



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Βελτίωσης φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού

Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΥΞΗΜΕΝΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΔΥΟ
ΕΙΔΩΝ ΜΗΔΙΚΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ
ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ**

ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ Ι. ΣΑΡΡΗ

ΑΘΗΝΑ, 2018

Επιβλέπουσα: Τάνη Ελένη



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Βελτίωσης φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού

Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΥΞΗΜΕΝΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΔΥΟ
ΕΙΔΩΝ ΜΗΔΙΚΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ
ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ**

ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ Ι. ΣΑΡΡΗ

ΑΘΗΝΑ, 2018

Επιβλέπουσα: Τάνη Ελένη

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΥΞΗΜΕΝΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΔΥΟ
ΕΙΔΩΝ ΜΗΔΙΚΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ
ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ**

ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ Ι. ΣΑΡΡΗ

Επιβλέπουσα: Τάνη Ελένη

Εξεταστική Επιτροπή

Τάνη Ελένη, ως Επιβλέπουσα

Αβραάμ Ελένη, ως Μέλος

Παπαδόπουλος Γεώργιος, ως Μέλος

Περίληψη

Η συσσώρευση ιόντων, λόγω αυξημένης αλατότητας στο έδαφος, αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αβιοτικές καταπονήσεις των καλλιεργούμενων φυτών που επιδρούν αρνητικά στην παραγωγικότητά τους. Μεταξύ των ειδών του γένους *Medicago*, μόνο το είδος *Medicago truncatula*, το οποίο αποτελεί μοντέλο φυτικών ειδών, έχει μελετηθεί εκτενώς, ενώ περιορισμένη είναι η έρευνα για την προσαρμογή στην αλατότητα δύο σημαντικών κτηνοτροφικών ψυχανθών του *M. sativa* και *M. arborea*. Σε προηγούμενη εργασία διαπιστώθηκε ότι τα δύο είδη ανταποκρίνονται σε συνθήκες αλατότητας μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Στην παρούσα μελέτη και σε συνέχεια της προηγούμενης, μελετήθηκε η έκφραση 6 γονιδίων, με σκοπό να διερευνηθεί εκτενέστερα ο τρόπος με τον οποίο αποκλείονται και μεταφέρονται τα ιόντα νατρίου στα διάφορα φυτικά μέρη αποφεύγοντας έτσι την τοξικότητα από ιόντα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μεταβολομική ανάλυση για τη μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών. Έξι γονίδια που σχετίζονται με την αλατότητα, τα *SOS1*, *SOS3*, *NHX2*, *AKT*, *AVP*, *HKT1* μελετήθηκαν σε φύλλα και σε ρίζες που συγκομίστηκαν 1 μήνα μετά την χορήγηση NaCl. Τα γονίδια *SOS1*, *SOS3* εμπλέκονται άμεσα στη ρύθμιση της ανεκτικότητας στην αλατότητα εξαγοντας το νάτριο από τις ρίζες των φυτών και απελευθερώνοντάς το είτε σε κύτταρα του ξύλου είτε στο εξωτερικό εδαφικό περιβάλλον ενώ τα γονίδια *HKT1* και *AKT* παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάκτηση του νατρίου από τα αγγεία του ξύλου στη ρίζα, αποτρέποντας έτσι τη φθορά στα φύλλα που προκαλείται από την αλατότητα. Τα γονίδια *NHX2* και *AVP* δρουν στα φύλλα και στις ρίζες συσσωρεύοντας τα ιόντα νατρίου στο χυμοτόπιο αποτρέποντας έτσι την τοξικότητα από συσσώρευση ιόντων. Τα φυτά ποτίστηκαν για 4 εβδομάδες με διαλύματα NaCl με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 1) σταδιακός εγκλιματισμός σε τελικό διάλυμα 100 mM NaCl ξεκινώντας από συγκέντρωση 50 mM NaCl (10 μέρες) αύξηση χορηγούμενης συγκέντρωσης στα 75mM NaCl (10 μέρες) και περαιτέρω αύξηση της χορηγούμενης συγκέντρωσης στα 100mM NaCl (για τις τελευταίες 10 μέρες πριν την κοπή), και 2) απευθείας χορήγηση διαλύματος συγκέντρωσης 100 mM NaCl. Κατά γενικό κανόνα, η *M. arborea* φαίνεται να υπερεκφράζει και να ενεργοποιεί όλους τους διαθέσιμους μηχανισμούς αντοχής σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας ενώ από την άλλη η *M. sativa* δρα πιο στοχευμένα, υπερεκφράζοντας τα γονίδια *HKT1* και *AKT* που συμβάλλουν στη συσσώρευση των ιόντων νατρίου συγκεκριμένα στη ρίζα. Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης έδειξαν συγκεκριμένα τις σαπωνίνες να παίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στην προστασία των φυτών σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας με μια πιθανή συνεργιστική δράση με τα λιγνάνια μόνο για το είδος *M. sativa*. Τέλος, δείξαμε ότι το μεταβολικό προφίλ του είδους *M. arborea* διαφέρει από το προφίλ της *M. sativa* και του υβριδίου τους.

Επιστημονική περιοχή: Γενετική Βελτίωση Φυτών

Λέξεις κλειδιά: αλατότητα, έκφραση γονιδίων, μηχανισμοί αντοχής, *M. arborea*, *M. sativa*, δευτερογενείς μεταβολίτες

Investigation of resilient mechanisms in conditions of increased salinity of two *Medicago* species through expression of genes and accumulation of secondary metabolites

Abstract

The accumulation of ions, due to increased salinity in the soil, is one of the major abiotic stresses of cultivated plants that negatively affect their productivity. Among *Medicago* species, only *Medicago truncatula*, which is a model of plant species, has been extensively studied, while research into the adaptation to salinity of two important forage legumes of *M. sativa* and *M. arborea* has been limited. In previous work it was found that the two species respond to salinity conditions through different mechanisms. In the present study and following the previous study, the expression of 6 genes was studied in order to investigate more extensively the way in which sodium ions are blocked and transferred to the various plant parts, thus avoiding ion toxicity. In addition, metabolic analysis was performed for the study of secondary metabolites. Six saline-related genes, *SOS1*, *SOS3*, *NHX2*, *AKT*, *AVP*, *HKT1*, were studied in leaves and roots harvested 1 month after NaCl administration. The *SOS1*, *SOS3* genes are directly involved in regulating salinity tolerance by extracting sodium from the plant roots and releasing it either into wood cells or in the outer terrestrial environment while the *HKT1* and *AKT* genes play an important role in the recovery of sodium from the xylem to the root, thus preventing leaf damage caused by salinity. The *NHX2* and *AVP* genes act on leaves and roots by accumulating sodium ions in the vacuole, thus preventing ion-accumulation toxicity. The plants were watered for 4 weeks with NaCl solutions with the following concentrations: 1) gradual acclimatization in a final solution of 100 mM NaCl starting at a concentration of 50 mM NaCl (for 10 days) increasing concentration to 75 mM NaCl (for 10 days) and further increasing the concentration in 100mM NaCl (for the last 10 days prior to cutting), and 2) directly administering a solution of 100 mM NaCl. As a general rule, *M. arborea* appears to overexpress and activate all available mechanisms of resistance in conditions of increased salinity while on the other hand *M. sativa* acts more targeted, over-expressing the *HKT1* and *AKT* genes that contribute to the accumulation of sodium ions in particular in root. The results of the metabolic analysis showed specifically that saponins play the most important role in protecting plants in conditions of increased salinity with a possible synergistic action with lignans only for *M. sativa* species. Finally, we have shown that the metabolic profile of *M. arborea* differs from that of *M. sativa* and their hybrid.

Scientific Area: Plant Breeding

Key words: salinity, gene expression, resilient mechanisms, *M. arborea*, *M. sativa*, secondary metabolites

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Οικονομική σημασία	10
1.2 Προσαρμοστικότητα.....	11
1.3 Καταπόνηση αλατότητας.....	13
1.4 Αντιδράσεις των φυτών στην καταπόνηση αλατότητας.....	15
1.5 Βελτίωση της αντοχής στην αλατότητα	17
1.6 Ενεργειακό κόστος της Αντοχής	19
1.7 Έκφραση γονιδίου <i>AVP</i>	20
1.8 Έκφραση γονιδίου <i>HKT1</i>	22
1.9 Έκφραση γονιδίου <i>AKT</i>	24
1.10 Έκφραση γονιδίων <i>SOS</i>	24
1.11 Έκφραση γονιδίου <i>NHX2</i>	25
1.12 Metabolomics – Μεταβολομική ανάλυση.....	27
1.13 Μεταβολικές αποκρίσεις στην ωσμωτική καταπόνηση	29
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
2.1 Φυτικό υλικό.....	32
2.2 Προβλάστηση σπόρων	32
2.3 Συνθήκες σποράς.....	32
2.4 Μεταχειρίσεις	32
2.5 Διάλυμα Hoagland.....	33
2.6 Συλλογή ιστού	33
2.7 Απομόνωση RNA.....	34
2.8 Μέτρηση συγκέντρωσης RNA.....	34
2.9 Καθαρισμός Δειγμάτων.....	35
2.10 Σύνθεση cDNA.....	36
2.11 PCR.....	37
2.12 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων.....	38
2.13 Το πρόγραμμα της Real-Time.....	39
2.14 Εκχύλιση μεταβολιτών	40
2.15 Συνθήκες ανάλυσης μεταβολιτών	40
2.16 Στατιστική ανάλυση	41
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
3.1 Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης έκφρασης γονιδίων	42
3.2 Έκφραση γονιδίου <i>SOS1</i>	46

3.3 Έκφραση γονιδίου <i>SOS3</i>	48
3.4 Έκφραση γονιδίου <i>NHX2</i>	50
3.5 Έκφραση γονιδίου <i>AKT</i>	52
3.6 Έκφραση γονιδίου <i>AVP</i>	53
3.7 Έκφραση γονιδίου <i>HKT1</i>	55
3.8 Μεταβολομική ανάλυση.....	57
3.9 Αποτελέσματα μεταβολομικής ανάλυσης	58
3.10 Πίνακες αποτελεσμάτων μεταβολομικής ανάλυσης	61
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

2.1. Συστατικά διαλύματος ενίσχυσης ανάπτυξης Hoagland.....	33
2.2. Αλληλουχίες εκκινητών γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν.....	39
3.1 Οι σημαντικότερες σαπωνίνες που ανιχνεύθηκαν στο είδος <i>M. sativa</i>	61
3.2 Οι σημαντικότερες σαπωνίνες που ανιχνεύθηκαν στο είδος <i>M. arborea</i>	61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

3.1. Ενδεικτικά αποτελέσματα για τον αριθμό κύκλων που απαιτούνται για το κάθε δείγμα, το οποίο για το κάθε γονίδιο βρίσκεται σε δύο επαναλήψεις, μέχρι να υπάρχει ορατό προϊόν. Στα πηγάδια με πράσινο χρώμα έχουν τοποθετηθεί εκκινητές το γονιδίου αναφοράς την ακτίνης ενώ στα πηγάδια με μωβ χρώμα το γονίδιο που μελετάται.....	43
3.2. Ενδεικτικά αποτελέσματα για τον αριθμό κύκλων που απαιτούνται για το κάθε δείγμα, μέχρι να υπάρχει ορατό προϊόν.....	44
3.3. Ενδεικτική εικόνα καμπύλης όπου φανερώνει ότι στην θερμοκρασία των 79 βαθμών Κελσίου περίπου μετουσιώθηκε το 50 % των προϊόντων όταν έγινε πολλαπλασιασμός με <i>NHX</i> εκκινητές.....	45
3.4. Μέση έκφραση γονιδίου <i>SOS1</i> στο <i>M. sativa</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P<0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	46
3.5. Μέση έκφραση γονιδίου <i>SOS1</i> στο <i>M. arborea</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P<0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	47
3.6. Μέση έκφραση γονιδίου <i>SO31</i> στο <i>M. sativa</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P<0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	48
3.7. Μέση έκφραση γονιδίου <i>SOS3</i> στο <i>M. arborea</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P<0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	49
3.8. Μέση έκφραση γονιδίου <i>NHX2</i> στο <i>M. sativa</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P<0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	50
3.9. Μέση έκφραση γονιδίου <i>NHX2</i> στο <i>M. arborea</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P<0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	51
3.10. Μέση έκφραση γονιδίου <i>AKT</i> στο <i>M. sativa</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P<0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	52
3.11. Μέση έκφραση γονιδίου <i>AKT</i> στο <i>M. arborea</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P<0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	52

3.12. Μέση έκφραση γονιδίου <i>AVP</i> στο <i>M. sativa</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	53
3.13. Μέση έκφραση γονιδίου <i>AVP</i> στο <i>M. arborea</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	54
3.14. Μέση έκφραση γονιδίου <i>HKT1</i> στο <i>M. sativa</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	55
3.15. Μέση έκφραση γονιδίου <i>HKT1</i> στο <i>M. arborea</i> στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.....	56
3.16 Χρωματογράφημα Quality Control (pooled sample) των δευτερογενών μεταβολιτών των τριών ειδών <i>Medicago</i> (ρίζες & υπέργεια τμήματα) σε Negative Mode.....	58
3.17 Χρωματογράφημα Quality Control (pooled sample) των δευτερογενών μεταβολιτών των τριών ειδών <i>Medicago</i> (ρίζες & υπέργεια τμήματα) σε Positive mode.....	58
3.18 Ανάλυση PCA για τις ρίζες των τριών ειδών μηδικής σε Negative (αριστερά) και Positive (δεξιά) Mode.....	59
3.19 Ανάλυση PCA για τα υπέργεια τμήματα των τριών ειδών μηδικής σε Negative (αριστερά) και Positive (δεξιά) Mode	59
3.20. Ανάλυση PCA για τα τους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς για την <i>M. sativa</i> (αριστερά) και <i>M. arborea</i> (δεξιά).....	60
3.21 Χρωματογράφημα που παρουσιάζει κατά πάσα πιθανότητα λιγνάνιο $R_t = 15.8 \text{ min}$, $C_{22}H_{26}O_6$, m/z 386, MS/MS: C_8H_8O , C_8H_8	62

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στη λέκτορα Τάνη Ελένη που αρχικά δέχτηκε να επιβλέψει την μεταπτυχιακή μου μελέτη και που με την πολύτιμη βοήθειά της, σε όλα τα στάδια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης μου μετέδωσε πολύτιμες γνώσεις. Η κα Τάνη με μεγάλη προθυμία και τις γνώσεις και την εμπειρία που την διακατέχουν, μου δίδαξε τον τρόπο που σκέφτεται και ενεργεί ένας ερευνητής και της οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια, στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Αβραάμ Ελένη και την ερευνήτρια στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Κατερίνα Τερμεντζή που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους η παρούσα μελέτη δεν θα είχε ολοκληρωθεί.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον καθηγητή Παπαδόπουλο Γεώργιο ο οποίος δέχτηκε να συμμετέχει στην τριμελή εξεταστική επιτροπή ώστε να αξιολογήσει και να βαθμολογήσει την παρούσα μελέτη, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στον Τσιαντή Περίανδρο για την υπομονή, συμπαράσταση και στήριξη που μου έδειξαν σε όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αβιοτικές καταπονήσεις επηρεάζουν άμεσα την ανάπτυξη των φυτών και την παραγωγικότητά τους. Οι καταπονήσεις αυτές μπορεί να είναι η χαμηλή θερμοκρασία, η αλατότητα, η ξηρασία, η υπερβολική υγρασία, η αυξημένη θερμοκρασία και η τοξικότητα από βαρέα μέταλλα και είναι ικανές να προκαλέσουν σημαντικές μειώσεις στην παραγωγή των καλλιεργούμενων φυτών σε παγκόσμια κλίμακα.

Η αλατότητα μπορεί να προκαλέσει ταυτόχρονα ιοντική και ωσμωτική καταπόνηση και να οδηγήσει σε ολοκληρωτικό θάνατο των καλλιεργειών. Η υψηλή συγκέντρωση αλάτων στο έδαφος οδηγεί σε χαμηλό υδατικό οριζόντιο, δυσκολεύοντας έτσι τα φυτά να απορροφήσουν νερό καθώς και θρεπτικά στοιχεία. Με αυτόν τον τρόπο η καταπόνηση στην αλατότητα οδηγεί σε συνθήκες έλλειψης νερού στα φυτά.

Η κοινή μηδική *Medicago sativa* αποτελεί το σημαντικότερο χορτοδοτικό φυτό παγκοσμίως και η σπουδαιότητά του οφείλεται στα θρεπτικά συστατικά αλλά και την καλλιεργητική συμπεριφορά του φυτού. Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε ακόμη το είδος μηδικής *Medicago arborea* καθώς και το υβριδίό τους *Alborea*.

Σκοπός της εργασίας ήταν να διερευνηθούν οι μηχανισμοί απόκρισης των δύο ειδών μηδικής και του υβριδίου τους, σε συνθήκες αλατότητας μέσω της μελέτης και ανάλυσης έξι γονιδίων και δευτερογενών μεταβολιτών.

1.1 Οικονομική σημασία

Η κοινή μηδική (*M. sativa*) είναι το σπουδαιότερο κτηνοτροφικό φυτό σε παγκόσμια κλίμακα. Σε όλο τον κόσμο καλλιεργούνται 330 περίπου εκατομμύρια στρέμματα, κυρίως για την παραγωγή σανού και κατά δεύτερο για ενσίρωση και βόσκηση. Σύμφωνα με τον Δαλιάνη, 1993, σε μια παγκόσμια θεώρηση παρατηρεί κανείς ότι η καλλιέργεια της μηδικής συγκεντρώνεται σε 5 κύρια μηδικοπαραγωγικά κέντρα. Το κυριότερο από αυτά είναι εκείνο της Βόρειας Αμερικής με 39% (33% οι Ηνωμένες Πολιτείες και 6 % ο Καναδάς). Ακολουθεί το κέντρο της Αργεντινής με 23 %, της Ρωσίας με 13%, της Ιταλίας-Γαλλίας με 10% και της Αυστραλίας με 3%.

Κατά τα τελευταία χρόνια σε όλες σχεδόν τις μηδικοπαραγωγικές χώρες παρατηρήθηκε μια γενική τάση αύξησεως των καλλιεργούμενων με μηδική εκτάσεων. Στην Ευρώπη η καλλιεργούμενη έκταση σχεδόν διπλασιάστηκε κατά την τελευταία δεκαετία. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στις χώρες της νοτιοανατολικής Ευρώπης, όπως η Ρουμανία, Ουγγαρία, Πολωνία, Ιταλία και Ελλάδα. Αύξηση επίσης παρατηρήθηκε στην Αυστραλία και στη

Βόρεια

Αμερική.

Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της μηδικής καταλαμβάνει έκταση 2,15 εκατομμυρίων στρεμμάτων. Οι κυριότερες μηδικοπαραγωγικές περιοχές είναι οι Νομοί Σερρών, Έβρου, Αιτωλοακαρνανίας, Θεσσαλονίκης, Καρδίτσας, Ιωαννίνων, Ροδόπης και Πέλλης. Στους 8 αυτούς Νομούς καλλιεργείται το 50 % της εκτάσεως που καταλαμβάνει η μηδική. Η ετήσια παραγωγή σανού φθάνει τα 2,15 εκατομμύρια τόνους με μια μέση στρεμματική απόδοση στα 1000 χιλιόγραμμα. Η Μακεδονία και η Στερεά Ελλάδα έχουν τις υψηλότερες αποδόσεις.

Στην Ελλάδα καλλιεργούνται και άλλα 70.000 στρέμματα μηδικής για την παραγωγή σπόρου. Η κυριότερη σποροπαραγωγική περιοχή είναι η Φθιώτιδα και ακολουθούν ο Νομός Έβρου, Βοιωτίας και Καρδίτσας. Στους 4 αυτούς Νομούς συγκεντρώνεται το 90% των καλλιεργούμενων εκτάσεων. Η ετήσια παραγωγή σπόρου ανέρχεται σε 1.700 τόνους με μια μέση στρεμματική απόδοση γύρω στα 25 χιλιόγραμμα.

1.2 Προσαρμοστικότητα

Η καλλιέργεια της μηδικής περιορίζεται κυρίως στις εύκρατες περιοχές της γης και αναπτύσσεται σε υψόμετρα που βρίσκονται κάτω από το επίπεδο της επιφάνειας της θάλασσας έως 3.000 μέτρων. Στις τροπικές περιοχές καλλιεργείται μόνο σε υψηλά υψόμετρα που επικρατούν εύκρατες συνθήκες.

Το καλύτερο κλίμα για την ανάπτυξη της μηδικής σύμφωνα με την Παπακώστα, (2005), είναι εκείνο που έχει ήπιο χειμώνα και καλοκαίρι θερμό και ξηρό. Ας σημειωθεί όμως ότι για να παραχθεί ένα χιλιόγραμμο ξηρής ουσίας απαιτούνται 700-900 χιλιόγραμμα νερού. Έτσι και παρά το γεγονός ότι η μηδική προτιμά ξηρά περιβάλλοντα και μπορεί να περάσει χωρίς ζημιά μια μικρή περίοδο ξηρασίας εν τούτοις έχει μεγάλες απαιτήσεις σε νερό. Για το λόγο αυτό στα κλίματα αυτά η μηδική πρέπει να αρδεύεται οπότε μπορεί να ζήσει 15-20 χρόνια.

Στα υγρά κλίματα, παρόλο ότι της εξασφαλίζεται η απαιτούμενη επάρκεια υγρασίας και νερού η μηδική δεν αναπτύσσεται και τόσο ικανοποιητικά είτε γιατί τα εδάφη των κλιμάτων αυτών έχουν ξεπλυθεί και είναι όξινα είτε γιατί η απόδοση και η ποιότητα του σανού ζημιώνεται από τους άφθονα αναπτυσσόμενους βιολογικούς εχθρούς και ασθένειες που προσβάλλουν την κεφαλή, τους βλαστούς και τα φύλλα της. Στα κλίματα αυτά, κοντά στα άλλα, δυσχεραίνεται και η αποξήρανση του σανού, η δε διάρκεια της ζωής της σπάνια υπερβαίνει τα 5 έως 6 χρόνια. Χαρακτηριστικό της μηδικής είναι ότι έχει την πιο μεγάλη προσαρμοστικότητα από τα περισσότερα καλλιεργούμενα πολυετή είδη. Υπάρχουν βιότυποι μηδικής που προσαρμόζονται σε ψυχρά ή σε ζεστά και ξηρά κλίματα και αναπτύσσονται σε εδάφη που ποικίλλουν από τα βαριά αργιλώδη έως τα αμμώδη.

Η θερμοκρασία δεν φαίνεται να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την καλλιέργεια της μηδικής. Η μηδική αντέχει τόσο στις χαμηλές όσο και στις υψηλές θερμοκρασίες. Ας

σημειωθεί όμως ότι οι ανθεκτικές στο ψύχος ποικιλίες δεν προσαρμόζονται στα ζεστά κλίματα και αντίθετα οι ποικιλίες που προσαρμόζονται στα ζεστά κλίματα δεν προσαρμόζονται στα ψυχρά.

Κατά την περίοδο των πολύ υψηλών θερμοκρασιών τα φυτά της μηδικής μεταπίπτουν σε ένα είδος νάρκης (λήθαργος) και η ανάπτυξη τους σταματά σε θερμοκρασίες που δεν είναι άμεσα θανατηφόρες. Παράλληλα η έκθεση των φυτών στις υψηλές θερμοκρασίες προκαλεί διάφορες μορφολογικές αλλαγές. Οι υψηλές θερμοκρασίες και ιδιαίτερα εκείνες της νύχτας έχουν σαν συνέπεια την αύξηση της αναπνοής και μείωση των αποθηκευόμενων υδατανθράκων με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου ζωής της καλλιέργειας. Πιο έντονα είναι τα αποτελέσματα αυτά όταν παράλληλα με τις υψηλές θερμοκρασίες γίνονται και συχνές κοπές (Δαλιάνης, 1993, Κοντσιώτου, 2005).

Η μηδική θεωρείται από τα πιο ανθεκτικά καλλιεργούμενα φυτά στις χαμηλές θερμοκρασίες. Η αντοχή αυτή ρυθμίζεται από πολλούς γενετικούς παράγοντες, η έκφραση των οποίων επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, τη φωτοπερίοδο και το εδαφικό περιβάλλον. Ο ρυθμός πτώσης της θερμοκρασίας του αέρα και του εδάφους, η ελάχιστη θερμοκρασία πτώσης και ο ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας μετά την πτώση, επηρεάζουν την επιβίωση. Την μεγαλύτερη αντοχή στο κρύο παρουσιάζει η κεφαλή της μηδικής. Ενδιάμεση ανθεκτικότητα έχουν οι ρίζες και μικρή τα φύλλα.

Τα νεαρά φυτά της μηδικής από τη στιγμή που θα βγουν οι κοτυληδόνες τους πάνω από την επιφάνεια του εδάφους μέχρις ότου αποκτήσουν 4 ή 5 φύλλα είναι πολύ ευαίσθητα στις παγωνιές. Τα καλά αναπτυγμένα φυτά μπορεί να αντέξουν πιο πολύ στις χαμηλές θερμοκρασίες υπό την προϋπόθεση όμως ότι τα αποθέματα των υδατανθράκων τους είναι μεγάλα.

Η κατάσταση νερού των μεσοκυττάρων χώρων, αλλά κυρίως η κατάσταση του νερού εντός των κυττάρων είναι ο πιο σπουδαίος παράγοντας που καθορίζει την έκταση των ζημιών από την παγωνιά. Η δημιουργία κρυστάλλων στους μεσοκυττάρους χώρους δεν είναι απαραίτητα επιζήμια, ενώ αντίθετα η δημιουργία κρυστάλλων μέσα στα κύτταρα αποβαίνει σχεδόν πάντα θανατηφόρα.

Η θερμοκρασία που επικρατεί στην περιοχή των ριζών ασκεί σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη της μηδικής. Η ανάπτυξη του υπέργειου μέρους ευνοείται από τις υψηλές σχετικά θερμοκρασίες, ενώ αντίθετα η ανάπτυξη των ριζών ευνοείται από τις χαμηλές.

Η μηδική χρειάζεται σημαντικές ποσότητες νερού για την ανάπτυξή της και για το λόγο αυτό, στις ξηροθερμικές περιοχές οι μέγιστες αποδόσεις λαμβάνονται με άρδευση. Επιβιώνει όμως και θεωρείται φυτό ανθεκτικό στην ξηρασία, λόγω του ότι επεκτείνει το ριζικό της σύστημα σε μεγάλο βάθος στο έδαφος από όπου αντλεί υγρασία. Επίσης έχει την ιδιότητα, σε

περιόδους ξηρασίας, να αναστέλλει την ανάπτυξή της και όταν της δοθεί επάρκεια υγρασίας να αναβλαστάνει. Δεν αναπτύσσεται όμως καλά στα υγρά εδάφη, στα συνεκτικά και στα εδάφη όπου η υπόγεια στάθμη του νερού, για μεγάλο χρονικό διάστημα, είναι πολύ υψηλή. Με περίσσεια υγρασίας στο έδαφος καταστρέφεται το ριζικό της σύστημα λόγω έλλειψης οξυγόνου, ανάπτυξης ασθενειών και σχηματισμού διάφορων τοξικών ουσιών στις ρίζες. Επίσης μειώνεται η βλαστική ανάπτυξη και αραιώνει η φυτεία καθώς μειώνεται η αντοχή στον παγετό. Ανθεκτικότερη στην κατάκλυση είναι η μηδική κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, κατάκλυση διάρκειας μεγαλύτερης από 24 ώρες προκαλεί ζημιές στην καλλιέργεια.

Όσον αφορά το έδαφος, η μηδική παρουσιάζει μεγάλη προσαρμοστικότητα. Δεν είναι πολύ απαιτητική, αναπτύσσεται όμως καλύτερα σε βαθιά, μέσης μηχανικής σύστασης, διαπερατά και γόνιμα εδάφη, με ικανοποιητική περιεκτικότητα σε ασβέστιο. Στα βαριά εδάφη ή σε εκείνα που έχουν χαμηλό pH, η μηδική δεν ευδοκιμεί. Αναπτύσσεται καλύτερα σε pH που κυμαίνεται από 6,6 έως 7,5. Το άριστο pH εξαρτάται όμως από τη δομή, την οργανική ουσία και διάφορες χημικές παραμέτρους του εδάφους. Σε εδάφη με pH μικρότερο από 6 πρέπει να γίνει προσθήκη ασβεστίου πριν από την εγκατάσταση της μηδικής. Η υψηλή οξύτητα του εδάφους έχει κυρίως έμμεση επίδραση στην ανάπτυξη της μηδικής, γιατί σχετίζεται με την έλλειψη ασβεστίου και μερικές φορές φωσφόρου καθώς και με την τοξική επίδραση ορισμένων στοιχείων όπως μαγγανίου και αργιλίου. Επίσης στα όξινα εδάφη μειώνεται η αζωτοδέσμευση. Τα νεαρά φυτά της μηδικής είναι πολύ ευαίσθητα στην αλατότητα του εδάφους και γι' αυτό είναι δύσκολη η εγκατάσταση της μηδικής σε αλατούχα εδάφη. Τα αναπτυγμένα όμως φυτά παρουσιάζουν μέτρια ως αρκετή αντοχή στην αλατότητα και αλκαλικότητα του εδάφους ανάλογα, με το γενότυπο (Δαλιάνης, 1993, Κοντσιώτου, 2005).

1.3 Καταπόνηση αλατότητας

Η έκθεση σε συνθήκες αλατότητας επιδρά στα φυτά με διάφορους τρόπους όπως στην μεταβολή του ωσμωτικού δυναμικού, στην ιοντική τοξικότητα και την διαταραχή της πρόσληψης θρεπτικών ουσιών (Lauchli and Epstein, 1990). Ο βαθμός με τον οποίο επιδρά ένας μηχανισμός εις βάρος άλλων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του είδους, γονότυπου, ηλικίας φυτού, ιοντική δύναμη και σύσταση του διαλύματος άλατος. Η καταπόνηση στην αλατότητα επιδρά στα φυτά από τη στιγμή που υποβάλλονται σε αυτή, μέχρι και την ωρίμανσή τους (Munns, 2002a). Σύμφωνα με τους Jenks et al., 2007, λίγες στιγμές μετά την εφαρμογή άλατος τα κύτταρα αφυδατώνονται, συρρικνώνονται αλλά επανακτούν τον αρχικό τους όγκο ώρες αργότερα. Παρά την ανάκαμψη, η επιμήκυνση και η

έκταση των διαιρεμένων κυττάρων μειώνεται οδηγώντας σε μικρότερα ποσοστά φυλλικής και ριζικής ανάπτυξης.

Φυτά τα οποία δέχονται μεγάλες δόσεις αλατότητας συχνά εμφανίζουν ορατά τραύματα. Ύστερα από εβδομάδες η ανάπτυξη πλευρικών βλαστών επηρεάζεται και υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε φυτά που έχουν υποβληθεί σε αλατότητα και σε αυτά που δεν έχουν.

Έχει διαπιστωθεί ότι το στάδιο ανάπτυξης φυτών επηρεάζει την ευαισθησία της καλλιέργειας στην αλατότητα. Αν και υπάρχουν εξαιρέσεις, οι περισσότερες έρευνες πληροφορούν ότι οι περισσότερες ετήσιες καλλιέργειες είναι ανεκτικές κατά τη βλαστική περίοδο αλλά ευαίσθητες κατά το φύτευμα και κατά την αρχική ανάπτυξη (Lauchli and Epstein, 1990; Maas and Grattan, 1999). Όσο τα φυτά προχωρούν στην ωρίμανση γίνονται σταδιακά περισσότερο ανεκτικά στην αλατότητα ιδιαίτερα σε μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης.

Τα ιόντα Na^+ και Cl^- βρίσκονται στο έδαφος σε συγκεντρώσεις μεταξύ 1-5 mM. Τα πιο ευαίσθητα στην αλατότητα φυτά εμφανίζουν σημάδια μειωμένης ανάπτυξης σε συγκέντρωση περίπου 30 mM NaCl. Σε αντίθεση όμως κάποια αλόφυτα είναι ικανά να παράγουν αυξημένη βιομάζα ακόμη και σε συγκέντρωση ίση με του θαλασσινού νερού στα 440 mM NaCl περίπου ή ίση με των αλυκών στα 1000 mM (Flowers et al., 1986 ; Glenn et al., 1998). Μεταξύ 30 και 440 mM ο αντίκτυπος του NaCl ποικίλει ανάλογα με τη συγκέντρωση, το βαθμό συσσώρευσης, την παρουσία άλλων ιόντων όπως K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , τη διάρκεια της καταπόνησης, το γονότυπο και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως θερμοκρασία, υγρασία, ένταση φωτός. Υπερβολικές ποσότητες Na^+ και Cl^- στη ριζόσφαιρα καθυστερούν την ανάπτυξη, μειώνουν την απόδοση και προκαλούν ακόμη και θάνατο δημιουργώντας έλλειψη νερού, τοξικότητα ιόντων, μείωση θρέψης με τη μορφή ιοντικής ανισορροπίας.

