

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Χαμπλά Ευανθία

**Γονιδιακή έκφραση γενετικού υλικού σόγιας σε
συνθήκες υδατικής καταπόνησης**

Επιβλέπων Καθηγητής

Γεώργιος Ν. Σκαράκης

ΑΘΗΝΑ

Απρίλιος 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Χαμπλά Ευανθία

Γονιδιακή έκφραση γενετικού υλικού σόγιας σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σκαράκης Γεώργιος, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής (Επιβλέπων)

Λάμπρου Νικόλαος, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Βιοτεχνολογίας (Μέλος)

Παυλή Ουρανία, Λέκτορας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος (Μέλος)

Ευχαριστίες

Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Ν. Σκαράκη, Κοσμήτορα της Σχολής Αγροτικής Παραγωγής, Υποδομών και Περιβάλλοντος και Διευθυντή του Εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού, για την ανάθεση του θέματος, τις πολύτιμες συμβουλές και την επιστημονική υποστήριξη που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στη Λέκτορα κα. Ουρανία Παυλή για τις αναμφισβήτητα πολύτιμες και στοχευμένες παρεμβάσεις της, οι οποίες συνέβαλαν ουσιαστικά στην πληρέστερη ολοκλήρωση της μελέτης μου. Πάνω απ' όλα όμως, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την ηθική στήριξη και τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσε για την παρούσα μελέτη. Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Λάμπρου για το χρόνο που αφιέρωσε ώστε να μελετήσει την παρούσα διατριβή, καθώς και για την παραχώρηση του εργαστηρίου του για την πραγματοποίηση μέρος των πειραμάτων της παρούσας εργασίας.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τους Φώτη Κωμαΐτη, Δημήτρη Σκληρό, Γιώργο Καραλιά και Γεωργία Κελαϊδή, υποψήφιους διδάκτορες του Γ.Π.Α. για την επιστημονική στήριξη που μου παρείχαν σε θέματα σχετικά με τις μεταγραφομικές αναλύσεις και τις πάντα εύστοχες παρατηρήσεις τους .

Συνεχίζοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού του Γ.Π.Α., καθώς και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Κατερίνα Μαρούλη , Ουρανία Ρούσου και Λευτέρη Στύλια για την ηθική υποστήριξη και την ανιδιοτελή συμπαράσταση που μου παρείχαν καθ'όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Τέλος, μια απλή ευχαριστία δεν αρκεί για τη στήριξη της οικογένειας μου. Ήταν όλοι τους παρόντες σε κάθε μου βήμα και ο καθένας με τον τρόπο του συνέβαλε ώστε να κλείσω αυτόν τον κύκλο, στηρίζοντας με τόσο ηθικά όσο και πρακτικά.

Χαμπλά Ε. Αθήνα,

Απρίλιος 2016

Περίληψη

Η σόγια αποτελεί ένα από τα περισσότερο σημαντικά ψυχανθή σε παγκόσμιο επίπεδο και μία πολλά υποσχόμενη καλλιέργεια για την εκμετάλλευσή της σε πλήθος εφαρμογών στη βιομηχανία. Το γεγονός ότι ανήκει στην κατηγορία των ευαίσθητων φυτών στην έλλειψη επαρκούς εδαφικής υγρασίας, δικαιολογεί την αναγκαιότητα υλοποίησης βελτιωτικών προγραμμάτων με στόχο την παραγωγή ποικιλιών ανθεκτικών στην περιβαλλοντική αυτή καταπόνηση. Προϋπόθεση για την επιτυχή διεξαγωγή τέτοιων προγραμμάτων είναι η αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που ειπείσονται στην εκδήλωση του γνωρίσματος της ανθεκτικότητας. Προς την κατεύθυνση αυτή, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε, στην ανάλυση της έκφρασης γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων και άλλων λειτουργικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με το γνώρισμα της ανθεκτικότητας στη σόγια. Ειδικότερα, μελετήθηκε η απόκριση σε μεταγραφικό επίπεδο δύο ποικιλιών σόγιας, μίας ανθεκτικής και μίας ευαίσθητης, υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Παράλληλα, ελέγχθηκε το προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε δύο αναπτυξιακά στάδια για την ανάδειξη ενδεχόμενης επαγωγής έκφρασης που εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών.

Από τα πειραματικά αποτελέσματα προέκυψαν ισχυρές ενδείξεις για τη συσχέτιση ορισμένων γονιδίων με την έκφραση του γνωρίσματος της ανθεκτικότητας. Από τα γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας NAC, βρέθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου *nac127* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ανθεκτικών γονοτύπων τόσο κατά το νεαρό (V1) όσο και κατά το μεταγενέστερο (V6) στάδιο ανάπτυξης, ενώ το γονίδιο *nac 101* μπορεί να αποτελέσει δείκτη ανθεκτικότητας κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στις περισσότερες των περιπτώσεων επίσης, και τα άλλα *nac* γονίδια που εξετάστηκαν, παρουσίασαν σημαντική υπερέκφραση κάτω από συνθήκες υδατικής ανεπάρκειας σε ώριμο αναπτυξιακό στάδιο. Η μελέτη των υπολοίπων μεταγραφικών παραγόντων, ανέδειξε την έκφραση του γονιδίου *nyg3* ως υποψήφιο δείκτη για την ταυτοποίηση ανθεκτικών γονοτύπων και στα δύο αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν. Το προφίλ έκφρασης των γονιδίων *ereb* και *areb1* δύναται επίσης να διακρίνει την ανθεκτικότητα σε φυτά νεαρού αναπτυξιακού σταδίου ενώ αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου *hsfa1* μπορεί να αποτελέσει διαγνωστικό εργαλείο για την επιλογή φυτών στο V6 στάδιο.

Όσον αφορά στο προφίλ έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες απόκρισης στην υδατική ανεπάρκεια, τα γονίδια *defensin*, *gol* και *rip1b* βρέθηκαν να υποεκφραζονται στην ευαίσθητη και υπερεκφράζονται στην ανθεκτική ποικιλία κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο, υποδεικνύοντας τη ενδεχόμενη χρησιμότητά τους για επιλογές σε στάδιο αυτό. Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα της μεταγραφομικής ανάλυσης για το γονίδιο *p5cs* στην περίπτωση των φυτών V6 σταδίου. Το ίδιο μεταγραφικό προφίλ προέκυψε και από την ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *gst4*, γεγονός που υποδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης του ως ισχυρό υποψήφιο δείκτη επιλογής. Επικρατέστερη όλων των περιπτώσεων των γονιδίων που κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες προστασίας της σόγιας από την υδατική καταπόνηση που εξετάστηκαν, ήταν αυτή του γονιδίου *hsp70*. Η έκφραση του γονιδίου αυτού μπορεί να αξιοποιηθεί για την ταυτοποίηση ανθεκτικών γονοτύπων σόγιας και στα δύο υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια, με σαφέστατα μεγαλύτερη ευχέρεια διάκρισης των γονοτύπων κατά το αναπτυξιακό στάδιο V1.

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υπογραμμίζουν σαφώς τη δυνατότητα ταυτοποίησης και επιλογής ανθεκτικού στην ξηρασία γενετικού υλικού σόγιας, μέσω του μεταγραφικού προφίλ συγκεκριμένων γονιδίων-δεικτών. Αξιοσημείωτη είναι η δυνατότητα διάκρισης της ανθεκτικότητας από τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, γεγονός που καθιστά εφικτή την αναβάθμιση της αποτελεσματικότητας επιλογών κατά τα στάδια αυτά. Τα γονίδια που προτείνονται ως εν δυνάμει εργαλεία αξιοποίησής τους για την ανίχνευση ανθεκτικού γενετικού υλικού πρέπει να ελεγχθούν για την αξιοπιστία τους. Στο πλαίσιο αυτό, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή πρόσθετων πειραμάτων μεταγραφομικής καθώς και η συσχέτιση των αποτελεσμάτων τους με την αξιολόγηση του υπό μελέτη γενετικού υλικού, μέσω της εκατοστιαίας απώλειας της απόδοσης υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης σε πειράματα αγρού.

Abstract

Soybean is one of the most important legumes worldwide, with numerous uses in the food, feed and industry sector. The fact that soybean crops suffer from the lack of adequate soil moisture, justifies the need for breeding programs aiming at producing drought tolerant varieties. Understanding the molecular mechanisms that underlie the trait, is a prerequisite for the success in such an endeavor. To this purpose, the present study concentrated in analyzing the gene expression profile of transcription factors and other functional proteins associated with the trait of drought tolerance in soybean. A drought susceptible and a drought tolerant variety were studied for their response, at the transcriptome level, when subjected to drought stress. At the same time, gene expression profile was determined at two developmental stages in order to investigate a possible dependence of the induction of expression to the crop age.

The results provided strong indications that certain genes are associated to the drought tolerance phenotype. Among the genes encoding for the NAC family transcription factors, the *nac127* gene expression was found capable to identify drought tolerant genotypes both at a young (V1) and at a later (V6) growth stage, while that of the *nac 101* gene could serve as a drought tolerant marker at the V1 stage. In most cases also, the other NAC family genes were significantly over-expressed under drought at a mature stage. The rest of the transcription factors revealed the *nya3* gene as a candidate marker to select for tolerant genotypes at both developmental stages. The expression profile of the *ereb* and *areb1* genes also could be used to select tolerant plants early, whereas that of the *hsfa1* gene to select at the V6 stage.

As for the genes encoding for functional proteins in response to inadequate soil moisture, the *defensin*, *go* and *pip1b* genes were found under-expressed in the susceptible and over-expressed in the tolerant variety at the V1 stage, pointing to their usefulness for early selection. Transcription analysis for the *p5cs* gene in plants at the V6 stage gave analogous results. The same transcription profile was obtained by analysing the *gst4* gene, thus rendering it as a strong selection marker. Among all genes encoding functional proteins of interest, the expression profile of the *hsp70* gene proved very significant and could be employed for selection purposes at both developmental stages studied, although with a much higher discriminant power at the V1 stage.

In conclusion, the findings of this study strongly support the possibility to identify and select drought tolerant soybean germplasm by exploiting the transcription profile of certain genes as suitable markers. The possibility revealed for early selection, is of utmost importance for the efficiency of any relevant breeding task. Obviously however, further validation and correlation with yield data in the field is still a needed for an immediate application .

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Η ΣΟΓΙΑ-ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	10
1.2 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΟΓΙΑΣ.....	11
1.3 ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΣΟΓΙΑΣ.....	12
1.3.1 Αναπτυξιακά στάδια σόγιας.....	13
1.3.2 Εδαφοκλιματικές συνθήκες σόγιας	15
1.4 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΣΠΟΡΩΝ ΤΗΣ ΣΟΓΙΑΣ	16
1.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΟΓΙΑΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ	18
1.6 ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΙΣ	19
1.6.1 Στάδια απόκρισης του φυτού σε αβιοτικές καταπονήσεις.....	19
1.6.2 Μηχανισμοί αντοχής σε καταπονήσεις	20
1.7 ΥΔΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ.....	21
1.8 ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΥΔΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ.....	22
1.8.1 Μορφολογικές τροποποιήσεις.....	23
1.8.2 Φυσιολογικές τροποποιήσεις	24
1.8.3 Επίδραση υδατικής καταπόνησης στη γονιδιακή έκφραση.....	25
1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	32
2.1 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΔΑΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ.	34
2.1.1 Δράση του μακρομορίου πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG).....	35
2.2 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΔΑΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΟ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟ	36
2.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ.....	37
2.3.1 Απομόνωση ολικού RNA μέσω Trizol	37
2.3.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας του RNA	38
2.3.3 Καθαρισμός RNA με DNase.....	39
2.3.4 Καθαρισμός RNA με καθίζηση	40
2.3.5 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης	41
2.3.6 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	42
2.3.7 Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR	43
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
3.1 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΣΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟΥ.....	49
3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕΣΩ QRT-PCR	50
3.2.1 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου <i>nac092</i>	51
3.2.2 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου <i>nac20</i>	52
3.2.3 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου <i>nac101</i>	53
3.2.4 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου <i>nac038</i>	54
3.2.5 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου <i>nac085</i>	55

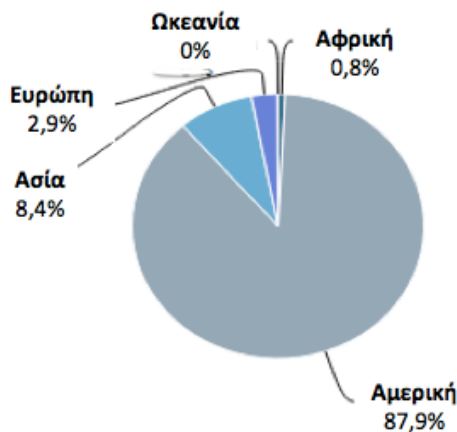
3.2.6 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου <i>pac127</i>	56
3.2.7 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου <i>pac11</i>	58
3.2.8 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου <i>gst10</i>	59
3.2.9 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου <i>gst2</i>	60
3.2.10 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου <i>gst4</i>	61
3.2.11 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>ereb</i>	62
3.2.12 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>zip1b</i>	63
3.2.13 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>gol</i>	64
3.2.14 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>dreb1a</i>	65
3.2.15 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>dreb1b</i>	66
3.2.16 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>hsfa1</i>	67
3.2.17 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>hsp70</i>	68
3.2.18 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>defensin</i>	69
3.2.19 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>rip1b</i>	71
3.2.20 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>nya3</i>	72
3.2.21 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>p5cs</i>	73
3.2.22 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>areb1</i>	74
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	76
4.1 ΓΕΝΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	77
4.2 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.....	77
4.3 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	81
4.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	84
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93

1. Εισαγωγή

1.1 Η Σόγια : Ιστορική αναδρομή

Η σόγια, με επιστημονική ονομασία *Glycine max*, αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα είδη ψυχανθών στον κόσμο. Προέρχεται από την Ανατολική Ασία, και σήμερα καλλιεργείται ευρέως σε Αμερική, Ασία και Ευρώπη. Η σημαντικότητα της έγκειται στο πλήθος εφαρμογών της, τεράστιας οικονομικής σημασίας, τόσο στη διατροφή ανθρώπων και ζώων, όσο και σε πολλούς τομείς της βιομηχανίας. Η βιομηχανοποίηση και η επεξεργασία του σπόρου της σόγιας, οφείλεται στην πλούσια σύστασή του σε έλαια και πρωτεΐνες και παρά το γεγονός της διπλάσιας συγκέντρωσής του σε πρωτεΐνη (40%) σε σχέση με τα έλαια (20%), ανήκει στη κατηγορία των ελαιούχων καρπών και όχι των οσπρίων (σύμφωνα με το Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας-FAO).

Οι πρώτες αναφορές καλλιεργητικής δραστηριότητας σόγιας, καταγράφονται στην Κίνα 9 χιλιάδες χρόνια πριν, αργότερα εισήχθη στην Ιαπωνία, περίπου 5-7 χιλιάδες πριν, και μετέπειτα, 3 χιλιάδες χρόνια πριν, καλλιεργούμενες ποικιλίες αναφέρονται στην Κορέα (Shurtleff *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015). Η σόγια, ως καλλιεργούμενο προϊόν, αποτελεί μέχρι και σήμερα, ένα αναπόσπαστο κομμάτι της παραδοσιακής λαϊκής διατροφής στην Ανατολική και Νοτιοανατολική Ασία. Στη Β. Αμερική πρωτοεισήχθη το 1765 και η χρήση της περιοριζόταν στη ζωϊκή διατροφή. Από το 1930 και έπειτα, άρχισαν να κυκλοφορούν και άλλα προϊόντα σόγιας με κατεύθυνση την διατροφή του ανθρώπου αλλά και τη βιομηχανία υφασμάτων και παραγωγής πλαστικού (Joe Schwarzc *et al.*, 2004). Στη Ν. Αμερική, στην Αργεντική, οι πρώτες αναφορές καλλιεργειών σόγιας γίνονται το 1882 (Shurtleff *et al.*, 2012). Στην Ευρώπη, από το 1600 στην Ισπανία και στην Πορτογαλία υπάρχουν ιστορικά δεδομένα που αναφέρουν τη χρήση προϊόντων σόγιας. Ωστόσο, οι πρώτες καλλιέργειες σόγιας χρονολογούνται το 1740 στη Γαλλία, ενώ το 1861 και αργότερα 1876 υπάρχει καταγεγραμμένη καλλιεργητική δραστηριότητα σόγιας στην Ελβετία και στην Αυστρία αντίστοιχα (Shurtleff *et al.*, 2015). Στην Ελλάδα, η σόγια πρωτοεισήχθη το 1935.



Διάγραμμα 1.1: Παγκόσμια κατανομή παραγωγής σόγιας (FAOSTAT 2014)

Σήμερα, βάσει των δεδομένων του FAOSTAT 2014, οι μεγαλύτεροι παραγωγοί σόγιας αποτελούν κατά φθίνουσα σειρά, η Αμερική, η Βραζιλία, η Αργεντινή, η Κίνα και η Ινδία, με το 87,9% της παγκόσμιας παραγωγής σόγιας να γίνεται στο σύνολο της Αμερικής, το 8,4% στην Ασία, το 2,9% στην Ευρώπη και το 0,8% στην Αφρική (βλ. διάγραμμα 1.1). Στην Ελλάδα, η σόγια καλλιεργείται σε μικρή έκταση και τα προϊόντα της αξιοποιούνται για παραγωγή βιοντίζελ και ζωοτροφή. Η εκτίμηση είναι ότι θα υπάρξει στο άμεσο μέλλον ενδιαφέρον για παραγωγή μη-γενετικά τροποποιημένων ποικιλιών τόσο για ζωοτροφές όσο και για ανθρώπινη κατανάλωση.

1.2 Βοτανικά χαρακτηριστικά σόγιας

Η σόγια αποτελεί ετήσιο ποώδες φυτό των θερμών κλιμάτων, με όρθια ανάπτυξη. Το ριζικό της σύστημα είναι εκτεταμένο και αποτελείται από μία πασσαλώδη ρίζα που μπορεί να φθάσει σε βάθος 1,5m και από πολλές πλάγιες διακλαδώσεις, ο κύριος όγκος των οποίων βρίσκεται στα πρώτα 25-30cm του εδάφους. Στις ρίζες, παρουσία του κατάλληλου ριζοβίου, σχηματίζονται φυμάτια τα οποία είναι μικρά, σφαιρικά ή περιστασιακά λοβωτά. Όταν γίνεται εμβολιασμός σε έδαφος που δεν υπάρχουν τα κατάλληλα ριζόβια, τα φυμάτια εμφανίζονται 7-10 ημέρες μετά τη σπορά. Αρχικά τα φυμάτια σχηματίζονται σε μεγάλη πυκνότητα στο επάνω μέρος της πασσαλώδους ρίζας και αυτά υποστηρίζουν με άζωτο το φυτό κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια. Τα φυμάτια των πλάγιων ριζών αποκτούν μεγαλύτερη σημασία κατά την άνθηση και το σχηματισμό των σπόρων.

Ο κύριος βλαστός είναι κυλινδρικός, με ύψος συνήθως γύρω στα 75cm, μπορεί όμως να φτάσει και τα 150cm, συχνά χνουδωτός και το χρώμα του είναι χαρακτηριστικό της ποικιλίας. Οι κατώτεροι κόμβοι με την πάροδο του χρόνου γίνονται ξυλώδεις. Ο κύριος βλαστός διακλαδίζεται άφθονα από τους κατώτερους κόμβους, αν και οι νέες ποικιλίες έχουν λιγότερες από έξι πλάγιες διακλαδώσεις. Οι κόμβοι του κυρίως βλαστού και των διακλαδώσεων που σχηματίζονται ταυτόχρονα, ανθίζουν και ταυτόχρονα και έχουν και παρόμοιο αριθμό ανθέων και λοβών. Πολλές φορές οι πλάγιοι βλαστοί, εξαιτίας του βάρους των λοβών, πλαγιαίνουν ή και σπάζουν κι έτσι μειώνεται η απόδοση.



Εικόνα 1.1: Αριστερά: Φύλλα και λοβοί σόγιας, δεξιά: Λοβός σόγιας με σπέρματα

Τα πρώτα πραγματικά φύλλα της σόγιας είναι απλά και εκφύονται αντίθετα. Τα υπόλοιπα είναι σύνθετα, κατ' εναλλαγή με τρία ωσειδή φυλλάρια, χνουδωτά και φέρουν παράφυλλα (βλ. εικόνα 1.1). Ο μίσχος του φύλλου είναι μακρύς και τριχωτός. Το χρώμα των φύλλων είναι συνήθως σκούρο πράσινο αλλά και ανοιχτό πράσινο, ανάλογα με την περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη. Με την ξήρανση των λοβών, συνήθως τα φύλλα παίρνουν κίτρινο χρώμα και πέφτουν, αξιόλογο χαρακτηριστικό που διευκολύνει τη συγκομιδή. Τα άνθη εκφύονται σε ταξιανθίες, από τη μασχάλη των φύλλων. Κάθε ταξιανθία μπορεί να φέρει μέχρι και 20 μικρά άνθη χρώματος λευκού ή μωβ. Κάθε άνθος έχει 3-4 ωάρια.

Ο αριθμός των ανθέων σε κάθε μασχάλη επηρεάζεται από τη θέση της επάνω στο φυτό και από διάφορους κλιματολογικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η υγρασία. Μόνο το 20-40% των ανθέων δίνει λοβούς. Τα άνθη της σόγιας έχουν μήκος μόλις 6-7 χιλιοστόμετρα και είναι τέλεια, με αποτέλεσμα η γύρη που σχηματίζεται στο άνθος να γονιμοποιεί το ωάριο του ίδιου άνθους. Συνήθως το 75% των ανθέων της σόγιας πέφτουν στο έδαφος με αποτέλεσμα η διατήρηση της ανθοφορίας να αποτελεί ένα σημαντικό στόχο για τους καλλιεργητές. Η καλή θρέψη και οι διατήρηση των ιδανικών συνθηκών καλλιέργειας αποτελούν μια αρκετά καλή πρακτική για την διατήρηση των ανθέων πάνω στο φυτό. Οι πρώτοι λοβοί αρχίζουν να εμφανίζονται 10-14 μέρες μετά την εμφάνιση του πρώτου άνθους οι οποίοι θα είναι ώριμοι 3 εβδομάδες περίπου αργότερα.

Ο καρπός είναι λοβός μήκους 2-10cm, με σχήμα επίμηκες ή ελαφρά δρεπανοειδές, τριχωτός, με χρώμα κατά την ωρίμανση συνήθως καφέ ή μαύρο αλλά και πράσινο, ή ελαφρώς κοκκινωπό. Κάθε λοβός περιέχει τρεις και περιστασιακά περισσότερους σπόρους. Ο αριθμός των λοβών ανά φυτό κυμαίνεται ευρύτατα από 50 έως 500 ή και περισσότερο. Οι σπόροι είναι σκληροί και διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα. Το σχήμα είναι συνήθως σφαιρικό αλλά και ελαφρώς ωσειδές, πεπλατυσμένο ή όχι, με διάμετρο 5-10mm. Το περισπέρμιο είναι λείο και γυαλιστερό με έναν μικρό ευδιάκριτο οφθαλμό και έχει χρώμα κίτρινο, πράσινο, καφέ, κόκκινο, μαύρο, ελαφρώς κηλιδωμένο ή δίχρωμο, ανάλογα με την ποικιλία. Το βάρος 1000 σπόρων κυμαίνεται από 50 έως 400g (Παπακώστα, 2012).

1.3 Αύξηση και ανάπτυξη της σόγιας

Διακρίνονται τέσσερα στάδια ανάπτυξης του ριζικού συστήματος της σόγιας σε συνθήκες αγρού:

- (i) ταχεία ανάπτυξη της ρίζας κατακόρυφα, κάτω απ' τη γραμμή των φυτών, κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης,
- (ii) διακλάδωση των ριζών στα πρώτα στάδια της αναπαραγωγικής ανάπτυξης,
- (iii) μειωμένη ανάπτυξη των ριζών κάτω από τις γραμμές σποράς και αυξημένη ανάπτυξη ριζών μεταξύ των γραμμών σποράς κατά το σχηματισμό των λοβών
- (iv) παύση ανάπτυξης της ρίζας και μείωση της μάζας των ριζών λόγω αποσύνθεσης κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ωρίμανσης.

Άριστη θερμοκρασία για γρήγορη αρχική ανάπτυξη της ρίζας θεωρούνται οι 27-32°C.

Στη σόγια παρατηρούνται δύο κύριοι τρόποι ανάπτυξης του υπέργειου τμήματος: καθορισμένο και ακαθόριστο. Στις ποικιλίες καθορισμένης ανάπτυξης, η βλαστική ανάπτυξη του κύριου βλαστού έχει ολοκληρωθεί κατά την έναρξη της άνθησης ή λίγο αργότερα, ενώ στις ακαθόριστης ανάπτυξης ποικιλίες, η βλαστική ανάπτυξη συνεχίζεται και μετά την άνθηση, δηλαδή παρατηρείται ταυτόχρονα βλαστική και αναπαραγωγική ανάπτυξη.

Η έναρξη της άνθησης καθορίζεται από το γονότυπο, επηρεάζεται από τις κλιματολογικές συνθήκες, κυρίως από τη φωτοπερίοδο, και γίνεται ορατή 25-50ημ. από τη σπορά. Η άνθηση και ο σχηματισμός λοβών διαρκούν περίπου 20-30ημ. Συνήθως, το διάστημα από τη στιγμή εμφάνισης του σπορόφυτου στην επιφάνεια του εδάφους μέχρι την εμφάνιση του πρώτου άνθους κυμαίνεται περί τις έξι με οχτώ εβδομάδες (εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του γονότυπου). Το μέγεθος των φυτών καθώς και ο αριθμός ανθέων εξαρτώνται κατά πολύ από τις συνθήκες που επικρατούν κατά την καλλιεργητική περίοδο.

Η σόγια είναι φωτοπεριοδικά ευαίσθητο φυτό, που σημαίνει ότι για την μετάβαση από το βλαστικό στο ανθικό στάδιο απαιτούνται συγκεκριμένες συνθήκες φωτοημέρας και πιο συγκεκριμένα, ορισμένες ώρες σκοταδιού κατά τη διάρκεια του εικοσιτετραώρου. Οι περισσότερες ποικιλίες αρχίζουν να ανθίζουν αμέσως μόλις το μήκος της ημέρας αρχίζει να μικραίνει, ανήκουν δηλαδή στα μικροήμερα φυτά. Το μήκος του φυτού κατά το οποίο θα αρχίσει να ανθίζει εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος.

Η αύξηση του μήκους των φυτών μετά την μετάβαση στο ανθικό στάδιο εξαρτάται όχι μόνο από τις συνθήκες του περιβάλλοντος αλλά και από τις καλλιεργητικές τεχνικές και την ποικιλία. Στις ακαθόριστης ανάπτυξης ποικιλίες, η αύξηση συνεχίζεται μετά την άνθηση και φτάνει 2 με 4 φορές το ύψος του φυτού μέχρι τότε. Στις καθορισμένης ανάπτυξης ποικιλίες, η αύξηση μετά την άνθηση είναι περιορισμένη.

1.3.1 Αναπτυξιακά στάδια σόγιας

Ο βιολογικός κύκλος του φυτού διαιρείται σε 3 βασικά στάδια: (i) Στάδιο βλάστησης και φυτρώματος του σπόρου, (ii) Βλαστικό στάδιο και (iii) Αναπαραγωγικό στάδιο που περιλαμβάνει την καταβολή των ανθέων, την άνθηση, τη γονιμοποίηση και το στάδιο ωρίμασης των καρπών και των σπόρων. Το στάδιο ωρίμασης καταλήγει στο γήρας και στον θάνατο του φυτού. Σε πολλά φυτά τα στάδια αυτά δεν ξεχωρίζουν μεταξύ τους χρονικά.

Τα αναπτυξιακά στάδια της σόγιας έχουν προσδιοριστεί με ακρίβεια. Το βλαστικό στάδιο (V) στη σόγια αριθμείται σύμφωνα με τον αριθμό των πλήρως ανεπτυγμένων τρίφυλλων. Το αναπαραγωγικό στάδιο (R) αρχίζει κατά την ανθοφορία και συνεχίζει με τη καρποφορία φυτών και την ωρίμανση. Ένα νέο στάδιο ανάπτυξης καθορίζεται όταν τουλάχιστον το 50% των φυτών πληρούν τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης που έχουν οριστεί. Στην εικόνα 1.2 φαίνονται σχηματικά στα στάδια ανάπτυξης της σόγιας και περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω όπως αναφέρονται από τον αγρονόμο Seth Naevie του πανεπιστημίου της Μινεσότα.

Στάδιο ανάδυσης (VE) προς στάδιο Πρώτης Τριφυλλίας (V1):

Το στάδιο ανάπτυξης (VE) αφορά στη φάση ανάπτυξης των κοτυληδόνων από το έδαφος. Όταν οι κοτυληδόνες αναδυθούν πλήρως, ξεκινά ο σχηματισμός των πρώτων πραγματικών φύλλων. Όταν τα πρώτα φύλλα επεκταθούν πλήρως, τότε ολοκληρώνεται το στάδιο των κοτυληδόνων (VC). Η πρώτη τριπλέτα φύλλων αρχίζει να ξεδιπλώνει κατά το στάδιο V1.

Βλαστικό στάδιο 1 (V1) προς βλαστικό στάδιο n (Vn):

Κάθε επιπλέον τριπλέτα φύλλων που αναδύεται από τον κύριο μίσχο, θεσπίζεται ένα νέο στάδιο V. Κατά τη διάρκεια του πλήρους ξεδιπλώματος της τρίφυλλης δομής αρχίζει να αναπτύσσεται και η δεύτερη τριπλέτα, η ολοκλήρωση της οποίας σηματοδοτεί την έναρξη του V2 σταδίου. Με την ίδια λογική ακολουθούν τα V3, V4, V5, Vn αναπτυξιακά στάδια. Ο αριθμός των αναπτυσσόμενων φύλλων εξαρτάται από την ποικιλία και από περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Αναπαραγωγικό στάδιο έναρξης της άνθισης R1 (V7-V10) προς στάδιο πλήρους άνθισης R2 (V8 - V12):

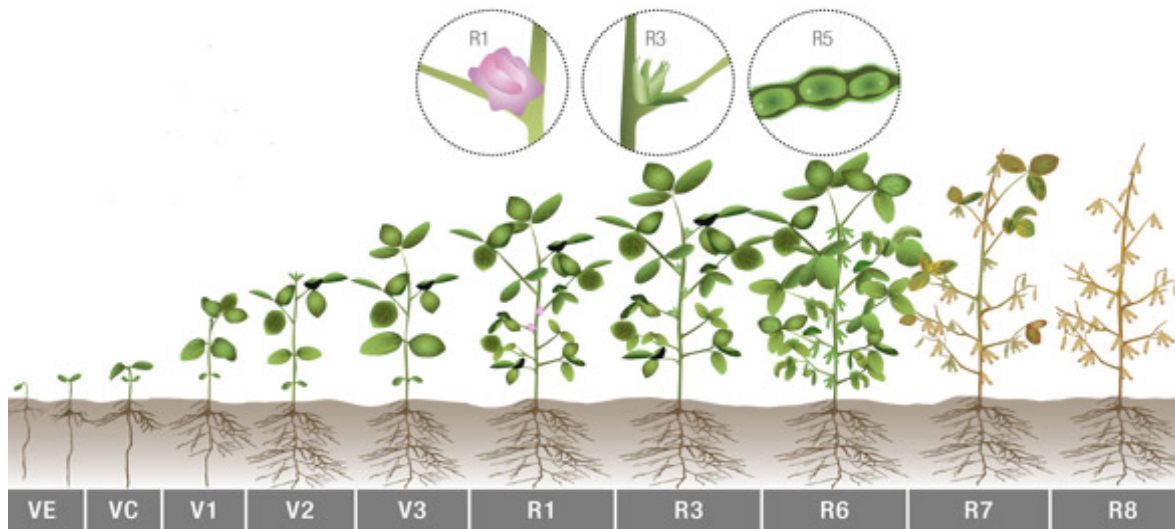
Τα φυτά έχουν τουλάχιστον ένα άνθος σε κάθε κόμβο-μασχάλη του κυρίου στελέχους. Η ανθοφορία ξεκινά από τον τρίτο έως τον έκτο κόμβο, συνεχίζει πάνω και κάτω επί του κυρίου μίσχου, και τελικά επεκτείνεται προς τα κλαδιά. Μόλις εμφανιστεί άνθος σε έναν από τους δύο πρώτους κόμβους του κυρίως στελέχους, το φυτό βρίσκεται στο στάδιο R2. Στο στάδιο αυτό, το φυτό έχει περίπου 25% του συνολικού ξηρού βάρους και περίπου 50% του ώριμου ύψους του.

Στάδιο έναρξης σχηματισμού λοβών (R3) (V11-V17) προς στάδιο πλήρους σχηματισμού λοβών (R4) (V13 - V20):

Κατά το στάδιο αυτό εμφανίζονται οι πρώτοι λοβοί. Το στάδιο R3, σηματοδοτείται όταν μεταξύ των ανώτερων τεσσάρων κόμβων σχηματιστεί λοβός μήκους 3/16 ιντσών. Ακολουθώντας, κατά το στάδιο R4, οι λοβοί αυξάνονται με γοργούς ρυθμούς και ξεκινά το γέμισμα των σπόρων. Αβιοτικό στρες κατά τη διάρκεια αυτών των δύο αναπτυξιακών σταδίων μπορεί να προκαλέσει τη σοβαρότερη μείωση της απόδοσης σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο στάδιο της ανάπτυξης. Άρδευση στη φάση αυτή βοηθά στη μείωση των πιθανοτήτων μειωμένης απόδοσης. Ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερους αριθμούς λοβών.

Στάδιο έναρξης σχηματισμού σπόρων (R5) (V15 - V23) προς στάδιο πλήρους σχηματισμού σπόρων (R6) (V16 - V25):

Κατά το R5 στάδιο υπάρχει τουλάχιστον ένας σπόρος ανά λοβό. Τα φυτά έχουν επιτύχει το μέγιστο ύψος, αριθμό κόμβων, και φυλλικής επιφάνειας. Όταν η πλήρωση των λοβών ολοκληρωθεί και δοθεί η εικόνα του "πράσινου φασολιού" σηματοδοτείται η έναρξη του σταδίου πλήρους σχηματισμού σπόρων R6. Στο στάδιο αυτό τα φύλλα αρχίζουν να κιτρινίζουν.



Εικόνα 1.2 : Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων ανάπτυξης της σόγιας. Ως V-στάδια ορίζονται τα βλαστικά αναπτυξιακά στάδια και ως R τα αναπαραγωγικά. Πηγή: Πανεπιστήμιο του Ιλινόις 1999

Στάδιο έναρξης ωρίμανσης (R7) προς στάδιο πλήρους ωρίμανσης (R8):

Το στάδιο R7, ξεκινά όταν ένας λοβός του κύριου μίσχου αποκτά καφέ ώριμο χρώμα, οπότε αρχίζει και η ξήρανση των σπόρων. Σπόροι και λοβοί χάνουν το πράσινο χρώμα. Όταν το 95% των λοβών έχουν φθάσει στο ώριμο χρώμα τους, η σόγια θεωρείται ότι βρίσκεται στο στάδιο πλήρους ωρίμανσης R8. Συνήθως, απαιτούνται 5-10 ημέρες μετά το R8 στάδιο ώστε να φτάσει σε υγρασία συγκομιδής, λιγότερο από 15%.

1.3.2 Εδαφοκλιματικές συνθήκες σόγιας

Η σόγια είναι φυτό των θερμών-εύκρατων κλιμάτων, βραχείας φωτοπεριόδου. Με την εντατική βελτιωτική προσπάθεια όμως δημιουργήθηκαν ποικιλίες οι οποίες μπορούν να καλλιεργηθούν σε υψόμετρο από 0 έως 3000m και διάρκεια ημέρας από 12 έως 16 ώρες. Η μεγαλύτερη όμως εμπορική καλλιέργεια της σόγιας γίνεται μεταξύ 25 και 45°C με γεωγραφικό πλάτος και υψόμετρο μικρότερο από 1000m. Ελάχιστη θερμοκρασία για ικανοποιητικό φύτεμα είναι οι 10-15°C, ανάλογα με την ποικιλία, αν και μπορεί να βλαστήσει και σε κάπως χαμηλότερη θερμοκρασία. Χαμηλές νυχτερινές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του φυτρώματος και λίγο αργότερα, καθυστερούν την ανάπτυξη των φυτών και μπορεί να επιταχύνουν την άνθηση. Ο παγετός καταστρέφει τα φυτά σε όλα τα στάδια ανάπτυξης. Καλύτερη μέση θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 28-30°C. Τόσο οι υψηλές όσο και οι χαμηλές θερμοκρασίες κατά την αναπαραγωγική περίοδο, είναι επιζήμιες. Θερμοκρασίες μικρότερες από 24°C καθυστερούν την άνθηση και μεγάλες περιοδοί συννεφιάς επιμηκύνουν τη βλαστική περίοδο σε βάρος της απόδοσης σε καρπό. Σε θερμοκρασίες δε μικρότερες από 15°C, σχηματίζονται λοβοί απόρριψης των ανθέων και κακής γονιμοποίησης. Σε υψηλές

θερμοκρασίες, παρατηρείται απόρριψη ανθέων και λοβών και το φαινόμενο είναι εντονότερο όταν οι υψηλές θερμοκρασίες συνδυάζονται με ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας.

Σε θερμοκρασία αέρα 21-32°C, το φύτευμα συντελείται σε 3-5 ημέρες. Στην Ελλάδα, τέτοιες θερμοκρασίες παρατηρούνται συνήθως την περίοδο μετά το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Απριλίου μέχρι τα μέσα Μαΐου (συνιστώμενη περίοδος ανοιξιιάτικης σποράς). Η σπορά όμως μπορεί να πραγματοποιηθεί και μετά τη συγκομιδή της κύριας χειμερινής καλλιέργειας (επίσπορη καλλιέργεια).

Τα φυτά ορισμένων ποικιλιών σόγιας είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη φωτοπερίοδο και στην ένταση του φωτισμού. Ανάλογα με τις απαιτήσεις σε φως, διακρίνονται ποικιλίες βραχείας και ουδέτερης φωτοπεριόδου. Οι απαιτήσεις του φυτού σε νερό κυμαίνονται από 500 έως 1000mm (βροχόπτωση και άρδευση) και εξαρτώνται από το είδος του εδάφους, τις κλιματικές συνθήκες, τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου και το επίπεδο απόδοσης της καλλιεργούμενης ποικιλίας. Η σόγια κατατάσσεται στα ευαίσθητα στην ξηρασία φυτά. Οι ανάγκες της σε νερό είναι μικρές κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης και την ωρίμανση και αυξημένες κατά τη διάρκεια της άνθησης και του γεμίσματος των σπόρων. Επιβλαβή επίδραση στην ανάπτυξη και απόδοση της σόγιας έχει και η κατάκλυση του εδάφους με νερό. Αναφορικά με τη σύσταση του εδάφους, η σόγια δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις, αρκεί να εξασφαλίζεται καλή στράγγιση. Οι υψηλότερες αποδόσεις λαμβάνονται στα πηλώδη γόνιμα εδάφη. Στα αμμώδη εδάφη, οι αποδόσεις δεν είναι σταθερές, ενώ στα αργιλώδη δυσκολεύεται το φύτευμα. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε εδάφη με pH=5,8-7,0, το άριστο pH όμως κυμαίνεται περί το 6-6,5. Στα όξινα εδάφη, μειώνεται η δραστηριότητα των αζωτοδεσμευτικών βακτηριών και η διαθεσιμότητα σε Mg και Ca. Εδάφη με χαμηλή περιεκτικότητα βορίου επηρεάζουν αρνητικά την απόδοση, καθώς η σόγια είναι ευαίσθητη στο στοιχείο αυτό. Τέλος, η σόγια κατατάσσεται στα φυτά με μέτρια ανοχή στην αλατότητα του εδάφους.

1.4 Βιοχημική σύσταση των σπόρων της σόγιας

Ο σπόρος της σόγιας αποτελείται από τρία μέρη: Το φλοιό ή περίβλημα του σπόρου, τις κοτυλιδόνες και τον άξονα του εμβρύου (επικοτύλιο + υποκοτύλιο + ριζίδιο). Ο φλοιός αποτελεί το 8-10% του βάρους του, οι κοτυλιδόνες το 88-91% και ο άξονας του εμβρύου το 2% περίπου (επί ξηρού βάρους). Ο σπόρος είναι πλούσιος σε πρωτεΐνες και σε έλαια. Τα δύο αυτά συστατικά αποτελούν το 60% περίπου του βάρους του σπόρου και βρίσκονται κυρίως στις κοτυλιδόνες (Dixit *et al.*, 2011). Η σύσταση ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία και τις συνθήκες του περιβάλλοντος όπου αναπτύσσονται τα φυτά. Γενικά, όσο μικρότερη είναι η περιεκτικότητά τους σε λάδι τόσο μεγαλύτερη είναι σε πρωτεΐνες και αντίθετα. Παρακάτω αναφέρονται τα σημαντικότερα αξιοποιήσιμα συστατικά της σόγιας.

