αντίδραση του ευαίσθητου υβριδίου S1, ακόμα και μετά από την εφαρμογή ψεκασμών με μικρότερες συγκεντρώσεις της εφαρμοζόμενης. Επιπλέον, σε πειράματα που διεξάχθηκαν (Bozic et al., 2012), παράλληλα με τις δοκιμές σε ελεγχόμενες συνθήκες, στον αγρό για 2 συνεχόμενα έτη, η ευαισθησία των ανθεκτικών υβριδίων παρατηρήθηκε κατά την εφαρμογή της δόσης των 96g imazamox/ha. Επίσης, φάνηκε ότι η ευαισθησία ήταν ανάλογη της αύξησης της βροχόπτωσης που παρατηρήθηκε κατά τη δεύτερη χρονιά, γεγονός που δείχνει ότι ο παράγοντας περιβάλλον φαίνεται να επηρεάζει άμεσα την ανθεκτικότητα.

Σε ένα ακόμα πείραμα αγρού, το οποίο επαναλήφθηκε για τρεις συνεχόμενες χρονιές, στην F1 και την F2 γενιά του Clearfield ηλίανθου, στο στάδιο του στο 4^{ου} με 6^{ου} πραγματικού φύλλου, τα φυτά ψεκάστηκαν με τη συνιστώμενη δόση (50g/ha) imazamox. Στη συνέχεια, λήφθηκαν μετρήσεις μετά από 14 και 28 ημέρες από την επέμβαση, αξιολογώντας τα φυτά σε μία κλίμακα 0 (υγιές φυτό) - 100(νεκρό) (Jursik et al., 2014). Έπειτα από 14 ημέρες από την επέμβαση, η ευαισθησία των φυτών ηλίανθου ανήλθε στο 30%, με την F2 γενιά να παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με την F1. Στις 28 ημέρες από την επέμβαση, η ευαισθησία του ηλίανθου διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα (27%), αλλά δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ F1 και F2 γενιάς. Μία ενδιαφέρουσα επισήμανση ήταν ότι κατά την τρίτη χρονιά των δοκιμών η ευαισθησία του ηλίανθου αυξήθηκε, πιθανώς λόγω του υψηλότερου ποσοστού βροχόπτωσης που παρατηρήθηκε. Παράλληλα, τα ίδια Clearfield υβρίδια εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε άλλες δραστικές ουσίες αναστολείς του AHAS, όπως είναι το iodosulfuron, το florasulam, το floramsulfuron, το trifensulfuron, το rimsulfuron, το tribenuron και το nicosulfuron, με την μεγαλύτερη ευαισθησία να παρουσιάζεται κατά τον ψεκασμό με τις δραστικές ουσίες iodosulfuron (97-100%) και florasulam (88-100%), ενώ τη μικρότερη με το tribenuron (0-87%) και με το nicosulfuron (0-78%) (Jursik et al., 2014).

Κατά τη μελέτη των Baugmartner et al. (1999) ανθεκτικές και ευαίσθητες ποικιλίες στο imazethapyr, ψεκάστηκαν στο στάδιο του 4^{ου} φύλλου με διάφορες συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών imazamox, chlorimuron, thifensulfuron και cloransulam. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ανθεκτικοί ηλίανθοι παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο imazamox ακόμα και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 12x της συνιστώμενης δόσης (43,7g ai/ha), ενώ έδειξαν λιγότερη ανθεκτικότητα στα υπόλοιπα ζιζανιοκτόνα με την παρακάτω σειρά: cloransulam > chlorimuron > thifensulfuron.

Σύμφωνα με τους Pfenning et al. (2008), οι Clearfield ηλίανθοι μπορεί να εμφανίσουν, μείωση του ύψους του φυτού ή προσωρινό κιτρίνισμα της καλλιέργειας, μετά από εφαρμογή της δραστικής

ουσίας imazamox, με εντονότερη την εμφάνιση των συμπτωμάτων. κάτω από συνθήκες καταπόνησης, όπως ο καύσωνας, η ξηρασία ή κατάκλιση με νερό. Για να θεωρηθεί ένα υβρίδιο ως Clearfield, πρέπει να είναι προσαρμοσμένο στις τοπικές συνθήκες και να είναι ανθεκτικό σε επέμβαση έως και 2x τη συνιστώμενη δόση. Καθοριστικοί, επίσης, παράγοντες, κατά την φαινοτυπική αξιολόγηση, αποτελούν παράμετροι όπως το στάδιο στο οποίο γίνεται η επέμβαση, η δόση, η αποτελεσματικότητα στην απορρόφηση του ζιζανιοκτόνου, το ποσοστό μεταφοράς στο ενεργό κέντρο και ο τρόπος που μεταβολίζεται το εκάστοτε ζιζανιοκτόνο (Kolkman et al., 2004; Pfenning et al., 2008).

Ο βαθμός ανθεκτικότητας των υβριδίων πιθανώς να ήταν μεγαλύτερος εάν οι περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τη διεξαγωγή του πειράματος ήταν πιο ευνοϊκές (χαμηλότερη θερμοκρασία).

Κατά τη διεξαγωγή άλλων πειραμάτων που έχουν γίνει και αφορούν ανθεκτικούς και ευαίσθητους πληθυσμούς ηλίανθου, όπως αυτά των Baumgartner et al. (1999) και των Al-Khatib et al. (1998), οι ανθεκτικοί πληθυσμοί παρουσίασαν ανθεκτικότητα 14 ημέρες μετά από την εφαρμογή ακόμη και 32 φορές της συνιστώμενης, έπειτα από επεμβάσεις στο στάδιο 3-4^{ου} φύλλου, με την δραστική ουσία imazethapyr σε διάφορες συγκεντρώσεις (συνιστώμενη δόση 70g ai/ha).

Σε μία άλλη μελέτη των White et al. (2002) κριτήριο εφαρμογής του ζιζανιοκτόνου αποτέλεσε το ύψος του φυτού (15 cm), σε διάστημα 7, 14 και 21 ημερών μετά την επέμβαση, όπου παρατηρήθηκε αύξηση των συμπτωμάτων αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης των επεμβάσεων σε σχέση με την συνιστώμενη δόση. Παρόμοια αποτελέσματα υπήρξαν και με μελέτη άλλων χαρακτηριστικών του φυτού όπως η βιομάζα, το μήκος του βλαστού και της ρίζας (Vega et al., 2009; Sala et al., 2012e; White et al., 2002; Breccia et al., 2011), ενώ τελευταία γίνεται προσπάθεια μελέτης της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης και των καροτινοειδών μετά από επεμβάσεις με imazapyr με σκοπό την εκτίμηση του βαθμού των χλωρώσεων που προκαλείται (Oghogavía, 2014).

Συμπερασματικά, σύμφωνα με όλες τις παραπάνω μελέτες, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η ανθεκτικότητα στον ηλίανθο είναι δοσοεξαρτώμενη, ενώ παράλληλα σημαντικό ρόλο εμφανίζεται να έχει και ο γονότυπος, καθώς και οι καιρικές συνθήκες που επικρατούν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Αυτό φαίνεται και από τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης που έδειξαν ότι οι κύριοι παράγοντες επίδρασης είναι ο γονότυπος που είχαμε, καθώς και οι επεμβάσεις.

4.2. Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού της ανθεκτικότητας των υβριδίων

Η ανθεκτικότητα του ηλίανθου στα ζιζανιοκτόνα αναστολείς του ενζύμου AHAS έχει δείξει ότι οφείλεται σε μεταλλάξεις στην καταλυτική υπομονάδα του AHAS. Συγκεκριμένα, η Clearfield τεχνολογία, την οποία διαθέτουν τα υβρίδια R2 και R3 του πειράματος, βασίζεται στην αντικατάσταση της αλανίνης από την βαλίνη στη θέση 205 και συγκεκριμένα βρίσκεται στο *AHASII* γονίδιο (Sala et al., 2012a).

Ένας άλλος παράγοντας που πιθανώς να επηρεάζει την ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα είναι το φυτικό είδος και η ενζυμική δραστηριότητα του AHAS, η οποία μπορεί να παρουσιάζει μείωση, αύξηση ή και να παραμείνει αμετάβλητη (Powles and Yu, 2010), ενώ η υπερπαραγωγή του ενζύμου στόχου μπορεί να επιφέρει ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα (Yu and Powles, 2014).

Στη εργασία αυτή στόχος ήταν να διερευνήσουμε το μοριακό μηχανισμό της ανθεκτικότητας στα υβρίδια ηλίανθου μετά από τις επεμβάσεις σε επίπεδο μεταγραφήματος. Η πιθανή διαφορετική έκφραση των γονιδίων μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών φυτών μπορεί να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα, πέρα από την μετάλλαξη του *HaAHASII*, την οποία διαθέτουν τα Clearfield υβρίδια. Επίσης, μελετήθηκε εάν υπήρξε έκφραση των γονιδίων *HaAHASII2* και *HaAHASII3* και εάν συσχετιζόντουσαν με την ανθεκτικότητα των φυτών.

Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *HaAHASII* στο R3 υβρίδιο πιθανώς να σχετίζεται με την υπερπαραγωγή του ενζύμου AHAS ώστε να μπορέσει να αυξήσει την ανθεκτικότητα του στο imazamox. Η υπερέκφραση του στο ευαίσθητο υβρίδιο S1, υποδεικνύει την προσπάθεια του φυτού να επιβιώσει και να απομακρύνει τα μόρια του ζιζανιοκτόνου με την παραγωγή περισσότερου ενζύμου. Η ευαισθησία του S1 υβριδίου πιθανώς να οφείλεται στο ότι δεν φέρει την μετάλλαξη που κάνει τα Clearfield ανθεκτικά και ότι η υπερπαραγωγή του ενζύμου που πιθανότατα συμβαίνει δεν επαρκεί για να προσδώσει ανθεκτικότητα.

Αξιοσημείωτη, επίσης, ήταν η επαγωγή του γονιδίου *HaAHASII2* στο ανθεκτικό υβρίδιο R3 στις επεμβάσεις των 400 και 1200 µg/ml imazamox. περίπου 4 φορές σε σύγκριση με το R3 μάρτυρα, δηλαδή την επέμβαση με το νερό, ενώ το ευαίσθητο υβρίδιο δεν παρουσίασε καμία επαγωγή. Η σημαντική επαγωγή των γονιδίων *HaAHASII* και *HaAHASII2* στο R3 υβρίδιο, δείχνει την πιθανή συσχέτιση τους με τον μοριακό μηχανισμό της ανθεκτικότητας του στις ιμιδαζολιόνες και συγκεκριμένα στο imazamox. Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου *HaAHASII3* δεν παρουσίασε καμία σημαντική επαγωγή σε κανένα από τα υβρίδια. Στο παρελθόν είχαν γίνει μελέτες της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *HaAHASII*, *HaAHASII2*, *HaAHASII3* στα φύλλα και στις ρίζες καθαρών σειρών ηλίανθου μεταξύ ευαίσθητων, ημιανθεκτικών και ανθεκτικών ποικιλιών στο imazapyr, το οποίο ανήκει και αυτό στην ομάδα των ιμιδαζολινονών (Breccia et al., 2013). Το

γονίδιο *HaAHAS12* εμφάνισε επαγωγή στις ενδιάμεσες ανθεκτικότητας σειρές, ενώ τα γονίδια *HaAHAS11* και *HaAHAS13* εμφάνισαν μειωμένη επαγωγή. Το γονίδιο *HaAHAS13* έδειξε αυξημένη επαγωγή στις ρίζες ευαίσθητων ή με ενδιάμεσες ανθεκτικότητας φυτών. Η μη σημαντική επαγωγή και διαφοροποίηση του γονιδίου *HaAHAS13* στο παρόν πείραμα προτείνεται να οφείλεται στην έκφραση του σε άλλο ιστό, όπως η ρίζα.

Οι Ochogavia et al. (2014), μελέτησαν την έκφραση των παραπάνω γονιδίων σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του ηλίανθου και σε διάφορα παραγωγικά και αναπτυξιακά όργανα, όπως είναι οι ρίζες, τα υποκοτύλια, τα φύλλα, τα άνθη και ανώριμα έμβρυα. Το γονίδιο *HaAHAS13* είχε το μικρότερο μεταγράφημα σε όλα τα στάδια ενώ το *HaAHAS11* χαρακτηρίστηκε από μεγαλύτερη γονιδιακή έκφραση στις ρίζες, στα υποκοτύλια και στα φύλλα σε σχέση με τα άνθη και τα έμβρυα. Τα *HaAHAS12* και *HaAHAS13* εκφράστηκαν περισσότερο στα άνθη και στα έμβρυα, ενώ στα νεαρά φύλλα, η γονιδιακή έκφραση του *HaAHAS11* ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με το *HaAHAS12* και *HaAHAS13*.

Στα υβρίδια ηλίανθου του παρόντος πειράματος, το γονίδιο *HaAHAS11* εμφάνισε αυξημένη επαγωγή στον φυλλικό ιστό των υβριδίων του ευαίσθητου S1 και του ανθεκτικού Clearfield υβριδίου R3, ενώ αξιοσημείωτη ήταν η επαγωγή του γονιδίου *HaAHAS12* στον φυλλικό ιστό του ανθεκτικού υβριδίου R3.

Η έκφραση του γονιδίου *AHAS11* έχει μελετηθεί και σε άλλα είδη όπως σε ανθεκτικές και ευαίσθητες σειρές κριθαριού, στις οποίες παρατηρήθηκε 4 φορές επαγωγή στα ανθεκτικά φυτά σε σύγκριση με τις ευαίσθητες σειρές χωρίς εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου (Lee et al., 2011).

Οι Jain και Tar'an (2015) μελέτησαν επίσης την έκφραση του γονιδίου *AHAS11* σε ανθεκτικές και ευαίσθητες ποικιλίες ρεβυθιού, *Cicer arietinum* L., στις μιδαζολινόνες, όπου τα φυτά όταν ήταν στο στάδιο του δεύτερου με τέταρτου φύλλου ψεκάστηκαν με imazamox στη συγκέντρωση των 20,22g ai/ha. Ο φυλλικός ιστός συλλέχθηκε μετά από 0, 2, 4, 6, 12 και 24 ώρες από την επέμβαση. Η έκφραση του γονιδίου *AHAS11* παρουσίασε αύξηση κατά τις 2 ώρες αλλά μετέπειτα σε άλλα διαστήματα δειγματοληψιών η έκφραση παρέμεινε σταθερή. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στα φυτά που δέχθηκαν τον ψεκασμό δεν παρουσίασε σημαντικές αλλαγές σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες, τα οποία δεν είχαν δεχθεί επέμβαση. Σε αντίθεση με το συγκεκριμένο πείραμα, το υβρίδιο R3 παρουσίασε αυξημένη επαγωγή του *AHAS11* και στις δύο συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα, όπως και το ευαίσθητο υβρίδιο S1.