Φυσιολογικές και βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αντοχή στην αλατότητα εξαρτάται από ένα εύρος προσαρμογών που σχετίζονται με διάφορες πτυχές της φυσιολογίας όπως : ιοντική διαμερισματοποίηση (Blits and Gallagher, 1990), παραγωγή ωσμωλυτών (Lutts et al., 2004), αντίδραση βλάστησης (Poljakoff – Mayber et al., 1994), ωσμωτική προσαρμογή (Lutts et al., 1996a; Lutts, 2000), ευχυμία (Naidoo and Rughunanan, 1990), επιλεκτική μεταφορά και πρόσληψη ιόντων (Lutts et al., 1995, 1996b), αντίδραση ενζύμων (Greenway, 1972) και απέκκριση άλατος και γενετικός έλεγχος (Flowers, 2004).

Για να είναι ικανά τα φυτά να αναπτυχθούν σε εδάφη με μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος είναι απαραίτητο να διατηρούν χαμηλή τη συγκέντρωση νατρίου στο κυτταρόπλασμα.

Πειράματα έδειξαν ότι η αντοχή στην αλατότητα έχει πολύπλοκο γενετικό έλεγχο που χαρακτηρίζεται από ετέρωση σε συνθήκες αλατότητας (Tal and Shannon, 1983), και είναι

πολυγονιδιακό χαρακτηριστικό (Akbar and Yabuno, 1977), με προσθετικές και κυρίαρχες επιδράσεις (Azhar and McNeilly, 1988; Subbarao et al., 1990).

1.4 Αντιδράσεις των φυτών στην καταπόνηση αλατότητας

Σε συνθήκες αλατότητας, τα φυτά επάγουν διαδικασίες που ρυθμίζουν την ωσμωτική προσαρμογή έτσι ώστε να διατηρηθεί η κυτταρική σπαργή εν μέρει, μέσω συσσώρευσης συμβατών διαλυτών ουσιών.

Η συσσώρευση προλίνης κατά την αφυδάτωση λόγω υψηλής αλατότητας έχει καταγραφεί σε βακτήρια, φύκια και ανώτερα φυτά και η αιτιώδης σχέση μεταξύ αυξημένης συσσώρευσης προλίνης και αντοχής στα φυτά σε υπερωσμωτικές καταπονήσεις, έχει αποδειχθεί (Hare et al., 1999). Η περιεκτικότητα σε προλίνη στα φύλλα και ρίζα της μηδικής αυξήθηκαν δραματικά όταν τα φυτά υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση ανεξάρτητα από το αν είχαν εμβολιαστεί ή όχι με μύκητες ή βακτήρια ή και τα δύο (Goicoechea et al., 1998). Ωστόσο, βρέθηκε ότι η περιεκτικότητα σε προλίνη σε ρίζα της μηδικής δεν εμφάνισε σημαντική διαφορά έπειτα από 72 ώρες εφαρμογής 90 mM NaCl, ενώ δύο Δ-pyrroline-5-carboxylate (P5CS) γονίδια επάχθηκαν μεταγραφικά σε ανώτερα επίπεδα καθόλη τη διάρκεια της ανάλυσης (Ginzberg et al., 1998a). Ενώ το P5CS αναγνωρίζεται ως πρόδρομο ένζυμο στη βιοσύνθεση της προλίνης, η σχέση μεταξύ αυξημένης μεταγραφής και συσσώρευσης της προλίνης στη μηδική δεν έχει κατανοηθεί πλήρως.

Εκτός από την προλίνη, η προλίνη βεταΐνη και η γλυσίνη βεταΐνη είναι ανάμεσα στα κύρια συμβατά διαλύματα (ωσμολύτες) που βρέθηκαν σε μηδική μετά από καταπόνηση (Girousse et al., 1996 ; Ginzberg et al., 1998b). Η μηδική είναι ένα από τα ελάχιστα φυτά που συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες από προλίνη και προλίνη βεταΐνη ταυτόχρονα (Trinchant et al., 2004). Ο συνδυασμός αυτός μπορεί να βοηθήσει στο να εξηγηθεί η υψηλή σχετική ωσμωτική αντοχή της μηδικής. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η προλίνη βεταΐνη έχει καταβοληθεί αποτελεσματικά μέσω διαδοχικών απομεθυλιώσεων σε N-μεθυλοπρολίνη και προλίνη. Η καταπόνηση με αλατότητα βρέθηκε ότι έπαιξε μικρό ρόλο στη βιοσύνθεση ενώ είχε μεγαλύτερη επίδραση στη μείωση της μετατροπής της προλίνης βεταΐνης σε N-μεθυλοπρολίνη και προλίνη. Ωστόσο, ο μηχανισμός της βιοσύνθεσης της προλίνης βεταΐνης και η μετατροπή της στην μηδική δεν έχει διευκρινιστεί.

Η ωσμωτική είναι πρωτεύουσα που υπάρχει στα κύτταρα των φυτών προσαρμοσμένων σε συνθήκες αλατότητας. Ο ρόλος της είναι άγνωστος και υπάρχει λίγη γνώση για τις φυσιολογικές επιδράσεις της.

Ακόμη αριθμός δεδομένων φανερώνει την συσσώρευση, κάτω από συνθήκες αλατότητας, διαφορών υδατανθράκων και πολυολών που συντελούν στην ωσμωρύθμιση.

Η τοξική επίδραση της αλατότητας αποφεύγεται από τα φυτά διαχωρίζοντας ιόντα και συμβατά διαλύματα μέσα σε κύτταρα και ιστούς. Αυτό το φαινόμενο ρυθμίζεται με μεταφορικές διαδικασίες (Blumwald, 2000 ; Hasegawa et al., 2000; Zhang et al., 2001).

Σύμφωνα με του Goyal et al., 2003, η αντίδραση στην αλατότητα περιλαμβάνει κυρίως δύο μηχανισμούς αντοχής : την ελαχιστοποίηση εισόδου του άλατος στο φυτό και την ελαχιστοποίηση της συγκέντρωσης άλατος στο κυτταρόπλασμα. Ένας άλλος πιθανός τρόπος αντίδρασης των φυτών στην αλατότητα μπορεί να σχετίζεται με την μεταχείριση της σύστασης λιπιδίων της μεμβράνης. Οι Allakhverdiev et al. (1999) ανέφεραν ότι η καταστολή των γονιδίων *desA* και *desD* στο κυανοβακτήριο *Synechocystis sp.* έδωσαν ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωση ακόρεστων λιπαρών οξέων, ασκώντας έντονη επίδραση στη λειτουργία του φωτοσυστήματος II καθώς επίσης και στη λειτουργία αντιμεταφοράς Na^+/H^+ . Μια εξήγηση είναι η βελτίωση της ροής της μεμβράνης, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη λειτουργία αντιμεταφοράς Na^+/H^+ και την προστασία του οξυγόνου που σχετίζεται με μηχανισμούς κατά των τραυματισμών από καταπόνηση σε συνθήκες αλατότητας.

Η διατήρηση ωσμωτικής ομοιότητας καθορίζεται είτε από την διαμερισματοποίηση του Na^+ , είτε από τη βιοσύνθεση και συσσώρευση ωσμολυτών.

Η ωσμωτική καταπόνηση προκαλεί την επαγωγή των πρωτεϊνών LEA (late-embryogenesis-abundant) που επιδρούν στην αντοχή στην αφυδάτωση σε βλαστικούς ιστούς των φυτών. Αυτός ο τύπος πρωτεϊνών κωδικοποιείται από γονίδια που ανταποκρίνονται στην αφυδάτωση (responsive to dehydration - RD), που ανταποκρίνονται πρόωρα στην αφυδάτωση (early responsive to dehydration - ERD), που επάγονται από το κρύο (cold inducible - KIN), που ρυθμίζονται από το κρύο (cold regulated - COR) και που ανταποκρίνονται στο ABA (responsive to ABA - RAB), σε διάφορα φυτικά είδη (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Zhu, 2002). Η συσσώρευση αυτών των πρωτεϊνών σχετίζεται με αντοχή σε καταπονήσεις σε διάφορα φυτικά είδη υποδηλώνοντας έναν προστατευτικό ρόλο κάτω από συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης.

Ένας άλλος μηχανισμός των φυτών για αντοχή στην αλατότητα είναι η συσσώρευση ιόντων σε διάφορα διαμερίσματα ιστού, κενοτόπια ή παλιά φύλλα (Flowers and Yeo, 1992; Munns, 1993; Yeo, 1998). Κάποια φυτά, είτε συγκρατούν τα άλατα στη βάση των φύλλων ή στο στέλεχος, είτε δίνουν κατεύθυνση του άλατος μακριά από τα νεότερα φύλλα προς τα γηραιότερα.

Στα περισσότερα φυτά, τα Na^+ και Cl^- περιορίζονται αποτελεσματικά από τις ρίζες, κατά τη διάρκεια απορρόφησης του νερού από το έδαφος (Munns 2005). Κατά την ωσμωτική πίεση, τα φυτά παράγουν ωσμωλύτες όπως η βεταΐνη γλυκίνη, η τρεχαλόζη ή προλίνη, που τα προστατεύουν από την αφυδάτωση ή μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Σχετικά με τα αμινοξέα, ενώ η υπερβολική τους συσσώρευση μπορεί να επιφέρει ζημιά στα κύτταρα, σε κάποια είδη αυξημένα επίπεδα συγκεκριμένων αμινοξέων μπορεί να έχουν θετική επίδραση κατά τον εγκλιματισμό σε συνθήκες καταπόνησης (Widodo et al., 2009).

Σύμφωνα με μια θεωρία οι παραπάνω μηχανισμοί αντίδρασης στην καταπόνηση θα μπορούσαν να συνοψιστούν σε δύο μόνο κατηγορίες : στην αποφυγή και την αντοχή (Levitt, 1980). Η αποφυγή περιλαμβάνει μια ποικιλία από προστατευτικούς μηχανισμούς που καθυστερούν ή προλαμβάνουν τις αρνητικές επιπτώσεις της καταπόνησης στα φυτά ενώ η αντοχή είναι η ικανότητα του φυτού να εγκλιματιστεί σε συνθήκες καταπόνησης.

Η ανταπόκριση των φυτών στην αλατότητα, με βάση τους Mahajan et al., 2005, μπορεί να συμβαίνει σε δύο φάσεις : σε μια γρήγορη ωσμωτική φάση που αναστέλλει την ανάπτυξη των νεαρών φύλλων και σε μια αργή ιοντική φάση που επιταχύνει την γήρανση των ώριμων φύλλων.

Συνοψίζοντας, η αυξημένη συγκέντρωση άλατος στο εδαφικό νερό αναστέλλει την ανάπτυξη των φυτών για δύο λόγους. Πρώτον μειώνει την ικανότητα του φυτού να προσροφήσει νερό με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της ανάπτυξης και δεύτερον μπορεί να εισαχθεί στο ρεύμα διαπνοής και να προκαλέσει τραυματισμούς των κυττάρων των φύλλων με περαιτέρω μείωση της ανάπτυξης. Κάθε είδος ενεργοποιεί διαφορετικούς μηχανισμούς για ικανοποιητική ανταπόκριση σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας.

1.5 Βελτίωση της αντοχής στην αλατότητα

Λόγω της εξάπλωσης καλλιιεργειών σε οριακές περιοχές, η βελτίωση της αντοχής των καλλιιεργειών σε συνθήκες αυξημένης εδαφικής αλατότητας γίνεται συχνά αντικείμενο μελέτης για τους βελτιωτές. Σύμφωνα με τους Ruan et al., 2010, ένα συνηθισμένο πρόβλημα στις αρδευόμενες καλλιιεργείες είναι η βαθμιαία αύξηση του υδατικού οριζοντα και επομένως της αλατότητας η οποία μπορεί να είναι επιζήμια στην παραγωγή της καλλιιεργείας. Επίσης, επιζήμια μπορεί να είναι η υπερβολική λίπανση που προκαλεί περίσσεια ιόντων Na, Ca, η άρδευση με νερό κακής ποιότητας και η ελλιπής στράγγιση. Τέτοιου είδους καταπονήσεις περιορίζουν σημαντικά την παραγωγικότητα της μηδικής μέσω των δυσμενών συνθηκών στην ανάπτυξη και στην ικανότητα αζωτοδέσμευσης. Η αλατότητα μπορεί να μεταβάλλει την έκφραση γονιδίων μέσω της γονιδιακής ρύθμισης και της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης.

Η γενετική βελτίωση των κτηνοτροφικών φυτών μέσω της κλασσικής βελτίωσης είναι μια πολύ αργή διαδικασία. Ένας λόγος είναι ότι τα περισσότερα κτηνοτροφικά φυτά είναι σταυρογονιμοποιούμενα με ισχυρό αυτοασυμβίβαστο κάτι που περιορίζει τις διασταυρώσεις που στοχεύουν στη συγκέντρωση των επιθυμητών γονιδίων. Επιπλέον, επιθυμητά γονίδια μεταφέρονται σε συνδυασμό με ανεπιθύμητα ενώ αναπαραγωγικά εμπόδια περιορίζουν την

μεταβίβαση ευνοϊκών αλληλομόρφων από διειδικές και διαγενικές πηγές (Chinnusamy et al., 2005). Στη γονιδιακή δεξαμενή των πιο σημαντικών καλλιεργειών, το πλήθος των γενετικών πληροφοριών είναι περιορισμένο επομένως δεν αναμένονται σημαντικά αποτελέσματα ως προς την βελτίωση για αντοχή στις αυξημένες συγκεντρώσεις αλατότητας (Ashraf and Akram, 2009). Η μεταφορά γονιδίων με σκοπό την αντοχή στην αλατότητα από άγριους συγγενείς στα καλλιεργούμενα είδη είναι δύσκολη λόγω αναπαραγωγικών εμποδίων και με τη μέθοδο της κλασσικής βελτίωσης οι επιτυχίες που έχουν καταγραφεί είναι αρκετά περιορισμένες (Ashraf, 1994; Flowers, 2004; Ashraf et al., 2008).

Τα εργαλεία της μοριακής βιολογίας για τη μεταφορά ενός ή κάποιων γονιδίων παρέχουν ελπίδες για τη μείωση των αρνητικών επιπτώσεων της ευρείας μεταφοράς γονιδίων που γίνεται σε ευρείες διασταυρώσεις. Λόγω της παρουσίας ωσμωλυτών και τοξικών ουσιών κατά την ανταπόκριση των φυτών στην καταπόνηση, οποιαδήποτε προσπάθεια βελτίωσης πρέπει να διαβεβαιώνει τη διατήρηση συνεχούς ροής νερού μέσα στους ιστούς των φυτών και επίσης την αποφυγή συσσώρευσης ιόντων μέσα στα κυτταρικά διαμερίσματα που μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα ιόντων (Turan et al., 2012).

Ο ευρύς υβριδισμός με συγγενικά είδη που οδηγεί στην ανάμειξη του γενετικού υλικού μέσω χρωμοσωμικού ανασυνδυασμού θεωρείται ένας αποτελεσματικός τρόπος να μεταφερθούν γονίδια που προσδίδουν αντοχή στην αλατότητα στα είδη-στόχος προκειμένου να διευρυνθεί η γενετική δεξαμενή. Ενδογενείς υβριδισμοί μεταξύ των ειδών *Lolium* και *Festuca* έχουν παρουσιάσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για του βελτιωτές κτηνοτροφικών ειδών (Karami et al., 2014).

Η γενετική τροποποίηση επιτρέπει την άμεση εισαγωγή γονιδίων και επομένως προσφέρει καινούριες δυνατότητες για τη μοριακή βελτίωση των κτηνοτροφικών φυτών. Παρόλα αυτά η παραγωγή φυτών με αντοχή στην αλατότητα μέσω γενετικής μηχανικής μέχρι στιγμής έχει περιορισμένη επιτυχία. Ένας λόγος είναι ότι στις περισσότερες περιπτώσεις μόνο ένα γονίδιο μεταφέρεται ενώ η αντοχή στην αλατότητα είναι πολυγονιδιακό χαρακτηριστικό και επίσης ένα πλήθος φυσιολογικών, βιοχημικών και μοριακών διεργασιών εμπλέκονται στον μηχανισμό της αντοχής στην αλατότητα (Zhu, 2002). Οι Ashraf et al., 2008 σε πείραμά τους με το φυτό *Arabidopsis* είδαν ότι η συμπεριφορά των φυτών (απόδοση-ευρωστία κοκ) κάτω από συνθήκες αυξημένης αλατότητας μπορεί να είναι διαφορετική σε ελεγχόμενες συνθήκες όπως στο εργαστήριο ή στο θερμοκήπιο από αυτή σε φυσικό περιβάλλον λόγω αλληλεπίδρασης εδαφικών και κλιματικών παραγόντων οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν τη συνολική ανάπτυξη των φυτών.

Σύμφωνα με το επιχείρημα ότι η διαχείριση ενός γονιδίου για την αντοχή στην αλατότητα δεν είναι τόσο αποτελεσματική γίνονται προσπάθειες δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών σε

καταπόνηση με την επαγωγή παραγόντων μεταγραφής αφού ένας μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζει πολλά γονίδια (Krasensky et al., 2011). Είναι επίσης πιθανό ότι πολλά γονίδια που σχετίζονται με τις καταπονήσεις να μοιράζονται κοινό μεταγραφικό παράγοντα.

Οι αποκρίσεις της μηδικής σε καταπονήσεις λόγω αυξημένης αλατότητας έχουν μελετηθεί εκτενώς σε φυσιολογικό και βιοχημικό επίπεδο ωστόσο οι πληροφορίες είναι περιορισμένες σε μοριακό επίπεδο. Με χρήση των πληροφοριών που έχουν αποκτηθεί από το φυτό-μοντέλο *Medicago truncatula* είναι πιθανό να προσεγγιστεί μεταβολικά η βελτίωση των κτηνοτροφικών φυτών.

Σε εδάφη με υπερβολική αλατότητα μόνο τα αλοφιλικά βακτήρια είναι ικανά να επιβιώσουν. Μια μορφή προσαρμογής στην υπεραλατότητα είναι η εισαγωγή πρόσθετων όξινων κατάλοιπων στην επιφάνεια των πρωτεϊνών καθιστώντας τις ικανές να παραμείνουν λειτουργικές σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος (Dennis and Shimmin, 1997). Φαίνεται απίθανο ότι ανώτερα φυτά ακόμη και αλόφυτα να έχουν εξελιχθεί προς αυτή την κατεύθυνση (Munns, 1993). Η βελτίωση της προστασίας κατά των τοξικών επιπέδων άλατος φαίνεται να σχετίζεται με την διαμερισματοποίηση, τη διατήρηση κάποιων συγκεκριμένων λειτουργιών ή με καινούργιες λειτουργίες που προκαλούνται μετά την έκθεση σε υψηλά επίπεδα άλατος. Μετά από την εξαγωγή αποτελεσμάτων από μελέτες των Apse et al., 1999 με διαγονιδιακά φυτά φαίνεται ότι η προστασία είναι το κυριότερο στοιχείο κατά την αντίδραση των φυτών στην αλατότητα. Μάλιστα, η βελτίωση του αποκλεισμού Na^+ μέσα στα χυμοτόπια είναι ένας μηχανισμός προστασίας βασιζόμενος στη διαμερισματοποίηση.

Η βελτίωση την αντοχής στην αλατότητα απαιτεί όχι μόνο τη βελτίωση της επιβίωσης και συγκεκριμένα της ανάπτυξης αλλά και την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων επιπτώσεων που σχετίζονται με την απόκτηση αυτού του χαρακτηριστικού. Ενώ η μεταφορά ενός μόνο γονιδίου τείνει να ελαχιστοποιεί το κόστος ως προς την τελική απόδοση, πρέπει να αξιολογούνται προσεκτικά οι επιζήμιες επιπτώσεις που οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται από υπερέκφραση γονιδίων. Έτσι αυξάνοντας ή δημιουργώντας καινούρια μονοπάτια βιοσύνθεσης, αυξάνεται η ζήτηση πρόδρομων ουσιών από την οποία, μπορεί να προκληθεί ενίσχυση του ενεργειακού κόστους ή έλλειψη των μεταβολιτών από μονοπάτια που είναι απαραίτητα για άλλες σχετικές με την απόδοση λειτουργίες (Krasensky and Jonak, 2011).

1.6 Ενεργειακό κόστος της Αντοχής

Η αντοχή στην αλατότητα σχετίζεται με ρύθμιση του εσωτερικού περιβάλλοντος των κυττάρων. Αυτό απαιτεί συγκέντρωση ωσμωτικών διαλυμάτων (ωσμωλυτών) ανόργανων ή οργανικών. Η ρύθμιση ανόργανων στοιχείων απαιτεί μεταφορά ιόντων διαμέσου μεμβρανών

από το εξωτερικό περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου καθώς επίσης διαμέσου εσωτερικών μεμβρανών και κυτταρικών διαμερισμάτων. Από τη συγκέντρωση αυτών των στοιχείων έναντι ηλεκτροχημικής διαβάθμισης, συνεπάγεται δαπάνη μεταβολικής ενέργειας. Επίσης η ρύθμιση των οργανικών ωσμωλυτών απαιτεί μεταβολισμό των συστατικών άνθρακα και χρήση της ενέργειας για τη δημιουργία ωσμωτικής διαβάθμισης που είναι αναγκαία για τη διατήρηση της περιεκτικότητας σε νερό του κυτταρικού περιβάλλοντος.

Επομένως, η ανάπτυξη φυτών με αντοχή στην αλατότητα αφορά την ανάπτυξη φυτών ικανών όχι μόνο να αντέχουν στην αλατότητα αλλά και στο να δίνουν ικανοποιητική παραγωγή. Φυτά που εκτίθενται σε καταπονήσεις συχνά ανταποκρίνονται χρησιμοποιώντας την ενέργεια για αύξηση για τη διατήρηση των φυσιολογικών διαδικασιών επισκευάζοντας έτσι τις ζημιές που προκλήθηκαν από την καταπόνηση. Έτσι όμως μειώνεται η ενέργεια που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των φυτών με αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγικότητας. Ένα φυτό με αντοχή στην αλατότητα θα πρέπει επίσης να χρησιμοποιεί ενέργεια για είναι ικανό να παράγει τόσο όσο παρήγαγε υπό φυσιολογικές συνθήκες. Είναι μάλλον απίθανο για τα φυτά να αντισταθμίσουν την επίδραση της αλατότητας αυξάνοντας την στερεοποίηση άνθρακα. Αυτό που χρειάζεται είναι τύποι φυτών οι οποίοι θα είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν τη διαθέσιμη ενέργεια πιο αποτελεσματικά (Stavarek and Rains, 1985).

1.7 Έκφραση γονιδίου *AVP*

Τα φυτά που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην αλατότητα και την ξηρασία διατηρούν την σπαργή τους σε χαμηλά δυναμικά νερού αυξάνοντας τον αριθμό των μορίων διαλυμένης ουσίας στο κύτταρο (Radin, 1983, McNeil et al., 1999, Bray et al., 2000). Η ενεργή μεταφορά των διαλυμένων ουσιών εξαρτάται από τις βαθμίδες πρωτονίων που καθορίζονται από τις αντλίες πρωτονίων. Στα φυτά, τρεις διαφορετικές αντλίες πρωτονίων παράγουν ηλεκτροχημικές μεταβολές πρωτονίων διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών. Η ATPase αντλεί κυτταροπλασματικό υδρογόνο διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης στον εξωκυτταρικό χώρο. Τα χυμοτόπια των φυτών αποτελούν το 40-90% του συνολικού ενδοκυτταρικού όγκου ενός ώριμου φυτικού κυττάρου (Zhen et al., 1997) και, σε συνδυασμό με το κυτταρόπλασμα, ρυθμίζουν την κυτταρική σπαργή που είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη και την ακαμψία των φυτών. Η κυτταρική σπαργή εξαρτάται από τη δράση των χυμοτοπικών αντλιών υδρογόνου που διατηρούν την ηλεκτροχημική βαθμίδα διαμέσου της χυμοτοπικής μεμβράνης, η οποία επιτρέπει τη δευτερογενή ενεργή μεταφορά ανόργανων ιόντων, οργανικών οξέων, σακχάρων και άλλων ενώσεων. Η συσσώρευση αυτών των διαλυμένων ουσιών απαιτείται για να διατηρηθεί η εσωτερική ισορροπία νερού (Leigh, 1997). Η αυξημένη συσσώρευση

κεκορεσμένων σωματιδίων μπορεί να επιφέρει ανοχή στην αλατότητα και ξηρασία. Αυτή η αναλογία ιόντων, όπως για παράδειγμα το νάτριο, θα μπορούσε να αυξήσει την οσμωτική πίεση του φυτού και ταυτόχρονα να μειώσει τις τοξικές επιδράσεις αυτού του κατιόντος.

Η έκθεση στο NaCl έχει αποδειχθεί ότι επάγει τη δραστηριότητα μεταφοράς υδρογόνου των χυμοτοπικών αντλιών τόσο σε φυτά που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην αλατότητα (Hasegawa et al., 2000, Gollack et al., 2001) όσο και σε ευαίσθητα σε άλατα φυτά (Maeshima, 2000). Αυξημένη έκφραση οποιασδήποτε από τις χυμοτοπικές αντλίες πρωτονίων θα πρέπει να αυξήσει την αναλογία των ιόντων στο χυμοτόπιο με την αύξηση της διαθεσιμότητας πρωτονίων. Ωστόσο, η υπερέκφραση της χυμοτοπικής H-ATPάσης του φυτού θα ήταν δύσκολη επειδή αποτελείται από πολλές υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες θα έπρεπε να υπερεκφράζεται στο σωστό επίπεδο σε ένα μόνο διαγονιδιακό φυτό για να επιτύχει υψηλότερη δραστηριότητα του συμπλέγματος πολλαπλών υπομονάδων (Luttge et al., 1997). Αντίθετα, η χυμοτοπική πυροφωσφατάση υδρογόνου του φυτού *Arabidopsis* κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο, το *AVP* (Sarafian et al., 1992). Το γονίδιο *AVP* μπορεί να παράγει μια βαθμίδα υδρογόνου διαμέσου του τονοπλάστη παρόμοια σε μέγεθος με αυτήν της χυμοτοπικής H-ATPάσης (Zhen et al., 1997). Η ετερόλογη έκφραση αυτής της φυτικής χυμοτοπικής H-πυροφωσφατάσης σε ζυμομύκητα αποκατέστησε την αντοχή σε αλατότητα σε ένα ευαίσθητο στην αλατότητα μεταλλαγμένο ζυμομύκητα (Gaxiola et al., 1999). Έχει φανεί ότι τα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα του γονιδίου *AVP*, είναι πιο ανθεκτικά στην αλατότητα και την ξηρασία από ό, τι τα φυτά άγριου τύπου. Αυτοί οι φαινότυποι ανθεκτικότητας συνδέονται με αυξημένη εσωτερική συσσώρευση διαλελυμένων ουσιών. Η αυξημένη ανοχή στην αλατότητα και την ξηρασία σε διαγονιδιακά φυτά με αυξημένα επίπεδα *AVP* εξηγείται πιο εύκολα από την αυξημένη πρόσληψη ιόντων στο χυμοτόπιο (Gaxiola et al., 2001). Πιθανώς, η μεγαλύτερη δραστηριότητα *AVP* να παρέχει αυξημένη κίνηση υδρογόνου για να οδηγήσει αυτή την καταληκτική δραστητική πρόσληψη κατιόντων στο χυμοτόπιο. Όπως είδαμε, διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν την χυμοτοπική H-πυροφωσφατάση είναι πολύ πιο ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl και σε στέρηση νερού από ότι τα ισογονικά στελέχη άγριου τύπου. Αυτά τα διαγονιδιακά φυτά συσσωρεύουν περισσότερο νάτριο και κάλιο στον ιστό των φύλλων τους από τον άγριο τύπο. Επιπλέον, οι άμεσες μετρήσεις σε απομονωμένα κυστίδια κυτταρικής μεμβράνης που προέρχονται από διαγονιδιακά φυτά *AVP* και από άγριου τύπου καταδεικνύουν ότι τα κυστίδια από τα διαγονιδιακά φυτά έχουν ενισχυμένη πρόσληψη κατιόντων. Οι φαινότυποι των διαγονιδιακών φυτών *AVP* υποδηλώνουν ότι η αύξηση της χυμοτοπικής βαθμίδας των πρωτονίων οδηγεί σε αυξημένη συσσώρευση διαλυτών ουσιών και κατακράτηση νερού. Πιθανώς, η απομόνωση των κατιόντων στο χυμοτόπιο μειώνει τις τοξικές τους επιδράσεις.

Η υπερέκφραση του γονιδίου *AVP* στο φυτό *Arabidopsis* (Arif et al., 2012), το ρύζι (Yang et al., 2007) και τη ντομάτα (Bhaskaran και Savithramma 2011) έχει αποδειχθεί ότι έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη απόδοση των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα και ξηρασία (Verma et al., 2014). Επιπλέον, η υπερέκφραση του γονιδίου *AVP* στο βαμβάκι έχει αναφερθεί ότι διεγείρει τη μεταφορά της αυξίνης στις ρίζες, βοηθώντας έτσι τα διαγονιδιακά φυτά να απορροφούν το νερό πιο αποτελεσματικά όταν υποβάλλονται σε καταπόνηση ξηρασίας και αλατότητας (Pasapula et al., 2011). Τέλος, διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis* που υπερεκφράζουν το γονίδιο *AVP* έδειξαν αυξημένη απομόνωση νατρίου μέσα στο χυμοτόπιο και διατήρησαν υψηλότερη σχετική περιεκτικότητα σε νερό στα φύλλα και αυξημένη αντοχή στην αλατότητα και ξηρασία σε σύγκριση με τον άγριο τύπο (Gaxiola et al., 2001).

Καταλήγοντας, τα γενετικά τροποποιημένα φυτά που αντέχουν στην ξηρασία και την αλατότητα θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για την αποκατάσταση των γεωργικών εκτάσεων που χάνονται στη γεωργία λόγω της αλατότητας και της έλλειψης βροχοπτώσεων.

1.8 Έκφραση γονιδίου *HKT1*

Το γονίδιο *HKT1* θεωρείται βασικός καθοριστικός παράγοντας για την ανοχή των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα (Platten et al., 2006). Σε συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα, το γονίδιο *AtHKT1*, ένας αγγειακός μεταφορέας ιόντων νατρίου ειδικού τύπου, έχει μια βασική σημασία στην ανοχή των φυτών (Rus et al., 2001) και εντοπίζεται στην μεμβράνη του πλάσματος στο φυτό *Arabidopsis* (Rus et al., 2001). Ο πρώτος φορέας ιόντων καλίου που περιγράφηκε στα ανώτερα φυτά, δηλαδή το γονίδιο *HKT1*, κωδικοποιεί ένα μεταφορέα καλίου υψηλής κίνησης που λειτουργεί ως μεταφορέας καλίου συζευγμένος με νάτριο και θεωρείται ότι συμβάλλει στην πρόσληψη νατρίου σε αλατούχο έδαφος (Yang et al., 2017). Υπό υψηλές συγκεντρώσεις νατρίου, το *HKT1* μπορεί να έχει περισσότερη φυσιολογική σημασία για την πρόσληψη νατρίου από την πρόσληψη καλίου. Ένα ομόλογο *HKT1* που απομονώθηκε πρόσφατα από το φυτό *Arabidopsis* (*AtHKT1*) λειτουργεί κυρίως ως ένας εκλεκτικός μεταφορέας πρόσληψης νατρίου με πολύ περιορισμένη δράση πρόσληψης καλίου.

Το γονίδιο *HKT1* μπορεί να βελτιώσει την ανοχή στην αλατότητα μειώνοντας τη συσσώρευση ιόντων νατρίου στον ιστό των βλαστών, προστατεύοντας έτσι τα φύλλα από τοξικότητα νατρίου (Ren et al., 2005, Sunarpi et al., 2005, Horie et al., 2009, Møller et al., 2009). Στο φυτό *Arabidopsis* έχει φανεί ότι το γονίδιο *HKT1* εκφράζεται έντονα στις ρίζες (Measer et al., 2002). Φυτά που δέχτηκαν το γονίδιο *HKT1* ήταν ευαίσθητα στην καταπόνηση με αλατότητα και συσσώρευσαν περισσότερα ιόντα νατρίου στους βλαστούς και λιγότερα

στις ρίζες, υποδηλώνοντας ότι το *HKT1* λειτουργεί στη διανομή του νατρίου μεταξύ της ρίζας και της βλάστησης ανακτώντας το νάτριο από τα αγγεία του ξύλου (Rus et al., 2004, Davenport et al., 2007). Οι Berthomieu et al., 2003, έδειξαν ότι υπό συνθήκες καταπόνησης αλατότητας, φυτά που δέχθηκαν το γονίδιο *hkt1* έδειξαν μείωση της συγκέντρωσης Na^+ στο φλοίωμα και εμφάνισαν έναν ευαίσθητο σε NaCl φαινότυπο που προέκυψε από υπερσυσσώρευση Na^+ στους βλαστούς.