Πρωτεΐνες

Το 35-40% του ξηρού βάρους των σπόρων της σόγιας αποτελείται από πρωτεΐνη, των οποίων, το 90% αποτελείται από δύο σφαιρίνες, την 11S γλυκινίνη και την 7S β-κονγλυκινίνη (Sugano *et*

al., 2006; Saio *et al.*, 1986). Αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για την ανθρώπινη διατροφή και καθιστούν τα προϊόντα σόγιας σχεδόν ισοδύναμα με ζωϊκές πηγές πρωτεΐνης σε ποιότητα, αλλά με λιγότερα κορεσμένα λίπη και χοληστερόλη. Επιπλέον αναλύσεις στη σύσταση των σπόρων, έχουν δείξει την πλούσια περιεκτικότητά τους στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα αιμοσυγκολλητίνης, αναστολές τρυψίνης, α-αμυλάσης και λιποξυγενασών (Sugano *et al.*, 2006), που αποτελούν σημαντικές πρωτεΐνες για τον άνθρωπο.

Έλαια

Περίπου 19% της σύστασης των σπόρων της σόγιας αποτελείται από έλαια, από τα οποία τα τριγλυκερίδια είναι το κύριο συστατικό. Το σογιέλαιο χαρακτηρίζεται από σχετικά μεγάλες ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (polyunsaturated fatty acids-PUFA), δηλαδή, 55% λινολεϊκό οξύ και 8% α-λινολενικό οξύ, του συνόλου των λιπαρών οξέων. Το λινολεϊκό οξύ αποτελεί ένα απαραίτητο λιπαρό οξύ (essential fatty acid-EFA) που ανήκει στην οικογένεια των ω-6 PUFAs, το οποίο κατέχει σημαντική διατροφική αξία. Το α-λινολενικό οξύ ανήκει επίσης στη κατηγορία των απαραίτητων 3-ω λιπαρών οξέων και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών μεταβολικών οδών. Ωστόσο, λόγω της παρουσίας λιποξυγενασών στη σόγια, το λινολεϊκό οξύ καθιστά το σογιέλαιο επιρρεπές σε φαινόμενα τάγγισης. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις υπάρχουν φωσφολιπίδια (λεκιθίνη), καθώς και φυτοστερόλες και τοκοφερόλες (Dixit *et al.*, 2011).

Άλλα στοιχεία

❖ Υδατάνθρακες

Η σόγια περιέχει περίπου 35% υδατάνθρακες, οι περισσότεροι εκ των οποίων είναι μη αμυλούχοι πολυσακχαρίτες. Σε μικρότερα ποσοστά περιέχει ολιγοσακχαρίτες όπως σταχυόζη(4%) και ραφινόζη (1,1%) (Grieshop *et al.*, 2003).

❖ Βιταμίνες και μέταλλα

Η σόγια αποτελεί μία από τις καλύτερες πηγές Β-βιταμινών (Liu *et al.*, 1997), αν και στερείται βιταμίνης Β12 και βιταμίνης C. Το σογιέλαιο περιέχει επίσης τοκοφερόλες (Liu *et al.*, 1997, Sugano *et al.* 2006), τα οποία είναι εξαιρετικά φυσικά αντιοξειδωτικά. Επιπλέον περιέχει 5% μέταλλα (Sugano *et al.*, 2006) και είναι πλούσια σε K, P, Ca, Mg, και Fe.

❖ Ισοφλαβόνες

Οι ισοφλαβόνες είναι μια υπο-ομάδα των ετεροκυκλικών φυτικών φαινολικών ενώσεων που ανήκουν στη κατηγορία των κατηγορία φλαβονοειδών που αποτελούν φυτοιστρογόνα. Η σόγια είναι η πιο άφθονη πηγή (Kudou *et al.*, 1991) ισοφλαβόνων (έως 3 mg/g ξηρού βάρους) στη φύση. Περιέχει τρεις τύπους ισοφλαβόνων τη γενιστεΐνη, νατνζείνη και γλυκίτεϊνη.

❖ Φυτοστερόλες

Το σογιέλαιο περιέχει περίπου 300-400mg/100g φυτικών στερολών. Τα κύρια συστατικά των στερολών σόγιας είναι β-σιτοστερόλη (53 έως 56%), καμπεστερόλη (20 σε 23%) και

στιγμαστερόλη (17 έως 21%) (Ozava *et al.*, 2001). Αυτές οι φυτοστερόλες διαφέρουν από τη χοληστερόλη στη δομή των πλευρικών αλυσίδων τους. Έχει αποδειχθεί ότι έχουν δραστηριότητα μείωσης της χοληστερόλης, αν και ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός (Paraga *et al.*, 2011).

❖ Φωσφολιπίδια

Το σογιέλαιο περιέχει 1-3% φωσφολιπίδια (Liu *et al.*, 1997; Sugano *et al.*, 2006), εκ των οποίων 35% φωσφατιδυλοχολίνη, 25% φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, 15% φωσφατιδυλο ινοσιτόλη, 5-10% φωσφατιδικό οξύ.

❖ Φερριτίνες

Η σόγια περιέχει φερριτίνη, μία πρωτεΐνη αποθήκευσης σιδήρου (Lonnerdal *et al.*, 2009), η οποία είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι ο σίδηρος απορροφάται από τη φερριτίνη σόγιας όσο και από τη ζωικής προέλευσης φερριτίνη.

1.5 Εφαρμογές σόγιας στη βιομηχανία

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται συνεχής αύξηση της παραγόμενης ποσότητας σόγιας με τη μεγάλη ζήτησή της να οφείλεται στα δύο κύρια προϊόντα της, την πρωτεΐνη και τα έλαια, που χρησιμοποιούνται με διάφορους τρόπους για τη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων καθώς και σε άλλους τομείς στη βιομηχανία. Περίπου το 85% των καλλιεργειών σόγιας στον κόσμο μεταποιείται σε σογιάλευρο και σογιέλαιο, ενώ το υπόλοιπο επεξεργάζεται με άλλους τρόπους ή χρησιμοποιείται για τροφή ως έχει. Η χρήση της σόγιας εξαρτάται από την ποικιλία. Η σόγια που δεν προορίζεται για την αξιοποίηση του ελαίου της, έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, και χαμηλότερη σε λιπαρά οξέα, ενώ το αντίθετο ισχύει στις περιπτώσεις που η παραγωγή προορίζεται για την χρήση των ελαίων.

Όσον αφορά το σογιέλαιο, οι εφαρμογές του δεν περιορίζονται μόνο στη χρήση του ως μαγειρικό λάδι. Μία ταχάιως αναπτυσσόμενη αγορά αφορά στην παραγωγή φαρμακευτικών ενώσεων όπως η βιταμίνη E και άλλων αντιοξειδωτικών ενώσεων παραγόμενων από το σογιέλαιο. Σημαντική η παρουσία του λαδιού σόγιας στις βιομηχανίες βερνικιών, βαφών και χρωμάτων καθώς λειτουργεί ως βάση των παραγόμενων μιγμάτων. Πολλά σαπούνια, λιπαντικά και στεγανωτικά υλικά περιέχουν επίσης έλαιο σόγιας. Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές των ελαίων της σόγιας αποτελεί η χρήση τους ως υποκατάστατο των καυσίμων πετρελαίου (βιοντίζελ).

Το σογιάλευρο λόγω της πλούσιας σύστασής του σε πρωτεΐνη, αποτελεί σημαντικής διατροφικής αξίας προϊόν που παρέχει πλήθος σκευασμάτων τροφής, με σκοπό τόσο την κατανάλωσή του από ζώα όσο και από τον άνθρωπο. Επιπλέον, οι παραγόμενες από τη σόγια πρωτεΐνες έχουν πρόσθετες εφαρμογές λόγω των πολλών λειτουργικών ιδιοτήτων τους όπως της γαλακτοποίησης, ζελατινοποίησης και ικανότητας συγκράτησης νερού. Συγκεκριμένα, εφαρμογές των πρωτεϊνών σόγιας περιλαμβάνουν η χρήση τους σε συγκολλητικά, σε ασφάλτους, σε υλικά καθαρισμού, σε καλλυντικά, μελάνια, χρώματα, επιχρίσματα χάρτου, σε φυτοφάρμακα/μυκητοκτόνα, σε πλαστικές ύλες, πολυεστέρες και υφαντικές ίνες.

1.6 Αβιοτικές καταπονήσεις

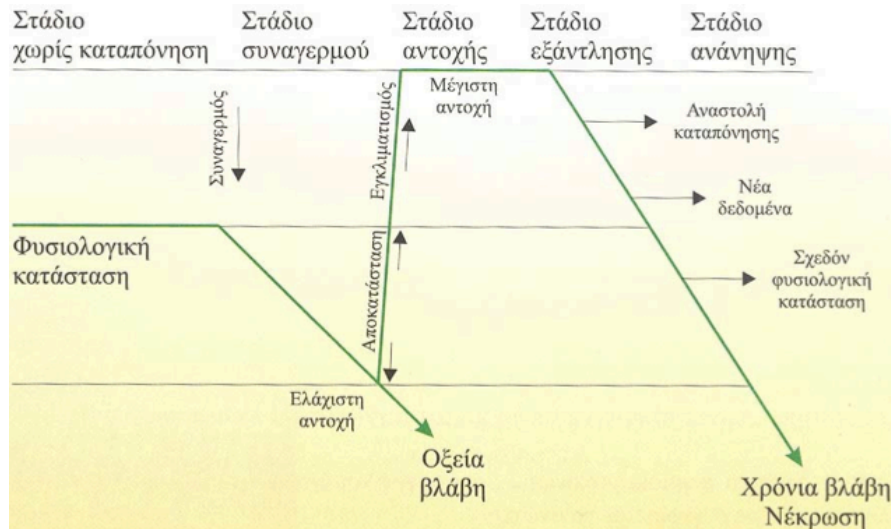
Οι περιβαλλοντικές συνθήκες που μπορούν να καταπονήσουν τα φυτά είναι η υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία, η περίσσεια ή έλλειψη νερού, η ύπαρξη ή μη αλάτων, ιόντων, βαρέων μετάλλων, αέριων ρύπων και βιοκτόνων (χημικές), η συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (οξειδωτικές), η επίδραση ανέμου, βαρύτητας, ήχου, μαγνητικών πεδίων, συμπίεσης (μηχανικές) και τέλος η έκθεση σε υπέρυθρη, ορατή, υπεριώδη και ιοντίζουσα ακτινοβολία. Οι σημαντικότερες αβιοτικές καταπονήσεις, βάσει των αλλαγών που προκαλούν στις μοριακές, βιοχημικές, φυσιολογικές και μορφολογικές αντιδράσεις των φυτών είναι: η οξειδωτική καταπόνηση, η έλλειψη νερού που μπορεί να προκληθεί από ξηρασία, αλατότητα, υψηλή θερμοκρασία και παγετό, η περίσσεια νερού που μπορεί να προκαλέσει ανοξία ή υποξία και η παρουσία βαρέων μετάλλων. Οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις δημιούργησαν συνθήκες ισχυρής επιλεκτικής πίεσης που συντέλεσαν στην προσαρμογή και την επιβίωση των φυτών στις δυσμενείς συνθήκες. Η προσαρμογή των φυτών στις διάφορες καταπονήσεις υποδηλώνει ότι οι φυτικοί οργανισμοί είναι ικανοί να προσλαμβάνουν και να μεταφέρουν τα περιβαλλοντικά σήματα, και στη συνέχεια να μεταβάλλονται οι ίδιοι προκειμένου να μπορέσουν να προσαρμοστούν. Αυτές οι μεταβολές ενδέχεται να είναι παροδικές ή μόνιμες και να κληρονομούνται στις επόμενες γενεές.

1.6.1 Στάδια απόκρισης του φυτού σε αβιοτικές καταπονήσεις

Η ικανότητα αντίδρασης σε ένα διαρκώς μεταβαλλόμενο και δυσμενές περιβάλλον διαφέρει σημαντικά μεταξύ των φυτών. Εκτός από τις γονοτυπικές διαφορές που υφίστανται, η ικανότητα αυτή εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού και το φυτικό όργανο που εξετάζεται, επηρεάζεται από τις συνθήκες ανάπτυξης του φυτού, τη συχνότητα, τη διάρκεια και την ένταση έκθεσης του σε συνθήκες καταπόνησης καθώς και από κάθε συνεργιστικό αποτέλεσμα έκθεσης σε πολλαπλές αντίξοες συνθήκες. Ο Lichtenthaler πρότεινε το 1996 τέσσερα εμπειρικά στάδια για την απόκριση του φυτού στην καταπόνηση:

- ❖ Το στάδιο συναγερμού (alarm stage). Το στάδιο αυτό της αντίδρασης χαρακτηρίζεται από εκδήλωση συναγερμού. Ο μεταβολισμός αποκλίνει από την κανονική πορεία του και το φυτό οδηγείται σε οξεία βλάβη, εάν δεν έχει την ικανότητα να περάσει στο επόμενο στάδιο της αντοχής.
- ❖ Το στάδιο της αντοχής (resistance). Το δεύτερο στάδιο, της αντοχής, χαρακτηρίζεται από μια γενική αναδιάταξη με διάφορες συνιστώσες.
- ❖ Το στάδιο εξάντλησης ή τελικό (exhaustion). Το στάδιο αυτό είναι αποτέλεσμα της υπερφόρτισης της ικανότητας προσαρμογής, καθώς η υπερβολική ένταση της καταπόνησης προκαλεί χρόνια βλάβη και τελικά νέκρωση των κυττάρων.

- ❖ Το στάδιο της ανάνηψης ή αναγέννησης (regeneration). Το τέταρτο στάδιο, της ανάνηψης ή αναγέννησης, περιλαμβάνει τη μερική ή ολοκληρωτική επαναφορά των φυσιολογικών λειτουργιών σε κανονικά επίπεδα, εφόσον η καταπόνηση ανασταλεί και εφόσον οι βλάβες είναι αναστρέψιμες.



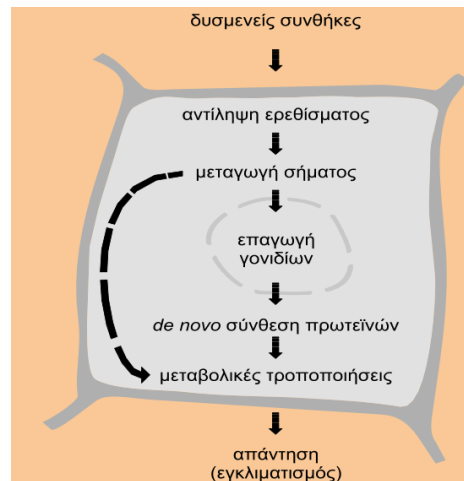
Σχήμα 1.3: Γενικευμένη παρουσίαση της αλληλουχίας των σταδίων από τα οποία διέρχεται το φυτό, προκειμένου να αντιμετωπίσει μια καταπόνηση. (Από “Φυσιολογία Φυτών – από το μόριο στο περιβάλλον”, επιμέλεια Κ.Α. Ρουμπελάκη- Αγγελάκη, 2003)

1.6.2 Μηχανισμοί αντοχής στις καταπονήσεις

Τα φυτά αντιδρούν στις καταπονήσεις αναπτύσσοντας μηχανισμούς αποφυγής (escape), διαφυγής (avoidance) και αντοχής (tolerance). Οι μηχανισμοί αποφυγής, περιλαμβάνουν στρατηγικές με τις οποίες τα φυτά αποφεύγουν τις δυσμενείς συνθήκες, είτε ολοκληρώνοντας τον κύκλο ζωής τους πριν την έναρξη της καταπόνησης είτε εισέρχονται σε λήθαργο κατά τη διάρκειά της. Οι μηχανισμοί διαφυγής παρεμποδίζουν την επίδραση της καταπόνησης στο κύτταρο (το κύτταρο αποφεύγει να έλθει σε φυσικοχημική ισορροπία με τον παράγοντα καταπόνησης) ή μειώνουν την έκθεση του φυτού στις καταπονήσεις. Οι μηχανισμοί ανοχής επιτρέπουν στο φυτό να ανεχθεί την αρνητική επίδραση μιας καταπόνησης που έχει ήδη επηρεάσει το κύτταρο (το κύτταρο βρίσκεται σε φυσικοχημική ισορροπία με την καταπόνηση).

Οι μηχανισμοί αντοχής κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: Εγγενείς (constitutive), Προσαρμογής (adaptive) και Εγκλιματισμού (acclimation, hardening). Οι εγγενείς μηχανισμοί αφορούν σε γενετικώς καθορισμένα χαρακτηριστικά τα οποία εκφράζονται δομικά, ανεξαρτήτως της ύπαρξης καταπόνησης. Οι μηχανισμοί προσαρμογής είναι εξειδικευμένες μακροχρόνιες αντιδράσεις που αφορούν τροποποιήσεις σε βιοχημικά και άλλα χαρακτηριστικά. Οι μηχανισμοί εγκλιματισμού είναι ταχείες αντιδράσεις μεταβολισμού και αύξησης που λαμβάνουν χώρα σε μεταβολές περιβάλλοντος, συνήθεις και βραχυχρόνιες. Κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού, το φυτό αγγίζει την ομοιόσταση του, αυξάνοντας τον

αναβολισμό του και μειώνοντας τη συσσώρευση τοξικών υποπροϊόντων. Η γενική αρχή της απόκρισης των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις συνοψίζεται στο παρακάτω σχήμα, όπου τα φυτά αποδεχόμενα το ερέθισμα της καταπόνησης, εκκινούν σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν σε ποικίλες μεταβολικές τροποποιήσεις των φυτών.



Εικόνα 1.4: Γενικό σχήμα που περιγράφει την απόκριση των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις, σε κυτταρικό επίπεδο.

1.7 Υδατική καταπόνηση

Ο πλέον περιοριστικός παράγοντας καταπόνησης της απόδοσης των καλλιεργειών είναι η ξηρασία. Η υδατική καταπόνηση εμφανίζεται είτε ως αφυδάτωση (συμπτώματα ξηρασίας), είτε ως ωσμωτική καταπόνηση (συμπτώματα αλατότητας). Το κοινό χαρακτηριστικό στις δύο αυτές στρεσογόνες καταστάσεις είναι η διαμόρφωση χαμηλού δυναμικού του νερού στους φυτικούς ιστούς. Έλλειψη νερού στο έδαφος λόγω ξηρασίας προκαλεί πτώση του ωσμωτικού δυναμικού του εδάφους, που όταν φθάσει σε τιμές περισσότερο αρνητικές από εκείνες του φυτού, προκαλείται στα κύτταρα ωσμωτική καταπόνηση, δηλαδή δυσχέρεια απορρόφησης νερού από το έδαφος και αύξηση της συγκέντρωσης ανόργανων ιόντων σε τοξικά πλέον επίπεδα για το κύτταρο. Ως ξηρασία ορίζεται το συνδυαστικό αποτέλεσμα της περιορισμένης διαθεσιμότητας νερού (από την ατμόσφαιρα ή/και από το έδαφος) και των έντονων απωλειών νερού, μέσω εξατμισοδιαπνοής. Συνθήκες ξηρασίας επικρατούν στο ένα τρίτο περίπου της χέρσου του πλανήτη, ενώ εποχικό ή τοπικό περιορισμό στη διαθεσιμότητα νερού υφίσταται ένα σημαντικό ποσοστό ξηράς.

Η ξηρασία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες καταπόνησης, οι οποίοι περιορίζουν τη γεωργική παραγωγή σε παγκόσμιο επίπεδο. Η ξηρασία είναι μια πολυδιάστατη μορφή καταπόνησης που επηρεάζει τα ανατομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτικών οργάνων και παράλληλα προκαλεί σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα πολλών βιοχημικών μονοπατιών που συνδέονται με αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση.

Ο παγκόσμιος πληθυσμός αναμένεται να φτάσει τα εννέα δισεκατομμύρια μέχρι το 2050. Λαμβάνοντας υπόψη αυτή την αύξηση του πληθυσμού, η απόδοση των καλλιεργειών πρέπει να βελτιωθεί κατά 40% σε περιοχές όπου η ξηρασία είναι πιθανό να επέρθει από το 2025 (Pennisi *et al.*, 2008). Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια, συχνά φαινόμενα ξηρασίας και ανώμαλες καιρικές συνθήκες έχουν παρατηρηθεί σε όλο τον κόσμο. Σχεδόν κάθε χρόνο, περιοχές της γης πλήττονται από την ξηρασία, με αποτέλεσμα την καταστροφή των καλλιεργειών και τη διατάραξη της γεωργικής παραγωγής. Η ξηρασία προκαλεί επίσης μεγάλες απώλειες στην παραγωγή πολλών καλλιεργειών όπως το ρύζι, το σιτάρι, και η σόγια. Οι νότιες πολιτείες της Βραζιλίας, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 40% της παγκόσμιας παραγωγής σόγιας και συνιστούν το δεύτερο μεγαλύτερο παραγωγό παγκοσμίως, παρουσίασαν απώλειες της τάξης του 20% της παραγωγής τους, λόγω της ξηρασίας κατά τη διάρκεια των περιόδων του 2003/2004 και 2004/2005 (Polizel *et al.*, 2011).

Είναι προφανές ότι η ανάπτυξη ανθεκτικού στην ξηρασία γενετικού υλικού θα είναι σημαντικά επωφελής σε περιοχές που πλήττονται από εφιαρκή ανεπάρκεια νερού. Πρόσφατα, κάποια πρόοδος έχει σημειωθεί προς την ταυτοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται με την απόκριση των φυτών στην ξηρασία είναι σημαντική ώστε να καταστεί εφικτή η αναβάθμιση της αποτελεσματικότητας των βελτιωτικών προγραμμάτων που στοχεύουν στη βελτίωση του γνωρίσματος στην ξηρασία.

1.8 Απόκριση φυτών στην υδατική καταπόνηση

Τα φυτά για να ανταπεξέλθουν σε συνθήκες έλλειψης νερού έχουν αναπτύξει τις αντίστοιχες στρατηγικές ανθεκτικότητας που προαναφέρθηκαν στην παράγραφο 1.5.2 και αφορούν στους μηχανισμούς αποφυγής, διαφυγής και αντοχής στην αφυδάτωση. Στη κατηγορία φυτών που ακολουθούν τη στρατηγική της αποφυγής της ξηρασίας, ανήκουν φυτά που το καλοκαίρι εισέρχονται σε λήθαργο, όπως για παράδειγμα κάποια αγρωστώδη (Vilagrosa *et al.*, 2012). Η στρατηγική της διαφυγής είναι η ικανότητα του φυτού να διατηρεί υψηλό υδατικό δυναμικό και επιτυγχάνεται μέσω μορφολογικών αλλαγών όπως το κλείσιμο των στομάτων, η μείωση της φυλλικής επιφάνειας και η ανάπτυξη εκτεταμένου ριζικού συστήματος (Levitt, 1980). Η αντοχή είναι η ικανότητα του φυτού να διατηρεί τις λειτουργίες του ακόμα και σε πολύ χαμηλά υδατικά δυναμικά και επιτελείται με ειδικούς φυσιολογικούς, βιοχημικούς και μοριακούς κυτταρικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την έκφραση εξειδικευμένων γονιδίων και τη συσσώρευση εξειδικευμένων πρωτεϊνών υπό συνθήκες ξηρασίας (Bohnert *et al.*, 1996; Kasuga *et al.*, 1999). Η σύνθεση πρωτεϊνών με εξειδικευμένο ρόλο λαμβάνει χώρα ως απόκριση των φυτών σε περιβαλλοντικές συνθήκες που προκαλούν αφυδάτωση όπως η ξηρασία, η αλατότητα, ο παγετός και η υψηλή θερμοκρασία. Στον πίνακα 1.1 αναφέρονται συνοπτικά οι τρεις στρατηγικές ανθεκτικότητας.

Όταν η καταπόνηση είναι ήπια μπορεί να έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού ενεργοποιώντας τον μεταβολισμό του, ενώ όταν είναι έντονη μπορεί να προκαλέσει βλάβες που επιδρούν αρνητικά στον μεταβολισμό και την ανάπτυξή του. Η διαδικασία της ανάνηψης μετά την καταπόνηση πολλές φορές οδηγεί όχι μόνο στην επαναφορά των φυσιολογικών λειτουργιών σε φυσιολογικά επίπεδα και την προσαρμογή στην ξηρασία αλλά και στη

σκληραγώγηση των φυτών, χαρακτηριστικό ιδιαίτερα επιθυμητό αν ληφθούν υπόψη οι συνεχείς αλλαγές στις περιβαλλοντικές/κλιματικές συνθήκες (Yordanov *et al.*, 2003).

Πίνακας 1.1: Στρατηγικές ανθεκτικότητας (Πηγή: A. Vilagrosa *et al.*, 2012)

Στρατηγική Ανθεκτικότητας		Μηχανισμοί
Αποφυγή από την ξηρασία	Αποφυγή από τη στρεσογόνο κατάσταση	Αγενής Λήθαργος Μικρή διάρκεια ζωής
Διαφυγή της ξηρασίας	Διαφυγή της στρεσογόνου κατάστασης Σκοπός: η διατήρηση του υδατικού δυναμικού στα επίπεδα πριν την υποβολή της καταπόνησης.	Κλείσιμο στομάτων Επέκταση ριζικού συστήματος Υψηλή Ικανότητα μεταφοράς νερού από τις ρίζες στα φύλλα Μικρά φύλλα-Αυξημένος λόγος φυλλικής μάζας / φυλλικής επιφάνειας
Αντοχή στην ξηρασία	Αντοχή στο μειωμένο υδατικό δυναμικό Σκοπός: η αντοχή του φυτού στο χαμηλό υδατικό δυναμικό	Οσμωτική προσαρμογή Εκκίνηση αντιοξειδωτικών συστημάτων Αλλαγή μεταβολισμού-έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην ξηρασία

1.8.1 Μορφολογικές τροποποιήσεις

Στα πλαίσια απόκρισης των φυτών στην ξηρασία, ως πρώτη γραμμή εμφανίζεται ο περιορισμός της επιφάνειας των αναπτυσσόμενων φύλλων. η άμεση αυτή αντίδραση συμβαίνει καθώς η διάταση των κυττάρων, ιδιαίτερα των μεριστωματικών ιστών, αποτελεί έναν μηχανισμό εξαιρετικά ευαίσθητο στην έλλειψη νερού, λόγω της άμεσης εξάρτησης από την ύπαρξη επαρκούς πίεσης σπαραγής, η οποία μειώνεται λόγω έλλειψης νερού. Η μείωση της φυλλικής επιφάνειας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων διαπνοής και κατά συνέπεια τη μείωση των απωλειών νερού.

Στη δεύτερη γραμμή άμυνας, μεταβάλλεται ο λόγος υπέργειου/υπόγειου τμήματος του φυτού. Κατά κανόνα, η ανάπτυξη της ρίζας σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης είναι λιγότερο ευαίσθητη έναντι εκείνης του βλαστού και ιδιαίτερα των φύλλων. Το γεγονός οφείλεται στην ενεργητική οσμωτική εξισσορόπηση των ριζών, η οποία προκαλεί πτώση του δυναμικού του νερού των κυττάρων σε χαμηλά επίπεδα (χαμηλότερα εκείνων του δυναμικού του εδαφικού νερού). Τα κύτταρα των ριζών έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλότερα

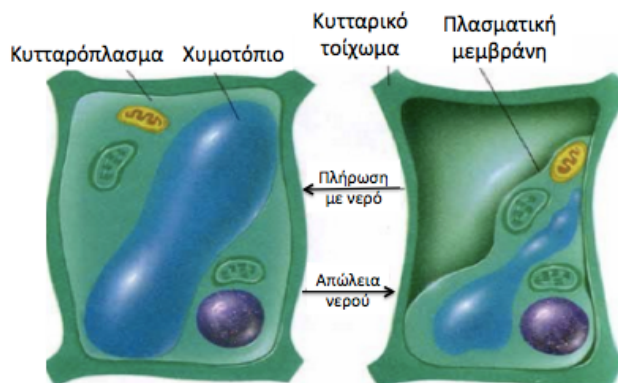
δυναμικά νερού έναντι των κυττάρων των φύλλων. Ο λόγος βλαστού/ρίζας ρυθμίζεται εκτός των άλλων (π.χ συνθήκες θρέψης και στάδιο ανάπτυξης), τόσο από τη δυνατότητα της ρίζας να τροφοδοτεί με νερό τον βλαστό, όσο και από τη δυνατότητα του βλαστού να τροφοδοτεί με φωτοσυνθετικά προϊόντα τη ρίζα. Αυτό οφείλεται στη μεταβολή των σχέσεων πηγής/κατανάλωσης αφού στις συνθήκες αυτές, ένα υψηλότερο ποσοστό φωτοσυνθετικών προϊόντων κατευθύνεται προς τη ρίζα. Το γεγονός οφείλεται στο ότι κατά τα αρχικά στάδια της υδατικής καταπόνησης, ο περιορισμός της διάτασης των φύλλων εμφανίζεται ως το πρώτο σύμπτωμα, με αποτέλεσμα οι ανάγκες των φύλλων σε φωτοσυνθετικά προϊόντα να περιορίζεται και επακολούθως, η φωτοσυνθετική λειτουργία παρεμποδίζεται σε επόμενα στάδια. Αποτέλεσμα της όλης διαδικασίας είναι η ανάπτυξη της ρίζας σε βαθύτερα-υγρότερα στρώματα εδάφους.

Μια σημαντική απόκριση των φυτών στην υδατική καταπόνηση αποτελεί η αποβολή των γυραιότερων φύλλων, ώστε να περιοριστεί η διαπνέουσα επιφάνεια. Σε πολλές περιπτώσεις μάλιστα, η παρουσία έντονης έλλειψης νερού έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή μόνο των κορυφαίων νεαρών φύλλων στο βλαστό. Ο μηχανισμός αυτός στον οποίο εμπλέκεται το αιθυλένιο, αναφέρεται ως εξισσορόπηση φυλλικής επιφάνειας και έχει ως προφανή στόχο το δραστικό περιορισμό των επιφανειών οι οποίες διαπνέουν και κατά συνέπεια την εξοικονόμηση νερού (Καραμπουρνιώτης, 2003).

1.8.2 Φυσιολογικές τροποποιήσεις

Το υδατικό στρες επιδρά σε πολλές πτυχές της φυσιολογίας των φυτών, ειδικά στη φωτοσυνθετική τους ικανότητα. Υπό συνθήκες παρατεταμένης καταπόνησης, σημειώνεται δραστική μείωση τόσο της ανάπτυξης των φυτών όσο και της παραγωγικότητας των φυτών. Τα φυτά έχουν εξελιχθεί ώστε να προσαρμόζονται βιοχημικά σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών καταπονήσεων. Η έλλειψη νερού έχει ως αποτέλεσμα το κλείσιμο των στομάτων, τη μείωση της φωτοσύνθεσης και της διαπνοής, τη μείωση του υδατικού δυναμικού των φυτικών ιστών και της ανάπτυξης του φυτού. Το στρες προκαλεί αφυδάτωση του κυττάρου, μείωση της πίεσης σπαραγής, μείωση του κυτταρικού όγκου, αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων σε επίπεδο που μπορεί να αποβούν τοξικά. Συγκεκριμένα, η υδατική καταπόνηση επηρεάζει τη δομή και λειτουργία των μεμβρανών. Ο πρωτοπλάστης συρρικνώνεται και συνοδεύεται από συμπύκνωση της υδατικής φάσης και αύξηση της συγκέντρωσης διαλυμένων ουσιών (αφυδάτωση του κυτταροπλάσματος). Οι μεμβρανικές αντλίες μειώνουν τη δραστηριότητά τους και παράλληλα δημιουργούνται ανεπιθύμητοι πόροι. Σε κυτταρικό επίπεδο, επέρχεται απώλεια της διαμερισματοποίησης και συνολική μεταβολική δυσλειτουργία (βλ. Εικόνα 1.5).

Κύτταρα με πλήρη χυμοτόπια παρέχουν μία "άκαμπτη-υγιή" δομή στη μορφολογία των φυτών. Αντίθετα, στα χυμοτόπια με ελλειπή ποσότητα νερού εμφανίζεται συρρίκνωση του κυτταρικού τοιχώματος, δημιουργούνται αποστάσεις μεταξύ των γειτονικών κυττάρων, μεταβολές που σε παρατεταμένη υδατική καταπόνηση συμβάλλουν στη διαμόρφωση γενεικευμένου μαρασμού (Καραμπουρνιώτης, 2003).



Εικόνα 1.5: Φυτικό κύτταρο σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες υδατικής έλλειψης. (Πηγή: www.emaze.com)

Επίσης, η υδατική καταπόνηση παρεμποδίζει την ομαλή φωτοσυνθετική λειτουργία, λόγω του αναπόφευκτου κλεισίματος των στοματίων που οδηγεί σε παρεμπόδιση της αφομοίωσης του CO_2 της ατμόσφαιρας. Το κλείσιμο των στομάτων γίνεται είτε παθητικά είτε μέσω της δράσης του αμπισικού οξέος (ABA). Επιπλέον, η επικράτηση χαμηλού δυναμικού του νερού στον πρωτοπλάστη επιδρά στη δομική και λειτουργική ακεραιότητα της φωτοσυνθετικής συσκευής (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Επίσης, η υδατική καταπόνηση παρεμποδίζει την ομαλή φωτοσυνθετική λειτουργία, λόγω του αναπόφευκτου κλεισίματος των στοματίων που οδηγεί σε παρεμπόδιση της αφομοίωσης του CO_2 της ατμόσφαιρας. Το κλείσιμο των στομάτων γίνεται είτε παθητικά είτε μέσω της δράσης του αμπισικού οξέος (ABA). Επιπλέον, η επικράτηση χαμηλού δυναμικού του νερού στον πρωτοπλάστη επιδρά στη δομική και λειτουργική ακεραιότητα της φωτοσυνθετικής συσκευής (Καραμπουρνιώτης, 2003).

1.8.3 Επίδραση υδατικής καταπόνησης στη γονιδιακή έκφραση

Η αντιμετώπιση των δραματικών επιπτώσεων της υδατικής καταπόνησης επιβάλλει όχι μόνο τις αναγκαίες μεταβολικές διευθετήσεις εγκλιματισμού στις νέες συνθήκες, αλλά και την *de novo* σύνθεση νέων πρωτεϊνικών μορίων απαραίτητων για τη σύνθεση ορισμένων μεταβολιτών. Στις πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνονται τα ένζυμα-κλειδιά ορισμένων βιοσυνθετικών οδών, όπως ΑΤΡάσες και ακουαπορίνες, δηλ. πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν μεμβρανικές διόδους διέλευσης μορίων νερού, καθώς και πρωτεάσες, δηλ. ένζυμα τα οποία υδρολύουν πρωτεΐνες που έχουν μετουσιωθεί λόγω των αντίξων συνθηκών. Τα φυτά αποκρινόμενα στην υδατική καταπόνηση μεταβάλλουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην ξηρασία. Οι αλλαγές μπορεί να αφορούν σε αύξηση έκφρασης γονιδιακών προϊόντων ή τη μείωση άλλων. Η αύξηση συνήθως συνδέεται με την επαγωγή της ανθεκτικότητας, ενώ η μείωση οφείλεται είτε στην αδυναμία των φυτών να αντεπεξέλθουν στα φυσιολογικά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης λόγω καταπόνησης, είτε στη στοχευμένη

μείωση της έκφρασης προϊόντων που δρουν ως αναστολείς άλλων που επάγουν την ανθεκτικότητα. Η απόκριση των φυτών στην υδατική καταπόνηση και γενικότερα στο αβιοτικό στρες διακρίνεται στο στάδιο της αντίληψης του στρες, της σηματοδότησης και της απόκρισης μέσω ενεργοποίησης ή αναστολής της έκφρασης γονιδίων (Parvaiz *et al.*, 2012).

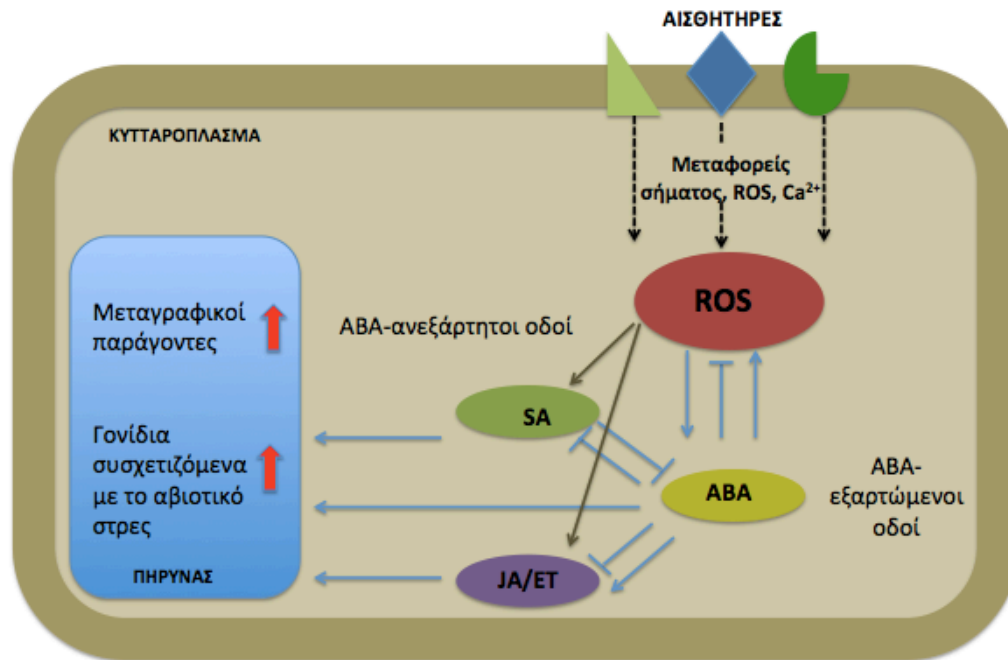
1.8.3.1 Αντίληψη στρες-σηματοδότηση

Η αντίληψη του υδατικού στρες, οφείλεται σε αισθητήρες της μεμβράνης (διαμεμβρανικά διμερή κινάσης ιστιδίνης) που αποτελούν μεταφορείς ιόντων των οποίων η δραστηριότητα μεταβάλλεται ως απόκριση στο συνοδευόμενο ωσμωτικό στρες που οδηγεί στην αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων. Άμεσο αποτέλεσμα της υδατικής καταπόνησης στα φυτικά κύτταρα είναι η σημαντική εισροή Ca^{2+} που αποτελεί κομβικό σηματοδοτικό μόριο. Ένα από τα πρώτα συμβάντα ύστερα από την διαδικασία αντίληψης της υδατικής καταπόνησης είναι το οξειδωτικό στρες που οφείλεται στην παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS-reactive oxygen species). Η αυξημένη συγκέντρωση των ROS οφείλεται στη μείωση του φωτοσυνθετικού ρυθμού. Ο περιορισμός της δέσμευσης CO_2 μειώνει την αναγέννηση του $NADP^+$ μέσω του κύκλου του Calvin και ως εκ τούτου, προκαλείται μείωση της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στην πραγματικότητα, κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης υπό στρες ξηρασίας, υπάρχει μεγαλύτερη διαρροή των ηλεκτρονίων προς το O_2 από την αντίδραση Mehler και έτσι προκύπτουν οι ενεργές μορφές οξυγόνου (Cruz, 2008). Η παραγωγή των ROS εμπλέκεται κυρίως στη σηματοδότηση και παρά τις βλάβες που μπορούν να προκαλέσουν στα φυτικά κύτταρα, δρουν προστατευτικά ενάντια στο αβιοτικό στρες καθώς εκκινούν αμυντικά μεταβολικά μονοπάτια.

Οι μοριακοί και φυσιολογικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την αντοχή στην έλλειψη νερού και την αποτελεσματικότητα της χρήσης νερού έχουν μελετηθεί εκτενώς και αποτελούν ένα περίπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο. Τα τελευταία χρόνια, ένας αριθμός χημικών παραγώγων έχουν ταυτοποιηθεί ως σχετιζόμενα με τη συστημική διαμεσολαβούμενη σηματοδότηση στα φυτά. Οι ενώσεις αυτές περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, το αμπισισικό οξύ (ABA), το σαλικυλικό οξύ (SA), το ιασμονικό οξύ (JA), την αυξίνη, το αιθυλένιο (ET), το μονοξείδιο του αζώτου (NO), διάφορα πεπτίδια και πρωτεΐνες, ηλεκτρικά σήματα και μόρια RNA (Karpinski *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Wendehenne *et al.*, 2014).

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ορμόνη ABA που συμμετέχει στη ρύθμιση και το συντονισμό της προσαρμογής του φυτού στην καταπόνηση. Η συγκέντρωση της ορμόνης αυξάνεται σημαντικά σε συνθήκες καταπόνησης, γεγονός που την καθιστά ορμόνη αποκρινόμενη στο στρες (Tuteja *et al.*, 2008). Η παραγωγή του αμπισισικού οξέος μπορεί να προέρχεται από δύο διαφορετικές πηγές: α) από τα φύλλα, λόγω της αφυδάτωσης του κυτταροπλάσματος, όπου ένα ποσοστό του συνολικού ABA των χλωροπλάστων απελευθερώνεται στους αποπλάσματικούς χώρους και β) από τις ρίζες, που παράγουν και εξάγουν ABA προς τα αγγεία του ξύλου. Η συγκέντρωση της ορμόνης στις ρίζες αυξάνεται δραματικά όταν υπάρχει έλλειψη νερού στο εδαφικό περιβάλλον. Επομένως, το ABA μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα διασυστημικό σήμα κινδύνου το οποίο προειδοποιεί ότι επέρχονται προβλήματα στην τροφοδοσία του υπέργειου τμήματος με νερό.