Οι Hu et al. (2015) μελέτησαν την γονιδιακή έκφραση των *AHAS11*, *AHAS12* και *AHAS13* σε ευαίσθητες και ανθεκτικές ποικιλίες ελαιοκράμβης, *Brassica napus* L. στις μιδαζολινόνες. Το γονίδιο *AHAS11* παρουσίασε περίπου τα ίδια επίπεδα έκφρασης και στις δύο ποικιλίες. Το γονίδιο

AHAS12 δεν είχε εκφραστεί σε καμία από τις δύο ποικιλίες, ενώ το *AHAS13* είχε εκφραστεί δύο φορές περισσότερο στην ανθεκτική ποικιλία σε σχέση με την ευαίσθητη. Αντίστοιχα στο πείραμα μας η έκφραση του *HaAHAS11* γονιδίου στο ανθεκτικό R3 και στο ευαίσθητο S1 υβρίδιο παρέμεινε περίπου ίδια, ενώ η έκφραση του γονιδίου *HaAHAS13* δεν ήταν σημαντική, σε αντίθεση η έκφραση του *HaAHAS12* γονιδίου η οποία ήταν σημαντική στο R3 υβρίδιο. Η έκφραση των γονιδίων δείχνει να επηρεάζεται από το φυτικό είδος αλλά και από τον ιστό που μελετάται.

Παράλληλα με τις παραπάνω αναφορές, οι Bruniard and Miller (2001) ανέφεραν ότι η ανθεκτικότητα στις ιμίδαζολινόνες ελέγχεται από δύο γονίδια, το ημικυρίαρχο *Imr1*, όπου θεωρείται βασικό και το *Imr2* ή συμπαράγοντας *E*, το οποίο αλληλεπιδρά με το *Imr1*. Για να επιτευχθεί πλήρης ανθεκτικότητα θα πρέπει τα δύο αυτά γονίδια να είναι ομοζύγωτα και κυρίαρχα, αν υπάρχει ημικυριαρχία τότε παρουσιάζεται ημιανθεκτικότητα και αν τα γονίδια αυτά βρίσκονται σε υπολειπόμενη μορφή τότε τα φυτά που προκύπτουν είναι ευαίσθητα.

Σύμφωνα με τους Kolkman et al. (2004), Vega et al. (2012) και Breccia et al. (2013) το *Imr1* ταυτίζεται με το γονίδιο *HaAHAS11*. Παράλληλα, οι Kolkman et al. (2004), έδειξαν με το πείραμα τους ότι τα *HaAHAS12* και *HaAHAS13* δεν αντιστοιχούν στο τροποποιητικό γονίδιο *Imr2*, σε αντίθεση με αυτούς, οι Vega et al. (2012), οι οποίοι πρότειναν ότι τα *HaAHAS12* και *HaAHAS13* είναι το *Imr2* και ότι ανάλογα με το αν έχουν κυριαρχία, ημικυριαρχία ή είναι υπολειπόμενα, συνδέονται με την ανθεκτικότητα, την ημιανθεκτικότητα ή την ευαισθησία αντίστοιχα. Δεν κατόρθωσαν όμως να το αποδείξουν και επομένως, το *Imr2* παραμένει άγνωστο (Vega et al., 2012; Sala et al., 2012a; Breccia et al., 2013).

Σύμφωνα με το παρόν πείραμα, η επαγωγή του *HaAHAS11* και στις δύο συγκεντρώσεις των 400 και 1200μg/ml imazamox που εφαρμόστηκαν, δείχνει την ταυτοποίηση του με το *Imr1*. Επίσης, η μεγάλη επαγωγή του *HaAHAS12* που παρατηρήθηκε στο R3 ανθεκτικό υβρίδιο δείχνει ότι πιθανότατα να πρόκειται για το *Imr2* και ότι συνδέεται με την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα που παρουσίασε το R3 κατά τις δύο επεμβάσεις.

Σε αντίθεση με την αυξημένη έκφραση των γονιδίων *HaAHAS11* και *HaAHAS12* που παρατηρήθηκε στο υβρίδιο R3, η έκφραση τους στο ανθεκτικό υβρίδιο R2 ήταν μειωμένη σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες και στις δύο δοσολογίες. Το γεγονός αυτό δείχνει την πιθανή μειωμένη αντίδραση του ενζύμου AHAS στην εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου στο υβρίδιο R2 (Powles and Yu, 2010; Breccia et al., 2013).

Σε αυτή την περίπτωση η ανθεκτικότητα του R2 μπορεί να προέρχεται από άλλους μηχανισμούς ανθεκτικότητας (non-target site mechanisms), όπως είναι η πρόσληψη, η μεταφορά, η ικανότητα να μεταβολίζουν το ζιζανιοκτόνο σε μη φυτοτοξικές ενώσεις (Yu and Powles, 2014; Sala et al., 2012a;

Vega et al., 2012; Breccia et al., 2013). Επιπροσθέτως, η ανθεκτικότητα του R2 υβριδίου πιθανότατα να οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των target-site μηχανισμών και των non-target-site μηχανισμών, όπως έχει προταθεί από τους Sala et al. (2012a) για τους Clearfield ηλίανθους.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός του πειράματος ήταν η φαινοτυπική αξιολόγηση τριών υβριδίων ηλίανθου, εκ των οποίων το ένα ήταν το ευαίσθητο (S1) και τα άλλα δύο ήταν τα Clearfield ανθεκτικά υβρίδια (R2/R3) στις μιδαζολινόνες, σύμφωνα με τα φυτοτοξικά συμπτώματα που παρουσίαζαν, μετά από επεμβάσεις με 400μg και με 1200 μg imazamox/ml ζιζανιοκτόνου. Παράλληλος στόχος, ήταν η διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων *HaAHAS11*, *HaAHAS12*, *HaAHAS13* στα παραπάνω υβρίδια ηλίανθου, 36ώρες μετά τις επεμβάσεις, για να διαπιστωθεί πιθανή συσχέτιση τους με την παρουσία ανθεκτικότητας.

Το ευαίσθητο υβρίδιο S1 αποδείχθηκε ευαίσθητο και στις δύο δοσολογίες. Τα ανθεκτικά υβρίδια, R2 και R3, παρουσίασαν ανθεκτικότητα στη συγκέντρωση των 400μg/ml, χωρίς να υπάρχουν σημαντικά στατιστικώς διαφορές μεταξύ τους. Η ανθεκτικότητα τους φάνηκε να εξαρτάται από την συγκέντρωση του διαλύματος της επέμβασης καθώς σημαντικό ρόλο παρουσιάστηκε να διαδραματίζουν και οι περιβαλλοντικές επιδράσεις κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

Όσον αφορά στη διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού της ανθεκτικότητας, παρατηρήθηκε σημαντική επαγωγή του γονιδίου *HaAHAS11* μετά τις επεμβάσεις των 400μg/ml και 1200 μg/ml imazamox τόσο στο ανθεκτικό υβρίδιο R3 όσο και στο ευαίσθητο S1. Επίσης, αξιοσημείωτη επαγωγή του γονιδίου *HaAHAS12* παρατηρήθηκε στο ανθεκτικό υβρίδιο R3 κατά τις δύο επεμβάσεις. Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου *HaAHAS13* δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε κανένα από τα υβρίδια. Τέλος, η έκφραση των γονιδίων *HaAHAS11* και *HaAHAS12* στο ανθεκτικό υβρίδιο R2, παρουσιάστηκε μειωμένη σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα γονίδια *HaAHAS11* και *HaAHAS12* πιθανώς σχετίζονται με τον μηχανισμό της ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα με συγκεκριμένο στόχο (target-site), όπως είναι οι μιδαζολινόνες (imazamox), που έχουν σαν στόχο το ένζυμο AHAS. Η σημαντικά επαγόμενη έκφραση του *HaAHAS12* στο ανθεκτικό υβρίδιο R3 μετά τις επεμβάσεις, υποδηλώνει ότι το *HaAHAS12* πιθανόν να αντιστοιχεί στο *Imr2* και να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στην δραστική ουσία imazamox. Από την άλλη μεριά, η μειωμένη έκφραση των γονιδίων *HaAHAS11* και *HaAHAS12* στο ανθεκτικό υβρίδιο R2, σε σχέση με τον μάρτυρα, υποδεικνύει την πιθανή ύπαρξη ενός άλλου μηχανισμού ανθεκτικότητας με μη στοχευμένη δράση (non-target-site) ή την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μηχανισμών στοχευμένης (target-site) με αυτών της μη στοχευμένης δράσης (non-target-site).

Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των *HaAHAS11*, *HaAHAS12*, *HaAHAS13* για πρώτη φορά σε υβρίδια ηλίανθου μετά από επεμβάσεις με την δραστική ουσία imazamox και αναμένεται να

συμβάλλει στη δημιουργία λειτουργικών μοριακών δεικτών. Ο συνδιασμός της μελέτης των φυτοτοξικών συμπτωμάτων με τη χρήση κατάλληλων μοριακών δεικτών θα μπορούσε να συνεισφέρει στην ταχεία διαλογή ανθεκτικού γενετικού υλικού, με σκοπό την χρήση του σε περιοχές που αντιμετωπίζουν σοβαρό πρόβλημα με ζιζάνια, όπως το ολοπαράσιτο οροβάγχι, υπεύθυνο για μεγάλες μειώσεις στην παραγωγή στη χώρα μας όπως και σε άλλες χώρες.

Επίσης, η μελέτη των υβριδίων σε διαφορετικές τοπικές συνθήκες και συγκεντρώσεις μιδαζολινονών, θα μπορούσε να προσδιορίσει την ανθεκτικότητα τους και την προσαρμογή τους ακόμα και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ζιζανιοκτόνου. Αυτό θα είχε σαν συνέπεια τη ελάττωση της μόλυνσης του περιβάλλοντος, καθώς θα βοηθούσε και τους παραγωγούς στην αποτελεσματικότερη διαχείριση των ζιζανίων και στην ανάπτυξη της καλλιέργειας τους.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δεικνύουν την ανάγκη πραγματοποίησης περαιτέρω ερευνών, οι οποίες θα αφορούν τόσο την αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων υβριδίων ηλίανθου και άλλων καλλιεργειών, όσο και την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα, καθώς και την κληρονομικότητά τους, έπειτα από την εφαρμογή της δραστικής ουσίας imazamox, σε διάφορες συγκεντρώσεις πέραν της συνιστώμενης και ενδεχομένως σε άλλα αναπτυξιακά στάδια των φυτών.

Επίσης, ένα μεγάλο ενδιαφέρον θα αποτελούσε η διερεύνηση των γονιδίων που εμπλέκονται όχι μόνο στη στοχευμένη δράση αλλά και στη μη στοχευμένη δράση των ζιζανιοκτόνων, όπως η περαιτέρω μελέτη του μοριακού μηχανισμού ανθεκτικότητας του Clearfield ανθεκτικού υβριδίου R2. Τέλος, η εργασία αυτή αναμένεται να συμβάλει στην ουσιαστικότερη κατανόηση της ανθεκτικότητας και του μοριακού μηχανισμού που τη διέπει.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1. Ξένη βιβλιόγραφία

- Alister, C. and Kogan, M. (2004). Efficacy of imidazolinone herbicides applied to imidazolinone resistant maize and their carryover effect on rotational crops. *Crop Protection* 24: 375-379
- Al-Khatib, Kassim, Baumgartner, Jolene R., Peterson, Dallas E., Currie, Randall S. (1998). Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Science* 46: 403-407
- Al-Khatib, K. and Miller, J.F. (2000). Registration of four genetic stocks of sunflower resistant to imidazolinone herbicides. *Crop science* 40: 869-870
- Andres, A., Fogliatto, S., Ferrero, A., Vidotto, F. (2014). Susceptibility to imazamox in Italian weedy rice populations and Clearfield[®] rice varieties. *Weed Research* 54: 492-500
- Baumgartner J. R., Al-Khatib K. and Currie R. S. (1999). Cross-Resistance of Imazethapyr-Resistant Common Sunflower (*Helianthus annuus*) to selected Imidazolinone, Sulfonylurea, and Triazolopyrimidine Herbicides. *Weed Technology* 13: 489-493
- Beckie, H.J., Heap, I.M., Smeda R.J., Hall, L.M. (2000). Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technology* 14: 428-445
- Blamey, F.P.C., Zollinger, R. and Schneiter, A.. Sunflower production and Culture. Schneiter (Ed.), In: *Sunflower Technology and Production, Agronomy Monograph 35*. ASA, CSSA, SSSA, Ed. Schneiter, 595-670, 1997
- Bozic, D., Saric, M., Malidza, G., Ritz, C., Vrbnicanin, S. (2012). Resistance of sunflower hybrids to imazamox and tribenuron-methyl. *Crop Protection* 39: 1-10
- Breccia, G., Vega, T., Nestares, G., Mayor, M.L., Zorzoli, R., Picardi, L. (2011). Rapid test for detection of imidazolinone resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding* 130: 109-113
- Breccia, G., Vega, T., Felitti, S., Picardi, L., Nestares, G. (2013). Differential expression of acetohydroxyacid synthase genes in sunflower plantlets and its response to imazapyr herbicide. *Plant Science*, 208: 28-33