Η έκφραση του *HKT1* σε συγκεκριμένο ιστό, όπως στην περικυκλική αγγειακή δέσμη, αυξάνει την ανοχή στην αλατότητα σε ολόκληρο το φυτό (Moller et al., 2009). Φυτά που δέχθηκαν το γονίδιο *HKT1* καταστέλλουν τους φαινοτύπους υπερευαισθησίας στην αλατότητα και σε φυτά που δέχθηκαν τα γονίδια *sos2* και *sos3*, υποδηλώνοντας ότι το *HKT1* συσχετίζεται με το μονοπάτι έκφρασης του γονιδίου *SOS* για τη ρύθμιση της ομοιοστασίας Na^+ / K^+ σε φυτικά κύτταρα (Rus et al., 2001, 2004). Το παραπάνω έδειξαν και οι Chinnusamy et al., (2006), όπου φαίνεται ότι η οδός του γονιδίου *SOS* μπορεί να ρυθμίζει και να συντονίζει τις δραστηριότητες του γονιδίου *HKT1* και του *SOS1* για τον έλεγχο της μεταφοράς Na^+ από τους βλαστούς στις ρίζες. Η λειτουργία του γονιδίου *HKT1* περιλαμβάνει την εξαγωγή Na^+ από τα αγγεία του ξύλου, ελαττώνοντας έτσι την καταπόνηση στην αλατότητα, υποδηλώνοντας ότι το *HKT1* ελέγχει τη μεταφορά Na^+ ανάμεσα στη ρίζα και τον βλαστό και τη συσσώρευση Na^+ στα φύλλα (Sunarpi et al., 2005; Horie et al., 2007; Moller et al., 2009).

Η έκφραση του *OsHKT1* ρυθμίζεται σημαντικά προς τα κάτω σε ρύζι ανεκτικό στην αλατότητα σε σύγκριση με ευαίσθητο στην αλατότητα ρύζι κατά τη διάρκεια καταπόνησης με χορήγηση 150 mM NaCl (Golldack et al., 2002). Ακόμη, διαγονιδιακά φυτά σίτου που εξέφρασαν το γονίδιο *HKT1* εμφάνισαν σημαντικά μικρότερη πρόσληψη Na^+ και αυξημένη ανάπτυξη υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας σε σύγκριση με φυτά μάρτυρες (Laurie et al., 2002). Αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα ομόλογα *HKT1* συμβάλλουν στην εισροή Na^+ κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε αλατότητα και η καθοδική ρύθμιση της *HKT1* μπορεί να βοηθήσει στον περιορισμό της εισροής Na^+ στις ρίζες. Διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν το γονίδιο *HKT1* γενικά συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες αλατιού στο βλαστό και είναι σχετικά πιο ευαίσθητα στην αλατότητα από τα φυτά μάρτυρες, ενώ τα φυτά που υπερεκφράζουν το ίδιο γονίδιο συγκεκριμένα στα κύτταρα της ρίζας συσσωρεύουν λιγότερο αλάτι στους βλαστούς και καθίστανται περισσότερο ανεκτικά στην αλατότητα (Rubio et al., 1995).

Το γονίδιο *AtHKT1* θεωρείται ότι υπάρχει γύρω από τους ξυλοφόρους ιστούς και ηθμό της ρίζας και του βλαστού και επίσης αυξάνει απευθείας τη συγκράτηση Na^+ στη ρίζα (Gorham et al., 1997).

1.9 Έκφραση γονιδίου *AKT*

Η πρωτεΐνης κινάσης B (*PKB / AKT*) έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο διαφόρων και σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι η κυτταρική επιβίωση (Hajduch et al., 2001) Το *AKT1* είναι ένα γονίδιο που είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάκτηση του νατρίου από τα αγγεία του ξύλου στη ρίζα, αποτρέποντας έτσι τη φθορά στα φύλλα που προκαλείται από την αλατότητα (Sandhu et al., 2017) Τα κανάλια εσωτερικής διόρθωσης καλίου (*KIRC*) άγουν προς την κατεύθυνση του κυτταροπλάσματος και είναι εξαιρετικά επιλεκτικά για την πρόσληψη καλίου έναντι του νατρίου υπό φυσιολογικές (μικρομοριακές) εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις καλίου και νατρίου (Cushman, 2001). Γενικά, τα περισσότερα *KIRCs* είναι μια κύρια οδός για την πρόσληψη καλίου χαμηλής επίδρασης, αλλά φαίνεται ότι δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην ροή του νατρίου σε φυτικά κύτταρα (Amtmann and Sanders, 1999). Αυτή η θέση αποτελεί παράδειγμα του γονιδίου *AKT1*, το οποίο παίζει βασικό ρόλο στην πρόσληψη καλίου από τις ρίζες των φυτών, αλλά είναι απίθανο να διαδραματίζει μείζονα ρόλο στην ακούσια πρόσληψη νατρίου (Hirsch et al., 1998, Spalding et al., 1999). Το γονίδιο *AKT1* και τα σχετικά κανάλια είναι μέλη οικογένειας πολλαπλών γονιδίων και λειτουργούν ως ομοτετραμερή (Daram et al., 1997, Czempinski et al., 1999, Urbach et al., 2000).

1.10 Έκφραση γονιδίων *SOS*

Η ανθεκτικότητα των φυτών στην καταπόνηση με αλατότητα ρυθμίζεται μέσω διαφόρων μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένου και του μονοπατιού *SOS* (salt overly sensitive) (Qiu et al., 2002). Τα γονίδια *SOS1*, *SOS2* και *SOS3* εμπλέκονται άμεσα στη ρύθμιση της ανεκτικότητας στην αλατότητα εξάγοντας το νάτριο από τις ρίζες των φυτών. Το *SOS3* ενεργοποιείται με δέσμευση ασβεστίου μέσα σε 2 ώρες από την καταπόνηση με αλατότητα και αλληλεπιδρά με το *SOS2* για να ενεργοποιήσει την κινάση, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει το *SOS1* (Gupta et al., 2014). Η φωσφορυλίωση αυξάνει την μεταφορική δραστηριότητα του γονιδίου *SOS1*, μια πρωτεΐνη που συνδέεται με την πλασματική μεμβράνη και ελέγχει την εκροή νατρίου από τη ρίζα (Shi et al., 2002). Αναλύσεις μοριακής αλληλεπίδρασης και συμπληρωματικότητας υπέδειξαν ότι το *SOS3* απαιτείται για την ενεργοποίηση του *SOS2* που ρυθμίζει την μεταγραφή του *SOS1* (Halfter et al., 2000, Shi et al., 2000), επιβεβαιώνοντας περαιτέρω ότι η σειρά της οδού σήματος είναι *SOS3-SOS2-SOS1* (Hasegawa et al., 2000).

Τα γονίδια *SOS* υπερεκφράστηκαν σε ανθεκτικούς γονοτύπους υποδηλώνοντας ότι ο αποκλεισμός νατρίου είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην παροχή ανθεκτικότητας στην αλατότητα σε αυτούς τους γονοτύπους. Ο ισχυρός μηχανισμός αποκλεισμού νατρίου έχει

αποδειχθεί ότι είναι το κλειδί για την αυξημένη αντοχή σε αλατότητα σε διάφορα είδη φυτών (Munns et al., 2008, Liu et al., 2015). Η υπερέκφραση των *SOS* πρωτεϊνών έχει αποδειχθεί ότι παρέχει αυξημένη αντοχή στην αλατότητα σε ετερόλογα είδη (Liu et al., 2015, Shi et al., 2003, Zhang et al., 2001).

Φυτά που δέχθηκαν το γονίδιο *HKT1* καταστέλλουν τους φαινοτύπους υπερευαισθησίας στην αλατότητα και σε φυτά που δέχθηκαν τα γονίδια *sos2* και *sos3*, υποδηλώνοντας ότι το *HKT1* συσχετίζεται με το μονοπάτι έκφρασης του γονιδίου *SOS* για τη ρύθμιση της ομοιοστασίας Na^+ / K^+ σε φυτικά κύτταρα (Rus et al., 2001, 2004).

Όπως αναφέρθηκε, η υπερέκφραση των γονιδίων του μονοπατιού *SOS* αυξάνει ελαφρώς την αντοχή των φυτών στην αλατότητα (Yang et al., 2009, Ma et al., 2014). Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι τα *SOS2* και *SOS3* δεν μπορούν να λειτουργήσουν στο βέλτιστο με το *SOS1* στους βλαστούς επειδή το *SOS3* λειτουργεί κυρίως στις ρίζες. Είναι επίσης πιθανό ότι αδιευκρίνιστοι παράγοντες αλληλεπιδρούν με τα *SOS* γονίδια κατά τη διάρκεια των αποκρίσεων εγκλιματισμού καταπόνησης στην αλατότητα. Η βέλτιστη συν-έκφραση των *SOS* γονιδίων και των αδιευκρίνιστων παραγόντων σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους/ιστούς μπορεί να βελτιώσει αποτελεσματικά την ανθεκτικότητα στην αλατότητα. Μια μετάλλαξη του *sos3* στο φυτό *Arabidopsis* είχε ως αποτέλεσμα ανεπαρκή ανάπτυξη ρίζας (Ishitani et al., 2000). Σύμφωνα με αυτή την παρατήρηση, το *SOS3* ρυθμίζει την ανακατανομή της αυξίνης στην κορυφή της ρίζας (Zhao et al., 2011). Οι γενετικές αναλύσεις υποδεικνύουν ότι όλες οι υποκαταστάσεις αμινοξέων σε διαφορετικές περιοχές του *SOS1* παράγουν μεταλλάξεις *sos1* που είναι ευαίσθητες στην αγωγή με άλατα (Shi et al., 2000), γεγονός που υποδηλώνει ότι το *SOS1* μπορεί να περιλαμβάνει και άλλες δραστηριότητες επιπρόσθετα με την μεταφορική δραστηριότητα Na^+ / H^+ .

Έχει φανεί ότι, τα διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis* που υπερέκφρασαν το *SOS1* έδειξαν χαμηλότερα επίπεδα Na^+ στο ρεύμα αγγείων του ξύλου και στο υπέργειο μέρος από τα φυτά άγριου τύπου και αύξησαν την ανθεκτικότητά τους στην αλατότητα. Τα διαγονιδιακά φυτά αναπτύχθηκαν και άνθισαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις άλατος (50-200 mM NaCl), ενώ τα φυτά μάρτυρες έγιναν νεκρωτικά (Shi et al., 2003).

Τέλος, η ισχυρή έκφραση του *SOS1* σε κύτταρα που συνορεύουν με τα αγγεία του ξύλου υποδηλώνει ότι το *SOS1* προκαλεί είτε απελευθέρωση Na^+ είτε ανάκτηση Na^+ από το αγγεία του ξύλου, ανάλογα με την ένταση της καταπόνησης της αλατότητας και συνεπώς είναι κρίσιμο για τον έλεγχο μεταφοράς Na^+ σε μεγάλες αποστάσεις από τις ρίζες προς τους βλαστούς (Shi et al., 2002b, Chinusamy et al., 2006).

1.11 Έκφραση γονιδίου *NHX2*

Για την τελευταία δεκαετία, οι χυμοτοπικές *NHX* πρωτεΐνες (*NHX1* και *NHX2*, *NHX* ; Na^+/H^+ αντιμεταφορείς) θεωρούνται οι κύριοι φορείς στην διαμερισματοποίηση νατρίου στα χυμοτόπια (Apse et al., 1999, 2003, Blumwald, 2000). Ωστόσο, ο Leidi et al. (2010) και πιο πρόσφατα οι Barragan et al. (2012) κατέδειξαν ότι τα *NHX1* και *NHX2*, τα οποία βρίσκονται στις μεμβράνες των τονοπλαστών, εμπλέκονται στην ενεργή πρόσληψη K^+ στον τονοπλάστη για την ρύθμιση της σπαργής αλλά δεν ενισχύουν την ικανότητα διαχωρισμού του Na^+ στα χυμοτόπια (Garcia et al., 2014). Οι Xu et al. (2013) ανέφεραν ότι το *NHX2* λειτουργεί κυρίως ως ενδοκυτταρικός αντιμεταφορέας K^+/H^+ και καθιστά δυνατή τη διατήρηση υψηλότερων συγκεντρώσεων K^+ σε κύτταρα ζυμομυκήτων υπό συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα. Το *NHX2* θα μπορούσε να μεταφέρει τα K^+ και Na^+ στα οργανίδια, αλλά είχε μεγαλύτερη ικανότητα για ανταλλαγή K^+/H^+ απ' ό,τι για την ανταλλαγή Na^+/H^+ . Οι Zhang et al., 2012 έδειξαν ότι η περιεκτικότητα Na^+ στα φύλλα της διαγονιδιακής μηδικής ήταν σημαντικά χαμηλότερη από την περιεκτικότητα K^+ και ότι η αναλογία $[\text{K}^+] / [\text{Na}^+]$ των διαγονιδιακών φυτών ήταν υψηλότερη από ό,τι στα φυτά άγριου τύπου υπό συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα, υποδηλώνοντας ότι το *NHX2* μπορεί επίσης να εμπλέκεται και στις μεταφορές Na^+ και K^+ .

Η έκφραση του *NHX2* ενίσχυσε την επιβίωση των ευαίσθητων σε αλατότητα μεταλλαγμένων κυττάρων ζυμομύκητα κάτω από συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα (Yu et al., 2007) και ανθεκτικότητα στην αλατότητα της διαγονιδιακής σόγιας (*Glycine max* Merr.), της ντομάτας και της μηδικής (Cao et al., 2011 Zhang et al., 2012).

Οι Cao et al., 2011 υποστηρίζουν ότι τα 'σύνθετα' φυτά, δηλαδή τα φυτά που αποτελούνται από βλαστούς άγριου τύπου με διαγονιδιακές ρίζες, που υπερέκφραζουν το γονίδιο *NHX2* παρουσιάζουν καλύτερη αντοχή στην αλατότητα. Το αποτέλεσμα αυτό έδειξε ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *NHX2* στις τριχοειδείς ρίζες σόγιας ήταν ωφέλιμη για τα «σύνθετα» φυτά για την ανθεκτικότητά τους σε συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα. Επομένως, η υπερέκφραση του γονιδίου *NHX2* στις ρίζες βελτιώνει την αντοχή στην αλατότητα των διαγονιδιακών ριζών. Ως εκ τούτου, η υπερέκφραση του γονιδίου *NHX2* βελτίωσε σημαντικά την ανάπτυξη των ριζών παρουσία NaCl πιθανώς αποφεύγοντας το νάτριο μέσω του διαχωρισμού στο χυμοτόπιο καθιστώντας την παροχή νερού και θρεπτικών συστατικών διαθέσιμα για την ανάπτυξη των βλαστών.

Οι Yu et al. 2007, ανέφεραν ότι η έκφραση του γονιδίου *NHX2* από σιτάρι ενίσχυσε την επιβίωση των ευαίσθητων σε αλατότητα μεταλλαγμένων κυττάρων ζυμομυκήτων υπό συνθήκες καταπόνησης αλατότητας. Τα στατιστικά αποτελέσματα κατέδειξαν σαφώς ότι η έκφραση του *NHX2* είχε σημαντική επίδραση στη διατήρηση της σχετικής περιεκτικότητας νερού (RWC) σε φύλλα διαγονιδιακής ντομάτας. Τα φυτά ντομάτας που υπερέκφραζουν το

NHX2 δείχνουν επίσης την παρουσία σημαντικώς μεγαλύτερης περιεκτικότητας χλωροφύλλης υπό καταπόνηση αλατότητας. Η διατήρηση μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε νερό και χλωροφύλλη στα διαγονιδιακά φυτά θα μπορούσε να οδηγήσει στην αυξημένη αντοχή τους στο καταπόνηση σε συνθήκες αλατότητας. Στην έρευνα αυτή, παρατηρήθηκε επίσης ένας καλύτερος ρυθμός βλάστησης και ανάπτυξης των διαγονιδιακών σπόρων σε σύγκριση με τον άγριο τύπο. Οι διαγονιδιακές σειρές ήταν ικανές να αναπτύσσονται καλά, να ανθίζουν και να δίνουν βιώσιμους σπόρους, ενώ τα φυτά άγριου τύπου είχαν μαραθεί δραστικά κάτω από ισοδύναμες συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα.

Στην μελέτη των Wei et al., (2010), δεν παρατηρήθηκε μόνο ότι το γονίδιο *NHX2* ανταποκρινόταν σημαντικά στην καταπόνηση με αλατότητα, αλλά επίσης διαπίστωσαν ότι θα μπορούσε να προκληθεί έντονα και από την καταπόνηση με ξηρασία. Η υπερέκφραση του *NHX2* είχε ως αποτέλεσμα αυξημένες αντοχές τόσο στην καταπόνηση της ξηρασίας όσο και της αλατότητας σε διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis*. Αυτό έδειξε ότι το γονίδιο *NHX2* μπορεί να διαδραματίσει διπλό ρόλο τόσο στην αποτοξίνωση του νατρίου όσο και στην προσαρμογή της ώσμωσης. Το αποτέλεσμά τους έδειξαν ότι, τα γονίδια αντιμεταφοράς τύπου *NHX2* μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην αντίσταση της ρίζας στην τοξικότητα νατρίου. Ως εκ τούτου, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η συν-υπερέκφραση του γονιδίου *NHX1* με το γονίδιο *NHX2* μπορεί να δημιουργήσει πολύ περισσότερο ανθεκτικά στην αλατότητα φυτά κατά συνεργικό τρόπο.

Συνοπτικά, η έκφραση του γονιδίου *NHX2* στην μηδική ενίσχυσε την αντοχή της στην αλατότητα μέσω βελτιωμένης ενδοκυτταρικής ομοιοστασίας καλίου, η οποία επιτεύχθηκε με ρύθμιση των φυσιολογικών και βιοχημικών διεργασιών που σχετίζονται με τη διαμεμβρανική ανταλλαγή ιόντων Na^+ (K^+). Τα διαγονιδιακά φυτά εμφάνισαν χαμηλότερη εκροή K^+ μέσω του ειδικού καναλιού K^+ και μεγαλύτερη απορρόφηση K^+ μέσω του μεταφορέα K^+ υψηλής συγγένειας από ό, τι τα φυτά άγριου τύπου και έτσι είχαν υψηλότερη περιεκτικότητα K^+ και αναλογία $[\text{K}^+] / [\text{Na}^+]$ στους ιστούς των φύλλων τους και στον κυτταρικό χυμό, η οποία συνέβαλε στην αυξημένη αντοχή στην αλατότητα. Το *NHX2* μεσολαβεί τόσο στη μεταφορά Na^+/H^+ όσο και στην K^+/H^+ , αλλά δείχνει προτίμηση στην ανταλλαγή K^+/H^+ σε σχέση με την ανταλλαγή Na^+/H^+ . Η ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση του καλίου που προκαλείται από το γονίδιο *NHX2* είναι κρίσιμη για την αντοχή στην καταπόνηση με αλατότητα στη διαγονιδιακή μηδική (Zhang et al.,2014). Αυτό υποδηλώνει ότι το γονίδιο *NHX2* θα μπορούσε να είναι ένας κατάλληλος υποψήφιος για την δημιουργία περισσότερων καλλιεργειών ανθεκτικών σε συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα (Maria et al.,2014).

1.12 Metabolomics – Μεταβολομική ανάλυση

Ο όρος "metabolomics" εισήχθη από τον Oliver et al. (1998) για να περιγράψει τη μεταβολή των σχετικών συγκεντρώσεων των μεταβολιτών που συνοδεύουν την εξάλειψη ή την υπερέκφραση ενός γονιδίου και περιγράφηκε από τον Fiehn (2001) ως την «ολοκληρωμένη και ποσοτική ανάλυση όλων των μικρών μορίων σε ένα βιολογικό σύστημα». Σε μια μεταγενέστερη δημοσίευση, ο Fiehn (2002) δήλωσε ότι η μεταβολομική ανάλυση μας επιτρέπει να σχεδιάσουμε μια σύνδεση μεταξύ των μεταβολών που συμβαίνουν στο σύνολο των μεταβολιτών στις γενετικές αλλοιώσεις, γεφυρώνοντας το χάσμα μεταξύ γονότυπου και φαινοτύπου (Goodacre, 2005). Για τον σχηματισμό αυτής της γέφυρας, είναι απαραίτητο να ανιχνευθούν, να προσδιοριστούν και, το σημαντικότερο, να ποσοτικοποιηθούν όλοι οι μεταβολίτες που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Δεδομένου ότι οι υπάρχουσες τεχνολογίες δεν επιτρέπουν την ταυτόχρονη μέτρηση της ευρείας σειράς μεταβολιτών σε ένα κύτταρο, επενδύεται τεράστια προσπάθεια στην ανάπτυξη μεθοδολογιών που να είναι πλήρεις, αξιόπιστες, ευαίσθητες, ποσοτικές και αναπαραγωγίσιμες. Έτσι, μπορεί να υποστηριχθεί ότι το προφίλ των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό σύστημα αντιπροσωπεύει το τελικό αποτέλεσμα της έκφρασης πολλαπλών γονιδίων σε ένα κύτταρο.

Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την ανίχνευση μεταβολιτών περιλαμβάνουν τον διαχωρισμό τους με αεριοχρωματογραφία (GC), υγρή χρωματογραφία (LC) ή τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) και επακόλουθη φασματομετρία μάζας (MS) των διαχωρισμένων μορίων. Εναλλακτικά, η άμεση μέτρηση του δείγματος μπορεί να εκτελεστεί χωρίς προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό (MS directinfusion) όπως η φασματομετρία μάζας συντονισμού κυτταροτροπικού ιόντος μετασχηματισμού Fourier (FT-ICR-MS), που επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της μάζας και επομένως καλύτερες αναγνωρίσεις κορυφής. Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια άλλη μέθοδος που δεν απαιτεί προηγούμενο διαχωρισμό των μεταβολιτών και είναι σε θέση να προσδιορίσει τη μοριακή δομή των μεταβολιτών που υπάρχουν σε ένα δείγμα (Bowne et al., 2011).

Η μεταβολομική ανάλυση μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη μελέτη του μεταβολισμού των καταπονήσεων, των μορίων μεταγωγής σήματος καταπόνησης ή των μορίων που αποτελούν μέρος της απόκρισης εγκλιματισμού των φυτών (Ruan et al., 2010). Οι περισσότεροι από τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στα φυτά μετά από περιβαλλοντικές καταπονήσεις αποσκοπούν στην αποκατάσταση της κυτταρικής βιοχημικής ομοιότητας, αν και σπάνια επιτυγχάνεται (Bohnert et al., 2006). Αν και έχουν υπάρξει μερικές αγρονομικές επιτυχίες στο χειρισμό της γονιδιακής έκφρασης βασικών συστατικών της ανεκτικότητας στις καταπονήσεις (Bohnert et al., 2006), η περιορισμένη γνώση του μεταβολισμού που σχετίζεται με την καταπόνηση παραμένει ένα σημαντικό κενό στην

κατανόηση των μηχανισμών ανοχής των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις (Perez-alfocea et al., 2011).

Συγκεκριμένα στο παρόν πείραμα, γίνεται μια καθολική αναζήτηση μεταβολιτών με ένδειξη ενδιαφέροντος στους μεταβολίτες εκείνους που παρουσιάζουν ωσμοπροστατευτική λειτουργία. Όπως θα δείτε στις παρακάτω αποκρίσεις τον ρόλο αυτό παίζουν κυρίως τα σάκχαρα και τα αμινοξέα καθώς φάνηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσής τους σχετίζεται με την αντοχή των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα. Με άλλα λόγια, η αρχική απόκριση των φυτών στο NaCl, δηλαδή η ωσμωτική αντίδραση στην καταπόνηση, προκαλεί αλλαγές στη ποσότητα των αμινοξέων και το μεταγραφικό προφίλ, ενώ η τοξικότητα Na⁺ αυξάνει τα επίπεδα των ωσμοπροστατευτικών που παράγονται μέσα στο κύτταρο προσδίδοντας έτσι αντοχή των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα.

1.13 Μεταβολικές αποκρίσεις στην ωσμωτική καταπόνηση

Όπως προαναφέραμε, ο τελικός στόχος μιας μεταβολομικής ανάλυσης είναι ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση όλων των μεταβολιτών σε έναν δεδομένο οργανισμό και η εκτίμηση των μεταβολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Μέχρι σήμερα, αυτό δεν ήταν εφικτό, επειδή οι περισσότεροι μεταβολίτες είναι ακόμα άγνωστοι και οι διαθέσιμες αναλυτικές τεχνικές δεν επιτρέπουν την εξαντλητική ανίχνευση μεταβολιτών.

Όμως οι Gong et al. (2005) εξέτασαν το μεταγραφικό και μεταβολομικό προφίλ στην *Arabidopsis* και σε ένα στενά συγγενές είδος που παρουσιάζει αντοχή στις καταπονήσεις με αλατότητα, το *Thellungiella halophila*. Διαπίστωσαν ότι ενώ πολλές κυτταρικές αποκρίσεις ήταν παρόμοιες και στα δύο είδη, υπήρχαν επίσης και ορισμένες διαφορές. Στην *Arabidopsis*, μόνο τρεις μεταβολίτες μεταβλήθηκαν σημαντικά -η προλίνη, η σακχαρόζη και ένα άγνωστο ζάχαρο αυξήθηκαν μετά από αγωγή με αλατότητα. Στο είδος *Thellungiella*, βρέθηκε ότι αυξήθηκαν οι μεταβολίτες γλυκόζη, γλυκερόλη, ινοσιτόλη, προλίνη, φωσφορικό άλας, τρεαλόζη και δύο άγνωστα σάκχαρα. Επιπλέον το κιτρικό, φουμαρικό, φωσφορικό άλας και η σακχαρόζη μειώθηκαν σημαντικά (Gong et al., 2005). Από τα παραπάνω δεδομένα, ήταν προφανές ότι η *Arabidopsis* αύξησε τη σύνθεση πρωτεϊνών ενώ η *Thellungiella* φαίνεται να έχει μια στρατηγική προ-προσαρμογής σε συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα μέσω αυξημένων συγκεντρώσεων ωσμοπροστατευτικών στο κύτταρο πριν από την καταπόνηση. Αυτό περιορίσει το ποσό των ζημιών που προκλήθηκαν κατά την έναρξη της καταπόνησης και επέτρεψε στο είδος *Thellungiella* να διαχειριστεί αποτελεσματικότερα την καταπόνηση. Αυτό το είδος πειράματος θα μπορούσε να οδηγήσει στον εντοπισμό νέων μεταβολιτών ή οδών που εμπλέκονται στην ανοχή, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει στην παραγωγή ειδών καλλιέργειας πιο ανθεκτικών στην καταπόνηση με αλατότητα. Οι εργασίες των Kim et

al. (2007) σε καλλιιεργημένα κύτταρα *Arabidopsis* έδειξαν αύξηση των επιπέδων αρωματικών αμινοξέων και μεταβολιτών που εμπλέκονται στη μεθυλίωση κατά την πρόωμη απόκριση στο NaCl ενώ μειώθηκαν 12 ώρες μετά την επιβολή του άλατος. Μετά από 72 ώρες, οι μεταβολίτες που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της σακχαρόζης και τη γλυκόλυση και εκείνοι με ωσμωπροστατευτική λειτουργία είχαν αυξηθεί περισσότερο. Αυτό υποδηλώνει ότι η αρχική απόκριση στο NaCl, δηλαδή η ωσμωτική αντίδραση στην καταπόνηση, προκάλεσε αλλαγές στη ποσότητα των αμινοξέων και το μεταγραφικό προφίλ, ενώ η τοξικότητα Na⁺ αύξησε τα επίπεδα των ωσμωπροστατευτικών που παράγονται μέσα στο κύτταρο.

Στο είδος *Brassica oleracea*, το σύνολο των μεταβολιτών του ξυλώδους αγγειακού συστήματος περιλάμβανε πολλές οργανικές ενώσεις όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα και αμινοξέα. Από αυτές, μετά από καταπόνηση με αλατότητα (80 mM για 7 ημέρες) μειώθηκαν αισθητά οι συγκεντρώσεις αμινοξέων, ειδικά της γλουταμίνης, που είναι το κύριο αμινοξύ του ξυλώδους αγγειακού συστήματος (Fernandez Garcia et al., 2011). Εντούτοις, η ολική και ατομική συγκέντρωση αμινοξέων και διαλυτών σακχάρων (π.χ. ασπαραγίνης, γλουταμίνης και καμινοβουτυρικού οξέως) αυξήθηκε κατά δύο φορές στο ξυλώδες αγγειακό σύστημα των φυτών τομάτας που εκτέθηκαν για 3 εβδομάδες σε 100 mM άλατος νατρίου (Martinez Andujar, 2006; Perez-Alfocea et al., 2000). Επειδή η αύξηση της συγκέντρωσης αμινοξέων στο ξυλώδες αγγειακό σύστημα φαίνεται να συμβαίνει από την πρώτη ημέρα εφαρμογής με αλατότητα στην τομάτα (Perez-Alfocea et al., 2000), δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι αυτή η απόκριση στην καταπόνηση εξαρτάται από το φυτικό είδος ή/και τις βασικές μορφές N που μεταφέρονται στο ξυλώδες αγγειακό σύστημα (π.χ. νιτρικά έναντι αμινοξέων). Στο ρύζι (*Oryza sativa*), η καταπόνηση με αλατότητα ελάττωσε έντονα τις συγκεντρώσεις τριακαρβοξυλικού οξέος, πυροσταφυλικού, κιτρικού, ακονιτικού, μηλικού και 2-οξογλουταρικού οξέος, ταυτόχρονα με μειώσεις στα επίπεδα των σικιμικών και τα κινικών οξέων και αυξήσεις στα αμινοξέα (Zhuter et al., 2007). Ωστόσο, η απόκριση των φυτών και, συνεπώς, η σύνθεση του ξυλώματος από αυτών των οργανικών μοριών φαίνεται ότι εξαρτώνται από τις συνθήκες φωτός. Πράγματι, παρατηρήθηκαν μειωμένες συγκεντρώσεις οργανικών οξέων σε φύλλα και ρίζες τοματών που είχαν δεχθεί καταπόνηση με αλατότητα (100 mM NaCl για 3 εβδομάδες) που συλλέχθηκαν σε σκοτεινή περίοδο, ενώ η απόκριση και η σύνθεση δεν επηρεάστηκαν σε φυτά που συγκομίστηκαν κατά τη διάρκεια φωτεινής περιόδου (Martinez-Andujar, 2006). Παρ' όλα αυτά, η συγκέντρωση τρι-καρβοξυλικού οξέος στα φύλλα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της σκοτεινής περιόδου αυξήθηκε κατά δύο φορές κάτω από συνθήκες αλατότητας σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες (Martinez-Andujar, 2006). Άλλοι συγγραφείς που μελέτησαν το είδος *Arabidopsis thaliana* έχουν βρει ότι οι βραχυπρόθεσμες αποκρίσεις στην καταπόνηση με αλατότητα περιλάμβαναν την επαγωγή του

κύκλου μεθυλίωσης για την παροχή μεθυλομάδων, της οδού φαινυλοπροπανοειδούς για την παραγωγή λιγνίνης και την παραγωγή γλυκίνης βεταΐνης. Η μελέτη του μεταβολισμού των αλοφύτων μπορεί να βελτιώσει την κατανόησή μας για τις κυτταρικές αποκρίσεις σε τοξικότητες από ιόντα. Οι συγγραφείς που δουλεύουν με διαφορετικά είδη έχουν καταλήξει σε κοινά συμπεράσματα που υποδηλώνουν ότι μετά από επιβολή καταπόνησης, οι φυσιολογικές αποκρίσεις σε μη προσαρμοσμένα είδη προκαλούνται μέσω ορμονικής ρύθμισης, ενώ οι καλύτερα προσαρμοσμένοι γονότυποι παρουσιάζουν μια βασική μεταβολική διαμόρφωση που είναι περισσότερο ικανή να αντέξει τις περιβαλλοντικές παραμέτρους (Arbona et al., 2010, Gagneul et al., 2007, Gong et al., 2005).

Οι Filippou et al., 2015 αξιολόγησαν την δράση ενός μυκητοκτόνου σε συνδυασμό με καταπόνηση στην αλατότητα στο μεταβολικό προφίλ φυτών *Medicago truncatula*. Η ανάλυση GC-MS εντόπισε μεταβολίτες που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες, συμπεριλαμβανομένων δύο κύριων ομάδων, των σακχάρων και αμινοξέων, καθώς και οργανικά οξέα και διάφορες άλλες ενώσεις (αζωτούχες ενώσεις και πολυόλες). Από ότι φάνηκε, κανένα από τα σάκχαρα ή οργανικά οξέα δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά σε φυτά που τους χορηγήθηκε μυκητοκτόνο και υποβλήθηκαν σε συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα. Όμως, η γλυκοπυρανοσίδη είναι ο μόνος (μη αμινοξικός) μεταβολίτης ο οποίος επηρεάζεται σημαντικά μετά από την προεπεξεργασία με μυκητοκτόνο σε φυτά που υποβάλλονται σε καταπόνηση αλατότητας.

