



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Επιστημών των Φυτών

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Βελτίωσης φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

« ΜΕΛΕΤΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΟ
GLYPHOSATE»

Στα πλαίσια του προγράμματος: «Herbicide resistant *Lolium spp.* in
climatically and agronomically diverse European countries: from
developing quick and reliable detection tools to devising sustainable
control strategies (RELIUM)»



ΜΑΡΙΑ Β. ΓΕΡΑΚΑΡΗ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΛΕΝΗ ΤΑΝΗ



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΟ
GLYPHOSATE»**

**«INVESTIGATION OF THE MECHANISMS OF RESISTANCE TO THE HERBICIDE
GLYPHOSATE»**

**Στα πλαίσια του προγράμματος: «Herbicide resistant *Lolium spp.* in
climatically and agronomically diverse European countries: from
developing quick and reliable detection tools to devising sustainable
control strategies (RELIUM)»**

Εξεταστική Επιτροπή

Τάνη Ελένη- Λέκτορας, ως Επιβλέπουσα

Μπεμπέλη Πηνελόπη- Καθηγήτρια, ως Μέλος

Τραυλός Ηλίας- Επίκουρος, ως Μέλος

ΜΑΡΙΑ Β. ΓΕΡΑΚΑΡΗ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λεπτή ήρα (*Lolium rigidum* Gaud.) είναι ένα ετήσιο χειμερινό ζιζάνιο, ιδιαίτερα επιβλαβές κυρίως για τις καλλιέργειες των χειμερινών σιτηρών και δευτερευόντως για άλλες χειμερινές, πρώιμες ανοιξιάτικες και πολυετείς καλλιέργειες. Το ζιζάνιο συναντάται σε όλο σχεδόν τον κόσμο, ενώ και στην Ελλάδα η συχνότητά του είναι ιδιαίτερα υψηλή. Η αποτελεσματική αντιμετώπιση της λεπτής ήρας αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τους καλλιεργητές σιτηρών, διότι το ζιζάνιο έχει αναπτύξει σε κάποιες περιοχές ανθεκτικότητα έναντι ορισμένων ευρέως χρησιμοποιούμενων ζιζανιοκτόνων.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση μηχανισμών ανθεκτικότητας της λεπτής ήρας (*L. rigidum* Gaud.) έναντι του ζιζανιοκτόνου glyphosate.

Ακολουθήθηκαν μοριακές τεχνικές απομόνωσης του γενετικού υλικού και αλληλούχιση του γονιδιώματος των υπό μελέτη βιοτύπων ήρας για το γονίδιο αναστολέα 5-ενολο πυροσταφυλικού φωσφο-σικού οξέος συνθετάσης (EPSPS) με σκοπό να διερευνηθεί η ύπαρξη ή μη στοχευμένης ανθεκτικότητας στο *L. rigidum*, καθώς επίσης και η ποσοτικοποίηση της έκφρασης τεσσάρων γονιδίων- μεταφορέων (*ABC transporters*). Τα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν πως οι μηχανισμοί ανάπτυξης της ανθεκτικότητας στο ζιζάνιο *L. rigidum* έναντι στο ζιζανιοκτόνο glyphosate δεν οφείλονται σε στοχευμένη ανθεκτικότητα, αντίθετα κατά τη διερεύνηση των μηχανισμών της μη στοχευμένης ανθεκτικότητας μελετήθηκε ένα γονίδιο-μεταφορέας το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για το διαχωρισμό ανθεκτικών και ευαίσθητων βιοτύπων *L. rigidum*.

Τέλος προτείνεται περαιτέρω διερεύνηση περισσότερων γονιδίων μεταφορέων έτσι ώστε να μπορέσει να εξαχθεί με ασφάλεια το συμπέρασμα πως η ανάπτυξη ανθεκτικότητας του *L. rigidum* έναντι στο ζιζανιοκτόνο glyphosate οφείλεται με μηχανισμούς μη στοχευμένης ανθεκτικότητας.

Λέξεις κλειδιά: μηχανισμοί ανθεκτικότητας, *Lolium rigidum*, *ABC-μεταφορείς*, στοχευμένη ανθεκτικότητα, μη-στοχευμένη ανθεκτικότητα, γλυφοσάτη

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE MECHANISMS OF RESISTANCE TO THE HERBICIDE GLYPHOSATE

Rigid ryegrass or annual ryegrass (*L. rigidum* Gaud.) is an annual, winter, grassy weed which causes severe problems mainly in winter cereal crops and, to a lesser extent, in other winter and early spring crops. Rigid ryegrass is nowadays present in almost every country in the world and it is also met in high frequency in Greece. The effective control of this weed is a matter of great importance to the cereal crop farmers because it has developed several mechanisms of resistance towards the most commonly used herbicides worldwide.

The purpose of the present study is to investigate the mechanisms of resistance of ryegrass (*L. rigidum* Gaud.) to the herbicide glyphosate.

Molecular techniques were used, for isolating genetic material and sequencing the genome of the ryegrass biotypes for the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (*EPSPS*) inhibitor gene, to investigate the presence of target or non-targeting site resistance to *L. rigidum*, as well as for studying the relative expression ratio of four genes (*ABC transporters*). The conclusions of the present work indicate that the mechanisms of the developed resistance to *L. rigidum* against glyphosate are not due to targeted-site resistance, but on the contrary to non-targeted site resistance, and could be utilized for the identification of resistant and susceptible *L. rigidum* biotypes.

To sum up, further investigation of more genes belonging to *ABC-transporter* gene family s suggested so that it can be safely concluded that the development of resistance of *L. rigidum* to herbicide glyphosate is due to mechanisms of non-targeted-site resistance.

Key words: resistance mechanisms, *Lolium rigidum*, *ABC-transporters*, target site resistance, non-target site resistance, Glyphosate

ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη, Γερακάρη Μαρία δηλώνω ότι το κείμενο της μελέτης αποτελεί δικό μου, μη υποβοηθούμενο πόνημα. Υποβάλλεται σε μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην «Καινοτόμες Εφαρμογές στην Αειφορική Γεωργία, στη Βελτίωση Φυτών και στην Αγρομετεωρολογία» του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Δεν έχει υποβληθεί ποτέ πριν για οιοδήποτε λόγο ή για εξέταση σε οποιοδήποτε άλλο πανεπιστήμιο ή εκπαιδευτικό ίδρυμα της χώρας ή του εξωτερικού.

Γερακάρη Μαρία

5/05/2020

.....
(ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ)

.....
(ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ) (Ημέρα,μήνας, έτος)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, Τάνη Ελένη που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί της, αρχικά επιβλέποντας την πτυχιακή μου μελέτη, ως προπτυχιακή φοιτήτρια και συνέχισε να με εμπιστεύεται και να με τιμά, επιβλέποντας και την μεταπτυχιακή μου διατριβή. Με την πολύτιμη βοήθειά της και το χαμόγελο, που ποτέ δεν έχασε, μου μετέδωσε πολύτιμες γνώσεις, με έκανε να αγαπήσω την έρευνα και το Πανεπιστήμιο και με ενέπνευσε με το να θέλω να εξελίξω περαιτέρω τις ακαδημαϊκές μου σπουδές και σε διδακτορικό επίπεδο. Η κυρία Τάνη με την μεγάλη προθυμία, τις γνώσεις και την εμπειρία που την διακατέχουν, μου δίδαξε πάνω απ' όλα τις ηθικές αξίες και την αξιοπρέπεια που οφείλει να διέπει έναν ερευνητή. Μου μεταλαμπάδευσε επίσης τον τρόπο σκέψης, την γνώση και την αγάπη της για αυτή την δουλειά και της οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ για όλα αυτά.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια και διευθύντρια του εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού του ΓΠΑ, κυρία Μπεμπέλη Πηνελόπη, για την υποστηρικτική της στάση, την κατανόηση και την προθυμία της να βοηθήσει σε οποιοδήποτε θέμα της ζητούνταν, καθώς επίσης και για το ότι δέχθηκε να συμμετέχει στην εξεταστική επιτροπή της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή του Εργαστηρίου Γεωργίας του ΓΠΑ και πρόεδρο της Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρίας (ΕΖΕ), κύριο Τραυλό Ηλία, κατά την προεδρία του οποίου τιμήθηκα, κατόπιν αξιολόγησης, από την ΕΖΕ με υποτροφία η οποία με βοήθησε αμέριστα στο να καταφέρω να εκπονήσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές έγκαιρα και με επιτυχία. Τον ευχαριστώ επίσης και για το γεγονός ότι δέχτηκε να συμμετέχει στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης θα ήθελα να απευθύνω στον Δρ. Χάχαλη Δημοσθένη, ερευνητή Α' του εργαστηρίου Ζιζανιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ

μαζί του και να εξοικειωθώ με την επιστήμη των ζιζανίων, κάνοντάς με να ανακαλύψω το ενδιαφέρον και την σημαντικότητα που ενέχουν ως τομέας της γεωπονικής επιστήμης.

Για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης βοήθησαν και τους ευχαριστώ πολύ, ο καθηγητής κύριος Παπαδόπουλος Γεώργιος, ο οποίος υπήρξε πάντα πρόθυμος και υποστηρικτικός με απορίες που του έθετα για τα διάφορα θέματα στατιστικής ανάλυσης που προέκυπταν, η κυρία Γκούφα Μαρία, προσωπικό του εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού του ΓΠΑ, η οποία δεν μου αρνήθηκε ποτέ την βοήθειά της για οποιοδήποτε θέμα προέκυψε κατά την διάρκεια της απασχόλησής μου στο εργαστήριο και τέλος, η γεωπόνος και φίλη Σαρρή Ευφροσύνη, η οποία μου επέδειξε όλες τις μεθόδους με τις οποίες ασχολήθηκα στην παρούσα εργασία.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στον Μπίμπιζα Νίκο για την υπομονή, την συμπαράσταση και την στήριξη που μου έδειξαν όλα αυτά τα επτά χρόνια, από την πρώτη μου μέρα στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ως προπτυχιακή φοιτήτρια, μέχρι και σήμερα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	i
ABSTRACT	ii
ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ.....	iii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	iv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	ix
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Τι ονομάζουμε «ζιζάνια» και τι ζημιές προκαλούν.....	1
1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον ανταγωνισμό ζιζανίων και καλλιεργούμενων φυτών.....	2
1.3 Το ζιζάνιο <i>L. rigidum</i> Gaud.	3
1.3.1 Η κατανομή του <i>L. rigidum</i> Gaud σε παγκόσμιο επίπεδο.....	4
1.3.2 Εισαγωγή και διάδοση.....	8
1.3.3 Βιολογία και Οικολογία.....	8
1.3.3.1 Γενετική.....	8
1.3.3.2 Φυσιολογία και φαινολογία.....	9
1.4 Πρόληψη και έλεγχος ζιζανίων.....	10
1.5 Ανθεκτικότητα των ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα.....	14
1.5.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας.....	16
1.6 Χρήσεις του glyphosate.....	18
1.6.1 Μηχανισμός δράσης του glyphosate.....	19
1.6.2 Ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (ένζυμο EPSPS).....	20
1.6.3 Βασικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στο glyphosate	21
1.6.3.1 Στοχευμένη ανθεκτικότητα (Target-site-resistance)	21
1.6.3.1.1 Μεταλλάξεις στο ένζυμο EPSPS.....	22