- Bruniard, J.M. and Miller, J.F. (2001). Inheritance of imidazolinone-herbicide resistance in sunflower. *Helia*,24 (35): 11-16
- Bulos, M., Sala, C.A., Altieri, E., Ramos, M.L. (2013). Marker assisted selection for herbicide resistance in sunflower. *Helia* 36 (59): 1-16
- Burgos, N.R., Tranel, P.J., Streibig, J.C., Davis, V.M., Shaner, D., Norsworthy, J.K., Ritz, C. (2013). Confirmation of Resistance to Herbicides and Evaluation of Resistance Levels. *Weed Science* 61: 4-20
- Chipman, D., Barak, Z., Schloss, J.V. (1998). Biosynthesis of 2-aceto-2hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1385: 401-419
- Chipman, D.V., Duggleby, R.G., Tittmann, K. (2005). Mechanisms of acetohydroxyacid synthases. *Current opinion in Chemical Biology* 9: 475-481
- Darmency, H. (2013). Pleiotropic effects of herbicide-resistance genes on crop yield: A review. *Pest Management Science* 69: 897-904
- Delye, C., Duhoux, A., Pernin, F., Riggins, C.W., Tranel, P.J. (2015). Molecular mechanisms of herbicide resistance. *Weed Science* 63: 91-115
- De Prado R., Lopez-Martinez, N., Gimenez-Espinosa, R.. Herbicide-Resistant weeds in Europe: Agricultural, Physiological and Biochemical aspects. In: *Weed and Crop resistance to herbicides*, 16-27, 1997
- Duggleby, R.G. and Pang, S. S. (2000). Acetohydroxyacid Synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 33 (1): 1-36
- Duggleby, R.G., McCourt, J. A., Guddat, L.W. (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 309-324
- Forouzesh, A., Zand, E., Soufizadeh, S., Foroushani, S.S. (2015). Classification of herbicides according to chemical family for weed resistance management strategies – an update. *Weed Research* 55(4): 334-358
- Giannopolitis, C.N. and Vassiliou, G.. The *Echinochloa crus-galli* complex in rice-morphological variants and tolerance to propanil in Greece. *Importance and Perspectives on Herbicide Resistant Weeds*. Eds. R. Cavalloro and G. Noye, 23-28, 1989

- Ghio, C., Ramos, M.L., Altieri, E., Bulos, M., Sala, C.A. (2013). Molecular characterization of Als1, an acetohydroxyacid synthase mutation conferring resistance to sulfonylurea herbicides in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 126: 2957-2968
- Green, J.M. (2014). Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Management Science* 70: 1351-1357
- Gressel, J. and Segel, L.A. (1978). The paucity of plants evolving genetic resistance to herbicides: possible reasons and implications. *Journal of Theoretical Biology* 75: 349-371
- Grula, J.W., Hudspeth, R.L., Hobbs, S.L., Anderson, D.M. (1995). Organization, inheritance and expression of acetohydroxyacid synthase genes in the cotton allotetraploid *Gossypium hirsutum*. *Plant molecular biology* 28: 837-846
- Hawley, R.M. (2005). The acetohydroxyacid synthase gene family its role in herbicide resistant sunflowers. *M.Sc. Thesis, Oregon State University*
- Hu, M., Pu, H., Kong, L., Gao, J., Long, W., Chen, S., Zhang, J., Qi, C. (2015). Molecular characterization and detection of a spontaneous mutation conferring imidazolinone resistance in rapeseed and its application in hybrid rapeseed production. *Molecular Breeding* 35, 46 (1-13)
- Intanon, S., Perez-Jones, A., Hulting, A.G., Mallory-Smith, C.A. (2011). Multiple Pro197 ALS substitutions endow resistance to ALS inhibitors within and among may weed chamomile populations. *Weed Science* 59: 431-437
- Iwakami, S., Uchino, A., Watanabe, H., Yamasue, Y., Inamura, T. (2012). Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. *Pest management science* 68: 1098-1106
- Jain, P. and Tar'an, B. (2015). Analysis of acetohydroxyacid synthase1 gene in chickpea conferring resistance to imazamox herbicide. *Genome* 57: 593-600
- Jaykumar, R., Premsekar, M., Kempuchetty, N., Subramaniam, S. (1988). Effect of integrated weed management on yield and quality of sunflower. *Madras Agricultural Journal* 75:304
- Jimenez, F., Fernandez, P., Rojano-Delgado, A.M., Alcantara, R., De Prado, R. (2015). Resistance to imazamox in Clearfield soft wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Protection* 78: 15-19

- Jovic, S., Malidza, G., Cvejic, S., Hladni, N., Miklic, V., Skoric, D. (2011) Development of sunflower hybrids tolerant to tribenuron methyl. *Genetika*, 43(1), 175-182
- Jursik, M., Hamouzova, K., Soukup, J.A., Holec, J. (2014). Differences in sensitivity of F1 and F2 generations of herbicide tolerant sunflower volunteers to selected acetolactate synthase inhibiting herbicides. *Plant Soil and Environment* 60(10): 446-451
- Kaya, Y., Josic, S., Miladinovic, D.. Sunflower. *Technological Innovations in Major World Oil Crops*, 1, 85-129, 2012
- Keeler, S.J., Sanders, P., Smith, J.K., Mazur, B.J.(1993). Regulation of tobacco acetolactate synthase gene expression. *Plant physiology* 102: 1009-1018
- Kolkman, J.M., Slabaugh, M.B., Bruniard, J.M., Berry, S., Bushman, B.S., Olungu, C., Maes, N., Abratti, G., Zambelli, A., Miller, J.F., Leon, A., Knapp, S.J. (2004). Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1147-1159
- Krato, C., Hartung, K., Petersen, J. (2012). Response of imidazolinone-tolerant and – susceptible volunteer oilseed rape (*Brassica napus* L.) to ALS inhibitors and alternative herbicides. *Pest Management Science* 68:1385-1392
- Lee H., Rustgi S., Kumar N., Burke I., Yenish J., Gill K.S., Wettstein D.von & Ullrich St.E., (2011). Single nucleotide mutation in the barley acetohydroxyacid synthase (AHAS) gene confers resistance to imidazolinone herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21): 8909-8913
- León, A., Moratta, M. and Olungu, C. (2007). Herbicide-resistant sunflower plants with a novel mutation in the gene encoding the large subunit of acetohydroxyacid synthase, isolated polynucleotides, and methods of use. *Patent application WO 2007/054555 A1*.
- Mallory-Smith, C.A., Thill, D.C. and Dial, M.J., (1990). Identification of sulfonylurea resistance herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology* 4: 163-168
- Marshall, M.W., Al-Khatib, K., Loughin, T. (2001). Gene flow, growth, and competitiveness of imazethapyr-resistant common sunflower. *Weed Science* 49: 14-21
- Massinga, R.A., Al-Khatib, K., Amand, P.St., Miller, J.F., (2003). Gene flow from imidazolinone-resistant domesticated sunflower to wild relatives. *Weed science* 51: 854-862

- Massinga, R.A., Al-Khatib, K., Amand P.St., Miller, J.F. (2005). Relative fitness of imazamox-resistant common sunflower and prairie sunflower. *Weed Science* 53, 166-174
- Mazur, B. J., Chui, C. F., Smith, J. K. (1987). Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant physiology* 85: 1110-1117
- McCourt, J.A., Pang, S.S., King-Scott, J., Guddat, L.W., Duggleby, R.G. (2006). Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103 (3): 569-573
- Mestanza, C., Riegel, R., Silva, H., Vasquez, S.C. (2015). Characterization of the acetohydroxyacid synthase multigene family in the tetraploide plant *Chenopodium quinoa*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 393-398
- Mezili M., Roussou O., Terzopoulos P., Bebeli P. (2014). Screening maize and sunflower hybrids for resistance to imidazolinones (imazamox). Balkan Agriculture Congress, Edirne, Turkey.
- Newhouse, K.E., Smith, W.A., Starrett, M.A., Schaefer, T.J., Singh, B.K. (1992). Tolerance to imidazolinone herbicides in wheat. *Plant Physiology* 100: 882-886
- Ochogavía, A.C., Breccia, G., Vega, T., Felitti, S.A., Picardi, L.A., Nestares, G. (2014). Acetohydroxyacid synthase activity and transcripts profiling reveal tissue-specific regulation of *ahas* gene in sunflower. *Plant Science* 224: 144-150
- Pandolfo, C.E., Presotto, A., Moreno, F., Dossou, I., Migasso, J.P., Sakima, E., Cantamutto, M. (2015). Broad resistance to acetohydroxyacid-synthase-inhibiting herbicides in feral radish (*Raphanus sativus* L.) populations from Argentina. *Pest Management Science* DOI 10.1002/ps.4006
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9): 2003-2007
- Pfaffl, M.W. (2002). Relative expression software tool (Rest©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30(9): 1-10
- Pfenning, M., Palfay, G., Guillet, T. (2008). The Clearfield® technology-A new broad-spectrum post-emergence weed control system for European sunflower growers. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Special Issue 2008

- Powles, S.B. and Yu, Q. (2010). Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61, 317-47
- Ramezani, M. (2007). Environmental Fate of Imidazolinone Herbicides and Their Enantiomers in Soil and Water. School of Agriculture, food & Wine, University of Adelaide, South Australia.
- Renton, M., Busi, R., Neve, P., Thornby, D., Vila-Aiub, M. (2014). Herbicide resistance modeling: past, present and future. *Pest Management Science* 70: 1394-1404
- Rutledge, R.G., Quillet, T.R.S., Hattori, J., Miki, B.L. (1991). Molecular characterization and genetic origin of the *Brassica napus* acetohydroxyacid synthase multigene family. *Molecular and General Genetics* 229: 31-40
- Sala, C.A., Bulos, M., Echarte, M., Whitt, S.R., Ascenzi, R. (2008). Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 105-112
- Sala, C.A., Bulos, M., Altieri, E. and Ramos, M.L. (2012a). Genetics and Breeding of Herbicide tolerance in sunflower. *Helia* 35(57): 57-70
- Sala, C.A. and Bulos, M. (2012b). Inheritance and molecular characterization of broad range tolerance to herbicide targeting acetohydroxyacid synthase in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 355-364
- Sala, C.A., Bulos, M., Altieri, E., Ramos, M. L. (2012c). Root biomass response to foliar application of imazapyr for two imidazolinone tolerant alleles of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Breeding Science*, 62, 235-240
- Sala, C.A., Bulos, M., Altieri, E., Weston, B. (2012d). Response to imazapyr and dominance relationships of two imidazolinone-tolerant alleles at the *Ahas11* locus of sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 385-396
- Sala, C.A., Bulos, M., Altieri, E., Ramos, M.L.. *Imisun tolerance is the result of the interaction between target and non-target tolerance mechanisms*. In Proc 18th Int. Sunflower Conf., Mar del Plata-Balcare, Argentina, 551-556, 2012e

- Shaner, D.L. and Singh, B.K. (1991). Imidazolinone-Induced Loss of Acetohydroxyacid Synthase Activity in Maize Is Not Due to the Enzyme Degradation. *Plant Physiology* 97: 1339-1341
- Shaner, D.L.. Herbicide resistance in North America: History, circumstances of development and current situation. In: *Weed and Crop resistance to herbicides*, 28-38, 1997
- Shaner, D. L. and Beckie, H. J. (2014).The future for weed control and technology. *Pest Management Science* 70, 1329-1339
- Simic, M., Dragicevic, V., Knezevic, S., Radosavijevic, M., Dolijanovic, Z., Filipovic, M. (2011). Effects of applied herbicides on crop productivity and on weed infestation in different growth stages of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* 34 (54): 27-38
- Sudianto, E., Beng-Kah, S., Ting-Xiang, N., Saldain, N. E., Scott, R.C., Burgos, N.R. (2013). Clearfield_ rice: Its development, success, and key challenges on a global perspective. *Crop Protection* 49, 40-51
- Tan, S. and Bowe, S.J. (2012). Herbicide tolerant crops developed from mutations. In Shu, Q.Y., Forster, B.P. and Nakagawa, H. (Eds) *Plant Mutation breeding and Biotechnology*. Chapter 31. pp423-437
- Tan, S., Evans, R., Singh, B. (2006). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* 30: 195-204
- Tan, S., Evans, R.E., Dahmer, M.L., Singh, B.K. and Shaner D.L., (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* 61: 246-257
- Tani, E., Chachalis, D., Travlos, I.S. (2015). A Glyphosate resistance mechanism in *Conyza Canadensis* involves synchronization of EPSPS and ABC-transporter genes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33, 1721-1730
- Thompson, C. and Taran, B. (2014). Genetic characterization of the acetohydroxyacid synthase (AHAS) gene responsible for resistance to imidazolinone in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 127: 1583-1591
- Tranel, P.J. and Wright, T.R. (2002). Resistance of weeds to AHAS inhibiting herbicides: What have we learned? *Weed Science* 50: 700-712

- Uchino, A., Ogata, S., Kohara, H., Yoshida, S., Yoshioka, T. and Watanabe, H. (2007). Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides*. *Weed Biology and Management* 7: 89-96.
- Uchino, A. and Watanabe, H. (2002). Mutations in the acetolactate synthase genes of sulfonylurea resistant biotypes of *Lindernia spp.*. *Weed Biology and Management* 2: 104-109
- Vega, T., Breccia, G., Nestares, G., Mayor, M.L., Zorzoli, R., Picardi, L. (2009). Soil-less bioassays for early screening for resistance to imazapyr in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pest Management Science* 65: 991-995
- Vega, T., Breccia, G., Gil, M., Zorzoli, R., Picardi, L., Nestares, G. (2012). Acetohydroxyacid synthase (AHAS) in vivo assay for screening imidazolinone-resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 61: 103-107
- Warwick, S. I., Sauder, C. A. and Beckie, H. J. (2010). Acetolactate synthase (ALS) target-site mutations in ALS inhibitor-resistant Russian thistle (*Salsola tragus*). *Weed Science* 58: 244-251.
- White, D., Owen, M. D. K., Cardina, (2002). Common sunflower resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Science* 50: 432-437
- Yuan, J.S., Tranel, P.J. and Steward, J.r. N. (2006). Non-target site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* 12 (1), 6-13
- Yu Q. and Powles S.B. (2014). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Management Science* 70: 1340-1350.
- Zhou, Q., Liu, W., Zhang, Y., Liu K., (2007). Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89: 89-96

6.2. Ελληνική βιβλιογραφία

- Γαλανοπούλου-Σενδούκα, Στέλλα. Ηλίανθος. *Βιομηχανικά Φυτά*, Εκδ. Σταμούλης, σελ. 199-211, 2002

- Ελευθεροχωρινός Η.Γ.. Τρόπος δράσης και μεταβολισμού των ζιζανιοκτόνων. *Ζιζανιολογία*, 3^η Έκδοση, Εκδόσεις Αγρότυπος, σελ. 241-283, 2009
- Ζιώγας Β.Ν. και Μάρκογλου Α.Ν.. Ζιζανιοκτόνα. *Γεωργική Φαρμακολογία: Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων*, Β' έκδοση, σελ. 585-603, 2010
- Πασπάτης Ε. Α..Ζιζανιολογία – Ζιζάνια, ζιζανιοκτόνα, φυτορρυθμιστικές ουσίες. *Σημειώσεις του μαθήματος Ζιζανιολογίας για τους φοιτητές του Α.Τ.Ε.Ι.*, σελ 23-28