Η μεταγωγή του σήματος γίνεται είτε μέσω ABA-εξαρτώμενων ή μέσω ABA-ανεξάρτητων οδών όπου και στις δύο περιπτώσεις στοχεύει στην αλλαγή έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων (βλ. Σχήμα 1.3) (Xiong *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2003).



Σχήμα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση σηματοδότηκών μονοπατιών φυτικών κυττάρων αποκρινόμενα στο στρες υδατικής ανεπάρκειας.

1.8.3.2 Μεταβολή στη γονιδιακή έκφραση

Σήμερα, έχει ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση των φυτών στην ξηρασία. Τα γονίδια αυτά, ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά σε λειτουργικά γονίδια που κωδικοποιούν σημαντικά ένζυμα και πρωτεΐνες (λειτουργικές πρωτεΐνες), όπως αντιοξειδωτικά ένζυμα, υδατοπορίνες και άλλα γονιδιακά προϊόντα, τα οποία λειτουργούν άμεσα προστατεύοντας τα κύτταρα από την καταπόνηση (Shinozaki *et al.*, 2003). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου των μεταγραφικών παραγόντων (Transcription factors-TFs) και των πρωτεϊνικών κινάσων, που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση και τη μεταγωγή σήματος αντίστοιχα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες λειτουργούν αλληλεπιδρώντας με *cis*-στοιχεία τους, στη περιοχή του προαγωγού των γονιδίων και δρουν ως μοριακοί διακόπτες της έκφρασης του γονιδίου. Γενικότερα, στα φυτά περίπου το 7% του γονιδιώματος κωδικοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες.

Όπως προαναφέρθηκε, η μεταγωγή σήματος για την αλλαγή έκφρασης των γονιδίων γίνεται είτε μέσω ABA-εξαρτώμενων οδών ή μέσω ABA-ανεξάρτητων μονοπατιών. Στα φυτά, η ρύθμιση της μεταγραφής κατά την απόκριση στην ξηρασία εξαρτάται από δύο κύριες κατηγορίες *cis*-δρώντων στοιχείων των περιοχών του προαγωγού των στρες-επαγωγίμων γονιδίων: τα ABA-στοιχεία απόκρισης ABRE (ABA-responsive elements) και τα στοιχεία απόκρισης στην αφυδάτωση DRE (Dehydration-responsive elements). Τα ABRE έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την ABA-μεσολάβηση, ενώ τα DRE είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στα ABA-ανεξάρτητα μονοπάτια (Kim *et al.*, 2011). Μοριακές αναλύσεις έχουν δείξει πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες που η λειτουργία τους συνδέεται με το ABA, να αναγνωρίζουν το *cis*-στοιχείο ABRE. Παράλληλα, στα ABA-ανεξάρτητα μονοπάτια σηματοδότησης, στα οποία συμμετέχουν μεταγραφικοί παράγοντες (TFs) αποκρινόμενοι στην αφυδάτωση όπως οι TF-NAC και οι TF-DREB και άλλοι που αναλύονται παρακάτω, αναγνωρίζουν αλληλουχίες της γενικής κατηγορίας των DRE στον προαγωγό γονιδίων-στόχων (Nakashima *et al.*, 2014). Στις παρακάτω παραγράφους αναλύονται οι σημαντικότεροι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης.

Οι πρωτεΐνες N-ακετυλοκυστεΐνες, ανήκουν στην οικογένεια του μεταγραφικού παράγοντα NAC και η λειτουργία τους συνδέεται με διάφορες διαδικασίες του φυτού συμπεριλαμβανομένου της βλάστησης του κορυφαίου μεριστώματος (Takada *et al.*, 2001), της ανάπτυξης των άνθων (Sablowski *et al.*, 1998), της κυτταρικής διαίρεσης (Kim *et al.*, 2006), της γήρανσης των φύλλων (Breeze *et al.*, 2011), του σχηματισμού δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Zhong *et al.*, 2010). Πολλές αναφορές έχουν γίνει στη συμμετοχή τους κατά την απόκριση των φυτών σε βιοτικούς και αβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες (Olsen *et al.*, 2005; Christianson *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2010). Μια τυπική πρωτεΐνη NAC περιέχει μία άκρως συντηρημένη αμινοτελική περιοχή δέσμησης του DNA και μία περιοχή ρύθμισης της μεταγραφής στην καρβοξυτελική τερματική περιοχή. Η περιοχή NAC με περίπου 150-160 αμινοξέα (Ooka *et al.*, 2003) αποτελεί αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization sequence-NLS), περιοχή δέσμησης του DNA, και περιοχή σχηματισμού ομοδιμερών ή ετεροδιμερών με άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν τη περιοχή NAC (Olsen *et al.*, 2005). Η μη συντηρημένη C-τερματική περιοχή, έχει συχνές επαναλήψεις αμινοξέων και περιοχές πλούσιες σε σερίνη και θρεονίνη, προλίνη και γλουταμίνη και λειτουργεί είτε επάγοντας είτε καταστέλοντας τη μεταγραφή γονιδίων (Olsen *et al.* 2005, Puranik *et al.* 2012). Κάποιοι NAC TFs περιέχουν επίσης διαμεμβρανικά μοτίβα στην C-τελική περιοχή που είναι υπεύθυνα για τη πρόσδεση στη κυτταρική μεμβράνη ή στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Seo *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2010).

Η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων NAC μπορεί να αναγνωρίσει πολλές θέσεις δέσμησης DNA που σχετίζονται με τη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων-στόχων, οδηγώντας σε αύξηση ή μείωση της έκφρασής τους. Τα προϊόντα των γονιδίων-στόχων, αποτελούν πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος, πρωτεΐνες ρύθμισης της μεταγραφής, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη παραγωγή ωσμολυτών, πρωτεΐνες απομάκρυνσης των δραστικών μορφών οξυγόνων (παράγωγα του οξειδωτικού στρες), πρωτεΐνες ουβικουιτινίωσης (Puranik *et al.*, 2012). Η αλληλουχία αναγνώρισης NAC (NACRS) που βρίσκεται στα γονίδια-στόχους περιέχει την αλληλουχία CACG. Η ύπαρξη NACRS έχει ταυτοποιηθεί στη περιοχή του προαγωγού (promoter) μερικών γονιδίων, καθιστώντας τα γονίδια αυτά άμεσους στόχους. Αντίθετα, τα γονίδια που δεν περιέχουν το συγκεκριμένο μοτίβο πιθανότατα δεν

συγκαταλέγονται στους άμεσους στόχους. (Taverne *et al.*, 2004). Πρόσθετες μελέτες, έχουν ταυτοποιήσει στις θέσεις των προαγωγών των γονιδίων *nac* επαναλαμβανόμενα *cis* στοιχεία των jasmonate-responsive elements (JRE; tGacG), ABA-responsive elements (ABRE; ccGtGt), ethylene-responsive elements (ERE; aGccGcc), και Ga-repression elements (Ga_down; acGtGtc).

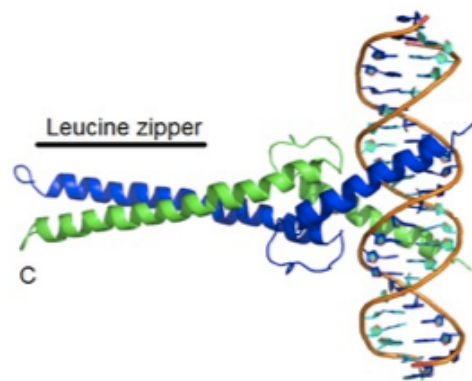


Εικόνα 1.6:Μοριακή δομή μεταγραφικού παράγοντα NAC. Στην εικόνα απεικονίζονται οι αλληλουχίες δέσμευσης CGTG στα γονίδια στόχους. (Πηγή wileyonlinelibrary.com)

Μία άλλη σημαντική οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων αποτελούν οι TF-DREB που δεσμεύονται με *cis*-στοιχεία απόκρισης στη ξηρασία. Ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων ERF (παραγόντες δέσμευσης αποκρινόμενοι στο αιθυλένιο). Ανάλυση των περιοχών των υποκινητών των γονιδίων που δείχνουν ABA-ανεξάρτητη έκφραση ως απόκριση υδατικού στρες, έχουν δείξει ένα *cis*-στοιχείο με την αλληλουχία A/GCCGAC, που ορίζουν την περιοχή δέσμευσης DRE/CRT (Sakuma *et al.*, 2006; Lata *et al.*, 2011). Οι μεταγραφικοί παράγοντες DREB συνδέονται με το στοιχείο απόκρισης στην αφυδάτωση DRE στους υποκινητές πολλών αποκρινόμενων σε αβιοτικό στρες γονιδίων. Οι TF-DREB χωρίζονται περαιτέρω σε δύο υποκατηγορίες, DREB1 και DREB2, η έκφρασή των οποίων προκαλείται από το κρύο και το στρες ξηρασίας αντίστοιχα (Mohammad, 2011). Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι η εισαγωγή διαφόρων γονιδίων *dreb1* σε διαγονιδιακά *Arabidopsis* προσδίδουν ανοχή στην ξηρασία, στην υψηλή αλατότητα και στον παγετό (Jaglo-Ottosen K.R *et al.* 2001, Kasuga M. *et al.* 1999, Liu Q *et al.* 1998, Maγuyama K. *et al.*, 2004). Χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες cDNA, περισσότερα από 40 διαφορετικά γονίδια-στόχοι του DREB1 ταυτοποιήθηκαν στα διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis*. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια-στόχους βρέθηκαν να κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με το στρες όπως οσμωπροστατευτικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες *Lea*, αναστολείς πρωτεάσης και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Από τότε, η ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με το στρες έχει καταδειχθεί σε αρκετά διαγονιδιακά φυτά μετασχηματισμένα με *dreb* γονίδια. Οι Chen *et al.* (2007) και Li *et al.* (2005) μελέτησαν την απόκριση αντίστοιχων διαγονιδιακών φυτών σόγιας που έδειξαν ανθεκτικότητα σε συνθήκες στρες ξηρασίας, αλατότητας και χαμηλής θερμοκρασίας.

Ορισμένες από τις ABA-εξαρτώμενες φυσιολογικές αποκρίσεις ρυθμίζονται από την

οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων bZIP (Leucine Zipper Transcription Factors-bZIP), που φέρουν τη χαρακτηριστική δομή φερμουάρ λευκίνης. Οι παράγοντες bZIP αλληλεπιδρούν με την προαναφερθείσα κατηγορία των *cis*-δρώντων στοιχείων DNA, που είναι συλλογικά γνωστά ως στοιχεία απόκρισης στο αμπισικό οξύ (ABREs). Η βασική περιοχή δέσμευσης του bZIP στο DNA, πλούσια σε λυσίνες και αργινίνες, που αλληλεπιδρούν με την κύρια αύλακα της διπλής έλικας του DNA. Η περιοχή φερμουάρ είναι μια αμφιπαθική έλικα 30-40 αμινοξέων με κάθε έβδομο κατάλοιπο λευκίνη. Οι λευκίνες αυτές, μαζί με τα παρεμβαλλόμενα αμινοξέα, σχηματίζουν μια δομή “φερμουάρ” που διμερίζεται με την αντίστοιχη περιοχή μιας άλλης πρωτεΐνης bZIP (βλ. Εικόνα1.7)(Xue et al., 2014; Gao et al., 2011).

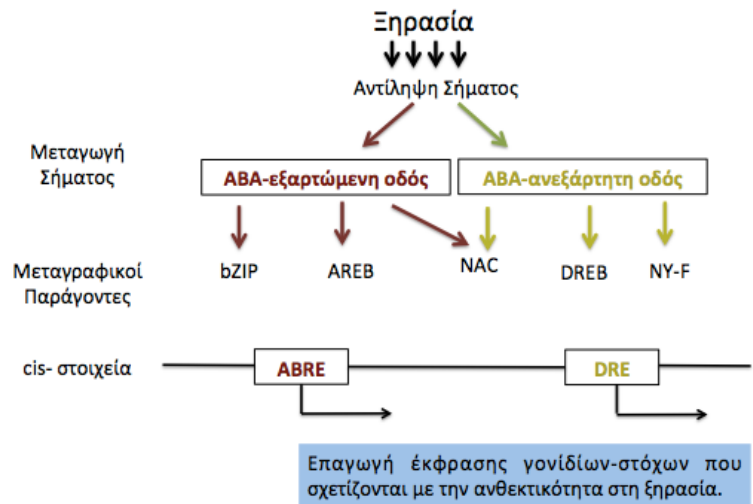


Εικόνα 1.7: Διμερές bZIP δεσμευμένο στην έλικα του DNA.

Ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας NF-Y αποτελεί ένα τριμερές σύμπλοκο, σχηματίζοντας ένα άκρως συντηρημένο παράγοντα μεταγραφής που δεσμεύεται σε CCAAT μοτίβα στις περιοχές του υποκινητή σε πλήθος γονιδίων. Η δράση του παράγοντα NF-Y φαίνεται να συνδέεται τόσο με ABA-εξαρτώμενα όσο και με ABA-ανεξάρτητα μονοπάτια. Η υπομονάδα NY-A συνδέεται σε ένα σφιχτό διμερές που αποτελείται από τις υπομονάδες B και C, σχηματίζοντας ένα τριμερές που δεσμεύεται στο DNA με υψηλή εξειδίκευση και συγγένεια. Μελέτες έχουν δείξει ότι το γονιδιακό προϊόν NY-A φέρει ειδική αλληλουχία αλληλεπίδρασης με το διμερές σύμπλοκο, γεγονός που υποδηλώνει ένα πιθανό ρόλο ως ρυθμιστική υπομονάδα (Maity et al., 1998). Έρευνες σε διάφορα φυτά έχουν δείξει τον ρυθμιστικό ρόλο του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα στην ABA-ρύθμιση (Li xu et al., 2014; Kumimoto et al., 2013). Άλλες μελέτες αποδεικνύουν τον ρυθμιστικό ρόλο των NF-Y πρωτεϊνών στην απόκριση των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις, ιδιαίτερα κατά το στρες ξηρασίας. Πειράματα υπερέκφρασης των γονιδίων NF-Y σε φυτά *Arabidopsis*, έδειξαν αυξημένη ανθεκτικότητα στην ξηρασία. (Li et al., 2008). Αντιθέτως, σε φυτά όπου είχαν κατασταλεί τα γονίδια NF-Y (knockout), υπήρξε αυξημένη απώλεια νερού στα φύλλα και μεγαλύτερη ευαισθησία στο στρες ξηρασίας σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Quach et al., 2015)

Οι πρωτεΐνες δέσμευσης περιοχών ABRE (AREB) κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες με δομή φερμουάρ λευκίνης (bZIP). Ο ρόλος τους στην ανθεκτικότητα των φυτών

στην αφυδάτωση καθώς και η ABA-συσχετιζόμενη επαγωγή τους αναφέρεται σε πολλές δημοσιευμένες εργασίες (Yoshida *et al.*, 2009; Fujita *et al.*, 2005; Furihata *et al.*, 2006). Στο εικόνα 1.8 φαίνονται συνοπτικά ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταγραφικούς παράγοντες που παίζουν ρόλο στην επαγωγή έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών στην ξηρασία.



Εικόνα 1.8: Μεταγραφικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο στην επαγωγή έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών στην ξηρασία.

1.9 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή είχε σκοπό τη μελέτη της απόκρισης, σε μεταγραφικό επίπεδο, γενετικού υλικού σόγιας υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Απώτερος σκοπός είναι η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα της σόγιας στην ξηρασία ώστε να καταστεί εφικτή η αναβάθμιση της αποτελεσματικότητας των σχετικών προγραμμάτων βελτίωσης. Στα πλαίσια αυτά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υδατικής καταπόνησης σε δύο ποικιλίες σόγιας, μία ανθεκτική και μία ευαίσθητη στην ξηρασία. Προκειμένου να διερευνηθεί η τυχόν χρονικά επαγόμενη εκδήλωση ανθεκτικότητας, η υδατική καταπόνηση έλαβε χώρα σε δύο αναπτυξιακά στάδια, το νεαρό στάδιο V1 και το στάδιο V6, μέσω μειωμένης άρδευσης και προσθήκης στο μέσο ανάπτυξης πολυαιθυλενικής γλυκόλης, σε δύο επίπεδα στρες. Συνεπώς, οι υπό μελέτη παράμετροι περιλάμβαναν το γονότυπο σόγιας, το αναπτυξιακό στάδιο και το επίπεδο καταπόνησης. Η απόκριση των φυτών μελετήθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο και αφορούσε στην αξιολόγηση μεταβολών στο προφίλ έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την υδατική καταπόνηση σε σχέση με φυτά-μάρτυρες.

Η ανάδειξη γονιδίων που η έκφρασή τους διαφέρει μεταξύ των δύο ποικιλιών δύναται να οδηγήσει στην εξαγωγή συμπερασμάτων για την πιθανή συσχέτιση των γονιδίων με τον ανθεκτικό φαινότυπο. Προς την κατεύθυνση αυτή, η απόκτηση βασικής γνώσης για τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν την ανθεκτικότητα στην ξηρασία θα έχει διττό ρόλο στη βελτίωση του γνωρίσματος; αφενός μεν θα συμβάλλει στη δημιουργία λειτουργικών δεικτών για την ευχερέστερη ταυτοποίηση ανθεκτικού γενετικού υλικού σε πρώιμα στάδια επιλογής και αφετέρου θα καταστεί δυνατή η αξιοποίηση της γνώσης αυτής για τη στοχευμένη πλέον δημιουργία ανθεκτικού γενετικού υλικού, μέσω κλασσικών βελτιωτικών διαδικασιών ή μέσω γενετικής μηχανικής.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Εφαρμογή υδατικής καταπόνησης στο εργαστήριο

Υλικά

- Φυτικό υλικό: 2 ποικιλίες σόγιας *Crawford* (ευαίσθητη) και *Jackson* (ανθεκτική)
- Murashige Skoog (MS) basal medium
- Σουκρόζη
- Φυτικό άγαρ
- Πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG 6000)
- 70% αιθανόλη
- Χλωρίνη και Υγρό σαπούνι εμπορίου
- Αποστειρωμένο απιονισμένο νερό
- Magenta boxes

Όργανολογία

- Θάλαμος νηματικής ροής
- Θάλαμος ανάπτυξης σταθερών συνθηκών
- Χύτρα αποστείρωσης

Μεθοδολογία

Ο έλεγχος της επίδρασης της υδατικής καταπόνησης κατά την βλαστική φάση ανάπτυξης των δύο ποικιλιών σόγιας, έγινε μέσω *in vitro* πειραμάτων στο εργαστήριο. Η σπορά τους έγινε σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, υπό την προσθήκη του ωσμωτικά δραστικού μακρομορίου πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG 6000) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (βλ. Παράγραφο 2.1.1). Για την προετοιμασία του στερεού θρεπτικού μέσου αναμίχθηκαν 1/2 basal Murashige Skoog (MS) medium, 10g/l σουκρόζη, 5g/l φυτικό άγαρ και 0%, 2,5% και 5% PEG. Τα διαλύματα αποστειρώθηκαν σε ειδική χύτρα πίεσεως και 100ml τοποθετήθηκαν σε ήδη αποστειρωμένα κουτιά magenta. Η τοποθέτηση του θρεπτικού στα κουτιά magenta, έγινε σε αποστειρωμένο περιβάλλον θαλάμου νηματικής ροής, για την αποφυγή επιμολύνσεων από μικροοργανισμούς. Οι σπόροι της σόγιας αρχικά απολυμάνθηκαν μέσω πλύσης με υγρό σαπούνι, εμβάπτισής τους σε 70% αιθανόλη για 1 λεπτό και ακολούθως σε 30% εμπορική χλωρίνη για 10 λεπτά υπό ανάδευση με 3 επακόλουθες πλύσεις με αποστειρωμένο dH₂O (Georgina Kosturkova *et al.*, 2014). Στη συνέχεια, οι σπόροι των 2 ποικιλιών τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια του στερεοποιημένου θρεπτικού μέσου της κάθε παρέμβασης (0%,2.5%,5%PEG). Κατά την σπορά, εφαρμόστηκαν αποστειρωμένες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής, για την αποφυγή επιμολύνσεων. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών στους 25°C υπό φως και ύστερα από 20 ημέρες, κατά το στάδιο των 4 φύλλων, τα φυτάρια αποκόπηκαν και φυλάχτηκαν άμεσα στους -80 °C για την περεταίρω ανάλυση της έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων σχετιζόμενων με την υδατική καταπόνηση της σόγιας.

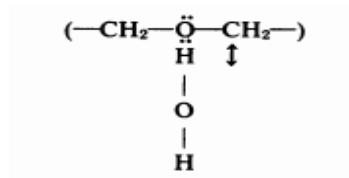


Εικόνα 2.1: Σπόροι σόγιας σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κατά τα *in vitro* πειράματα υδατικής καταπόνησης.

2.1.1 Δράση του μακρομορίου πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG)

Η πολυαιθυλενική γλυκόλη (polyethylen glycol-PEG), αποτελεί ένα πολυμερές πολυαιθέρα με συντακτικό τύπο $H-(CH_2-O-CH_2)_n-OH$. Στο εμπόριο κυκλοφορεί με εύρος μοριακών βαρών από 300 g/mol έως 10.000.000 g/mol και χρησιμοποιείται για τις *in vitro* μελέτες απόκρισης των φυτών στην υδατική καταπόνηση. Η πολυαιθυλενική γλυκόλη μεγάλου μοριακού βάρους >4000g/mol, είναι κατάλληλη για τέτοιου είδους πειράματα, καθώς δεν είναι δυνατή η ενεργός μεταφορά του μορίου στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων (Nayer Mohammadkhanl et al., 2008; Oertli et al., 1985; Sakthivelu G. et al., 2008), αποφεύγοντας έτσι τη τοξική του επίδραση. Η παρουσία του μακρομορίου στο μέσο ανάπτυξης των φυτών στο εργαστήριο, μειώνει το υδατικό δυναμικό ψ_w του μέσου, προσομοιώνοντας έτσι το χαμηλό ψ_w του εδάφους σε συνθήκες έλλειψης νερού. Ήδη από το 1970, οι Kaufmann M. και Eckard A. έδειξαν ότι η προσθήκη PEG 6000 προκαλεί αλλαγές στις υδατικές σχέσεις φυτού-μέσου ανάπτυξης, αντίστοιχες με αυτές του φυτού με το ξηρό έδαφος. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της μείωσης του οσμωτικού δυναμικού του μέσου, της μείωσης του δυναμικού πίεσης του ξυλώματος του φυτού και της μη μεταβολής στο οσμωτικό δυναμικό του ριζικού ξυλώματος είναι αντίστοιχα με πειράματα στον αγρό. Επιπλέον μελέτες όσο αφορά τις ιδιότητες της πολυαιθυλενικής γλυκόλης, αποδεικνύουν εμπειριστατωμένα τη μείωση του υδατικού δυναμικού του μέσου που εμπεριέχει το μόριο, ωστόσο οι Steuter et al. (1981) κάνουν λόγο για τις κολλοειδείς ιδιότητες της πολυαιθυλενικής γλυκόλης μεγάλου μοριακού βάρους και

παράλληλα, αναφέρουν τον τρόπο που συγκρατούν το H₂O ώστε να μην επιτρέπεται η μεταφορά του νερού στη ρίζα. Στην εικόνα 2.2, φαίνεται ο δεσμός υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ του πυρηνόφιλου οξυγόνου του αιθέρα και του υδρογόνου του νερού.



Εικόνα 2.2: Δέσμευση του μορίου του νερού στη πολυαιθελενική γλυκόλη

2.2 Εφαρμογή υδατικής καταπόνησης στο θερμοκήπιο

Υλικά

- Φυτικό υλικό: 2 ποικιλίες σόγιας *Crawford* (ευαίσθητη) και *Jackson* (ανθεκτική)
- Γλάστρες διαμέτρου 20cm
- Φυτόχωμα
- Υγρό άζωτο

Μεθοδολογία

Η διεξαγωγή της υδατικής καταπόνησης, διεξήχθη στο θερμοκήπιο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου αναπτύχθηκαν συνολικά 160 φυτά σόγιας. Συγκεκριμένα, τον Απρίλιο του 2015, σπάρθηκαν 80 φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας *Crawford* και 80 της ανθεκτικής ποικιλίας *Jackson* P548617 (βάση δεδομένων του USDA) σε γλάστρες των 20εκ. και ακολούθησε κανονική άρδευση για χρονικό διάστημα δύο μηνών. Κατά τη διεκπεραίωση του υδατικού στρες, εφαρμόστηκαν τέσσερις επεμβάσεις: δύο επίπεδα άρδευσης (κανονικό και ελλειμματικό) στις δύο ποικιλίες (ευαίσθητη και ανθεκτική). Το στρες εφαρμόστηκε τον Ιούνιο του 2015 όταν >50% των φυτών βρισκόταν στο V6 αναπτυξιακό στάδιο (λίγο πριν την άνθηση), το οποίο θεωρείται το κρισιμότερο στάδιο για την έλλειψη επαρκούς εδαφικής υγρασίας στη σόγια, και διήρκησε 6 ημέρες. Κατά το διάστημα αυτό, τα υποβεβλημένα σε στρες φυτά δεν αρδεύονταν (Jin–Woong Cho *et al.* 2006). Η δειγματοληψία έγινε την 4^η και 6^η ημέρα από την έναρξη της υδατικής καταπόνησης, όπου φύλλα πάρθηκαν από 4 φυτά της κάθε επέμβασης και ύστερα από άμεση μεταφορά τους σε υγρό άζωτο, φυλάχτηκαν στους -80 °C για περαιτέρω ανάλυση. Η άμεση μεταφορά του ιστού στο υγρό άζωτο καθίσταται απαραίτητη, ώστε να περιοριστούν κατά το δυνατό περισσότερο τυχόν μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση που σχετίζονται με τον τραυματισμό των φύλλων κατά τη δειγματοληψία.

2.3 Έλεγχος έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων

Για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την υδατική καταπόνηση των φυτών σόγιας, εφαρμόστηκαν οι μοριακές τεχνικές που συνοπτικά περιγράφονται στην παράγραφο. Από τα δείγματα που συλλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA, που έγινε μέσω της χρήσης του διαλύματος TRIzol[®]. Ακολούθησε περαιτέρω καθαρισμός του RNA με χρήση του ενζύμου DNase και πρωτοκόλλων καθίζησης φαινόλης:χλωροφόρμιου. Στη συνέχεια έγινε ποσοτική και ποιοτική αξιολόγησή του, φωτομετρικά και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη, ώστε να επιλεγθούν οι καταλληλότερες RNA απομονώσεις για τη μετέπειτα σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) και τις αντιδράσεις ημιποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου.

2.3.1 Απομόνωση ολικού RNA μέσω Trizol[®]

Υλικά

- Υγρό άζωτο
- Πήλινα γουδιά
- TRIzol (Invitrogen)
- Πλαστικά έμβολα
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη
- αποστειρωμένο mQH₂O, απαλλαγμένο από RNase και DNase

Οργανολογία

- Συσκευή vortex
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος

Μεθοδολογία

Η χρήση του διαλύματος TRIzol για την απομόνωση του RNA αποτελεί ευρέως διαδεδομένη μέθοδο και βασίζεται στη θεμελιώδη τεχνική απομόνωσης RNA θειοκυανικού γουανιδίνιου-φαινόλης-χλωροφόρμιου. Το μονοφασικό διάλυμα TRIzol[®] εμπεριέχει φαινόλη και θειοκυανικό γουανιδίνιο (Piotr Chomczynski and et al. Sacchi, N., 1987), και επιτυγχάνει υψηλής απόδοσης απομόνωση RNA. Ο χαστροπικός παράγοντας θειοκυανικό γουανιδίνιο, είναι υπεύθυνος για την διατήρηση της ακεραιότητας των μορίων RNA λόγω της αποτελεσματικής αναστολής των ριβονουκλεασών RNase, που προκαλούν την θραύση των ριβονουκλεοτιδικών αλυσίδων καθώς και την μετουσίωση άλλων πρωτεϊνών που επεμβαίνουν στην καθαρότητα των δειγμάτων. Ο χειρισμός του RNA λόγω της ευαισθησίας του, απαιτεί περιβάλλον αυστηρά απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες RNase.

Για την απομόνωση του ολικού RNA, απαιτείται αρχικά η λειοτρίβιση του ιστού με χρήση υγρού αζώτου και αποστειρωμένων γουδιών. Από τον λειοτριβημένο ιστό ζυγίζονται 80mg σε

ζυγό ακριβείας και τοποθετούνται σε σωληνάρια erpendorf των 1,5ml ενώ, το υπόλοιπο φυλάσσεται ως stock στους -80°C . Κατά την διαδικασία της λειοτρίβησης και της ζύγισης, είναι απαραίτητος ο ταχύς χειρισμός ώστε να αποφευχθεί απόψυξη του ιστού, με κίνδυνο τη δράση ενζύμων RNase. Στον ζυγισμένο ιστό, προστίθενται 400μl διαλύματος TRIzol®, ακολουθεί ομογενοποίηση με χρήση εμβόλων και ενδιάμεση έντονη ανάδευση χρησιμοποιώντας συσκευή vortex (το βήμα αυτό εκτελείται 2-3 φορές). Στη συνέχεια, προστίθενται επιπλέον 600μl TRIzol® και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της ομογενοποίησης ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή λύση των κυττάρων. Για την απομάκρυνση του μη ομογενοποιημένου φυτικού ιστού γίνεται φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 10min στους 4°C , το υπερκείμενο συλλέγεται, μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο erpendorf και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min. Στην συνέχεια, προστίθενται 200μl χλωροφόρμιου, ακολουθεί έντονη ανάδευση μικρής διάρκειας σε συσκευή vortex και αναμονή 3min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα ύστερα φυγοκεντρώνονται στις 12.000rpm για 15min στους 4°C και προκύπτει τριφασικό διάλυμα, με το RNA να βρίσκεται στην ανώτερη υδατική φάση η οποία μεταφέρεται σε νέο erpendorf. Το βήμα αυτό αποσκοπεί στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών και λιπιδίων και χρήζει προσοχής η μεταφορά της άνω υδατικής φάσης, που πρέπει να γίνεται χωρίς επέμβαση στις κατώτερες φάσεις, καθώς πρωτεΐνες και λιπίδια βρίσκονται διαλυμένα στη φαινόλη και στο χλωροφόρμιο αντίστοιχα και η πρόσμιξή τους με το RNA θα επέμβει στην ακεραιότητα του. Ακολουθεί προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης, ήπια ανάδευση με το χέρι, αναμονή 10min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 10min στους 4°C . Λόγω της μη διαλυτότητας του RNA στην ισοπροπανόλη, το RNA καθιζάνει δίνοντας ένα ορατό λευκό ίζημα. Ύστερα από την απομάκρυνση του υπερκειμένου ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1ml αιθανόλη με χρήση της συσκευής vortex και φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 10min στους 4°C . Ακολούθως, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα στεγνώνει σε θάλαμο νηματικής ροής με ανοιχτά τα σωληνάρια erpendorfs για περίπου 15min. Όταν τα υπολείμματα αιθανόλης δεν είναι ορατά το ίζημα επαναδιαλύεται σε 25μl mQH_2O και αποθηκεύεται στους -80°C . Κατά την παραπάνω διαδικασία απομόνωσης του RNA, λόγω των ομοίων φυσικοχημικών ιδιοτήτων RNA και DNA γίνεται παράλληλα απομόνωση και μορίων δεοξυριβονουκλεοτιδικών αλυσίδων. Το DNA απομακρύνεται μέσω της χρήσης του ενζύμου DNase, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.3, ενώ η διαδικασία ελέγχου καθαρότητας του RNA ως προς τις προσμίξεις με DNA μέσω ηλεκτροφόρησης περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.5.

2.3.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας του RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) έγινε φωτομετρικά με χρήση του σπεκτροφωτόμετρου Nanodrop ND-1000 (εικόνα 2.3). Η χρήση του σπεκτροφωτόμετρου Nanodrop ND-1000, επιτρέπει υψηλής ακρίβειας αναλύσεις σε εξαιρετικά μικρά δείγματα (1μl) νουκλεϊκών οξέων. Η μέτρηση έγινε στα 260nm, μήκος κύματος με τη μέγιστη απορρόφηση για τα νουκλεϊκά οξέα και για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε ddH_2O . Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η μη ένδειξη προσμίξεων του RNA με DNA, λόγω μέγιστης

απορρόφησης και των δύο μορίων στα 260nm. Τιμή απορρόφησης (A)=1, ισοδυναμεί με 40μg/ml RNA, 50μg/ml δίκλωνο DNA και 33μg/ml μονόκλωνου DNA. Η καθαρότητα των δειγμάτων ως προς τις προσμίξεις με πρωτεΐνες εκτιμήθηκε βάση του λόγου A_{260}/A_{280} και αποδεκτές ήταν οι τιμές εύρους 1,8-2,2. Εκτός από την παρουσία πρωτεϊνών στο RNA, άλατα γουανιδίνης και φαινολικά παράγωγα επεμβαίνουν στην καθαρότητα των δειγμάτων και ισχυρή απορρόφηση σε μήκος κύματος στα 230nm είναι ενδεικτική της παρουσίας τους. Ο λόγος A_{260}/A_{230} με εύρος τιμών 1,8-2,2 θεωρείται αποδεκτός. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA δεν αποδεικνύει και την ακεραιότητα του, ο έλεγχος της οποίας περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.5.



Εικόνα 2.3: Σπεκτροφωτόμετρο
Nanodrop ND-1000

2.3.3 Καθαρισμός RNA με DNase

Υλικά

- DNase kit Biolabs
- Θερμενόμενος επωαστής
- 0.5 M EDTA

Μεθοδολογία

Για την απομάκρυνση του DNA από τα απομονωμένα κλάσματα RNA, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο DNase της εταιρίας Biolabs, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την πραγματοποίηση της πέψης, 10μg RNA επαναδιαλύθηκαν σε 1X DNase I Reaction Buffer σε τελικό όγκο 100 μl. Ακολούθησε προσθήκη 2 units του ενζύμου DNase I, και το μίγμα επώαστηκε στους 37°C για 10min. Με το πέρας της επώασης, προστέθηκε 1 μl 0.5 M EDTA (τελική συγκέντρωση 5 mM) και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 75°C για 10min, ώστε να ανασταλεί η δράση του ενζύμου και να τερματίσει η αντίδραση. Ύστερα από την αντίδραση πέψης του DNA, έγινε ξανά ποσοτική μέτρηση του RNA φωτομετρικά με τη χρήση του Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

2.3.4 Καθαρισμός RNA με καθίζηση

Υλικά

- Φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη 24:25:1
- Χλωροφόρμιο
- Οξικό αμμώνιο 3M
- Αιθανόλη
- 75% αιθανόλη
- mQH₂O
- Σωληνάρια erpendorf

Οργανολογία

- Φυγόκεντρος
- Θάλαμος νηματικής ροής

Μεθοδολογία

Το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA μέσω Trizol που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.1, παρά την μεγάλη συγκέντρωση RNA που επιτυγχάνει, μειονεκτεί ως προς τη καθαρότητα των δειγμάτων, που είναι επιμολυσμένα με φαινολικές ενώσεις, πολυσακχαρίδια, πρωτεΐνες και άλατα. Για την απομάκρυνση των ενώσεων αυτών, έγινε επιπλέον διαδικασία καθαρισμού μέσω υγρής-υγρής εκχύλισης. Αρχικά, προστέθηκε ένας όγκος του διαλύματος φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη 24:25:1. Ακολούθησε σύντομη ανάδευση, με χρήση συσκευής vortex, και στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 13.000rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Η άνω υδατική φάση στην οποία εμπεριέχονταν το υδατοδιαλυτό RNA, μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο erpendorf των 1,5 ml. Η κάτω οργανική φάση που απορρίφθηκε, συγκέντρωνε τις λιγότερο πολικές πρωτεΐνες, τα μη πολικά πολυσακχαρίδια και άλατα. Στη συνέχεια, προστέθηκε ένας όγκος χλωροφόρμιου, και ακολούθησε η διαδικασία ανάδευσης και φυγοκέντρωσης όπως προηγουμένως. Η άνω φάση του διφασικού διαλύματος, απαλλαγμένη από τα φαινολικά παράγωγα, μεταφέρθηκε σε καινούριο σωληνάριο erpendorf και προστέθηκε μισός όγκος οξικού αμμώνιου 3M και δύο όγκοι καθαρής αιθανόλης. Ύστερα από μικρή ανάδευση με την πιπέτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -80 °C ο/ν. Με το πέρας της επώασης, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000rpm για 30min στους 4°C σχηματίζοντας ορατό λευκό ίζημα που συγκέντρωνε το RNA. Αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο, ακολούθησε ένα στάδιο πλύσης του ιζήματος με 100μl 75% αιθανόλης και ύστερα από φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 15min στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το ίζημα, ορατό ή όχι, αφέθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής να στεγνώσει και στη συνέχεια, επαναδιαλύθηκε σε 25μl dH₂O και μετρήθηκε η τελική συγκέντρωση του RNA σε σπεκτροφωτόμετρο.

2.3.5 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά

- Αγαρόζη
- Ρυθμιστικό Διάλυμα 1X TAE (Tris/Acetate/EDTA)
- Δείκτες μοριακών βαρών DNA (1 kb DNA Ladder-NEB)
- Διάλυμα χρώσης νουκλεοτιδίων (NEB)
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Εμπορική χλωρίνη

Οργανολογία

- Ζυγός, Denver Instrument Company
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης, Biorad
- Συσκευή για φωτογράφιση των πηκτών αγαρόζης (MiniBis Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltd.)

Μεθοδολογία

Ο έλεγχος της ακεραιότητας του RNA που ακολουθεί της διαδικασίας της απομόνωσής του, είναι απαραίτητος καθώς το μόριο μπορεί εύκολα να αυτολυθεί, είτε να υποστεί ενζυμική λύση από RNase. Η ευαισθησία του RNA οφείλεται στη χημικά ασταθή ριβονουκλεοτιδική αλυσίδα, λόγω της πυρηνόφιλης 2' OH ομάδας της ριβόζης. Ο έλεγχος της ακεραιότητας του, έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε γέλη αγαρόζης. Το αρνητικά φορτισμένο DNA έχει την ικανότητα να μετακινείται προς τον θετικό πόλο όταν δημιουργείται ηλεκτρικό πεδίο. Στην ικανότητα αυτή στηρίζεται και η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Η κίνηση του DNA εξαρτάται από το μέγεθός του. Η ύπαρξη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) συνεισφέρει στον προσδιορισμό της θέσης του DNA στο πήκτωμα καθώς η ουσία αυτή παρεμβάλλεται των αζωτούχων βάσεων στο δίκλωνο μόριο κατά την παρατήρηση του πηκτώματος με υπεριώδες φως.

Για την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιήθηκε 1% αγαρόζη σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE (Tris/Acetate/EDTA) και προστέθηκε 2% μη διαλυμένης εμπορικής χλωρίνης, βάση του πρωτοκόλλου που αναφέρουν οι Aranda *et al.* (2016). Στη συνέχεια, αφού το μίγμα θερμάνθηκε για 2min σε φούρνο μικροκυμάτων, προστέθηκαν 5μl από 10 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου και το διάλυμα στερεοποιήθηκε στο ειδικό εκμαγείο της γέλης. Η προσθήκη χλωρίνης μετουσιώνει τη δευτεροταγή δομή του RNA επιτρέποντας έτσι τον πιο εύκολο διαχωρισμό των μορίων στην πηκτή αγαρόζης και παράλληλα, καταστρέφει οποιαδήποτε παρούσα ριβονουκλεάση. Η τάση που τέθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης ήταν 80V για περίπου 1 ώρα.

Για την εκτίμηση της ακεραιότητας και καθαρότητας των δειγμάτων που έτρεξαν στην ηλεκτροφόρηση, τα προϊόντα της έγιναν ορατά ύστερα από έκθεση της γέλης σε υπεριώδη ακτινοβολία στη συσκευή MiniBis Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltd. Η άνω ριβοσωμική ζώνη

(28S rRNA) θα πρέπει να είναι περίπου δύο φορές η ένταση της κάτω ζώνης (18S rRNA). Εάν οι ζώνες rRNA είναι ίσης έντασης, τότε φαίνεται ότι υπήρξε κάποια λύση. Το mRNA τρέχει μεταξύ των 2 ριβοσωμικών ζωνών, δείχνοντας ίσως μια θολή εικόνα (smear). Μπάντες κάτω από τις ζώνες rRNA είναι ενδεικτικές της ύπαρξης μικρότερων ριβονουκλεοτιδικών αλυσίδων, προϊόντα της λύσης του RNA, ενώ υψηλότερες ζώνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους, υποδεικνύουν πιθανή επιμόλυνση του RNA με DNA.