1.6.3.1.2 Υπερσυσσώρευση (πολλαπλά αντίγραφα) του γονιδίου που κωδικοποιεί το <i>EPSPS</i>	22
1.6.3.2 Μη-στοχευμένη ανθεκτικότητα (Non-Target site resistance).....	23
1.6.3.2.1 Μεταφορά και απομόνωση του glyphosate στο χυμοτόπιο.....	23
1.6.4 Αναδρομή στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας της ήρας στο glyphosate.....	24
1.7 Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
2.1 Σχεδιασμός και εγκατάσταση πειράματος.....	26
2.2 Η απομόνωση του RNA.....	27
2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του RNA	29
2.4 Καθαρισμός απομονωμένων RNA δειγμάτων.....	31
2.5 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης για τη δημιουργία cDNA.....	32
2.6 Επιλογή των εκκινητών για αλληλούχιση.....	34
2.7 Προετοιμασία και εκτέλεση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).....	35
2.8 Έλεγχος τελικού προϊόντος	36
2.9 Επιλογή γονιδίων για την Real Time PCR.....	36
2.9.1. Σχεδιασμός των εκκινητών.....	38
2.9.2 Παρασκευή των διαλυμάτων των εκκινητών.....	40
2.9.3 Παρασκευή των stock solutions (διαλύματα stock) των εκκινητών.....	40
2.10 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων.....	40
2.11 Το πρόγραμμα της Real-Time.....	44
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
3.1 Αποτελέσματα για την διερεύνηση μηχανισμών στοχευμένης ανθεκτικότητας (target-site resistance).....	45
3.2 Αποτελέσματα για την διερεύνηση μηχανισμών μη-στοχευμένης ανθεκτικότητας (non-target-site resistance).....	47

3.2.1 Ανάλυση σχετικής έκφρασης γονιδίων Relative Quantification (RQ).....	48
3.2.1.1 Η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα ABC συναρτήσει των τριών υπό μελέτη παραγόντων.....	48
3.2.1.2 Η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Multidrugprotein συναρτήσει των τριών υπό μελέτη παραγόντων.....	49
3.2.1.3 Η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Lpironinhibited συναρτήσει των τριών υπό μελέτη παραγόντων.....	51
3.2.1.4 Η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα LpM10 συναρτήσει των τριών υπό μελέτη παραγόντων.....	52
3.2.2 Ανάλυση Comparative Ct (ΔΔCT) - Double Delta Ct Analysis (2 ^Δ ΔCT Method).....	54
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
4.1 Στοχευμένη έκφραση ανθεκτικότητας.....	56
4.2 Μη - στοχευμένη έκφραση ανθεκτικότητας.....	58
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ.....	74
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	75

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ:

Πίνακας 1: Η παγκόσμια κατανομή του <i>L. rigidum</i>	4
Πίνακας 2: Μερικές από τις σπουδαιότερες ομάδες ζιζανιοκτόνων με τα κυριότερα είδη ζιζανίων που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα.....	14
Πίνακας 3: Τα κυριότερα είδη αγρωστωδών ζιζανίων και τα ζιζανιοκτόνα στα οποία έχουν εμφανίσει ανθεκτικότητα.....	15
Πίνακας 4: Οι βιότυποι στους οποίους έγινε δειγματοληψία στις τρεις, στις έξι και στις δώδεκα ώρες μετά τον ψεκασμό καθώς και η ανθεκτικότητα ή μη στο glyphosate που παρουσίασαν σε προγενέστερες μελέτες (Travlos, personal communication).....	27
Πίνακας 5: Οι βιότυποι που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση ύπαρξης στοχευμένης και μη ανθεκτικότητας.....	27
Πίνακας 6: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του cDNA, οι συγκεντρώσεις RNA τους μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό των δειγμάτων, καθώς και η ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία του cDNA.....	33
Πίνακας 7: Τα δεδομένα που απαιτούνται να συμπληρωθούν έτσι ώστε να υπολογιστεί η σχετική έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων για την μέθοδο ανάλυσης ΔΔCT.....	41
Πίνακας 8: Κωδικόνια αμινοξέων προλίνης (Pro 106) και αλανίνης (Ala 109) για τους υπό μελέτη βιότυπους (ανθεκτικούς, Resistant-R & ευαίσθητο, susceptible-(S)).....	47

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ:

Εικόνα 1: Ωριμα φυτά ήρας σε αγρό της Αυστραλίας	4
Εικόνα 2: Παγκόσμιος χάρτης εξάπλωσης του ζιζανίου <i>L. rigidum</i>	8
Εικόνα 3: Οι πέντε πυλώνες ολοκληρωμένης διαχείρισης ζιζανίων.....	13
Εικόνα 4: Ο τρόπος δράσης των ζιζανιοκτόνων	18
Εικόνα 5: Κατάλυση της αντίδρασης S3P + PEP προς παραγωγή του EPSP και ανόργανου P από το ένζυμο EPSPS	20
Εικόνα 6: Τα αρωματικά αμινοξέα: α) Τρυπτοφάνη, β) Τυροσίνη και γ) Φαινυλαλανίνη.....	20
Εικόνα 7: Φυλογενετικό δέντρο στο οποίο παρουσιάζεται η γενετική συγγένεια των τεσσάρων υπό μελέτη γονιδίων.....	37
Εικόνα 8: Blast program, NCBI Database.....	38
Εικόνα 9: Α: Συσκευή StepOnePlus, Real – Time PCR της AB – Applied Biosystems με Β: θήκη υποδοχής των strips για τα προς πολλαπλασιασμό δείγματα cDNAs.....	42
Εικόνα 10: Τοποθέτηση δειγμάτων στο plate της RT-PCR για το γονίδιο ABC.....	43

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ:

Διάγραμμα 1: Η έκφραση του *γονιδίου-μεταφορέα ABC* για τους δύο υπό μελέτη βιοτύπους, τον 21(πιθανά ανθεκτικός) και 27(πιθανά ευαίσθητος)...**48**

Διάγραμμα 2: Η έκφραση του *γονιδίου-μεταφορέα ABC* για τις τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές στις οποίες διεξήχθη η δειγματοληψία μετά τον ψεκασμό.....**48**

Διάγραμμα 3: Η έκφραση του *γονιδίου-μεταφορέα ABC* για τις δύο μεταχειρίσεις, ψεκασμένα φυτά (X) και φυτά χωρίς εφαρμογή ψεκασμού (C).**49**

Διάγραμμα 4: Η έκφραση του *γονιδίου-μεταφορέα Multidrygprotein* για τους δύο υπό μελέτη βιοτύπους, τον 21(πιθανά ανθεκτικός) και 27(πιθανά ευαίσθητος).....**50**

Διάγραμμα 5: Η έκφραση του *γονιδίου-μεταφορέα Multidrygprotein* για τις τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές στις οποίες διεξήχθη η δειγματοληψία μετά τον ψεκασμό.....**50**

Διάγραμμα 6: Η έκφραση του *γονιδίου-μεταφορέα Multidrygprotein* για τις δύο μεταχειρίσεις, ψεκασμένα φυτά (X) και φυτά χωρίς εφαρμογή ψεκασμού (C).....**50**

Διάγραμμα 7: Η έκφραση του *γονιδίου-μεταφορέα Lpironinhibited* για τους δύο υπό μελέτη βιοτύπους, τον 21(πιθανά ανθεκτικός) και 27(πιθανά ευαίσθητος).....**51**

Διάγραμμα 8: Η έκφραση του *γονιδίου-μεταφορέα Lpironinhibited* για τις τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές στις οποίες διεξήχθη η δειγματοληψία μετά τον ψεκασμό.....**51**

Διάγραμμα 9: Η έκφραση του *γονιδίου-μεταφορέα Lpironinhibited* για τις δύο μεταχειρίσεις, ψεκασμένα φυτά (X) και φυτά χωρίς εφαρμογή ψεκασμού (C).**52**

Διάγραμμα 10: Η έκφραση του *γονιδίου-μεταφορέα LpM10* για τους δύο υπό μελέτη βιοτύπους, τον 21(πιθανά ανθεκτικός) και 27(πιθανά ευαίσθητος)...**52**

Διάγραμμα 11: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα *LpM10* για τις τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές στις οποίες διεξήχθη η δειγματοληψία μετά τον ψεκασμό.....**53**

Διάγραμμα 12: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα *LpM10* για τις δύο μεταχειρίσεις, ψεκασμένα φυτά (X) και φυτά χωρίς εφαρμογή ψεκασμού (C).**53**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τι ονομάζουμε «ζιζάνια» και τι ζημιές προκαλούν

Ως ζιζάνιο ορίζεται κάθε φυτό το οποίο αναπτύσσεται σε σημεία όπου και όταν δεν είναι επιθυμητό. Είναι δηλαδή φυτά αυτοφυή ή καλλιεργούμενα που αναπτύσσονται εκεί όπου δεν χρειάζονται ή αναπτύσσονται στη θέση άλλων χρησίμων φυτών. Για να χαρακτηριστεί ένα φυτό ζιζάνιο ή όχι, εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο προορίζεται να χρησιμοποιηθεί σε ένα αγροοικοσύστημα. Εάν, για παράδειγμα, ένα φυτό βλίτου μεγαλώνει σε ένα χωράφι όπου καλλιεργείται βαμβάκι είναι επιζήμιο, ενώ εάν μεγαλώνει σε ένα λειμώννα συμβάλλει στην ισορροπία του οικολογικού συστήματος και περιορίζει τη διάβρωση του εδάφους. Επομένως, μπορούμε να πούμε ότι τα ζιζάνια είναι φυτά των οποίων η χρησιμότητα δεν είναι απόλυτα γνωστή στον άνθρωπο, (οικολογικός ορισμός) (Λόλας, 1997). Δεν λείπουν ακόμη και οι περιπτώσεις κατά τις οποίες, ουσίες που έχουν βρεθεί να υπάρχουν σε ζιζάνια είναι εξαιρετικά επωφελείς για την ανθρώπινη υγεία και χρησιμοποιούνται σε ποικίλους επιστημονικούς τομείς, όπως αυτοί της βιολογίας και της ιατρικής. Δεν μπορούμε να ισχυριστούμε λοιπόν πως τα ζιζάνια είναι πάντα και παντού ανεπιθύμητα φυτά, αλλά χαρακτηρίζονται έτσι σε περιπτώσεις που προκαλούν ανεπιθύμητες δράσεις στα καλλιεργούμενα φυτά, στον άνθρωπο ή/και στα ζώα. Τέτοιες ανεπιθύμητες δράσεις αναφέρονται παρακάτω.

- 1) Ο ανταγωνισμός με τα καλλιεργούμενα φυτά για θρεπτικά στοιχεία, νερό και φως, το αποτέλεσμα του οποίου είναι η μείωση της απόδοσης και η ποιοτική υποβάθμιση των παραγόμενων προϊόντων
- 2) Η αλληλοπαθητική επίδραση, όπου τοξικές ουσίες εκκρίνονται από το ριζικό σύστημα των ζιζανίων στο έδαφος και επηρεάζουν την ανάπτυξη/αναπαραγωγή των γύρω φυτών
- 3) Υποβάθμιση της ποιότητας, π. χ. το αγριοσκόρδο (*Allium vine ale*) μεταδίδει τη μυρωδιά του στο αλεύρι όταν αλεστεί με το σιτάρι
- 4) Η αύξηση του κόστους παραγωγής (οργώματα, σκαλίσματα, εφαρμογή ζιζανιοκτόνων),
- 5) Ο παρασιτισμός των καλλιεργούμενων φυτών (οροβάγχη, κουσκούτα)

- 6) Ενδέχεται να είναι ξενιστές επιβλαβών εντόμων και παθογόνων μικροοργανισμών των καλλιεργούμενων φυτών
- 7) Προκαλούν δυσχέρειες κατά την εγκατάσταση των καλλιεργούμενων φυτών και κατά την εκτέλεση των μετέπειτα καλλιεργητικών φροντίδων
- 8) Η οψίμηση της παραγωγής των προϊόντων και η δυσχέρεια κατά τη συγκομιδή τους
- 9) Οι δηλητηριάσεις σε ζώα και ανθρώπους
- 10) Η μείωση της ταχύτητας της ροής του νερού σε αρδευτικά και στραγγιστικά κανάλια (υδροχαρή ζιζάνια)
- 11) Η μείωση της ορατότητας σε στροφές και διασταυρώσεις δρόμων
- 12) Η αύξηση της πιθανότητας πυρκαγιάς
- 13) Η μείωση της αποτελεσματικής χρήσης βιομηχανικών χώρων
- 14) Τα προβλήματα στις σιδηροδρομικές γραμμές
- 15) Η υποβάθμιση της αισθητικής αξίας των χώρων αναψυχής και η υποβάθμιση της λειτουργικής αξίας των χώρων αθλητισμού (ποδοσφαιρικά γήπεδα, γήπεδα γκολφ). (Ελευθεροχωρινός, 1992,2008).