6.3. Ηλεκτρονικές Διευθύνσεις

- www.weedscience.org

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Διαδικασία εξαγωγής RNA για κάθε δείγμα

- Στο μικροσωληνίσκο 1,5ml με τα 100mg ιστού προστέθηκε 350μl του RA1 ρυθμιστικού διαλύματος και 3,5μl β-μερκαπτοαιθανόλης, ώστε να επιτευχθεί το κυτταρόλυμα και να σταματήσει η λειτουργία των Rnases (ριβονοκλεασών). Ανακατεύθηκε καλά με την πιπέτα ώστε να πάει το διάλυμα παντού.
- Το κυτταρόλυμα μεταφέρθηκε για διήθηση στο ειδικό φίλτρο (ροζ), με σκοπό να μειωθεί το ιξώδες του και να καθαρίσει το λύμα. Ακολούθησε ανάμιξη και φυγοκέντρηση 11.000G για ένα λεπτό.
- Στη συνέχεια το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καινούριο μικροσωληνίσκο 1,5ml και έγινε ανάμιξη με 350μl αιθανόλη 70%, με σκοπό να αρχίσουν να δημιουργούνται οι συνθήκες δέσμησης του RNA.
- Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο φίλτρο (γαλάζιο), ώστε να γίνει δέσμηση του DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11000G για 30δευτερόλεπτα.
- Ακολούθησε «αφαλάτωση» της μεμβράνης του πυριτίου, προσθέτοντας 350μl MDB(Membrane Desalting Buffer) και φυγοκέντρηση 11000G για 1 λεπτό, ώστε να λειτουργήσει το επόμενο βήμα των Dnases για την απομάκρυνση του γενωμικού DNA .
- Η πέψη του DNA έγινε με την προσθήκη 95μl rDNase ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, το οποίο αποτελείται από 10μl rDNase επαναδιαλυμένο με RNase free νερό και 90μl ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης για rDNase. Αφήνεται για 15λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το προτελευταίο στάδιο ήταν το πλύσιμο και το στέγνωμα της μεμβράνης, το οποίο αποτελούνταν από τρεις φάσεις και γίνεται αφαίρεση αλάτων, μεταβολιτών και άλλων στοιχείων που ενδέχεται να επηρεάσουν μετέπειτα αντιδράσεις . Η πρώτη ήταν η προσθήκη 200μl RAW2 ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο αδρανοποιεί την rDNase, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11,000G για 30 δευτερόλεπτα και τοποθέτηση σε καινούριο μικροσωληνίσκο 1,5ml. Η δεύτερη φάση ήταν η προσθήκη 600μl RA3 ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκέντρηση 11,000G για 30 δευτερόλεπτα. Αφαίρεση του υποκειμένου και επανατοποθέτηση του στο φίλτρο. Η τρίτη φάση ήταν η προσθήκη στο φίλτρο 250μl του ρυθμιστικού διαλύματος RA3, φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 11,000G μέχρι να στεγνώσει η μεμβράνη. Ακολουθεί τοποθέτηση σε καινούριο μικροσωληνίσκο.
- Το τελευταίο στάδιο ήταν η έκλυση του RNA, το οποίο επιτεύχθηκε με την προσθήκη 60μl RNase-free νερό και φυγοκέντρηση στα 11,000G για 1 λεπτό.

Επανάληψη της έκλουσης σε άλλο μικροσωληνίσκο επιτυγχάνεται με 30μl RNase-free νερό και φυγοκέντρηση στα 11,000G για 1 λεπτό.

Στη συνέχεια έγινε αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C μέχρι την επαναχρησιμοποίησή τους στο επόμενο στάδιο.

2. Διαδικασία χρήσης του σπεκτροφωτόμετρου Nanodrop 1000 και του λογισμικού N.D. -1000 v 3.3.1. για κάθε δείγμα

Από το παράθυρο εργασιών του πίνακα του λογισμικού N.D. -1000 v 3.3.1., έγινε επιλογή στη ρύθμιση νουκλεοτίδια, RNA. Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε βάζοντας 1,5μl Rnase free νερό και πατώντας BLANK. Στη συνέχεια, ακολούθησε η μέτρηση του κάθε δείγματος τοποθετώντας στο «βάθρο» του σπεκτροφωτόμετρου 1,5μl δείγματος RNA. Κάθε φορά γινόταν αλλαγή του ονόματος σύμφωνα με το δείγμα και καθαρισμός του «βάθρου» ώστε να μην υπάρξει κάποια πρόσμιξη και αλλοίωση των αποτελεσμάτων. Η μέτρηση επαναλαμβάνονταν δύο φορές για την αξιοπιστία της μέτρησης.

3. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των γονιδίων *HaAHASII*, *HaAHASI2*, *HaAHASI3* και ταυτοποίηση νουκλεοτιδίων με την βοήθεια του προγράμματος ClustalW2.

```
gi |46948855|gb|AY541456.1| ATGGCCGCCATACATCCTCCCCACCCTTCCATCACCGCCAAACCACCGCC 50
gi |46948857|gb|AY541457.1| ATGGCCGCCATACATCCTCCCCACCCTTCCATCACCGCCAAACCACCGCC 50
gi |46948845|gb|AY541451.1| ATGGCGGC-----TCCTCCCAACCCTTCCATCTCCTTCAAACCACCGTC 44
gi |46948849|gb|AY541453.1| ATGGCGGC-----TCCTCCCAACCCTTCCATCTCCTTCAAACCACCGTC 44
gi |46948851|gb|AY541454.1| ATGGCGGC-----TCCTCCCAACCCTTCCATCTCCTTCAAACCACCGTC 44
gi |46948853|gb|AY541455.1| ATGGCGGC-----TCCTCCCAACCCTTCCATCTCCTTCAAACCACCGTC 44
gi |46948847|gb|AY541452.1| ATGGCGGC-----TCCTCCCAACCCTTCCATCTCCTTCAAACCACCGTC 44
gi |46948859|gb|AY541458.1| ATGGCAG-----TCCCCTCAC--TTTCATCTCCGGCAAACCACCATT 41
***** *          *** **  ** ** ***** ** *****

gi |46948855|gb|AY541456.1| ATCTTCGGCCG--CGCCGTCGCAC-----TACCACCCCACTTCGCAT 91
gi |46948857|gb|AY541457.1| ATCTTCGGCCG--CGCCGTCGCAC-----TACCACCCCACTTCGCAT 91
gi |46948845|gb|AY541451.1| ACCCGCCGCCGCACTGCCACCACGCTCCGCCTTCTCCCCCGTTTCGCAT 94
gi |46948849|gb|AY541453.1| ACCCGCCGCCGCACTGCCACCACGCTCCGCCTTCTCCCCCGTTTCGCAT 94
gi |46948851|gb|AY541454.1| ACCCGCCGCCGCACTGCCACCACGCTCCGCCTTCTGCCCGTTTCGCAT 94
gi |46948853|gb|AY541455.1| ACCCGCCGCCGCACTGCCACCACGCTCCGCCTTCTGCCCGTTTCGCAT 94
gi |46948847|gb|AY541452.1| ACCCGCCGCCGCACTGCCACCACGCTCCGCCTTCTCCCCCGTTTCGCAT 94
gi |46948859|gb|AY541458.1| CTCCGCCAC-----ACCATCACAGT-----TAACTACCAATCTTTCAC 79
* ** *          ** * *          * ** * **

gi |46948855|gb|AY541456.1| TCTCCATCACCTCCACTTCCCACAAAACGCCACCGCCTCCACATCTCCAAC 141
gi |46948857|gb|AY541457.1| TCTCCATCACCTCCACTTCCCACAAAACGCCACCGCCTCCACATCTCCAAC 141
gi |46948845|gb|AY541451.1| TACCCATCACTTCCACTACCCAAAACGACACCGTCTTCACATCTCCAAT 144
```


gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | TACCCATCACTTCCACTACCCAAAAACGACACCGTCTTCACATCTCCAAT 144
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | TACCCATCACTTCCACTACCCAAAAACGACACCGTCTTCACATCTCCAAT 144
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | TACCCATCACTTCCACTACCCAAAAACGACACCGTCTTCACATCTCCAAT 144
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | TACCCATCACTTCCACTACCCAAAAACGACACCGTCTTCACATCTCCAAT 144
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | TCCCACTCAC-TCTTCTACCCAT-----CATC-CCTTCAAAGACTCA-T 120
* * **** * * **** * * * * * * *

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | GTCCTCTCCGACTCCA---CCACCACCACCGGTGCC----- 174
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | GTCCTCTCCGACTCCA---CCACCACCACCGGTGCC----- 174
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | GTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCACCACCACCACCACCAC----- 188
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | GTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCACCACCACCACCACCACCACCAC 194
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | GTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCACCACCACCAC----- 179
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | GTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCACCACCACCAC----- 179
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | GTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCACCACCACCACCAC----- 185
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | GTTTCTAAACACCTCATAATAACCAATGCTATTGCTA----- 157
** * * * * * * *

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | -----ACCACC-----ATTCACCCACCGCCATTC--GTCTCCCGGTAC 210
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | -----ACCACCGCCACCATTCACCCACCGCCATTC--GTCTCCCGGTAC 216
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | ---TCAACGACCGT-----TACCGGTGCAGCCTTTT--GTCTCCCGTTAC 228
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | CACTCAACCACCGT-----TACAGGCGCAGCCTTTT--GTCTCCCGTTAC 237
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | ---TCAACCACCGT-----TACAGGCGCAGCCTTTT--GTCTCCCGTTAC 219
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | ---TCAACCACCGT-----TACAGGCGCAGCCTTTT--GTCTCCCGTTAC 219
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | ---TCAACCACCGT-----TACAGGCGCAGCCTTTT--GTCTCCCGGTAC 225
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | -----AACATTAC----ATTCACATAAAGCTTTTGTGGTCTCGAGGTTC 198
* * * * * * * * * * * * * * *

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | GCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGCAGACGTGCTCGTGGAAGCTCTAGA 260
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | GCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGCAGACGTGCTCGTGGAAGCTCTAGA 266
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | GCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGCAGACGTGTTGGTGGAAGCTCTGGA 278
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | GCGCCTGATCAACCGAGAAAAGGCGCAGACGTGTTGGTGGAAGCTCTGGA 287
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | GCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGCAGACGTGTTGGTGGAAGCTCTGGA 269
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | GCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGCAGACGTGTTGGTGGAAGCTCTAGA 269
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | GCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGCAGACGTGTTGGTGGAAGCTCTGGA 275
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | GGTCTGACGAACCAAGGAAAGGATCTGATGTCCTAGTGGAAGCACTAGA 248
* * * * * * * * * * * * * * *

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | ACGGGAAGGTGTACCCGACGTCTTCGCCTACCCCGGCGGCGCGTCAATGG 310
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | ACGGGAAGGTGTACCCGACGTCTTCGCCTACCCCGGCGGCGCGTCAATGG 316
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | ACGGGAAGGTGTACCCGACGTCTTCGCCTACCCCGGCGGCGCGTCAATGG 328
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | ACGGGAAGGTGTACCCGACGTCTTCGCCTACCCCGGCGGCGCGTCAATGG 337
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | ACGGGAAGGTGTACCCGACGTCTTCGCCTACCCCGGCGGCGCGTCAATGG 319
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | ACGGGAAGGTGTACCCGACGTCTTCGCCTACCCCGGCGGCGCGTCAATGG 319
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | ACGGGAAGGTGTACCCGACGTCTTCGCCTACCCCGGCGGCGCGTCAATGG 325
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | GCGCGAAGGGTAAACGAACGTCTTTGCGTATCCAGGTGGCGCCACCTTGG 298
* * * * * * * * * * * * * * *