2.3.6 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Υλικά

- Kit SuperScript II RT (Invitrogen)
- Oligo(dT)12-18
- dNTP Mix
- dH₂O
- RNaseOUT™ (Invitrogen)

Οργανολογία

- Φυγόκεντρος
Συσκευή PCR (MiniOpticon Real-Time PCR της εταιρίας Biorad)

Μεθοδολογία

Η σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) έγινε με χρήση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II RT και η αντίδραση εκτελέστηκε βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων φαίνονται παρακάτω. Η ποσότητα του RNA που χρησιμοποιήθηκε για κάθε δείγμα, βασίστηκε στα αποτελέσματα του Nanodrop. Είναι πολύ σημαντικό η αρχική ποσότητα του ολικού RNA που χρησιμοποιείται, να είναι ίδια για όλα τα δείγματα, ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων.

Oligo(dT)12-18 (500 µg/mL)	: 1µl
1–500 ng RNA	: x µl
dNTP Mix (10 mM)	: 1µl
dH ₂ O	: έως 12µl

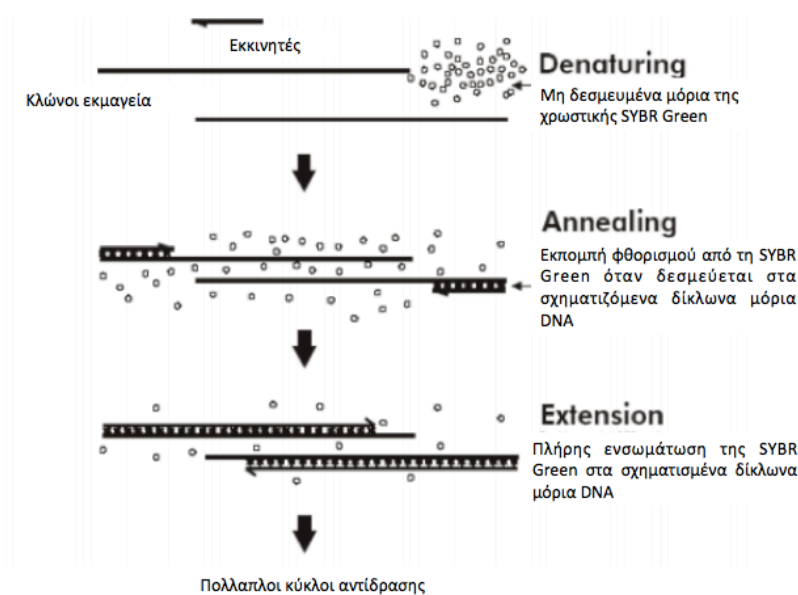
Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 5 λεπτά και ύστερα από άμεση ψύξη των δειγμάτων σε πάγο και σύντομη φυγοκέντρωση, προστέθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

5X First-Strand Buffer	: 4µl
0.1 M DTT	: 2µl
RNaseOUT™ (40 units/µL)	: 1µl

Ύστερα από ήπια ανάδευση, τα δείγματα επώαστηκαν στους 42°C για 2 λεπτά και ακολούθησε η προσθήκη 1 μL της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript™ II RT που αντιστοιχούν σε 200 units. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν στους 42°C για 50 λεπτά στο μηχάνημα της PCR και η αντίδραση τερματίστηκε με επώαση στους 70°C για 15 λεπτά.

2.3.7 Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR

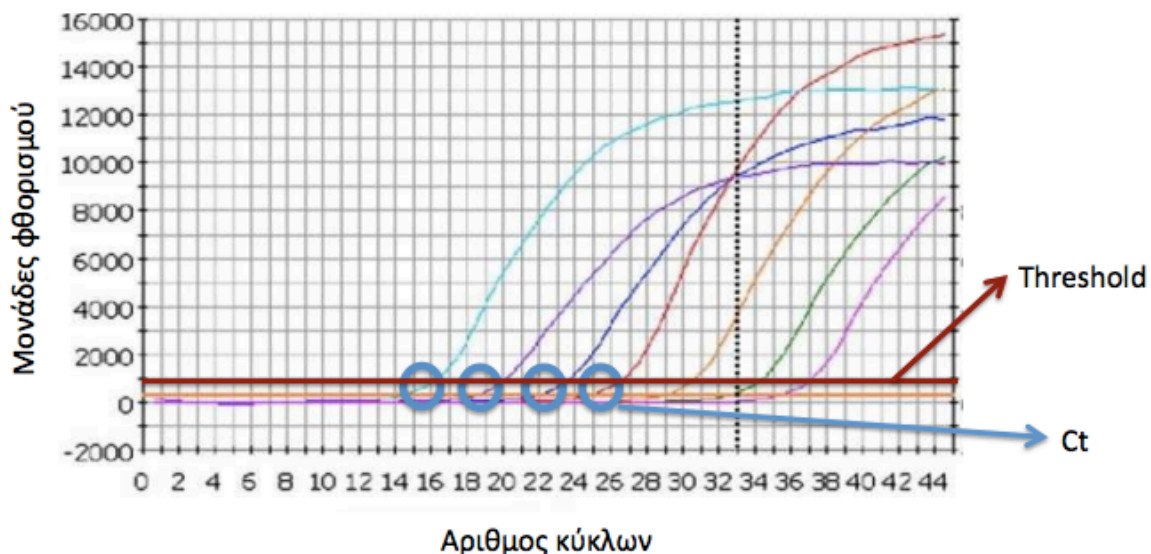
Η Real Time PCR αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση καθώς και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Πρόκειται για μία μέθοδο λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών DNA που δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθ' όλη τη διάρκεια εκτέλεσής της. Η παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA γίνεται με την σήμανση των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια (fluorescent reporter molecule). Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιούνται μετρήσεις των επιπέδων του φθορισμού στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση ρομποτικού σαρωτή. Τα δείγματα προς ανάλυση παρακολουθούνται με την βοήθεια αυτοποιημένου μηχανήματος ειδικού για την Real time PCR που είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή το οποίο παρέχει την δυνατότητα ανάλυσης και ποσοτικοποίησης του σήματος ανίχνευσης του DNA μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης.



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας πρόσδεσης της χρωστικής SYBR Green στην δίκλινη έλικα του DNA κατά την διάρκεια των βημάτων της PCR

Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η SYBR Green I, η οποία κατά την παρεμβολή της σε δίκλωνο DNA φθορίζει έντονα πράσινο χρώμα, ενώ όταν βρίσκεται ελεύθερη μέσα στο διάλυμα εμφανίζει σχετικά χαμηλό φθορισμό (Εικόνα 2.4). Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται ως αναλογική, σε συνάρτηση της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA στο διάλυμα.

Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που παράγονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η γραμμή Threshold είναι το σημείο στο οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real time PCR από το φόντο, ενώ ο κύκλος κατά την διάρκεια του οποίου, το δείγμα φτάσει την γραμμή Threshold ονομάζεται Threshold cycle (Ct) ή τιμή Ct (Εικ. 2.5.). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή Ct για κάθε δείγμα, δηλαδή αναλογικά η Ct θα είναι μικρότερη.



Εικόνα 2.5: Καταγραφή τιμών φθορισμού της χρωστικής SYBR Green που απεικονίζει την σταδιακή αύξηση της έντασης του φθορισμού σε σχέση με την αύξηση των αντιγράφων σε κάθε κύκλο. Με την οριοθέτηση του σημείου threshold, γίνεται πιο εύκολος ο προσδιορισμός της τιμής Ct.

Μεθοδολογία

Για τη μελέτη του επιπέδου έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων έγινε σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification). Η μέθοδος στηρίζεται στη σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπό μελέτη γονιδίου μετά από αλυσιδωτή ενίσχυση, με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference ή control gene). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο της ουβικουιλίνης. Το γονίδιο της ουβικουιλίνης, χρησιμοποιήθηκε για την αρχική κανονικοποίηση των cDNA, με σκοπό την εκτέλεση των κατάλληλων αραιώσεων ώστε στα εξεταζόμενα δείγματα η εκθετική φάση των αντιδράσεων για το γονίδιο αναφοράς να ξεκινά περίπου στον ίδιο χρόνο (απόκλιση Ct έως έναν κύκλο). Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η MiniOpticon Real-Time PCR (Biorad) (εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6 :MiniOpticon Real-Time PCR (Biorad)

Στις αντιδράσεις qRT-PCR, το μίγμα περιείχε 5 μ l SYBR Green (Invitrogen), 1 μ l για κάθε εκκινητή (10mM), 2 μ l H₂O και 1 μ l cDNA. Το πρόγραμμα της qRT-PCR περιελάμβανε έναν κύκλο αρχικής αποδιάταξης στους 95 °C για 3 min, 40 κύκλους συνιστώμενους από αποδιάταξη στους 95 °C για 0.6 min και υβριδισμό στους 60 °C για 1 min. Για κάθε δείγμα έγιναν 3 τεχνικές επαναλήψεις. Τα γονίδια που επελέγησαν βασίστηκαν σε δημοσιευμένες μελέτες που σχετίζονταν με την υποβολή υδατικής καταπόνησης σε διάφορες ποικιλίες *Glycine max*. Στον Πίνακα 2.1 καταγράφονται τα γονίδια που επελέγησαν.

Πίνακας 2.1: Λίστα των γονιδίων που επελέγησαν για τη μελέτη απόκρισης της σόγιας σε συνθήκες ξηρασίας.

Όνομα γονιδίου	Βιβλιογραφία
Dehydration-responsive binding protein (dreb1a)	Satoshi Kidokoro <i>et al.</i> (2015), R. Stolf-Moreira1 <i>et al.</i> (2010)
Dehydration-responsive element-binding protein 1B-like (dreb1b)	Satoshi Kidokoro <i>et al.</i> (2015)
Drought-induced proteinase inhibitor (defensin)	R. Stolf-Moreira1 <i>et al.</i> (2010)
Putative channel protein, aquaporin, (pip1b)	R. Stolf-Moreira1 <i>et al.</i> (2010)
Galactinol synthase (gols)	R. Stolf-Moreira1 <i>et al.</i> (2010)
Ethylene-response factor (ereb)	R. Stolf-Moreira1 <i>et al.</i> (2010)
D1-pyrroline-5-carboxylase synthetase p5cs	R. Stolf-Moreira1 <i>et al.</i> (2010)
Heat shock proteins70 kilodalton (hsp70)	Baoge Zhu <i>et al.</i> (2006)
Heat shock factor protein hsf8-related hsf1	Baoge Zhu <i>et al.</i> (2006)
Nuclear transcription factor Y subunit A-3-like nya3	Truyen N. Quach <i>et al.</i> (2015), Zhiyong Ni <i>et al.</i> (2013)
Dehydration-responsive binding element (DREB) protein	Amal Harb <i>et al.</i> (2010)

transcription factor	
Abcisic acid (ABA)-responsive element binding proteins (areb)	Shi-Qing Gao <i>et al.</i> (2011), Takuya Yoshida <i>et al.</i> (201009)
Leucine Zipper transcription factor (zip)	Shi-Qing Gao <i>et al.</i> (2011)
NAC family transcription factor	Dung Tien Le <i>et al.</i> (2012)
Glutathione transferase family (GSTs)	Labrou <i>et al.</i> (2015), Sharma <i>et al.</i> (2014)

Οι εξειδικευμένοι εκκινητές για κάθε γονίδιο στόχο (πίνακας 2.2) σχεδιάστηκαν με την χρήση του προγράμματος Primer Express (Applied Biosystems, Darmstadt), ενώ ελέγχθηκαν μέσω του αλγορίθμου blastn στις δημόσιες βάσεις δεδομένων και επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα σχηματισμού διμερών ή/και υβριδισμού τους και με άλλα γονίδια.

Πίνακας 2.2: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις qRT-PCR αναλύσεις.

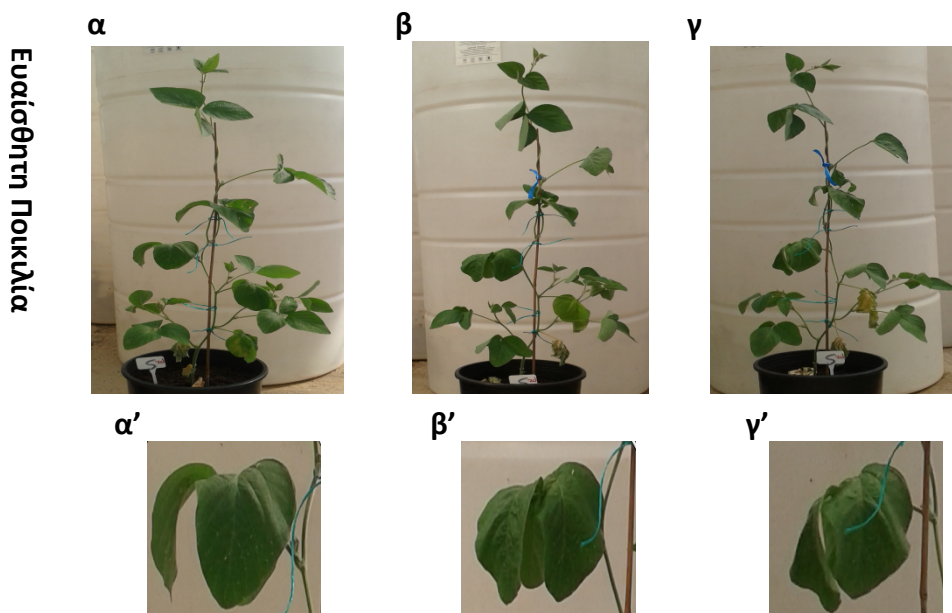
	Forward Primer	Reverse Primer
Gmdreb1a	CTGATTCCATTCGCCGAAAA	GTGGTGAAGCGCGGTTTG
Gmdefensin-190F	TGACACCAACTGTGGCTCTGTT	TGCGACGGAAGCCACG
Gmdefensin-403F	GGGTTTCTTTGTTTGCTCTATTTTAT	CCTTCACACTGATCACTCGTTTCA
Gmpip1b	CAACAGAAGGCCTGGGATGA	AAGGCTGCAATGGCTGCTC
Gmgols	GCGTCACCCTGAGAACGTTG	AAGGCTTAGACCCAGCAGCAC
Gmreb	CTCGGCGGAGACGCAAC	GAAGGCAGGTCGTCGAAGCT
Gmp5cs	GGGCACGATTTGGACTAGGTG	TCCTACTGGACCCCGAGCAT
GmHSP70-1028F	GCCCGTTTCGAAGAGCTTAAC	TCCCGCAAACACTTCTCCAC
GmHSP70-1521F	TTCCTCCTGCTCCGAGAGGT	GTTCAATATACCGTTGGCGTCAA
GmHsfA	GCGAACTCCAGTGTGAGAGGA	TTGGCTGCACCTCATTCTCC
GmNYA3	CCGTATCTTCACGAGTCCCG	TTGAGAAAGCGTCCACCAGC
GmDREB1B	AGCGCTGATTATCACACCGC	AATCCACAGTCGTTTCGCCA
GmAREb1	TGGTGCTCCTACGCATTTGTT	TCCAATCAACCCTCCCCTTCT
GmbZIP1B	TGCTGGTGCTCCTACGCATT	TCCAATCAACCCTCCCCTTCT
GmNAC11	ACAACCCCAATTGAACCCCTT	TGTTTGAAACTTGGCGCTTTG
GmNAC20	GCAGGGCAACAGCGAGTTT	GGAGCGGCGACATCTGATTAT
GmNAC038	GAGTTTGACACTGCCTCATATCGAA	ACGCACTTGCTCCAACCTTGAT
GmNAC085	TCGGCCACAGCCATGTAAAC	CCTCACACCGCTTTGAACCTC
GmNAC092	GACGCAAGGCATGGTGAACCT	ACGTGCCACATGGCATAA
GmNAC101	CGTCAACACGCTGCAACAA	AACCCCTGCACCCAAGTT
GmNAC127	GATGACTGGGTTCTATGCCGG	GATGCTGCCTCTGTGGTTGG
GmGST4	TCCACAATGGCAAACCCAT	TCTGTCAATCCAAACCTCCTCA
GmGST2	TGTTGCCAAGTCTTCTCTGA	GGCCAAGAATGATCAATACGTC
GmGST10	AAATTGTTGGAGGAACAGCTGG	CAATGTTGAGGCTGCCAAAAG

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν συγκρίνοντας τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ως προς το γονίδιο αναφοράς, χρησιμοποιώντας την εξίσωση $Eff^{-\Delta Ct}$ όπου Eff: η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης PCR και ΔCt : Ctγονιδίου αναφοράς- Cτεξεταζόμενου γονιδίου.

3. Αποτελέσματα

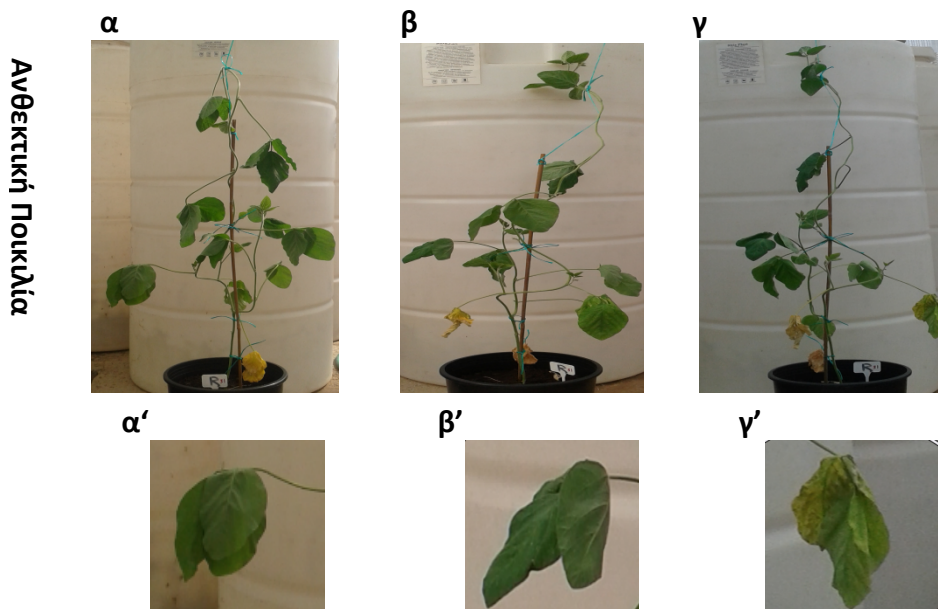
3.1 Φαινοτυπικές παρατηρήσεις στα πειράματα θερμοκηπίου

Με στόχο τη μελέτη της απόκρισης φυτών σόγιας στην υδατική καταπόνηση διεξήχθησαν πειράματα στο θερμοκήπιο (βλ παράγραφο 2.1). Το υδατικό στρες διήρκεσε 6 ημέρες, κατά το οποίο στα υπό μελέτη φυτά δε χορηγήθηκε καθόλου νερό, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν φυτά-μάρτυρες (controls), η άρδευση των οποίων γινόταν κανονικά. Το υλικό που παρουσιάζεται είναι ενδεικτικό της φαινοτυπικής απόκρισης των φυτών σόγιας που εξετάστηκαν. Στην εικόνα 3.1 παρουσιάζεται άτομο της ευαίσθητης ποικιλίας κατά την (α) 4^η (β) και 6^η ημέρα (γ) μετά την υποβολή υδατικού στρες. Όπως φαίνεται από την εικόνα, ήδη από τη 4^η ημέρα, τα φύλλα παρουσιάζουν συμπτώματα συρρίκνωσης που επεκτάθηκαν στα περισσότερα φύλλα κατά την παρατεταμένη καταπόνηση την 6^η ημέρα.



Εικόνα 3.1: Φαινότυπος φυτών σόγιας που υπέστησαν υδατική καταπόνηση σε πειράματα θερμοκηπίου. Φυτό της ευαίσθητης ποικιλίας κατά την (α) 4^η (β) και 6^η (γ) ημέρα εφαρμογής του στρες. Κάτωθεν των φωτογραφιών φαίνεται σε μεγέθυνση η φαινοτυπική απόκριση φύλλου του φυτού, με α', β', γ' τα αντίστοιχα χρονικά σημεία.

Στην εικόνα 3.2 παρουσιάζονται οι φαινοτυπικές μεταβολές που υπέστη άτομο της ανθεκτικής ποικιλίας κατά την εφαρμογή υδατικού στρες στο θερμοκήπιο. Η συμπτωματολογία ήταν εκτενέστερη εν συγκρίσει με την ευαίσθητη ποικιλία. Την 4^η ημέρα, η συρρίκνωση των φύλλων ήταν εμφανής στο μεγαλύτερο ποσοστό των φύλλων και των 40 υποβεβλημένων σε στρες φυτών. Την 6^η ημέρα, τα φύλλα υπέστησαν περαιτέρω συρρίκνωση, ενώ μέρος αυτών εμφάνιζε συμπτώματα μαρασμού. Γηραιότερα κατώτερα φύλλα αποπέσαν στις περισσότερες των περιπτώσεων.



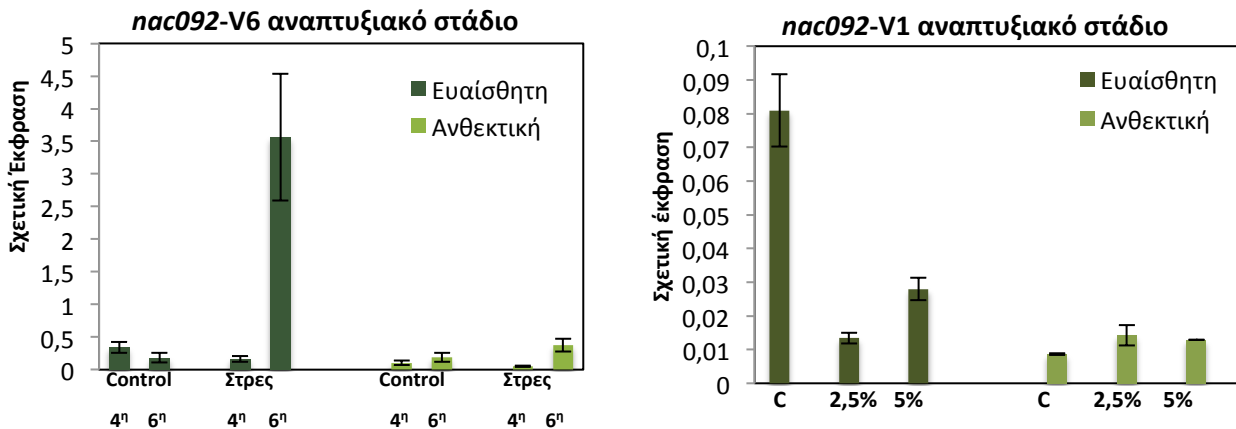
Εικόνα 3.2: Φαινότυπος φυτών σόγιας που υπέστησαν υδατική καταπόνηση σε πειράματα θερμοκηπίου. Φυτό της ευαίσθητης ποικιλίας κατά την (α) 4^η (β) και 6^η (γ) ημέρα εφαρμογής του στρες. Κάτωθεν των φωτογραφιών φαίνεται σε μεγέθυνση η φαινοτυπική απόκριση φύλλου του φυτού, με α', β', γ' τα αντίστοιχα χρονικά σημεία.

3.2 Ανάλυση έκφρασης των γονιδίων μέσω qRT-PCR

Όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2, για την ανάλυση έκφρασης των γονιδίων, προηγήθηκε ολική απομόνωση του RNA από φύλλα αναπτυξιακού σταδίου V6, καθαρισμός των RNA απομονώσεων και, ύστερα από αυστηρή κανονικοποίηση του ολικού RNA των δειγμάτων, ακολούθησαν αντιδράσεις ημιποσοτικής Real Time PCR. Η επιλογή των εξεταζόμενων γονιδίων βασίστηκε σε βιβλιογραφική και *in silico* έρευνα που αφορούσε στον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση της *Glycine max* στην υδατική καταπόνηση. Η μελέτη κατέδειξε στα γονίδια της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα NAC, της οικογένειας των ενζύμων μεταφοράς της γλουταθειόνης (GSTs-Glutathione S-transferases), της οικογένειας των heat-shock πρωτεϊνών και άλλων μεταγραφικών παραγόντων που αποκρίνονται είτε αυξάνοντας ή μειώνοντας την έκφρασή τους κατά την υποβολή της υδατικής καταπόνησης (βλ πίνακα 2.1). Οι αναλύσεις των δειγμάτων από τα *in vitro* πειράματα υδατικής καταπόνησης, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG6000), σε φυτά V1 αναπτυξιακού σταδίου, έγιναν ύστερα από ομαδοποίηση (bulk) των φυταρίων για την κάθε μεταχείριση. Σημαντική μεταβολή της έκφρασης θεωρήθηκαν οι περιπτώσεις των μεταχειρίσεων που άλλαξαν τα επίπεδα της έκφρασης κατά ≥ 2 φορές με ελάχιστο επίπεδο σημαντικότητας $< 0,05$. Στις επόμενες παραγράφους αναλύονται τα αποτελέσματα της qRT-PCR για το κάθε τα υπό μελέτη γονίδια.

3.2.1 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *nac092*

Στο διάγραμμα 3.1 αριστερά, απεικονίζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *nac092* στις δύο ποικιλίες σόγιας κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο που εξετάστηκε σε φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση σε συνθήκες θερμοκηπίου. Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα, δεν παρουσιάστηκε σημαντική μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου μεταξύ των φυτών-μαρτύρων των δύο ποικιλιών. Αντιθέτως, η διαφορά στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης στα στρεσαρισμένα φυτά των δύο ποικιλιών, είναι ευδιάκριτη. Συγκεκριμένα, η έκφραση του εξεταζόμενου γονιδίου στην ευαίσθητη ποικιλία κατά την 4^η ημέρα της υδατικής καταπόνησης, διατηρείται στα ίδια χαμηλά επίπεδα με τα φυτά-μάρτυρες πλήρους άρδευσης. Ωστόσο, την 6^η ημέρα της καταπόνησης, η έκφραση του γονιδίου είναι 20 φορές υψηλότερη (p 0,0017) σε σχέση με τα μη υποβεβλημένα σε στρες φυτά. Στα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, η έκφραση του γονιδίου παραμένει χαμηλή καθ'όλη τη διάρκεια εφαρμογής του στρες, χωρίς να παρατηρείται σημαντική μεταβολή στην έκφραση σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες.



Γράφημα 3.1 Σχετική έκφραση γονιδίου *nac092* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4^η και 6^η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

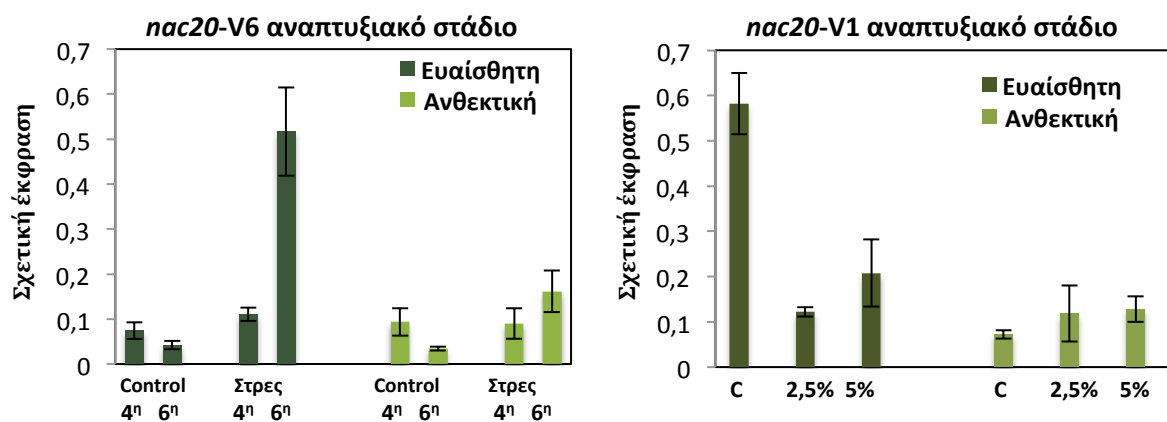
Οι αναλύσεις που έγιναν στα δείγματα που συλλέγησαν κατά το πρώιμο στάδιο ανάπτυξης V1 των δύο ποικιλιών της σόγιας, που υποβλήθηκαν σε *in vitro* υδατικό στρες, έδειξαν διαφορετική εικόνα ως προς την έκφραση του *nac092*. Στο διάγραμμα 3.1 δεξιά, απεικονίζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου στις δύο ποικιλίες, σε φυτά μάρτυρες (C) και σε φυτά που υποβλήθηκαν σε δύο επίπεδα καταπόνησης: 2,5% και 5% PEG 6000. Τα φυτά-μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας, παρουσίασαν δεκαπλάσια περίπου επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τα φυτά της ανθεκτικής. Τα φυτά της ευαίσθητης που αναπτύχθηκαν παρουσία πολυαιθυλενικής γλυκόλης, έδειξαν 6 φορές χαμηλότερα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης κατά το 1^ο επίπεδο στρες (2,5% PEG) και λιγότερο χαμηλά (κατά 3 φορές) στο 2^ο επίπεδο στρες (5%

PEG). Αντιθέτως, η ανθεκτική ποικιλία δεν έδειξε σημαντική διαφοροποίηση στα εκφραζόμενα επίπεδα, τα οποία υπήρξαν χαμηλά σε όλες τις περιπτώσεις.

Συγκρίνοντας την έκφραση του γονιδίου μεταξύ των δύο αναπτυξιακών σταδίων, στη περίπτωση των φυτών-μαρτύρων της ευαίσθητης ποικιλίας, το γονίδιο εκφράζεται σε υποτριπλάσιο βαθμό κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια σε σχέση με το ανεπτυγμένο φυτό. Τα στρεσαρισμένα φυτά της ίδιας ποικιλίας, υπερεκφράζουν το γονίδιο *nac092* κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο ενώ αντίθετα, κατά το πρώιμο στάδιο μειώνουν την έκφρασή του. Όσον αφορά την ανθεκτική ποικιλία, τα φυτά-μάρτυρες του V6 σταδίου επάγουν την έκφραση του γονιδίου κατά 16 φορές περισσότερο σε σχέση με τα φυτά του V1 αναπτυξιακού σταδίου. Τα υπό υδατική καταπόνηση φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, δε δείχνουν σημαντική διαφοροποίηση στην έκφραση του γονιδίου *nac092*.

3.2.2 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *nac20*

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *nac20*, από τα δείγματα που συλλέγησαν κατά το πείραμα υδατικής καταπόνησης στο θερμοκήπιο, απεικονίζεται στο διάγραμμα 3.2 (αριστερά). Μεταξύ των φυτών μαρτύρων των δύο ποικιλιών, δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου. Τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας που υποβλήθηκαν σε στρες, κατά την 4^η ημέρα της καταπόνησης παρουσίασαν ανάλογη με τους μάρτυρες γονιδιακή έκφραση, ωστόσο, κατά την 6^η ημέρα παρουσίασαν 12πλάσιο επίπεδο έκφρασης ($p < 0,016$). Αντίστοιχα, η ανθεκτική ποικιλία παρουσίασε ανάλογο προφίλ γονιδιακής έκφρασης, με μικρότερη ωστόσο επαγωγή έκφρασης. Συγκεκριμένα, κατά την 4^η ημέρα η έκφραση του γονιδίου *nac20* ήταν στο ίδιο επίπεδο με τους μάρτυρες, ενώ την 6^η ημέρα πενταπλασιάστηκε (τιμή $p < 0,02$).



Γράφημα 3.2 Σχετική έκφραση γονιδίου *nac20* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

Στο διάγραμμα 3.2 (δεξιά), παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *nac20* στις δύο ποικιλίες σόγιας σε φυτά V1 αναπτυξιακού σταδίου. Τα φυτά-μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας, χαρακτηρίζονταν από σημαντικά αυξημένη (υπερπενταπλάσια) έκφραση του γονιδίου *nac20* σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας. Όσον αφορά τα στρεσαρισμένα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας, υπήρξε εμφανής μείωση της έκφρασης, περίπου υποτετραπλάσια, σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες και στα δύο επίπεδα στρες. Αντίθετα, στα στρεσαρισμένα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, σε σημειώθηκε σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασης σε κανένα από τα δύο επίπεδα στρες σε σχέση με τους μάρτυρες.

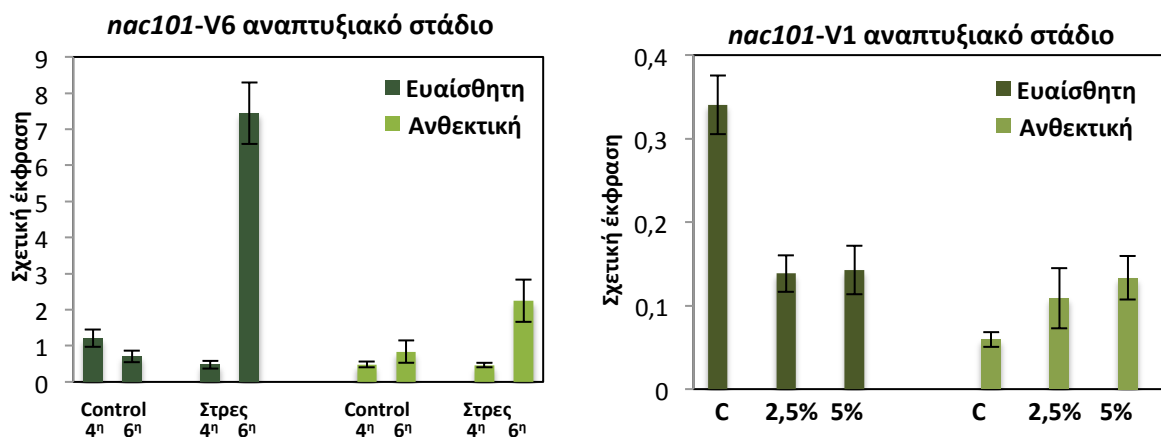
Αντιπαραθέτοντας τα αποτελέσματα των αναλύσεων των φυτών-μαρτύρων της ευαίσθητης ποικιλίας κατά τα δύο εξεταζόμενα αναπτυξιακά στάδια, διαπιστώνεται η 10 φορές υψηλότερη έκφραση του γονιδίου *nac20* κατά το νεαρό στάδιο. Τα στρεσαρισμένα φυτά της ίδιας ποικιλίας, κατά το V6 στάδιο έδειξαν σημαντική επαγωγή της έκφρασης, ενώ τα νεαρά φυτά έδειξαν σημαντική μείωση. Η ανθεκτική ποικιλία, διατηρεί σταθερά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *nac20* και στα δύο εξεταζόμενα στάδια ανάπτυξης.

3.2.3 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *nac101*

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης qRT-PCR για το γονίδιο *nac101*, καταδεικνύουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των μεταχειρίσεων που εφαρμόστηκαν σε πειράματα του θερμοκηπίου (διάγραμμα 3.3 αριστερά). Όσον αφορά τα φυτά μάρτυρες, τόσο της ευαίσθητης όσο και της ανθεκτικής ποικιλίας, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *nac101* κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα. Η ευαίσθητη ποικιλία, την 4^η ημέρα της καταπόνησης δεν έδειξε σημαντική διαφοροποίηση στην έκφραση, ωστόσο, την 6^η ημέρα ακολούθησε δεκαπλάσια αύξηση ($p < 0,035$) σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες. Τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, δεν έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασης κατά τη 4^η ημέρα εφαρμογής της υδατικής καταπόνησης, αλλά κατά το παρατεταμένο στρες των 6 ημερών τα φυτά παρουσίασαν αυξημένη κατά 2,5 φορές γονιδιακή έκφραση.

Στο διάγραμμα 3.3 (δεξιά), απεικονίζεται η η διαφορά στο μεταγραφικό προφίλ του γονιδίου *nac101* μεταξύ των δύο ποικιλιών σόγιας σε νεαρό στάδιο ανάπτυξης, κατά τα *in vitro* πειράματα υδατικής καταπόνησης. Τα φυτά-μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας, εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη γονιδιακή έκφραση (6πλάσια) σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας. Κατά το στρες, τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας, παρουσιάζουν μειωμένη κατά το ήμισυ έκφραση, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο επιπέδων στρες. Στην ανθεκτική ποικιλία αντίθετα, τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης δε μεταβλήθηκαν κατά την επιβολή στρες 2,5%PEG αλλά διπλασιάστηκαν κατά την υποβολή του μεγαλύτερου επιπέδου στρες (5%PEG). Η συγκριτική μελέτη της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο υπό μελέτη αναπτυξιακών σταδίων, καταδεικνύει τα εμφανώς μειωμένα επίπεδα έκφρασης στο νεαρό εξεταζόμενο αναπτυξιακό στάδιο, σε σχέση με το στάδιο V6. Κατά το αναπτυξιακό στάδιο V1, τα φυτά-μάρτυρες της ευαίσθητης και ανθεκτικής ποικιλίας παρουσιάζουν μειωμένη κατά 3,5 και 13 φορές αντίστοιχα έκφραση του γονιδίου *nac101*. Τα στρεσαρισμένα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας χαρακτηρίζονταν από μειωμένη

έκφραση κατά το νεαρό στάδιο και σημαντική υπερέκφραση του γονιδίου σε ανεπτυγμένο στάδιο. Όσον αφορά το μεταγραφικό προφίλ της ανθεκτικής ποικιλίας υπό συνθήκες στρες, κατά τα πρώτα επίπεδα στρες (4^η ημέρα και 2,5%PEG) δεν παρουσιάστηκε μεταβολή της έκφρασης του *nac101* ενώ, κατά το παρατεταμένο στρες (6 ημέρες και 5%PEG), σημειώθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης.



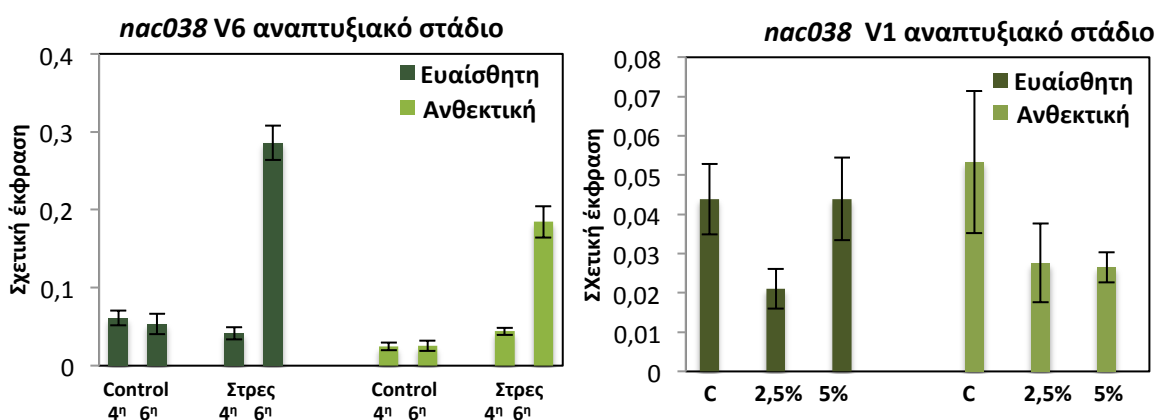
Γράφημα 3.3 Σχετική έκφραση γονιδίου *nac101* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσοαρτισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

3.2.4 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *nac038*

Το διάγραμμα 3.4 (αριστερά), δείχνει τις μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου *nac038* στα φυτά σόγιας των δύο ποικιλιών κατά τα πειράματα υδατικής καταπόνησης στο θερμοκήπιο. Συγκρίνοντας τη σχετική έκφραση του γονιδίου ανάμεσα στα φυτά-μάρτυρες, η ευαίσθητη ποικιλία χαρακτηρίζεται από τριπλάσια επίπεδα γονιδιακής έκφρασης σε σχέση με την ανθεκτική. Τα στρεσοαρτισμένα κατά το V6 στάδιο φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας δεν άλλαξαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου την 4^η ημέρα του στρες ενώ αντίθετα την 6^η ημέρα, υπερέκφρασαν το γονίδιο κατά 5 φορές (τιμή p 0,0001) σε σχέση με τους μάρτυρες της ίδιας ποικιλίας. Παρόμοιο προφίλ έκφρασης παρουσίασαν και τα στρεσοαρτισμένα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, τα οποία την 4^η ημέρα διατήρησαν την έκφραση στα ίδια επίπεδα με τους μάρτυρες, αλλά την 6^η ημέρα επταπλασίασαν την έκφραση του *nac038*.