Ωστόσο τα περισσότερα φυτά δεν γίνονται ζιζάνια, αυτό οφείλεται στο ότι δεν διαθέτουν πολύ αποτελεσματικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού και διασποράς, δεν έχουν ευρεία προσαρμοστική και κυρίως μεγάλη ανταγωνιστική ικανότητα, δεν επωφελούνται από τις περιποιήσεις του ανθρώπου στα καλλιεργούμενα φυτά και τέλος εξαλείφονται εύκολα μετά την εγκατάσταση τους.

1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον ανταγωνισμό ζιζανίων και καλλιεργούμενων φυτών

Ως ανταγωνισμός ορίζεται η αμοιβαία «εχθρική» επίδραση οργανισμών ή ειδών που χρησιμοποιούν πόρους οι οποίοι βρίσκονται σε ανεπαρκείς ποσότητες. Ανταγωνισμός μπορεί να αναπτύσσεται μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους πχ. μεταξύ καλλιεργούμενων φυτών ή ζιζανίων ή μεταξύ ατόμων τα οποία ανήκουν σε διαφορετικά είδη πχ. μεταξύ καλλιέργειας και ζιζανίων ή μεταξύ ζιζανίων διαφορετικών ειδών.

Υπάρχουν δύο βασικά είδη ανταγωνισμού. Το ένα ονομάζεται ανταγωνισμός παρεμβολής (interference competition) και αφορά σε άμεση

παρεμπόδιση εγκατάστασης του ζιζανίου σε κάποιο τμήμα του περιβάλλοντος και επομένως και από τις πηγές που υπάρχουν εκεί. Το δεύτερο είδος ονομάζεται ανταγωνισμός αξιοποίησης (exploitation competition) και αφορά την έμμεση αλληλεπίδραση ειδών λόγω της χρησιμοποίησης ενός κοινού πόρου περιορισμένης επάρκειας. Τα φυτά δεν αλληλεπιδρούν άμεσα για της πηγές των διαθέσιμων πόρων, απλώς κάποιο είδος στις συγκεκριμένες συνθήκες είναι πιο ικανό στη πρόσληψη αυτών από κάποιο άλλο.

Ο βαθμός στον οποίο τα καλλιεργούμενα φυτά ζημιώνονται εξαιτίας του ανταγωνισμού που αναπτύσσεται με τα ζιζάνια επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων, οι οποίοι δεν είναι ανεξάρτητοι αλλά πολλές φορές αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους. Όσον αφορά το ζιζάνιο, παράγοντες όπως η πυκνότητα του πληθυσμού και το είδος του, ο χρόνος εμφάνισης και παραμονής εντός του καλλιεργούμενου φυτού και η ομοιομορφία της κατανομής στον αγρό παίζουν καθοριστικό ρόλο στο πως θα διαμορφωθεί ο ανταγωνισμός μεταξύ ζιζανίου και καλλιεργούμενου είδους. Οι παράγοντες που σχετίζονται με το καλλιεργούμενο φυτό αφορούν στο είδος καθώς και την ποικιλία ή υβρίδιο που χρησιμοποιείται, οι καλλιεργητικές φροντίδες που εφαρμόζονται στην καλλιέργεια καθώς και η πυκνότητα σποράς των φυτών (Ελευθεροχωρινός, 2008).

1.3 Το ζιζάνιο *L. rigidum* Gaud.

Το γένος *Lolium* περιλαμβάνει τα είδη *L. rigidum*, *L. multiflorum*, *L. perenne*, *L. temulentum*, *L. canariense*, *L. persicum*, *L. edwardii* και *L. remotum*. Όλα τα παραπάνω είδη είναι ζιζάνια. Από αυτά, τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης παρουσιάζουν το *L. rigidum* (λεπτή ήρα) και το *L. multiflorum* (πολύανθη ήρα) (Ελευθεροχωρινός και Γιαννοπολίτης, 2009). Η λεπτή ήρα (*L. rigidum* Gaud.), κατάγεται από τις εύκρατες περιοχές της Ευρώπης και της Ασίας, ενώ σταδιακά εξαπλώθηκε από την Αυστραλία έως και τον Καναδά (Kloot, 1983). Παρακάτω, την Εικόνα 1, απεικονίζεται η έκταση του προβλήματος της ήρας σε συνθήκες αγρού στην Αυστραλία.



Εικόνα 1: Ωριμα φυτά ήρας σε αγρό της Αυστραλίας (Πηγή: Murrumbidgee Catchment Management Authority http://archive.ils.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0008/495332/archive-annual-ryegrass.pdf)

Στην Ελλάδα, η λεπτή ήρα θεωρείται το δεύτερο σε σημαντικότητα αγρωστώδες ζιζάνιο μετά την αγριοβρώμη. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην κατανομή και την έκταση του προβλήματος που δημιουργεί σε εθνικό επίπεδο, τόσο σε καλλιέργειες χειμερινών σιτηρών όσο και σε άλλες καλλιέργειες (Καλουμένος κ.ά., 2012). Φυτρώνει το φθινόπωρο και νωρίς την άνοιξη και δημιουργεί ποικίλα προβλήματα (Ελευθεροχωρινός & Γιαννοπολίτης, 2009).

1.3.1 Η κατανομή του *L. rigidum* Gaud σε παγκόσμιο επίπεδο

Το *L. rigidum* είναι φυτό ιθαγενές της Μεσογειακής λεκάνης. Στον Πίνακα 1 καθώς και στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται η κατανομή του ζιζανίου σε παγκόσμιο επίπεδο.

Πίνακας 1: Η παγκόσμια κατανομή του *L. rigidum* . (πηγή: CABI – Centre for Agriculture and Biosciences International- <https://www.cabi.org/isc/datasheet/31167#None>)

Χώρα	Εξάπλωση	Ιθαγενές ή ξενικό είδος
ΑΣΙΑ		
Αφγανιστάν	Παρόν	Ιθαγενές
Αρμενία	Παρόν	Ιθαγενές
Αζερμπαϊτζάν	Παρόν	Ιθαγενές
Γεωργία	Παρόν	Ιθαγενές
Ινδία	Παρόν	Ιθαγενές
Ιράν	Παρόν	Ιθαγενές
Ιράκ	Παρόν	Ιθαγενές
Ισραήλ	Παρόν	Ιθαγενές
Ιορδανία	Παρόν	Ιθαγενές
Κουβέιτ	Παρόν	Ιθαγενές
Λίβανος	Παρόν	Ιθαγενές
Πακιστάν	Παρόν	Ιθαγενές
Σαουδική Αραβία	Παρόν	Ιθαγενές
Συρία	Παρόν	Ιθαγενές
Τουρκία	Παρόν	Ιθαγενές
Τουρκμενιστάν	Παρόν	Ιθαγενές
Ουζμπεκιστάν	Παρόν	Ιθαγενές
ΑΦΡΙΚΗ		
Αλγερία	Παρόν	Ιθαγενές
Αίγυπτος	Παρόν	Ιθαγενές

Λιβύη	Παρόν	Ιθαγενές
Μαρόκο	Παρόν	Ιθαγενές
Νότια Αφρική	Παρόν	Ξενικό
Τυνησία	Λίαν διαδεδομένο	Ιθαγενές
ΒΟΡΕΙΑ ΑΜΕΡΙΚΗ		
Μεξικό	Παρόν	Ξενικό
ΗΠΑ		
-Αριζόνα	Παρόν	Ξενικό
-Καλιφόρνια	Παρόν	Ξενικό
-Χαβάη	Παρόν	Ξενικό
-Λουιζιάνα	Παρόν	Ξενικό
-Μισούρι	Παρόν	Ξενικό
-Όρεγκον	Παρόν	Ξενικό
-Τέξας	Παρόν	Ξενικό
ΝΟΤΙΑ ΑΜΕΡΙΚΗ		
Αργεντινή	Παρόν	Ξενικό
Χιλή	Παρόν	Ξενικό
ΕΥΡΩΠΗ		
Αλβανία	Παρόν	Ιθαγενές
Βουλγαρία	Παρόν	Ιθαγενές
Γαλλία	Παρόν	Ξενικό
-Κορσική	Παρόν	Ξενικό

Ελλάδα	Παρόν	Ιθαγενές
Ιταλία	Παρόν	Ιθαγενές
Πορτογαλία	Παρόν	Ιθαγενές
Ρωσία	Παρόν	Ιθαγενές
Ισπανία	Παρόν	Ιθαγενές
Ελβετία	Παρόν	Ιθαγενές
Ουκρανία	Παρόν	Ιθαγενές
Γιουγκοσλαβία	Παρόν	Ιθαγενές
ΩΚΕΑΝΙΑ		
Αυστραλία	Λίαν διαδεδομένο	Ξενικό
-Νέα Νότια Ουαλία	Παρόν	Ξενικό
-Κουίνσλαντ	Παρόν	Ξενικό
-Νότια Αυστραλία	Παρόν	Ξενικό
-Τασμανία	Παρόν	Ξενικό
-Βικτώρια	Παρόν	Ξενικό
-Δυτική Αυστραλία	Παρόν	Ξενικό



Εικόνα 2: Παγκόσμιος χάρτης εξάπλωσης του ζιζανίου *L. rigidum* (Πηγή: *Invasive Species Compendium* <https://www.cabi.org/isc/datasheet/31167#None>)

1.3.2 Εισαγωγή και διάδοση

Το *L. rigidum* είναι ιθαγενές φυτό των Μεσογειακών χωρών, της Νότιας Ευρώπης και της Βόρειας Αφρικής, του Ασιατικού Κόλπου και της Ινδικής υπο-ηπείρου. Έχει εισαχθεί ή διαδοθεί στη Βόρεια και Νότια Αμερική, στη Νότια Αφρική και στην Αυστραλία. Εισήχθη εκ προθέσεως στην Αυστραλία ως επιθυμητό είδος στους λειμώνες για βοσκή κατά τη διάρκεια του 19ου αιώνα και από τότε εξελίχθηκε σε σημαντικό καλλιεργητικό ζιζάνιο στη Νότια Αυστραλία. Είναι πολύ εύκολο να εξαπλωθεί από σπόρους σιτηρών που κρατήθηκαν από τους καλλιεργητές και συχνά απαντάται σε καλλιέργειες της Αυστραλίας (Niknam et. al., 2002).

1.3.3 Βιολογία και Οικολογία

1.3.3.1 Γενετική

Το *L. rigidum* είναι ένα αυτοασυμβίβαστο, διπλοειδές είδος, με αριθμό χρωμοσωμάτων $n=7$ ($2n=14$). Παρουσιάζει μεγάλη προσαρμοστικότητα και φαινοτυπική παραλλακτικότητα, ανάλογα με τις εναρμονισμένες και γεωργικές συνθήκες (Kloot, 1983). Επί παραδείγματι, στην Αυστραλία, έχουν έγκυρα

καταγραφεί πληθυσμοί του *L.rigidum* με μεγάλες διαφορές στη φαινολογική τους ανάπτυξη, οι οποίοι παρουσιάζουν εξαιρετική ικανότητα προσαρμογής στα τοπικά περιβάλλοντα από τότε που το είδος εισήχθη για πρώτη φορά (Gill et al., 1996).