Κλείνοντας, οι μεταβολικές αποκρίσεις στις ωσμωτικές καταπονήσεις συχνά σχετίζονται με τις αλλαγές στη διαθεσιμότητα, τη χρήση και την ανάπτυξη του άνθρακα (Hummel et al., 2010), αλλά η σύγκριση των μεταβολικών αποκρίσεων στην ξηρασία και την καταπόνηση με αλατότητα σε είδη *Lotus* έδειξε ότι μόνο το ένα τρίτο έως οι μισές μεταβολικές αποκρίσεις διατηρήθηκαν, ενώ ορισμένοι μεταβολίτες, ιδιαίτερα τα οργανικά οξέα, ανταποκρίθηκαν προς την αντίθετη κατεύθυνση, δηλαδή αυξήθηκαν κάτω από συνθήκες ξηρασίας αλλά μειώθηκαν κάτω από συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα (Sanchez et al., 2011, 2012). Είναι σαφές ότι χρειάζεται περισσότερη έρευνα -η οποία θα πρέπει να ενσωματωθεί μαζί με άλλα δεδομένα-ομικής, φυσιολογίας και γενετικής-, ιδιαίτερα για τις καλλιέργειες κτηνοτροφικών φυτών, για να εντοπιστούν μεταβολικά χαρακτηριστικά και μονοπάτια που προσδίδουν αντοχή στην ξηρασία έτσι ώστε να βελτιωθούν οι πιθανότητες επιτυχίας των σημερινών αναπαραγωγικών προσπαθειών (Cattivelli et al., 2008; Salekdeh et al., 2009; Roy et al., 2011, Rasmussen et al., 2012).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκαν 2 είδη του γένους *Medicago*, η *Medicago arborea* και η *Medicago sativa*, και το υβριδίο τους, *Alborea* για τη μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών. Οι σπόροι προμηθεύτηκαν από το δημιουργό του υβριδίου, από την περιοχή Wisconsin των ΗΠΑ. Η μελέτη έκφρασης των έξι γονιδίων αποτελεί συνέχεια του πειράματος της πτυχιακής μου μελέτης και χρησιμοποιήθηκε το αποθηκευμένο γενετικό υλικό των *M.sativa* και *M.arborea*.

2.2 Προβλάστηση σπόρων

Για την προβλάστηση σπόρων έγιναν τα ακόλουθα βήματα :

1. Αφαίρεση των σπόρων από τους χέδρωπες (pods).
2. Προσθήκη 5ml θειικού οξέως (H_2SO_4) για 10min. Αυτό πραγματοποιείται για την διάρρηξη του εξωτερικού τοιχώματος έτσι ώστε να διευκολυνθεί η βλάστηση.
3. Αφαίρεση του H_2SO_4 και ξέπλυμα των σπόρων με κρύο νερό
4. Προσθήκη διαλύματος χλωρίνης 3% για 1,5-2min.
5. Ξέπλυμα της χλωρίνης με κρύο νερό δέκα φορές.
6. Τοποθέτηση των σπόρων σε τρυβλία με άγαρ 0,8% w/v
7. Τοποθέτηση των τρυβλίων με τους σπόρους ανάποδα στους 4° C για 18 ώρες.
8. Μεταφορά των τρυβλίων στους 20°C σε σκοτεινό περιβάλλον (για 3 μέρες).

2.3 Συνθήκες σποράς

Από την κάθε ποικιλία φυτεύτηκαν 60 σπόροι, μετά από προβλάστησή τους, σε γλαστράκια ύψους 8,5 cm και διαμέτρου 10 cm. Κάθε γλαστράκι περιείχε τύρφη, Kronos N 50-300 mg/l, P2O5 80-300 mg/l, K2O 80-300 mg/l, pH 5-6.5, αλατότητα < 1,75 g/l και έναν σπόρο. Έπειτα όλα τα γλαστράκια τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης που ανήκει στο εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού και σε σταθερή θερμοκρασία 25 °C, και φωτοπερίοδο 16 ωρών φως και 8 ωρών σκότους, όπου ποτίζονταν τακτικά και γινόταν λίπανση κάθε εβδομάδα. Για κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά για το κάθε είδος. Χρησιμοποιήθηκε το εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο.

2.4 Μεταχειρίσεις

Στα 2 είδη και το υβριδίο τους εφαρμόστηκαν 2 διαφορετικές συνθήκες αλατότητας και ο μάρτυρας. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά.

Συγκεκριμένα :

- στους 20 μάρτυρες υπήρχε απουσία εφαρμογής NaCl
- σε 20 φυτά υπήρχε συνεχής εφαρμογή NaCl συγκέντρωσης 100 mM,
- σε 20 φυτά υπήρχε σταδιακή εφαρμογή NaCl με συγκεντρώσεις 50-75-150 mM με αλλαγή συγκέντρωσης κάθε 10 μέρες.

2.5 Διάλυμα Hoagland

Για ενίσχυση της ανάπτυξης των φυτών εφαρμόστηκε μια φορά την εβδομάδα λίπανση με διάλυμα Hoagland. Αρχικά δημιουργήθηκαν πυκνά διαλύματα από τα οποία στη συνέχεια φτιάχτηκε το τελικό διάλυμα Hoagland με την παρακάτω σύνθεση.

Πίνακας 2.1. Συστατικά διαλύματος ενίσχυσης ανάπτυξης Hoagland

α/α	Συστατικά	Πυκνό διάλυμα g/L	Διάλυμα Hoagland ml/L
1.	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	72	10
2.	KCl	74	5
3.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	120	4
4.	KH ₂ PO ₄	70	4
5.	KNO ₃	50	5
6.	Fe EDTA α) FeCl ₃ ·6H ₂ O 0.24g/500ml β) EDTA 0.75g/500ml		20
7.	Μικροστοιχεία		3
	H ₃ BO ₃	2.86	
	MnCl ₂ ·H ₂ O	1.8	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22	
	CuSO ₄	0.08	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.017	
8.	sucrose		10 g

2.6 Συλλογή ιστού

Ένα μήνα μετά το φύτεμα συγκομίσθηκαν τα φύλλα και οι ρίζες των φυτών ξεχωριστά τα οποία ήταν απαλλαγμένα από παθογόνους οργανισμούς και εχθρούς. Το φυτικό υλικό που κοβόταν τοποθετούνταν σε αλουμινόχαρτο πάνω στο οποίο σημειωνόταν ο

κωδικός του αριθμός και κατόπιν εμβαπτιζόταν σε υγρό άζωτο για να διατηρηθεί μέχρι τη μεταφορά του στο εργαστήριο. Το φυτικό υλικό αποθηκεύτηκε σε βαθιά ψύξη στους -80 βαθμούς Κελσίου μέχρι την λειοτριβήση του ιστού.

2.7 Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση RNA αρχικά έγινε λειοτριβήση των ιστών με χρήση υγρού αζώτου σε γουδιά, τα οποία προηγουμένως είχαν αποστειρωθεί σε χύτρα αποστείρωσης. Κατόπιν 0,1 gr από κάθε λειοτριβιμένο δείγμα τοποθετείται σε σωληνάκια (ependorfs) των 1,5ml και προστίθεται 1 ml TRIzol Reagent. Για καλύτερη ομογενοποίηση κάνουμε χρήση Vortex και τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 0,2 ml χλωροφορμίου και τα δείγματα αφήνονται για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγόκεντρωση για 15 λεπτά στους 2-8 βαθμούς Κελσίου (ψυχόμενη φυγόκεντρος) στις 12.000 στροφές.

Έπειτα, η ανώτερη υδατική φάση μεταφέρεται σε καινούρια σωληνάκια (1,5 ml eppendorfs) και γίνεται προσθήκη 0,5 ml ισοπροπανόλης. Τα δείγματα αφήνονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγόκεντρωση για 10 λεπτά στην ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 12.000 στροφές.

Ακολουθεί αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και προσθήκη 1,5 ml 75% αιθανόλη. Ακολουθεί Vortex και στη συνέχεια φυγόκεντρωση για 5 λεπτά στις 7.500 στροφές στους 2-8 βαθμούς Κελσίου.

Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τέλος, αφήνονται τα σωληνάκια στον απαγωγό για 15 λεπτά με το καπάκι ανοιχτό. Προσθέτονται 50μl νερού απαλλαγμένου από RNAσες. Τέλος, τα δείγματα παραμένουν στους 65 βαθμούς Κελσίου για 10 λεπτά για διευκόλυνση της διάλυσης του RNA στο νερό. Κατόπιν τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80oC .

2.8 Μέτρηση συγκέντρωσης RNA

Το απομονωμένο RNA είναι απαλλαγμένο από DNA και πρωτεΐνες και αυτό διαπιστώνεται με χρήση μηχανήματος Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer).

Αρχικά, τοποθετείται 1μl από το δείγμα στην άκρη καλωδίου οπτικής ίνας και μια δεύτερη οπτική ίνα έρχεται σε επαφή με το υγρό δείγμα το οποίο τώρα βρίσκεται ανάμεσα στις δύο οπτικές ίνες. Με τη χρήση φωτός ξένον και γραμμικής διάταξης CCD το μηχάνημα αναλύει το φως που διέρχεται μέσα από το δείγμα.

Οι μετρήσεις του μηχανήματος αναλύονται μέσω ειδικού λογισμικού του υπολογιστή και όλα τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε αρχείο του υπολογιστή.

Για τη χρήση του μηχανήματος αρχικά τοποθετείται πάνω στην μια οπτική ίνα 1μl καθαρού μοριακού νερού και μέσω υπολογιστή επιλέγουμε την ανάλυσή του με σκοπό τη ρύθμιση του μηχανήματος.

Έπειτα ανοίγονται οι οπτικές ίνες και καθαρίζονται από το νερό.

Ακολουθεί η προσθήκη 1μl δείγματος RNA. Αφού έχει γίνει ήδη ρύθμιση του προγράμματος συγκεκριμένα για μέτρηση συγκέντρωσης RNA, φέρονται σε επαφή οι δύο ίνες και επιλέγεται από τον υπολογιστή η ανάλυση του δείγματος.

Μετά από λίγα δευτερόλεπτα στην οθόνη του υπολογιστή εμφανίζονται τα αποτελέσματα καθαρότητας του RNA και η συγκέντρωσή του.

Συγκεκριμένα, εμφανίζονται :

- ο λόγος 260/280 όπου δείχνει την απορρόφηση στα 260 (απορρόφηση νουκλεϊκών οξέων) και 280 nm (απορρόφηση πρωτεϊνών) και την καθαρότητα του δείγματος. Για δείγμα RNA ο λόγος πρέπει να είναι ~2,0 για να είναι αποδεκτός. Λόγος μικρότερος του 2,0 υποδεικνύει παρουσία πρωτεϊνών, φαινολών ή άλλων περιεχομένων που απορροφούν ισχυρά κοντά ή στα 280 nm.
- Ο λόγος 260/230 είναι μια δεύτερη μέτρηση της καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων. Η τιμή του λόγου πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 1,8 και 2,2, Αν η τιμή είναι χαμηλότερη τότε υπάρχει παρουσία και άλλων προϊόντων.
- Τέλος, στην οθόνη του υπολογιστή εμφανίζεται η συγκέντρωση του δείγματος σε ng/ul που βασίζεται στην απορρόφηση στα 260 nm και η τιμή της σύμφωνα με την εξίσωση Beer-Lambert ($A = E * b * c$) είναι αποδεκτή στα 40 ng/ul για το RNA.

Για προσθήκη επόμενου δείγματος ανοίγονται οι οπτικές ίνες και καθαρίζονται καλά και οι δύο και στη συνέχεια τοποθετείται 1 μl και εκτελείται η παραπάνω διαδικασία εκ νέου για το καινούριο δείγμα.

2.9 Καθαρισμός Δειγμάτων

Μετά την μέτρηση της συγκέντρωσης RNA διαπιστώθηκαν δείγματα όπου δεν εμφάνιζαν τους παραπάνω λόγους 260/280, 260/230, ng/ul σε αποδεκτές τιμές οπότε ακολούθησε καθαρισμός των δειγμάτων προκειμένου οι τιμές τους να βρίσκονται εντός των επιθυμητών ορίων.

Για τον καθαρισμό δειγμάτων με χρήση χλωροφορμίου - φαινόλης έγιναν τα παρακάτω βήματα :

- Αρχικά, προσθήκη ίσου όγκου (50 μl), χλωροφορμίου- φαινόλης : isoamycil με αναλογία 25:24:1
- Χρήση Vortex και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καινούρια σωληνάκια
- Προσθήκη 1 όγκου χλωροφορμίου (50 μl)
- Ακολούθησε Vortex και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καινούρια σωληνάκια
- Προσθήκη μισού όγκου 50 μl NaOAc 3M και 2 200μl όγκων 100% EtOH
- Παραμονή των δειγμάτων overnight στους -80 βαθμούς Κελσίου.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4 βαθμούς Κελσίου
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Ξέπλυμα του pellet με 100-150μl 75% αιθανόλη (EtOH) παγωμένη
- Στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4 βαθμούς Κελσίου
- Και τέλος, παρέμειναν τα σωληνάκια με ανοιχτά τα καπάκια για στέγνωμα του pellet.
- Επαναδιάλυση σε 50μl καθαρού νερού 65oC

2.10 Σύνθεση cDNA

Το RNA που απομονώθηκε αποθηκεύτηκε σε βαθιά ψύξη στους -80 βαθμούς Κελσίου μέχρι να χρησιμοποιηθεί για παρασκευή cDNA.

Η προετοιμασία των αντιδράσεων έγινε σε ασηπτικές συνθήκες ώστε να αποφευχθεί η μόλυνσή τους από ξένο DNA και καταστροφή του RNA από RNAσες και οι χειρισμοί κατά την προετοιμασία των αντιδράσεων γίνονται σε πάγο για αποφυγή αλλοίωσης των προϊόντων.

Για την παρασκευή cDNA χρησιμοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση superscript II από την εταιρεία Invitrogen.

Αρχικά προστέθηκαν σε αποστειρωμένο tube χωρητικότητας 0,5ml οι παρακάτω όγκοι:

- 2 μl Oligo(dT)12-18 (500 μg/mL),
- 2 μL dNTP Mix (10 mM από το καθένα)
- 21.5 μl καθαρό μοριακό νερό ειδικό για χρήση σε πειράματα μοριακής βιολογίας (Water Molecular Biology Grade)
- 0,5 μgr RNA

Ακολούθησε τοποθέτηση του σωληναρίου στον κυκλοποιητή για 5 λεπτά στους 65 βαθμούς Κελσίου και αμέσως μεταφορά σε πάγο.

Στη συνέχεια, σύντομη φυγοκέντρηση και προσθήκη 5X First-Strand Buffer 4 μ L και 0.1 M DTT 2 μ L.

Μετά από ανάδευση ακολούθησε τοποθέτηση στον κυκλοποιητή για 2 λεπτά στους 42 βαθμούς Κελσίου.

Προσθήκη 1 μ L SuperScript™ II RT (τελικός όγκος αντίδρασης τα 20 μ l) και πιπετάρισμα και σύντομη φυγοκέντρηση και έπειτα τοποθέτηση των δειγμάτων για 50 λεπτά στους 42 βαθμούς Κελσίου και τέλος 15 λεπτά στους 70 βαθμούς Κελσίου.

2.11 PCR

Η PCR χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του προϊόντος της σύνθεσης cDNA και χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές του γονιδίου αναφοράς της ακτίνης. Το κάθε δείγμα υπήρχε σε 2 επαναλήψεις όπου στην μια από τις δύο επαναλήψεις δεν υπήρχε στο περιεχόμενο των σωληναρίων το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης με σκοπό τον εντοπισμό της ύπαρξης DNA υπολειμμάτων.

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία που είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων NCBI για το γονίδιο της ακτίνης με αριθμό καταχώρησης JQ028730.1

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Primer Blast μέσω της βάσης δεδομένων NCBI. Οι εκκινητές της ακτίνης παρουσιάζονται παρακάτω στον Πίνακα 2.2.

Για το μείγμα της PCR τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο:

- 5 μ l PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl] (10x)
- 1.5 μ L MgCl₂ 50 mM
- 1 μ L dNTP Mix 10 mM
- 1 μ L Forward εκκινητή (10 μ M)
- 1 μ L Reverse εκκινητή (10 μ M)
- 0.4 μ L Taq DNA πολυμεράση (5 U/ μ L)
- 2 μ L cDNA
- 13,1 μ L καθαρό μοριακό νερό ειδικό για πειράματα μοριακής βιολογίας

Στη συνέχεια το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το εξής :

- Αρχική αποδιάταξη του DNA σε θερμοκρασία 94 βαθμών Κελσίου για 2 λεπτά.
- Κύκλος που επαναλαμβανόταν 40 φορές και αποτελείται από :
 1. θερμική αποδιάταξη στους 94 βαθμούς Κελσίου για 30sec.

2. υβριδισμό του εκκινητή στους 60 βαθμούς Κελσίου για 30sec.
3. επιμήκυνση του εκκινητή για σύνθεση νέου κλώνου στους 72 βαθμούς Κελσίου για 30sec.

- Τελική επιμήκυνση στους 72 βαθμούς Κελσίου για 5 λεπτά.

Διατήρηση των δειγμάτων στους 10oC ο/η(για 16 ώρες).

2.12 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems. Τα δείγματα τοποθετούνται σε plates τα οποία με τη σειρά τους τοποθετούνται σε υποδοχή του μηχανήματος. Μέσα στα κελιά των plates περιέχεται το cDNA και το ένζυμο Cyber Select Buffer. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της Real Time PCR, η οποία μετρά το προϊόν της PCR σε κάθε κύκλο με την χρήση φθορίζοντων χρωστικών, όπου ο φθορισμός αυξάνεται σε αναλογία με την ενίσχυση του προϊόντος. Τα οπτικά μέσα του μηχανήματος συλλέγουν τον εναπομένοντα φθορισμό που εκπέμπεται από τα πηγάδια σε ένα σταθερό χρονικό διάστημα και τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στο εύρος μήκους κύματος εκπομπής. Η ποσοτικοποίηση αυτή δείχνει την μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του mRNA, το οποίο ερμηνεύεται ως συμπληρωματικό DNA (cDNA).

Το πείραμα έγινε με την μέθοδο των Σχετικών (threshold cycle) C_T κατά την οποία μπορεί να γίνει προσδιορισμός της σχετικής ποσότητας ενός γονιδίου στόχου στα δείγματα. Μετά το πέρας της RTqPCR, βλέπουμε τις τιμές C_t (threshold cycle) οι οποίες είναι το σημείο τομής μεταξύ της καμπύλης ενίσχυσης και της τιμής κατωφλίου. Είναι μία σχετική μέτρηση της συγκέντρωσης του στόχου στην PCR αντίδραση. Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα έξι γονίδια στόχοι που μελετήθηκαν ήταν τα *SOS1*, *SOS3*, *NHX2*, *AKT*, *AVP* και *HKT1*. Τα αποτελέσματα εξάγονται σύμφωνα με τη συσχέτιση ενός δείγματος αναφοράς και κανονικοποιούνται με βάση ένα ενδογενές γονίδιο αναφοράς όπου στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν το γονίδιο της ακτίνης. Δείγμα αναφοράς ήταν ιστός από φύλλα *Medicago sativa*. Επίσης για τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν δυο επαναλήψεις και ένας μάρτυρας που δεν περιείχε DNA δείγματος για το κάθε γονίδιο.

Για την διεξαγωγή του πειράματος τοποθετήθηκαν σε κάθε κελί :

- 2 μl από το δείγμα,
- 10 μL ειδικό ένζυμο Cyber Select Buffer,
- 7,6 μl νερό ειδικό για πειράματα μοριακής βιολογίας, και
- 0,2 μl από τον κάθε εκκινητή.

Οι εκκινητές παραγγέλθηκαν βασιζόμενοι στην έρευνα των Sandu et al., (2017) όπου και αναφέρονται. Αραιώθηκαν με καθαρό μοριακό νερό με βάση τις συγκεντρώσεις της εταιρείας κατασκευής τους.

Πίνακας 2.2. Αλληλουχίες εκκινητών γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν

Γονίδιο	Sequence (5'-3')
MsActin F	GGAATGGTCAAGGCTGGATTT
MsActin R	TGATTGAGCTTCATCACCAACATA
MsAKT1 F	CGAACTAGAAAATTTAGGGATACCAT
MsAKT1 R	CCTCCGAGTCTGTTCTAAACTTC
MsAVP F	AGAAGTACATTGAGGCTGGTG
MsAVP R	GTCCAGAGGTGTCCTTCAATG
MsHKT1 F	TTCATTGTCATGATGTATCTTCCAC
MsHKT1 R	CTGAGAGAATATAAATACGATCCACTAGG
MsNHX2 F	GCGCTAAACAATCCAACAAAGA
MsNHX2 R	CCTCTCCCACATTGACTTAACC
MsSOS1 F	TTGCTTACTACTGCTCAAGA
MsSOS1 R	GCGATATAAGCAATCATTTCCCAA
MsSOS3 F	CTAGCTGGAATTCTTCCTTGTG
MsSOS3 R	CAGTACTGTGAGTGAAGTAGAG

Μετά την τοποθέτηση των παραπάνω υλικών ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και τοποθέτηση των κελιών στο μηχάνημα.

Τέλος, μετά από 2,5 ώρες περίπου λειτουργίας του μηχανήματος εξάγονται τα αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης των γονιδίων.

Για το κάθε δείγμα, η παραπάνω διαδικασία έγινε σε 3 επαναλήψεις σε διαφορετικές ημέρες.

Όλα τα υλικά ήταν τοποθετημένα σε πάγο καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος προκειμένου να μην υπάρξει αλλοίωσή τους.

Οι πάγκοι εργασίας και οι πιπέττες είχαν απολυμανθεί πριν τη χρήση τους με καθαρή αλκοολη και όλα τα tips που χρησιμοποιήθηκαν είχαν αποστειρωθεί σε χύτρα αποστείρωσης.

2.13 Το πρόγραμμα της Real-Time

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής :

1. Αποδιάταξη στους 95 βαθμούς Κελσίου για 10 λεπτά

2. Εφαρμόστηκαν 40 κύκλου σε 2 βήματα :
 - αποδιάταξη στους 95 βαθμούς Κελσίου για 15 δευτερόλεπτα
 - υβριδισμός και επιμήκυνση του εκκινητή στους 60 βαθμούς Κελσίου για 1 λεπτό
3. Σχηματισμός της καμπύλης όπου φανερώνει την θερμοκρασία όπου μετουσιώνονται το 50% των προϊόντων της Real-Time και χρησιμοποιείται για έλεγχο της διαδικασίας ποσοτικοποίησης (ποσοτικοποίηση του σωστού προϊόντος)
 - Στους 95 βαθμούς Κελσίου για 15 δευτερόλεπτα
 - Στους 60 βαθμούς Κελσίου για 1 λεπτό
 - Και τέλος στους 95 βαθμούς Κελσίου για 15 δευτερόλεπτα. Από τους 60 βαθμούς μέχρι τους 95 βαθμούς Κελσίου κάθε 0,3 βαθμοί Κελσίου λαμβάνονται νέες τιμές για εμφάνιση άλλων προϊόντων.

2.14 Εκχύλιση μεταβολιτών

Για την εκχύλιση των μεταβολιτών αρχικά λειοτριβήσαμε το φυτικό ιστό με άζωτο. Στη συνέχεια σε 20mg φυτικού ιστού προσθέσαμε 395μL μεθανόλης και 5μL ριβιτόλης.

Επώασαμε για 15 λεπτά στους 70 βαθμούς Κελσίου με συνεχή ανακίνηση και σφραγισμένα με parafilm. Έπειτα προσθέσαμε 200μL χλωροφορμίου και ακολούθησε vortex. Τα δείγματα έπειτα διατηρήθηκαν στους 37 βαθμούς Κελσίου για 5 λεπτά και σε συνεχή ανακίνηση.

Ακολουθεί προσθήκη 400μL νερό και vortex. Φυγοκεντρήσαμε για 5 λεπτά στις 13000 στροφές και πήραμε 250μL υπερκείμενης φάσης και τα μεταφέραμε σε νέο eppendorf.

Τέλος, εξατμίσαμε τα δείγματα σε αέριο άζωτο.

2.15 Συνθήκες ανάλυσης μεταβολιτών

Οι αναλύσεις φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης των εκχυλισμάτων μηδικής για το πείραμα μεταβολισμού πραγματοποιήθηκαν σε πλατφόρμα U-HPLC-HRMS/MS Orbitrap Q-Exact (Thermo Scientific Germany). Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας εξαιρετικά υψηλής απόδοσης ήταν ένα σύστημα Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Germany). Για τους διαχωρισμούς χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης Hypersil Gold UPLC C18 (2.1 x 100 mm, 1.9 μm) (Thermo Scientific, Germany).

Η κινητή φάση συνίσταται από διαλύτες A: υδατικό 0.1% (ο/ο) φορμικό οξύ και B: ακετονιτρίλιο. Τόσο το φορμικό οξύ όσο και το ακετονιτρίλιο αγοράστηκαν από τη Merck (Γερμανία).

Διαφορετικές βαθμίδες εκλούσεων πραγματοποιήθηκαν για ανίχνευση θετικού και αρνητικού ιόντος και μετά την βελτιστοποίηση της χρωματογραφίας η εφαρμοζόμενη

βαθμίδωση ήταν: T=0 λεπτά, 5% B, T=3 λεπτά, 5% B, T=21 λεπτά, 95% B, T=23 λεπτά, 95% B, T=24 λεπτά, 5% B. Ο ρυθμός ροής ήταν 0.220 κ.εκ./λεπτό και ο όγκος έγχυσης 5 μ L. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40°C ενώ η θερμοκρασία του δίσκου δειγμάτων ρυθμίστηκε στους 10°C.

Ο ιονισμός πραγματοποιήθηκε σε HESI, τόσο για τα θετικά όσο και για τα αρνητικά ιόντα. Οι συνθήκες για το HRMS για αμφοτέρους τους τρόπους αρνητικού και θετικού ιονισμού καθορίστηκαν ως εξής: τριχοειδής θερμοκρασία, 350°C, τάση ψεκασμού 2,7kV, επίπεδο S-φακού Rf, 50V, ροή αερίου θήκης, 40 arb. μονάδες, ροή αερίου 5 arb. μονάδες, θερμοκρασία θερμοσίφωνα 50°C. Η ανάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας τον τρόπο φασματομετρίας μάζας μετασχηματισμού Fourier της LTQ orbitrap (FTMS) σε πλήρη λειτουργία ιόντων σάρωσης, εφαρμόζοντας ένα ψήφισμα 70.000, ενώ η απόκτηση των φασμάτων μάζας εκτελέστηκε σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιώντας τον κεντροειδή τρόπο λειτουργίας. Η ικανότητα απόκτησης δεδομένων που εξαρτάται από τα δεδομένα χρησιμοποιήθηκε επίσης σε ανάλυση 35.000, επιτρέποντας τον κατακερματισμό MS/MS των τριών πιο έντονων ιόντων κάθε κορυφής που υπερβαίνουν το προκαθορισμένο όριο εφαρμόζοντας δυναμική εξαίρεση 10 δευτερολέπτων. Η σταδιακή κανονικοποιημένη ενέργεια σύγκρουσης ορίστηκε στα 40, 60 και 100. Η απόκτηση και ανάλυση δεδομένων ολοκληρώθηκε χρησιμοποιώντας το Xcalibur 2.1.

2.16 Στατιστική ανάλυση

Η διερεύνηση των διαφορών μεταξύ των ειδών και του υβριδίου ως προς την έκφραση των γονιδίων έγινε με Ανάλυση της Διακύμανσης (ANOVA). Η σύγκριση των μέσων όρων έγινε με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου IBM SPSS Statistics 23 για Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Η Ανάλυση των Κυρίων Συνιστωσών (PCA, *Principal Component Analysis*) χρησιμοποιήθηκε για την ομαδοποίηση των δύο ειδών και του υβριδίου τους με βάση τους δευτερογενείς μεταβολίτες. Η Ανάλυση των Κυρίων Συνιστωσών πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics 23 για Windows. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των Χαρακτηριστικών Ριζών (Eigenvalues) και του Ποσοστού Παραλλακτικότητας (Percentage of Variation) της κάθε συνιστώσας (PC's). Η ομαδοποίηση των ειδών και του υβριδίου σε διάγραμμα διασποράς έγινε με βάση τις δύο συνιστώσες με το μεγαλύτερο ποσοστό παραλλακτικότητας για τους δευτερογενείς μεταβολίτες.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης έκφρασης γονιδίων

Τα στοιχεία που χρησιμοποιήθηκαν για την έκδοση αποτελεσμάτων αφορούσαν :

- τον αριθμό των κύκλων μέχρι να εμφανιστεί ορατό προϊόν,
- την μορφή της καμπύλης (melting curve) για το κάθε δείγμα η οποία υποδεικνύει την θερμοκρασία όπου μετουσιώνονται το 50% των προϊόντων και το πόσο εξειδικευμένο είναι το προϊόν της αντίδρασης και τέλος
- την σχετική έκφραση των γονιδίων.

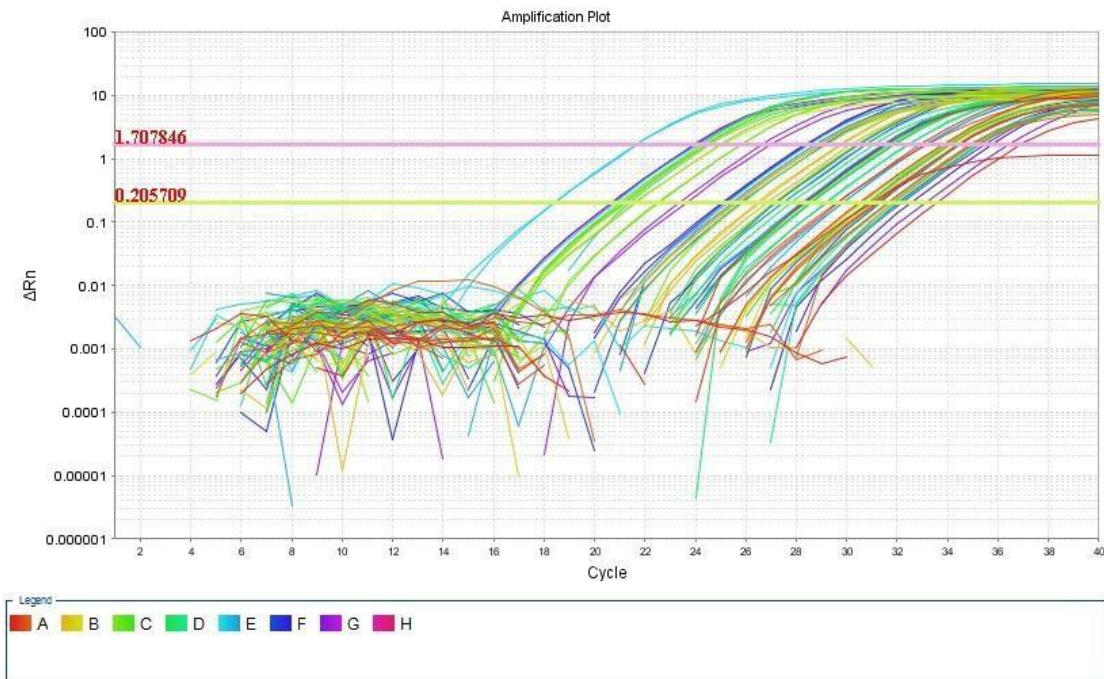
Στην Εικόνα 3.1 παρακάτω, αρχικά φαίνονται τα δύο πρώτα πηγάδια στα οποία τοποθετήθηκαν όλα τα υλικά που περιέχουν και τα υπόλοιπα πηγάδια χωρίς όμως το δείγμα. Στη συνέχεια, τα επόμενα 4 πηγάδια περιλαμβάνουν το δείγμα αναφοράς με το οποίο συσχετίστηκε η έκφραση των γονιδίων όλων των υπόλοιπων δειγμάτων.

Όσα πηγάδια έχουν πράσινο χρώμα περιέχουν τους εκκινητές του γονιδίου αναφοράς την ακτίνης ενώ τα πηγάδια με μωβ χρώμα περιέχουν τους εκκινητές για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε.