Στο διάγραμμα 3.4 (δεξιά), απεικονίζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *nac038* στις δύο ποικιλίες κατά το στάδιο σχηματισμού της πρώτης τριπλέτας φύλλων, υπό συνθήκες απουσίας (μάρτυρες) και παρουσίας πολυεθυλενικής γλυκόλης σε δύο επίπεδα (2,5% και 5%). Στους

μάρτυρες, η έκφραση του γονιδίου δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο ποικιλιών. Τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας σε επίπεδο στρες 2,5% PEG, παρουσίασαν μειωμένη κατά το ήμισυ έκφραση του γονιδίου, ενώ στο υψηλότερο επίπεδο στρες (5% PEG), τα επίπεδα έκφρασης ήταν ίδια με αυτά των μαρτύρων. Η ανθεκτική ποικιλία δεν παρουσίασε μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου υπό την παρουσία PEG στο μέσο ανάπτυξης. Συγκρίνοντας τα δεδομένα που παραθέτονται στα δύο παραπάνω γραφήματα, υπάρχουν διαφορές στο προφίλ έκφρασης του γονιδίου *nac038* μεταξύ των δύο αναπτυξιακών σταδίων. Τα επίπεδα έκφρασης ωστόσο, δεν διαφέρουν μεταξύ των φυτών-μαρτύρων της κάθε ποικιλίας. Τόσο η ανθεκτική όσο και η ευαίσθητη ποικιλία, αποκρίνονται στο στρες με αύξηση της έκφρασης στο V6 στάδιο και αντίστοιχη μείωσή της κατά το V1 στάδιο ανάπτυξης.



Γράφημα 3.4 Σχετική έκφραση γονιδίου *nac038* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσορρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

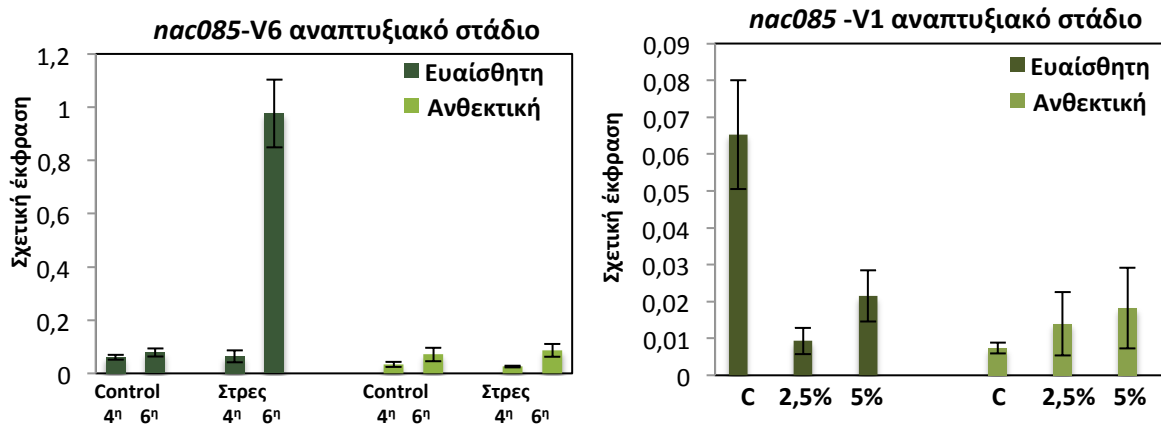
3.2.5 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *nac085*

Στο διάγραμμα 3.5 (αριστερά), απεικονίζεται η επίδραση της υδατικής καταπόνησης στην έκφραση του γονιδίου *nac085*, κατά τις δοκιμές που έλαβαν χώρα στο θερμοκήπιο. Τα αποτελέσματα της qRT-PCR κατέδειξαν τη μη ύπαρξη διαφοροποίησης στη γονιδιακή έκφραση του γονιδίου μεταξύ των δύο ποικιλιών κατά την πλήρη άρδευση. Η επιβολή του στρες στα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας, δεν άλλαξε τα επίπεδα έκφρασης την 4^η ημέρα, αλλά προκάλεσε εντυπωσιακή αύξηση στην έκφραση του γονιδίου την 6^η ημέρα, ξεπερνώντας κατά 12 φορές το επίπεδο έκφρασης των μαρτύρων ($p < 0,0008$). Τα στρεσορρισμένα φυτά της

ανθεκτικής ποικιλίας αντίθετα, ακολούθησαν διαφορετικό προφίλ διατηρώντας σταθερά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έκφρασης του γονιδίου *nac085* από τις εργαστηριακές δοκιμές υδατικής έλλειψης στις δύο ποικιλίες σόγιας, απεικονίζονται στο διάγραμμα 3.5 (δεξιά). Υπάρχει σαφής διαφορά μεταξύ των φυτών-μαρτύρων των δύο ποικιλιών, με 8πλάσια την έκφραση του γονιδίου στα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας. Η εφαρμογή του στρες στα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση, κατά περισσότερο από 4 φορές, της έκφρασης και στα δύο επίπεδα στρες (2,5% και 5% PEG). Αντίθετα, τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, δεν παρουσίασαν μεταβολή στην έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου.

Η συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων υποδεικνύει την ύπαρξη διαφορών στο προφίλ έκφρασης του γονιδίου *nac085* μεταξύ των δύο εξεταζόμενων φάσεων ανάπτυξης. Οι μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας διατηρούν τα ίδια επίπεδα έκφρασης τόσο στο ανεπτυγμένο όσο και στο νεαρό στάδιο ενώ αντίθετα, τα φυτά πλήρους άρδευσης της ανθεκτικής ποικιλίας παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη έκφραση (7 φορές) κατά το V1 στάδιο ανάπτυξης σε σχέση με το V6. Τα στρεσοαρισμένα φυτά της ευαίσθητης αυξάνουν την έκφραση όταν βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης, αλλά σε νεαρό στάδιο υποεκφράζουν το γονίδιο. Η ανθεκτική ποικιλία δεν έδειξε διαφοροποίηση στην έκφραση σε κανένα από τα δύο αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν.



Γράφημα 3.5 Σχετική έκφραση γονιδίου *nac085* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσοαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

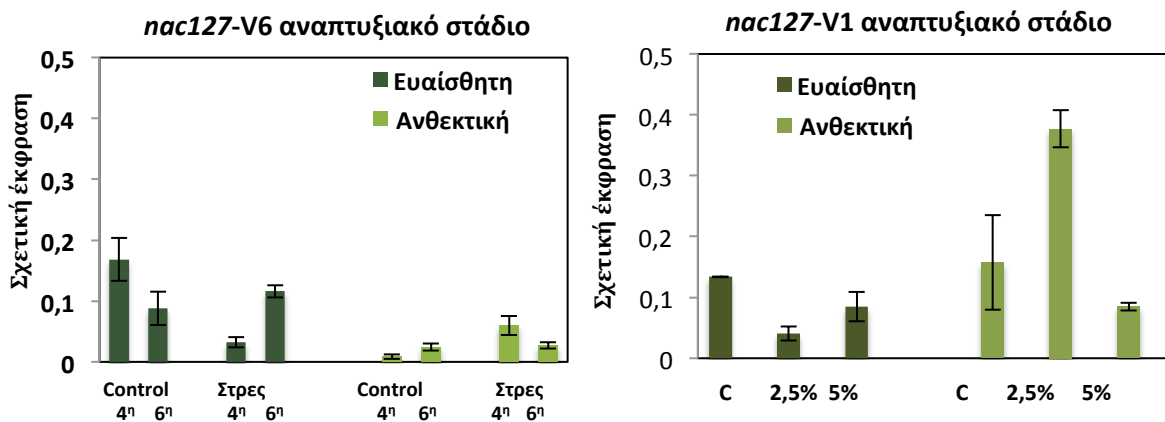
3.2.6 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *nac127*

Τα αποτελέσματα της έκφρασης του γονιδίου *nac127* κατά τον έλεγχο απόκρισης των 2 ποικιλιών σόγιας στα πειράματα του θερμοκηπίου παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.6

(αριστερά). Συγκρίνοντας τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στα φυτά-μάρτυρες, παρατηρείται κατά 8 φορές περίπου υψηλότερη έκφραση στα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας. Όσον αφορά την απόκρισή τους στο στρες, είναι προφανές ότι οι υπό μελέτη ποικιλίες παρουσιάζουν αντίθετο μεταγραφικό προφίλ. Συγκεκριμένα, κατά την 4^η ημέρα υποβολής του στρες, η ευαίσθητη ποικιλία, εμφάνισε υποπενταπλάσια έκφραση του γονιδίου (τιμή p 0,005) σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες ενώ κατά την 6^η ημέρα, η γονιδιακή έκφραση αυξήθηκε για να φτάσει τα ίδια επίπεδα με τα controls. Από την άλλη, τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, επταπλασίασαν (τιμή p 0,0037) τη 4^η ημέρα την έκφραση του γονιδίου και με το πέρασμα των επόμενων δύο ημερών, η έκφραση μειώθηκε στα ίδια επίπεδα με τους μάρτυρες.

Αντίστοιχες διαφοροποιήσεις έδειξαν οι αναλύσεις της έκφρασης του *nac127*, στα πειράματα που εκτελέστηκαν στο εργαστήριο (βλ διάγραμμα 3.6 δεξιά). Η σχετική έκφραση των μαρτύρων κυμάνθηκε στις ίδιες τιμές μεταξύ των δύο ποικιλιών. Στην περίπτωση των υποβεβλημένων σε στρες φυτών της ευαίσθητης ποικιλίας, κατά το 1^ο επίπεδο στρες (2,5% PEG) η έκφραση υποτριπλασιάστηκε, ενώ υπό την παρουσία 5%PEG στο μέσο ανάπτυξης των φυτών, η έκφραση διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα με αυτή των controls. Διαφορετική απόκριση στο στρες έδειξε η ανθεκτική ποικιλία, αυξάνοντας την έκφραση κατά 2,5 φορές στο 1^ο επίπεδο στρες, ενώ κατά το 2^ο επίπεδο, η έκφραση δε διέφερε από αυτή των controls.

Από τα συγκριτικά της έκφρασης του γονιδίου *nac127*, προκύπτει η εμφανώς ανάλογη τάση στην έκφραση μεταξύ των δύο εξεταζόμενων αναπτυξιακών σταδίων. Η ευαίσθητη ποικιλία δεν έδειξε διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Τα φυτά μάρτυρες της ανθεκτικής ποικιλίας, είχαν 6 φορές υψηλότερη έκφραση κατά το V1 στάδιο ανάπτυξης του φυτού, συγκριτικά με τα ανεπτυγμένα φυτά των πειραμάτων του θερμοκηπίου. Η έκφραση του *nac127* στα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας υπό συνθήκες στρες, αυξήθηκε κατά τη διάρκεια και των δύο αναπτυξιακών σταδίων με μεγαλύτερη ένταση στο πρώιμο στάδιο ανάπτυξης.



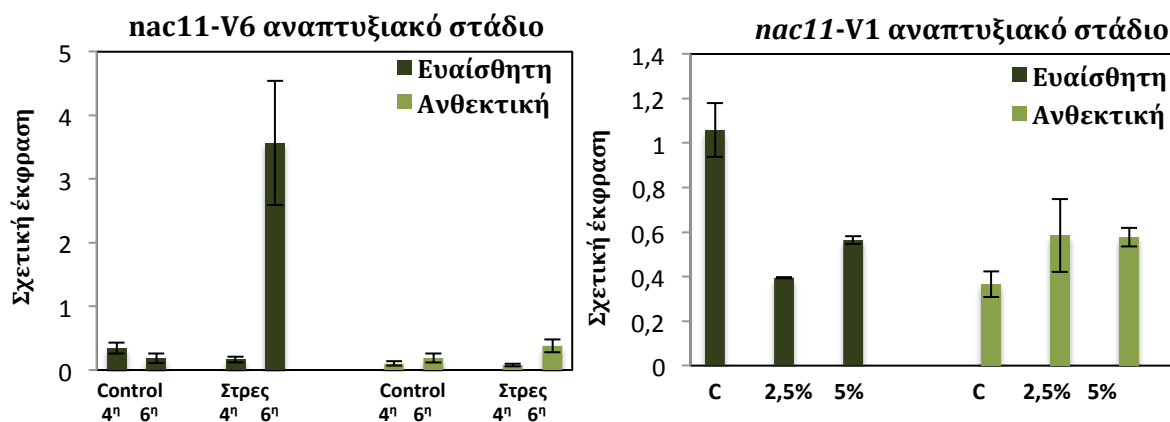
Γράφημα 3.6 Σχετική έκφραση γονιδίου *nac127* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσορραρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

3.2.7 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *nac11*

Η απόκριση των δύο ποικιλιών σόγιας αναπτυξιακού σταδίου V6 στην υδατική καταπόνηση, ως προς την έκφραση του γονιδίου *nac11*, παρουσιάζεται στο διάγραμμα 3.7 (αριστερά). Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση του γονιδίου μεταξύ των μαρτύρων των δύο ποικιλιών. Τα στρεσαρισμένα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας κατά την 4^η ημέρα δεν εμφάνισαν μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ενώ αντιθέτως, την 6^η ημέρα χαρακτηρίζονταν από σημαντικά αυξημένη (20πλάσια) σχετική έκφραση ($p < 0,01$). Τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας δεν εμφάνισαν μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου *nac11*, η οποία παρέμεινε στα ίδια επίπεδα με αυτή των φυτών-μαρτύρων.

Αναφορικά με την απόκριση των εξεταζόμενων φυτών υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο, παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις στην έκφραση του γονιδίου *nac11*. Μεταξύ των μαρτύρων (C) των δύο ποικιλιών, η ευαίσθητη ποικιλία φαίνεται να εκφράζει σχεδόν σε τριπλάσιο βαθμό το γονίδιο *nac11* σε σχέση με την ανθεκτική. Τα στρεσαρισμένα φυτά της ευαίσθητης, εμφανίζουν μειωμένη κατά το ήμισυ έκφραση και στα δύο επίπεδα στρες (2,5% και 5% PEG). Αντιθέτως, η υποβολή στρες δεν επέφερε μείωση στα επίπεδα έκφρασης στην ανθεκτική ποικιλία.

Αντιπαραθέτοντας τα δύο υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια, προκύπτει ότι τα φυτά-μάρτυρες τόσο της ευαίσθητης όσο και της ανθεκτικής ποικιλίας εμφανίζουν αυξημένη, κατά 3 και 2,5 φορές αντίστοιχα, γονιδιακή έκφραση κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Τα υποβεβλημένα σε στρες V6 φυτά της ευαίσθητης, υπερέκφρασαν το γονίδιο εν αντιθέσει με τα νεαρά φυτά V1 αναπτυξιακού σταδίου, που μείωσαν τα επίπεδα έκφρασης. Όσον αφορά την ανθεκτική ποικιλία, η απουσία μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου *nac11* ήταν χαρακτηριστική και στα δύο αναπτυξιακά στάδια.



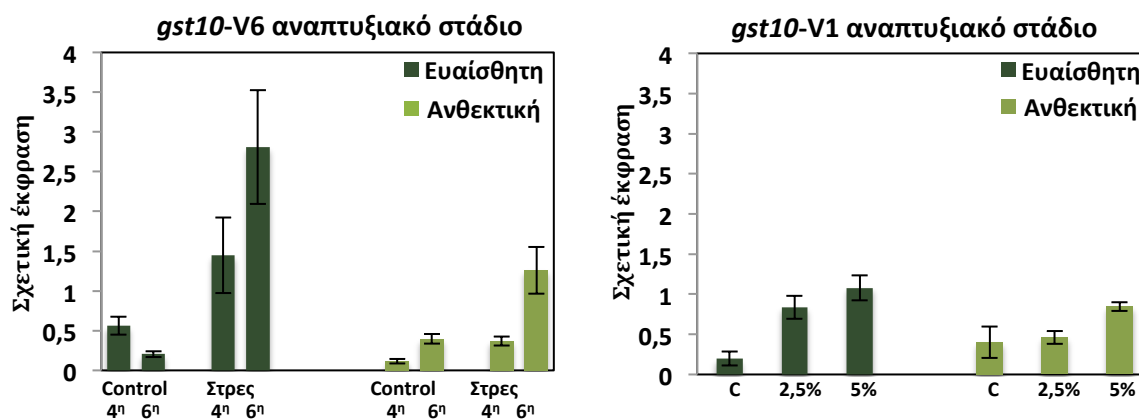
Γράφημα 3.7 Σχετική έκφραση γονιδίου *nac11* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

3.2.8 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *gst10*

Αναφορικά με το γονίδιο *gst10*, είναι φανερή η διαφοροποίηση της σχετικής του έκφρασης μεταξύ των υπό μελέτη μεταχειρίσεων (γράφημα 3.8, αριστερά). Η έκφραση του εξεταζόμενου γονιδίου στα φυτά-μάρτυρες των δύο ποικιλιών, κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα. Όσον αφορά τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας, κατά την 4^η ημέρα εφαρμογής του στρες δεν παρουσίασαν μεταβολή στην έκφραση, ωστόσο την 6^η ημέρα η έκφρασή τους αυξήθηκε σημαντικά (13 φορές) σε σχέση με τους μάρτυρες (p 0,01). Διαφορετική υπήρξε η εικόνα για την ανθεκτική ποικιλία, που τριπλασίασε (τιμή p 0,004) τη σχετική έκφραση του γονιδίου από την 4^η ημέρα και διατήρησε την έκφραση στα ίδια επίπεδα και την 6^η ημέρα.

Τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων για το γονίδιο *gst10* δείχνουν να μην υπάρχει σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση μεταξύ των controls των δύο ποικιλιών κατά το V1 στάδιο ανάπτυξης (γράφημα 3.8, δεξιά). Τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας 4πλασίασαν και 5πλασίασαν την έκφραση του γονιδίου υπό το στρες των 2,5% και 5%PEG αντίστοιχα. Η ανθεκτική ποικιλία δεν έδειξε να επηρεάζεται κατά το στρες των 2,5%, διπλασιάζοντας ωστόσο την έκφραση, υπό το μεγαλύτερο στρες των 5%PEG.

Από τη συγκριτική ανάλυση προκύπτει ότι τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας που δεν υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση εκφράζουν στο διπλάσιο το γονίδιο *gst10* κατά το ανεπτυγμένο V6 στάδιο, σε σχέση με το νεαρό. Ενώ τα φυτά της ίδια ποικιλίας που εφαρμόστηκε το στρες, αν και έδειξαν να υπερεκφράζουν το γονίδιο και στις δύο περιπτώσεις, κατά το V6 στάδιο η υπερέκφραση γίνεται σε μεγαλύτερο βαθμό. Η ανθεκτική ποικιλία δείχνει παρόμοια εικόνα, καθώς οι μάρτυρες έχουν τα ίδια επίπεδα έκφρασης και στις δύο εξεταζόμενες φάσεις ανάπτυξης ενώ υπό στρες, τα V1 και V6 φυτά της ανθεκτικής υπερεκφράζουν το γονίδιο.



Γράφημα

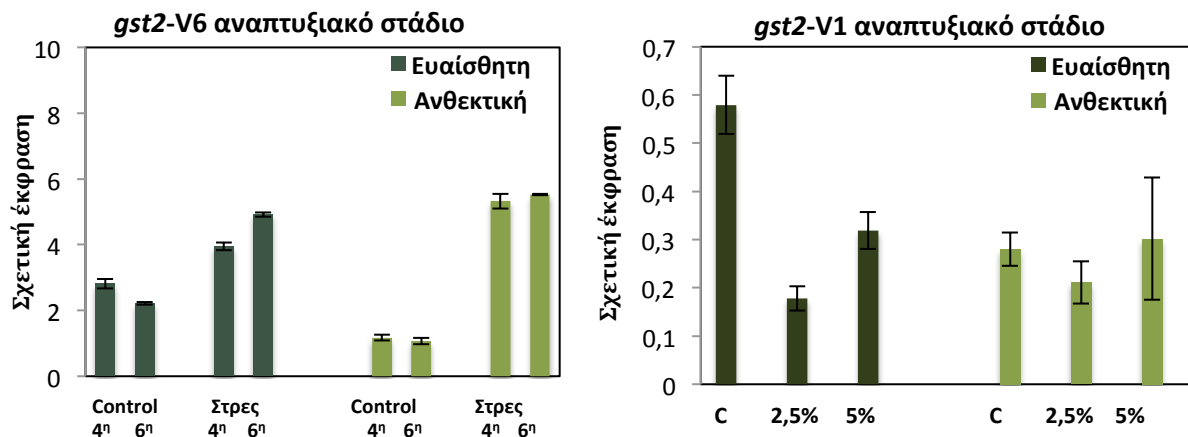
3.8 Σχετική έκφραση γονιδίου *gst10* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσορρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

3.2.9 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *gst2*

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *gst2* στα φυτά σόγιας που μελετήθηκαν κατά τα πειράματα καταπόνησης στο θερμοκήπιο, απεικονίζεται στο διάγραμμα 3.9 (αριστερά). Συγκρίνοντας τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου μεταξύ των φυτών μάρτυρων των δύο ποικιλιών, η ευαίσθητη ποικιλία εκφράζει περίπου στο διπλάσιο το γονίδιο. Κατά την 4^η ημέρα υποβολής του στρες, τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας, δεν έδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση στην έκφραση, ενώ την 6^η ημέρα αύξησαν τα επίπεδα έκφρασης πάνω από 2 φορές (τιμη $p < 0,01$). Η απόκριση της ανθεκτικής ποικιλίας στο στρες υπήρξε όμοια τόσο την 4^η όσο και την 6^η ημέρα, καθώς και στις δύο περιπτώσεις η έκφραση ήταν πενταπλάσια ($p < 0,05$).

Από τις αναλύσεις που έγιναν στα φυτά που υποβλήθηκαν σε *in vitro* δοκιμές υδατικής καταπόνησης, προκύπτουν κάποιες διαφοροποιήσεις στην έκφραση του *gst2* (διάγραμμα 3.9, δεξιά). Οι μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας χαρακτηρίζονται από διπλάσια γονιδιακή έκφραση σε σχέση με την ανθεκτική ποικιλία. Διαφορετικό προφίλ έκφρασης παρουσιάζουν τα στρεσαρισμένα φυτά, καθώς στην περίπτωση της ευαίσθητης, τα φυτά μείωσαν την έκφραση σε υποτριπλάσιο και υποδιπλάσιο βαθμό κατά την υποβολή των 2,5% και 5% PEG αντίστοιχα, ενώ η ανθεκτική ποικιλία δεν άλλαξε τα επίπεδα έκφρασης.

Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, υπάρχουν εμφανείς διαφορές στον τρόπο που αποκρίνονται τα φυτά ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκονται. Στα φυτά-μάρτυρες V1 αναπτυξιακού σταδίου, τόσο της ανθεκτικής όσο και της ευαίσθητης ποικιλίας, το γονίδιο *gst2* εκφράζεται 4 φορές λιγότερο. Τα υποβεβλημένα σε υδατική καταπόνηση φυτά της ευαίσθητης, κατά το V6 στάδιο υπερεκφράζουν το γονίδιο ενώ κατά το V1 η έκφρασή του παρουσιάζεται μειωμένη. Διαφορές στην έκφραση μεταξύ των δύο υπό μελέτη φάσεων ανάπτυξης των φυτών παρατηρείται και στην ανθεκτική ποικιλία, καθώς στη περίπτωση του V6 σταδίου το γονίδιο υπερεκφράζεται, ενώ τα V1 φυτά δεν μεταβάλλουν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου.

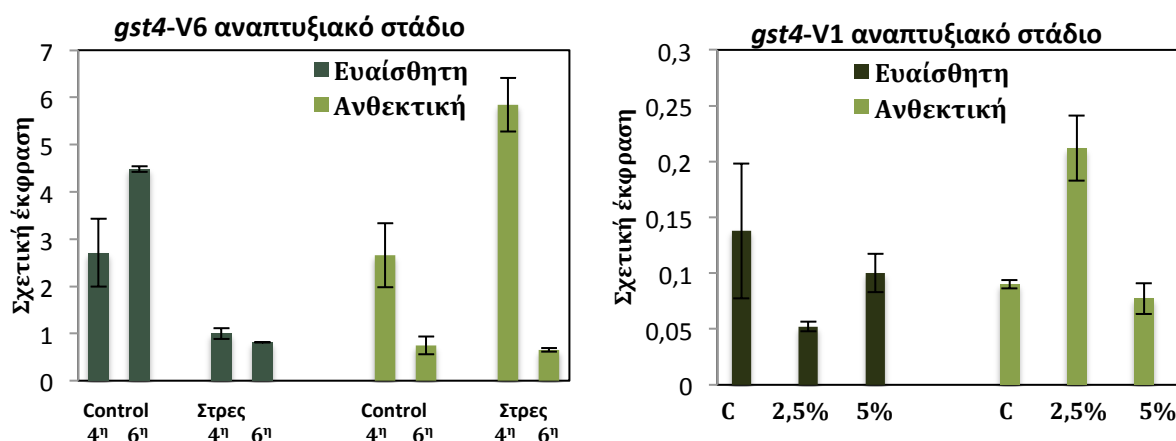


Γράφημα 3.9 Σχετική έκφραση γονιδίου *gst2* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

3.2.10 Ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *gst4*

Στο διάγραμμα 3.10 (αριστερά) παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *gst4* στις δύο εξεταζόμενες ποικιλίες σόγιας, κατά τις δοκιμές υδατικής καταπόνησης στο θερμοκήπιο. Αναφορικά με τα φυτά-μάρτυρες των δύο ποικιλιών, δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την ύπαρξη διαφοράς στη γονιδιακή έκφραση. Υπό συνθήκες στρες, τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας έδειξαν να μη διαφοροποιούν την έκφραση κατά την 4^η ημέρα, ενώ την 6^η ημέρα από την υποβολή του στρες, σημειώθηκε υποέκφραση κατά 5 φορές (τιμή p 0,01) σε σχέση με τα επίπεδα των μαρτύρων. Η ανθεκτική ποικιλία την 4^η ημέρα διπλασίασε (τιμή p 0,03) την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου, ενώ την 6^η ημέρα μείωσε την έκφραση σε ίδια επίπεδα με τους μάρτυρες.

Κατά τις *in vitro* δοκιμές υδατικής καταπόνησης στις δύο ποικιλίες σόγιας, τα φυτά έδειξαν διαφοροποιήσεις στην έκφραση του *gst4*. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.10 (δεξιά), η έκφραση στα φυτά-μάρτυρες κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα τόσο στην ευαίσθητη όσο και στην ανθεκτική ποικιλία. Κατά την υποβολή σε επίπεδο στρες 2,5% PEG, η ευαίσθητη ποικιλία μείωσε την έκφραση (2,5 φορές) ενώ υπό το στρες των 5% PEG, διατηρήθηκαν σε παρόμοια με τους μάρτυρες επίπεδα έκφρασης. Την εικόνα αντίθετου προφίλ έκφρασης είχαν τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας. Συγκεκριμένα, κατά το 1^ο επίπεδο στρες των 2,5% PEG τα φυτά αυτά αύξησαν κατά 2,5 φορές την έκφραση του γονιδίου και τη διατήρησαν αμετάβλητη κατά το 2^ο επίπεδο στρες.



Γράφημα 3.10 Σχετική έκφραση γονιδίου *gst4* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσοαρσιμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

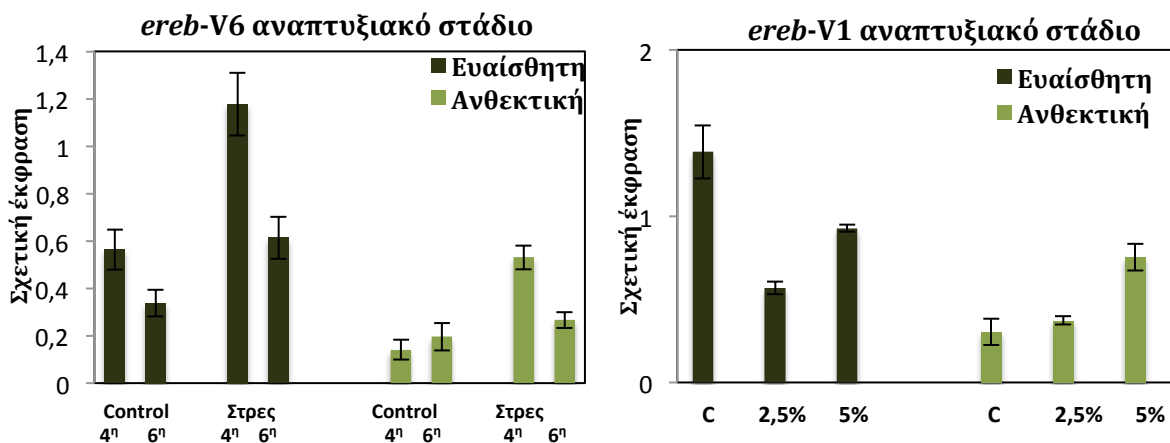
Συγκρίνοντας την απόκριση των φυτών στο υδατικό στρες κατά τα δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, τα φυτά εκφράζουν το γονίδιο 26 και 30 φορές περισσότερο κατά το ανεπτυγμένο V6 στάδιο στην ευαίσθητη και ανθεκτική ποικιλία, αντίστοιχα. Η ευαίσθητη ποικιλία και στα δύο εξεταζόμενα αναπτυξιακά στάδια, έδειξε να υποεκφράζει το γονίδιο σε

συνθήκες στρες. Αντίθετα, η ανθεκτική ποικιλία υπερεκφράζει το γονίδιο υπό συνθήκες στρες και στις δύο περιπτώσεις, ωστόσο σε υψηλό επίπεδο υδατικής καταπόνησης (6η ημέρα και 5%PEG) τα επίπεδα έκφρασης είναι αντίστοιχα των φυτών μάρτυρων.

3.2.11 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *ereb*

Στο διάγραμμα 3.11 (αριστερά), απεικονίζεται η επίδραση της υδατικής καταπόνησης στην έκφραση του γονιδίου *ereb*, κατά τα πειράματα θερμοκηπίου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της qRT-PCR, τα φυτά πλήρους άρδευσης της ευαίσθητης ποικιλίας, είχαν διπλάσια επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε σχέση με την ανθεκτική. Η επιβολή του στρες στα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας, διπλασίασε την έκφραση την 4^η ημέρα (τιμή p 0,0009) αλλά την 6^η ημέρα, ακολούθησε πτώση της έκφρασης στα αντίστοιχα επίπεδα με τους μάρτυρες. Με παρόμοιο τρόπο αποκρίθηκαν και τα φυτά της ανθεκτικής, αυξάνοντας κατά 3,5 φορές (p 0,0001) την έκφραση του γονιδίου *ereb* κατά την 4^η ημέρα και διατηρώντας σε παρόμοια με τους μάρτυρες επίπεδα έκφρασης κατά την 6^η.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έκφρασης του γονιδίου *ereb* από τις εργαστηριακές δοκιμές υδατικής έλλειψης στις δύο ποικιλίες σόγιας, απεικονίζονται στο διάγραμμα 3.11 (δεξιά). Υπάρχει σαφής διαφορά στην έκφραση μεταξύ των φυτών-μάρτυρων των δύο ποικιλιών, με σχεδόν 5πλάσια τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στα φυτά της ευαίσθητης. Η εφαρμογή του στρες στα φυτά της ευαίσθητης, έδειξε να μειώνει κατά 2,5 φορές την έκφραση στη περίπτωση προσθήκης 2,5%PEG, ωστόσο υπό 5%PEG δε σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση. Τα φυτά της ανθεκτικής, δε μετέβαλλαν την έκφραση του *ereb* στην περίπτωση εφαρμογής 2,5%PEG, αλλά κατά την υποβολή των 5%PEG, διπλασίασαν τα επίπεδα έκφρασης.

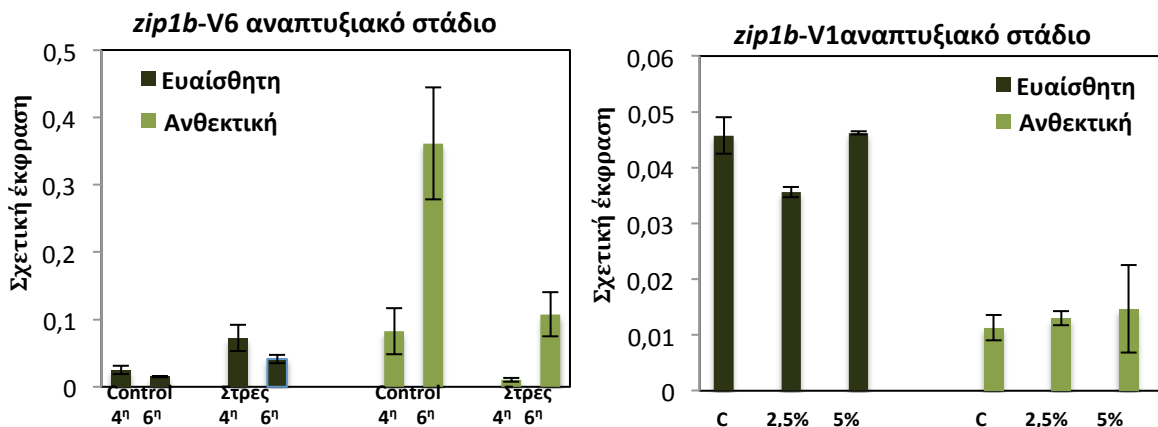


Γράφημα 3.11 Σχετική έκφραση γονιδίου *ereb* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσοαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

Συγκρίνοντας το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *ereb* μεταξύ των δύο εξεταζόμενων αναπτυξιακών σταδίων, προκύπτει ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο, η ευαίσθητη και η ανθεκτική ποικιλία εκφράζουν το γονίδιο κατά 3 και 2 φορές περισσότερο αντίστοιχα, εν συγκρίσει με το V6 στάδιο. Φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας που υποβλήθηκαν σε στρες κατά το V6 στάδιο, αύξησαν την έκφρασή τους, ενώ τα φυτά V1 σταδίου μείωσαν την έκφρασή τους. Και στις δύο περιπτώσεις παρατεταμένου στρες (6^η ημέρα, 5%PEG), τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας δείχνουν να μην αποκρίνονται.

3.2.12 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *zip1b*

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *zip1b* στις δύο ποικιλίες σόγιας κατά τα πειράματα υδατικής καταπόνησης στο θερμοκήπιο, παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.12 αριστερά. Μεταξύ των controls της ευαίσθητης και της ανθεκτικής ποικιλίας, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στην ανθεκτική. Τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας υπό στρες, υπερέκφρασαν το γονίδιο κατά 2,5 φορές (p 0,04) ήδη από την 4^η ημέρα υποβολής του στρες και τα διατήρησαν το ίδιο υψηλά και την 6^η ημέρα (p 0,001). Τα υπό στρες φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, παρουσίασαν διαφορετική εικόνα ως προς την έκφραση του γονιδίου. Συγκεκριμένα, την 4^η ημέρα δε σημειώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην έκφραση, αλλά την 6^η ημέρα, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης κατά 3,5 φορές (p 0,01).



Γράφημα 3.12 Σχετική έκφραση γονιδίου *zip1b* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έκφρασης του γονιδίου *zip1b* από τις εργαστηριακές δοκιμές υδατικής έλλειψης στις δύο ποικιλίες σόγιας, απεικονίζονται στο διάγραμμα 3.12

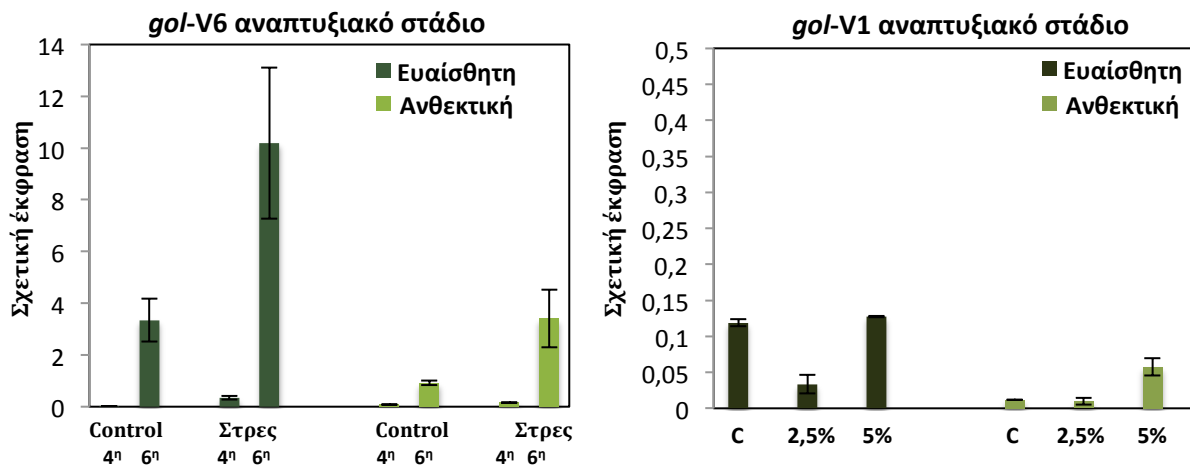
(δεξιά). Υπάρχει σαφής διαφορά στην έκφραση μεταξύ των φυτών-μαρτύρων των δύο ποικιλιών, με 4πλάσια την έκφραση του γονιδίου στα φυτά της ευαίσθητης. Βάση των αποτελεσμάτων, καμία από τις δύο υπό μελέτη ποικιλίες σόγιας δεν αποκρίθηκε μεταβάλλοντας το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *zip1b*, εφόσοντα επίπεδα έκφρασης διατηρήθηκαν σταθερά και στα δύο επίπεδα στρες.

Αναφορικά με τις διαφορές στην έκφραση που οφείλονται στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, παρατηρούνται τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης στο V1 αναπτυξιακό στάδιο, σε σχέση με το V6. Κατά το νεαρό αναπτυξιακό στάδιο, οι μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας εκφράζουν κατά 2 φορές λιγότερο το γονίδιο *zip1b*, ενώ στην περίπτωση της ανθεκτικής η έκφραση είναι σαφώς μειωμένη (5 φορές). Όσον αφορά τα φυτά που υπέστησαν το υδατικό στρες, κατά το V6 στάδιο έδειξαν μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης, με την ευαίσθητη να υπερεκφράζει και την ανθεκτική να υποεκφράζει το υπό μελέτη γονίδιο. Αντίθετα, κατά το αναπτυξιακό στάδιο V1, δεν προκλήθηκε καμία αλλαγή στο προφίλ έκφρασης.

3.2.13 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *gol*

Η ανάλυση των δεδομένων της qRT-PCR για την έκφραση του γονιδίου *gol*, παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.13. Κατά την εφαρμογή υδατικού στρες, τα φυτά V6 σταδίου αποκρίνονται με σημαντική διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης, τόσο στην ευαίσθητη όσο και στην ανθεκτική ποικιλία (διάγραμμα 3.13, δεξιά). Όσον αφορά την έκφραση μεταξύ των φυτών-μαρτύρων των δύο ποικιλιών, δεν εξάγονται ασφαλή συμπεράσματα ως προς τις διαφορές τους. Τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας που συμμετείχαν στις δοκιμές υδατικής έλλειψης, αύξησαν σημαντικά την έκφρασή τους την 4^η ημέρα (16 φορές, $p < 0,0001^*$) και ακολούθως, τη μείωσαν σε 3πλάσια (τιμή $p < 0,03$) επίπεδα υπερέκφρασης την 6^η ημέρα. Στις ίδιες συνθήκες, τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας 2πλασίασαν (τιμή $p < 0,008$) την έκφραση κατά την 4^η ημέρα ενώ την 6^η ημέρα, δεν έδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση στην έκφραση.

Τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων υδατικής καταπόνησης, όπου εξετάστηκε το V1 αναπτυξιακό στάδιο των φυτών, έδειξαν υψηλότερη έκφραση του γονιδίου *gol* στα φυτά-μάρτυρες της ευαίσθητης σε σχέση με τα αντίστοιχα της ανθεκτικής ποικιλίας. Σε επίπεδο στρες 2,5% PEG, η ευαίσθητη ποικιλία έδειξε να υποεκφράζει κατά 3 φορές το γονίδιο, ενώ υπό 5%PEG να διατηρεί την έκφραση στα ίδια επίπεδα με τους μάρτυρες. Η εφαρμογή υδατικού στρες στην ανθεκτική, δεν έδειξε σημαντική διαφοροποίηση στην έκφραση κατά το 1^ο επίπεδο στρες αλλά 5πλασίασε τα επίπεδα έκφρασης στην περίπτωση των 5%PEG. Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρούνται τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gol* κατά το νεαρό αναπτυξιακό στάδιο, σε σχέση με το ανεπτυγμένο. Η ευαίσθητη ποικιλία στο V6 αναπτυξιακό στάδιο δείχνει να υπερεκφράζει το γονίδιο *gol*, ενώ μειώνει τα επίπεδα έκφρασης όταν τα φυτά βρίσκονται σε V1 αναπτυξιακό στάδιο. Η ανθεκτική ποικιλία, και στα δύο αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν αύξησε τα επίπεδα έκφρασης, με μεγαλύτερο βαθμό υπερέκφρασης κατά το V1 στάδιο.