Το *L.rigidum* διασταυρώνεται ελεύθερα με τα συγγενή του είδη *L.multiflorum* και *L.perenne*, αλλά σχηματίζει υβρίδια και με έναν αρκετά μεγάλο αριθμό ειδών του γένους *Festuca* (Terrell, 1968). Μορφολογικές μελέτες μπόρεσαν να διαφοροποιήσουν τα είδη *Lolium*, αν και ήταν εμφανής η σημαντική παρεμπόδιση μεταξύ των ειδών, ιδιαίτερα των *L.rigidum* και *L.multiflorum* (Bennett et al., 2000,2002).

Ακόμη, σε σχετική μελέτη του είδους *Lolium* στην Ιταλία, ένα μεγάλο ποσοστό της τάξης του 40%-60% των ατόμων ήταν υβρίδια (Dinelli et al., 2002). Επίσης, βρέθηκε ένα υψηλό επίπεδο ενδο-πληθυσμιακής παραλλακτικότητας στο *L.rigidum* και διαπιστώθηκε ότι η ροή των γονιδίων που πραγματοποιήθηκε μέσω της γύρης μεταξύ των πληθυσμών αυτών ήταν 2,2 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τη ροή των γονιδίων από τη μετακίνηση με σπόρους (Balfourier et al., 2000).

1.3.3.2 Φυσιολογία και φαινολογία

Οι φρέσκοι διασκορπισμένοι σπόροι του *L.rigidum* παρουσιάζουν ενδογενή λήθαργο και απαιτούν μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο μετά την ωρίμανσή τους για να βλαστήσουν. Η διακοπή του ληθάργου σε πληθυσμούς που προέρχονται από τη Δυτική Αυστραλία έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται άμεσα με την αύξηση της θερμοκρασίας μετά την ωρίμανση, με κάποια διακύμανση που σημειώθηκε στο βαθμό του λήθαργου κατά τη διάρκεια της διασποράς (Steadman et al., 2003).

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός διακοπής του λήθαργου στο *L.rigidum* έδειξε ότι οι σπόροι ανταποκρίνονται στην ενυδάτωση υπό συνθήκες σκότους. Δηλαδή, ένα μέρος των σπόρων μπορεί να εμφανίζει αναγκαστικό σκοτεινό λήθαργο, σε ποσοστό 10-20%, αυτή η κατάσταση οδηγεί στη βραχύχρονη επιμονή των θαμμένων σπόρων να διατηρούν τη βλαστικότητά τους (Gramshaw & Stearn, 1977). Ακόμη, βρέθηκε βέλτιστη βλάστηση και εμφάνιση νεαρών φυταριών από σπόρους που είχαν τοποθετηθεί κοντά στην επιφάνεια

του εδάφους (Pearce & Quinlivan, 1971) και έχει αναφερθεί μειωμένη εγκατάσταση σπόρων που είχαν τοποθετηθεί κάτω από αυτό το βάθος, με πλήρη αναστολή σε βάθος 11-14 εκατοστών (Gramshaw & Stearn, 1977). Αναφέρθηκε ακόμη ετήσια μείωση της τράπεζας σπόρων της τάξης του 70-80% για το *L. rigidum* (Peltzer & Matson, 2002). Η λεπτή ήρα είναι ζιζάνιο που παράγει πολλούς σπόρους και αναπαράγεται αποκλειστικά με αυτούς. Σε καλλιέργεια σιταριού έχει αναφερθεί αριθμός παραγωγής σπόρων 31.000-45.000 ανά τετραγωνικό μέτρο (Rerkasem et al., 1980).

1.4 Πρόληψη και έλεγχος ζιζανίων

Προληπτικά μέτρα

Τα κυριότερα από τα προληπτικά μέτρα είναι η χρησιμοποίηση πιστοποιημένου σπόρου σποράς, κοπριάς και λοιπών υλικών απαλλαγμένα από σπόρους ή όργανα αγενούς αναπαραγωγής των ζιζανίων και ο προσεκτικός καθαρισμός των μηχανημάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε περιοχές μολυσμένες από ζιζάνια πριν να χρησιμοποιηθούν σε αμόλυντους αγρούς.

Μηχανική μέθοδος

Η ελαφριά επεξεργασία του εδάφους από την αρχή της καλλιεργητικής περιόδου, πριν από τη σπορά της καλλιέργειας, έχει τη δυνατότητα να διεγείρει τη βλάστηση του *L. rigidum*, αν και αυτή η πρακτική δεν είναι τόσο επιτυχημένη σε βαρύτερα εδάφη. Οι Reeves and Smith (1975) έδειξαν ότι η οριζόντια επεξεργασία εδάφους μειώνει τον πληθυσμό του *L. rigidum* περισσότερο από τη χρήση δίσκου και οι Matthews et al. (1996) ανέφεραν μείωση του αριθμού των ζιζανίων στην ακόλουθη συγκομιδή 98%, έπειτα από την οριζόντια κατεργασία.

Έλεγχος του πληθυσμού

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες καλλιεργητικές πρακτικές που συμβάλλουν στον έλεγχο του *L. rigidum*. Η αρχική βλάστηση του *L. rigidum* μετά από φθινοπωρινές βροχοπτώσεις πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύει περίπου το 60-80% της συνολικής εποχιακής του εμφάνισης. Δεδομένου αυτού του γεγονότος, είναι δυνατόν να καθυστερήσουμε τη σπορά της καλλιέργειας

προκειμένου να ελέγξουμε την πλειοψηφία του πληθυσμού *L. rigidum* πριν από την εγκατάσταση της καλλιέργειας (Gill, 1995). Η πρακτική αυτή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του δυναμικού παραγωγής του. Οι Planes et al. (1999) έδειξαν ότι η καθυστέρηση στην σπορά σιταριού μείωσε την τράπεζα των σπόρων *L. rigidum* κατά 40% και την πυκνότητα των φυταρίων κατά 27%. Ωστόσο, η καθυστερημένη σπορά είχε ως αποτέλεσμα απώλεια απόδοσης 46 kg / ha / ημέρα. Αύξηση του ανταγωνισμού της καλλιέργειας μέσω της αύξησης των ποσοστών σποράς και της επιλογής, καθώς και η βελτίωση για ανταγωνιστικές καλλιεργούμενες ποικιλίες έχει επίσης υποστηριχθεί πως συμβάλει θετικά στον περιορισμό του προβλήματος. Οι Medd et al. (1985) ανέφεραν ότι ο αριθμός των ζιζανίων της ήρας δεν επηρεάστηκε από την αυξημένη πυκνότητα της καλλιέργειας σίτου αλλά ότι η πιθανή παραγωγή σπόρων *L. rigidum* μειώθηκε. Ομοίως, ο Matthews (2002) ανέφερε ότι η γονιμότητα των ζιζανίων μειώθηκε σε συνθήκες με υψηλές πυκνότητες καλλιεργούμενων φυτών. Οι Lemerle et al. (2001) έδειξαν σημαντικές διαφορές στην ανταγωνιστική ικανότητα των καλλιεργειών σίτου κατά της ήρας και άλλες έρευνες έχουν εντοπίσει γενετικούς τόπους (Quantitative Trait Loci, QTLs) για χαρακτηριστικά που προσδίδουν μεγαλύτερη ανταγωνιστικότητα στον σίτο (Coleman et al., 2001). Αναμένεται ότι τα QTLs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα βελτίωσης με τη χρήση μοριακών δεικτών στο μέλλον. Μελέτες στην Αυστραλία έδειξαν τη δυνατότητα εντοπισμού και συλλογής σπόρων *L. rigidum* κατά τη διάρκεια της συγκομιδής (Matthews et al., 1996), αυτή η πρακτική χρησιμοποιείται ευρέως όπου η ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα έχει καταστεί σοβαρό πρόβλημα. Αφού συλλεχθούν, οι σπόροι αυτοί μπορούν να συγκεντρωθούν σε σωρούς στο χωράφι και να καούν ή να αφαιρεθούν και να καταστραφούν για να μειωθεί έτσι σημαντικά η τράπεζα σπόρων του ζιζανίου στο έδαφος. Η καύση, όπου επιτρέπεται, έχει τη δυνατότητα να θανατώνει τους σπόρους *L. rigidum* στην επιφάνεια του εδάφους.

Οι κεφαλές σπόρων του *L. rigidum*, κατά προτίμηση, μπορούν να χορηγηθούν ως τροφή για βοοειδή και πρόβατα, μειώνοντας έτσι την ολική παραγωγή σπόρων και την ανασύσταση της τράπεζας σπόρων. Μετά την κατάποση και την απέκκριση του σπόρου *L. rigidum* από τα βοοειδή και τα

πρόβατα, μόνο 11,9 και 3,9% των σπόρων, αντίστοιχα, είχαν βλαστικότητα (Stanton et al., 2002).

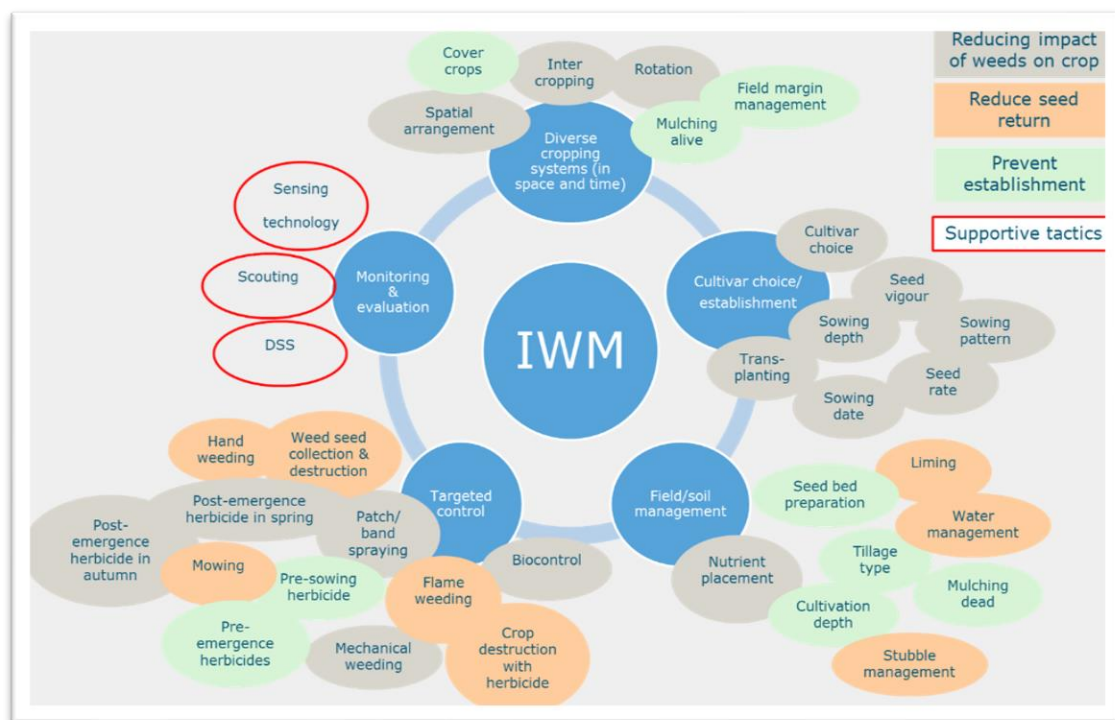
Χημικός έλεγχος

Οι Mamarot and Rodriguez (1997) δίνουν συστάσεις για τη χρήση ζιζανιοκτόνων κατά διαφόρων ειδών *Lolium*, συμπεριλαμβανομένου και του *L. rigidum*, σε μια ποικιλία καλλιεργειών. Καρβεταμίδη σε όσπρια, κράμβη και ηλίανθο, EPTC και ατραζίνη στον αραβόσιτο, μονολινδρόνιο σε πατάτα και μία ποικιλία ζιζανιοκτόνων που σχετίζονται με το sethoxydim και το fluazifop σε πλατύφυλλα φυτά.