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | AGATCCACCAAGCTCTCACGCGCTCAAACACCATCCGCAATGTCTCCCC 360
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | AGATCCACCAAGCTCTCACGCGCTCAAACACCATCCGCAATGTCTCCCC 366
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | AGATCCACCAAGCTCTCACGCGCTCAAGCACTATCCGCAATGTCTCCCC 378
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | AGATCCACCAAGCTCTCACGCGCTCAAGCACTATCCGCAATGTCTCCCC 387
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | AGATCCACCAAGCTCTCACGCGCTCAAACACTATCCGCAATGTCTCCCC 369
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | AGATCCACCAAGCTCTCACGCGCTCAAACACCATCCGCAATGTCTCCCC 369
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | AGATCCACCAAGCTCTCACGCGCTCAAACACTATCCGCAATGTCTCCCC 375
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | AGATCCACCAAGCGTAACACGATCAACCATCATACGCAACATCTCTCCCT 348
***** * * * * * * * * * * * * * * *

```

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | CGTCACGAACAGGGCGGCGTGTTCGCCGCCGAAGGCTACGCACGTGCCTC 410
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | CGTCACGAACAGGGCGGCGTGTTCGCCGCCGAAGGCTACGCACGTGCCTC 416
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | CGTCACGAACAGGGCGGCGTGTTCGCCGCCGAAGGCTACGCACGTGCCTC 428
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | CGTCACGAACAGGGCGGCGTGTTCGCCGCCGAAGGCTACGCACGTGCCTC 437
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | CGTCACGAACAGGGCGGCGTGTTCGCCGCCGAAGGCTACGCACGTGCCTC 419
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | CGTCACGAACAGGGCGGCGTGTTCGCCGCCGAAGGCTACGCACGTGCCTC 419
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | CGTCACGAACAGGGCGGCGTGTTCGCCGCCGAAGGCTACGCACGTGCCTC 425
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | CGCCATGAGCAAGGCGGTGTGTTTGTGCAGAGGGTTACGCACGTGCCTC 398
** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | CGGTGTTCCCGCGTCTGTATCGCCACTTCCGGTCCCGGAGCTACAAACC 460
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | CGGTGTTCCCGCGTCTGTATCGCCACTTCCGGTCCCGGAGCTACAAACC 466
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | CGGTCTTCCCGCGTGTGTATCGCCACTTCCGGTCCCGGAGCTACGAACC 478
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | CGGTCTTCCCGCGTGTGTATCGCCACTTCCGGTCCCGGAGCTACGAACC 487
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | CGGTCTTCCCGCGTGTGTATCGCCACTTCCGGTCCCGGAGCTACGAACC 469
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | CGGTCTTCCCGCGTGTGTATCGCCACTTCCGGTCCCGGAGCTACGAACC 469
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | CGGTCTTCCCGCGTGTGTATCGCCACTTCCGGTCCCGGAGCTACGAACC 475
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | TGGTTAACCAGCGTATGCATATCTACTTCCGGTCCAGGCGCTACAAACT 448
*** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | TAGTTAGTGGTCTTGTGACGCGCTGTTAGACAGTGTCCCATGGTGGCA 510
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | TAGTTAGTGGTCTTGTGACGCGCTGTTAGACAGTGTCCCATGGTGGCA 516
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | TAGTTAGTGGTCTTGTGACGCGCTGTTAGACAGTGTCCCATGGTGGCA 528
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | TAGTTAGTGGTCTTGTGACGCGCTGTTAGACAGTGTCCCATGGTGGCA 537
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | TAGTTAGTGGTCTTGTGACGCGCTGTTAGACAGTGTCCCATGGTGGCA 519
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | TAGTTAGTGGTCTTGTGACGCGTGTAGACAGTGTCCCATGGTGGCA 519
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | TAGTTAGTGGTCTTGTGACGCGCTGTTAGACAGTGTCCCATGGTGGCA 525
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | TGGTCAGTGGCCTTGCCGACGCCCTTCTTGATAGCGTCCCAATCGTCGCC 498
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | ATCACCGGTCAAGTTCCCGGAGAATGATCGGAACCGATGCGTTTCAAGA 560
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | ATCACCGGTCAAGTTCCCGGAGAATGATCGGAACCGATGCGTTTCAAGA 566
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | ATCACCGGTCAAGTTCCCGGAGAATGATCGGAACCGATGCGTTTCAAGA 578
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | ATCACCGGTCAAGTTCCCGGAGAATGATCGGAACCGATGCGTTTCAAGA 587
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | ATCACCGGTCAAGTTCCCGGAGAATGATCGGAACCGATGCGTTTCAAGA 569
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | ATCACCGGTCAAGTTCCCGGAGAATGATCGGAACCGATGCGTTTCAAGA 569
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | ATCACCGGTCAAGTTCCCGGAGAATGATCGGAACCGATGCGTTTCAAGA 575
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | ATTACTGGACAAGTCCCTCGTAACATGATTGGTACTGATGCTTCCAAGA 548
** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | AACCCCAATTGTTGAGGTAACACGTTTCGATTACTAAACATAATTATCTTG 610
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | AACCCCAATTGTTGAGGTAACACGTTTCGATTACTAAACATAATTATCTTG 616
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | AACCCCAATTGTTGAGGTAACACGTTTCGATTACTAAACATAATTATCTTG 628
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | AACCCCAATTGTTGAGGTAACACGTTTCGATTACTAAACATAATTATCTTG 637
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | AACCCCAATTGTTGAGGTAACACGTTTCGATTACTAAACATAATTATCTTG 619
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | AACCCCAATTGTTGAGGTAACACGTTTCGATTACTAAACATAATTATCTTG 619
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | AACCCCAATTGTTGAGGTAACACGTTTCGATTACTAAACATAATTATCTTG 625
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | AACCCCAATTGTTGAGGTTTCACGCTCATTACTAAACATAACTACCTAG 598
*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | TGTTGGATGTTGAGGATATCCCAGAATTGTTAGGGAGGCTTTTTATCTT 660
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | TGTTGGATGTTGAGGATATCCCAGAATTGTTAGGGAGGCTTTTTATCTT 666
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | TGTTGGATGTTGAGGATATCCCAGAATTGTTAGGGAGGCTTTTTATCTT 678
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | TGTTGGATGTTGAGGATATCCCAGAATTGTTAGGGAGGCTTTTTATCTT 687
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | TGTTGGATGTTGAGGATATCCCAGAATTGTTAGGGAGGCTTTTTATCTT 669
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | TGTTGGATGTTGAGGATATCCCAGAATTGTTAGGGAGGCTTTTTATCTT 669
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | TGTTGGATGTTGAGGATATCCCAGAATTGTTAGGGAGGCTTTTTATCTT 675
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | TTTTGAATGTACAAGATATCCACGTATAGTTCATGAAGCTTTCTTTCTT 648
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

```

```

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | GCGAGTTCGGGTCGACCCGGCCAGTTTTGATAGATGTACCTAAGGATAT 710
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | GCGAGTTCGGGTCGACCCGGCCAGTTTTGATAGATGTACCTAAGGATAT 716
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | GCGAGTTCGGGTCGACCCGGCCCGTTTTGATAGATGTACCGAAAAGATAT 728
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | GCGAGTTCGGGTCGACCCGGCCCGTTTTGATAGATGTACCGAAAAGATAT 737
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | GCGAGTTCGGGTCGACCCGGCCCGTTTTGATAGATGTACCGAAAAGATAT 719
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | GCGAGTTCGGGTCGACCCGGCCCGTTTTGATAGATGTACCGAAAAGATAT 719
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | GCGAGTTCGGGTCGACCCGGCCCGTTTTGATAGATGTACCGAAAAGATAT 725
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | GCCTCGTCTGGTCGGCCGGCCCGTTTTAATCGACATCCCAAAGACAT 698
**      ** ***** ***** ***** ** ** * ** ** ** **
ACAGCAACAGTTAGTGGTGCCGAAATGGGATGAAC-----CGATGA 751
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | ACAGCAACAGTTAGTGGTGCCGAAATGGGATGAAC-----CGATGA 757
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | ACAGCAACAGTTAGTGGTGCCGAAATGGGATGAAC-----CGATGA 769
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | ACAGCAACAGTTAGTGGTGCCGAAATGGGATGAAC-----CGATGA 778
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | ACAGCAACAGTTAGTGGTGCCGAAATGGGATGAAC-----CGATGA 760
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | ACAGCAACAGTTAGTGGTGCCAAAATGGGATGAAC-----CGATGA 760
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | ACAGCAACAGTTAGTGGTGCCGAAATGGGATGAAC-----CGATGA 766
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | ACAACAACAGTTGGTTGTTCCCAATTGGGATGAACAACAACAACCTATGA 748
*** ***** ** ** ** ** ***** ** * ****
gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | GGTTACCGGGTATTTGTCTAGAATGCCGAAGCCTCAATATGATGGGCAT 801
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | GGTTACCGGGTATTTGTCTAGAATGCCGAAGCCTCAATATGATGGGCAT 807
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | GGTTACCGGGTATTTGTCTAGAATGCCGAAGCCTCAATATGATGGGCAT 819
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | GGTTACCGGGTATTTGTCTAGAATGCCGAAGCCTCAATATGATGGGCAT 828
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | GGTTACCGGGTATTTGTCTAGAATGCCGAAGCCTCAATATGATGGGCAT 810
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | GGTTACCGGGTATTTGTCTAGAATGCCGAAGCCTCAATATGATGGGCAT 810
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | GGTTACCGGGTATTTGTCTAGAATGCCGAAGCCTCAATATGATGGGCAT 816
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | GGTTAGATGGTTACATCTCCAGGTTACCAAAGCCTCCAAACGAGACGCAT 798
***** ***** * ** * * ** ***** * ** ** ***
gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | TTGGAACAGATTGTTAGGTTGGTGGGGGAAGCAAAGAGGCCCGTTTTGTA 851
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | TTGGAACAGATTGTTAGGTTGGTGGGGGAAGCAAAGAGGCCCGTTTTGTA 857
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | TTGGAACAGATTGTTAGGTTGGTGGGGGAAGCAAAGAGGCCCGTTTTGTA 869
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | TTGGAACAGATTGTTAGGTTGGTGGGGGAAGCAAAGAGGCCCGTTTTGTA 878
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | TTGGAACAGATTGTTAGGTTGGTGGGGGAAGCAAAGAGGCCCGTTTTGTA 860
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | TTGGAACAGATTGTTAGGTTGGTGGGGGAAGCAAAGAGGCCCGTTTTGTA 860
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | TTGGAACAGATTGTTAGGTTGGTGGGGGAAGCAAAGAGGCCCGTTTTGTA 866
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | TTACGACAAATTGTACGCTTCATAAAGGAATCGAAGAGGCCCGTTTTGTA 848
**      *** ***** * ** * ***** * ** ***** *****
gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | TGTGGGTGGTGGGTGTTTGAATTCGGATGACGAGTTGAGGCGGTTTGTGG 901
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | TGTGGGTGGTGGGTGTTTGAATTCGGATGACGAGTTGAGGCGGTTTGTGG 907
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | TGTGGGTGGTGGGTGTTTGAATTCGGATGATGAGTTGAGGCGGTTTGTGG 919
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | TGTGGGTGGTGGGTGTTTGAATTCGGATGATGAGTTGAGGCGGTTTGTGG 928
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | TGTGGGTGGTGGGTGTTTGAATTCGGATGATGAGTTGAGGCGGTTTGTGG 910
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | TGTGGGTGGTGGGTGTTTGAATTCGGATGATGAGTTGAGGCGGTTTGTGG 910
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | TGTGGGTGGTGGGTGTTTGAATTCGGATGATGAGTTGAGGCGGTTTGTGG 916
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | TGTGGGTGGGGTGTATGAACTCGAGTGAAGTGAAGTGGTTCGTTTTGTAG 898
***** ** *** ***** ** * ** ** * ** ***** *
gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | AGCTTACGGGATTCCGGTTGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGAGCGTAC 951
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | AGCTTACGGGATTCCGGTTGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGAGCGTAC 957
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | AGCTTACGGGATTCCGGTTGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGAGCGTAC 969
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | AGCTTACGGGATTCCGGTTGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGAGCGTAC 978
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | AGCTTACGGGATTCCGGTTGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGAGCGTAC 960
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | AGCTTACGGGATTCCGGTTGCAAGTACTTTGATGGGGCTTGGAGCGTAC 960

```

```

gi |46948847|gb|AY541452.1| AGCTTACGGGGATTCCGGTTGCGAGTACTTTGATGGGGCTCGGAGCGTAC 966
gi |46948859|gb|AY541458.1| AGCTTACGGGGATTCCAGTGCGGAATACTTTGATGGGACTTGGAAACATAC 948
***** ***** ** ** * ***** ***** ** ** * **

gi |46948855|gb|AY541456.1| CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCATATGCTTGGGATGCATGGCACGGT 1001
gi |46948857|gb|AY541457.1| CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCATATGCTTGGGATGCATGGCACGGT 1007
gi |46948845|gb|AY541451.1| CCTGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCATATGCTTGGGATGCATGGTACGGT 1019
gi |46948849|gb|AY541453.1| CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCATATGCTTGGGATGCATGGTACGGT 1028
gi |46948851|gb|AY541454.1| CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCATATGCTTGGGATGCATGGGACTGT 1010
gi |46948853|gb|AY541455.1| CCTGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCATATGCTTGGGATGCATGGGACTGT 1010
gi |46948847|gb|AY541452.1| CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCATATGCTTGGGATGCATGGTACGGT 1016
gi |46948859|gb|AY541458.1| CCCGGTTCGCATGATTTGTCGCTTCATATGCTAGGGATGCATGGCACGGT 998
** * *** ***** ***** ***** ***** ** **

gi |46948855|gb|AY541456.1| TTATGCGAATTATGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCCTTTGGTG 1051
gi |46948857|gb|AY541457.1| TTATGCGAATTATGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCCTTTGGTG 1057
gi |46948845|gb|AY541451.1| TTATGCGAATTATGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCCTTTGGGG 1069
gi |46948849|gb|AY541453.1| TTATGCGAATTATGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCCTTTGGGG 1078
gi |46948851|gb|AY541454.1| CTATGCGAATTATGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCCTTTGGGG 1060
gi |46948853|gb|AY541455.1| CTATGCGAATTATGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCCTTTGGGG 1060
gi |46948847|gb|AY541452.1| TTATGCGAATTATGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCCTTTGGGG 1066
gi |46948859|gb|AY541458.1| TTATGCGAATTATGCGATTGATAAAAGCGACTTGTTGTTGGCCTTTGGCG 1048
***** ***** ** ** ***** * ***** *

gi |46948855|gb|AY541456.1| TGCGGTTTGATGATCGTGTGACGGGGAAGCTTGAGGCGTTTGCTAGTAGG 1101
gi |46948857|gb|AY541457.1| TGCGGTTTGATGATCGTGTGACGGGGAAGCTTGAGGCGTTTGCTAGTAGG 1107
gi |46948845|gb|AY541451.1| TGCGGTTTGATGATCGTGTGACGGGGAAGCTTGAGGCGTTTGCTAGTAGG 1119
gi |46948849|gb|AY541453.1| TGCGGTTTGATGACCGTGTGACGGGGAAGCTTGAGGCGTTTGCTAGTAGG 1128
gi |46948851|gb|AY541454.1| TGCGGTTTGATGACCGTGTGACGGGGAAGCTTGAGGCGTTTGCTAGTAGG 1110
gi |46948853|gb|AY541455.1| TGCGGTTTGATGACCGTGTGACGGGGAAGCTTGAGGCGTTTGCTAGTAGG 1110
gi |46948847|gb|AY541452.1| TGCGGTTTGATGACCGTGTGACGGGGAAGCTTGAGGCGTTTGCTAGTAGG 1116
gi |46948859|gb|AY541458.1| TCCGGTTTGATGACCGTGTGACGGGAAAGATTGAAGCGTTTGCGAGTCTGA 1098
* ***** ***** ***** ***** ***** ***** *

gi |46948855|gb|AY541456.1| GCGAAGATTGTTTCATATTGATATTGATCCGGCTGAAATTGGGAAGAATAA 1151
gi |46948857|gb|AY541457.1| GCGAAGATTGTTTCATATTGATATTGATCCGGCTGAAATTGGGAAGAATAA 1157
gi |46948845|gb|AY541451.1| GCGAAGATTGTTTCATATTGATATTGATCCTGCTGAAATTGGGAAGAATAA 1169
gi |46948849|gb|AY541453.1| GCGAAGATTGTTTCATATTGATATTGATCCTGCTGAAATTGGGAAAAATAA 1178
gi |46948851|gb|AY541454.1| GCGAAGATTGTTTCATATTGATATTGATCCGGCTGAAATTGGGAAGAATAA 1160
gi |46948853|gb|AY541455.1| GCGAAGATTGTTTCATATTGATATTGATCCGGCTGAAATTGGGAAGAATAA 1160
gi |46948847|gb|AY541452.1| GCGAAGATTGTTTCATATTGATATTGATCCGGCTGAAATTGGGAAGAATAA 1166
gi |46948859|gb|AY541458.1| GCAAAGATTGTTTCATATCGATATTGATCCTGCCGAGATAGGGAAGAATAA 1148
** ***** ***** ***** ***** ***** *****

gi |46948855|gb|AY541456.1| ACAGCCTCATGTGTCGATTTGTGGGGATATCAAGGTCGCGTTACAGGGTT 1201
gi |46948857|gb|AY541457.1| ACAGCCTCATGTGTCGATTTGTGGGGATATCAAGGTCGCGTTACAGGGTT 1207
gi |46948845|gb|AY541451.1| GCAGCCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATATTAAGGTCGCGTTACAGGGTT 1219
gi |46948849|gb|AY541453.1| ACAGCCTCATGTGTCGATTTGTGGGGATATTAAGGTCGCGTTACAGGGTT 1228
gi |46948851|gb|AY541454.1| ACAGCCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATATTAAGGTCGCGTTACAGGGTT 1210
gi |46948853|gb|AY541455.1| ACAGCCGCATGTGTCGATTTGTGGGGATATTAAGGTCGCGTTACAGGGTT 1210
gi |46948847|gb|AY541452.1| ACAGCCTCATGTGTCGATTTGTGGCGATATTAAGGTCGCGTTACAGGGTT 1216
gi |46948859|gb|AY541458.1| GCAGCCTCATTTTTCGATTTGTGGGGATATCAAGGCGGCTTTACAAGGAC 1198
***** ** * ***** ***** ***** ***** ** ***** **