Για το συγκεκριμένο δείγμα ο αριθμός κύκλων ήταν μεταξύ 30,89 - 28,44 για το γονίδιο της ακτίνης και 32,96 - 33,81 για το γονίδιο που μελετήθηκε. Όσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων τόσο περισσότερο εκφράζεται το γονίδιο.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Target 1 Cr: 33.63	Target 2 Cr: Undetermined	Sample 17 Target 1 Cr: 30.89	Sample 17 Target 1 Cr: 28.44	Sample 17 Target 2 Cr: 32.95	Sample 17 Target 2 Cr: 33.81	Sample 18 Target 1 Cr: 31.31	Sample 18 Target 1 Cr: 31.24	Sample 18 Target 2 Cr: Undetermined	Sample 18 Target 2 Cr: 33.23	Sample 19 Target 1 Cr: 31.69	Sample 19 Target 1 Cr: 31.9
B	Sample 19 Target 2 Cr: 30.17	Sample 19 Target 2 Cr: 29.71	Sample 20 Target 1 Cr: 25.69	Sample 20 Target 1 Cr: 25.62	Sample 20 Target 2 Cr: Undetermined	Sample 20 Target 2 Cr: 29.82	Sample 21 Target 1 Cr: 30.66	Sample 21 Target 1 Cr: 31.01	Sample 21 Target 2 Cr: 33.91	Sample 21 Target 2 Cr: 33.89	Sample 22 Target 1 Cr: 21.65	Sample 22 Target 1 Cr: 21.34
C	Sample 22 Target 2 Cr: 25.83	Sample 22 Target 2 Cr: 25.64	Sample 23 Target 1 Cr: 25.9	Sample 23 Target 1 Cr: 25.9	Sample 23 Target 2 Cr: 30.36	Sample 23 Target 2 Cr: 30.38	Sample 24 Target 1 Cr: 21.69	Sample 24 Target 1 Cr: 21.3	Sample 24 Target 2 Cr: 24.37	Sample 24 Target 2 Cr: 24.22	Sample 25 Target 1 Cr: 31.75	Sample 25 Target 1 Cr: 30.89
D	Sample 25 Target 2 Cr: 31.19	Sample 25 Target 2 Cr: 31.62	Sample 26 Target 1 Cr: 31.34	Sample 26 Target 1 Cr: 30.87	Sample 26 Target 2 Cr: 31.81	Sample 26 Target 2 Cr: 31.89	Sample 27 Target 1 Cr: 27.86	Sample 27 Target 1 Cr: 27.56	Sample 27 Target 2 Cr: 32.43	Sample 27 Target 2 Cr: 32.46	Sample 28 Target 1 Cr: 32.12	Sample 28 Target 1 Cr: 32.24
E	Sample 28 Target 2 Cr: 34.93	Sample 28 Target 2 Cr: Undetermined	Sample 29 Target 1 Cr: 18.51	Sample 29 Target 1 Cr: 18.5	Sample 29 Target 2 Cr: 24.54	Sample 29 Target 2 Cr: 24.05	Sample 30 Target 1 Cr: 28.3	Sample 30 Target 1 Cr: 28.44	Sample 30 Target 2 Cr: 33.08	Sample 30 Target 2 Cr: 33.13	Sample 31 Target 1 Cr: 25.34	Sample 31 Target 1 Cr: 25.51
F	Sample 31 Target 2 Cr: 29.08	Sample 31 Target 2 Cr: 28.89	Sample 32 Target 1 Cr: 30.91	Sample 32 Target 1 Cr: 31.43	Sample 32 Target 2 Cr: 30.46	Sample 32 Target 2 Cr: 30.78	Sample 5-2 Target 1 Cr: 28.39	Sample 5-2 Target 1 Cr: 28.39	Sample 5-2 Target 2 Cr: 28.4	Sample 5-2 Target 2 Cr: 28.34	Sample 7-2 Target 1 Cr: 32.22	Sample 7-2 Target 1 Cr: 32.67
G	Sample 7-2 Target 2 Cr: 36.43	Sample 7-2 Target 2 Cr: 35.46	Sample 4-2 Target 1 Cr: 20.73	Sample 4-2 Target 1 Cr: 20.74	Sample 4-2 Target 2 Cr: 25.66	Sample 4-2 Target 2 Cr: 26.94						
H												

Εικόνα 3.1. Ενδεικτικά αποτελέσματα για τον αριθμό κύκλων που απαιτούνται για το κάθε δείγμα, το οποίο για το κάθε γονίδιο βρίσκεται σε δύο επαναλήψεις, μέχρι να υπάρξει ορατό προϊόν. Στα πηγάδια με πράσινο χρώμα έχουν τοποθετηθεί εκκινητές το γονιδίου αναφοράς την ακτίνης ενώ στα πηγάδια με μωβ χρώμα το γονίδιο που μελετάται.



Εικόνα 3.2. Ενδεικτικά αποτελέσματα για τον αριθμό κύκλων που απαιτούνται για το κάθε δείγμα, μέχρι να υπάρξει ορατό προϊόν.

Μια άλλη πηγή πληροφορίας σχετικά με τον αριθμό των κύκλων μέχρι να υπάρξει ορατό προϊόν φαίνεται στην Εικόνα 3.2.

Το σημείο τομής των χρωματισμένων καμπυλών με την οριζόντια πράσινη γραμμή υποδηλώνει ακριβώς τον αριθμό των κύκλων μέχρι να υπάρξει ορατό προϊόν.

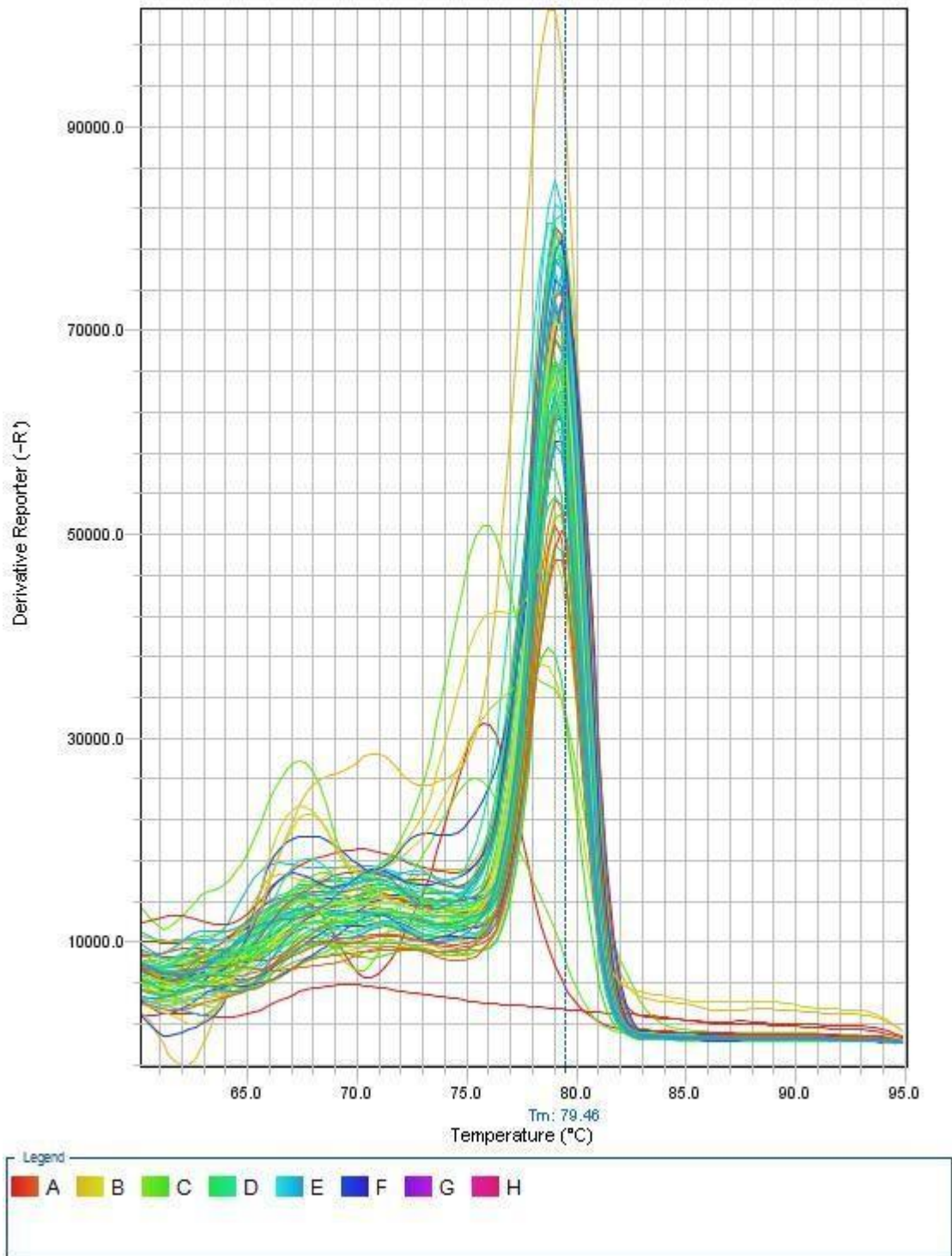
Συγκεκριμένα εδώ φαίνεται για την πρώτη καμπύλη 18,5 κύκλοι ενώ για την τελευταία καμπύλη 33,5 κύκλοι.

Στην Εικόνα 3.3 παρακάτω, φαίνονται όλες οι καμπύλες για το κάθε δείγμα και παρατηρείται ότι για τα περισσότερα δείγματα η καμπύλη έχει την επιθυμητή αιχμηρή μορφή που υποδηλώνει την σωστή λειτουργία του συστήματος.

Επίσης, εκτός από την επιθυμητή μορφή σχεδόν όλες οι καμπύλες δείχνουν την ίδια θερμοκρασία μετουσίωσης του 50 % των προϊόντων περίπου 79 βαθμοί Κελσίου.

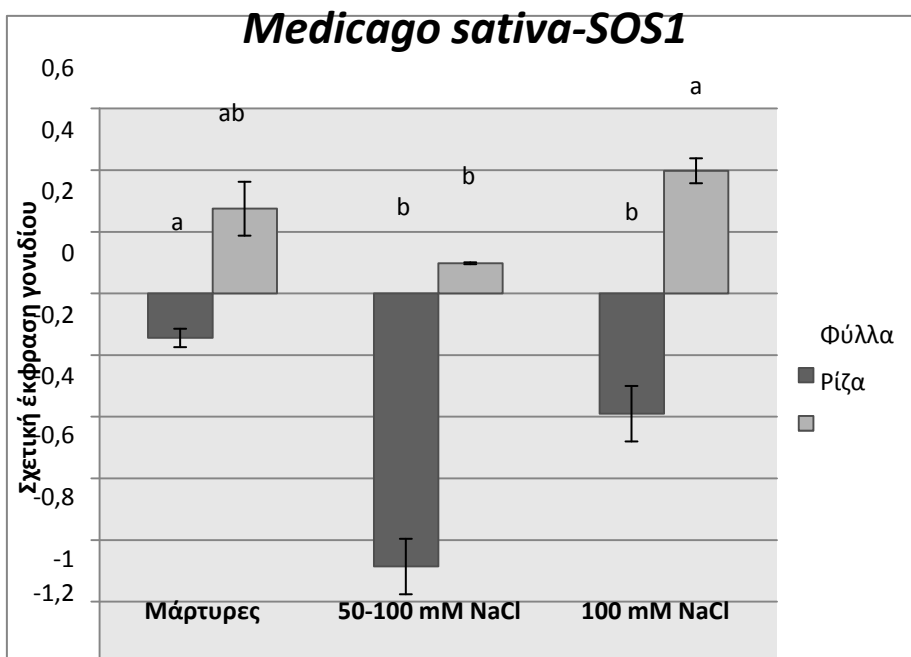
Για τα δείγματα των οποίων οι καμπύλες δεν έχουν την σωστή μορφή έγινε περαιτέρω επανάληψη την ανάλυσής τους.

Melt Curve



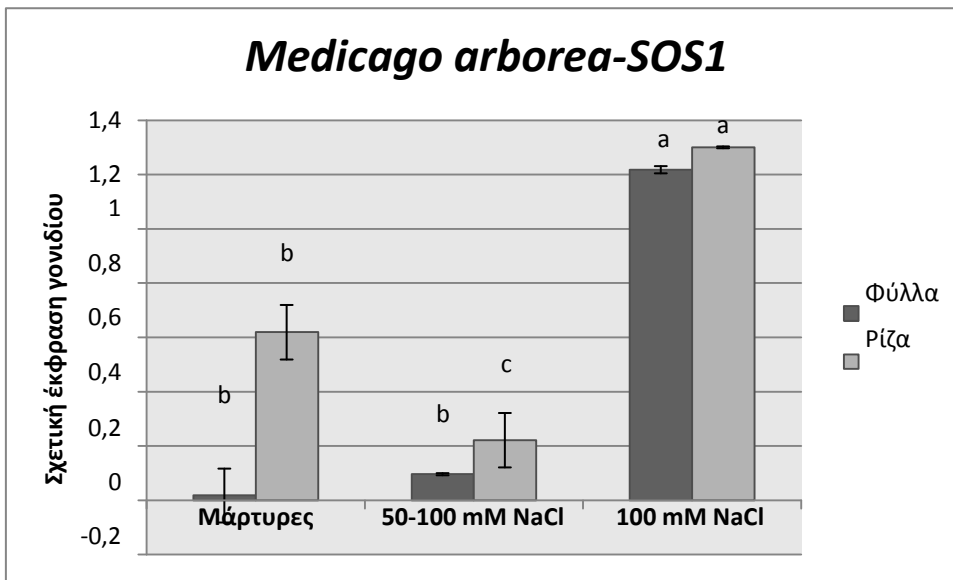
Εικόνα 3.3. Ενδεικτική εικόνα καμπύλης όπου φανερώνει ότι στην θερμοκρασία των 79 βαθμών Κελσίου περίπου μετουσιώθηκε το 50 % των προϊόντων όταν έγινε πολλαπλασιασμός με *NHX* εκκινητές.

3.2 Έκφραση γονιδίου *SOS1*



Εικόνα 3.4. Μέση έκφραση γονιδίου *SOS1* στο *M. sativa* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Στο είδος *Medicago sativa*, η μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου *SOS1* παρουσιάστηκε στις ρίζες των φυτών που δέχονταν συνεχή εφαρμογή 100 mM NaCl (Εικόνα 3.4). Για τον ίδιο χειρισμό φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου στα φύλλα. Για τον χειρισμό σταδιακής αύξησης της εφαρμοσμένης συγκέντρωσης NaCl με τελική συγκέντρωση τα 100 mM NaCl δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της έκφρασης γονιδίου *SOS1* στα φύλλα και τις ρίζες.

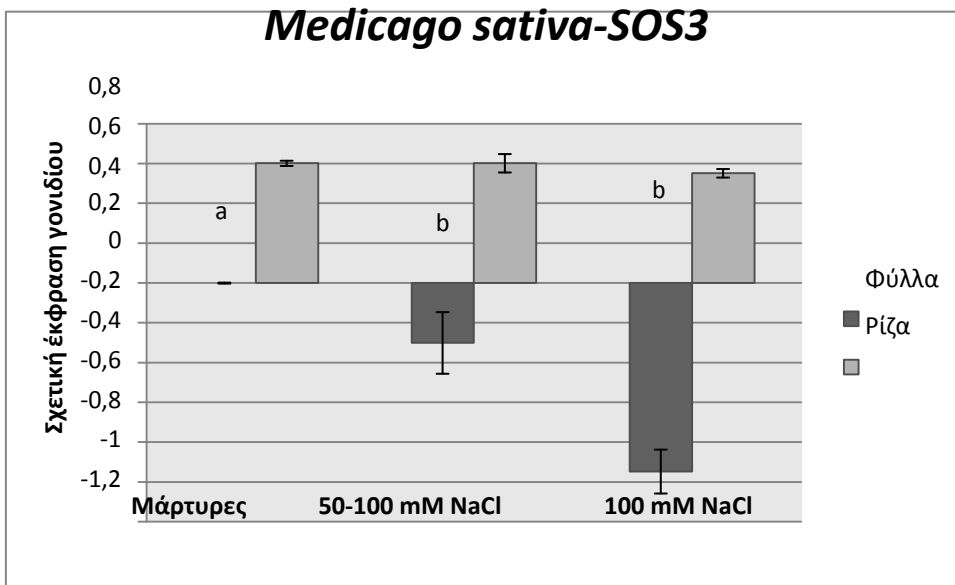


Εικόνα 3.5. Μέση έκφραση γονιδίου *SOS1* στο *M. arborea* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Για το είδος *M. arborea* οι μεγαλύτερες τιμές έκφρασης εμφανίστηκαν στα φυτά που υποβλήθηκαν καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος σε συνεχή εφαρμογή αλατότητας 100 mM NaCl χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα φύλλα και τις ρίζες των ατόμων. Στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρχε ανάμεσα στα φύλλα και τις ρίζες των φυτών που δέχθηκαν σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης αλατότητας με τις ρίζες να εμφανίζουν μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου *SOS1* (Εικόνα 3.5).

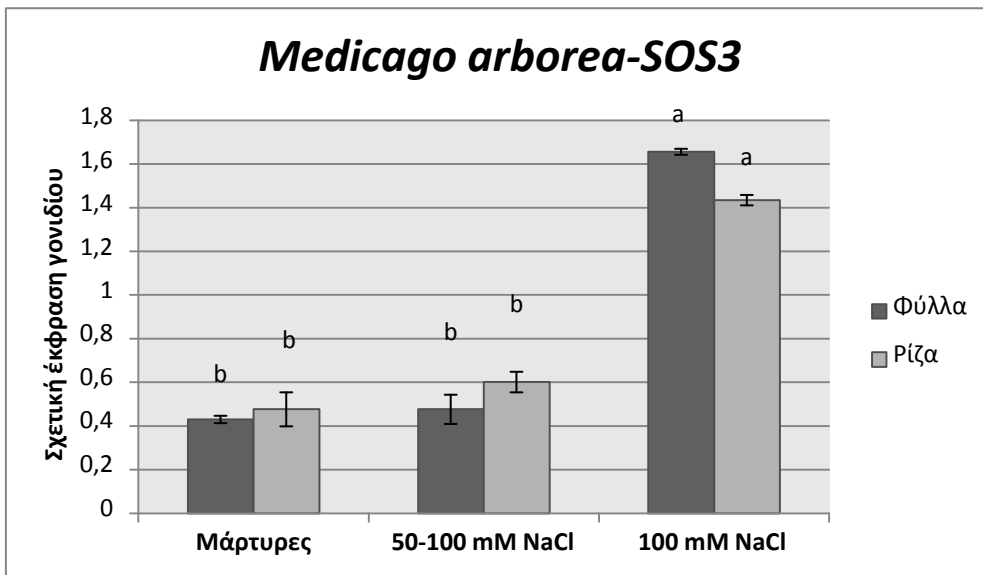
Συμπερασματικά για το γονίδιο *SOS1*, και τα δύο είδη μηδικής είχαν αυξημένη έκφραση στον χειρισμό συνεχούς εφαρμογής αλατότητας 100 mM NaCl με το *M. arborea* να υπερέχει του *M. sativa*. Το *M. arborea* επίσης παρουσίασε γενικά μεγαλύτερες τιμές έκφρασης για όλους τους χειρισμούς.

3.3 Έκφραση γονιδίου *SOS3*



Εικόνα 3.6. Μέση έκφραση γονιδίου *SOS3* στο *M. sativa* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Για το γονίδιο *SOS3* και το *M. sativa* οι μεγαλύτερες τιμές έκφρασης παρουσιάστηκαν στις ρίζες των φυτών και στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας δηλαδή μάρτυρες, φυτά που δέχθηκαν σταδιακή αύξηση συγκέντρωσης αλατότητας με τελική συγκέντρωση τα 100 mM NaCl και τέλος φυτά που δέχονταν εξ'αρχής συγκέντρωση 100 mM NaCl. Οι τιμές έκφρασης στα φύλλα των φυτών που δέχθηκαν τους χειρισμούς αλατότητας δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 3.6).

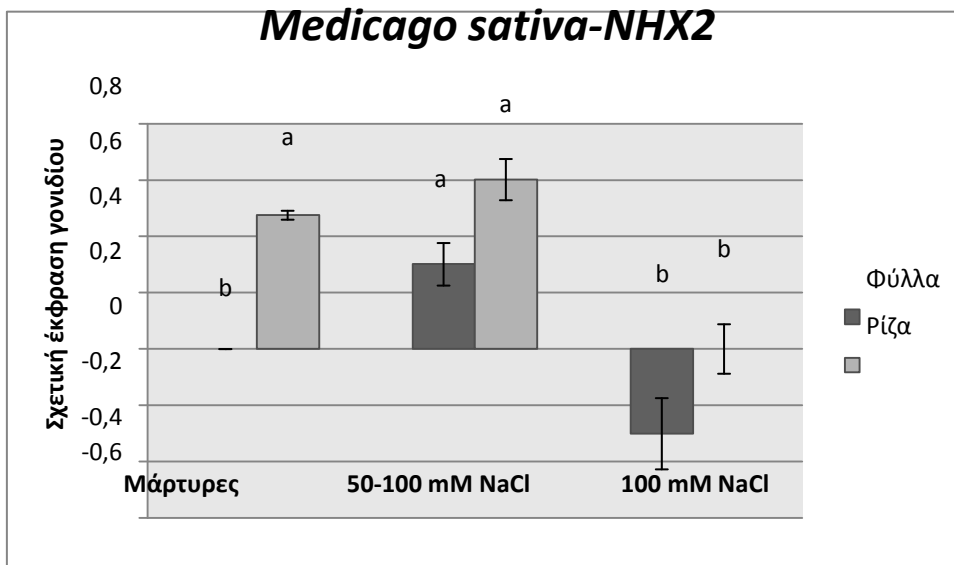


Εικόνα 3.7. Μέση έκφραση γονιδίου *SOS3* στο *M. arborea* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Στο *M. arborea* τα φύλλα και οι ρίζες των φυτών που δέχθηκαν συνεχόμενη εφαρμογή αλατότητας 100 mM NaCl εμφάνισαν την μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου χωρίς να υπάρχει μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 3.7). Οι τιμές έκφρασης στα φύλλα και τις ρίζες στα φυτά μάρτυρες και φυτά που υποβλήθηκαν σε σταδιακή αύξηση της αλατότητας δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους.

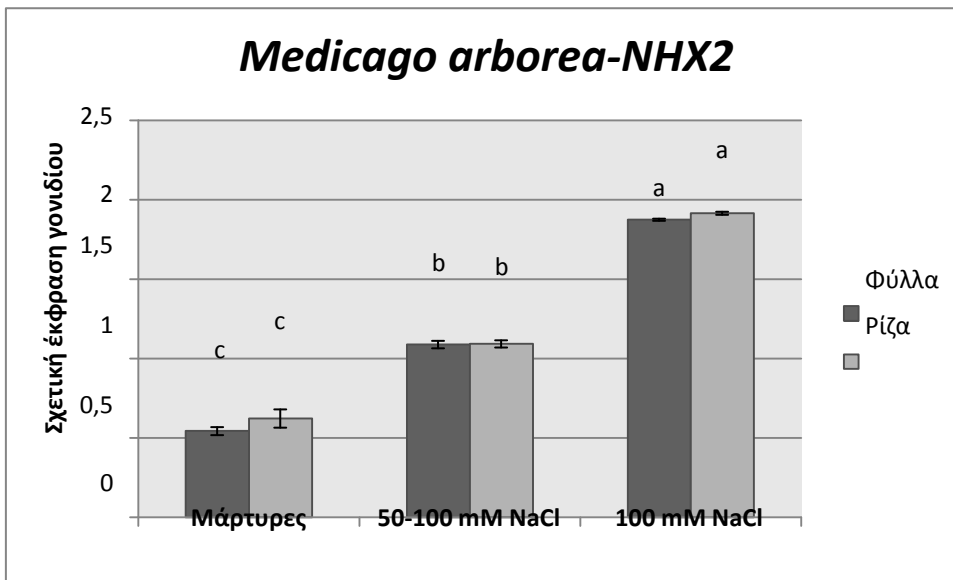
Συμπερασματικά για το γονίδιο *SOS3*, και στα δύο είδη υπήρχε αυξημένη έκφραση σε όλους τους χειρισμούς αλατότητας για τις ρίζες των φυτών και η μεγαλύτερη έκφραση εξ'αυτών παρουσιάστηκε στο *M. arborea* στα φυτά που δέχονταν συνεχόμενη εφαρμογή 100 mM NaCl. Όπως και παραπάνω το είδος *M. arborea* παρουσίασε μεγαλύτερη γενική έκφραση σε σχέση με το είδος *M. sativa*.

3.4 Έκφραση γονιδίου *NHX2*



Εικόνα 3.8. Μέση έκφραση γονιδίου *NHX2* στο *M. sativa* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Για το *M. sativa* η μεγαλύτερη τιμή έκφρασης για το γονίδιο *NHX2* παρουσιάστηκε στις ρίζες και τα φύλλα των φυτών που δέχονταν σταδιακή αύξηση αλατότητας με τελική συγκέντρωση τα 100 mM NaCl χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Εικόνα 3.8). Επίσης, στατιστικά σημαντική διαφορά δεν υπήρχε μεταξύ των ριζών και φύλλων των φυτών που δέχθηκαν συνεχόμενη εφαρμογή αλατότητας 100 mM NaCl.

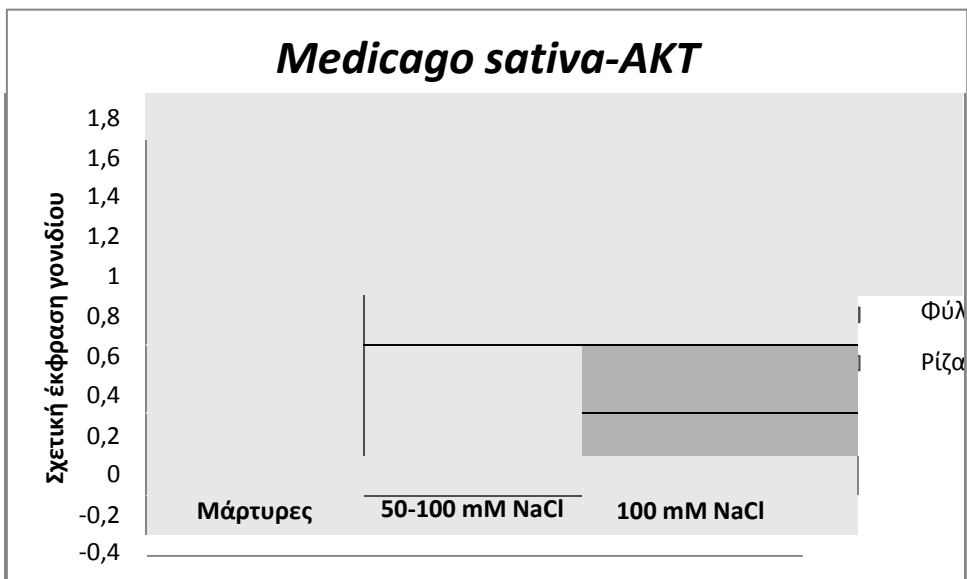


Εικόνα 3.9. Μέση έκφραση γονιδίου *NHX2* στο *M. arborea* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Για το *M. arborea* οι τρεις χειρισμοί διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους και οι μεγαλύτερες τιμές έκφρασης δόθηκαν από τα φύλλα και τις ρίζες των φυτών που δέχονταν συνεχόμενη συγκέντρωση αλατότητας 100 mM NaCl από την αρχή μέχρι το τέλος του πειράματος (Εικόνα 3.9). Μέσα στους χειρισμούς η έκφραση στα φύλλα και οι ρίζες δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

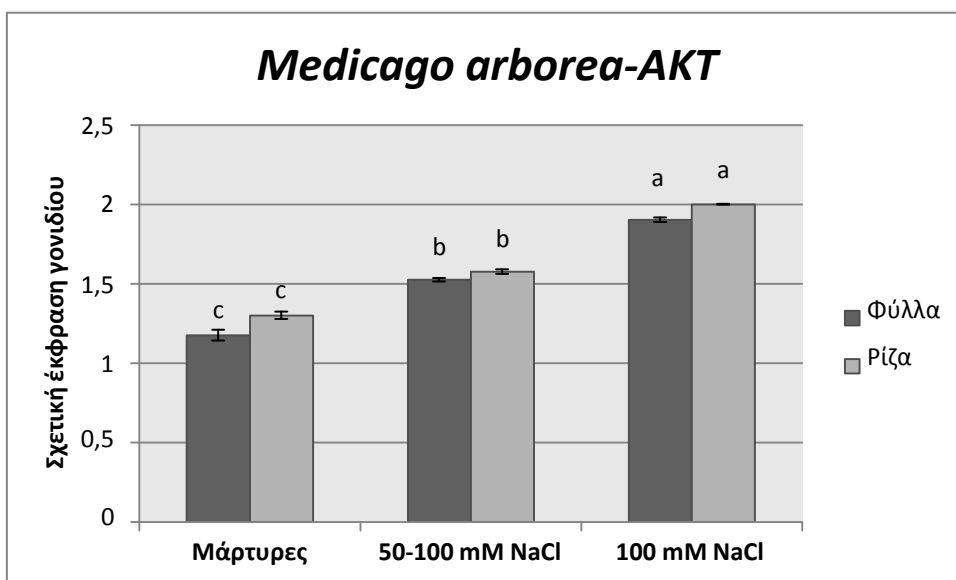
Συμπερασματικά για το γονίδιο *NHX2*, για το είδος *M. sativa* οι υψηλότερες τιμές έκφρασης υπήρχαν στα φυτά που δέχονταν σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης NaCl ενώ για το είδος *M. arborea* στα φυτά που δέχονταν συνεχόμενη εφαρμογή αλατότητας 100 mM NaCl. Όπως και στα προηγούμενα αποτελέσματα το είδος *M. arborea* παρουσίασε καθολικά μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου σε όλους τους χειρισμούς.

3.5 Έκφραση γονιδίου AKT



Εικόνα 3.10. Μέση έκφραση γονιδίου *AKT* στο *M. sativa* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Για το είδος *M. sativa*, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.10 οι υψηλότερες τιμές έκφρασης για το γονίδιο *AKT* παρουσιάστηκαν στις ρίζες των φυτών και για τους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς. Οι τιμές αυτές μεταξύ των δύο χειρισμών καταπόνησης με αλατότητα δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

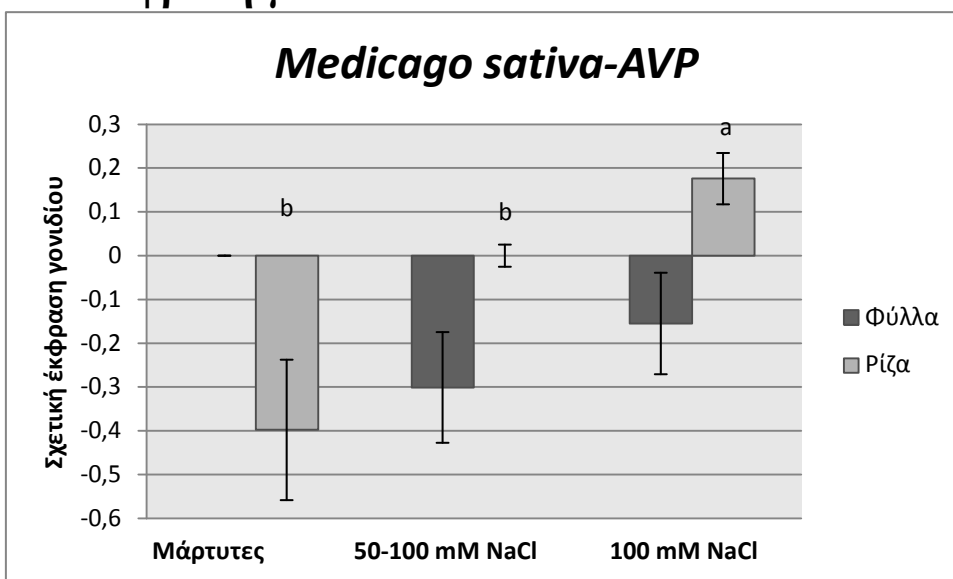


Εικόνα 3.11. Μέση έκφραση γονιδίου *AKT* στο *M. arborea* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Για το *M.arborea* οι τρεις χειρισμοί διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους και οι μεγαλύτερες τιμές έκφρασης δόθηκαν από τα φύλλα και τις ρίζες των φυτών που δέχονταν συνεχόμενη συγκέντρωση αλατότητας 100 mM NaCl από την αρχή μέχρι το τέλος του πειράματος (Εικόνα 3.11). Μέσα στους χειρισμούς τα φύλλα και οι ρίζες δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

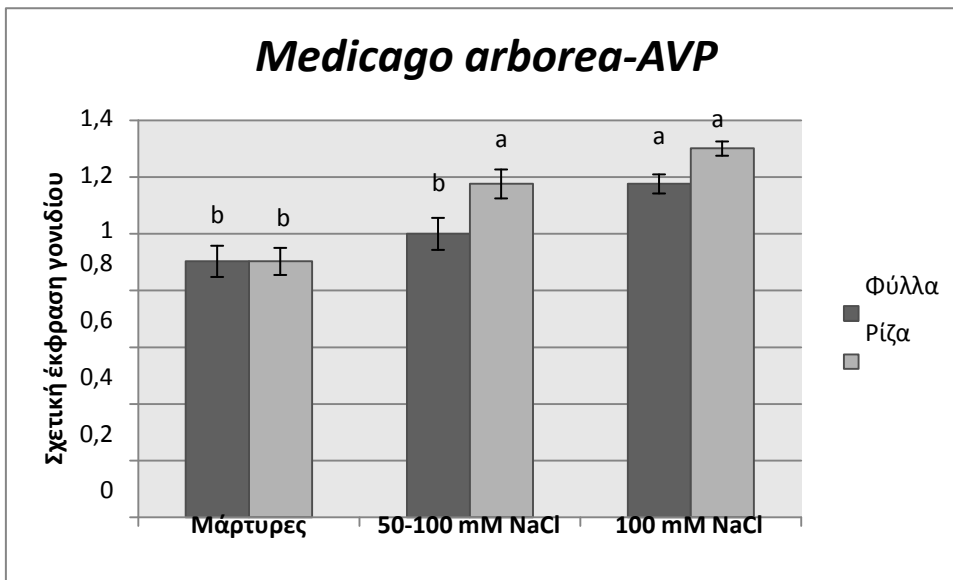
Συμπερασματικά για το γονίδιο *AKT*, για το είδος *M.sativa* οι υψηλότερες τιμές έκφρασης υπήρχαν στις ρίζες των φυτών σε όλους τους χειρισμούς ενώ για το είδος *M.arborea* στα φυτά που δέχονταν συνεχόμενη εφαρμογή 100 mM NaCl. Όπως και στα προηγούμενα αποτελέσματα το είδος *M.arborea* παρουσίασε καθολικά μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου σε όλους τους χειρισμούς.