Η ανάπτυξη εκτεταμένης και πολλαπλής ανθεκτικότητας σε μια σειρά κατηγοριών ζιζανιοκτόνων έχει αναφερθεί ευρέως για τους πληθυσμούς του *L. rigidum*. Έντονες αναφορές έγιναν μέσα στην δεκαετία του 1990. Η ανθεκτικότητα είχε αναφερθεί στη σιμαζίνη (Gonzalez-Gutierrez and Prado, 1997), το diclofop-methyl, το chlortoluron και το isoproturon (Prado et al., 1997), carbetamide (Hole and Powles, 1997), triasulfuron, sulfometuron και imazethapyr) και metolachlor (Burnet et al., 1994a). Από το 1998 δε άρχισαν να γίνονται αναφορές στο πρόβλημα ανθεκτικότητας στο glyphosate που κατέστησε το *L. rigidum* το πρώτο ζιζάνιο το οποίο ανέπτυξε τέτοια ανθεκτικότητα (Gut, 1998, Powles et al. , 1998). Μέχρι το 2004, στην Αυστραλία είχαν αναφερθεί πληθυσμοί *L. rigidum* ανθεκτικοί σε αναστολείς ACCase, αναστολείς ALS, δινιτροαλινίνες, τριαζόλες, ουρίες, ισοξαζολιδόνες, αναστολείς μιτώσεως, χλωροακεταμίδια, θειοκαρβαμικά, αναστολείς φωτοσυστήματος II και γλυκίνες. Αντίσταση στους αναστολείς ACCase είχε επίσης αναφερθεί στη Χιλή, τη Γαλλία, την Ελλάδα, το Ισραήλ, τη Σαουδική Αραβία, τη Νότια Αφρική, την Ισπανία και την Τυνησία, στους αναστολείς ALS στη Νότια Αφρική, στους αναστολείς του φωτοσυστήματος II στο Ισραήλ και στην Ισπανία, στο glyphosate στη Νότια Αφρική ΗΠΑ και στα διπυρίδια στη Νότια Αφρική (Hear, 2004). Το *L. rigidum* κατατάχθηκε ως το πιο ανθεκτικό ζιζάνιο στα ζιζανιοκτόνα στον κόσμο (Hear, 2004). Περίπου τριάντα χρόνια μετά και το πρόβλημα της ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα συνεχίζει να υπάρχει και να είναι πιο επίκαιρο από ποτέ, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη εξεύρεσης μιας αειφόρου και βιώσιμης λύσης.

Ολοκληρωμένη διαχείριση

Η ταχεία και ευρεία ανάπτυξη της ανθεκτικότητας του *L. rigidum* στα ζιζανιοκτόνα, απαιτεί τη διαμόρφωση ολοκληρωμένων στρατηγικών διαχείρισης των ζιζανίων, οι οποίες θα μειώσουν την εξάρτηση από τον χημικό έλεγχο και θα καθυστερήσουν ή θα αποτρέψουν την ευρεία εξέλιξη της ανθεκτικότητας. Η ολοκληρωμένη διαχείριση θα πρέπει να περιλαμβάνει την όψιμη σπορά της καλλιέργειας, τη χρήση καλλιεργούμενων ποικιλιών που ανταγωνίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό τα ζιζάνια, τη χρήση μη εκλεκτικών ζιζανιοκτόνων, τη συλλογή σπόρων ζιζανίων κατά τη συγκομιδή και την εναλλαγή καλλιεργειών (Powles and Matthews, 1996, Gill and Holmes, 1997) .



Εικόνα 3: Οι πέντε πυλώνες ολοκληρωμένης διαχείρισης ζιζανίων (μπλε) με παραδείγματα τακτικών διαχείρισης ζιζανίων και ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο η τακτική αυτή συμβάλλει στη μείωση της πίεσης που ασκούν τα ζιζάνια στην καλλιέργεια (Πηγή: Wageningen University & Research <https://www.wur.nl/en/newsarticle/Development-of-an-integrated-weed-management-strategy.htm>)

1.5 Ανθεκτικότητα των ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα

Γενικά ως ανθεκτικότητα (resistance) ορίζεται η ικανότητα του ενός φυτού-ξενιστή να ελαχιστοποιεί τις δυσμενείς επιδράσεις από τον παρασιτισμό (Φανουράκης Ν., 2010). Ένας εναλλακτικός ορισμός επίσης αναφέρει πως αντοχή ή ανθεκτικότητα, ονομάζεται η ικανότητα ενός φυτού να αμύνεται αποτελεσματικά στην είσοδο, την εγκατάσταση και την ανάπτυξη ενός παθογόνου στους ιστούς του (Βακαλουνάκης Δ.Ι. κ.α., 2003). Η ανθεκτικότητα ζιζανίων αναφέρεται ως η ικανότητά αυτών να επιβιώνουν μετά την εφαρμογή, ακόμα και μεγαλύτερης από της συνιστώμενης δόσης, κάποιου ζιζανιοκτόνου, στο οποίο ο αρχικός πληθυσμός ήταν ευαίσθητος» (LeBaron & Gressel, 1982). Στον Πίνακα 2 περιγράφονται μερικές από τις σπουδαιότερες ομάδες ζιζανιοκτόνων με τα κυριότερα είδη ζιζανίων που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Πίνακας 2: Μερικές από τις σπουδαιότερες ομάδες ζιζανιοκτόνων με τα κυριότερα είδη ζιζανίων που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα.

Ζιζανιοκτόνα	Είδη ζιζανίων
Αρυλοξυφαινοξυαλκανοικά Κυκλοεξανδιόνες	<i>L. rigidum</i> , <i>Lolium multiflorum</i> , <i>Avena sterilis</i> , <i>Avena fatua</i> , <i>Alopecurus myosuroides</i> , <i>Phalaris</i> <i>minor</i> , <i>Echinochloa crus-galli</i> , <i>Setaria viridis</i> , <i>Sorghum</i> <i>halepense</i> , <i>Digitaria sanguinalis</i>
Σουλφονουλουρίες	<i>Stellaria media</i> , <i>Lactuca serriola</i> , <i>Kochia scoparia</i> , <i>Alisma plantago-</i> <i>aquatica</i> , <i>Papaver rhoeas</i> , <i>Bilderdykia convolvulus</i> , <i>Sonchus</i> <i>oleraceus</i> , <i>Conyza spp.</i> , <i>Amaranthus spp.</i> , <i>L. rigidum</i>

Τριαζίνες	<i>Solanum nigrum</i> , <i>Chenopodium album</i> , <i>Chenopodium polyspermum</i> , <i>Amaranthus retroflexus</i> , <i>Amaranthus lividus</i> , <i>Amaranthus hybridus</i> , <i>Senecio vulgaris</i> , <i>Conyza canadensis</i> , <i>Stellaria media</i> , <i>Sonchus asper</i> , <i>Bilderdykia convolvulus</i> , <i>Polygonum persicaria</i> , <i>Polygonum lapathifolium</i>
Διπυριδίλια	<i>Conyza canadensis</i> , <i>Epilobium ciliatum</i> , <i>Poa annua</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Solanum nigrum</i> , <i>Hordeum spp.</i>
Φαινοξυαλκανοικά	<i>Stellaria media</i> , <i>Cirsium arvense</i> , <i>Papaver rhoeas</i>
Δινιτροανιλίνες	<i>Setaria viridis</i> , <i>Eleusine indica</i> , <i>Amaranthus palmeri</i>

Στον πίνακα 3 αναφέρονται τα κυριότερα είδη αγρωστωδών ζιζανίων και τα ζιζανιοκτόνα στα οποία έχει επιβεβαιωθεί ανθεκτικότητα (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Πίνακας 3: Τα κυριότερα είδη αγρωστωδών ζιζανίων και τα ζιζανιοκτόνα στα οποία έχουν εμφανίσει ανθεκτικότητα

Είδη αγρωστωδών ζιζανίων	Ζιζανιοκτόνα
<i>L. rigidum</i>	diclofop, tralkoxydim, chlorsulfuron, sethoxydim, fluazifop, haloxyfop, glyphosate

<i>Avena sterilis</i>	diclofop, tralkoxydim, sethoxydim
<i>Avena fatua</i>	diclofop, fenoxaprop, tralkoxydim, sethoxydim
<i>Alopecurus myosuroides</i>	chlorotoluron, isoproturon, diclofop, clodinafop, fenoxaprop, fluazifop, sethoxydim, tralkoxydim
<i>Phalaris minor</i>	isoproturon, diclofop, fenoxaprop, sethoxydim
<i>Echinochloa crus-galli</i>	propanil, quinclorac
<i>Setaria viridis</i>	trifluralin, sethoxydim, fluazifop, haloxyfop, fenoxaprop, quizalofop, diclofop, tralkoxydim
<i>Sorghum halepense</i>	fluazifop, quizalofop, fenoxaprop, sethoxydim

1.5.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Αρχικά οι ερευνητές θεωρούσαν πως οι δύο πιο κοινοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών είναι αφενός η ικανότητά τους να το μεταβολίζουν το ζιζανιοκτόνο και αφετέρου η γενετική τροποποίηση της πρωτεΐνης ή του ένζυμου-στόχου του ζιζανιοκτόνου (Hatzios, 2001; Gressel, 2002).

Ο τρόπος δράσης των ζιζανιοκτόνων από τη στιγμή που θα εισέλθουν εντός του φυτού μέχρι και την καταστροφή του κυττάρου και το θάνατο του φυτού περιγράφονται ως εξής: Αρχικά το ζιζανιοκτόνο εισχωρεί στο φυτό, μεταφέρεται στο ένζυμο-στόχο, συσσωρεύεται στην πρωτεΐνη-στόχο, προσδένεται στο ένζυμο και το απενεργοποιεί. Ακολουθεί η κυτταρική ζημιά και θάνατος του φυτού.