Γράφημα 3.13 Σχετική έκφραση γονιδίου *gol* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

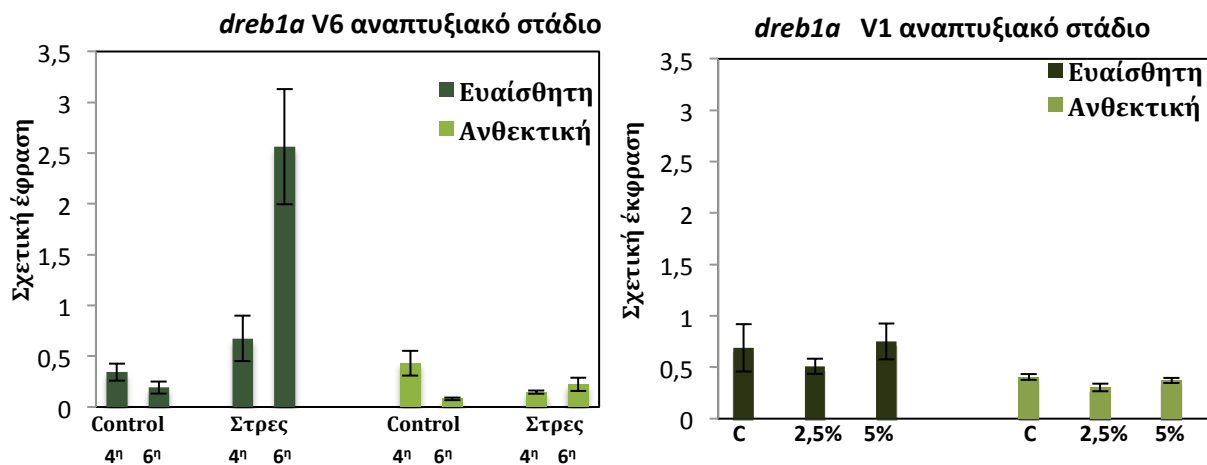
3.2.14 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *dreb1a*

Τα αποτελέσματα της έκφρασης του γονιδίου *dreb1a* κατά τα πειράματα του θερμοκηπίου, παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.14 (αριστερά). Μεταξύ των μη στρεσαρισμένων φυτών των δύο ποικιλιών, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση. Τα φυτά της ευαίσθητης που υποβλήθηκαν σε στρες, διατήρησαν σταθερά τα επίπεδα έκφρασης την 4^η ημέρα από την έναρξη της υδατικής καταπόνησης, ωστόσο την 6^η ημέρα αποκρίθηκαν υπερεκφράζοντας το γονίδιο 13 φορές περισσότερο σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα, η ανθεκτική ποικιλία δε μετέβαλλε το προφίλ έκφρασης του γονιδίου κατά την υποβολή των φυτών σε υδατικό στρες.

Κατά την ανάπτυξη των φυτών στο εργαστήριο, τα φυτά-μάρτυρες και των δύο ποικιλιών δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή στη σχετική έκφραση του γονιδίου (διάγραμμα 3.14, δεξιά). Επίσης, η έκφραση του γονιδίου μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων, δε φαίνεται να παρουσιάζει καμία διαφοροποίηση, τόσο στην ευαίσθητη όσο και στην ανθεκτική ποικιλία.

Η εικόνα της έκφρασης του *dreb1a* κατά τα πειράματα του θερμοκηπίου, εν συγκρίσει με τα δεδομένα που πάρθηκαν από τις *in vitro* δοκιμές, δεν δείχνουν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των φυτών-μαρτύρων της ανθεκτικής ποικιλίας. Ωστόσο, τα φυτά-μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας, εκφράζουν στο διπλάσιο το γονίδιο κατά το V1 στάδιο. Στη περίπτωση του V6 σταδίου, τα φυτά της ευαίσθητης υπερεκφράζουν το γονίδιο υπό συνθήκες έλλειψης νερού ενώ κατά τα εργαστηριακά πειράματα, η έκφραση παραμένει

σταθερή. Η ανθεκτική ποικιλία και στα δύο αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν δεν δείχνει διαφοροποίηση στην έκφραση του γονιδίου.



Γράφημα 3.14 Σχετική έκφραση γονιδίου *dreb1a* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

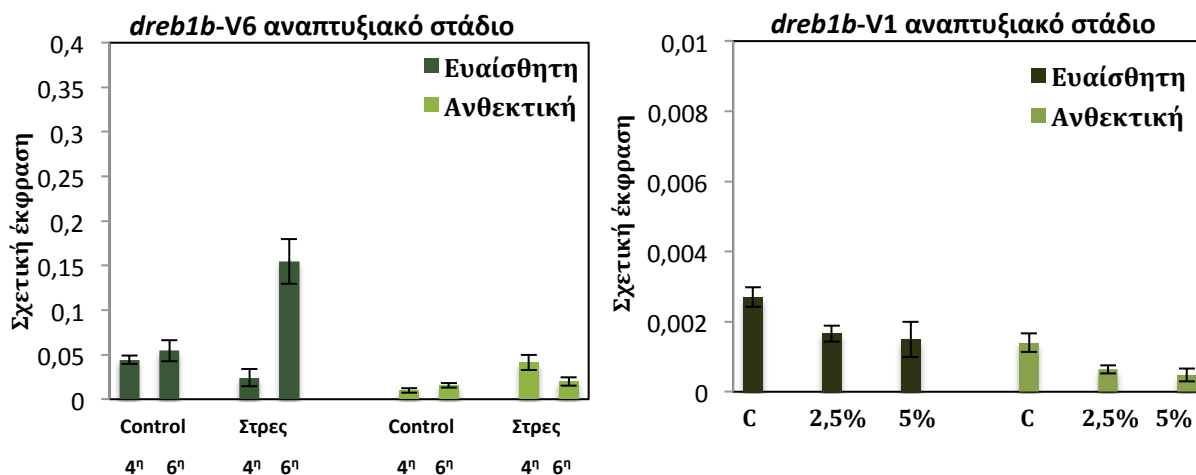
3.2.15 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *dreb1b*

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων που αφορούν την έκφραση του γονιδίου *dreb1b* κατά το αναπτυξιακό στάδιο V6 παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.15 (αριστερά). Στα φυτά-μάρτυρες, το γονίδιο εκφράζεται σχεδόν 4 φορές περισσότερο στην ευαίσθητη συγκριτικά με την ανθεκτική ποικιλία. Η ευαίσθητη ποικιλία, διατήρησε σταθερά τα επίπεδα έκφρασης κατά την 4^η ημέρα από την έναρξη του υδατικού στρες και ακολούθως την 6^η ημέρα τριπλασίασε την έκφραση (τιμή $p < 0,04$). Στα στρεσαρισμένα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, σημειώθηκε αύξηση (4 φορές) της γονιδιακής έκφρασης κατά την 4^η ημέρα ωστόσο, υπό το παρατεταμένο στρες των 6 ημερών τα φυτά μείωσαν την έκφραση στα ίδια επίπεδα με τους μάρτυρες.

Οι αναλύσεις που έγιναν σε φυτά αναπτυξιακού σταδίου V1, τόσο στην ανθεκτική όσο και στην ευαίσθητη ποικιλία, δεν έδειξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς την έκφραση του γονιδίου *dreb1b* (διάγραμμα 3.15, δεξιά). Έτσι, τόσο στα φυτά-μάρτυρες όσο και στα στρεσαρισμένα φυτά και των δύο ποικιλιών δε σημειώθηκε σημαντική μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου.

Από την συγκριτική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *dreb1b* στα δύο αναπτυξιακά στάδια, προκύπτει η υψηλότερη κατά 30 φορές γονιδιακή έκφραση στα φυτά-μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας κατά το V6 στάδιο. Τα στρεσαρισμένα φυτά της ίδιας ποικιλίας, υπερεκφράζουν το γονίδιο *dreb1b* κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο, ενώ κατά το V1 στάδιο, δε

μεταβάλουν την έκφρασή του. Όσον αφορά την ανθεκτική ποικιλία, τα φυτά-μάρτυρες του V6 σταδίου επάγουν την έκφραση του γονιδίου κατά 5 φορές περισσότερο σε σχέση με τα φυτά του V1 αναπτυξιακού σταδίου. Τα υπό υδατική καταπόνηση φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, δε δείχνουν σημαντική διαφοροποίηση στην έκφραση του γονιδίου.



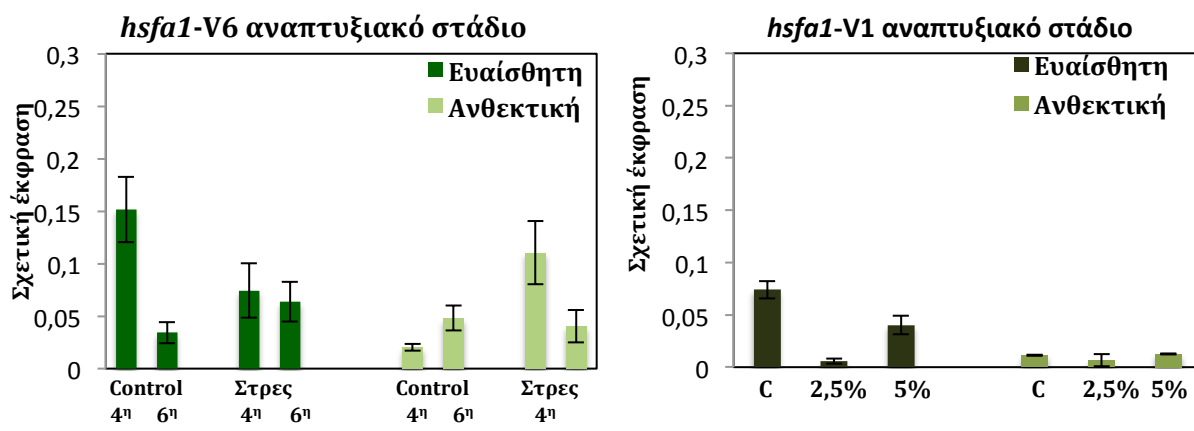
Γράφημα 3.15 Σχετική έκφραση γονιδίου *dreb1b* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

3.2.16 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *hsfa1*

Τα αποτελέσματα που πρατίθενται στο διάγραμμα 3.16 (αριστερά), δείχνουν τη σχετική έκφραση του γονιδίου *hsfa1* στις δοκιμές υδατικής καταπόνησης στο θερμοκήπιο. Μεταξύ των μη υποβεβλημένων σε στρες φυτών των δύο ποικιλιών, φαίνεται η ευαίσθητη ποικιλία να εκφράζει σε τριπλάσιο βαθμό το γονίδιο συγκριτικά με την ανθεκτική. Υπό συνθήκες στρες, τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας κατά την 4^η ημέρα φαίνεται να υποεκφράζουν στο μισό το γονίδιο ($p < 0,03$), ενώ την 6^η ημέρα, αυξάνουν και πάλι τη έκφραση στα επίπεδα των μαρτύρων. Στην ανθεκτική ποικιλία, την 4^η ημέρα σημειώθηκε αύξηση (5 φορές, $p < 0,01$) της γονιδιακής έκφρασης ενώ την 6^η, η έκφραση μειώθηκε σε παρόμοια με τους μάρτυρες επίπεδα.

Όσον αφορά το αναπτυξιακό στάδιο V1, η έκφραση του γονιδίου *hsfa1* έδειξε κάποιες διαφοροποιήσεις και στις δύο ποικιλίες σόγιας. Όπως απεικονίζονται στο διάγραμμα 3.16 (δεξιά), η έκφραση στα φυτά-μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας είναι κατά 6,5 φορές υψηλότερη σε σχέση με τα αντίστοιχα της ανθεκτικής. Η ευαίσθητη ποικιλία κατά την προσθήκη 2,5% PEG στο μέσο ανάπτυξης, μείωσε τη γονιδιακή έκφραση κατά 12 φορές, ενώ υπό το στρες των 5% PEG δεν παροσιάστηκε μεταβολή της έκφρασης. Στην περίπτωση της ανθεκτικής ποικιλίας, τα επίπεδα έκφρασης δεν διαφοροποιήθηκαν κατά την υποβολή του στρες.

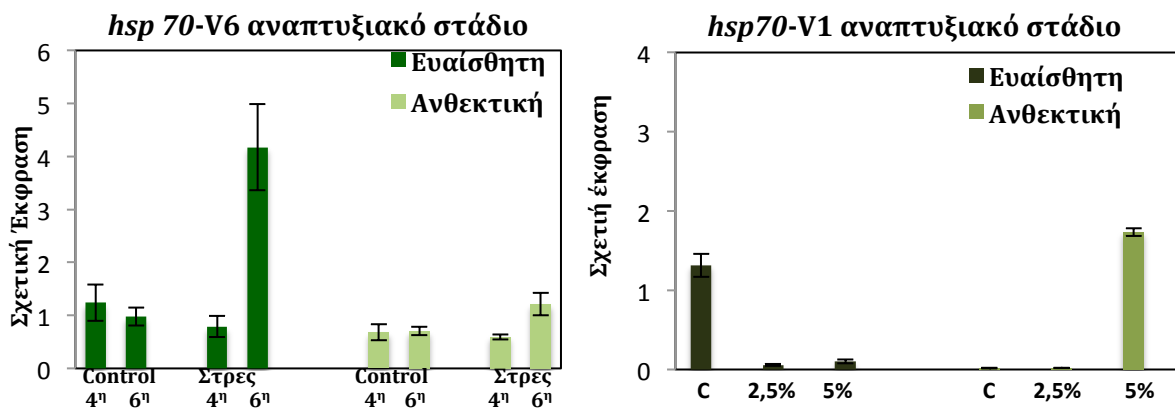
Συγκρίνοντας την απόκριση των φυτών στο υδατικό στρες κατά τα δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, τα φυτά εκφράζουν το γονίδιο σε διπλάσιο βαθμό κατά το ανεπτυγμένο V6 στάδιο. Ίδια απόκριση στο στρες έδειξαν τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας και στα δύο εξεταζόμενα αναπτυξιακά στάδια, καθώς το γονίδιο υποεκφράζεται κατά το 1^ο επίπεδο στρες (4^η ημέρα, 2,5% PEG), ενώ σε παρατεταμένο στρες (6^η ημέρα, 5% PEG) η έκφραση ήταν στα ίδια επίπεδα με τους μάρτυρες. Διαφρετική εικόνα στο προφίλ έκφρασης είχε η ανθεκτική ποικιλία, υπερεκφράζοντας το γονίδιο κατά το V6 στάδιο και μη μεταβάλλοντας την έκφραση κατά το V1.



Γράφημα 3.16 Σχετική έκφραση γονιδίου *hsfa1* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσοαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

3.2.17 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *hsp70*

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *hsp70*, κατά την υποβολή υδατικής καταπόνησης στα πειράματα του θερμοκηπίου απεικονίζονται στο διάγραμμα 3.17 (αριστερά). Μεταξύ των φυτών-μαρτύρων των δύο ποικιλιών, δεν φάνηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης. Ωστόσο, τα στρεσοαρισμένα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας, διατήρησαν σταθερή την έκφραση κατά την 4^η ημέρα, αλλά την αύξησαν κατά 4 φορές (τιμή $p < 0,01$) την 6^η ημέρα. Η ανθεκτική ποικιλία αντίθετα, δε μετέβαλλε τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου κατά τις διαφορετικές μεταχειρίσεις.



Γράφημα 3.17 Σχετική έκφραση γονιδίου *hsp70* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

Σημαντική διαφοροποίηση στην έκφραση του *hsp70* σημειώθηκε και στα φυτά V1 σταδίου και στις δύο ποικιλίες που συμμετείχαν στις δοκιμές υδατικής καταπόνησης στο εργαστήριο (διάγραμμα 3.17, δεξιά). Συγκρίνοντας την έκφραση στα φυτά-μάρτυρες των δύο ποικιλιών, η ευαίσθητη εκφράζει το γονίδιο 80 φορές περισσότερο από την ανθεκτική. Υπό συνθήκες υδατικής έλλειψης, τα φυτά της ευαίσθητης παρουσίασαν σημαντική μείωση της έκφρασης. Συγκεκριμένα, σημειώθηκε μείωση κατά 23 και 13 φορές για τις περιπτώσεις των 2,5% και 5%PEG αντίστοιχα. Την αντίθετη εικόνα είχαν τα στρεσαρισμένα φυτά της ανθεκτικής που υπερέκφρασαν εντυπωσιακά το γονίδιο υπό την επιβολή του 5%PEG (100 φορές) σε σχέση με τους μάρτυρες.

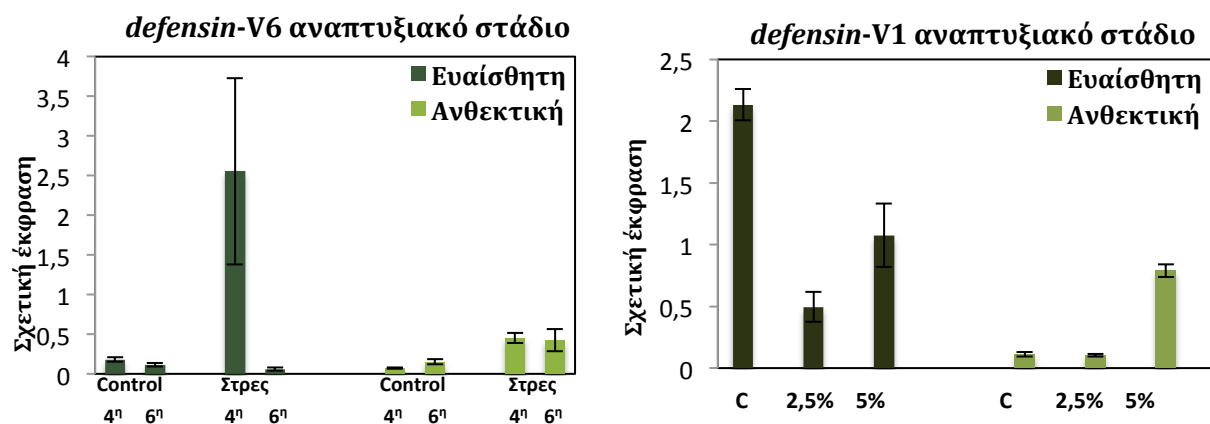
Οι διαφορές στην απόκριση των φυτών στην υδατική καταπόνηση ανάμεσα στα δύο εξεταζόμενα αναπτυξιακά στάδια είναι εμφανείς. Όσον αφορά τα μη στρεσαρισμένα φυτά, η ευαίσθητη ποικιλία εκφράζει το γονίδιο *hsp70* στα ίδια επίπεδα και στα δύο αναπτυξιακά στάδια ενώ η ανθεκτική, εκφράζει κατά 40 φορές περισσότερο το γονίδιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Η ανθεκτική ποικιλία υπό στρες υπερεκφράζει το γονίδιο σε ανεπτυγμένο στάδιο, ενώ το υποεκφράζει σε νεαρό αναπτυξιακό στάδιο. Οι αντίστοιχες δοκιμές σε φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, δεν έδειξαν καμιά απόκριση στο στρες κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο και αντιθέτως, ραγδαία υπερέκφραση του γονιδίου *hsp70* συνέβη κατά V1 στάδιο.

3.2.18 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *defensin*

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *defensin* κατά τα πειράματα υδατικής καταπόνησης που διεκπεραιώθηκαν στο θερμοκήπιο παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.18 (αριστερά). Μεταξύ των controls της ευαίσθητης και της ανθεκτικής ποικιλίας, δεν υπήρξαν διαφορές στην έκφραση του γονιδίου. Η ευαίσθητη ποικιλία υπό στρες, δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στην έκφραση (τιμή $p > 0,05$). Τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας που

υποβλήθηκαν σε στρες, τη 4^η ημέρα βπλασίασαν (τιμή p 0,001) την έκφραση του γονιδίου ενώ την 6^η, επανέφεραν την έκφραση στα ίδια επίπεδα με τα φυτά-μάρτυρες.

Το διάγραμμα 3.8 (δεξιά), απεικονίζει τις μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου *defensin* στις δύο ποικιλίες σόγιας όταν υποβλήθηκαν σε *in vitro* υδατική καταπόνηση. Η σχετική έκφραση στα φυτά-μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας είναι 19 φορές υψηλότερη σε σχέση με τα αντίστοιχα της ανθεκτικής. Υπό στρες, η ευαίσθητη ποικιλία παρουσιάζει μειωμένη γονιδιακή έκφραση, κατά 4 και 2 φορές, στο επίπεδο στρες των 2,5%PEG και 5%PEG, αντίστοιχα. Στην ανθεκτική ποικιλία παρατηρήθηκε διαφορετικό προφίλ απόκρισης, με απουσία μεταβολής της έκφρασης στο 1^ο επίπεδο στρες και υπερέκφραση (κατά 7 φορές) σε σχέση με τους μάρτυρες κατά το 2^ο επίπεδο καταπόνησης.



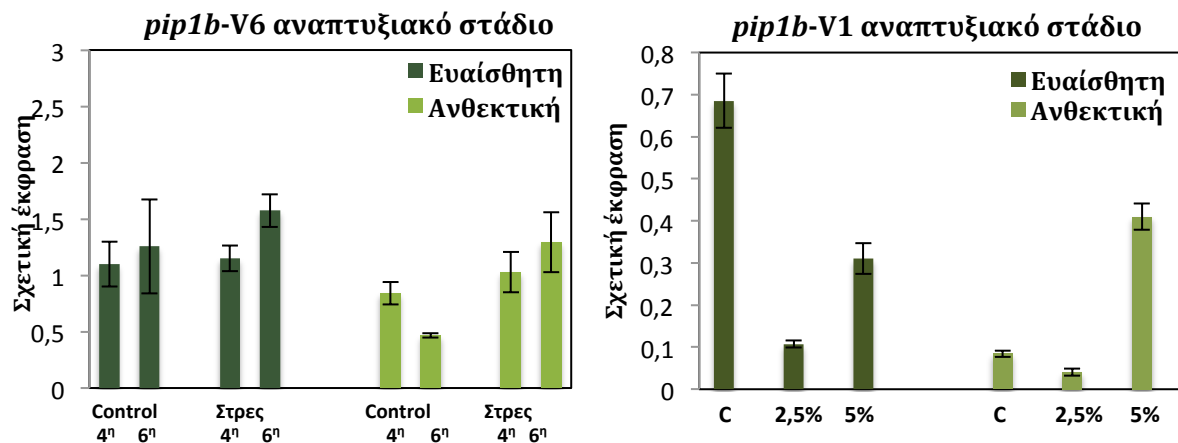
Γράφημα 3.18 Σχετική έκφραση γονιδίου *defensin* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσοαρτισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

Συγκρίνοντας τη σχετική έκφραση του γονιδίου στα δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια που εξετάστηκαν, διακρίνονται σημαντικές διαφορές στην απόκριση των φυτών. Κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο, τα μη στρεσοαρτισμένα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας εκφράζουν κατά 15 φορές περισσότερο το γονίδιο σε σχέση με τα controls της ίδιας ποικιλίας V6 αναπτυξιακού σταδίου. Τα φυτά πλήρους άρδευσης (C) της ανθεκτικής ποικιλίας, διατηρούν τα ίδια επίπεδα έκφρασης και στα δύο αναπτυξιακά στάδια. Υπό στρες, η ευαίσθητη ποικιλία στο στάδιο V6 δεν άλλαξε τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *defensin*, ενώ κατά το στάδιο V1 μείωσε την έκφρασή του. Τα φυτά της ανθεκτικής αποκρίθηκαν με τον ίδιο τρόπο κατά τα δύο αναπτυξιακά στάδια όταν υποβλήθηκαν σε στρες, υπερεκφράζοντας το γονίδιο *defensin* και στις δύο περιπτώσεις.

3.2.19 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *rip1b*

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις έκφρασης του γονιδίου *rip1b* των πειραμάτων του θερμοκηπίου, παρατίθενται στο διάγραμμα 3.19 (αριστερά). Εξετάζοντας τα αποτελέσματα που αφορούν τα μη στρεσαρισμένα φυτά των δύο ποικιλιών, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ ευαίσθητης και ανθεκτικής ποικιλίας. Επίσης, υπό συνθήκες στρες, τόσο η ευαίσθητη όσο και η ανθεκτική ποικιλία διατήρησαν σταθερά τα επίπεδα έκφρασης του *rip1b* και στις δύο εξεταζόμενες χρονικές στιγμές υποβολής του στρες.

Η σχετική έκφραση του *rip1b* κατά την εφαρμογή υδατικού στρες σε νεαρά φυτά των δύο ποικιλιών, παρουσιάζεται στο διάγραμμα 3.19 (δεξιά). Τα μη υποβεβλημένα σε στρες φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας, έχουν κατά 8 φορές υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες της ανθεκτικής. Κατά το 1^ο επίπεδο στρες, τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας μείωσαν την έκφραση του γονιδίου στο υποεξαπλάσιο σε σχέση με τους μάρτυρες και κατά το 2^ο επίπεδο έδειξαν υποδιπλάσια έκφραση. Η ανθεκτική ποικιλία δεν επηρεάστηκε υπο το στρες των 2,5% PEG, αλλά πενταπλασίασε την έκφραση κατά την παρουσία 5% PEG στο μέσο ανάπτυξης.



Γράφημα 3.19 Σχετική έκφραση γονιδίου *rip1b* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

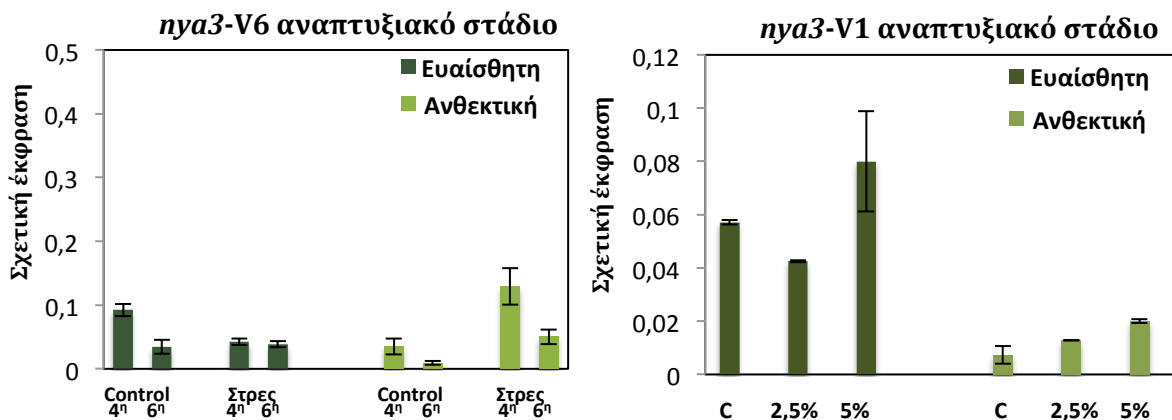
Αντιπαραθέτοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτουν σαφείς διαφορές στην απόκριση των φυτών κατά τα δύο υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια. Όσον αφορά τους μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας, εκφράζουν σχεδόν στα ίδια επίπεδα το γονίδιο και σε νεαρό και σε ανεπτυγμένο στάδιο. Η ανθεκτική ποικιλία αντίθετα, δείχνει να εκφράζει το γονίδιο κατά 10 φορές λιγότερο κατά το νεαρό σε σχέση με το ανεπτυγμένο στάδιο. Και στις δύο περιπτώσεις των ποικιλιών που εφαρμόστηκε υδατικό στρες, τα φυτά δεν μετέβαλλαν την

έκφραση του γονιδίου κατά το V6 στάδιο, ενώ στο στάδιο V1, η ευαίσθητη μείωσε και η ανθεκτική αύξησε την έκφραση του γονιδίου *rip1b*.

3.2.20 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *ng3*

Στο διάγραμμα 3.20 (αριστερά), απεικονίζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *ng3* στα φυτά σόγιας V6 σταδίου που συμμετείχαν στα πειράματα καταπόνησης στο θερμοκήπιο. Συγκρίνοντας τα φυτά-μάρτυρες των δύο ποικιλιών, η ανθεκτική ποικιλία εκφράζει σε υποτριπλάσιο βαθμό το γονίδιο. Η ευαίσθητη ποικιλία δεν διαφοροποίησε τα επίπεδα έκφρασης υπό την εφαρμογή υδατικού στρες. Την ίδια εικόνα είχαν και τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας κατά την 4^η ημέρα από την έναρξη του στρες, αλλά την 6^η ημέρα αύξησαν σημαντικά την έκφραση κατά 5 φορές (τιμή p 0,03).

Το γράφημα 3.20 (δεξιά), παρουσιάζει τη σχετική έκφραση του γονιδίου *ng3* στις δύο ποικιλίες σόγιας στις *in vitro* δοκιμές υδατικής καταπόνησης. Τα φυτά μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας, εκφράζουν κατά 8 φορές περισσότερο το γονίδιο σε σχέση με την ανθεκτική. Κατά την εφαρμογή υδατικού στρες, τα φυτά της ευαίσθητης, δεν μεταβάλλουν τα επίπεδα έκφρασης. Αντιθέτως, τα φυτά της ανθεκτικής αν και έχουν την ίδια εικόνα κατά την εφαρμογή των 2,5% PEG, στην περίπτωση των 5% PEG αυξάνουν την έκφραση κατά 2,5 φορές.



Γράφημα 3.20 Σχετική έκφραση γονιδίου *ng3* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

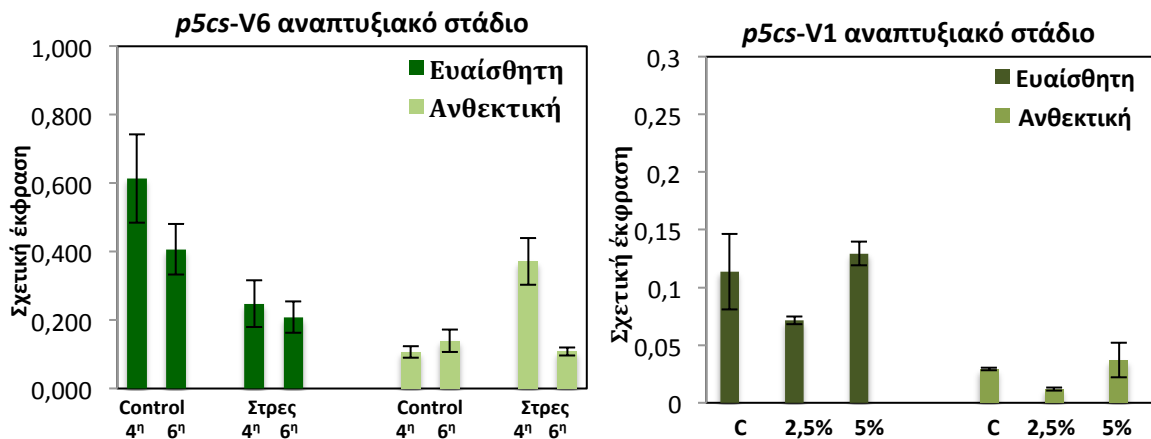
Συγκρίνοντας το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *nyg3* μεταξύ των δύο εξεταζόμενων αναπτυξιακών σταδίων, παρατηρούνται σημαντικές ομοιότητες. Η ευαίσθητη ποικιλία έχει τα ίδια επίπεδα έκφρασης και κατά το V6 και κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο, χωρίς να μεταβάλλονται υπό συνθήκες στρες. Τα controls της ανθεκτικής ποικιλίας κατά το στάδιο V1, εκφράζουν σε υποτριπλάσιο βαθμό το γονίδιο σε σχέση με την έκφραση κατά το V6. Υπό παρατεταμένο στρες τα φυτά της ανθεκτικής τόσο σε πρώιμη όσο και σε προχωρημένη φάση ανάπτυξης, υπερεκφράζουν το γονίδιο αποκρινόμενα στην εφαρμογή της καταπόνησης. Αντιπαραθέτοντας τα αποτελέσματα των αναλύσεων, διαπιστώνονται σημαντικές διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *p5cs* μεταξύ των εξεταζόμενων αναπτυξιακών σταδίων. Αναφορικά με τα φυτά-μάρτυρες, τόσο η ευαίσθητη όσο και η ανθεκτική ποικιλία, εκφράζουν 4 φορές περισσότερο το γονίδιο στην περίπτωση του V6 σταδίου. Τα V6 φυτά της ευαίσθητης που υποβλήθηκαν σε στρες αύξησαν τα επίπεδα έκφρασης, ενώ τα V1 δεν μετέβαλλαν την έκφραση. Ομοίως τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, κατά το ανεπτυγμένο στάδιο αυξάνουν την έκφραση αποκρινόμενα στο στρες ενώ σε νεαρό στάδιο διατηρούν σταθερά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *p5cs*.

3.2.21 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *p5cs*

Τα αποτελέσματα της έκφρασης του γονιδίου *p5cs* που προέκυψαν κατά τον έλεγχο απόκρισης των δύο ποικιλιών σόγιας στα πειράματα του θερμοκηπίου εμφανίζονται στο διάγραμμα 3.21 (αριστερά). Συγκρίνοντας τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στα φυτά που δεν εφαρμόστηκε στρες έλλειψης νερού, παρατηρείται κατά 4 φορές περίπου υψηλότερη έκφραση στα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας. Όσον αφορά την απόκρισή τους στο στρες, η ευαίσθητη ποικιλία την 4^η ημέρα, μείωσε κατά 2,5 φορές ($p < 0,01$) τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες και ακολούθως την 6^η ημέρα, κατά 2 φορές ($p < 0,04$). Από την άλλη, τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας αύξησαν την έκφραση του γονιδίου κατά 3,5 φορές (τιμή $p < 0,0001$) την 4^η ημέρα και ύστερα από δύο ημέρες, η έκφραση μειώθηκε στα ίδια επίπεδα με τους μάρτυρες.

Το διάγραμμα 3.21 (δεξιά), δείχνει τη σχετική έκφραση του γονιδίου *p5cs* στις δύο ποικιλίες κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Συγκρίνοντας την έκφραση των μη στρεσαρισμένων φυτών των δύο ποικιλιών, η ευαίσθητη ποικιλία εκφράζει 4 φορές περισσότερο το γονίδιο συγκριτικά με την ανθεκτική. Όσον αφορά τα στρεσαρισμένα φυτά, οι δύο ποικιλίες δεν αποκρίθηκαν στην υποβολή του στρες, διατηρώντας την έκφραση σταθερή και στα δύο επίπεδα στρες.

Αντιπαραθέτοντας τα αποτελέσματα των αναλύσεων, διαπιστώνονται σημαντικές διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *p5cs* μεταξύ των εξεταζόμενων αναπτυξιακών σταδίων. Αναφορικά με τα φυτά-μάρτυρες, τόσο η ευαίσθητη όσο και η ανθεκτική ποικιλία, εκφράζουν 4 φορές περισσότερο το γονίδιο στην περίπτωση του V6 σταδίου. Τα V6 φυτά της ευαίσθητης που υποβλήθηκαν σε στρες αύξησαν τα επίπεδα έκφρασης, ενώ τα V1 δεν μετέβαλλαν την έκφραση. Ομοίως τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, κατά το ανεπτυγμένο στάδιο αυξάνουν την έκφραση αποκρινόμενα στο στρες ενώ σε νεαρό στάδιο διατηρούν σταθερά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *p5cs*.

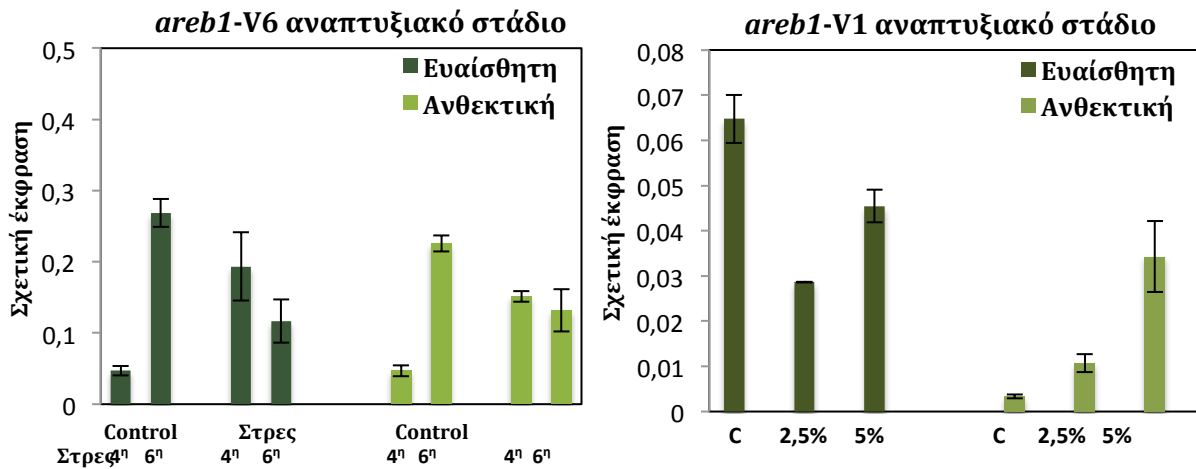


Γράφημα 3.21 Σχετική έκφραση γονιδίου *p5cs* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

3.2.22 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *areb1*

Η ανάλυση των δεδομένων της qRT-PCR για την έκφραση του γονιδίου *areb1* σε φυτά V6 σταδίου υποδεικνύει την ύπαρξη διαφοροποιήσεων κατά την απόκριση στο στρες (διάγραμμα 3.22 δεξιά). Η έκφραση των μη στρεσαρισμένων φυτών μεταξύ των δύο ποικιλιών, κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα. Κατά την υποβολή σε στρες, τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας την 4^η ημέρα αυξάνουν (4 φορές, p 0,045) την έκφραση του γονιδίου *areb1* και ενώ κατά την 6^η ημέρα, παρατηρείται μείωση (2 φορές, p 0,007) της έκφρασης. Παρόμοια εικόνα σημειώθηκε και στα στρεσαρισμένα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας όπου την 4^η ημέρα παρατηρήθηκε αύξηση (3 φορές, p 0,004) και την 6^η ημέρα μείωση της έκφρασης στο μισό (p 0,045) σε σχέση με τους μάρτυρες.

Οι αναλύσεις της έκφρασης του *areb1*, στα πειράματα που εκτελέστηκαν στο εργαστήριο απεικονίζονται στο διάγραμμα 3.22 (δεξιά). Η σχετική έκφραση των controls της ευαίσθητης ποικιλίας ήταν 19 φορές υψηλότερη από τα μη στρεσαρισμένα φυτά της ανθεκτικής. Στην περίπτωση των στρεσαρισμένων φυτών της ευαίσθητης ποικιλίας, στο 1^ο επίπεδο στρες (2,5% PEG) η έκφραση υποδιπλασιάστηκε, ενώ υπό την παρουσία 5%PEG στο μέσο ανάπτυξης των φυτών, η έκφραση ήταν στα ίδια επίπεδα με αυτή των controls. Αντίθετως, σημαντική απόκριση στο στρες έδειξε η ανθεκτική ποικιλία αυξάνοντας την έκφραση κατά 3 και 10 φορές στο 1^ο και 2^ο επίπεδο στρες, αντίστοιχα.



Γράφημα 3.22 Σχετική έκφραση γονιδίου *areb1* σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική και ευαίσθητη). Αριστερά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση στο θερμοκήπιο κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση κατά την 4η και 6η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες σε φυτά-μάρτυρες (control) και στρεσαρισμένα φυτά. Δεξιά: Φυτά που υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση, με τη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση σε φυτά-μάρτυρες (control) και φυτά που υποβλήθηκαν σε 2 επίπεδα καταπόνησης (2,5% και 5% PEG).

Από τη συγκριτική μελέτη της απόκρισης των φυτών στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια προκύπτει η αυξημένη (2.5 φορές) γονιδιακή έκφραση στα φυτά-μάρτυρες της ευαίσθητης ποικιλίας κατά το V6 στάδιο. Αντίστοιχα, τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας χαρακτηρίζονται από σαφώς υψηλότερη (40 φορές) έκφραση κατά το V6 στάδιο ανάπτυξης του φυτού συγκριτικά με τα φυτά V1 σταδίου. Υπό στρες, τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας παρουσίασαν αρχικά αυξημένη και ακολούθως μειωμένη έκφραση του γονιδίου *areb1* κατά το V6 στάδιο, ενώ κατά το V1 τη διατήρησαν σε σταθερά επίπεδα. Παρουσιάζοντας διαφορετικό προφίλ έκφρασης, τα φυτά της ανθεκτικής υπερεκφράζουν το γονίδιο και στα δύο αναπτυξιακά στάδια, ωστόσο σε συνθήκες παρατεταμένης υδατικής καταπόνησης, τα φυτά V6 και V1 σταδίου αποκρίνονται με μείωση και αύξηση της έκφρασης αντίστοιχα.

4. Συζήτηση

4.1 Γενικά

Η ξηρασία αποτελεί έναν από τους σοβαρότερους περιοριστικούς παράγοντες στην απόδοση των καλλιεργειών. Δεδομένης της επερχόμενης κλιματικής αλλαγής και τις καταστροφικές της επιπτώσεις στις καλλιέργειες, η έρευνα έχει στραφεί στη δημιουργία βελτιωμένων ποικιλιών με αυξημένη ανθεκτικότητα στην ξηρασία. Η διελεύκανση των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν την ανθεκτικότητα στην ξηρασία αναμένεται να υλοποιήσει την ταυτοποίηση υποψήφια δεικτών που θα χρησιμοποιούνται για σκοπούς επιλογής γενετικού υλικού που παρουσιάζει αντοχή στην ξηρασία. Παράλληλα, η ανεύρεση γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις γενικότερα και στην ξηρασία ειδικότερα, μπορεί να αξιοποιηθεί για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών που χαρακτηρίζονται από αντοχή στην έλλειψη εδαφικής υγρασίας.