3.6 Έκφραση γονιδίου *AVP*



Εικόνα 3.12. Μέση έκφραση γονιδίου *AVP* στο *M. sativa* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Για το γονίδιο *AVP* και για το είδος *M.sativa* η μεγαλύτερη τιμή έκφρασης εμφανίστηκε στις ρίζες των φυτών που δέχθηκαν συνεχόμενη εφαρμογή αλατότητας 100 mM NaCl όπως φαίνεται στην εικόνα 3.12. Όλες οι υπόλοιπες τιμές για τους υπόλοιπους χειρισμούς διέφεραν στατιστικά σημαντικά και ήταν αρκετά χαμηλότερες.

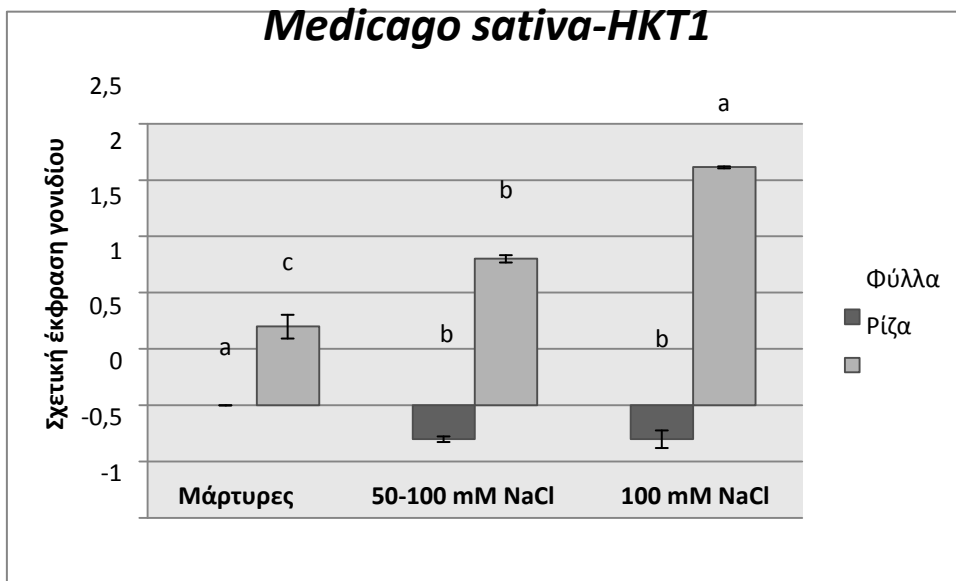


Εικόνα 3.13. Μέση έκφραση γονιδίου *AVP* στη *M. arborea* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Για το *M. arborea* οι μεγαλύτερες τιμές έκφρασης παρουσιάστηκαν στα φύλλα και τις ρίζες των φυτών που δέχονταν συνεχόμενη εφαρμογή 100 mM NaCl αλλά και στις ρίζες των φυτών που δέχθηκαν σταδιακά την καταπόνηση με αλατότητα με τελική συγκέντρωση τα 100mM NaCl (Εικόνα 3.13). Στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρχε μεταξύ των ριζών και των φύλλων για τα άτομα που δέχθηκαν σταδιακή αύξηση της αλατότητας με τελική συγκέντρωση τα 100 mM NaCl.

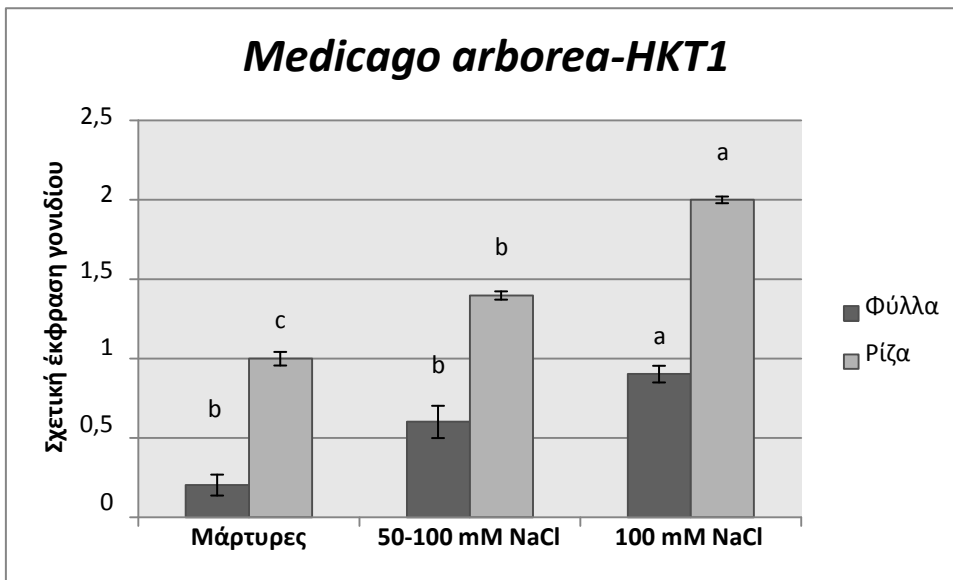
Συμπερασματικά για το γονίδιο *AVP*, το *M. sativa* παρουσίασε την μεγαλύτερη τιμή έκφρασης στις ρίζες των φυτών που δέχονταν συνεχόμενα 100 mM NaCl, ενώ στο *M. arborea* οι υψηλότερες τιμές εμφανίστηκαν στα φύλλα και τις ρίζες του παραπάνω χειρισμού καθώς και στις ρίζες των φυτών που δέχθηκαν σταδιακή αύξηση της αλατότητας με τελική συγκέντρωση 100 mM NaCl. Είναι εμφανές και πάλι ότι το *M. arborea* έχει αυξημένη έκφραση του γονιδίου σε όλους χειρισμούς συγκριτικά με το *M. sativa*.

3.7 Έκφραση γονιδίου *HKT1*



Εικόνα 3.14. Μέση έκφραση γονιδίου *HKT1* στο *M. sativa* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Για το *M. sativa*, η υψηλότερη τιμή έκφρασης του γονιδίου *HKT1* παρουσιάστηκε στις ρίζες των φυτών που δέχονταν συνεχόμενη εφαρμογή 100 mM NaCl και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τη σχετική έκφραση στα φύλλα (Εικόνα 3.14). Στατιστική διαφορά δεν υπήρχε μεταξύ των ριζών και φύλλων των ατόμων που δέχονταν σταδιακά την αύξηση της συγκέντρωσης NaCl με τελική συγκέντρωση τα 100 mM NaCl.



Εικόνα 3.15. Μέση έκφραση γονιδίου *HKT1* στο *M. arborea* στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς αλατότητας. Οι συγκρίσεις μεταξύ γονοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε $P < 0,05$. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) με βάση το κριτήριο του Tukey.

Για το *M. arborea*, φαίνεται από την εικόνα 3.15 ότι οι υψηλότερες τιμές έκφρασης του γονιδίου δόθηκαν από τις ρίζες και τα φύλλα των φυτών που δέχονταν συνεχόμενα συγκέντρωση αλατότητας 100 mM NaCl χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Οι αμέσως επόμενες τιμές παρουσιάστηκαν από τα φυτά που υποβλήθηκαν σε σταδιακή καταπόνηση αλατότητας χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ριζών και φύλλων.

Συμπερασματικά για το γονίδιο *HKT1*, και τα δύο είδη παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές έκφρασης για τα φυτά που δέχονταν εξ' αρχής συγκέντρωση 100 mM NaCl, με το *M. arborea* πάλι να εμφανίζει γενικά μεγαλύτερες εκφράσεις στα φύλλα και ρίζες σε όλους τους χειρισμούς σε σχέση με το *M. sativa*.

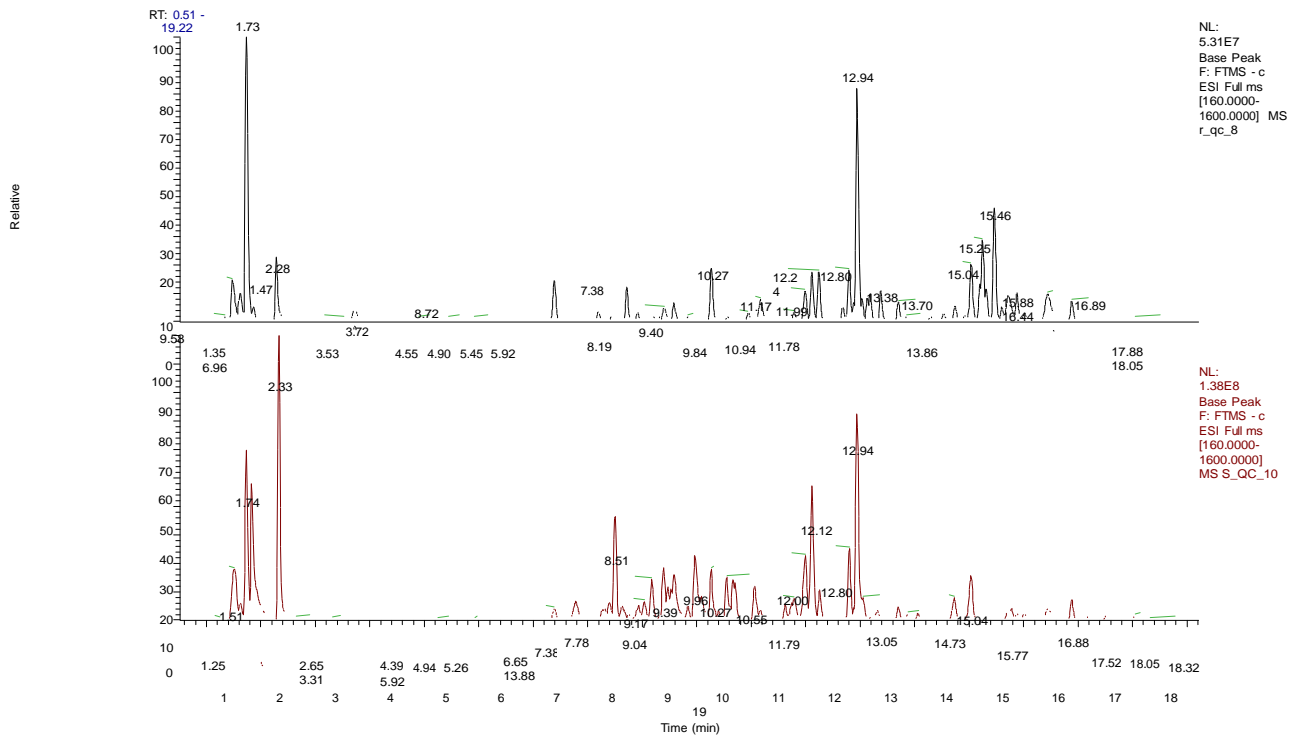
3.8 Μεταβολομική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε καταγραφή του μεταβολομικού προφίλ και μεταβολομική ανάλυση των δειγμάτων των δύο ειδών (*M.sativa*, *M.arborea*) και του υβριδίου τους Alborea σε σύστημα Orbitrap HRMS/MS.

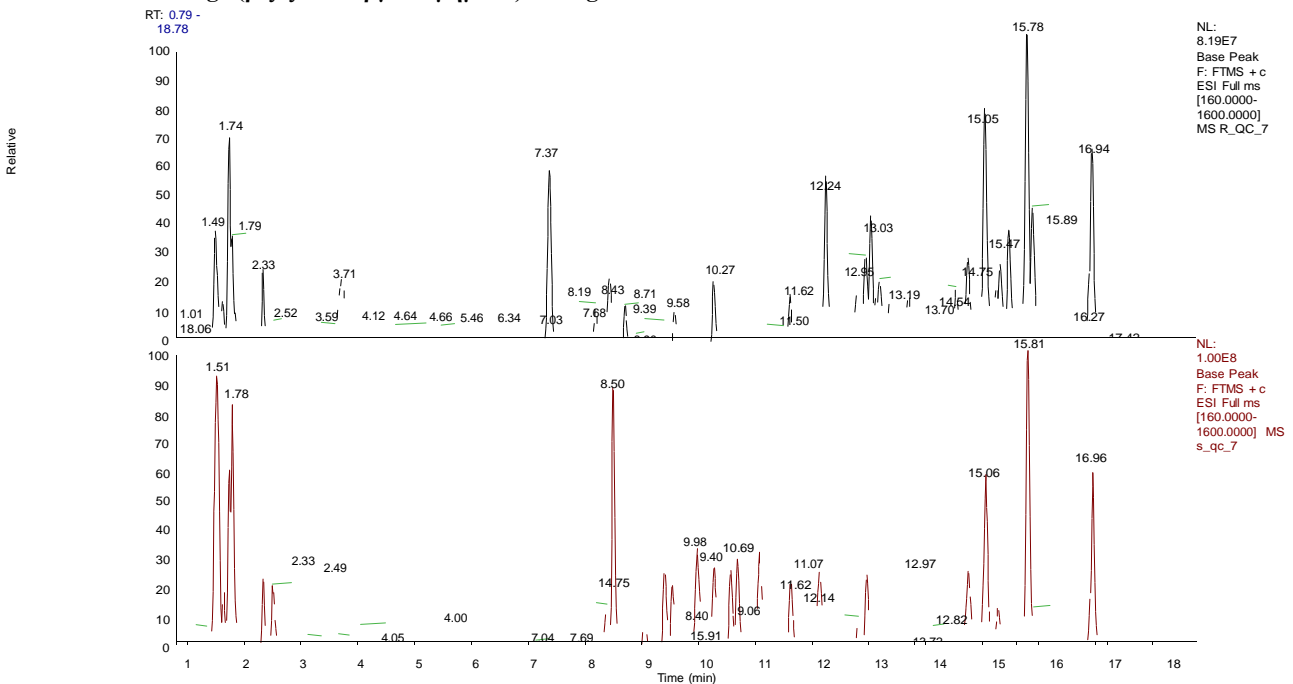
Το σύστημα αυτό είναι υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution, 70000) και δίνει τη δυνατότητα μέτρησης του ακριβούς μοριακού βάρους κάθε μορίου που χρωματογραφείται, προτείνοντας μοριακή δομή (Molecular Formula) με μεγάλη εμπιστοσύνη ($\Delta < 3 \text{ ppm}$), καθώς και ακριβή υπολογισμό των Ισοδυνάμων δακτυλίων-διπλών δεσμών (Ring-Double Bond Equivalents, RDBeq). Οι ταυτοποιήσεις των δευτερογενών μεταβολιτών πραγματοποιήθηκαν συνυπολογίζοντας δεδομένα χρωματογραφίας (Rt), ακριβούς μοριακού βάρους και προτεινόμενης δομής, των δεδομένων RDB σε συνδυασμό με τα θραύσματα MS/MS (με ακρίβεια μέτρησης μάζας των θραυσμάτων) και με δεδομένα από τη βιβλιογραφία.

Για τη μεταβολομική ανάλυση και την επεξεργασία των χρωματογραφικών και φασματομετρικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Compound Discoverer (Thermo Scientific®).

Παρακάτω στις εικόνες 3.16 και 3.17 φαίνεται χρωματογράφημα Quality Control (pooled sample) των δευτερογενών μεταβολιτών των δύο ειδών Medicago και του υβριδίου τους (ρίζες & υπέργεια τμήματα). Παρόμοια μόρια ταυτοποιούνται στα δύο τμήματα του φυτού. Τα μόρια που ταυτοποιούνται στα χρωματογραφήματα ανήκουν στις γενικές ομάδες των φαινολικών οξέων, флаβονοειδών και σαπωνινών. Σαν γενική παρατήρηση στα χρωματογραφήματα μέχρι τα 11 λεπτά περίπου εκλούνται φαινολικά οξέα και флаβονοειδή, ενώ μετά τα 20 min εκλούνται χαρακτηριστικές για το είδος σαπωνίνες και λιγνάνια. Οι σαπωνίνες και τα λιγνάνια φαίνονται να είναι πιο σημαντικά από τα флаβονοειδή και φαινολικά οξέα (υπάρχει μια σαφής διαφοροποίηση και σε ποιοτικό και σε ποσοτικό επίπεδο μεταξύ των δειγμάτων), επομένως οι παρακάτω σχολιασμοί αφορούν αυτές τις δύο ομάδες.



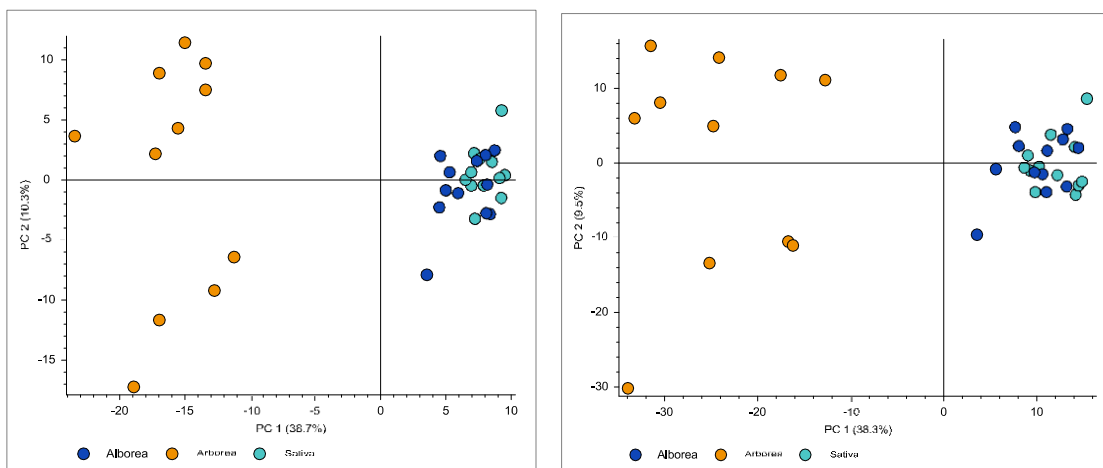
Εικόνα 3.16 Χρωματογράφημα Quality Control (pooled sample) των δευτερογενών μεταβολιτών των τριών ειδών *Medicago* (ρίζες & υπέργεια τμήματα) σε Negative Mode



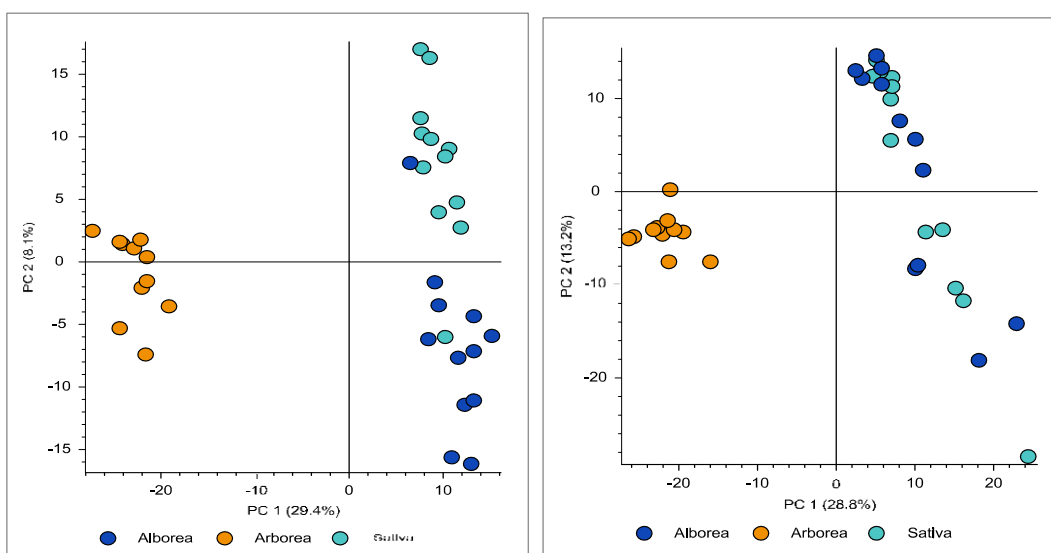
Εικόνα 3.17 Χρωματογράφημα Quality Control (pooled sample) των δευτερογενών μεταβολιτών των τριών ειδών *Medicago* (ρίζες & υπέργεια τμήματα) σε Positive mode

3.9 Αποτελέσματα μεταβολομικής ανάλυσης

Κατά την επεξεργασία των δεδομένων της μεταβολομικής ανάλυσης αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύγκριση των ειδών και του υβριδίου μεταξύ τους (Εικόνες 3.18, 3.19).

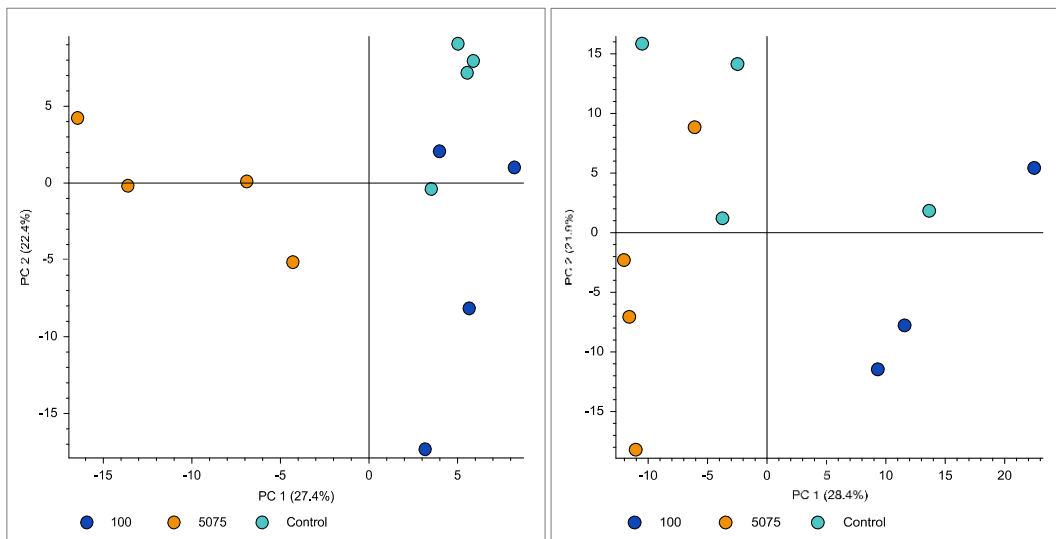


Εικόνα 3.18 Ανάλυση PCA για τις ρίζες των δύο ειδών μηδικής και του υβριδίου τους σε Negative (αριστερά) και Positive (δεξιά) Mode



Εικόνα 3.19 Ανάλυση PCA για τα υπέργεια τμήματα των δύο ειδών μηδικής και του υβριδίου τους σε Negative (αριστερά) και Positive (δεξιά) Mode

Είναι προφανές από τις εικόνες 3.18 και 3.19 ότι σαν είδη και μόνο υπάρχει σαφής διαχωρισμός του *M. arborea* από το *M. sativa* και το υβρίδιό τους, τα οποία πολύ αδρά διαχωρίζονται σύμφωνα με το περιεχόμενό τους σε δευτερογενείς μεταβολίτες. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μόρια εκείνα που φαίνεται πως διαφοροποιούν το *M. arborea* από το *M. sativa* είναι τα ίδια με εκείνα που διαφοροποιούν το *M. arborea* από το υβρίδιο.



Εικόνα 3.20. Ανάλυση PCA για τα τους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς για το *M.satīna* (αριστερά) και *M.arborea* (δεξιά)

Μια άλλη παρατήρηση που προέκυψε ήταν ότι τα επίπεδα έκφρασης σαπωνινών για το είδος *M.arborea* ήταν σταθερά υψηλά και στους μάρτυρες και στους χειρισμούς αλατότητας ενώ από την άλλη στο είδος *M.satīna* οι σαπωνίνες εκφράζονται ελαφρώς αυξημένες στους χειρισμούς εφαρμογής αλατότητας σε σχέση με τους μάρτυρες του ίδιου είδους που παρουσιάζουν γενικά μηδενική ή πολλή ασθενή έκφραση σαπωνινών. Στην Εικόνα 3.20 βλέπουμε ότι για το *M.arborea* δεν διαφοροποιούνται οι τρεις χειρισμοί μεταξύ τους ενώ στο *M.satīna* φαίνεται κυρίως η διαφοροποίηση του χειρισμού σταδιακής αύξησης χορήγησης αλατότητας.

3.10 Πίνακες αποτελεσμάτων μεταβολομικής ανάλυσης

Πίνακας 3.1 Οι σημαντικότερες σαπωνίνες που ανιχνεύθηκαν στο είδος *M. sativa*

Medicago sativa				
RT [min]	Molecular Weight	Formula	MS/MS	Structural Identification
11,646	1090,556	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃		Spongioside B, Medicago-saponin
13.038	1088.50487	C ₅₂ H ₈₀ O ₂₄	501 (C ₃₀ H ₄₅ O ₆) 463(C ₂₁ H ₃₅ O ₁₁)	Medicagenic acid saponin +Neohancoside B
13,376	1044,479	C ₅₁ H ₈₀ O ₂₂		Namonin E
12,502	1368,62	C ₈₁ H ₉₂ O ₁₉	470 (C ₃₀ H ₄₆ O ₄)	Saponin
12,622	1236,579	C ₅₁ H ₉₆ O ₃₃	486 C ₃₀ H ₄₆ O ₅	Quillaic Acid
12,837	1074,526	C ₅₂ H ₈₂ O ₂₃	486 C ₃₀ H ₄₆ O ₅	Quillaic Acid or quinovic acid or Emmolic Acid saponin
13,101	816,4889	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₅		Majonoside-R1 or Panajaponol A or MOMORDICOSIDE
13,296	942,4841	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₉	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	Saponin
14,161	912,4738	C ₆₄ H ₆₄ O ₅	502 C ₃₀ H ₄₆ O ₆	Medicagenic acid

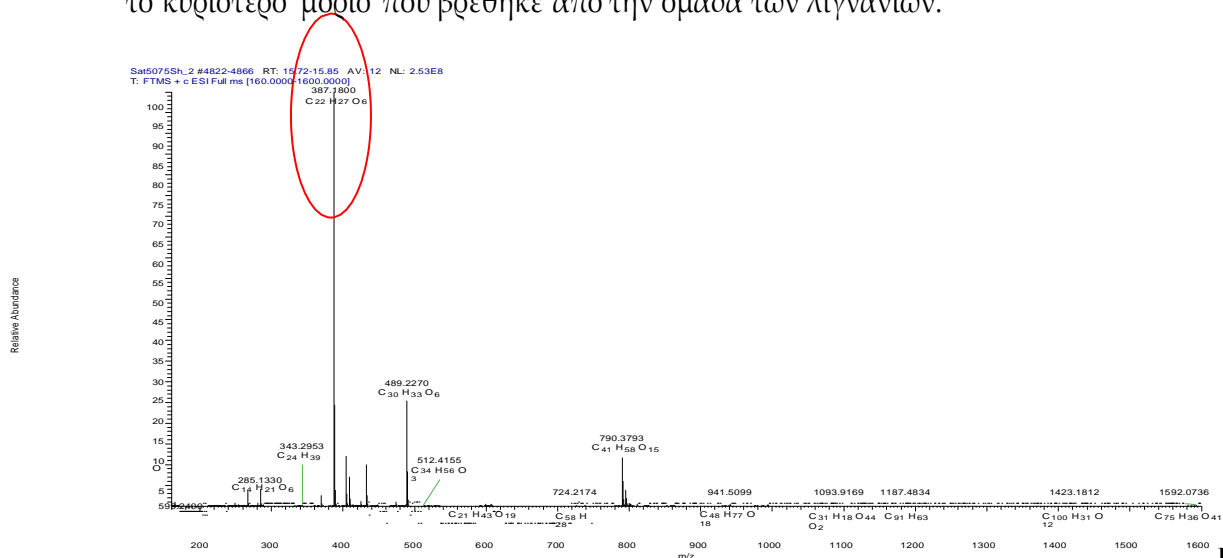
Πίνακας 3.2 Οι σημαντικότερες σαπωνίνες που ανιχνεύθηκαν στο είδος *M. arborea*

Medicago arborea				
RT [min]	Molecular Weight	Formula	MS/MS	Structural Identification
12.46	664,3828	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₁	470 (C ₃₀ H ₄₆ O ₄)	Glucuronic acid saponin
12.55	1042.46392	C ₄₃ H ₇₈ O ₂₈	487(C ₃₀ H ₄₇ O ₅)	Caryophyllogenin type saponin
12.77	826.43709	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₆	487 (C ₃₀ H ₄₇ O ₅)	Caryophyllogenin type saponin
12.78	664,3828	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₁	470 (C ₃₀ H ₄₆ O ₄)	Glucuronic acid saponin
12.893	1220.54651	C ₅₇ H ₈₈ O ₂₈	502 (C ₃₀ H ₄₄ O ₆)	Medicagenic acid saponin
13.052	1104.8357	C ₇₁ H ₇₆ O ₁₁	502 (C ₃₀ H ₄₄ O ₆)	Medicagenic acid saponin
13.038	1088.50487	C ₅₂ H ₈₀ O ₂₄	502 (C ₃₀ H ₄₆ O ₆)	Medicagenic acid saponin
13,063	1206,565	C ₅₇ H ₉₀ O ₂₇	456 (C ₂₉ H ₄₄ O ₄) + 393 (C ₂₈ H ₄₀ O)	O-Acetyldiosgenin+
13.18	1061.5567	C ₅₂ H ₈₅ O ₂₂	454 (C ₃₀ H ₄₆ O ₃)	Oleanonic type saponin
13.491	782.4455	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₄	470 (C ₃₀ H ₄₆ O ₄)	Saponin
14,941	664,3828	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₁	470 (C ₃₀ H ₄₆ O ₄)	Glucuronic acid saponin
15,82	926.4952	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₈	456 (C ₃₀ H ₄₈ O ₃)	Soyasapogenol E saponin
16.21	910.4932	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₇	456 (C ₃₀ H ₄₆ O ₂)	Oleanadienoic acid saponin

Φαίνεται από τους πίνακες ότι το είδος *M. arborea* διαφοροποιείται από το είδος *M. sativa* κυρίως μέσω της υπερέκφρασης συγκεκριμένων ομάδων σαπωνινών. Τα δύο είδη ως επί το πλείστον παρουσιάζουν διαφορετικές σαπωνίνες και σε περιπτώσεις όπου τα δύο είδη εμφάνισαν ίδιο μόριο σαπωνίνης υπήρχε διαφορά στο ποσοτικό επίπεδο έκφρασης. Μια τέτοια περίπτωση είναι η σαπωνίνη που φέρει άγλυκο medicagenic acid που υπάρχει και στα δύο είδη όπως βλέπουμε στους πίνακες 3,1 και 3,2, όμως στην *M. arborea* εκφράζεται 25 φορές περισσότερο σε σχέση με την *M. sativa*.

Στο υβρίδιο Alborea τα επίπεδα έκφρασης σαπωνινών ήταν ανάξια σχολιασμού και πολύ χαμηλά τόσο στα φυτά που δέχθηκαν εφαρμογή αλατότητας όσο και στους μάρτυρες γι' αυτό και δεν παρατέθηκε πίνακας αποτελεσμάτων.

Όπως προαναφέρθηκε, εκτός από τις σαπωνίνες βρέθηκε και μια άλλη ομάδα μορίων, τα λιγνάνια. Τα λιγνάνια εμφανίστηκαν στο υβρίδιο και το *M. sativa* και αποτελούν άλλον ένα παράγοντα διαφοροποίησης σε σχέση με το *M. arborea*. Στην εικόνα 3.21 παρακάτω φαίνεται το κυριότερο μόριο που βρέθηκε από την ομάδα των λιγνανίων.



Εικόνα

3.21 Χρωματογράφημα που παρουσιάζει κατά πάσα πιθανότητα λιγνάνιο $R_t= 15.8\text{min}$, $C_{22}H_{26}O_6$, m/z 386, MS/MS: $C_{22}H_{26}O_6$, $C_{22}H_{26}O_6$

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το είδος της κοής μηδικής (*Medicago sativa*) λόγω της θρεπτικής του αξίας και των καλλιεργητικών χαρακτηριστικών του, αποτελεί σημαντικό χορτοδοτικό φυτό για ζωοτροφή παγκοσμίως. Από την άλλη, το είδος *Medicago arborea* το οποίο έχει δενδρώδη μορφή εκτός από τη χρήση του ως χορτοδοτικό χρησιμοποιείται και ως καλλωπιστικό. Με διασταύρωση των ειδών *Medicago sativa* και *Medicago arborea* δημιουργήθηκε το υβρίδιο Alborea προκειμένου να καλυφθούν οι μεγάλες ανάγκες σε ζωοτροφή. Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκαν και τα δύο είδη μηδικής και το υβρίδιό τους, με σκοπό να διερευνηθούν μηχανισμοί αντοχής σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Παρόλο που δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, οι έρευνες έχουν δείξει ότι τα δυο είδη μηδικής, η *Medicago sativa* και η *Medicago arborea* παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή σε συνθήκες αλατότητας, όμως δεν υπάρχουν στοιχεία για το υβρίδιό τους.