Πλέον έχουν αναγνωρισθεί έξι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα και περιλαμβάνουν:

(Α) Μειωμένη απορρόφηση του ζιζανιοκτόνου στο σημείο ψεκασμού (υπέργειο μέρος) λόγω μορφολογικών χαρακτηριστικών του φυτού (πχ: αυξημένο πάχος επιφάνειας των φύλλων)

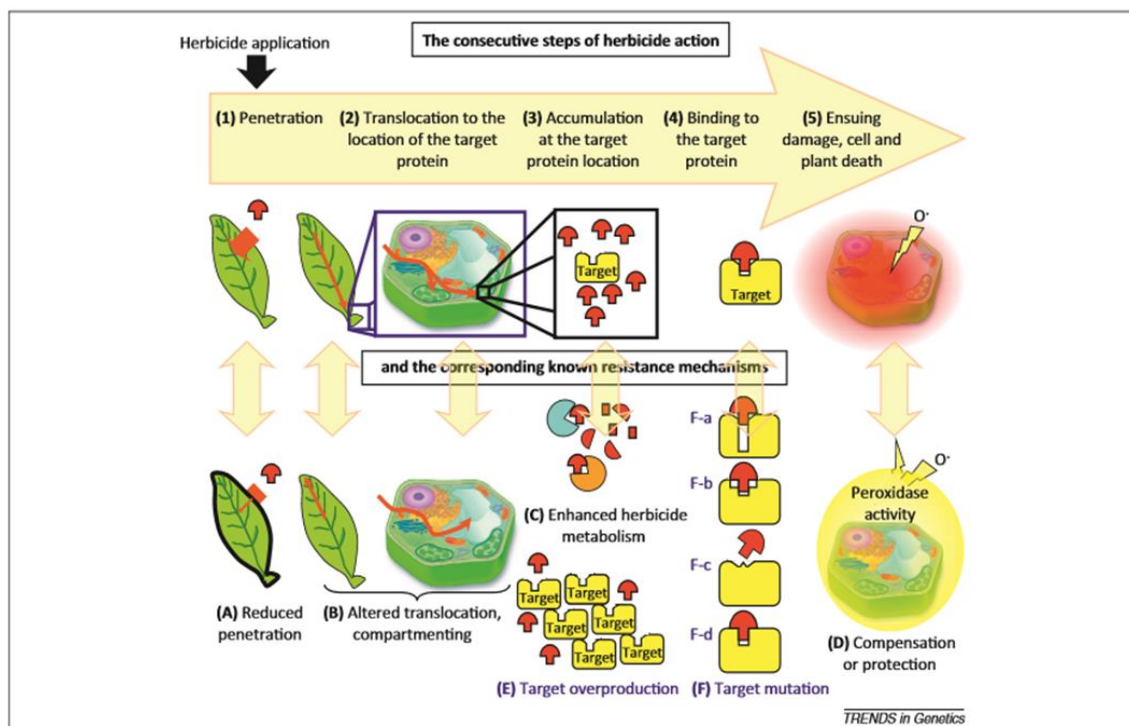
(Β) Απομάκρυνση και απομόνωση του ζιζανιοκτόνου σε ιστούς του φυτού και οργανίδια εντός του κυττάρου (η λεγόμενη διαμερισματοποίηση), μακριά από το ένζυμο-στόχο του ζιζανιοκτόνου

(Γ) Αυξημένος ρυθμός μεταβολισμού του ζιζανιοκτόνου σε λιγότερο τοξικά παραπροϊόντα

(Δ) Εξουδετέρωση κυτταροτοξικών μορίων που παράγονται από τη δράση των ζιζανιοκτόνων (πχ: ελεύθερες ρίζες οξυγόνου) από αποτοξικοποιητικά μόρια, όπως είναι οι υπεροξειδάσες

(Ε) Λειτουργικές μεταλλάξεις που προκαλούν υπερ-παραγωγή μιας πρωτεΐνης-στόχου. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην εφαρμογή ακόμη μεγαλύτερης ποσότητας ζιζανιοκτόνου ώστε να θανατωθούν τα φυτά

(ΣΤ) Μεταλλαγές που οδηγούν σε διαφοροποίηση της τριτοταγούς δομής του ενζύμου, που συνεπάγεται αδυναμία πρόσδεσης του μορίου του ζιζανιοκτόνου επάνω στο ένζυμο, όπως φαίνεται και στην εικόνα 4 (Delye et al., 2013).



Εικόνα 4: Πάνω (κίτρινο βέλος): Ο τρόπος δράσης των ζιζανιοκτόνων από τη στιγμή που θα εισέλθουν εντός του φυτού μέχρι και την καταστροφή του κυττάρου και το θάνατο του φυτού. Εισχώρηση στο φυτό, μεταφορά στο ένζυμο-στόχο, συσσώρευση του ζιζανιοκτόνου στην πρωτεΐνη-στόχο, πρόσδεση στο ένζυμο και απενεργοποίησή του, κυτταρική ζημιά και θάνατος του φυτού. Κάτω: Πολλοί είναι οι μηχανισμοί της ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα και περιλαμβάνουν (Α) Μειωμένη απορρόφηση του ζιζανιοκτόνου στο σημείο ψεκασμού (υπέργειο μέρος) λόγω μορφολογικών χαρακτηριστικών του φυτού (πχ: αυξημένο πάχος εφυμενίδας των φύλλων), (Β) Απομάκρυνση και απομόνωση του ζιζανιοκτόνου σε ιστούς του φυτού και οργανίδια εντός του κυττάρου, μακριά από το ένζυμο-στόχο του ζιζανιοκτόνου, (Γ) Αυξημένος ρυθμός μεταβολισμού του ζιζανιοκτόνου σε λιγότερο τοξικά παραπροϊόντα, (Δ) Εξουδετέρωση κυτταροτοξικών μορίων που παράγονται από τη δράση των ζιζανιοκτόνων (πχ: ενεργές μορφές οξυγόνου) από μόρια αποτοξίνωσης, όπως είναι οι υπεροξειδάσες, (Ε) Η υπερέκφραση του ένζυμου-στόχου, πράγμα που οδηγεί στην εφαρμογή ακόμη μεγαλύτερης ποσότητας ζιζανιοκτόνου ώστε να θανατωθούν τα φυτά, (ΣΤ) Μεταλλαγές που οδηγούν σε διαφοροποίηση της τριτοταγούς δομής του ενζύμου, που συνεπάγεται αδυναμία πρόσδεσης του μορίου του ζιζανιοκτόνου επάνω στο ένζυμο. (Πηγή: Delye et al., 2013).

1.6 Χρήσεις του glyphosate

Το glyphosate είναι σήμερα το πιο διαδεδομένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο ζιζανιοκτόνο παγκοσμίως. Είναι ένα συστηματικό, μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο και δρα σε ένα ευρύ φάσμα ετήσιων και πολυετών ζιζανίων που εμφανίζονται σε αρόσιμες ή μη καλλιεργούμενες περιοχές (Baylis, 2000).

Από τη χρονιά που εισήχθη στις αγορές, το 1974, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ζιζανίων τόσο σε γεωργικά όσο και σε αστικά και σε φυσικά οικοσυστήματα. Χρήσεις του αναφέρονται τόσο για έλεγχο των ζιζανίων σε καλλιέργειες όσο και σε αστικές και βιομηχανικές περιοχές (πρανή δρόμων, σιδηροδρομικές γραμμές, κα), αστικά πάρκα και άλλες περιοχές (Powles, 2008). Αρχικά, πριν την εμφάνιση των διαγονιδιακών καλλιεργούμενων φυτών ανθεκτικών στο glyphosate, χρησιμοποιείτο ακριβώς πριν τη σπορά του καλλιεργούμενου φυτού. Επίσης, η χρήση του γίνεται και μεταξύ των γραμμών σε πολυετείς καλλιέργειες όπως είναι οι οπωρώνες και οι αμπελώνες. Σε μονοετείς καλλιέργειες, λόγω της μη εκλεκτικότητάς του, δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μεταξύ των γραμμών σποράς όταν το καλλιεργούμενο φυτό είχε ήδη φυτρώσει. Όμως, από το 1996 με την εισαγωγή των διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικά στο glyphosate που περιέχουν ένα γονίδιο που τους προσδίδει την ανθεκτικότητα (Dill et al. 2008), γίνεται εφαρμογή του και μεταφυτρωτικά για έλεγχο των ζιζανίων χωρίς να ζημιώνεται η καλλιέργεια, μία,

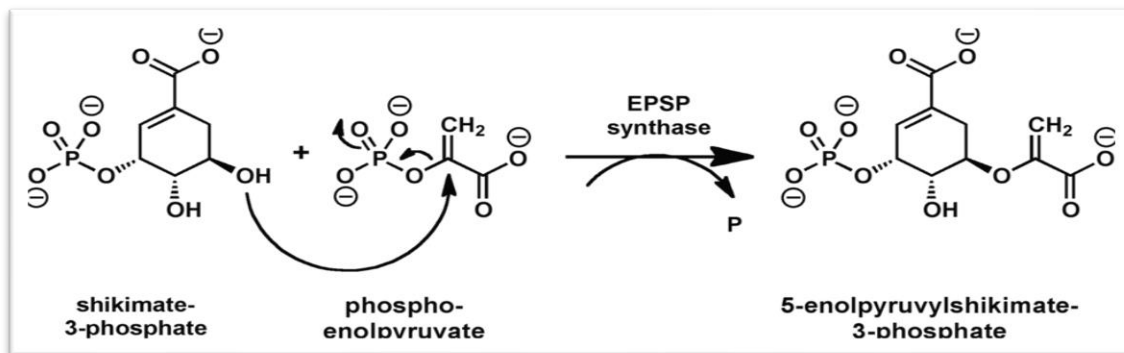
δύο ή και περισσότερες φορές μέσα στην καλλιεργητική περίοδο. Άλλα πλεονεκτήματα πλέον, μετά την εμφάνιση των διαγονιδιακών φυτών, είναι η πρόωγη σπορά και η ακαλλιέργεια του εδάφους για έλεγχο ζιζανίων (James, 2006). Όμως, η εισαγωγή διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών στο glyphosate συνέβαλλε επίσης στη μείωση της χρήσης ζιζανιοκτόνων με διαφορετικό μηχανισμό δράσης, γεγονός που αύξησε την πίεση επιλογής για την εμφάνιση ανθεκτικών βιότυπων ζιζανίων, αλλά και γενικότερα συνέβαλλε στην αλλαγή των πρακτικών της φυτικής παραγωγής σε διάφορες καλλιέργειες, όπως το βαμβάκι και η σόγια (Young, 2006).

1.6.1 Μηχανισμός δράσης του glyphosate

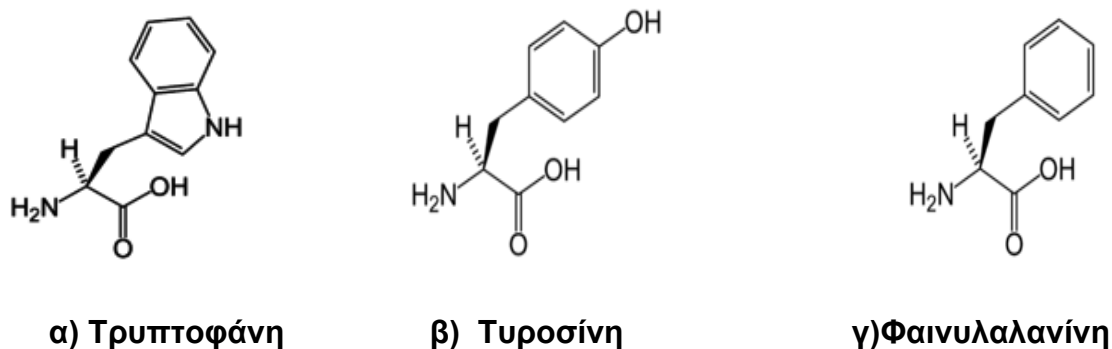
Το glyphosate ανήκει στην ομάδα ζιζανιοκτόνων-αναστολέων της βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων και δρα ανταγωνιστικά ως αναστολέας 5-ενολο πυροσταφυλικού φωσφο-σικού οξέος συνθετάσης (*EPSPS*), ενός βασικού ενζύμου στην οδό του σικιμικού οξέος, που καταλύει τη σύνθεση του πυριβατικού 5-ενολο-πυροσταφυλικού σικιματικού-3-φωσφορικού οξέος (*EPSP*) σε shikim-3-φωσφορικό (*S3P*) και πυριτικό φωσφοενόλη (*PEP*) (Duke and Powles 2008)(Εικόνα 4).

Το *EPSP* αποτελεί την πρόδρομη ουσία σε πολλά μονοπάτια βιοσύνθεσης συστατικών των κυττάρων και ειδικότερα εμπλέκεται στο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των αρωματικών αμινοξέων τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη (Εικόνα 5).