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη επικεντρώθηκε, στην ανάλυση της έκφρασης γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων και άλλων λειτουργικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της σόγιας στην ξηρασία, ένα φυτό ευρέως γνωστό για την ευαισθησία του σε συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας νερού. Για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων μελετήθηκε η απόκριση σε μεταγραφικό επίπεδο δύο ποικιλιών σόγιας, μίας ανθεκτικής και μίας ευαίσθητης στην ξηρασία, υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Παράλληλα, ελέγχθη το προφίλ έκφρασης των γονιδίων σε δύο αναπτυξιακά στάδια για την ανάδειξη ενδεχόμενης επαγωγής έκφρασης συσχετιζόμενης με το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών.

4.2 Διαφορική έκφραση γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων

Οι τελευταίες μελέτες που αφορούν τη διερεύνηση γονιδίων που σχετίζονται με το υδατικό στρες στη σόγια έχουν στραφεί στην οικογένεια του μεταγραφικού παράγοντα NAC. Οι μεταγραφικοί παράγοντες NAC λειτουργούν είτε ως ενεργοποιητές της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στις αβιοτικές καταπονήσεις είτε με την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης (Yu-Jun Hao *et al.*, 2011). Σύμφωνα με τους Tien Le *et al.* (2012) οι μεταγραφικοί παράγοντες NAC, συνιστούν υποψήφια εργαλεία για τη μελλοντική ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών σόγιας ανθεκτικών στην ξηρασία. Στο πλαίσιο διερεύνησης της έκφρασης γονιδίων της οικογένειας NAC υπό συνθήκες υδατικού στρες, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη μελέτη των γονιδίων *nac092*, *nac20*, *nac101*, *nac038*, *nac085*, *nac127* και *nac11*. Τα αποτελέσματα στον πίνακα Α του παραρτήματος δείχνουν συνοπτικά την αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων *nac* στις δύο εξεταζόμενες ποικιλίες σόγιας στα δύο πειράματα που εκτελέστηκαν. Στο σύνολό τους τα αποτελέσματα υποδεικνύουν τη διαφορική έκφραση γονιδίων της οικογένειας NAC στα υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια. Συγκεκριμένα στην ευαίσθητη ποικιλία, είναι προφανής η διαμόρφωση ενός προφίλ χαμηλής γονιδιακής έκφρασης (υποέκφραση) κατά το νεαρό αναπτυξιακό στάδιο (V1) και επαγωγής της έκφρασης κατά το αναπτυξιακό στάδιο V6. Δεδομένου ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες NAC συνιστούν ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, μέσω της επαγωγής ή καταστολής της έκφρασης γονιδίων, το προφίλ μειωμένης έκφρασης κατά το αναπτυξιακό στάδιο V1 πιθανότατα

σχετίζεται με παρεμπόδισμό του κατασταλτικού τους ρόλου. Εναλλακτικά, η μειωμένη έκφραση σε νεαρά αναπτυξιακά στάδια πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το ενεργειακό φορτίο του φυτού έχει μετατοπιστεί σε άλλα πιο σημαντικά για την επιβίωση του φυτού μεταβολικά μονοπάτια.

Πρόσφατες μελέτες που αφορούν στην αξιοποίηση των γονιδίων *nac11* και *nac20* για την ανάπτυξη αβιοτικής ανθεκτικότητας, υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση των γονιδίων αυτών σε φυτά *Arabidopsis* και *Glycine max* προσδίδει ανθεκτικότητα στην υψηλή αλατότητα, καταπόνηση που η συμπτωματολογία της παρουσιάζει ομοιότητες με αυτή της υδατικής (Yu-Jun Hao *et al.*, 2011). Στα πλαίσια αυτά, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η έκφραση των γονιδίων *nac11* και *nac20* υπό συνθήκες υδατικού στρες σε φύλλα φυτών V1 και V6 σταδίου. Παρά το γεγονός ότι κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο τα δύο γονίδια έδειξαν σημαντική υπερέκφραση, κατά το V1 στάδιο η γονιδιακή έκφραση υπήρξε σαφώς μειωμένη σε φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας ενώ αντίθετα δεν σημειώθηκε καμία μεταβολή σε φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας. Παρόμοια επίπεδα χαμηλής έκφρασης των γονιδίων *nac11* και *nac20* σημειώθηκαν σε φύλλα και βλαστούς νεαρών φυτών υπό συνθήκες στρες ξηρασίας και υψηλής αλατότητας (Yu-Jun Hao *et al.*, 2011). Υπό τις ίδιες συνθήκες, οι ρίζες και οι κοτυληδόνες χαρακτηρίζονταν από υπερέκφραση των γονιδίων *nac11* και *nac20*. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι υπό συνθήκες ξηρασίας και υψηλής αλατότητας, η έκφραση των γονιδίων *nac11* και *nac20*, πέραν της γονοτυπικής εξάρτησης, διαφοροποιείται ανάλογα με τον ιστό και το αναπτυξιακό στάδιο.

Αναφορικά με τα υπόλοιπα *nac* γονίδια που εξετάστηκαν, η ανάλυση κατέδειξε σημαντική υπερέκφραση στις περισσότερες των περιπτώσεων και ειδικότερα σε φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας. Συγκεκριμένα, τα γονίδια *nac092* και *nac085* παρουσίασαν υπερέκφραση μόνο στην ευαίσθητη ποικιλία και καμία μεταβολή στην ανθεκτική ποικιλία, ενώ τα γονίδια *nac101* και *nac038*, έδειξαν σημαντική υπερέκφραση, κατά την 6^η ημέρα από την έναρξη εφαρμογής του στρες, στα V6 φύλλα και των δύο εξεταζόμενων ποικιλιών. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, όπου αναλύσεις μικροσυστοιχειών απέδειξαν την αύξηση της έκφρασης γονιδίων της οικογένειας *nac* σε φύλλα σόγιας V6 σταδίου υποβεβλημένης σε υδατικό στρες (Tien Le *et al.*, 2012).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το διαφορετικό προφίλ έκφρασης του γονιδίου *nac127* στις δύο υπό μελέτη ποικιλίες. Συγκεκριμένα, η ευαίσθητη ποικιλία παρουσίασε σταθερά μειωμένη γονιδιακή έκφραση ενώ αντίθετα, η ανθεκτική ποικιλία χαρακτηρίζονταν από αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *nac127* και κατά τα δύο αναπτυξιακά στάδια. Επιπλέον, η μεταβολή της έκφρασης σημειώθηκε στα πρώτα επίπεδα στρες, ορίζοντας έτσι την 4^η ημέρα υποβολής και το επίπεδο στρες 2.5%PEG. Υπό συνθήκες παρατεταμένου στρες αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης ήταν ίδια με αυτά των μαρτύρων. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανώς οφείλονται στο γεγονός ότι υπό παρατεταμένο στρες, το φυτό αδυνατεί να διατηρήσει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *nac127* ή εναλλακτικά, μεταφέρει το ενεργειακό του φορτίο για την έκφραση άλλων γονιδίων. Η διαφορετική αυτή εικόνα που παρουσίασε το γονίδιο *nac127*, υποδηλώνει ίσως μία σχέση ανταγωνιστική μεταξύ του βιοχημικού μονοπατιού που οδηγεί στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NAC127 και των υπολοίπων που εξετάστηκαν. Κατά τα *in vitro* πειράματα, όπου αξιολογήθηκε η απόκριση φυτών V1 αναπτυξιακού σταδίου υπό συνθήκες καταπόνησης με PEG, σημειώθηκε σημαντική μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων *nac101* και *nac127*. Κατά συνέπεια, τα αυξημένα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης μπορεί να

αξιοποιηθούν για τη δημιουργία δεικτών που θα συμβάλουν στην ευχερέστερη ταυτοποίηση ανθεκτικού στην ξηρασία γενετικού υλικού σόγιας.

Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τον σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο που διαδραματίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας DREB στους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων. Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν την υπερέκφραση των γονιδίων *dreb* στη σόγια σε συνθήκες ξηρασίας, παγετού και υψηλής αλατότητας και κάνουν λόγο για τον ρόλο τους στην επαγωγή έκφρασης πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στο αβιοτικό στρες (Nakashima *et al.*, 2014; Kidokoro *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2011). Ειδικότερα, αναφέρεται ότι η υπερέκφραση γονιδίων της οικογένειας DREB1 σε φυτά *Arabidopsis* και *Glycine max* προσδίδει ανθεκτικότητα σε διάφορες δοκιμές αβιοτικής καταπόνησης. Είναι αξιοσημείωτο μάλιστα το γεγονός ότι η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα σχετίζεται με φαινότυπο νάνου (Yamasaki *et al.*, 2016; Kidokoro *et al.*, 2015). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου διερευνήθηκε η διαφορική έκφραση των γονιδίων της οικογένειας DREB1, *dreb1a* και *dreb1b*, υποδεικνύουν ότι το προφίλ έκφρασης των γονιδίων *dreb* σχετίζεται με το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού ή/και το στάδιο κατά το οποίο λαμβάνει χώρα η καταπόνηση. Συγκεκριμένα, τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας διατήρησαν σταθερή την έκφραση των *dreb* γονιδίων όταν υποβλήθηκαν σε στρες κατά το νεαρό αναπτυξιακό στάδιο, αλλά παρουσίασαν σημαντική αύξηση της γονιδιακής τους έκφρασης κατά την υποβολή στρες στο V6 στάδιο ανάπτυξης. Κατά το στάδιο αυτό, και τα δύο εξεταζόμενα γονίδια παρουσιάζουν σημαντική αύξηση της έκφρασής τους στα υποβεβλημένα σε στρες φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας. Ωστόσο, η υπερέκφραση του γονιδίου *dreb1a* είναι σαφώς υψηλότερη σε σχέση με αυτή του γονιδίου *dreb1b*. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες (Kidokoro *et al.*, 2015) και πιθανώς υποδεικνύουν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας DREB1A διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο σε σχέση με τον DREB1B στην άμυνα των φυτών κατά του στρες ξηρασίας. Η υπόθεση αυτή ωστόσο δεν επιβεβαιώνεται στα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, όπου η έκφραση του γονιδίου *dreb1a* δεν μεταβάλλεται σημαντικά στα υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια.

Παράλληλα, ενδιαφέρον παρουσίασε και το προφίλ έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα NYA3, που αφορά σε ένα ρυθμιστικό μόριο η δράση του οποίου σχετίζεται με πολλές φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών. Στην παρούσα εργασία, η έκφρασή του γονιδίου *nyaz* δεν παρουσίασε καμία μεταβολή στα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας. Στην περίπτωση της ανθεκτικής ποικιλίας, τόσο στα νεαρά όσο και στα ώριμα φυτά, η γονιδιακή έκφραση αυξήθηκε σημαντικά υπό συνθήκες παρατεταμένου υδατικού στρες (6^η ημέρα, 5%PEG). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η έκφραση του γονιδίου *nyaz* δεν επάγεται άμεσα σε συνθήκες ξηρασίας αλλά αυξάνει σε οξείες καταστάσεις καταπόνησης. Τα αποτελέσματα συμπίπτουν με αυτά των Zhiyong Ni *et al.* (2013), που έδειξαν υπερέκφραση του γονιδίου *nyaz* σε φυτά σόγιας υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας (με χρήση PEG) και υψηλής αλατότητας. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η έκφραση του *nyaz* σηματοδοτεί την επαγωγή έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα, καθιστούν το μεταγραφικό προφίλ του *nyaz* σημαντικό υποψήφιο δείκτη για την ταυτοποίηση ανθεκτικού γενετικού υλικού.

Κατά τον έλεγχο της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα EREB, παρατηρήθηκαν άμεσα από την 4^η κιόλας ημέρα της καταπόνησης, αυξημένα επίπεδα έκφρασης κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο σε φυτά και των δύο ποικιλιών, σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες.

Αντίστοιχα αποτελέσματα αυξημένης γονιδιακής έκφρασης σε φυτά σόγιας αναπτυξιακού σταδίου V4 αναφέρθηκαν και σε προηγούμενα πειράματα υδατικής καταπόνησης (Marcolino-Gomes *et al.*, 2013). Κατά την παρατεταμένη υδατική έλλειψη ωστόσο, η έκφραση του γονιδίου *ereb* δεν μεταβλήθηκε, υποδεικνύοντας είτε πιθανό χρονικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης είτε απώλεια της ικανότητας του φυτού να μεταβάλλει τη γονιδιακή έκφραση κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αφυδάτωσης. Παρόμοια εικόνα μείωσης της έκφρασης του γονιδίου *ereb* κατά το παρατεταμένο υδατικό στρες στη ρίζα φυτών σόγιας, έδειξαν οι Stolf-Moreira *et al.* (2010). Στα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας δεν σημειώθηκαν διαφορές στο προφίλ έκφρασης του γονιδίου *ereb* ανάμεσα στα δύο εξεταζόμενα αναπτυξιακά στάδια. Αντίθετα, στην ευαίσθητη ποικιλία, υπήρξε σαφής διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ereb* μεταξύ των V1 και V6 σταδίων, μειωμένα και αυξημένα επίπεδα αντίστοιχα, υποδηλώνοντας την συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *ereb* με το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού. Ωστόσο συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που αφορούν αποκλειστικά τα φυτά V1 αναπτυξιακού σταδίου, παρατηρήθηκε υποέκφραση στα φυτά της ευαίσθητης και υπερέκφραση στα φυτά της ανθεκτικής, καταδεικνύοντας την έκφραση του γονιδίου *ereb*, πιθανώς αξιοποιήσιμη στην καταγραφή ανθεκτικού γονοτύπου σε φυτά σόγιας νεαρού αναπτυξιακού σταδίου.

Κατά τον έλεγχο της διαφορικής έκφρασης του γονιδίου *zip1b* στα φυτά σόγιας V6 αναπτυξιακού σταδίου που εφαρμόστηκε το στρες υδατικής καταπόνησης, τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορετικό προφίλ έκφρασης μεταξύ των εξεταζόμενων ποικιλιών, με αυξημένα επίπεδα έκφρασης στα φυτά της ευαίσθητης και μειωμένα στην ανθεκτική. Στα φυτά V1 αναπτυξιακού σταδίου δεν παρατηρήθηκε καμμία μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου *zip1b*, υποδεικνύοντας εξάρτηση έκφρασης του γονιδίου από το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών. Οι Shi-Qing Gao *et al.* (2011), αναφέρουν σημαντική υπερέκφραση του γονιδίου σε φυτά ευαίσθητης ποικιλίας μικρού αναπτυξιακού σταδίου, ενώ πειράματα υπερέκφρασης του *zip1b* σε φυτά *Arabidopsis*, απέδωσαν φυτά με ανθεκτικότητα στο στρες ξηρασίας.

Στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων ZIP ανήκει και ο AREB1, που σε πολλές μελέτες γίνεται λόγος για τη δράση του ως επαγωγέας έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις (Osakabe *et al.*, 2014, Kim *et al.* 2014;, Fugjita Yasunari *et al.*, 2005). Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *areb1* υπό συνθήκες ξηρασίας σε φυτά V1 και V6 αναπτυξιακού σταδίου οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η γονιδιακή έκφραση υπόκειται σαφώς σε εξάρτηση από το στάδιο έναρξης του στρες. Όσον αφορά το V1 αναπτυξιακό στάδιο, οι υπό μελέτη ποικιλίες εμφάνισαν διαφορετικό προφίλ έκφρασης του γονιδίου *areb1*, με την ευαίσθητη ποικιλία να χαρακτηρίζεται από χαμηλά και την ανθεκτική ποικιλία από υψηλά επίπεδα έκφρασης. Κατά το V6 αναπτυξιακό στάδιο αντίθετα, οι υπό μελέτη ποικιλίες παρουσίασαν ανάλογο προφίλ έκφρασης του γονιδίου *areb1*. Ειδικότερα, σημειώθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης κατά την 4^η ημέρα υποβολής του στρες και ακολούθως μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους μάρτυρες κατά την 6^η ημέρα. Πιθανολογείται, ότι η παρατηρηθείσα υποέκφραση του γονιδίου *areb1* την 6^η ημέρα, σχετίζεται με τη μεταφορά του ενεργειακού φορτίου σε πιο κρίσιμα για την επιβίωση μεταβολικά μονοπάτια των φυτικών κυττάρων. Ωστόσο, πειράματα υδατικής καταπόνησης σε φυτά σόγιας, έδειξαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *areb1* προσδίδει ανθεκτικότητα στην ξηρασία (Gargioni *et al.*, 2012). Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν τη

δυνατότητα αξιοποίησης του γονιδίου *areb1* ως δείκτη για την επιλογή του ανθεκτικού γονότυπου μόνο κατά το νεαρό αναπτυξιακό στάδιο.

Μια πολύ σημαντική κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων, που η δράση τους εμπλέκεται στους μοριακούς μηχανισμούς που επιφέρουν αντοχή στις αβιοτικές καταπονήσεις, αποτελεί η οικογένεια των HSFs (heat shock transcription factors). Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν σημαντική υπερέκφραση των γονιδίων *hsf* τόσο κατά το στρες ξηρασίας όσο και υψηλής θερμοκρασίας (BaogeZhu *et al.*, 2006,; Li *et al.*, 2014). Στην παρούσα εργασία, τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας χαρακτηρίζονταν από προφίλ μειωμένης έκφρασης του γονιδίου *hsfa1* κατά την διάρκεια της υδατικής έλλειψης και στα δύο εξεταζόμενα αναπτυξιακά στάδια, με σημαντική μείωση κατά το V1 στάδιο (12 φορές χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους μάρτυρες). Οι Nishizawa-Yoko *et al.*, 2011, αναφέρουν την ανταγωνιστική δράση των μεταγραφικών παραγόντων που ανήκουν στην οικογένεια HSF, που πιθανόν να εξηγεί την σημαντική υποέκφραση του γονιδίου *hsfa1* στην ευαίσθητη ποικιλία. Αντίθετα, στα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας υπήρξε μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης κατά το νεαρό στάδιο ανάπτυξης, ενώ κατά το αναπτυξιακό στάδιο V6 σημειώθηκε υπερέκφραση του γονιδίου *hsfa1*. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν πλήρως με προηγούμενες αναφορές που αποδίδουν σημαντική εξάρτηση της έκφρασης των γονιδίων *hsf* από το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών σόγιας (Li *et al.*, 2014).

4.3 Διαφορική έκφραση γονιδίων λειτουργικών πρωτεϊνών

Η μελέτη της διαφορικής έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την απόκριση των φυτών στο στρες ξηρασίας, κατέδειξε σημαντικές διαφοροποιήσεις τόσο μεταξύ των εξεταζόμενων ποικιλιών όσο και μεταξύ των υπό μελέτη αναπτυξιακών σταδίων (V1 και V6) (βλ. Παράτημα).

Η πρωτεΐνη HSP70 ανήκει στην γενικότερη κατηγορία των heat shock πρωτεϊνών, που λειτουργούν ως συνοδοί (chaperons) νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης, με σκοπό την αποφυγή της μετουσίωσής τους και των επακόλουθων επιζήμιων επιπτώσεών τους στα φυτικά κύτταρα (Al-Whaibi *et al.*, 2010). Σύμφωνα με τη μελέτη των Das *et al.* (2016), η απόκριση των φυτών σόγιας σε συνθήκες καταπόνησης υδατικής ανεπάρκειας και υψηλής θερμοκρασίας περιλαμβάνει την ενεργοποίηση κοινών στρατηγικών άμυνας. Συνεπώς, οι παράγοντες που αποδεδειγμένα συμβάλλουν στην αντοχή των φυτών σε θερμικό στρες συνιστούν ταυτόχρονα και στόχους διερεύνησης για τον ρόλο τους στην ανθεκτικότητα των φυτών στην ξηρασία. Στα πλαίσια αυτά, μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου *hsp70* σε φυτά σόγιας V1 και V6 αναπτυξιακού σταδίου. Στην ευαίσθητη ποικιλία, τα φυτά V6 σταδίου παρουσίασαν αύξηση στη σχετική έκφραση του γονιδίου *hsp70* ενώ αντίθετα, τα φυτά V1 αναπτυξιακού σταδίου μείωσαν σημαντικά την έκφρασή τους, υποδεικνύοντας την εξάρτηση της γονιδιακής έκφρασης από το αναπτυξιακό στάδιο. Ανάλογη εξάρτηση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου *hsp70* από το αναπτυξιακό στάδιο σημειώθηκε και στα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας. Ωστόσο, τα ανθεκτικά στην ξηρασία φυτά παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης και στα δύο υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια. Βέβαια,

αξιοσημείωτη αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *hsp70* σημειώθηκε στα φυτά V1 σταδίου, όπου η γονιδιακή έκφραση εκτινάχθηκε σε επίπεδο 100 φορές υψηλότερο σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά, που συνάδουν με την έρευνα των Ling Zhang *et al.* (2015), αναδεικνύουν τη σημαντική δράση του πρωτεϊνικού μορίου Hsp70 στην άμυνα των φυτών έναντι της ξηρασίας, χαρακτηρίζοντας το γονίδιο *hsp70* ως κατάλληλο διαγνωστικό εργαλείο για την ταυτοποίηση ανθεκτικού στην υδατική καταπόνηση γενετικού υλικού.

Οι πρωτεΐνες Defensin, είναι κοινώς αναγνωρισμένες για την συμβολή τους σε πολλαπλά μονοπάτια άμυνας έναντι βιοτικών καταπονήσεων. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αναφορές για τη δράση των πρωτεϊνών αυτών στην άμυνα των φυτών έναντι αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης (Carvalho *et al.*, 2011). Προς την κατεύθυνση αυτή, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν σαφείς διαφορές στην σχετική έκφραση του γονιδίου *defensin* ανάμεσα στις δύο ποικιλίες. Συγκεκριμένα, η ανθεκτική ποικιλία παρουσίασε ένα προφίλ αυξημένης γονιδιακής έκφρασης σε φυτά και των δύο αναπτυξιακών σταδίων ενώ αντίθετα, η ευαίσθητη ποικιλία χαρακτηρίστηκε από σταθερά επίπεδα έκφρασης κατά το στάδιο V1 και υποέκφραση κατά το στάδιο V6. Τα αποτελέσματα των Stolf-Moreira *et al.* (2010), αποκλίνουν από αυτά της παρούσας μελέτης καθώς δεν αναφέρουν μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου *defensin* στην ανθεκτική ποικιλία σόγιας, ενώ στην ευαίσθητη παρατήρησαν υπερέκφραση μετά από παρατεταμένο χρονικό διάστημα καταπόνησης. Σύμφωνα με τα παραπάνω, απαιτείται περισσότερη διερεύνηση για τον ρόλο της PIP1b, στην άμυνα των φυτών έναντι της υδατικής καταπόνησης.

Το γονίδιο της σόγιας *p5cs* κωδικοποιεί το ένζυμο Δ1-πυρρολίνη-5-καρβοξυλική συνθάση, το οποίο αποτελεί ένζυμο κλειδί στη βιοσύνθεση της προλίνης. Η προλίνη συνιστά ένα σημαντικό αμινοξύ που εμπλέκεται στην κυτταρική οσμωτική ρύθμιση κατά τη διάρκεια της αφυδάτωσης των φυτικών κυττάρων. Παράλληλα, λειτουργεί ως αντιοξειδωτικός παράγοντας που δρα ενάντια των ελευθέρων ριζών, καταστέλλοντας ενδεχόμενες κυτταρικές βλάβες κατά τη διάρκεια του στρες ξηρασίας. Αρκετές μελέτες αναφέρουν την αύξηση της συγκέντρωσης της προλίνης κατά τη διάρκεια υδατικής έλλειψης ενώ ταυτόχρονα, η συσσώρευσή της φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα αντοχής στην ξηρασία (Seki *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2009). Κατά το αναπτυξιακό στάδιο V6, η διερεύνηση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *p5cs* κατέδειξε το διαφορετικό προφίλ έκφρασης μεταξύ των δύο ποικιλιών, με την ανθεκτική ποικιλία να χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα έκφρασης και την ευαίσθητη να παρουσιάζει μειωμένη έκφραση. Ωστόσο, σε ανάλογα πειράματα των Stolf-Moreira *et al.* (2010) σημειώθηκε υποέκφραση στα φυτά και των δύο ποικιλιών με ακολουθούμενη υπερέκφραση κατά το παρατεταμένο στρες, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του γονιδίου εξαρτάται από την ένταση του στρες. Αναφορικά με τα φυτά V1 αναπτυξιακού σταδίου δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες, υποδεικνύοντας εξάρτηση της έκφρασης του γονιδίου *p5cs* με το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών. Πρόσφατες έρευνες όπου μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου *p5cs* σε φυτά ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας V2 αναπτυξιακού σταδίου αναφέρουν υψηλά επίπεδα έκφρασης και στις δύο ποικιλίες, με μεγαλύτερη ωστόσο υπερέκφραση στα φυτά της ανθεκτικής (Soleimani *et al.*, 2015).

Το γονίδιο *gol* εκφράζει τη συνθετάση της γαλακτινόλης, ένα κομβικό ένζυμο που καταλύει το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεση της οικογένειας ολιγοσακχαριτών της ραφινόζης (RFO) από την UDP-γαλακτόζη. Στα ανώτερα φυτά, έχουν αναφερθεί αρκετές λειτουργικές

σημασία δράσεις των RFO, συμπεριλαμβανομένου της προστασίας του εμβρύου από την ωρίμανση που σχετίζεται με την αποξήρανση, της μεταφοράς υδατανθράκων, της συσσώρευσής τους στους φυτικούς ιστούς σε απόκριση ποικίλων αβιοτικών καταπονήσεων και της λειτουργίας τους ως σηματοδοτικά μόρια μετά από επίθεση παθογόνων ή/και τραυματισμό. Ωστόσο, πειράματα μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας έχουν μέχρι στιγμής αποτύχει να αποδείξουν οποιαδήποτε διαταραχή σε αυτές τις βιολογικές λειτουργίες (Sengupta *et al.*, 2015). Στην εργασία αυτή, κατά τον έλεγχο του επιπέδου μεταγραφής του γονιδίου *gol* στα V6 φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας, παρατηρήθηκε άμεσα από την 4^η κιόλας ημέρα από την έναρξη υποβολής του στρες, σημαντική αύξηση των επιπέδων του mRNA (16 φορές υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες), η οποία ακολουθήθηκε από μείωση σε χαμηλότερα επίπεδα την 6^η ημέρα. Αντίστοιχα, στα V6 φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας κατά την 4^η ημέρα σημειώθηκε αύξηση (2 φορές υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες) με ακολουθούμενη μείωση της γονιδιακής έκφρασης την 6^η ημέρα. Το ίδιο μοτίβο έκφρασης παρατήρησαν και οι Stolf-Moreira *et al.* (2010) σε ανθεκτική ποικιλία υπό υδατικό στρες ενώ στις ίδιες συνθήκες, η ευαίσθητη ποικιλία παρουσίασε υποέκφραση. Τα αποτελέσματα τους που αφορούν την ευαίσθητη ποικιλία συμπίπτουν με αυτά της παρούσας μελέτης για τα φυτά V1 σταδίου, όπου επίσης παρατηρήθηκε υποέκφραση, δείχνοντας τη συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου με το αναπτυξιακό στάδιο της ευαίσθητης ποικιλίας. Στα V1 φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, παρατηρήθηκαν όμοιες μεταβολές με τα φυτά V6, σημειώνοντας υπερέκφραση. Οι Downie *et al.* (2003), αναφέρουν ότι η έκφραση των γονιδίων *gol* εξαρτώνται από DREB μεταγραφικούς παράγοντες, γεγονός που δεν ανέδειξαν ούτε οι Stolf-Moreira *et al.* (2010) αλλά ούτε τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής. Σημαντική ήταν η παρατήρηση των Guimaraes-Dias *et al.* (2012), που αφορά στις αποκλίσεις στην έκφραση γονιδίων *gol* που οφείλονται στο σχεδιασμό των πειραμάτων καταπόνησης.

Οι ακουαπορίνες συνιστούν πρωτεΐνες-διαύλους νερού που διευκολύνουν και ρυθμίζουν την παθητική κίνηση των μορίων του νερού στα φυτικά κύτταρα, σε συνθήκες χαμηλού υδατικού δυναμικού. Ο ρυθμός ροής του νερού, μέσα ή έξω από ένα κύτταρο, καθορίζεται από την κλίση του υδατικού δυναμικού που ενεργεί ως κινητήρια δύναμη για τη μεταφορά του. Οι πρωτεΐνες αυτές διευκολύνουν την ώσμωση σχηματίζοντας υδατο-ειδικούς πόρους ως εναλλακτική λύση στην διάχυση νερού διαμέσου της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, αυξάνοντας έτσι την διαπερατότητα του νερού της μεμβράνης. Έχει προταθεί ότι οι ακουαπορίνες του χυμοτοπίου και της πλασματικής μεμβράνης, είναι υπεύθυνες για την ωσμоруθμιση και απαραίτητες για τη διατήρηση των φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών (Porcel *et al.*, 2006). Στην παρούσα εργασία έγινε ανάλυση της διαφορικής έκφρασης του γονιδίου *rip1b* που εκφράζει την μεμβρανική ακουαπορίνη PIP1b. Σε πρόσφατη εργασία των Stolf-Moreira *et al.* (2010), παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *rip1b* σε φυτά ανθεκτικής ποικιλίας υπό υδατικό στρες προφίλ αρχικής μείωσης και επακόλουθης αύξησης της γονιδιακής έκφρασης του σε φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας. Το συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης συγκλίνει με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας που αφορούν στα φυτά V1 σταδίου, τα οποία έδειξαν υποέκφραση του γονιδίου για την ευαίσθητη και υπερέκφραση για την ανθεκτική ποικιλία. Βέβαια, καμία μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου *rip1b* δεν σημειώθηκε στα φυτά V6 αναπτυξιακού σταδίου. Βάσει των αποτελεσμάτων και των δύο εργασιών, το γονίδιο *rip1b*, μπορεί να αξιοποιηθεί ως δείκτης ταυτοποίησης της ανθεκτικότητας σε φυτά σόγιας νεαρού αναπτυξιακού σταδίου. Ωστόσο, πειράματα

υπερέκφρασης του γονιδίου σε καπνό απέτυχαν να αποδώσουν ανθεκτικό φαινότυπο στα φυτά (Aharon *et al.*, 2003).

Οι S-μεταφοράδες της γλουταθειόνης (GSTs) αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια διμερών πρωτεϊνών που καταλύουν τη συμπύκνωση του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH) με μεγάλη ποικιλία υδρόφοβων μορίων. Τα ένζυμα αυτά απαντούν σε όλους τους οργανισμούς και αποτελούν ίσως τον σημαντικότερο μηχανισμό αποτοξίνωσης των κυττάρων (Lambrou *et al.*, 2015). Ήδη από την δεκαετία του 90' έχει ανευρεθεί η συμβολή των GSTs στην αντοχή των φυτών σε πλήθος βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Στα πλαίσια αυτά, η ετερόλογη έκφραση ενός γονιδίου της οικογένειας των GST, προερχόμενου από σόγια, σε φυτά καπνού είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανθεκτικότητας του καπνού στην ξηρασία και στην υψηλή αλατότητα (Ji *et al.* 2010). Αντίστοιχα πειράματα διαγονιδιακής έκφρασης γονιδίων της οικογένειας GSTs σε φυτά *Arabidopsis*, κατέδειξαν επίσης ανθεκτικό φαινότυπο στην ξηρασία (Sharma *et al.*, 2014). Βάσει των παραπάνω, η μεταγραφομική ανάλυση των γονιδίων της οικογένειας των *gst* αποτελεί σημαντική κατεύθυνση έρευνας. Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε η διαφορική έκφραση τριών γονιδίων που εκφράζουν πρωτεΐνες GST, *gst10*, *gst2* και *gst4*. Συνολικά, τα αποτελέσματα χαρακτηρίζονται από σημαντικές διαφορές στο προφίλ έκφρασης των τριών γονιδίων, επιδεικνύοντας διαφορετικό ρυθμιστικό ρόλο μεταξύ των GST10, GST2 και GST4 στο στρες ξηρασίας. Συγκεκριμένα, τα φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας αποκρίθηκαν στο στρες, υπερεκφράζοντας το γονίδιο *gst10* σημαντικά και στα δύο αναπτυξιακά στάδια που εξετάστηκαν (13 και 5 φορές περισσότερο σε σχέση με τους μάρτυρες στα V6 και V1 στάδια αντίστοιχα). Η σημαντική αυτή υπερέκφραση του γονιδίου στα φυτά της ευαίσθητης, υποδηλώνει την πιθανή του χρήση ως δείκτης ευαισθησίας της σόγιας σε υδατική έλλειψη για μετέπειτα μελέτες. Τα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, σημείωσαν επίσης αυξημένη έκφραση του γονιδίου *gst10*, σε χαμηλότερα επίπεδα ωστόσο σε σχέση με την ευαίσθητη. Το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *gst2*, δείχνει εξάρτηση από το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών, καθώς τα στρεσαρισμένα φυτά V1 και V6 αναπτυξιακού σταδίου και των δύο ποικιλιών χαρακτηρίζονταν από μειωμένα και αυξημένα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης αντίστοιχα. Στην περίπτωση του γονιδίου *gst4*, τα αποτελέσματα έδειξαν σαφή μείωση της έκφρασής του υπό συνθήκες υδατικού στρες τόσο στα V6 όσο και V1 φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας. Αντίθετα, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gst4* στα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, καθιστούν το συγκεκριμένο γονίδιο εν δυνάμει δείκτη επιλογής για τον ταυτοποίηση και επιλογή του ανθεκτικού γονοτύπου.

4.4 Συμπεράσματα

Αντικείμενο της παρούσας έρευνας αποτέλεσε η απόκτηση βασικής γνώσης για την έκφραση και το γενετικό έλεγχο του εξαιρετικά πολύπλοκου γνωρίσματος της ανθεκτικότητας της σόγιας στην ξηρασία με τη μελέτη της απόκρισης του φυτού σε μεταγραφομικό επίπεδο. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της σόγιας στην ξηρασία αναμένεται να επιτρέψει την αξιοποίηση της γνώσης αυτής για την ανάπτυξη

στοχευμένων δεικτών έτσι ώστε οι διαδικασίες επιλογών που έχουν ως στόχο την βελτίωση της ανθεκτικότητας της σόγιας στην υδατική καταπόνηση να καταστούν αποτελεσματικότερες, ταχύτερες και λιγότερο δαπανηρές. Τα αποτελέσματα από τη συγκριτική μελέτη ανθεκτικού και ευαίσθητου στην ξηρασία γενετικού υλικού συνθέτουν μια σαφή εικόνα διαφορικής έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή της σόγιας στην ξηρασία. Ταυτόχρονα, το μεταγραφικό προφίλ του υπό μελέτη γενετικού υλικού καταδεικνύει τη δυνατότητα αξιοποίησης συγκεκριμένων γονιδίων ως λειτουργικούς δείκτες για την ταυτοποίηση και επακόλουθη επιλογή ανθεκτικού γενετικού υλικού. Συγκεκριμένα, από τα γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας NAC, διακρίθηκε η έκφραση των γονιδίων *nac127* και *nac 101*, και προτείνεται η αξιοποίησή τους ως βιοδιαγνωστικά εργαλεία επιλογής ανθεκτικών γονοτύπων σόγιας. Ειδικότερα, η έκφραση του γονιδίου *nac127* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ανθεκτικών γονοτύπων τόσο κατά το νεαρό (V1) όσο και κατά το μεταγενέστερο (V6) στάδιο ανάπτυξης, ενώ το γονίδιο *nac 101* μπορεί να αποτελέσει δείκτη ανθεκτικότητας κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο. Αναφορικά με τα υπόλοιπα *nac* γονίδια που εξετάστηκαν, επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση των γονιδίων *nac* με την υδατική ανεπάρκεια της σόγιας ώριμου αναπτυξιακού σταδίου, καθώς σημειώθηκε σημαντική υπερέκφραση στις περισσότερες των περιπτώσεων. Η διερεύνηση της έκφρασης των υπολοίπων μεταγραφικών παραγόντων, ανέδειξε μερικές ισχυρά τεκμηριωμένες περιπτώσεις γονιδίων που δύνανται να αξιοποιηθούν ως εργαλεία επιλογής ανθεκτικών γονοτύπων. Στις περιπτώσεις αυτές, συγκαταλέγεται το γονίδιο *ng3*, που σημείωσε υπερέκφραση στα ανθεκτικά φυτά και των δύο υπό μελέτη αναπτυξιακών σταδίων. Επίσης, το προφίλ έκφρασης των γονιδίων *ereb*, *areb1* και *hsfa1* θεωρείται ως αξιοποιήσιμος δείκτης για την ανεύρεση ανθεκτικού γενετικού υλικού. Συγκεκριμένα, η έκφραση των *ereb* και *areb1* δύνανται να διακρίνει την ανθεκτικότητα σε φυτά νεαρού αναπτυξιακού σταδίου ενώ αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου *hsfa1* μπορεί να αποτελέσει διαγνωστικό εργαλείο για την επιλογή φυτών V6 σταδίου.

Ο έλεγχος του προφίλ έκφρασης γονιδίων που κωδικεύουν λειτουργικές πρωτεΐνες απόκρισης στην υδατική ανεπάρκεια της σόγιας, κατέδειξε ορισμένες ενδιαφέρουσες περιπτώσεις. Τα γονίδια *defensin*, *gol* και *rip1b*, κατά το V1 αναπτυξιακό στάδιο, παρουσίασαν υποέκφραση στα φυτά της ευαίσθητης και υπερέκφραση στα φυτά της ανθεκτικής, καθιστώντας τα ενδεχόμενα εργαλεία επιλογής σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο. Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα της μεταγραφομικής για το γονίδιο *p5cs* στην περίπτωση των φυτών V6 σταδίου. Το ίδιο μεταγραφικό προφίλ προέκυψε και από την ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *gst4*, γεγονός που υποδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης του ως ισχυρό υποψήφιο δείκτη επιλογής. Επικρατέστερη όλων των περιπτώσεων των γονιδίων που κωδικεύουν λειτουργικές πρωτεΐνες προστασίας της σόγιας από την υδατική καταπόνηση που εξετάστηκαν, ήταν αυτή του γονιδίου *hsp70*. Η έκφραση του γονιδίου *hsp70* μπορεί να αξιοποιηθεί για την ταυτοποίηση ανθεκτικών γονοτύπων σόγιας και στα δύο υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια, με σαφέστατα μεγαλύτερη ευχέρεια διάκρισης των γονοτύπων κατά το αναπτυξιακό στάδιο V1 (100πλάσια υπερέκφραση).

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υπογραμμίζουν σαφώς τη δυνατότητα ταυτοποίησης και επιλογής ανθεκτικού στην ξηρασία γενετικού υλικού σόγιας, μέσω του μεταγραφικού προφίλ συγκεκριμένων γονιδίων-δεικτών. Αξιοσημείωτη είναι η δυνατότητα διάκρισης της ανθεκτικότητας από τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, γεγονός που

καθιστά εφικτή την αναβάθμιση της αποτελεσματικότητας επιλογών κατά τα στάδια αυτά. Τα γονίδια που προτείνονται ως εν δυνάμει εργαλεία αξιοποίησής τους για την ανίχνευση ανθεκτικού γενετικού υλικού πρέπει να ελεγχθούν για την αξιοπιστία τους. Στα πλαίσια αυτά, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή πρόσθετων πειραμάτων μεταγραφομικής καθώς και η συσχέτιση των αποτελεσμάτων τους με την αξιολόγηση του υπό μελέτη γενετικού υλικού, μέσω της εκατοστιαίας απώλειας της απόδοσης υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, σε πειράματα αγρού.

Παράρτημα

Πίνακας Α: Σχετική έκφραση γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της σόγιας στην ξηρασία, σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική-ευαίσθητη) κατά τα εξεταζόμενα V1 και V6 αναπτυξιακά στάδια V1 και V6. Με παύλες (---) συμβολίζεται η μη απουσία μεταβολής στην έκφραση. Με τα βέλη \uparrow , \downarrow , συμβολίζεται ο βαθμός υπερέκφρασης και υποέκφρασης, αντίστοιχα.

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.03$, *** $p < 0.01$).