Για το σκοπό αυτό αξιολογήθηκαν τα δύο είδη, *Medicago sativa*, *Medicago arborea* και το υβρίδιό τους, ως προς το μεταβολομικό τους προφίλ μετά από εφαρμογή διαλύματος NaCl με δύο τρόπους: α) με εφαρμογή από την αρχή μέχρι το πέρας του πειράματος με δεδομένη συγκέντρωση άλατος (100 mM NaCl), και β) με βαθμιαία αύξηση συγκέντρωσης άλατος δηλαδή, αρχική συγκέντρωση 50 mM και τελική 100 mM NaCl (αύξηση συγκέντρωσης κατά 25mM NaCl κάθε 10 ημέρες). Εκτός από τους δευτερογενείς μεταβολίτες, αξιολογήθηκαν τα δύο είδη *Medicago sativa* και *Medicago arborea* και ως προς τη γονιδιακή έκφραση έξι γονιδίων, που φαίνεται να σχετίζονται με την αντοχή σε συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα, σε συνέχεια του πειράματος της πτυχιακής μου μελέτης. Από τα πειραματικά αποτελέσματα φαίνεται ότι, η *M.arborea* υπερεκφράζει και ενεργοποιεί όλους τους διαθέσιμους μηχανισμούς αντοχής σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας ενώ από την άλλη η *M.sativa* δρα πιο στοχευμένα, υπερεκφράζοντας γονίδια που συμβάλλουν στη συσσώρευση των ιόντων νατρίου συγκεκριμένα στη ρίζα. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης έγινε με την μέθοδο της Real-Time PCR για τα γονίδια *SOS1*, *SOS3*, *NHX2*, *AKT*, *AVP*, *HKT1*.

Η αντοχή των φυτών στην αλατότητα ρυθμίζεται μέσω διαφόρων μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένου του συμπλέγματος γονιδίων *SOS* (Salt Overly Sensitive) (Qiu et al., 2002). Τα γονίδια *SOS1*, *SOS2* και *SOS3* εμπλέκονται άμεσα στη ρύθμιση της ανεκτικότητας σε άλατα αποβάλλοντας το Na από τις ρίζες των φυτών. Το *SOS3* ενεργοποιείται με δέσμευση Ca και αλληλεπιδρά με το *SOS2* για να ενεργοποιήσει την κινάση, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει το *SOS1* (Gupta et al., 2014). Η φωσφορυλίωση αυξάνει τη δραστηριότητα μεταφοράς του *SOS1*, μια πρωτεΐνη που συνδέεται με την μεμβράνη πλάσματος και ελέγχει την εκροή Na από τη ρίζα (Shi et al., 2002).

Για την *Medicago sativa* φαίνεται ότι υπάρχει υπερέκφραση του γονιδίου *SOS* κυρίως στις ρίζες και στον χειρισμό συνεχούς εφαρμογής 100mM NaCl. Όπως φαίνεται το είδος *M.sativa* εστιάζει στην υπερέκφραση του γονιδίου στις ρίζες και όχι στα φύλλα. Σύμφωνα με τους Liu et al., 2015 η υπερέκφραση των γονιδίων *SOS* σε πειράματα που έκαναν με τα είδη μηδικής *M. falcata* και *M. truncatula*, δείχνει ότι η αποβολή νατρίου είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην επιβίωση των φυτών σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας και ένας ισχυρός τέτοιος μηχανισμός αποβολής νατρίου μπορεί να βελτιώσει την ανθεκτικότητα των φυτών.

Στην *Medicago arborea* οι τιμές έκφρασης του γονιδίου είναι αυξημένες για τα φύλλα και για τις ρίζες με υψηλότερη έκφραση στα φυτά που δέχονταν εξ' αρχής 100mM NaCl χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι οι τιμές έκφρασης στους υπόλοιπους χειρισμούς ήταν χαμηλές όπως ισχύει για την *M.sativa*. Σε πείραμα των Shi et al., (2002) τα διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis thaliana* που υπερέκφρασαν το γονίδιο *SOS* είχαν καλύτερη ανάπτυξη από τα φυτά μάρτυρες σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας.

Συγκρίνοντας τα δύο αυτά είδη, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το είδος *M.arborea* έχει μια γενικευμένη έκφραση του γονιδίου σε όλους τους χειρισμούς και για τα δύο τμήματα του φυτού, φύλλα και ρίζες, ενώ από την άλλη η *M.sativa* υπερεκφράζει πιο στοχευμένα το γονίδιο εστιάζοντας στις ρίζες.

Αρκετά γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί σε διαφορετικά είδη φυτών που είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην απομόνωση του Na μέσα στο χυμοτόπιο για την προστασία του κυτταροπλάσματος από τις τοξικές επιδράσεις. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι και το *NHX2* το οποίο υπάρχει στην χυμοτοπική μεμβράνη και περιορίζει το Na στο χυμοτόπιο (Barragan, et al. 2012).

Για την *Medicago sativa* σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του προηγούμενου γονιδίου, το γονίδιο *NHX2* φαίνεται να υπερεκφράστηκε στα φυτά που υποβλήθηκαν σε σταδιακή αύξηση της χορήγησης αλατότητας ξεκινώντας από 50 mM NaCl και καταλήγοντας στα 100 mM NaCl αλλά και στις ρίζες στα φυτά μάρτυρες. Οι Zahran et al., (2007) παρατήρησαν σε πείραμα αλατότητας με το είδος *Medicago intertexta* ότι το γονίδιο *NHX2* δεν υπερεκφράστηκε μετά από υποβολή των φυτών σε αλατότητα. Μάλιστα, το συγκεκριμένο γονίδιο είχε ίδια επίπεδα έκφρασης όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν παρουσία αλλά και απουσία αλατότητας. Τα αποτελέσματα αυτά συμπίπτουν και με των Yang et al., (2005) όπου παρατηρήθηκε μέτρια έκφραση του γονιδίου σε φυτά μηδικής ακόμα και όταν τα φυτά αναπτύσσονταν σε περιβάλλον χωρίς καταπόνηση.

Σε αντίθεση με το *M.sativa*, για το *M.arborea* το γονίδιο *NHX2* παρουσίασε την μεγαλύτερη τιμή υπερέκφρασης στα φυτά που δέχονταν από την αρχή μέχρι το τέλος του πειράματος 100 mM NaCl. Μικρότερη έκφραση παρουσίασαν τα φυτά του σταδιακού

χειρισμού και ακόμα μικρότερη τα φυτά μάρτυρες καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο παίζει ρόλο στην ανθεκτικότητα των φυτών σε καταπόνηση με αλατότητα. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Zhang et al., (2012,2014) όπου η υπερέκφραση του γονιδίου *NHX2* σε διαγονιδιακά φυτά μηδικής βελτίωσε την ανθεκτικότητα στην αλατότητα μέσω βελτίωσης της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης καλίου.

Συμπερασματικά, οι απόψεις για το γονίδιο *NHX2* φαίνονται να δίστανται για το αν παίζει τελικά ρόλο στην αντοχή των φυτών σε συνθήκες αλατότητας ή εκφράζεται το ίδιο είτε υποβάλλονται τα φυτά σε αυτές τις συνθήκες είτε όχι. Τα δύο είδη *Medicago sativa* και *Medicago arborea* φαίνεται να συμπεριφέρθηκαν με διαφορετικό τρόπο όσον αφορά το συγκεκριμένο γονίδιο.

Το επόμενο γονίδιο που μελετήθηκε ήταν το *AKT* το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην διοχέτευση του νατρίου από το ξύλο στις ρίζες, προλαμβάνοντας έτσι τις ζημιές στα φύλλα (Sandhu et al.,2017).

Για το είδος *M.sativa*, οι υψηλότερες τιμές έκφρασης για το γονίδιο *AKT* παρουσιάστηκαν στις ρίζες των φυτών και για τους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς. Αντίθετα οι τιμές έκφρασης στα φύλλα ήταν πολύ χαμηλές. Οι Sandhu et al., (2017) διεξήγαγαν πείραμα με 12 διαφορετικούς γονοτύπους μηδικής προκειμένου να εντοπίσουν τους πιο ανθεκτικούς στην αλατότητα μελετώντας εκφράσεις γονιδίων. Οι δύο γονότυποι που παρουσίασαν την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αλατότητα βρέθηκαν να υπερεκφράζουν το γονίδιο *AKT* υποδηλώνοντας την σημασία του γονιδίου στην εκροή του νατρίου από τις ρίζες.

Η *Medicago arborea* από την άλλη, είχε τα ίδια επίπεδα έκφρασης τόσο για τις ρίζες όσο και για τα φύλλα ξεχωριστά για τον κάθε χειρισμό. Ο χειρισμός με την συνεχόμενη εφαρμογή 100 mM NaCl ήταν αυτός που παρουσίασε την υψηλότερη τιμή ακολουθούμενος από την σταδιακή μεταχείριση και τέλος τα φυτά μάρτυρες. Όπως φαίνεται το γονίδιο παίζει όντως ρόλο στην ανθεκτικότητα των φυτών στην αλατότητα εφόσον υπερεκφράζεται με αύξηση της καταπόνησης. Παρόλο όμως που το συγκεκριμένο γονίδιο φαίνεται να εμπλέκεται στους μηχανισμούς απόκρισης αλατότητας δεν υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές για το συγκεκριμένο γονίδιο στα φυτά.

Καταλήγοντας, τα αποτελέσματα έκφρασης του γονιδίου *AKT* στην *Medicago sativa* συμφωνούν πλήρως με τα μέχρι τώρα δεδομένα για το γονίδιο *AKT* που το θέλουν να υπερεκφράζεται και να εντοπίζεται η λειτουργία του στις ρίζες των φυτών. Από την άλλη το είδος *M. arborea* παρουσιάζει αυξημένες τιμές έκφρασης σε όλους τους χειρισμούς καταπόνησης για τις ρίζες αλλά και τα φύλλα. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται να εμπλουτίσει τα μέχρι τώρα ερευνητικά αποτελέσματα γύρω από το συγκεκριμένο γονίδιο αλλά και να

υπογραμμίσει το γεγονός ότι τα δύο είδη μηδικής που μελετήσαμε διαθέτουν διαφορετικούς μηχανισμούς απόκρισης στις αβιοτικές καταπονήσεις.

Ένα άλλο γονίδιο που μελετήθηκε στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μελέτης ήταν το γονίδιο *AVP*. Η λειτουργία του έγκειται στην συσσώρευση και απομόνωση νατρίου μέσα στο χυμοτόπιο προλαμβάνοντας έτσι εκδηλώσεις εμφάνισης τοξικότητας (Gaxiola et al., 2001).

Για το γονίδιο *AVP* και για το είδος *M.sativa* η μεγαλύτερη τιμή έκφρασης εμφανίστηκε στις ρίζες των φυτών που δέχθηκαν συνεχόμενη εφαρμογή αλατότητας 100mM NaCl. Όλες οι υπόλοιπες τιμές για τους υπόλοιπους χειρισμούς ήταν αρκετά χαμηλότερες. Οι Gaxiola et al., (2001) που μελέτησαν το γονίδιο σε διαγονιδικά φυτά *Arabidopsis* βρήκαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *AVP* συνεπάγεται αυξημένη απομόνωση νατρίου μέσα στο χυμοτόπιο και διατήρηση υψηλότερης σχετικής περιεκτικότητας σε νερό στα φύλλα και αυξημένη αντοχή στην αλατότητα και ξηρασία σε σύγκριση με φυτά άγριου τύπου.

Σε αντίθεση με το *M.sativa*, οι τιμές έκφρασης του γονιδίου για όλους τους χειρισμούς για το *M.arborea* ήταν σαφώς αυξημένες. Οι μεγαλύτερες τιμές έκφρασης παρουσιάστηκαν στα φύλλα και τις ρίζες των φυτών που δέχονταν συνεχόμενη εφαρμογή 100mM NaCl αλλά και στις ρίζες των φυτών που δέχθηκαν σταδιακά την καταπόνηση με αλατότητα με τελική συγκέντρωση τα 100 mM NaCl. Το γεγονός ότι το γονίδιο σχετίζεται όντως με την αντοχή στην αλατότητα επιβεβαιώνουν και οι Arif et al., (2012), Yang et al., (2007), Bhaskaran και Savithramma (2011) όπου έδειξαν με πειράματά τους ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *AVP* στο φυτό *Arabidopsis*, το ρύζι και τη ντομάτα έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη απόδοση των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης με αλατότητα και ξηρασία. Επιπλέον, η υπερέκφραση του γονιδίου *AVP* στο βαμβάκι έχει αναφερθεί ότι υποβοηθάει τη μεταφορά της αυξίνης στις ρίζες, βοηθώντας έτσι τα διαγονιδικά φυτά να απορροφούν το νερό πιο αποτελεσματικά όταν υποβάλλονται σε καταπόνηση ξηρασίας και αλατότητας (Pasapula et al., 2011).

Το συμπέρασμα στο οποίο καταλήγουμε για το συγκεκριμένο γονίδιο και για τα δύο είδη μηδικής, συνάδει με τα αποτελέσματα για τα προηγούμενα γονίδια όπου φαίνεται και πάλι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης που εμφανίζει η *M.arborea* έναντι της *M.sativa*.

Το τελευταίο γονίδιο που μελετήθηκε ήταν το *HKT1*, το οποίο παρουσιάζει την ίδια λειτουργία με το γονίδιο *AKT* που αναφέρθηκε προηγουμένως, και παίζει σημαντικό ρόλο στην διοχέτευση του νατρίου από το ξύλο στις ρίζες, προλαμβάνοντας έτσι τις ζημιές στα φύλλα.

Για το *M. sativa*, η υψηλότερη τιμή έκφρασης του γονιδίου *HKT1* παρουσιάστηκε στις ρίζες των φυτών που δέχονταν συνεχόμενη εφαρμογή αλατότητας 100 mM NaCl αλλά και οι υπόλοιπες τιμές ριζών είναι αυξημένες. Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου για τα φύλλα και στους τρεις χειρισμούς είναι αισθητά χαμηλότερη. Πράγματι οι Sandhu et al., (2017)

εντόπισαν ότι το γονίδιο *HKT1* υπερεκφράστηκε στις ρίζες παρά στα φύλλα των φυτών μηδικής που παρουσίασαν μεγαλύτερη απόδοση, κάτω από συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν και οι Measer et al., (2002) όπου έδειξαν ότι στο φυτό *Arabidopsis* το γονίδιο *HKT1* εκφράζεται έντονα στις ρίζες.

Για το *M.arborea*, φαίνεται ότι οι υψηλότερες τιμές έκφρασης του γονιδίου εντοπίστηκαν στις ρίζες αλλά και στα φύλλα των φυτών που δέχονταν συνεχόμενα συγκέντρωση αλατότητας 100 mM NaCl. Οι αμέσως χαμηλότερες τιμές εντοπίστηκαν στα φυτά που υποβλήθηκαν σε σταδιακή καταπόνηση αλατότητας όπου πάλι τα φύλλα και οι ρίζες παρουσίασαν ίδια επίπεδα έκφρασης. Βλέπουμε επομένως ότι για το είδος αυτό το γονίδιο *HKT1* υπερεκφράζεται και στα φύλλα σε αντίθεση με το *M.sativa*. Οι Laurie et al., (2002) έδειξαν ότι τα διαγονιδιακά φυτά σίτου που υπερέκφρασαν το γονίδιο *HKT1* εμφάνισαν σημαντικά μικρότερη πρόσληψη Na⁺ και αυξημένη ανάπτυξη υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας σε σύγκριση με φυτά μάρτυρες. Μια άλλη ενδιαφέρουσα έρευνα των Rubio et al., (1995) υποστηρίζει ότι τα διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν το γονίδιο *HKT1* γενικά, συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες αλάτων στο βλαστό και είναι σχετικά πιο ευαίσθητα στην αλατότητα από τα φυτά μάρτυρες, ενώ τα φυτά που υπερεκφράζουν το ίδιο γονίδιο συγκεκριμένα στα κύτταρα της ρίζας συσσωρεύουν λιγότερο νάτριο στους βλαστούς και καθίστανται περισσότερο ανεκτικά στην αλατότητα.

Τελειώνοντας, όσον αφορά με τις σχετικές εκφράσεις των έξι γονιδίων συνολικά που μελετήθηκαν σε φυτά του είδους *M.sativa* και *M.arborea* μετά από υποβολή τους σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι κατά γενικό κανόνα, η *M.arborea* φαίνεται να υπερεκφράζει και να ενεργοποιεί όλους τους διαθέσιμους μηχανισμούς αντοχής σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας ενώ από την άλλη η *M.sativa* δρα πιο στοχευμένα, υπερεκφράζοντας τα γονίδια *HKT1* και *AKT* που συμβάλλουν στη συσσώρευση των ιόντων νατρίου συγκεκριμένα στη ρίζα. Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν άλλες βιβλιογραφικές αναφορές που να επιβεβαιώνουν ή απορρίπτουν το παραπάνω συμπέρασμα, η μεταπτυχιακή αυτή μελέτη συμβάλλει ουσιαστικά στην διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας στα δύο αυτά είδη μηδικής μέσω της έκφρασης των έξι γονιδίων και θα ήταν χρήσιμο να υπάρξουν περαιτέρω ερευνητικές δραστηριότητες.

Όπως αναφέραμε εκτός από την μελέτη έκφρασης των παραπάνω γονιδίων μελετήσαμε και τους δευτερογενείς μεταβολίτες στα δύο είδη μηδικής και το υβρίδιό τους (*M.sativa*, *M.arborea* και *M.Alborea*), σε σύστημα Orbitrap HRMS/MS. Τα μόρια που ταυτοποιήθηκαν στα χρωματογραφήματα ανήκαν στις γενικές ομάδες των φαινολικών οξέων, φλαβονοειδών

και σαπωνινών. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που βρέθηκαν να παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον όμως ήταν οι σαπωνίνες.

Το είδος *M.arborea* παρουσιάζει διαφορετικό μεταβολικό προφίλ από το *M. sativa* και το υβριδίό τους. Είναι γενικά γνωστό ότι κάθε φυτικό είδος παρουσιάζει διαφορετικούς δευτερογενείς μεταβολίτες ακόμα και διαφορετικά ενδιάμεσα μεταβολικά μονοπάτια σε περίπτωση κοινού τελικού προϊόντος μεταβολίτη. Επίσης, τα δεδομένα των Edreva et al., (2008) έδειξαν ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες σχετίζονται με τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών προς τις αβιοτικές καταπονήσεις, γεγονός που συμφωνεί με τα δεδομένα και της παρούσας εργασίας. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Arbona et al., (2013), η επαγωγή δευτερογενών μεταβολιτών σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει έναν αποτελεσματικό μηχανισμό συνδυασμένης προστασίας και από βιοτικές καταπονήσεις, παρέχοντας μια αλληλεπικάλυψη μεταξύ αποκρίσεων σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις.

Ακόμη, όπως φαίνεται και στους πίνακες 3.1 και 3.2, όπου καταγράφονται οι σημαντικότερες σαπωνίνες που εντοπίστηκαν στα δύο είδη *M.sativa* και *M.arborea*, υπάρχει σαφής διαφοροποίηση μεταξύ αυτών των δύο ειδών τόσο στα είδη των σαπωνινών όσο και στην ποσότητά τους. Συγκριμένα, στην περίπτωση που τα δύο είδη είχαν κοινή σαπωνίνη με άγλυκο medicagenic acid, στο είδος *M.arborea* υπήρχε 25 φορές περισσότερο σε σχέση με το *M.sativa*. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι τα δύο αυτά είδη παρουσίασαν ικανοποιητική απόκριση σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας, ενώ από την άλλη το υβρίδιο τους δεν ανταποκρίθηκε καθόλου σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Μια από τις αιτίες της μη ικανοποιητικής απόκρισης θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι δεν παρήχθησαν σαπωνίνες στο υβρίδιο. Μάλιστα, οι Szaliel et al., (2010) καθώς και οι Gomez-Pando et al., (2010) συσχετίζουν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και συγκεκριμένα την παραγωγή σαπωνινών σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, με την αποτελεσματική απόκριση του φυτού κάτω από τέτοιες συνθήκες.

Πράγματι, οι Basyuni et al, (2011) μετά από πείραμα αλατότητας σε αλόφυτα (mangrove) βρήκαν ότι, η συνολική περιεκτικότητα σε σαπωνίνες στις ρίζες και στα φύλλα των φυτών μαρτύρων ήταν 87,0 και 66,2 μgr αντίστοιχα, ενώ στα φυτά που δέχθηκαν αυξημένα επίπεδα αλατότητας οι τιμές αυξήθηκαν σημαντικά σε 173,1 και 142,6 μgr αντίστοιχα. Οι ίδιοι επισημαίνουν ότι είναι πιθανό η περιεκτικότητα σε τριτερπενοειδή να παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των φυτών σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Οι παραπάνω παρουσίασαν τα ίδια αποτελέσματα για τα είδη *Kandelia candel*, *Bruguiera gymnorrhiza*, *Avicennia marina*, *Rhizophora* *stylosa*.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν το γεγονός ότι τα επίπεδα σαπωνινών στο *M.arborea* παρέμειναν σταθερά τόσο στα φυτά μάρτυρες όσο και στα φυτά που δέχθηκαν τους δύο διαφορετικούς χειρισμούς όσον αφορά την αλατότητα. Από την άλλη οι μάρτυρες του είδους *M.sativa* είχαν ελάχιστη ή μηδαμινή ποσότητα σαπωνινών ενώ υπήρχε αισθητή αύξηση τους στα φυτά που δέχθηκαν τους χειρισμούς με NaCl.

Οι Pulvento et al., (2012) μελέτησαν την απόδοση φυτών κινόα κάτω από συνθήκες αυξημένης αλατότητας και διαπίστωσαν ότι τα φυτά δεν επηρεάστηκαν από την καταπόνηση δίνοντας αυξημένη απόδοση κάτι που δείχνει ότι η κινόα θα πρέπει να ορίζεται ως μια καλλιέργεια ανθεκτική στην αλατότητα. Το ενδιαφέρον είναι ότι, οι χρωματογραφικές αναλύσεις έδειξαν ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας είχαν υψηλότερα επίπεδα σαπωνινών σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες.

Μια άλλη έρευνα που συσχέτισε τις σαπωνίνες με την ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας ήταν των Oku et al., 2003 όπου σε πειράματα αυξημένης αλατότητας στα είδη *K. candel* και *B. gymnorrhiza* έδειξαν ότι η ποσότητα των τριτερπενοειδών αυξήθηκε σημαντικά σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας τόσο στα φύλλα όσο και τις ρίζες. Αυξημένα επίπεδα παραγωγής σαπωνινών ως αποτέλεσμα έκθεσης σε αβιοτική καταπόνηση παρατήρησαν και οι Nasrollahi et al., (2014) στο πείραμα που διεξήγαγαν στο φυτό *Glycyrrhiza glabra* με μελέτη της επίδρασης της ξηρασίας στα επίπεδα σαπωνινών του φυτού και συσχέτιση τους με την αυξημένη αντοχή.

Μια κάπως διαφορετική προσέγγιση παρουσίασαν οι Eliasova et al., (2004) σε πείραμά τους για την διακύμανση της ποσότητας δευτερογενών μεταβολιτών κάτω από αβιοτικές συνθήκες στο είδος *Matricaria chamomilla*. Οι παραπάνω έδειξαν ότι μετά την εφαρμογή της καταπόνησης υπήρχαν κάποιοι μεταβολίτες που μειώθηκαν αλλά και κάποιοι διαφορετικοί μεταβολίτες που αυξήθηκαν μέχρι και 20 φορές παραπάνω σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες.

Αντίθετα με τα περισσότερα παραπάνω ευρήματα είναι οι G mez-Caravaca et al., (2012), όπου σε πείραμά τους με το είδος *Chenopodium quinoa* έδειξαν ότι οι σαπωνίνες μειώθηκαν σε δείγματα που εκτέθηκαν σε συνθήκες ξηρασίας και αλατότητας. Σε καταστάσεις έντονης υδατικής καταπόνησης, η περιεκτικότητα σε σαπωνίνες μειώθηκε κατά 45% και κατά 50% όταν προστέθηκε η καταπόνηση με αλατότητα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η υδατική καταπόνηση και η αυξημένη αλατότητα μπορούν να ρυθμίσουν την παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων στην quinoa, επηρεάζοντας τις θρεπτικές και βιομηχανικές τους τιμές. Οι ίδιοι επισημαίνουν ότι ναι μεν υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν τις αβιοτικές καταπονήσεις με αύξηση των μεταβολιτών, όπως των Dixon et al., (1995) και Wahid et al., (2006), αλλά υπάρχουν και μελέτες που συμφωνούν με τα δικά τους αποτελέσματα, όπως των Bourguou et

al., (2010), όπου η αυξημένη συγκέντρωση NaCl επηρεάζει αρνητικά το περιεχόμενο των δευτερογενών μεταβολιτών σε φυτά κινόα.

Εκτός από τις σαπωνίνες, βρέθηκε και μια άλλη ομάδα μορίων που παράχθηκαν, τα λιγάνια, τα οποία όμως παρουσιάστηκαν μόνο στα είδη *M.sativa* και το υβρίδιο. Σύμφωνα με τον Yazaki, (2005) τα λιγάνια αποτελούν φαινολικούς δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι συσχετίζονται με την επίδραση των φυτών με παθογόνα και με την προστασία των φυτών ενάντια στις αβιοτικές καταπονήσεις. Γενικά, δεν υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τα λιγάνια και η παρούσα μελέτη ενισχύει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη τους.

Καταλήγοντας για τα τρία είδη το *M. arborea* φαίνεται να παρουσιάζει διαφορετικό μεταβολομικό προφίλ σε σχέση με το *M.sativa* και το υβρίδιο τους. Εκτός από τις διαφορετικές σαπωνίνες που εκκρίνει το κάθε είδος είδαμε ότι σε μια περίπτωση που τα είδη *M.arborea* και *M.sativa* είχαν κοινή σαπωνίνη τότε στο πρώτο είδος ήταν σαφώς περισσότερες φορές αυξημένη σε σχέση με το δεύτερο είδος. Ακόμη, τα επίπεδα έκφρασης των σαπωνινών διατηρηθήκαν σταθερά και δεν διαφοροποιήθηκαν στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς για το είδος *M.arborea* ενώ από την άλλη υπήρξε ορατή διαφοροποίηση για το *M.sativa* με αύξηση, σε σχέση με τους μάρτυρες, της παρουσίας σαπωνινών στους χειρισμούς με προσθήκη NaCl ιδιαίτερα στον χειρισμό της σταδιακής συσσώρευσης NaCl. Το υβρίδιο *M.Alborea* δεν εμφάνισε αυξημένες ποσότητες σαπωνινών στα καταπονημένα φυτά σε σχέση με τους μάρτυρες, όμως παρουσίασε αυξημένη παραγωγή μιας άλλης ομάδας μορίων μαζί με το είδος *M.sativa*, τα λιγάνια. Από τα αποτελέσματά μας φαίνεται να προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι σαπωνίνες και τα λιγάνια ίσως δρουν συνεργιστικά στην ανταπόκριση και ανθεκτικότητα των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις (τουλάχιστον όσον αφορά το *M.sativa*). Τέλος, ενώ οι σαπωνίνες από μόνες τους φαίνεται να μπορούν να ενισχύσουν την ανθεκτικότητα των φυτών, δεν ισχύει το ίδιο για τα λιγάνια όπως είδαμε στην περίπτωση του υβριδίου και μόνο συνεργιστικά μπορούν να συμβάλλουν. Θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει περαιτέρω έρευνα και να διερευνηθούν συγκεκριμένα μονοπάτια από την αρχή μέχρι το τέλος τους, δηλαδή από τον γονότυπο μέχρι τον φαινότυπο, με μελέτη συγκεκριμένων γονιδίων που ελέγχουν μονοπάτια συγκεκριμένων μεταβολιτών, κάτω από συνθήκες βιοτικών ή αβιοτικών καταπονήσεων ή συνδυασμού τους.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

Γεννάδιος, Π.Γ. 1914. Λεξικόν Φυτολογικόν. Τυπογρ. Παρασκευά Λεώνη. Εν αθήναις. Σελ. 1-1448

Δαλιάνης Κ.,1993, Μηδική και τριφύλλια. Σελ 17-20, 110-120, 259-268

Κλημής, Αρ. Ν. 1958. Σημερινή διάρθρωσις – Κατευθύνσεις. Έκδοση Αγρ. Τράπεζα Ελλάδος. Τεύχος 102. σελ. 23-26

Κοντσιώτου Κ. Ελένη, 2005, Η μηδική. Καλλιέργεια και χρήση. Σελ. 19, 22-26, 98-103, 106-127

Παπαδόπουλος, Δ.Ν. 1957. Η μηδική. Υπ. Γεωργ. Δ/ση Γ. Εφαρμ. και Εκπαίδευσης. Αθήναι. Σελ. 1-52

Παπακάστα-Τασοπούλου Δέσποινα,2005, Ψυχανθή (Καρποδοτικά-Χορτοδοτικά). Σελ. 285-287

Σκληρός Δημήτριος. 2012. Μελέτη των μεταβολικών αποκρίσεων του ψυχανθούς *Lens culinaris* κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας. Σελ. 44-45

Ξένη Βιβλιογραφία

Agarwal PK, Jha B., 2010. Transcription factors in plants and ABA depended and independed abiotic stress signalling . *Biologia Plantarum* 54, 201- 212

Aisset Amel, Mehdadi Zoheir, 2015.Effect of Salinity and water Stress on the Germination of *Medicago arborea* L. Seeds

Akbar, M., and Yabuno, T. 1977. Breeding saline-resistant varieties of rice. IV. Inheritance of delayed type panicle sterility induced by salinity. *Jpn. J. Breeding* 27: 237–240.

Amtmann, A. and D. Sanders. 1999. Mechanisms of Na¹ uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* 29:75– 112.

Analia Llanes, Genoveva Devinar, Maria Virginia Luna. (2015) Role of abscisic acid in legumes under abiotic stress. *Research Gate And newly emergerd questions. Genes and Development* 24, 1695-1708

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

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

Apse MP, Sottosanto JB, Blumwald E. 2003. Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant Journal* 36: 229– 239.

Arbona Vicent, Matías Manzi, Carlos de Ollas and Aurelio G. mez-Cadenas, 2013, Metabolomics as a Tool to Investigate Abiotic Stress Tolerance in Plants, *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 4885-4911

Arbona, V., Argamasilla, R., and Gomez-Cadenas, A. (2010). Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress. *J Plant Physiol* 167, 1342– 1350.

- Arif A, Zafar Y, Arif M, Blumwald E (2012) Improved growth, drought tolerance, and ultrastructural evidence of increased turgidity in tobacco plants overexpressing Arabidopsis Vacuolar Pyrophosphatase (AVP1). *Mol Biotechnol* 54:379–392
- Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 17–42.
- Ashraf, M., and Akram, N. A. 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. *Biotechnol. Adv.* 27: 744–752.
- Ashraf, M., Athar, H.R., Harris, P.J.C., and Kwon, T.R. 2008. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Adv. Agron.* 97: 45–110.
- Australian Journal of Plant Physiology* 13: 75–91.
- Azhar, F. M., and McNeilly, T. 1988. The genetic basis for salt tolerance in *Sorghum bicolor* (L) Moench seedlings. *Plant Breeding* 101: 114–121.
- Barnes, D.K. 1972 . A system for visually classifying Alfalfa flower colour. U.S. Dept. Agr., Agr. Handbook. No. 424
- Barragan V, Leidi EO, Andres Z, Rubio L, De Luca A, Fernandez JA, Cubero B, Pardo JM. 2012. Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 1127–1142.
- Basyuni et al. 2012, salinity increases the triterpenoid content of a salt secretor and a non-salt secretor mangrove, *Aquatic Botany* 97 (2012) 17– 23
- Basyuni M. et al, 2012, Salt-dependent increase in triterpenoids is reversible upon transfer to fresh water in mangrove plants *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*, 0176-1617 Elsevier GmbH
- Bhandal I.S. & Malik C.P., 1988 Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *International Review of Cytology* 110, 205–254.
- Bhaskaran S, Savithramma DL (2011) Co-expression of *Pennisetum glaucum* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter and Arabidopsis H⁺ pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic tomato. *J Exp Bot* 62:5561–5570
- Blaha G., Stelzl U., Spahn C.M.T., Agrawal R.K., Frank J. & Nierhaus K.H. (2000) Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods in Enzymology* 317, 292–306.
- Blits, K. C., and Gallagher, J. L. 1990. Salinity tolerance of *Kosteletzkya virginica*. 2. root-growth, lipid-content, ion and water relations. *Plant Cell. Environ.* 13: 419–425.
- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* 1465:140–151
- Blumwald E. 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinions in Cell Biology* 12: 431–434.
- Bohnert, H.J., Gong, Q.Q., Li, P.H., and Ma, S.S. (2006). Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms—getting genomics going. *Curr Opin Plant Biol* 9, 180–188.
- BOLTON, J. L. 1962: "Alfalfa. Botany, cultivation and utilization." pp. 102. 103. Leonard Hill, London; Interscience Publishers. New York. 474 pp
- Bourgou, S.; Bettaieb, I.; Saidani, M.; Marzouk, B. Fatty acids, essential oil, and phenolics modifications of black cumin fruit under NaCl stress conditions. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 12399–12406.