Αν και το ένζυμο κωδικοποιείται εντός του πυρήνα των φυτικών κυττάρων, στη συνέχεια μεταφέρεται με τη βοήθεια ενός πεπτιδίου-μεταφορέα (*CTP*, Chloroplast Transit Peptide) εντός του χλωροπλάστη, και κατά συνέπεια στον χλωροπλάστη γίνεται η σύνθεση των παραπάνω αρωματικών αμινοξέων.



Εικόνα 5: Κατάλυση της αντίδρασης S3P + PEP προς παραγωγή του EPSP και ανόργανου P από το ένζυμο EPSPS (πηγή: Μουρκίδου, 2008)



Εικόνα 6: Τα αρωματικά αμινοξέα: α) Τρυπτοφάνη, β) Τυροσίνη και γ) Φαινυλαλανίνη (πηγή: Βουλγαρίδης, 2014).

1.6.2 Ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (ένζυμο EPSPS)

Στην κατηγορία αυτή των ζιζανιοκτόνων υπάγονται οι γλυκίνες ή φωσφονογλυκίνες. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις του glyphosate με τη μορφή αλάτων του. Στο εμπόριο το glyphosate κυκλοφορεί σαν άλας της ισοπροπυλαμίνης (glyphosate-isopropylammonium, Roundup), σαν άλατα αμμωνίου (glyphosate-ammonium και glyphosate diammonium), άλατα καλίου (glyphosate-potassium), νατρίου (glyphosate-sodium) και θείου (glyphosate-trimesium, γνωστό σαν sulfosate) (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

1.6.3 Βασικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στο glyphosate

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που έχουν αναπτύξει τα φυτά έναντι στο glyphosate μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους μηχανισμούς που αναφέρονται στο ένζυμο EPSPS (target site resistance), η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει γενικότερα μηχανισμούς αποτοξίνωσης από το ζιζανιοκτόνο που δεν έχουν σχέση με το ένζυμο-στόχο (non-target site resistance) (Sammons and Gaines, 2014) και μια τρίτη τον συνδυασμό και των δυο (Tani et al. 2015).

1.6.3.1 Στοχευμένη ανθεκτικότητα (Target-site resistance)

Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την ανθεκτικότητα ορισμένων φυτών απέναντι στο glyphosate και έχουν σχέση με το ένζυμο-στόχο του ζιζανιοκτόνου είναι:

α) Μια μεταλλαγή στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, οπότε το μόριο του glyphosate δε μπορεί να προσδεθεί και να το απενεργοποιήσει. Ο μηχανισμός αυτός έχει βρεθεί σε διάφορα φυτά, όπως είναι η ελευσίνη (*Eleusine indica*) (Baerson et al. 2002; Ng et al. 2003) και η ήρα (*Lolium sp.*) (Perez-Jones et al., 2007; Simarmata and Penner, 2008; Wakelin and Preston, 2006).

β) Υπερσυσσώρευση του γονιδίου που κωδικοποιεί το EPSPS, οπότε και το ζιζανιοκτόνο στη συνιστώμενη δόση εφαρμογής δεν είναι πλέον αποτελεσματικό, αλλά απαιτούνται πολύ μεγαλύτερες ποσότητες για τον έλεγχο των ζιζανίων. Ο δεύτερος αυτός μηχανισμός ανθεκτικότητας έχει βρεθεί ιδιαίτερα σε ζιζάνια του είδους *Conyza sp.* (Dinelli et al. 2006, 2008).

1.6.3.1.1 Μεταλλάξεις στο ένζυμο EPSPS

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο EPSPS περιέχει μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν τα αμινοξέα που συνθέτουν την πρωτεΐνη-ένζυμο. Έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο glyphosate και μια από αυτές είναι η αντικατάσταση του υδρόφοβου αμινοξέος

προλίνη στη θέση 106 της αλληλουχίας των αμινοξέων της πρωτοταγούς δομής του EPSPS από τα υδρόφοβα αμινοξέα αλανίνη ή λευκίνη ή από τα υδρόφιλα αμινοξέα σερίνη ή θρεονίνη. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ανιχνευθεί σε 6 είδη, πιο συχνά σε είδη του γένους *Lolium sp.* (*L. rigidum*, *L. multiflorum*) (Bell et al. 2013, Nandula et al. 2013). Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούν μια αλλαγή στη στερεοδιάταξη του ενζύμου στο χώρο (τριτοταγής δομή) και ειδικότερα στο ενεργό του κέντρο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγγένεια μεταξύ του ενεργού κέντρου και του μορίου του glyphosate. Όμως η αλλαγή αυτή δεν είναι τόσο μεγάλη ώστε να μην προσδένονται τα μόρια του PEP. Επομένως το PEP αποκτά ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στην πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο του EPSPS σε σχέση με το glyphosate και κατά συνέπεια η αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο συμβαίνει κανονικά (Baerson et al. 2002; Healy-Fried et al. 2007).

1.6.3.1.2 Υπερσυσσώρευση (πολλαπλά αντίγραφα) του γονιδίου που κωδικοποιεί το EPSPS

Όταν ένα διπλασιασμένο γονίδιο περιέχει μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των εκκινητών, το άμεσο αποτέλεσμα είναι η συσσώρευση (πολλαπλά αντίγραφα) mRNA και πρωτεΐνης. Ειδικά στους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο glyphosate, έχουν αναφερθεί παραδείγματα προσαρμογής με διπλασιασμό των γονιδίων όταν τα φυτά βρεθούν κάτω από περιβαλλοντικό στρες (Kondrashov 2012). Συμπερασματικά, η ανθεκτικότητα έναντι στο glyphosate φαίνεται να αυξάνεται σε αρκετές περιπτώσεις όταν υπάρχει αυξημένος αριθμός αντίγραφων του EPSPS. Για παράδειγμα, σε *Lolium multiflorum*, η δόση που απαιτείται για να επιτευχθεί 50% μείωση στη φυτική ανάπτυξη, αυξήθηκε γραμμικά με την αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του EPSPS (Salas et al. 2012).

1.6.3.2 Μη στοχευμένη ανθεκτικότητα (Non-Target site resistance)

Με τους γενικότερους μηχανισμούς αποτοξίνωσης που διαθέτει το φυτό απέναντι στο glyphosate, η κατάληξη είναι να φθάνει μια μη θανατηφόρα δόση

του ζιζανιοκτόνου πάνω στο ένζυμο-στόχο, που όπως αναφέρθηκε είναι το EPSPS. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν:

α) Μειωμένη απορρόφηση από το φυτό και μειωμένη μετακίνηση του ζιζανιοκτόνου εντός του φυτού. Παραμονή του glyphosate στο σημείο εφαρμογής (De Prado et al. 2005; Vila-Aiub et al. 2012),

β) Μεταφορά και απομόνωση του ζιζανιοκτόνου σε κυτταρικά οργανίδια όπως είναι το χυμοτόπιο (διαμερισματοποίηση), όπου το glyphosate παραμένει ανενεργό (Ge et al. 2010) και

γ) Γρήγορο μεταβολισμό του ζιζανιοκτόνου, οπότε το μόριο του glyphosate διασπάται και παράγονται μεταβολίτες που είναι αβλαβείς για το φυτό (Busi et al. 2011; de Carvalho et al. 2012; De Prado et al. 2005; Gonzalez-Torralva et al. 2012).

1.6.3.2.1 Μεταφορά και απομόνωση του glyphosate στο χυμοτόπιο

Στη διαδικασία μεταφοράς και απομόνωσης του glyphosate στο χυμοτόπιο βασικό ρόλο παίζουν οι *μεταφορείς ABC*. Οι μεταφορείς αυτοί ανήκουν σε μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες πρωτεϊνών και δρουν στη μεταφορά των ενώσεων στις κυτταρικές μεμβράνες ενώ εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών. Έτσι, οι εφαρμογές που βρίσκουν στη βιοτεχνολογία είναι πάρα πολλές, συμπεριλαμβανομένης της συνεισφοράς για την αντιμετώπιση του καρκίνου, της αντοχής στα φάρμακα (π.χ αντιβιοτικά), και της ανάπτυξης ανθεκτικότητας διαφόρων φυτικών ειδών στα ζιζανιοκτόνα. Επιπλέον, τα φυτά φαίνεται να φιλοξενούν την μεγαλύτερη ποικιλία γονιδίων-*μεταφορέων ABC* σε σύγκριση με οποιοδήποτε άλλο οργανισμό (Lane et.al, 2016). Οι *ABC μεταφορείς* εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, μεταφέροντας, είτε εξωτερικά στο πλάσμα είτε εσωτερικά μέσα στο χυμοτόπιο, πιθανά τοξικές για το φυτό ουσίες και λιπίδια, προδίδοντας ανεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα και αντιγόνα, καθώς επίσης διαμορφώνουν τη δραστηριότητα διαφόρων ιόντων (Martinoia et.al, 2001).

Μετά την εφαρμογή του glyphosate έχει παρατηρηθεί υπερ-έκφραση γονιδίων-μεταφορέων που σχετίζονται με την διαμερισματοποίηση του glyphosate στα χυμοτόπια (Shaner 2009). Ένας τέτοιος *μεταφορέας ABC*

εμπλέκεται στη μεταφορά glyphosate κατά μήκος του τονοπλάστη (Yuan et.al.,2010).

Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας για τα ανθεκτικά φυτά στο glyphosate, φανερώνει μια κληρονομούμενη ικανότητα των φυτών αυτών να απομονώνουν το ζιζανιοκτόνο στο χυμοτόπιο των κυττάρων τους, όπου, κατά πάσα πιθανότητα, παραμένει εκεί επ 'αόριστον ή απελευθερώνεται με αργό ρυθμό. Οι μέχρι τώρα παρατηρήσεις υποδεικνύουν πως ο τρόπος που το glyphosate συμπεριφέρεται, κυρίως στο χυποτόπιο ανθεκτικών φυτών *Conyza sp.*, είναι παρόμοιος με τις αναφορές σχετικά με τον τρόπο δράσης του συστήματος μεταφοράς *ABC μεταφορέων* για αποτοξίνωση (Ge et.al.,2010). Η λειτουργική ικανότητα του glyphosate στον τονοπλάστη υπάρχει και σε ευαίσθητα είδη *Conyza sp.*, αλλά είναι δραματικά χαμηλότερη σε σύγκριση με τα ανθεκτικά, υποδηλώνοντας υπερέκφραση ή αναπροσαρμογή του *ABC μεταφορέα* (Ge et.al.,2010). Σε μελέτη που έγινε στο φυτικό είδος *Conyza canadensis* από τους Tanii et.al το 2015, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η επαγωγή του μηχανισμού ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο glyphosate συνδυάζει ταυτόχρονα την επαγωγή των γονιδίων *EPSPS* και *ABC-μεταφορέων*. Αντίθετα, στην ίδια μελέτη, η αλληλούχιση του γονιδίου *EPSPS* για τον ανθεκτικό βιότυπο δεν αποκάλυψε καμία σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 106 της προλίνης, υποδηλώνοντας ότι ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στην περίπτωση αυτή δεν οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη.