```

gi 46948855 gb AY541456.1	TGAACAAGATTTTGGG-----GGAGAAAATTC-----TCTTGATT	1238
gi 46948857 gb AY541457.1	TGAACAAGATTTTGGG-----GGAGAAAATTC-----TCTTGATT	1244
gi 46948845 gb AY541451.1	TGAACAAGATTTTGGG-----GGAAAAGAATTCGGTACTAATCTTGATT	1265
gi 46948849 gb AY541453.1	TGAACAAGATTTTGGG-----GGAAAAGAATTCGGTACTAATCTTGATT	1274
gi 46948851 gb AY541454.1	TGAACAAGATTTTGGG-----GGAAAAGAATTCGGTACTAATCTTGATT	1256
gi 46948853 gb AY541455.1	TGAACAAGATTTTGGG-----GGAAAAGAATTCGGTACTAATCTTGATT	1256
gi 46948847 gb AY541452.1	TGAACAAGATTTTGGG-----GGAAAAGAATTCGGTACTAATCTTGATT	1262
gi 46948859 gb AY541458.1	TAAACAAGATTTTGGAAAGAGGTGAAGATCTTG-----ATTTGATT	1241
	* ***** ** * * * * * * * * * *	
gi 46948855 gb AY541456.1	TTCAAATGGAGGAAGGAATTAGATGAA-CAAAAAGTGAAATTCCTGTTG	1287
gi 46948857 gb AY541457.1	TTCAAATGGAGGAAGGAATTAGATGAA-CAAAAAGTGAAATTCCTGTTG	1293
gi 46948845 gb AY541451.1	TTCGACCTGGAGAAAGGAATTGGATGAA-CAAAAAAGTGAAGTTCCGTTG	1314
gi 46948849 gb AY541453.1	TTCGAACTGGAGAAAGGAATTGGATGAA-CAAAAAGTGAAGTTCCGTTG	1323
gi 46948851 gb AY541454.1	TTCGAACTGGAGAAAGGAATTGGATGAA-CAAAAAGTGAAGTTCCGTTG	1305
gi 46948853 gb AY541455.1	TTCGAACTGGAGAAAGGAATTGGATGAA-CAAAAAGTGAAGTTCCGTTG	1305
gi 46948847 gb AY541452.1	TTCGAACTGGAGAAAGGAATTGGATGAA-CAAAAAGTGAAGTTCCGTTG	1311
gi 46948859 gb AY541458.1	CTCACCTTGAAGGAGGAAGTA-ATGAATCAGAAAGCGAGTAACCCGTTG	1290
	** **** * ***** ** * * * * * *****	
gi 46948855 gb AY541456.1	AGCTTTAAAACGTTTGGCGAAGCGATTCTCCACAGTATGCTATTCAATG	1337
gi 46948857 gb AY541457.1	AGCTTTAAAACGTTTGGCGAAGCGATTCTCCACAGTATGCTATTCAATG	1343
gi 46948845 gb AY541451.1	AGCTTTAAAACGTTTGGCGAAGCGATTCTCCACAGTATGCTATTCAAGT	1364
gi 46948849 gb AY541453.1	AGCTTTAAAACGTTTGGCGAAGCGATTCTCCACAGTATGCTATTCAAGT	1373
gi 46948851 gb AY541454.1	AGCTTTAAAACGTTTGGCGAAGCGATTCTCCACAGTATGCTATTCAAGT	1355
gi 46948853 gb AY541455.1	AGCTTTAAAACGTTTGGCGAAGCGATTCTCCACAGTATGCTATTCAAGT	1355
gi 46948847 gb AY541452.1	AGCTTTAAAACGTTTGGCGAAGCGATTCTCCACAGTATGCTATTCAAGT	1361
gi 46948859 gb AY541458.1	AGTTATAAAAACGTTTGGGGACGCGATTCCACCTCAGTATGCGATCCAAGT	1340
	** * ***** ** ***** ** * * * * * ** * * * *	
gi 46948855 gb AY541456.1	GCTCGATGAGTTAACGGGTGGGAATGCAATTATTAGCACCGGTGTCGGGC	1387
gi 46948857 gb AY541457.1	GCTCGATGAGTTAACGGGTGGGAATGCAATTATTAGCACCGGTGTCGGGC	1393
gi 46948845 gb AY541451.1	TCTTGATGAGTTAACGGGCGGGAATGCAATTATTAGCACCGGTGTCGGGC	1414
gi 46948849 gb AY541453.1	TCTTGATGAGTTAACGGGCGGGAATGCAATTATTAGCACCGGGGTGTCGGGC	1423
gi 46948851 gb AY541454.1	TCTTGATGAGTTAACGGGCGGGAATGCAATTATTAGCACCGGGGTGTCGGGC	1405
gi 46948853 gb AY541455.1	TCTTGATGAGTTAACGGGCGGGAATGCAATTATTAGCACCGGGGTGTCGGGC	1405
gi 46948847 gb AY541452.1	TCTTGATGAGTTAACGGGCGGGAATGCAATTATTAGCACCGGTGTCGGGC	1411
gi 46948859 gb AY541458.1	GCTGAATGAAGTGACGGGTGGGAACGCGATCATAACGACTGGGGTGGGGC	1390
	** **** * ***** ***** ** * * * * * ** * * * *****	
gi 46948855 gb AY541456.1	AGCATCAGATGTGGGCTGCCAGTTTTACAATACAACAAACCGAGACAA	1437
gi 46948857 gb AY541457.1	AGCATCAGATGTGGGCTGCCAGTTTTACAATACAACAAACCGAGACAA	1443
gi 46948845 gb AY541451.1	AACATCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAATACAACAAACCTAGACAA	1464
gi 46948849 gb AY541453.1	AACATCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAATACAACAAACCTAGACAA	1473
gi 46948851 gb AY541454.1	AACATCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAATACAACAAACCTAGACAA	1455
gi 46948853 gb AY541455.1	AACATCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAATACAACAAACCTAGACAA	1455
gi 46948847 gb AY541452.1	AACATCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAATACAACAAACCTAGACAA	1461
gi 46948859 gb AY541458.1	AGCATCAAATGTGGTACGCCAGTTTTACAAGTACAATAGGCCTAGGCAA	1440
	* ***** ***** * ** ***** ***** * * * * * *	
gi 46948855 gb AY541456.1	TGGCTGACGTCGGGCGGGCTAGGGGCAATGGGTTTCGGGCTGCCCGCTGC	1487
gi 46948857 gb AY541457.1	TGGCTGACGTCGGGCGGGCTAGGGGCAATGGGTTTCGGGCTGCCCGCTGC	1493
gi 46948845 gb AY541451.1	TGGCTGACGTCGGGCGGGCTAGGGGCAATGGGTTTCGGGCTGCCCGCTGC	1514
gi 46948849 gb AY541453.1	TGGCTGACGTCGGGCGGGCTAGGGGCAATGGGTTTCGGGCTGCCCGCTGC	1523
gi 46948851 gb AY541454.1	TGGCTGACGTCGGGCGGGCTAGGGGCAATGGGTTTGGGCTGCCCGCTGC	1505
gi 46948853 gb AY541455.1	TGGCTGACGTCGGGCGGGCTAGGGGCAATGGGTTTGGGCTGCCCGCTGC	1505
gi 46948847 gb AY541452.1	TGGCTGACGTCGGGCGGGCTAGGGGCAATGGGTTTGGGCTGCCCGCTGC	1511

```

gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | TGGCTAACTTCGGCTGGGCTAGGTGCTATGGGGTTCGGGCTGCCTGCAGC 1490
***** ** ***** ** ***** ** ** ***** ** **

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | TATCGGGGCGGCCGTTGCAAGACCCGATGCGGTAGTAGTTGATATCGACG 1537
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | TATCGGGGCGGCCGTTGCAAGACCCGATGCGGTAGTAGTTGATATCGACG 1543
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | TATCGGGGCGGCCGTTGCAAGACCTGATGCGGTAGTAGTTGACATCGACG 1564
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | TATCGGGGCGGCCGTTGCAAGACCTGATGCGGTAGTAGTTGACATCGACG 1573
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | TATCGGGGCGGCCGTTGCAAGACCTGATGCGGTAGTAGTTGACATCGACG 1555
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | TATCGGGGCGGCCGTTGCAAGACCTGATGCGGTAGTAGTTGACATCGACG 1555
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | TATCGGGGCGGCCGTTGCAAGACCTGATGCGGTAGTAGTTGACATCGACG 1561
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | TATCGGGGCGGCTGTTGCACGACCAGATGCAGTCGTGGTTGACATCGACG 1540
***** ***** ** ***** ** ** ***** *****

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | GTGATGGAAGCTTTATGATGAACGTTCAAGAGTTAGCCACAATCCGTGTT 1587
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | GTGATGGAAGCTTTATGATGAACGTTCAAGAGTTAGCCACAATCCGTGTT 1593
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | GTGACGGAAGCTTTATGATGAATGTTCAAGAGTTAGCCACAATCCGTGTT 1614
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | GTGACGGAAGCTTTATGATGAATGTTCAAGAGTTAGCCACAATCCGTGTT 1623
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | GTGACGGAAGCTTTATGATGAATGTTCAAGAGTTAGCCACAATCCGTGTT 1605
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | GTGACGGAAGCTTTATGATGAATGTTCAAGAGTTAGCCACAATCCGTGTT 1605
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | GTGACGGAAGCTTTATGATGAATGTTCAAGAGTTAGCCACAATCCGTGTT 1611
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | GTGATGGAAGTTTTATGATGAATGTTCAAGAATTGGCGACCATTTCGTGTA 1590
**** ***** ***** ***** ** ** ** ** *****

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | GAAAATCTGCCGGTTAAGATTTTATTACTTAACAACCAGCATTGGGTAT 1637
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | GAAAATCTGCCGGTTAAGATTTTATTACTTAACAACCAGCATTGGGTAT 1643
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | GAAAATCTGCCGGTTAAGATTTTATTACTTAACAACCAGCATTGGGTAT 1664
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | GAAAATCTGCCGGTTAAGATTTTATTACTTAACAATCAGCATTGGGTAT 1673
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | GAAAATCTGCCGGTTAAGATTTTATTACTTAACAACCAGCATTGGGTAT 1655
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | GAAAATCTGCCGGTTAAGATTTTATTACTTAATAATCAGCATTGGGTAT 1655
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | GAAAATCTGCCGGTTAAGATTTTATTACTCAACAATCAGCATTGGGTAT 1661
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | GAGAATCTTCTGTAAATGATGGTGCTTAATAACCAACACTTGGGTAT 1640
** ***** ** ***** ** * * ** ** ** ** *****

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | GGTGGTTCAGTGGGAGGATCGGTTTTACAAGGCGAATCGGGCTCATACCT 1687
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | GGTGGTTCAGTGGGAGGATCGGTTTTACAAGGCGAATCGGGCTCATACCT 1693
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | GGTGGTTCAGTGGGAGGATCGGTTTTACAAGGCGAATCGGGCTCATACCT 1714
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | GGTGGTTCAGTGGGAGGATCGGTTTTACAAGGCGAATCGGGCTCATACCT 1723
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | GGTGGTTCAGTGGGAGGATCGGTTTTACAAGGCGAATCGGGCTCATACCT 1705
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | GGTGGTTCAGTGGGAGGATCGGTTTTACAAGGCGAATAGGGCTCATACCT 1705
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | GGTGGTTCAGTGGGAGGATCGGTTTTACAAGGCGAATCGGGCTCATACCT 1711
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | GGTGGTTCAGTGGGAAGACCGTTTTATAAGGCGAACC GCGCACACCT 1690
***** ***** ** ** ***** ***** * ** ** *****

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | ACTTAGGAAACCCGTCAAAGAGTCGGAAATATTCCCGAACATGTTGAAG 1737
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | ACTTAGGAAACCCGTCAAAGAGTCGGAAATATTCCCGAACATGTTGAAG 1743
gi | 46948845 | gb | AY541451.1 | ACTTAGGAAACCCGTCAAAGAGTCGGAAATATTCCCTAACATGGTGAAG 1764
gi | 46948849 | gb | AY541453.1 | ACTTAGGAAACCCGTCAAAGAGTCGGAAATATTCCCTAACATGGTGAAG 1773
gi | 46948851 | gb | AY541454.1 | ACTTAGGAAACCCGTCAAAGAGTCGGAAATATTCCCTAACATGGTGAAG 1755
gi | 46948853 | gb | AY541455.1 | ACTTAGGAAACCCGTCAAAGAGTCGGAAATATTCCCTAACATGGTGAAG 1755
gi | 46948847 | gb | AY541452.1 | ACTTAGGAAACCCGTCAAAGAGTCGGAAATATTCCCTAACATGTTGAAG 1761
gi | 46948859 | gb | AY541458.1 | ACTTAGGAAACCCGACAACGAATCGGGTATATTCCCAATATGTTGAAG 1740
***** ***** ** ** ***** ***** ** ** *****

gi | 46948855 | gb | AY541456.1 | TTTGCTGAAGCTTGTGATATTCCAGCTGCGAGAGTAACCCGAAAGGGGGA 1787
gi | 46948857 | gb | AY541457.1 | TTTGCTGAAGCTTGTGATATTCCAGCTGCGAGAGTAACCCGAAAGGGGGA 1793