Γονίδιο	V6				V1			
	Ευαίσθητη		Ανθεκτική		Ευαίσθητη		Ανθεκτική	
	4 ^η ημέρα	6 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	6 ^η ημέρα	2,5%PEG	5%PEG	2,5%PEG	5%PEG
<i>nac092</i>	---	20 \uparrow ***	---	---	6 \downarrow	3 \downarrow	---	---
<i>nac20</i>	---	12 \uparrow **	---	5 \uparrow **	4 \downarrow	4 \downarrow	---	---
<i>nac101</i>	---	10 \uparrow *	---	2,5 \uparrow **	2 \downarrow	2 \downarrow	---	2 \uparrow
<i>nac038</i>	---	5 \uparrow ***	---	7 \uparrow **	2 \downarrow	---	---	---
<i>nac085</i>	---	12 \uparrow ***	---	---	4 \downarrow	4 \downarrow	---	---
<i>nac127</i>	5 \downarrow ***	---	7 \uparrow ***	---	3 \downarrow	---	2,5 \uparrow	---
<i>nac11</i>	---	20 \uparrow ***	---	---	2 \downarrow	2 \downarrow	---	---
<i>dreb1a</i>	---	13 \uparrow **	---	---	---	---	---	---
<i>dreb1b</i>	---	3 \uparrow *	4 \uparrow **	---	---	---	---	---
<i>nya3</i>	---	---	---	5 \uparrow *	---	---	---	2,5 \uparrow
<i>ereb</i>	2 \uparrow ***	---	3,5 \uparrow ***	---	2,5 \downarrow	---	---	2 \uparrow
<i>areb1</i>	4 \uparrow *	2 \downarrow ***	3 \uparrow ***	2 \downarrow *	2 \downarrow	---	3 \uparrow	10 \uparrow
<i>zip1b</i>	2,5 \uparrow *	2,5 \uparrow ***	---	3,5 \downarrow ***	---	---	---	---
<i>hsfa1</i>	2 \downarrow **	---	5 \uparrow ***	---	12 \downarrow	---	---	---

Πίνακας Β: Σχετική έκφραση γονιδίων λειτουργικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της σόγιας στην ξηρασία, σε δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική-ευαίσθητη) κατά τα εξεταζόμενα V1 και V6 αναπτυξιακά στάδια V1 και V6. Με παύλες (---) συμβολίζεται η μη απουσία μεταβολής στην έκφραση. Με τα βέλη ↑↓, συμβολίζεται ο βαθμός υπερέκφρασης και υποέκφρασης, αντίστοιχα.

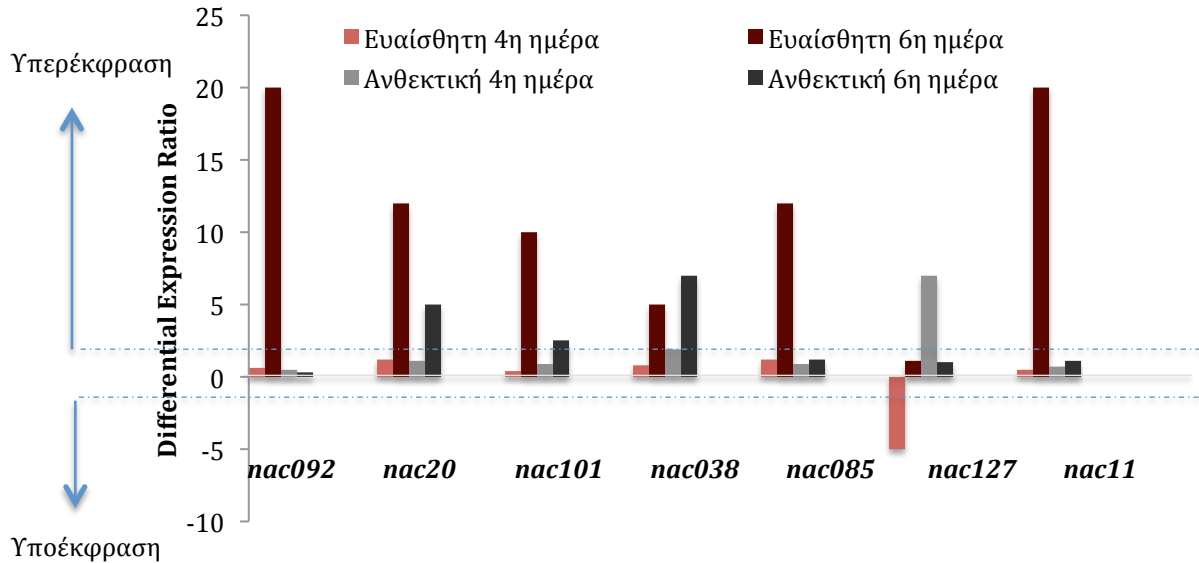
(* p<0.05, ** p<0.03, *** p<0.01).

Γονίδιο	V6				V1			
	Ευαίσθητη		Ανθεκτική		Ευαίσθητη		Ανθεκτική	
	4η ημέρα	6η ημέρα	4η ημέρα	6η ημέρα	2,5%PEG	5%PEG	2,5%PEG	5%PEG
gst10	---	13↑**	3↑*	---	4↑	5↑	---	2↑
gst2	---	2↑**	5↑***	5↑***	3↓	2↓	---	---
gst4	---	5↓**	2↑*	---	2,5↓	---	2,5↑	---
hsp70	---	4↑**	---	---	23↓	13↓	---	100↑
defensin	---	---	6↑***	---	4↓	2↓	---	7↑
p5cs	2,5↓**	2↓*	3,5↑***	---	---	---	---	---
Gol	16↑***	3↑*	2↑***	---	3↓	---	---	5↑
pip1b	---	---	---	---	6↓	2↓	---	5↑

Γραφήματα A-B: Σχετική έκφραση των γονιδίων της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα NAC κατά τα πειράματα υδατικής καταπόνησης στις δύο ποικιλίες σόγιας (ανθεκτική-ευαίσθητη). Απεικονίζεται ο βαθμός υπερέκφρασης και υποέκφρασης των γονιδίων σε σχέση με τα φυτά- μάρτυρες. Ως σημαντική μεταβολή, ορίστηκαν οι διπλάσιες και άνω τιμές (Σχετική έκφραση ≥ 2 , $p < 0,05$). (Για τις περιπτώσεις που η σχετική έκφραση ήταν ≥ 2 με τιμή $p \geq 0,05$, ορίστηκε σχετική έκφραση 1-μη απουσία μεταβολής/μεταβολή)

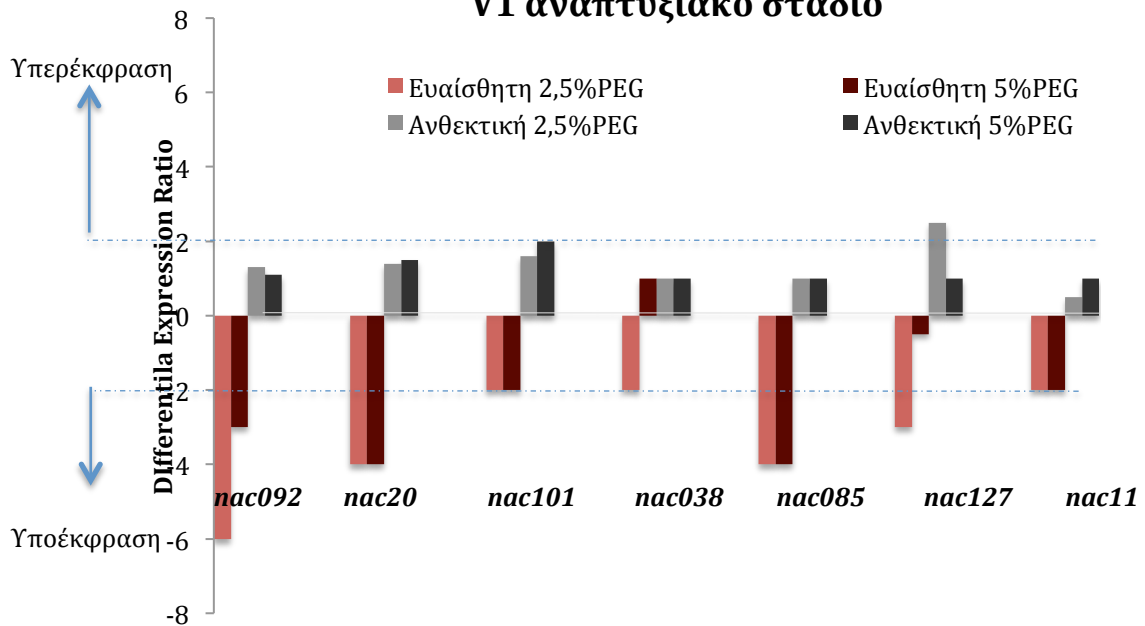
A)

V6 αναπτυξιακό στάδιο



B)

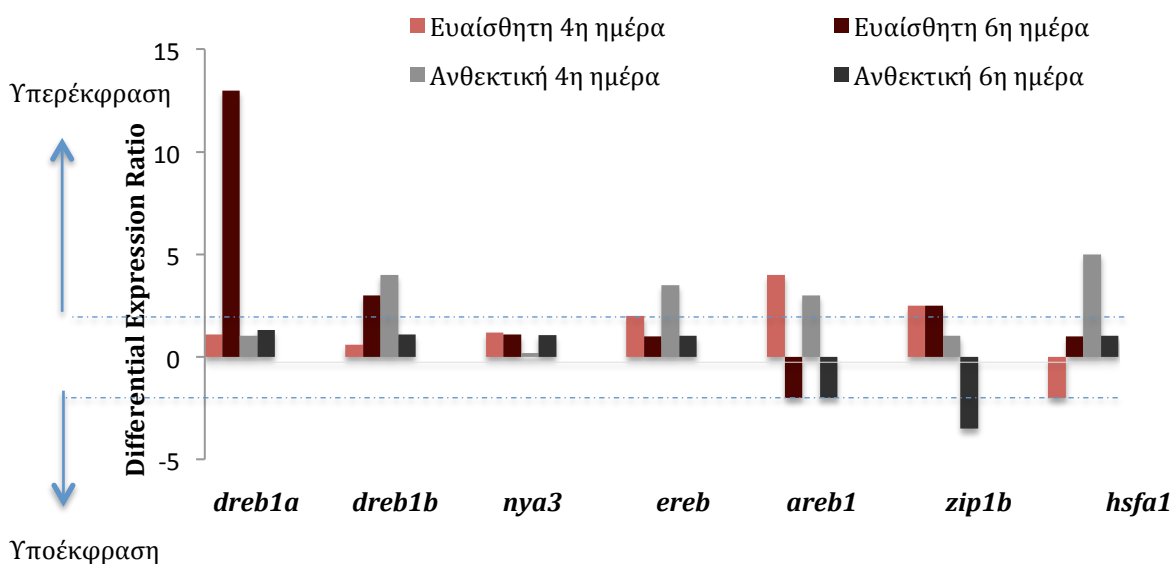
V1 αναπτυξιακό στάδιο



Γραφήματα Γ-Δ: Σχετική έκφραση των γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την ανοχή της σόγιας στην ξηρασία κατά τα πειράματα υδατικής καταπόνησης στις δύο ποικιλίες (ανθεκτική-ευαίσθητη). Απεικονίζεται ο βαθμός υπερέκφρασης και υποέκφρασης των γονιδίων σε σχέση με τα φυτά- μάρτυρες. Ως σημαντική μεταβολή, ορίστηκαν οι διπλάσιες και άνω τιμές (Σχετική έκφραση ≥ 2 , $p < 0,05$). (Για τις περιπτώσεις που η σχετική έκφραση ήταν ≥ 2 με τιμή $p \geq 0,05$, ορίστηκε σχετική έκφραση 1-μη απουσία μεταβολής)

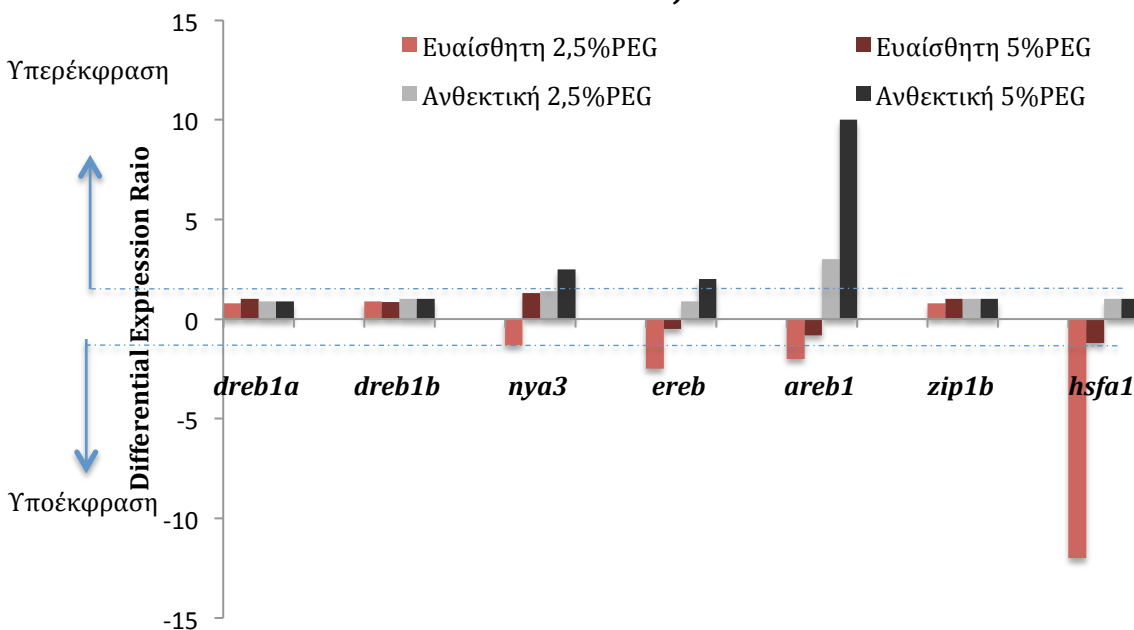
Γ)

V6 αναπτυξιακό στάδιο

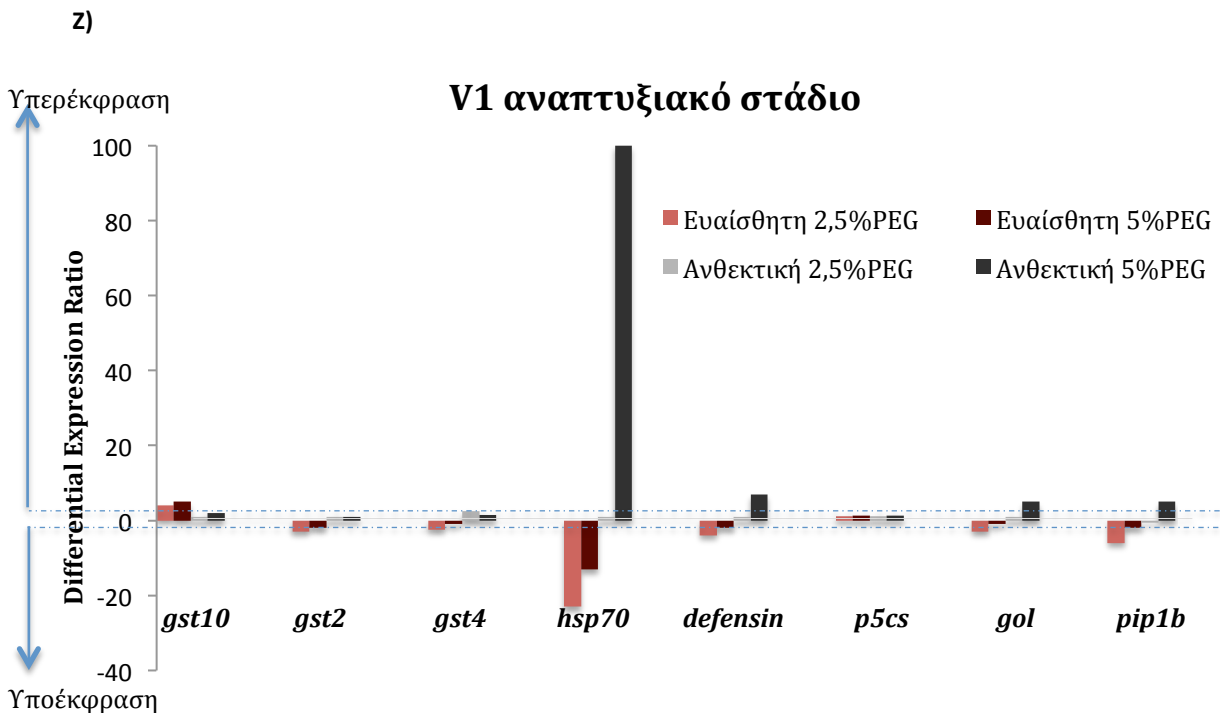
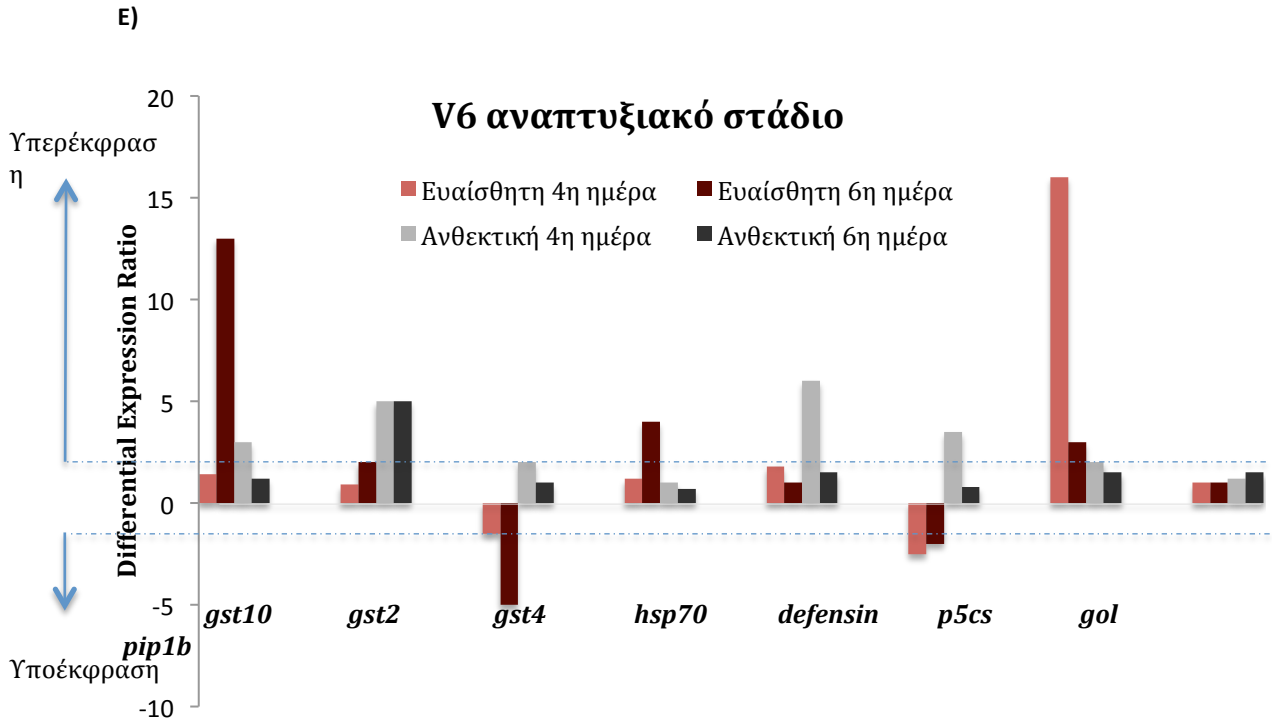


Δ)

V1 αναπτυξιακό στάδιο



Γραφήματα E-Z: Σχετική έκφραση των γονιδίων λειτουργικών που σχετίζονται με την ανοχή της σόγιας στην ξηρασία κατά τα πειράματα υδατικής καταπόνησης στις δύο ποικιλίες (ανθεκτική-ευαίσθητη). Απεικονίζεται ο βαθμός υπερέκφρασης και υποέκφρασης των γονιδίων σε σχέση με τα φυτά- μάρτυρες. Ως σημαντική μεταβολή, ορίστηκαν οι διπλάσιες και άνω τιμές (Σχετική έκφραση ≥ 2 , $p < 0,05$). (Για τις περιπτώσεις που η σχετική έκφραση ήταν ≥ 2 με τιμή $p \geq 0,05$, ορίστηκε σχετική έκφραση 1-μη απουσία μεταβολής)



Βιβλιογραφία

- Aharona Refael, Yosepha Shahak, Smadar Wininger, Rozalina Bendov, Yoram Kapulnik, Gad Galilia: *Overexpression of a Plasma Membrane Aquaporin in Transgenic Tobacco Improves Plant Vigor under Favorable Growth Conditions but Not under Drought or Salt Stress* *The Plant Cell*, Vol. 15, 439–447, www.plantcell.org © 2003 American Society of Plant Biologists. 2003
- Al-Whaibi, M.H. *Plant heat-shock proteins: A mini review. Journal of King Saud University (Science)* (2010), doi:10.1016/j.jksus.2010.06.022. 2010
- Aranda, Patrick S., Dollie M. LaJoie, and Cheryl L. Jorcyk. "Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality." *Electrophoresis* 33.2 (2012): 366–369. PMC. Web. 7 Apr. 2016
- Baoge Zhu, Chunjiang Ye, Huiying Lü, Xiaojun Chen, Guohua Chai, Jiannan Chen, Chao Wang *Identification and characterization of a novel heat shock transcription factor gene, GmHsfA1, in soybeans (Glycine max)* *Journal of Plant Research*, Volume 119, Number 3, Page 247. 2006
- Bohnert HJ, Jensen RG: *Metabolic engineering for increased salt tolerance — the next step. Aust J Plant Physiol*, 23:661-667. 1996
- Breeze E, Harrison E, McHattie S.: *High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. The Plant Cell* 23, 873–894. 2011
- Carvalho A. and Gomes V.: *Plant Defensins and Defensin-Like Peptides - Biological Activities and Biotechnological Applications* *Current Pharmaceutical Design*, 17, 4270-4293. 2011
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco J.: *Understanding plant response to drought – from genes to the whole plant. Functional Plant Biology.* ;30:239–264. 2003
- Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Xia LQ, Ma YZ: *GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. Biochem Biophys Res Commun.* 9;353(2):299-305. 2007
- Cho Jin–Woong, Yamakawa Takeo: *Effects on Growth and Seed Yield of Small Seed Soybean Cultivars of Flooding Conditions in Paddy Field. Fac. Agr., Kyushu Univ.,* 51 (2), 189–193. 2006
- Chomczynski P, Sacchi N. : *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem.* Apr;162(1):156-9.1987
- Christianson JA, Dennis ES, Llewellyn DJ, Wilson IW.: *ATAF NAC transcription factors: regulators of plant stress signaling. Plant Signal Behav.* 428-32. 2010
- Cruz Maria Helena: *Drought stress and reactive oxygen species, Production, scavenging and signaling Plant Signaling & Behavior* 3:3, 156-165. 2008

Das Aayadh, Moustafa Eldakak, Bimal Paudel, Dea-Wook Kim, Homa Hemmati, Chhandak Basu, Jai S. Rohila: Leaf Proteome Analysis Reveals Prospective Drought and Heat Stress Response Mechanisms in Soybean *BioMed Research International* Volume 2016, Article ID 6021047

<http://dx.doi.org/10.1155/2016/6021047>. 2016

Dung Tien Le, Nishiyama R, Watanabe Y, Tanaka M, Seki M, Ham LH, et al. Differential Gene Expression in Soybean Leaf Tissues at Late Developmental Stages under Drought Stress Revealed by Genome-Wide Transcriptome Analysis. *PLoS ONE* 7(11): e49522. doi:10.1371/journal.pone.0049522. 2012

Dixit Ajay K., J. I. X. Antony, Navin K. Sharma and Rakesh K. Tiwari: Soybean constituents and their functional benefits. *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry* 367-383 ISBN: 978-81-308-0448-4. 2011

Downie B, Gurusinghe S, Dahal P, Thacker RR, et al. :Expression of a GALACTINOL SYNTHASE gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented. *Plant Physiol.* 131: 1347-1359. 2003

Fujita Y, Fujita M, Satoh R, et al.: AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*;17(12):3470-3488. doi:10.1105/tpc.105.035659. 2005

Furihata T., Maruyama K., Fujita Y., Umezawa T., Yoshida R., Shinozaki K., et al.: Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 1988–1993 10.1073/pnas.0505667103. 2006

Gargioni Elton, Grisoste Barbosa, Juliana Paula Leite, Silvana Regina Rockenbach Marin et al. Overexpression of the ABA-Dependent AREB1 Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* Improves Soybean Tolerance to Water Deficit *Plant Molecular Biology Reporter*. 2012

Gao Shi-Qing, Ming Chen, Zhao-Shi Xu, Chang-Ping Zhao, Liancheng Li, Hui-jun Xu, Yi-miao Tang, Xin Zhao, You-Zhi Ma: The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. *Springer*. 2011

Grieshop C.M., Kadzere, C.T., Clapper, G.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Frazier, R.L., Fahey, G.C. J. Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals *Agric. Food Chem.*, 51, 7684-7691. 2003

Guimarães-Dias Fabia, Neves-Borges Anna Cristina, Antonio Americo Barbosa Viana, Rosilene Oliveira Mesquita, Eduardo Romano et al. : Expression analysis in response to drought stress in soybean: Shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 222-232, Sociedade Brasileira de Genética. 2012

Hao Yu-Jun, Wei Wei, Qing-Xin Song, Hao-Wei Chen, Yu-Qin Zhang, Fang Wang, Hong-Feng Zou, Gang Lei, Ai-Guo Tian, Wan-Ke Zhang, Biao Ma, Jin-Song Zhang, Shou-Yi Chen: Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants *The Plant Journal* 68, 302–313 doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04687.x. 2011

Harb Amal, Arjun Krishnan, Madana M.R. Ambavaram and Andy Pereira Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth¹. *Plant Physiology* November vol 154 no.3 1254-1271. 2010

Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., and Thomashow, M.F.: Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280104–106. 1998

Ji W, Zhu Y, Li Y, Yang L, Zhao X, Cai H, Bai X. Over-expression of a glutathione S-transferase gene, GsGST, from wild soybean (*Glycine soja*) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett* 32: 1173–1179. 2012

Joe Schwarcz: *The Fly in the Ointment: 63 Fascinating Commentaries on the Science of Everyday Life*. ECW Press. p. 193. ISBN 978-1-55022-621-8. 2004

Karpinski S, Szechynska-Hebda M, Wituszynska W, Burdiak P. Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants. *Plant, Cell and Environment* 36, 736–44. 2013

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.: Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* 17 287–291. 1999

Kaufmann E., Eckard A. Evaluation of Water Stress Control with Polyethylene Glycols by Analysis of Guttation. *Plant Physiology* 47, 453-456. 1970

Kidokoro, S., Watanabe, K., Ohori, T., Moriwaki, T., Maruyama, K., Mizoi, J., Myint Phyu Sin Htwe, N., Fujita, Y., Sekita, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. : Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. *Plant J*, 81: 505–518. doi:10.1111/tbj.12746. 2015

Kim June-Sik, Junya Mizoi, Takuya Yoshida, Yasunari Fujita, Jun Nakajima, Teppei Ohori, Daisuke Todaka, Kazuo Nakashima, Takashi Hirayama, Kazuo Shinozaki and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki An ABRE Promoter Sequence is Involved in Osmotic Stress-Responsive Expression of the DREB2A Gene, Which Encodes a Transcription Factor Regulating Drought-Inducible Genes in Arabidopsis. *Plant and cell physiology*. 2011

Kim Ys, Kim SG, Park HY et al. A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in Arabidopsis. *Plant Cell*. Nov;18(11):3132-44. Epub 2006 Nov 10. 2006

Kosturkova Georgina, Rositsa Todorova, Margarita Dimitrova, Krasimira Tasheva Establishment of tests for facilitating screening of drought tolerance in soybean *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XVIII, ISSN 2285-1364, CD-ROM ISSN 2285-5521, ISSN Online 2285-1372, ISSN-L 2285-1364. 2014

Kudou S., Fleury, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T., Kitamura, K., Okubo, K. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2227-2233. 1991

Kumimoto RW, Siriwardana CL, Gayler KK, Risinger JR, Siefers N, et al.: NUCLEAR FACTOR Y Transcription Factors Have Both Opposing and Additive Roles in ABA-Mediated Seed Germination. *PLoS ONE* 8(3): e59481. doi:10.1371/journal.pone.0059481. 2011

Labrou NE, Papageorgiou AC, Pavli O, Flietakis E. Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response. *Curr Opin Biotechnol.* ;32:186-94. doi: 10.1016/j.copbio.2014.12.024. Epub 2015 Jan 19. 2015

Lata Charu, Prasad Manoj: Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of experimental botany*.2011

Lee Gyoung-Ah; Crawford, Gary W.; Liu, Li; Sasaki, Yuka; Chen, Xuexiang.: Archaeological Soybean (*Glycine max*) in East Asia: Does Size Matter?". *PLoS ONE* 6 (11): e26720. doi:10.1371/journal.pone.0026720. 2015

Levitt J: Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York. 1980

Lichtenthalerl HK.: Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol* 148: 4-14. 1996

Li XP, Tian AG, Luo GZ, Gong ZZ, Zhang JS, Chen SY: Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. *Theoretical and Applied Genetics* ;110:1355-1362. 2005

Li Xu, Zhongyuan Lin, Qing Tao, Mingxiang Liang , Gengmao Zhao, Xiangzhen Yin, Ruixin Fu: Multiple NUCLEAR FACTOR Y Transcription Factors Respond to Abiotic Stress in *Brassica napus* L <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111354>. 2014

Li PS, Yu TF, He GH, Chen M, Zhou YB, Chai SC¹, Xu ZS, Ma YZ. Genome-wide analysis of the Hsf family in soybean and functional identification of GmHsf-34 involvement in drought and heat stresses. *BMC Genomics*. 2014 Nov 21;15:1009. doi: 10.1186/1471-2164-15-1009. 2014

Li W-X, Oono Y, Zhu J, et al.: The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. *The Plant Cell* ;20(8):2238-2251. doi:10.1105/tpc.108.059444. 2008

Liu K.S., Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components. In *Soybean: Chemistry, Technology, and Utilization*, Chapman & Hall, New York, pp. 25-113. 1997

Liu Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.: Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10 1391–1406. 1998

Lonnerdal B. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1680S-5S.2009

Maity SN, de Crombrugge B: Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends Biochem Sci* 23: 174–178. doi: 10.1016/s0968-0004(98)01201-8. 1998

Marcolino-Gomes J, Rodrigues FA, Oliveira MCN, Farias JRB, Neumaier N, et al. Expression Patterns of GmAP2/EREB-Like Transcription Factors Involved in Soybean Responses to Water Deficit. *PLoS ONE* 8(5): e62294. doi:10.1371/journal.pone.0062294. 2013

Maruyama K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.: Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J.* 38 982–993. 2004

Mohammad Sayyar Khan: The Role of Dreb Transcription Factors in Abiotic Stress Tolerance of Plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. Volume 25, pages 2433-2441. 10.5504/BBEQ.2011.0072. 2011

Mohammadkhani N, Heidari R.: *Effect of Drought on Soluble Protein in Two Maize Varieties,* Turkish Journal of Biology, No. 32, pp. 23-30. 2008

Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. *The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat.* *Frontiers in Plant Science*;5:170. doi:10.3389/fpls.2014.00170. 2014

Nishizawa-Yokoi A, Nosaka R, Hayashi H, Tainaka H, Maruta T, Tamoi M, Ikeda M, Ohme-Takagi M, Yoshimura K, Yabuta Y, Shigeoka S. *HsfA1d and HsfA1e involved in the transcriptional regulation of HsfA2 function as key regulators for the Hsf signaling network in response to environmental stress.* *Plant Cell Physiol.* 2011 May;52(5):933-45. doi: 10.1093/pcp/pcr045. 2011

Oertli JJ: *The response of plant cells to different forms of moisture stress.* *J Plant Physiol* 121: 295–300 1985

Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K.: *NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse.* *Trends Plant Sci.* 10(2):79-87. 2005

Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Suzuki K, Kojima K, Takahara Y, Yamamoto K, Kikuchi S. : *Comprehensive analysis of NAC family genes in Oryza sativa and Arabidopsis thaliana.* *DNA Res.* 10(6):239-47. 2003

Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP. *Response of plants to water stress.* *Frontiers in Plant Science.* 2014;5:86. doi:10.3389/fpls.2014.00086. 2014

Ozawa Y., Sato, H., Nakatani, A., Mori, O., Hara, Y., Nakada, Y., Akiyama, Y., Morinaga, Y. *J. Oleo Sci.*, 50, 217-223. 2001

Parraga Ignacio, Jesús López-Torres, Fernando Andrés, Beatriz Navarro, José M del Campo, Mercedes García-Reyes, María P Galdón, Ángeles Lloret, Juan C Precioso and Joseba Rabanales : *Effect of plant sterols on the lipid profile of patients with hypercholesterolaemia. Randomised, experimental study* 11:73DOI: 10.1186/1472-6882-11-73. 2011

Pennisi E. *Plant genetics. The blue revolution, drop by drop, gene by gene.* *Science* 320, 171–173. doi: 10.1126/science.320.5873.171. 2008

Polizel AM, Medri ME, Nakashima K, Yamanaka N, Farias JRB, et al. *Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with rd29A:AtDREB1A for the improvement of drought tolerance.* *Genetics and molecular research: GMR* 10: 3641–3656. 2011

Porcel Rosa, Ricardo Aroca, Rosario Azcon, Juan Manuel Ruiz-Lozano: *PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal Glycine max and Lactuca sativa plants in relation to drought stress tolerance.* *Plant Molecular Biology* 60:389–404 DOI 10.1007/s11103-005-4210-y. 2006

Puranik S Sahu PP, Srivastava PS, Prasad M. *NAC proteins: regulation and role in stress tolerance.* *Trends Plant Sci.* (6):369-81. 2012

Quach, Truyen N. et al. *“Genome-Wide Expression Analysis of Soybean NF-Y Genes Reveals Potential Function in Development and Drought Response.”* *Molecular Genetics and Genomics* 290.3: 1095–1115. PMC. 2015

Sakthivelu G., M. K. Akitha Devi, P. Giridhar, T. Rajasekaran, G. A. Ravishankar, T. Nedev, G. Kosturkova. Drought-induced alterations in growth, osmotic potential and in vitro regeneration of soybean. *Gen applied plant physiology. Special issue 34(1-2)* 103-112. 2008

Sablowski R. W., and Meyerowitz, E. M.: A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* 92, 93–103. doi: 10.1016/S0092-8674(00) 80902-2. 1998

Saio, K. Yamagishi, T., Yamauchi, F. *Cereal Chem.*, 63, 493-496. 1986

Sakuma Yoh, Kyonoshin, Maruyama Yuriko et al.: Functional Analysis of an Arabidopsis Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression *Plant Cell*. 2006 May; 18(5): 1292–1309. 2006

Seo P. J., Kim M. J., Park J. Y., Kim S. Y., Jeon J., Lee Y. H., et al. Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in Arabidopsis. *Plant J.* 61, 661–671. 2010

Seo P.J., Kim S.-G., Park C.-M.: Membrane-bound transcription factors in plants. *Trends Plant Sci.* 13: 550–556. 2008

Seki Motoaki, Umezawa Taishi, Urano Kaoru, Shinozaki Kazuo Regulatory metabolic networks in drought stress responses *Current Opinion in Plant Biology* Volume 10, Issue 3, June 2007, Pages 296–302. 2007

Sengupta S, Mukherjee S, Basak P and Majumder AL :Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front. Plant Sci.* 6:656. doi: 10.3389/fpls.2015.00656. 2015

Shah Jyoti, Ratnesh Chaturvedi, Zulkarnain Chowdhury, Barney Venables, Robby A. Petros: Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *The plant journal*. 2014

Sharma R, Sahoo A, Devendran R, Jain M: Over-Expression of a Rice Tau Class Glutathione S-Transferase Gene Improves Tolerance to Salinity and Oxidative Stresses in Arabidopsis. *PLoS ONE* 9(3): e92900. doi:10.1371/journal.pone.0092900. 2014

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses *Curr Opin Plant Biol.* Oct;6(5):410-7. 2003

Shi-Qing Gao, Ming Chen, Zhao-Shi Xu, Chang-Ping Zhao, Liancheng Li, Hui-jun Xu, Yi-miao Tang, Xin Zhao, You-Zhi Ma The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants *Plant Molecular Biology*, Volume 75, Number 6, Page 537. 2011

Shurtleff William; Aoyagi, Akiko.: *History of Whole Dry Soybeans, Used as Beans, or Ground, Mashed or Flaked (240 BCE to 2013)*. Lafayette, California. 950 pp. 2013

Shurtleff William; Aoyagi, Akiko.: *History of Soybeans and Soyfoods in South America (1882–2009)*. Soy Info Center. ISBN 978-1-928914-23-5. Retrieved February 18, 2012.

Shurtleff W.; Aoyagi, A. "History of Soybeans and Soyfoods in Austria and Switzerland (1781-2015)." Lafayette, California: Soyinfo Center. 705 pp. (1444 references; 128 photos and illustrations). Free online. ISBN 978-1-928914-77-8. 2015

Soleimani Valiollah, Ahmadi Jafar, Golkari Saber, Sadeghzadeh Behzad: Expression profiling of PAP3, BZIP, and

P5CS genes in soybean under drought stress conditions Turkish Journal of Botany 39: 952-961 TÜBİTAK doi:10.3906/bot-1505-12. 2015

Steuter A.: Water Potential of Aqueous Polyethylene Glycol. Plant Physiology 67, 64-67. 1981

Stolf-Moreira R., M.E. Medri , N. Neumaier , N.G. Lemos , J.A. Pimenta , S. Tobita , R.L. Brogin, F.C. Marcelino-Guimarães , M.C.N. Oliveira, J.R.B. Farias , R.V. Abdelnoor and A.L. Nepomuceno Soybean physiology and gene expression during drought. Genet. Mol. Res. 9 (4): 1946-1956. 2010

Sugano, M., Ed., Soy in Health and Disease Prevention, CRC Press, FL, USA, 2006.

Takada S, Hbara K. Ishida T, Tasaka M.The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation. NCBI Apr;128(7):1127-35. 2001

Taverner, N. V., Smith, J. C., and Wardle, F. C.: Identifying transcriptional targets. Genome Biol. 5, 210. doi: 10.1186/gb-2004-5-3-210 2004

Tran LS, Nishiyama R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. GM Crops. 1(1):32-9. doi: 10.4161/gmcr.1.1.10569. 2010

Truyen N., Quach, Hanh T. M. Nguyen, Babu Valliyodan, Trupti Joshi, Dong Xu, Henry T. Nguyen Genome-wide expression analysis of soybean NF-Y genes reveals potential function in development and drought response. Mol. Genet. Genomics 290:1095–1115 DOI 10.1007/s00438-014-0978-2. 2015

Tuteja Narendra, Sopory Sudhir Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. Plant Signaling & Behavior 3:8, 525-536. 2008

Vilagrosa A., E. Chirino, J.J. Peguero-Pina, T.S. Barigah, H. Cochard and E. Gil-Pelegrín Xylem Cavitation and Embolism in Plants Living in Water-Limited Ecosystems. 2012

Wang Songhu, Blumwald Eduardo: Stress-Induced Chloroplast Degradation in Arabidopsis Regulated via a Process Independent of Autophagy and Senescence-Associated Vacuoles.The Plant Cell. 2014

Wendehenne D, Gao QM, Kachroo A, Kachroo P. Free radical-mediated systemic immunity in plantsCurr Opin Plant Biol. 2014

Yamasaki Yusi, Randal Stephen Functionality of soybean CBF/DREB1 transcription factors, Plant Science Vol. 246 Pages 80-90. 2016

Yordanov, I., V. Velikova and T. Tsonev.: Plant responses to drought and stress tolerance. Bulg. J. Plant Physiol., (Special Issue): 187-206. 2003

Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. Plant J. Feb;61(4):672-85. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04092.x. 2010

Xiong Liming, Schumaker Karen, Zhu¹ Jian-Kang Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The plant cell*. 2002

Xue Chen, Zhu Chen, Hualin Zhao, Yang Zhao, Beijiu Cheng, Yan Xiang : Genome-Wide Analysis of Soybean HD-Zip Gene Family and Expression Profiling under Salinity and Drought Treatments *Plos One* .doi.org/10.1371/journal.pone.0087156. 2014

Zhang L, Zhao H-K, Dong Q-L, Zhang Y-Y, Wang Y-M, Li H-Y, Xing G-J, Li Q-Y and Dong Y-S : Genome-wide analysis and expression profiling under heat and drought treatments of HSP70 gene family in soybean (*Glycine max* L.) *Front. Plant Sci.* 6:773. doi: 10.3389/fpls.2015.00773. 2015

Zhang Xunzhong, E.H. Ervin, G.K. Evanylo, and K.C. Haering: Impact of Biosolids on Hormone Metabolism in Drought-Stressed Tall Fescue. Published in *Crop Sci.* 49:1893–1901 (2009). doi: 10.2135/cropsci2008.09.0521. 2009

Zhiyong Ni, Zheng Hu, Qiyan Jiang, Hui Zhang *GmNFYA3, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress Plant Molecular Biology, Page 1.* 2013

Zhong R., Lee C. Ye ZH : Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in *Arabidopsis*. *Mol Plant.* Nov;3(6):1087-103. 2010

Βιβλία

Καραμπουρνιώτης Φυσιολογία καταπονήσεων φυτών 2003

Παπακώστα - Τασοπούλου, Δέσποινα. "Ειδική γεωργία: Σιτηρά και ψυχανθή 2012.

Ρουμπελάκη- Αγγελάκη "Φυσιολογία Φυτών –από το μόριο στο περιβάλλον", επιμέλεια Κ.Α., 2003) Parvaiz Ahmad, M.N.V. Prasad: *Abiotic Stress Responses in Plants*, Springer 2012