Bowne Jairus, Antony Bacic¹, Mark Tester² and Ute Roessner¹, ABIOTIC STRESS AND METABOLOMICS,

Annual Plant Reviews Volume 43, Biology of Plant Metabolomics, First Edition.

Edited by Robert Hall. © 2011 Blackwell Publishing Ltd. Published 2011

Bray, E. A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E. (2000) in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, eds. Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD), pp. 1159–1175.

Campbell, C. R., and C. O. Plank. 1998. Preparation of plant tissue for laboratory analysis. In *Handbook of reference methods for plant analysis*, ed. Y. P. Kalra, 37–49. Boca Raton, FL.: CRC Press

Cao D, Hou WS, Liu W, Yao WW, Wu CX, Liu XB, Han TF (2011) Overexpression of TaNHX2 enhances salt tolerance of 'composite' and whole transgenic soybean plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 107:541–552

Cattivelli L, Rizza F, Badeck F-W, et al. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* 105: 1–14

Charu Lata and Manoj Prasad, (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 1-18

Cheng-Jiang Ruan, Jaime A. Teixeira da Silva, Susan Mopper, Pei Qin & Stanley Lutts. 2010. Halophyte Improvement for a Salinized World. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29:329–359

Chinnusamy Viswanathan,¹ Jianhua Zhu,² and Jian-Kang Zhu², salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance, *Genetic Engineering*, Volume 27, Edited by J. K. Setlow ©Springer Science+Business Media, Inc. 2006

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., and Zhu, J. K. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45: 437–448.

Cramer GR. 2002. Response of abscisic acid mutants of *Arabidopsis* to salinity. *Funct. Plant Biol.* 29:561–67

Cushman John C. Osmoregulation in Plants: Implications for Agriculture Author(s): Source: *American Zoologist*, 41(4):758-769. 2001

Cutler S, Rodriguez P, Finkelstein R, Abrams S (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* 61: 651–679.

Czempinski, K., N. Gaedeke, S. Zimmermann, and B. Mueller-Roeber. 1999. Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *J. Exp. Bot.* 50: 955–966.

Daram, P., S. Urcach, F. Gaymard, H. Sentenac, and I. Cherel. 1997. Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its c-terminal cytoplasmic domain. *EMBO J.* 16:3455–3463.

Davenport RJ, Muñoz-Mayor A, Jha D, Essah PA, Rus A, Tester M. 2007. The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 30: 497–507.

Dennis PP, Shimmin LC. 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(1):90-104.

Devinar G, Llanes A, Masciarelli O, Luna V (2013) Different relative humidity conditions combined with chloride and sulphate salinity treatments modify abscisic acid and salicylic acid levels in the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Plant Growth Regul* 70: 247–256.

- Dixon, R. A.; Paiva, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 1995, 7, 1085–1097.
- Edreva A., V. Velikova, T. Tsonev, S. Dagnon, A. Gürel, L. Aktaş, E. Gesheva, 2008, Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms, protection by secondary metabolites *Gen. Appl. Plant Physiol*, 2008, special issue, 34 (1-2), 67-78
- Eliasova Adriana, Miroslav Repcak, and Andrea Pastirova, 2004, Quantitative Changes of Secondary Metabolites of *Matricaria chamomilla* by Abiotic Stress, Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen
- Elumalai RP, Nagpal P, Reed JW (2002) A mutation in the arabidopsis KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *Plant Cell* 14:119–131
- Expression of CAP2, an APETALA2-Family Transcription Factor from Chickpea, Enhances Growth and Tolerance to Dehydration and Salt Stress in Transgenic Tobacco *Plant Physiol.* 142(1): 113–123.
- Farooq M, Wahid A., Kobayashi N. Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress : effects, mechanisms and management. *Agronomy of sustainable Development* 29, 185-212
- Fayçal Boughalleb, Mounir Denden, Bechir Ben Tiba (2008), Photosystem II photochemistry and physiological parameters of three fodder shrubs, *Nitraria retusa*, *Atriplex halimus* and *Medicago arborea* under salt stress. *Acta Physiol Plant* 31:463–476
- Fernandez-Garcia, N., Hernandez, M., Casado-Vela, J., Bru, R., Elortza, F., Hedden, P., et al. (2011). Changes to the proteome and targeted metabolites of xylem sap in *Brassica oleracea* in response to salt stress. *Plant Cell Environ* 34, 821–834.
- Fiehn, O. (2001) Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics* 2, 155–168.
- Fiehn, O. (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48, 155–171.
- Filippou Panagiota , C. Antoniou, T. Obata, K. Van Der Kelen, V. Harokopos, L. Kanetis, V. Aidinis, F. Van Breusegem, A. R Fernie and V. Fotopoulos, Kresoxim-methyl primes *Medicago truncatula* plants against abiotic stress factors via altered reactive oxygen and nitrogen species signalling leading to downstream transcriptional and metabolic readjustment, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 67, No. 5 pp. 1259–1274, 2016
- Flowers TJ, Dalmond D. 1992. Protein synthesis in halophytes: the influence of potassium, sodium and magnesium in vitro. *Plant Soil.* 146:153–61
- Flowers TJ, Yeo AR. 1986. Ion relations of plants under drought and salinity.
- Flowers, T. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307–319.
- Francisco Perez-Alfocea, Michel Edmond Ghanem, Aurelio Gómez-Cadenas, and Ian C. Dodd, Omics of Root-to-Shoot Signaling Under Salt Stress and Water Deficit, *OMICS A Journal of Integrative Biology* Volume 15, Number 12, 2011
- Gagneul, D., Ainouche, A., Duhaze, C., Lugan, R., Lahrer, F.R., and Bouchereau, A. (2007). A reassessment of the function of the so-called compatible solutes in the halophytic *Plumbaginaceae* *Limonium latifolium*. *Plant Physiol* 144, 1598–1611.
- Garcia Jesus de la Garma, Nieves Fernandez-Garcia, Enas Bardisi, Beatriz Pallol, Jose Salvador Asensio Rubio, Roque Bru and Enrique Olmos, New insights into plant salt acclimation: the roles of vesicle trafficking and reactive oxygen species signalling in mitochondria and the endomembrane system, *New Phytologist* (2015) 205: 216–239

- Gaxiola R.A., Rao R., Sherman A., Grisafi P., Alper S.L. & Fink G.R. (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNHX1 and AVP1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1480–1485.
- Gaxiola Roberto A., Jisheng Li, Soledad Undurraga, Lien M. Dang, Gethyn J. Allen, Seth L. Alper, and Gerald R. Fink Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H1-pump 2001
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L. and Fink, G.R. (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11444-11449.
- Genc Y, Mcdonald GK, Tester M (2007) Reassessment of tissue Na⁺ concentration as a criterion for salinity tolerance in bread wheat. *Plant Cell Environ* 30:1468–1498
- Ginzberg, I., Stein, H., Kapulnik, Y., Szabados, L., Strizhov N, Schell, J. Koncz C, and Zilberstein A., 1998b. Isolation and characterization of two different cDNA s of Δ -pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Mol. Biol.* 38 : 755-764
- Girdhar K., Pandey, John J. Grant, Yong Hwa Cheong, Beom Gi Kim, Legong Li, and Sheng Luan 2005. ABR1, an APETALA2-Domain Transcription Factor That Functions as a Repressor of ABA Response in *Arabidopsis* *Plant Physiol.* 139(3): 1185–1193.
- Girousse C, Bournoville R, Bonnemain JL. 1996 Water Deficit-Induced Changes in Concentrations in Proline and Some Other Amino Acids in the Phloem Sap of Alfalfa. *Plant Physiol.* 111(1):109-113.
- Glenn, E.P., Brown, J., and O'Leary, J.W. 1998. Irrigating crops with seawater. *Sci. Am.* 279: 56–61.
- Goicoechea M, Martin J, de Sequera P, Quiroga JA, Ortiz A, Carreño V, Caramelo C. 1998 Role of cytokines in the response to erythropoietin in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 54(4):1337-43.
- Golldack, D. & Dietz, K. J. (2001) *Plant Physiol.* 125, 1643–1654.
- Golldack, D., Su, H., Quigley, F., Kamasani, U.R., Munoz-Garay, C., Balderas, E., Popova, O.V., Bennett, J., Bohnert, H.J. and Pantoja, O. (2002) *Plant J.* 31, 529-542.
- Gomez J, Sanchez-Martinez D., Stiefel V., Rigau J., Puigdomenech P., Pages M. 1998. A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glucine-rich protein. *Nature* 334, 262-264
- Gomez J.M, J.A. Hernandez A. Jimenez, L.A. del Rio, and F. Sevilla. 1999. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplast and mitochondria to long term NaCl stress of pea plants. *Free Radic. Res.* 31: S11-S18
- Gomez-Caravaca Ana María, Giovanna Iafelice, Antonella Lavini, Cataldo Pulvento, Maria Fiorenza Caboni, and Emanuele Marconi, *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 4620–4627
- Gomez-Pando, L. R.; Alvarez-Castro, R.; Eguiluz-de la Barra, A. Effect of salt stress on Peruvian germoplasm of *Chenopodium quinoa* Willd: a promising crop. *J. Agric. Crop Sci.* 2010, 196, 391–396.
- Gong, Q., Li, P., Ma, S. et al. (2005) Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 44, 826–839.
- Goodacre, R. (2005) Metabolomics – the way forward. *Metabolomics* 1(1), 1–2.

- Gorham J, Bridges J, Dubcovsky J, Dvorak J, Hollington PA, Luo MC, Khan JA (1997) Genetic analysis and physiology of a trait for enhanced K⁺/Na⁺ discrimination in wheat. *New Phytol* 137:109–116
- Gorham, J., Bridges, J., Dubcovsky, J., Dvorak, J., Hollington, P. A., Luo, M.C. and Khan, J.A. (1997) *New Phytol.* 137, 109-116.
- Goyal Sham. S, Surinder K. Sharma, D. William Rains, 2003. Crop production in saline environments : global and integrative perspectives. Pg 1-67
- Greenway, H. 1972. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. *Plant Physiol.* 49: 256–259.
- Guan L.Q.M, J Zhao, and J.G. Scandalios . 2000. Cis- elements and trans-factors that regulate expression of maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress : H₂O₂ is the likely intermediary signalling molecule for the response. *Plant J* 22: 87-95
- Gupta, B. & Huang, B. R. Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int. J. Genomics* 2014, Article ID 701596, 18 pages, doi: 10.1155/2014/701596 (2014).
- Hajduch Eric, Gary J. Litherland, Harinder S. Hundal Protein kinase B (PKB/Akt) ^ a key regulator of glucose transport, 2001, Elsevier Science
- Halfter U, Ishitani M, Zhu JK. 2000. The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 3735–3740.
- Hamada A, Shono M, Xia T, Ohta M, Hayashi Y, Tanaka A, Hayakawa T. (2001) Isolation and characterization of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Mol Biol* 46: 35-42
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment* 21: 535–553
- Hartung W, Peuke AD, Davies WJ (1999). Abscisic acid – a hormonal long-distance stress signal in plants under drought and salt stress. In: Pessarakli M (ed.), *Handbook of Crop Stress*, 2nd edn. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 731–747.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu.Rev.PlantPhysiol.PlantMol.Biol.* 51:463–99
- Hernández JA, Ferrer MA, Jiménez A, Barcel AR, Sevilla F. 2001 Antioxidant systems and O₂(-)/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* 127(3):817-31.
- Hirsch, R. E., B. D. Lewis, E. P. Spalding, and M. R. Sussman. 1998. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280:918–921
- Horie T, Hauser F, Schroeder JI. 2009. HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in Plant Science* 14: 660–668.
- Hubbard KE., Nishimura N., Hitomi K., Getzoff ED, Schroeder JI.2010. Early abscisic acid signal transduction mechanisms : newly discovered components
- Hummel I, Pantin F, Sulpice R, et al. 2010. Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology* 154: 357–372.
- Hussain SS, Kayani MA, Amjad M. 2011. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought tolerance in plants. *American Institute of Chemical Engineers* DOI: 10.1002/btpr.514.

- Ishitani M, Liu J, Halfter U, Kim CS, Shi W, Zhu JK. 2000. SOS3 function in plant salt tolerance requires a myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* 12:1667–1677.
- Jenks Mathew A., Paul M. Hasegawa, S. Mohan Jain (2007) *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Pp. 1-32, 795-805
- Jha d., n. Shirley, m. Tester & s. j. roy. (2010) Variation in salinity tolerance and shoot sodium accumulation in *Arabidopsis* ecotypes linked to differences in the natural expression levels of transporters involved in sodium transport. *Plant, Cell and Environment* 33, 793–804
- Jin-Lin Zhang & Timothy J. Flowers & Suo-Min Wang. 2009. Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. *Plant Soil* 326:45–60
- K. R. Allakhverdiev, Sh. G. Gasymov, A. Ismailov, Z. Yu. Salaeva, F. A. Mikailov. 1999. The Influence of Hydrostatic Pressure on the Electrical Conductivity and Hall Effect of CuInTe_2 Crystals. *Basic solid state physics*. Volume 211, Pages 571–575
- Karami M., F. Rafieia, B. Shiran, and M. Khodambashi, 2015, Comparative Response of Annual *Medicago* spp. to Salinity. *Russian Journal of Plant Physiology* Vol. 62, No. 5, pp. 617–624
- Kazuko Yamaguchi-Shinozaki and Kazuo Shinozaki. 2009. DREB Regulons in Abiotic-Stress-Responsive Gene Expression in Plants. *Molecular Breeding of Forage and Turf*,
- Kim, J.K., Bamba, T., Harada, K. et al. (2007) Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis* thaliana cell cultures after salt stress treatment. *Journal of Experimental Botany* 58(3), 415–424.
- Krasensky Julia and Claudia Jonak. 2011. Drought, salt and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. of Exp. Botany* 1-16
- Kronzucker HJ, Szczerba MW, Moazami-Goudarzi M, Britto DT (2006) The cytosolic $\text{Na}^+:\text{K}^+$ ratio does not explain salinity-induced growth impairment in barley: a dual tracer study using $^{42}\text{K}^+$ and $^{24}\text{Na}^+$. *Plant Cell Environ* 29:2228–2237
- Lauchli A., E. Epstein. 1990– Plant response to saline and sodic conditions. – In : *Agricultural salinity assessment and management*. – ASCE manuals and reports on engineering Practice No 71, pp 110-137.
- Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J.M., Heard, P.J., Brown, S.J. and Leigh, R.A. (2002) *Plant J.* 32, 139-149.
- Leidi EO, Barragan V, Rubio L, El-Hamdaoui A, Ruiz MT, Cubero B, Fernandez JA, Bressan RA, Hasegawa PM, Quintero FJ et al. 2010. The *AtNHX1* exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant Journal* 61: 495–506.
- Leidi EO, Barragan V, Rubio L, El-Hamdaoui A, Ruiz T, Cubero B, Fernández JA, Bressan RA, Hasegawa PM, Quintero FJ, Pardo JM (2010) The *AtNHX1* exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J* 61:495–506
- Leigh, R. A. (1997) in *The Plant Vacuole*, eds. Leigh, R. A. & Sanders, D. (Academic, San Diego), Vol. 25, pp. 171–194.
- Levitt J., 1980. Responses of plants to environmental stresses. New York: Academic Press
- Liang Liu, Xiu-Duo Fan, Fa-Wei Wang, Nan Wang, Yuan-Yuan Dong, Xio-Ming Liu, Jing Yang, Yan-Fang Wang, Hai-Yan Li. 2013. Coexpression of *ScNHX1* and *ScVP* in transgenic hybrids improves salt and saline-alkali tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Plant Growth Regul* 32: 1-8

- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 1998. 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*. *The Plant Cell* 10, 391–406.
- Liu, M., Wang, T.-Z. & Zhang, W.-H. Sodium extrusion associated with enhanced expression of SOS1 underlies different salt tolerance between *Medicago falcata* and *Medicago truncatula* seedlings. *Env. Exp. Bot.* 110, 46–55, doi: 10.1016/j. envexpbot.2014.09.005 (2015).
- Luttge, U. & Ratajczak, R. (1997) in *The Plant Vacuole*, eds. Leigh, R. A. & Sanders, D. (Academic, San Diego), Vol. 25, pp. 253–296.
- Lutts, S., Almansouri, M., and Kinet, J. M. 2004. Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. *Plant Sci.* 167: 9–18.
- Lutts, S., Kinet, J. M., and Bouharmont, J. 1995. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *J. Exp. Bot.* 46: 1843–1852.
- Lutts, S., Kinet, J. M., and Bouharmont, J. 1996a. Ethylene production by leaves of rice (*Oryza sativa* L.) in relation to salinity tolerance and exogenous putrescine application. *Plant Sci.* 116: 15–25
- Lutts, S. 2000. Exogenous glycine betaine reduces sodium accumulation in salt stressed rice plants. *Int. Rice Res. Notes* 25: 39–40.
- Measer P, Eckelman B, Vaidyanathan R, Horie T, Fairbairn DJ, Kubo M, Yamagami M, Yamaguchi K, Nishimura M, Uozumi N et al. 2002. Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Letters* 531: 157–161.
- Ma DM, Xu WR, Li HW, Jin FX, Guo LN, Wang J, Da HJ, Xu X. 2014. Coexpression of the *Arabidopsis* SOS genes enhances salt tolerance in transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Protoplasma* 251: 219–231.
- Maas EV, Hoffman GJ (1977) Crop salt tolerance current assessment. *J Irrig Drainage Div ASCE* 103:115–134
- Maathuis F., Amtmann A. (1999) K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Ann Bot* 84, 123-133
- Maeshima, M. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 37–51.
- Mahajan Shilpi, Tuteja Narendra, 2005. Cold, salinity and drought stress : An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444 139–158
- María Pilar Rodríguez-Rosales, Xingyu Jiang, Francisco Javier Gálvez, María Nieves Aranda, Beatriz Cubero and Kees Venema, Overexpression of the Tomato K⁺/H⁺ Antiporter LeNHX2 Confers Salt Tolerance by Improving Potassium Compartmentalization, *New Phytologist*, 2014
- Martinez-Andujar, C. (2006). Análisis funcional de una asparagina sintetasa dependiente de amonio en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivado en condiciones de salinidad y diferente nutrición nitrogenada. PhD Thesis. Universidad de Murcia.
- Maser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJM, Sanders D, Harper JF, Tchiew J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA,

- Guerinot ML (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126:1646–1667
- McNeil, S. D., Nuccio, M. L. & Hanson, A. D. (1999) *Plant Physiol*. 120, 945–949.
- Mokhtar Rejili, Dalel Telahigue, Belgacem Lachiheb, Abdessalem Mrabet, Ali Ferchichi. (2008) Impact of gamma radiation and salinity on growth and K⁺/Na⁺ balance in two populations of *Medicago sativa* (L.) cultivar Gabes. *Progress in Natural Science* 18 1095–1105
- Møller IS, Gilliam M, Jha D, Mayo GM, Roy SJ, Coates JC, Haseloff J, Tester M. 2009. Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 217: 2163–2178.
- Munns R, James RA, L'ouchli A. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57:1025–43
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Ann Rev Plant Biol* 59:651–681
- Munns R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils : some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* 16, 15-24.
- Munns R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plan Cell Environ.* 25, 239-250.
- Munns, R. & Tester, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651–681, doi: 10.1146/annurev. arplant.59.032607.092911 (2008).
- Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167: 645–663.
- Naidoo G., and Rughunanan R. 1990. Salt tolerance in the succulent, coastal halophyte, *Sarcocornia natalensis*. *J. Exp. Bot.* 41: 497–502.
- Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, et al. (2000) Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol Biol* 42: 657–665.
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* 56: 165–185
- Nasrolahhi et al., 2014, The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*), *Phytochemistry* 103 32-37
- Oku Hirosuke, Shigeyuki Baba, Hiroya Koga, Kensaku Takara, Hironori Iwasaki, 2003, Lipid composition of mangrove and its relevance to salt tolerance, *J Plant Res* (2003) 116:37–45
- Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B. et al. (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology* 16, 373–378.
- Pardo JM., Cubero B, Leidi EO, Quintero FJ, (2006) Alkali cation exchangers : roles in cellular homeostasis and stress tolerance . *J Exp Bot* 57: 1181-1199
- Pasapula V, Shen G, Kuppu S, Paez-Valencia J, Mendoza M, Hou P et al (2011) Expression of an *Arabidopsis* vacuolar H⁺ pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fiber yield in the field conditions. *Plant Biotechnol* 9:88–99
- Perez-Alfocea, F., Balibrea, M.E., Alarcon, J.J., and Bolarrn, M.C. (2000). Composition of phloem and xylem exudates in relation to the salt-tolerance of domestic and wild tomato species. *J Plant Physiol* 156, 367–374.

- Pei Z.M, Y. Murata, G. Benning, S. Thomine, B. Klusener, G.J. Allen, E. Grill, and J.I. Schroeder. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature* 406: 731-734
- Platten DJ, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bohnert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, Horie T, Leigh RA, Lin H-X, Luan S et al. 2006. Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Science* 11: 372–374.
- Poljakoff-Mayber, A., Somers, G. F., Werker, E., and Gallagher, J. 1994. Seeds of *Kosteletzkya virginica* (Malvaceae): Their structure, germination, and salt tolerance. II germination and salt tolerance. *Am. J. Bot.* 81: 54–59.
- Pospisilova J., Synkova H., Haisel D., Batkova P., 2009. Effect of abscisic acid on photosynthetic parameters during ex vitro transfer of micropropagated tobacco plantlets. *Biologia Plantarum* 53, 11-20
- Pulvento C., M. Riccardi¹, A. Lavini¹, G. Iafelice², E. Marconi² & R. d'Andria¹, Yield and Quality Characteristics of Quinoa Grown in Open Field Under Different Saline and Non-Saline Irrigation Regimes, *J. Agronomy & Crop Science* (2012) ISSN 0931-2250
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S. & Zhu, J.-K. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8436–8441, doi: 10.1073/pnas.122224699 (2002).
- Radin, W.J. (1983) in *Limitations to Efficient Water Use in Crop Production*, eds. Taylor, H. M., Jordan, W. R. & Sinclair, T. R. (ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI), pp. 267–276.
- Rakesh K. Shukla, Sumita Raha, Vineeta Tripathi, and Debasis Chattopadhyay. 2006.
- Rana Munns. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167 : 645–663
- Rana Munns¹ and Mark Tester². 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:651–81
- Rasmussen Susanne, Anthony J. Parsons² and Christopher S. Jones, Metabolomics of forage plants: a review, *Annals of Botany* Page 1 of 10, 2012
- Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX. 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics* 37: 1141–1146.
- Roy SJ, Tucker EJ, Tester M. 2011. Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 232–239
- Ruan, C.J., and Teixeira da Silva, J.A. (2010). Metabolomics: creating new potentials for unraveling the mechanisms in response to salt and drought stress and for the biotechnological improvement of xero-halophytes. *Crit Rev Biotechnol* X, 1–17
- Rubio F, Gassmann W, Schroeder JI (1995) Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* 270:1660–1663
- Ruili LI¹, Fuchen SHI, Kenji FUKUDA and Yongli YANG (2010), Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Soil Science and Plant Nutrition* 56, 725–733
- Rus A, Lee BH, Mu~noz-Mayor A, Sharkhuu A, Miura K, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM. 2004. AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant Physiology* 136: 2500–2511.

- Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM. 2001. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 14150–14155.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006b) Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in
- Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet JG., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki k., 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 998-1009
- Salekdeh GH, Reynolds M, Bennett J, Boyer J. 2009. sConceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends in Plant Science* 14: 488–496
- Sanchez DH, Pieckenstein FL, Escaray F, et al. 2011. Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and glycophytic Lotus species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis. *Plant, Cell & Environment* 34: 605–617.
- Sanchez DH, Schwabe F, Erban A, Udvardi MK, Kopka J. 2012. Comparative metabolomics of drought acclimation in model and forage legumes. *Plant, Cell & Environment* 35: 136–149
- Sandhu Devinder, Monica V. Cornacchione, Jorge F. S. Ferreira & Donald L. Suarez Variable salinity responses of 12 alfalfa genotypes and comparative expression analyses of saltresponse genes , *Scientific RepoRts* | 7:42958 | DOI: 10.1038/srep42958, 2017
- Sarafian, V., Kim, Y., Poole, R. J. & Rea, P. A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1775–1779.
- Satpal Turan, Katrina Cornish and Shashi Kumar. (2012) Salinity tolerance in plants: Breeding and genetic engineering . *AJCS* 6(9):1337-1348
- Schachtman D, Liu W. 1999. Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends in Plant Science* 4: 281–287.
- Schachtman DP, Tyerman SD, Terry BR (1991) The K⁺/Na⁺ selectivity of a cation channel in the plasma membrane of root cells does not differ in salt-tolerant and salt-sensitive wheat species. *Plant Physiol* 97:598–605
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK. 2000. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 6896–6901.
- Shi, H., Lee, B. H., Wu, S. J. & Zhu, J. K. Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nat. Biotechnol.* 21, 81–85, doi: 10.1038/nbt766 (2003).
- Shi H., Quintero, F. J., Pardo, J. M. & Zhu, J.-K. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* 14, 465–477, doi: 10.1105/tpc.010371 (2002).
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3: 217–223
- Shiv S. Verma & Rakesh Sinha & M. H. Rahman & Swati Megha & Michael K. Deyholos & Nat N. V. Kav Springer Science+Business Media New York 2014
- Sibole JV, Cabot C, Poschenrieder C, Barcelo AJ (2003). Efficient leaf ion partitioning, an overriding condition for abscisic acid-controlled stomatal and leaf growth responses to NaCl salinization in two legumes. *J Exp Bot* 54: 2111–2119.

- Spalding, E. P., R. E. Hirsch, D. R. Lewis, Q. Zhi, M. R. Sussman, and B. D. Lewis. 1999. Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity. Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *J. Gen. Physiol.* 113: 909–918.
- Stavarek S.J., Rains D.W., 1985. Effect of salinity on growth and maintenance costs of plant cells. *Cellular and molecular Biology of Plant stress* . 129-143
- Subbarao, G. V., Johansen, C., Kumar Rao, J. V. D. K., and Jana, M. K. 1990. Salinity tolerance in F1 hybrids of pigeonpea and a tolerant wild relative. *Crop Sci.* 30: 785–788.
- Suh Christopher.2011. Evaluation of bioactivity of phytotoxins from pathogenic fungi of *Orobanche* sp. Ph.D. Thesis. pp 88
- Sunarpixxx, Horie T, Motoda J, Kubo M, Yang H, Yoda K, Horie R, Chan WY, LeungHY, Hattori Ketal.2005.Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem parenchyma cells. *Plant Journal* 44: 928–938.
- Szaliel, A.; Paczkowski, S.; Henry, M. Influence of environmental biotic factors on the content of saponins plants. *Phytochem Rev.* 2010, 10, 493–502.
- Tal, M., and Shannon, M. C. 1983. Salt tolerance in two wild relatives of the cultivated tomato: Responses of *Lycopersicon esculentum*, *L. cheesmani*, *L. peruvianum*, *Solanum pennelli*, and F1 hybrids of high salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 10: 109–117.
- Tester M, Davenport R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503–527.
- Thaler SJ, Bostock RM (2004) Interactions between abscisic acid mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology* 85: 48–58
- Trinchant JC, Boscari A, Spennato G, Van de Sype G, Le Rudulier D. 2004. Proline betaine accumulation and metabolism in alfalfa plants under sodium chloride stress. Exploring its compartmentalization in nodules. *Plant Physiol.*;135(3):1583-94
- Urbach, S., I. Cherel, H. Sentenac, and F. Gaymard. 2000. Biochemical characterization of the *Arabidopsis* K1 channels KAT1 and AKT1 expressed or co-expressed in insect cells. *Plant J.* 23:527–538.
- Verslues PE, Bray EA., 2006. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential induced ABA and proline accumulation. *Journal of Experimental Botany* 57,201-212
- Verslues PE, Zhu JK (2007) New developments in abscisic acid perception and metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 10: 447–452.
- Wahid, A.; Ghazanfar, A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *J. Plant Physiol.* 2006, 163, 723–730.
- Wang CM, Zhang JL, Liu XS, Li Z, Wu GQ, Cai JY, Wang SM (2009) *Puccinellia tenuiflora* maintains a low Na⁺ level under salinity by limiting unidirectional Na⁺ influx resulting in a high selectivity for K⁺ over Na⁺. *Plant Cell Environ* 32:486–496
- Wang SM, Wan CG, Wang YR, Chen H, Zhou ZY, Fu H, Sosebee RE (2004a) The characteristics of Na⁺, K⁺ and free proline distribution in several drought-resistant plants of the Alxa Desert, China. *J Arid Environ* 56:525–539
- Widodo, Patterson, J. H., Newbigin, E., Tester, M., Bacic, A., and Roessner, U. 2009. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *J. Exp. Bot.* 60: 4089–4103.

- Xiong L, Zhu JK (2002) Salt tolerance. In: Somerville CR, Meyerowitz EM (eds) *The arabidopsis book*. The American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 1–22
- Xu YY, Zhou Y, Hong S, Xia ZH, Cui DQ, Guo JC, Xu HX, Jiang XY (2013) Functional characterization of a wheat NHX antiporter gene TaNHX2 that encodes a K⁺/H⁺ exchanger. *PLoS ONE* 8:e78098. doi:10.1371/journal.pone.0078098
- Yang Q, Chen ZZ, Zhou XF, Yin HB, Li X, Xin XF, Hong XH, Zhu JK, Gong Z. 2009. Overexpression of SOS (SaltOverlySensitive) genes increases salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Molecular Plant* 2: 22–31.
- Yang Q, Wu M, Wang P, Kang J, Zhou X (2005) Cloning and expression analysis of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene from alfalfa. *DNA Sequence* 16: 352–357
- Yang H, Knapp J, Koirala P, Rajagopal D, Peer WA, Silbart LK, Murphy A, Gladiola RA (2007) Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. *Plant Biotechnol J* 5:735–745
- Yan-Min Zhang, Hong-Mei Zhang, Zi-Hui Liu, Hui-Cong Li, Xiu-Lin Guo, Guo-Liang Li, (2014). The wheat NHX antiporter gene TaNHX2 confers salt tolerance in transgenic alfalfa by increasing the retention capacity of intracellular potassium. *Plant Mol Biol* 87: 317–327
- Yazaki Kazufumi (2005) ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites, *FEBS letters* 580 (2006) 1183–1191
- Yeo, A. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49: 915–129.
- Yongqing Yang and Yan Guo Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses, *Tansley review*, 2017,
- Yu JN, Huang J, Wang ZN, Zhang JS, Chen SY (2007) An Na⁺/H⁺ antiporter gene from wheat plays an important role in stress tolerance. *J Biosci* 32:1153–1161
- Zahrán Hamdi H.,†, M. Carmen Mari ´n-Manzanob, A. Juan Sa ´nchez-Rayac, Eulogio J. Bedmara, Kees Venemab and M. Pilar Rodr ´iguez-Rosalesb, (2007) Effect of salt stress on the expression of NHX-type ion transporters in *Medicago intertexta* and *Melilotus indicus* plants, *Physiologia Plantarum* 131: 122–130.
- Zhang HX, Blumwald E (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol* 19: 765–768
- Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E (2001) Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12832–12836
- Zhang Yan-Min · Hong-Mei Zhang · Zi-Hui Liu · Hui-Cong Li · Xiu-Lin Guo · Guo-Liang Li, *The wheat NHX antiporter gene TaNHX2 confers salt tolerance in transgenic alfalfa by increasing the retention capacity of intracellular potassium*, Springer Science+Business Media Dordrecht 2014
- Zhang YM, Liu ZH, Wen ZY, Zhang HM, Yang F, Guo XL (2012) The vacuolar Na⁺/H⁺ antiport gene TaNHX2 confers salt tolerance to transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Funct Plant Biol* 39:708–716
- Zhang, H. X. & Blumwald, E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotechnol.* 19, 765–768, doi: 10.1038/90824 (2001).
- Zhang, J., Li, X., Jiang, G., Xu, Y., and He, Y. 2006. Pyramiding of Xa7 and Xa21 for the improvement of disease resistance to bacterial blight in hybrid rice. *Plant Breeding* 125: 600–605.

Zhao Y, Wang T, Zhang W, Li X. 2011. SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in Arabidopsis. *New Phytologist* 189: 1122–1134.

Zhen, R. G., Kim, E. J. & Rea, P. A. (1997) in *The Plant Vacuole* (Academic, San Diego), Vol. 25, pp. 298–337.

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 53: 247–273.

Zuther, E., Koehl, K., and Kopka. (2007). Comparative metabolome analysis of the salt response in breeding cultivars of rice. In *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerance Crops*. M.A. Jenks, P.M. Hasegawa, and S.M. Jain, eds. (Springer-Verlag, Berlin), pp. 285–315