```

gi 46948845 gb AY541451.1	TTTGCTGAAGCCTGTGATATCCCGGCTGCTCGAGTGACCCAAAAGGCGGA	1814
gi 46948849 gb AY541453.1	TTTGCTGAAGCCTGTGATATCCCGGCTGCTCGAGTGACCCAAAAGGCGGA	1823
gi 46948851 gb AY541454.1	TTTGCTGAAGCCTGTGATATCCCGGCTGCTCGAGTGACCCAAAAGGCGGA	1805
gi 46948853 gb AY541455.1	TTTGCTGAAGCCTGTGATATCCCGGCTGCTCGAGTGACCCAAAAGGCGGA	1805
gi 46948847 gb AY541452.1	TTTGCCGAAGCCTGTGATATCCCGGCTGCTCGAGTGACCCAAAAGGCGGA	1811
gi 46948859 gb AY541458.1	TTTGCTGAAGCGTGTGACATCCCGGCTGCGCGAGTAACCCAAAAGGGAGA	1790
	***** **	
gi 46948855 gb AY541456.1	TCTACGAGCGGCTATTCAGAAGATGTTGGATACACCGGGCCTTACTTGT	1837
gi 46948857 gb AY541457.1	TCTACGAGCGGCTATTCAGAAGATGTTGGATACACCGGGCCTTACTTGT	1843
gi 46948845 gb AY541451.1	TCTACGAGCAGTATTCAGAAGATGTTGGATACACCGGGCCTTACTTGT	1864
gi 46948849 gb AY541453.1	TCTACGAGCAGTATTCAGAAGATGTTGGATACACCGGGCCTTACTTGT	1873
gi 46948851 gb AY541454.1	TCTACGAGCAGTATTCAGAAGATGTTGGATACACCGGGCCTTACTTGT	1855
gi 46948853 gb AY541455.1	TCTACGAGCAGTATTCAGAAGATGTTGGATACACCGGGCCTTACTTGT	1855
gi 46948847 gb AY541452.1	TCTACGAGCAGTATTCAGAAGATGTTGGATACACCGGGCCTTACTTGT	1861
gi 46948859 gb AY541458.1	TGTTAGAACCGGATTTCAGAAAATGTTGGATACACCGGGCCTTACTTAT	1840
	* * * * *	
gi 46948855 gb AY541456.1	TGGATGTCATTGTTCCACATCAAGAACACGTGTTGCCCATGATCCCGGCT	1887
gi 46948857 gb AY541457.1	TGGATGTCATTGTTCCACATCAAGAACACGTGTTGCCCATGATCCCGGCT	1893
gi 46948845 gb AY541451.1	TGGATGTGATTGTGCCGCATCAAGAACACGTGTTGCCCATGATCCCGGCT	1914
gi 46948849 gb AY541453.1	TGGATGTGATTGTGCCGCATCAAGAACACGTGTTGCCCATGATCCCGGCT	1923
gi 46948851 gb AY541454.1	TGGATGTGATTGTGCCGCATCAAGAACACGTGTTGCCCATGATCCCGGCT	1905
gi 46948853 gb AY541455.1	TGGATGTGATTGTGCCGCATCAAGAACACGTGTTGCCCATGATCCCGGCT	1905
gi 46948847 gb AY541452.1	TGGATGTGATTGTGCCGCATCAAGAACACGTGTTGCCCATGATCCCGGCT	1911
gi 46948859 gb AY541458.1	TGGATGTTATCGTTCACATCAAGAACATGTTTTACCCATGATCCAGCC	1890
	***** **	
gi 46948855 gb AY541456.1	GGGGGAGGTTTCTCGGATGTGATCACCAGGGTGATGGCAGAATGAAATA	1937
gi 46948857 gb AY541457.1	GGGGGAGGTTTCTCGGATGTGATCACCAGGGTGATGGCAGAATGAAATA	1943
gi 46948845 gb AY541451.1	GGCGGAGGTTTCTCGGATGTGATCACCAGGGTGATGGCAGAACGAAATA	1964
gi 46948849 gb AY541453.1	GGCGGAGGTTTCTCGGATGTGATCACCAGGGTGATGGCAGAACGAAATA	1973
gi 46948851 gb AY541454.1	GGCGGAGGTTTCTCGGATGTGATCACCAGGGTGATGGCAGAACGAAATA	1955
gi 46948853 gb AY541455.1	GGCGGAGGTTTCTCGGATGTGATCACCAGGGTGATGGCAGAACGAAATA	1955
gi 46948847 gb AY541452.1	GGCGGAGGTTTCTCGGATGTGATCACCAGGGTGATGGCAGAACGAAATA	1961
gi 46948859 gb AY541458.1	GGAGGGGTTTTAACGATATCATAACTGACGCGGATGGCAGAACACAATA	1940
	** * * * *	
gi 46948855 gb AY541456.1	TTGA	1941
gi 46948857 gb AY541457.1	TTGA	1947
gi 46948845 gb AY541451.1	TTGA	1968
gi 46948849 gb AY541453.1	TTGA	1977
gi 46948851 gb AY541454.1	TTGA	1959
gi 46948853 gb AY541455.1	TTGA	1959
gi 46948847 gb AY541452.1	TTGA	1965
gi 46948859 gb AY541458.1	G---	1941

4. Δημιουργία ρυθμιστικού διαλύματος 1 x TAE για τη χρήση του σε πηκτή αγαρόζης και διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Για να δημιουργηθεί το 1 x TAE , πρέπει πρώτα να παρασκευαστεί το πυκνό διάλυμα 50xTAE.

Για την παρασκευή 1L διαλύματος 50xTAE (pH 8,32) χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι χημικές ουσίες:

315,2g Tris HCL (MW = 157,6)

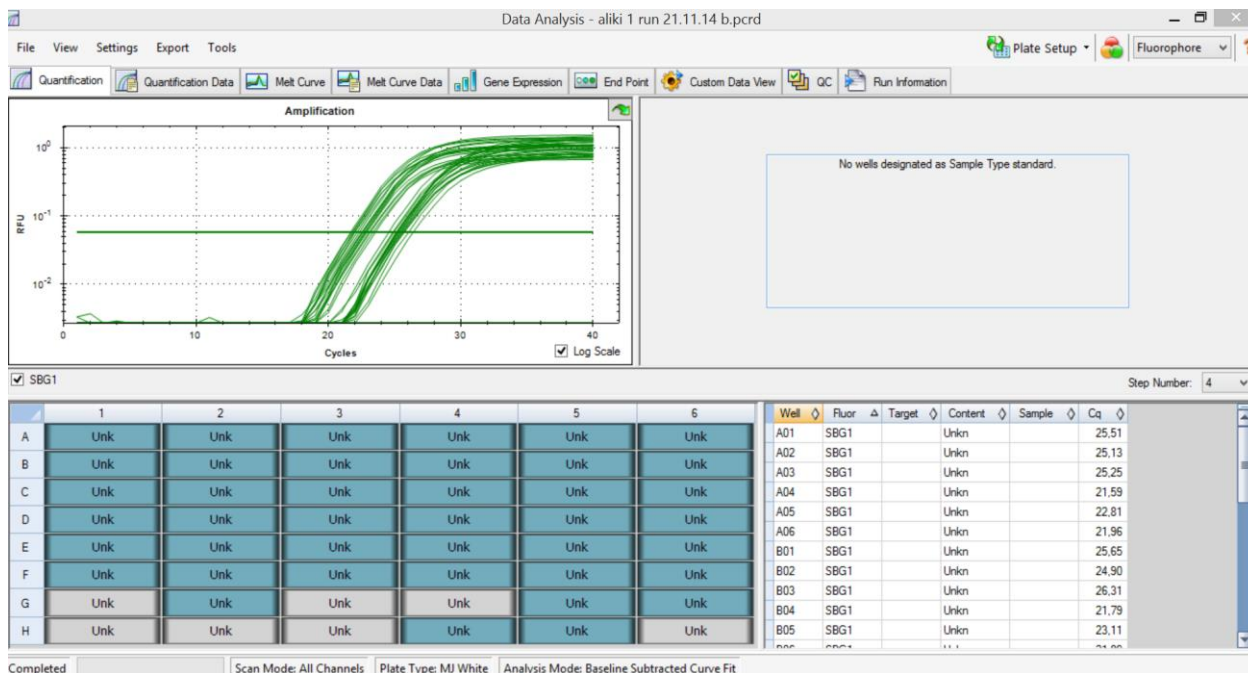
57,1ml Glacial Acetic Acid

100ml 0,5M EDTA

Έγινε ανάμιξη των παραπάνω μέχρι την πλήρη διάλυση, προσθέτοντας 625ml HPLC νερό και μετρώντας συνεχώς το pH. Όταν διαλυθούν όλα τα συστατικά φτάνουν σε τελικό όγκο 1000ml, προσθέτοντας 375ml HPLC νερό.

5. Τιμές Cq μετά το πέρας της RTqPCR

Παρακάτω φαίνεται ένα παράδειγμα των καμπύλων που δείχνουν την αύξηση του προϊόντος μετά το και κάποιες τιμές των Cq μετά το πέρας της RTqPCR. Αυτό που φαίνεται αποθηκεύεται σε pdf με όλα τα δεδομένα, ακόμα και αυτών που δεν φαίνονται εδώ, όπως η melting curve κορυφή και επεξεργάζονται με το πρόγραμμα REST[©].



6. Ανάλυση δεδομένων με το πρόγραμμα Rest[©]

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα παράδειγμα του προγράμματος Rest[©].

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P																																																																																																																																																																					
Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test ©						run Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test ©																																																																																																																																																																														
Direct download (mirror) Nucleic Acids Research 2001 Vol.29 (9) e45 Nucleic Acids Research 2002 Vol.29 (9) e38						Specify the range on the spreadsheet. Go to last cell of last target gene to define the spreadsheet.																																																																																																																																																																														
Direct support http://www.wzvw.tum.de/gene-quantification gene.quantification@wzvw.tum.de						Randomisation Data Output :																																																																																																																																																																														
Copyright © 2001 & 2002 Michael W. Pfaffli & Graham W. Horjan						<table border="1"> <thead> <tr> <th>Genes</th> <th>Ref.</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCR Efficiencies</td> <td>2</td> <td>2</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Control Means</td> <td>21,495</td> <td>25,977</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sample Means</td> <td>21,937</td> <td>25,647</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Expression Ratios</td> <td></td> <td>1,707</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>p-Values</td> <td>0,001</td> <td>0,110</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Expression Ratios-<i>nn</i></td> <td>0,736</td> <td>1,257</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>p-Values-<i>nn</i></td> <td>0,092</td> <td>0,209</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Randomisations</td> <td>2000</td> <td>of</td> <td>2000</td> <td>done</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>										Genes	Ref.	1	2	3	4	PCR Efficiencies	2	2				Control Means	21,495	25,977				Sample Means	21,937	25,647				Expression Ratios		1,707				p-Values	0,001	0,110				Expression Ratios- <i>nn</i>	0,736	1,257				p-Values- <i>nn</i>	0,092	0,209				Randomisations	2000	of	2000	done																																																																																																																
Genes	Ref.	1	2	3	4																																																																																																																																																																															
PCR Efficiencies	2	2																																																																																																																																																																																		
Control Means	21,495	25,977																																																																																																																																																																																		
Sample Means	21,937	25,647																																																																																																																																																																																		
Expression Ratios		1,707																																																																																																																																																																																		
p-Values	0,001	0,110																																																																																																																																																																																		
Expression Ratios- <i>nn</i>	0,736	1,257																																																																																																																																																																																		
p-Values- <i>nn</i>	0,092	0,209																																																																																																																																																																																		
Randomisations	2000	of	2000	done																																																																																																																																																																																
Alternative Efficiency						Randomisation Test Results [normalised by reference gene expression]:																																																																																																																																																																														
Efficiency						<p>Target gene 1 (not investigated) Target gene 1 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by the factor 1,707 Target gene 1 sample group is NOT different from target gene 1 control group. p = 0,11</p> <p>Target gene 2 (not investigated) #DIV/0! Target gene 2 sample group is NOT different from target gene 2 control group. p = 0</p> <p>Target gene 3 (not investigated) #DIV/0! Target gene 3 sample group is NOT different from target gene 3 control group. p = 0</p> <p>Target gene 4 (not investigated) #DIV/0! Target gene 4 sample group is NOT different from target gene 4 control group. p = 0</p> <p>Randomisation Test Results [NOT normalised (nn) by reference gene expression]:</p> <p>Reference gene (not investigated) not normalised Reference gene is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by the factor 1,358 Reference gene control group is NOT different from reference gene sample group. p =0,092</p> <p>Target gene 1 (not investigated) not normalised Target gene 1 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by the factor 1,257 Target gene 1 control group is NOT different from target gene 1 sample group. p =0,209</p> <p>Target gene 2 (not investigated) not normalised #DIV/0! Target gene 2 control group is NOT different from target gene 2 sample group. p =0</p>																																																																																																																																																																														
CP input						<table border="1"> <thead> <tr> <th>reference gene</th> <th>[target gene 1]</th> <th>[target gene 2]</th> <th>[target gene 3]</th> <th>[target gene 4]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>control 1</td> <td>0</td> <td>25,65</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 2</td> <td>21,49</td> <td>26,21</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 3</td> <td>21,5</td> <td>26,07</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 7</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 9</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 10</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 11</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 12</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 13</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 14</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 15</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>control 16</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 1</td> <td>22,36</td> <td>25,7</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 2</td> <td>21,65</td> <td>25,43</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 3</td> <td>21,8</td> <td>25,81</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 7</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 9</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 10</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 11</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 12</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 13</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 14</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 15</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>sample 16</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>										reference gene	[target gene 1]	[target gene 2]	[target gene 3]	[target gene 4]	control 1	0	25,65			control 2	21,49	26,21			control 3	21,5	26,07			control 4					control 5					control 6					control 7					control 8					control 9					control 10					control 11					control 12					control 13					control 14					control 15					control 16					sample 1	22,36	25,7			sample 2	21,65	25,43			sample 3	21,8	25,81			sample 4					sample 5					sample 6					sample 7					sample 8					sample 9					sample 10					sample 11					sample 12					sample 13					sample 14					sample 15					sample 16				
reference gene	[target gene 1]	[target gene 2]	[target gene 3]	[target gene 4]																																																																																																																																																																																
control 1	0	25,65																																																																																																																																																																																		
control 2	21,49	26,21																																																																																																																																																																																		
control 3	21,5	26,07																																																																																																																																																																																		
control 4																																																																																																																																																																																				
control 5																																																																																																																																																																																				
control 6																																																																																																																																																																																				
control 7																																																																																																																																																																																				
control 8																																																																																																																																																																																				
control 9																																																																																																																																																																																				
control 10																																																																																																																																																																																				
control 11																																																																																																																																																																																				
control 12																																																																																																																																																																																				
control 13																																																																																																																																																																																				
control 14																																																																																																																																																																																				
control 15																																																																																																																																																																																				
control 16																																																																																																																																																																																				
sample 1	22,36	25,7																																																																																																																																																																																		
sample 2	21,65	25,43																																																																																																																																																																																		
sample 3	21,8	25,81																																																																																																																																																																																		
sample 4																																																																																																																																																																																				
sample 5																																																																																																																																																																																				
sample 6																																																																																																																																																																																				
sample 7																																																																																																																																																																																				
sample 8																																																																																																																																																																																				
sample 9																																																																																																																																																																																				
sample 10																																																																																																																																																																																				
sample 11																																																																																																																																																																																				
sample 12																																																																																																																																																																																				
sample 13																																																																																																																																																																																				
sample 14																																																																																																																																																																																				
sample 15																																																																																																																																																																																				
sample 16																																																																																																																																																																																				

7. Αναλυτικά τα δεδομένα της φαινοτυπικής αξιολόγησης των φυτοτοξικών συμπτωμάτων των τριών υβριδίων S1, R2, R3 σύμφωνα με την κλίμακα αξιολόγησης

Πίνακας 1. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων σύμφωνα με την κλίμακα αξιολόγησης των υβριδίων S1, R2, R3 μετά από 7 ημέρες από τις επεμβάσεις με τις συγκεντρώσεις των 400μg δ.ο./ml και 1200 μg δ.ο./ml

ΦΥΤΑ	ΕΠΙΠΛΗΡΗΣ	7Η ΗΜΕΡΑ								
		S1 ΥΒΡΙΔΙΟ			R2 ΥΒΡΙΔΙΟ			R3 ΥΒΡΙΔΙΟ		
		H ₂ O	400 μg/ml	1200 μg/ml	H ₂ O	400 μg/ml	1200 μg/ml	H ₂ O	400 μg/ml	1200 μg/ml
1	A	0	3	3	0	2	3	0	3	3
2	A	0	3	2	0	3	3	0	3	3
3	A	0	3	3	0	2	3	0	2	2
4	A	0	2	3	0	3	3	0	2	3
5	A	0	3	3	0	3	3	0	3	2
6	A	0	2	3	0	3	3	0	2	3
7	A	0	3	3	1	2	3	0	3	3
8	A	1	2	3	0	3	3	0	3	3
9	A	0	3	5	0	4	3	0	2	2
10	A	0	3	3	0	2	3	0	3	2
11	A	0	3	3	0	2	2	0	3	3
12	A	1	3	3	0	3	3	0	2	3
1	B	0	3	3	0	3	5	0	3	3
2	B	0	3	3	0	2	3	0	3	3
3	B	0	3	3	0	2	3	0	3	5
4	B	0	3	3	0	3	2	0	3	3
5	B	0	3	3	0	2	3	0	2	3
6	B	0	3	3	0	1	3	0	3	3
7	B	0	3	3	0	3	3	0	2	2
8	B	0	3	3	0	2	3	0	2	3
9	B	0	3	3	0	3	3	0	2	2
10	B	0	3	3	0	3	3	0	2	3
11	B	0	3	3	0	3	2	0	2	3
12	B	0	3	3	0	2	3	1	2	3

Πίνακας 2. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων σύμφωνα με την κλίμακα αξιολόγησης των υβριδίων S1, R2, R3 μετά από 14 ημέρες από τις επεμβάσεις με τις συγκεντρώσεις των 400μg δ.ο./ml και 1200 μg δ.ο./ml

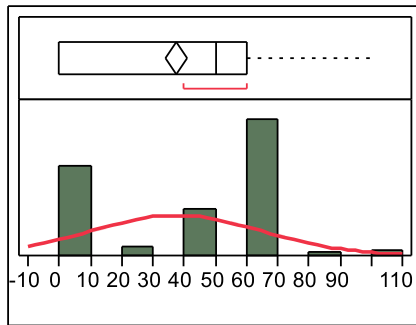
ΦΥΤΑ	ΕΠΑΝΑ-ΛΗΨΗ	14Η ΗΜΕΡΑ								
		S1 ΥΒΡΙΔΙΟ			R2 ΥΒΡΙΔΙΟ			R3 ΥΒΡΙΔΙΟ		
		H ₂ O	400 μg/ml	1200 μg/ml	H ₂ O	400 μg/ml	1200 μg/ml	H ₂ O	400 μg/ml	1200 μg/ml
1	A	1	5	5	0	3	3	0	5	5
2	A	0	5	3	0	3	5	0	4	5
3	A	1	5	5	0	3	2	0	3	3
4	A	0	3	3	1	5	3	1	2	3
5	A	0	5	3	0	3	3	0	3	3
6	A	0	5	3	0	3	3	0	2	3
7	A	0	3	3	1	3	3	0	3	3
8	A	1	3	3	0	5	5	0	3	3
9	A	0	3	3	0	3	2	0	3	3
10	A	0	3	3	0	5	3	0	3	4
11	A	0	3	3	0	3	2	0	3	3
12	A	1	5	5	1	3	3	1	3	3
1	B	0	5	3	0	5	5	0	3	5
2	B	0	3	3	0	3	3	0	3	3
3	B	1	3	3	0	3	3	1	3	5
4	B	0	3	5	1	5	3	0	3	3
5	B	0	3	5	0	3	5	0	5	3
6	B	0	3	5	0	3	2	0	3	3
7	B	1	3	3	0	5	5	0	3	3
8	B	0	3	3	0	3	3	1	3	3
9	B	0	3	3	0	3	2	0	3	3
10	B	0	3	3	0	3	3	0	5	3
11	B	0	3	3	1	3	2	0	3	3
12	B	1	5	3	0	2	4	1	3	3

Πίνακας 3. Αξιολόγηση των φυτοτοξικών συμπτωμάτων σύμφωνα με την κλίμακα αξιολόγησης των υβριδίων S1, R2, R3 μετά από 21 ημέρες από τις επεμβάσεις με τις συγκεντρώσεις των 400μg δ.ο./ml και 1200 μg δ.ο./ml

ΦΥΤΑ	ΕΠΑΝΑ-ΛΗΨΗ	21Η ΗΜΕΡΑ								
		S1 ΥΒΡΙΔΙΟ			R2 ΥΒΡΙΔΙΟ			R3 ΥΒΡΙΔΙΟ		
		H ₂ O	400 μg/ml	1200 μg/ml	H ₂ O	400 μg/ml	1200 μg/ml	H ₂ O	400 μg/ml	1200 μg/ml
1	A	1	5	5	0	5	4	0	5	5
2	A	0	5	4	0	3	5	0	4	4
3	A	1	5	5	0	3	3	0	3	4
4	A	0	4	3	1	5	5	1	3	5
5	A	0	4	5	0	3	5	0	5	3
6	A	0	5	4	0	5	4	0	3	5
7	A	0	4	3	1	3	3	0	4	5
8	A	1	5	5	0	5	5	0	3	4
9	A	0	4	4	0	4	3	0	3	4
10	A	0	5	5	0	5	5	0	4	5
11	A	0	4	4	0	3	3	0	3	3
12	A	1	5	5	1	3	5	1	3	5
1	B	0	5	3	0	5	5	0	5	5
2	B	0	5	4	0	3	3	0	3	4
3	B	1	4	4	0	3	5	1	3	5
4	B	0	4	5	1	5	3	0	3	4
5	B	0	3	5	0	3	5	0	5	5
6	B	0	5	5	0	3	3	0	3	5
7	B	1	4	5	0	5	5	0	4	3
8	B	0	4	5	0	3	5	1	3	3
9	B	0	5	4	0	5	4	0	3	5
10	B	0	4	3	0	4	5	0	5	3
11	B	0	4	3	1	5	3	0	3	3
12	B	1	5	5	0	3	4	1	3	4

8. Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων με το πρόγραμμα JMP®

- Στην αρχή έγινε έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων
- Για την 7^η ημέρα παρατήρησης μετά τις επεμβάσεις



Normal(37,5926,27,5806)

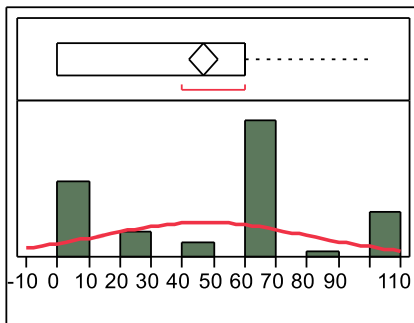
Goodness-of-Fit Test

Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,761632	0,0000*

Note: Ho = The data is from the Normal distribution. Small p-values reject Ho.

- Για την 14 ημέρα παρατήρησης μετά τις επεμβάσεις



Normal(46,9444,33,7145)

Goodness-of-Fit Test

Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,838341	<,0001*

Note: Ho = The data is from the Normal distribution. Small p-values reject Ho.

Level		Least Sq Mean
S1	A	40,000000
R2	B	36,944444
R3	B	35,833333

Levels not connected by same letter are significantly different.

EΠΕΜΒΑΣΗ

Level	Least Sq Mean	Std Error
A	52.777778	1.2518714
B	58.888889	1.2518714
M	1.111111	1.2518714

Level		Least Sq Mean
B	A	58,888889
A	B	52,777778
M	C	1,111111

Levels not connected by same letter are significantly different.

ΥΒΡΙΑΙΟ*ΕΠΕΜΒΑΣΗ

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error
S1,A	57.500000	1.9793825
S1,B	60.833333	1.9793825
S1,M	1.666667	1.9793825
R2,A	50.833333	1.9793825
R2,B	59.166667	1.9793825
R2,M	0.833333	1.9793825
R3,A	50.000000	1.9793825
R3,B	56.666667	1.9793825
R3,M	0.833333	1.9793825

Level		Least Sq Mean
S1,B	A	60,833333
R2,B	A	59,166667
S1,A	A	57,500000
R3,B	A	56,666667
R2,A	B	50,833333
R3,A	B	50,000000
S1,M	C	1,666667
R2,M	C	0,833333
R3,M	C	0,833333

Levels not connected by same letter are significantly different.

— 14^η ημέρα παρατήρησης

➤ Ανάλυση διασποράς

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	8	194100,00	24262,5	99,8808
Error	207	50283,33	242,9	Prob > F
C. Total	215	244383,33		<,0001*

Effect tests

Source	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
ΥΒΡΙΔΙΟ	2	844.44	1.7313	0.1796
ΕΠΕΜΒΑΣΗ	2	192633.33	394.9523	<.0001*
ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ	1	46.30	0.1898	0.6635
ΥΒΡΙΔΙΟ*ΕΠΕΜΒΑΣΗ	4	622.22	0.6379	0.6361

➤ Σύγκριση μέσων με την LSD

ΥΒΡΙΔΙΟ

Level	Least Sq Mean	Std Error
S1	50.185185	2.1251105
R2	46.296296	2.1251105
R3	45.740741	2.1251105

Level	Least Sq Mean
S1	A 50.185185
R2	A 46.296296
R3	A 45.740741

Levels not connected by same letter are significantly different.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ

Level	Least Sq Mean	Std Error
A	69.351852	2.1251105
B	67.685185	2.1251105
M	5.185185	2.1251105

Level		Least Sq Mean
A	A	69.351852
B	A	67.685185
M	B	5.185185

Levels not connected by same letter are significantly different.

ΥΒΡΙΔΙΟ*ΕΠΕΜΒΑΣΗ

Level	Least Sq Mean	Std Error
S1,A	73.796296	3.3600947
S1,B	70.462963	3.3600947
S1,M	6.296296	3.3600947
R2,A	69.629630	3.3600947
R2,B	64.629630	3.3600947
R2,M	4.629630	3.3600947
R3,A	64.629630	3.3600947
R3,B	67.962963	3.3600947
R3,M	4.629630	3.3600947

Level		Least Sq Mean
S1,A	A	73.796296
S1,B	A B	70.462963
R2,A	A B	69.629630
R3,B	A B	67.962963
R2,B	B	64.629630
R3,A	B	64.629630
S1,M	C	6.296296
R3,M	C	4.629630
R2,M	C	4.629630

Levels not connected by same letter are significantly different.

— 21^η ημέρα παρατήρησης

➤ Ανάλυση Διασποράς

Source	DF	Sum of Squares	of Mean Square	F Ratio
Model	9	292055.556	32450.6173	154.094027
Error	206	43381.48150	210,1589716	Prob > F
C. Total	215	335437,037		<,0001*

Effect Tests

Source	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
ΥΒΡΙΔΙΟ	2	1848.15	4.3880	0.0136*
ΕΠΕΜΒΑΣΗ	2	288070.37	683.9612	<.0001*
ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ	1	118.52	0.5628	0.4540
ΥΒΡΙΔΙΟ*ΕΠΕΜΒΑΣΗ	4	2018.52	2.3963	0.0515

➤ Σύγκριση μέσων με την LSD

ΥΒΡΙΑΙΟ

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error
S1	61.018519	1.9747935
R2	56.018519	1.9747935
R3	54.074074	1.9747935

Level		Least Sq Mean
S1	A	61.018519
R2	B	56.018519
R3	B	54.074074

Levels not connected by same letter are significantly different.

ΕΠΙΜΒΑΣΗ

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error
A	80.462963	1.9747935
B	85.185185	1.9747935
M	5.462963	1.9747935

Level		Least Sq Mean
B	A	85.185185
A	A	80.462963
M	B	5.462963

Levels not connected by same letter are significantly different.

ΥΒΡΙΑΙΟ*ΕΠΙΜΒΑΣΗ

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error
S1,A	89.907407	3.1224228
S1,B	86.574074	3.1224228
S1,M	6.574074	3.1224228
R2,A	79.074074	3.1224228
R2,B	84.074074	3.1224228
R2,M	4.907407	3.1224228
R3,A	72.407407	3.1224228
R3,B	84.907407	3.1224228
R3,M	4.907407	3.1224228

Level		Least Sq Mean
S1,A	A	89.907407
S1,B	A B	86.574074
R3,B	A B	84.907407
R2,B	A B	84.074074
R2,A	B C	79.074074
R3,A	C	72.407407
S1,M	D	6.574074
R2,M	D	4.907407
R3,M	D	4.907407

Levels not connected by same letter are significantly different.