1.6.4 Αναδρομή στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας της ήρας στο glyphosate

Σύμφωνα με παλαιότερες επιστημονικές μελέτες, καμία περίπτωση ανθεκτικότητας στο glyphosate δεν είχε αναφερθεί ακόμη και είκοσι χρόνια μετά την χρήση του (Powles et.al 1998). Μερικά χρόνια αργότερα εντοπίστηκε ανθεκτικότητα στο glyphosate σε αρκετές χώρες. Δύο ανεξάρτητες περιπτώσεις ανθεκτικών στο glyphosate *Lolium rigidum* (Gaud.) βιοτύπων αναφέρθηκαν στην Αυστραλία και μερικές ακόμη στην California των ΗΠΑ. Επιπρόσθετα, η εξελιγμένη ανθεκτικότητα στο glyphosate εμφανίστηκε σε πληθυσμούς *Eleusine indica* από τη Μαλαισία και στην *Conyza canadensis* στο Delaware των ΗΠΑ (Lorraine-Colwill et.al, 2002). Επιπλέον σε παρόμοια ερευνητική εργασία κάποια χρόνια αργότερα, δύο πληθυσμοί *L. multiflorum* ανθεκτικοί στο

glyphosate εντοπίστηκαν, συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν για την ανθεκτικότητα στο glyphosate, ένας από τη Χιλή και ένας από το Oregon των ΗΠΑ. Από την μελέτη αυτή προέκυψε πως η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στο glyphosate στο *L. multiflorum* οφείλεται σε δύο διαφορετικούς μηχανισμούς, ο πρώτος αφορά στην ανάπτυξη της μη στοχευμένης ανθεκτικότητας (non target-site resistance) και της στοχευμένης ανθεκτικότητας (target-site resistance) (Perez-Jones et.al, 2007). Από τότε έως και σήμερα το πρόβλημα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας της ήρας στο glyphosate συνεχίζει να υφίσταται ολοένα και περισσότερο, πολυάριθμες μελέτες που δημοσιεύονται ετησίως με προσανατολισμό τη διερεύνηση της στοχευμένης και μη ανθεκτικότητας.

1.7 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Το *L. rigidum* είναι το δεύτερο σε σημαντικότητα αγρωστώδες ζιζάνιο μετά την αγριοβρώμη και το συναντάμε σε καλλιεργήσιμες και μη περιοχές. Είναι ένα σημαντικός εχθρός των χειμερινών σιτηρών και δημιουργεί προβλήματα με σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο για τις περιοχές που απαντάται. Έχουν πολύ συχνά αναφερθεί και καταγραφεί προβλήματα των καλλιεργητών όσον αφορά την αδυναμία ή τη μερική μόνο αποτελεσματικότητα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για να αντιμετωπιστεί το ζιζάνιο (και ιδιαίτερα της χημικής μεθόδου αντιμετώπισης). Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας πέντε πιθανά ανθεκτικών βιότυπων του ζιζανίου και ενός πιθανά ευαίσθητου βιότυπου ήρας έναντι του ζιζανιοκτόνου glyphosate, με την διερεύνηση της μη-στοχευμένης ανθεκτικότητας και τη μελέτη του γονιδίου EPSPS, καθώς και με την διερεύνηση της στοχευμένης ανθεκτικότητας σε δύο βιότυπους ήρας, έναν πιθανά ανθεκτικό και έναν πιθανά ευαίσθητο, μέσω της μελέτης έκφρασης τεσσάρων γονιδίων που με βάση τη δημοσιευμένη βιβλιογραφία, φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη μηχανισμών ανθεκτικότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σχεδιασμός και εγκατάσταση πειράματος

Το πείραμα εγκαταστάθηκε στον αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στον αγρό του εργαστηρίου Γεωργίας. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε φυτά ανά βιότυπο τα οποία ήταν τοποθετημένα σε γλάστρες ανά βιότυπο και ανά μεταχείριση, ενώ το πειραματικό σχέδιο που ακολουθήθηκε ήταν το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (ΕΤΣ). Στο παρόν πείραμα έγινε δειγματοληψία από φύλλα τεσσάρων βιοτύπων του ζιζανίου *L. rigidum* στα οποία εφαρμόστηκε διαφυλλικός ψεκασμός με συνιστώμενη δόση Χ ($X = 720 \text{ g. a.i. ha}^{-1}$) από το ζιζανιοκτόνο glyphosate, όταν τα φυτά βρίσκονταν σε αναπτυξιακό στάδιο περίπου των έξι εβδομάδων από τη σπορά, και σε φύλλα ζιζανίων *L. rigidum* από τους ίδιους τέσσερις βιότυπους, τα οποία δεν δέχθηκαν καμία μεταχείριση με το ζιζανιοκτόνο (control). Κάθε μία μεταχείριση αποτελούνταν από τρεις επαναλήψεις ανά βιότυπο.

Στις 4/12/2018 και ώρα 11.30 π.μ. εφαρμόστηκε ο ψεκασμός με το ζιζανιοκτόνο glyphosate. Ακολούθησε δειγματοληψία στις τρεις, στις έξι και στις δώδεκα ώρες μετά τον ψεκασμό. Για κάθε χρονικό σημείο όπου πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία, συλλέχθηκε ιστός από πέντε διαφορετικά φυτά ανά βιότυπο. Αμέσως μετά από κάθε δειγματοληψία, τα φυτικά δείγματα τοποθετούνταν σε ξεχωριστά σακουλάκια αλουμινίου μέσα σε ειδικά μονωτικά κυτία με πάγο και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε βαθιά κατάψυξη -80°C , έτσι ώστε να αποφευχθεί η αλλοίωση του φυτικού ιστού. Στο παρακάτω πίνακα 4 αναφέρονται οι βιότυποι που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα καθώς και η ανθεκτικότητα ή μη στο glyphosate που παρουσίασαν σε προγενέστερες μελέτες (Travlos, personal communication).

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της στοχευμένης και της μη στοχευμένης ανθεκτικότητας παρουσιάζονται στο πίνακα 5, τα οποία αναλυθήκαν με τις μεθοδολογίες που περιγράφονται παρακάτω. Αρκετή έρευνα για τους βιότυπους που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή έχει γίνει έως σήμερα σχετικά με τους μηχανισμούς ανάπτυξης ανθεκτικότητας που διαθέτουν μέσω διαφόρων τεχνικών και χημικών αναλύσεων (Cheimona et.al.,

2019; Travlos, et.al, 2018; Fernandez-Moreno et.al, 2017), ωστόσο η παρούσα εργασία εστιάζει περισσότερο στο μοριακό επίπεδο ανάλυσης των μηχανισμών αυτών.

Πίνακας 4: Οι βιότυποι στους οποίους έγινε δειγματοληψία στις τρεις, στις έξι και στις δώδεκα ώρες μετά τον ψεκάσμό καθώς και η ανθεκτικότητα ή μη στο glyphosate που παρουσίασαν σε προγενέστερες μελέτες (Travlos, personal communication).

ΒΙΟΤΥΠΟΣ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ/ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΟ GLYPHOSATE
Ιταλικός	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
70	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
27	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ
21	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Πίνακας 5: Οι βιότυποι που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση ύπαρξης στοχευμένης και μη ανθεκτικότητας.

ΒΙΟΤΥΠΟΣ	Διερεύνηση στοχευμένης ανθεκτικότητας	Διερεύνηση μη-στοχευμένης ανθεκτικότητας
Ιταλικός	μελετήθηκε	-
70	μελετήθηκε	-
27	μελετήθηκε	μελετήθηκε
21	μελετήθηκε	μελετήθηκε

2.2 Η απομόνωση του RNA

Πριν την απομόνωση του RNA, τα ακρορύγχια (tips), οι μικροσωληνίσκοι (Eppendorf tubes) και τα λοιπά εργαλεία (σπάτουλες, λαβίδες, γουδιά, γουδοχέρια κλπ.) αποστειρώθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία με χρήση της χύτρας αποστείρωσης. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε απαγωγό εστία με

σκοπό την αποφυγή εισπνοής των χημικών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

Η διαδικασία απομόνωσης του RNA για κάθε δείγμα είναι η ακόλουθη (μέθοδος NucleoZol):

- Λειοτριβήση φυτικού ιστού βάρους περίπου 0,1 g σε γουδί με συνεχή προσθήκη υγρού αζώτου ώστε ο ιστός να μην αποψυχθεί. Τοποθέτηση του λειοτριβημένου φυτικού ιστού (σκόνης) με χρήση σπάτουλας σε μικροσωληνίσκο όγκου 1.5mL, όπου στη συνέχεια τοποθετήθηκε 1mL έτοιμο διάλυμα NucleoZOL. Ακολούθησε ανακίνηση του μικροσωληνίσκου με ήπιο VORTEX.
- Προσθήκη 400μl νερού (H₂O) σε κάθε μικροσωληνίσκο και ήπια ανακίνηση με το χέρι για 15".
- Τα δείγματα παραμένουν σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου για 30'.
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε ψυχόμενη φυγόκεντρο ρυθμισμένη στα 12000G, στους 4°C για 15'.
- Παραλαβή του υπερκείμενου υγρού, όγκου περίπου 1ml σε νέο μαρκαρισμένο μικροσωληνίσκο και προσθήκη 5μl 4-bromoanisole. Στη συνέχεια γίνεται ήπια ανάμειξη με το χέρι για 15".
- Τα δείγματα αφήνονται ξανά σε ηρεμία και σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου για 15'.
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε ψυχόμενη φυγόκεντρο ρυθμισμένη στα 12.000G, στους 4°C για 10'.
- Παραλαβή 750μl υπερκείμενου σε νέο μικροσωληνίσκο (1,5 ml) και προσθήκη 750μl ισοπροπανόλης.
- Στη συνέχεια, τα δείγματα αφήνονται πάλι σε ηρεμία και σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου για 10' και έπειτα τοποθετούνται πάλι σε ψυχόμενη φυγόκεντρο ρυθμισμένη στα 12.000G, στους 4 °C για 10'.

- Ακολουθεί πλύσιμο του pellet που έχει σχηματιστεί με 500 μl από 75% αιθανόλη και στη συνέχεια φυγοκέντριση στα 6.000G, στους 4 °C για 2'.
- Επανάληψη του βήματος 10.
- Απομακρύνεται η αιθανόλη και τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν με τον αέρα, μέσα στην απαγωγό εστία, έτσι ώστε να εξαππμιστεί όλη η ποσότητα αιθανόλης, για περίπου 5'-7'.
- Τέλος συμπληρώνουμε στους μικροσωληνίσκους των δειγμάτων όγκο νερού 300 μl στον κάθε ένα και ζεσταίνουμε σε υδατόλουτρο για 10' στους 55°C.

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

2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του RNA

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του RNA των δειγμάτων μας έγινε:

α) Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του εκλούμενου RNA έγινε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου Nanodrop 1000 και του λογισμικού N.D.-1000 v 3.3.1.

Με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου έγινε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος στα 230, 260 και 280 nm. Η καθαρότητα του κάθε δείγματος εκτιμήθηκε από το λόγο A260/A280 ο οποίος και δείχνει την επιμόλυνση με πρωτεΐνες, και από το λόγο A260/A230 ο οποίος δείχνει την επιμόλυνση με υψηλή συγκέντρωση αλάτων ή φαινολικών ουσιών. Οι αποδεκτές τιμές για το λόγο A260/A280 κυμαίνονται από 1.8 έως 2.1, ενώ οι αποδεκτές τιμές για το λόγο A260/A230 είναι γύρω στο 2.1 με 2.3. Γενικά στην κοινή εργαστηριακή πρακτική, δείγματα DNA και RNA με A_{260} / A_{280} και $A_{260} / A_{230} > 1.8$ θεωρούνται κατάλληλα για χρήση στις μοριακές αναλύσεις (πηγή: https://www.neb.com//media/catalog/applicationnotes/mvs_analysis_of_na_co

c)

Όσον αφορά τη διαδικασία χρήσης του φασματοφωτόμετρου, συνοπτικά είναι η εξής: Από το παράθυρο εργασιών του πίνακα του λογισμικού N.D. - 1000 v 3.3.1. έγινε η επιλογή στη ρύθμιση νουκλεοτίδια (nucleic acids), RNA(RNA-40). Η μέτρηση του κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε τοποθετώντας στο «βάθρο» (υποδοχή) του φασματοφωτόμετρου 1.0 μL δείγματος RNA και πατώντας την ένδειξη MEASUREMENT στο παράθυρο εργασιών. Κάθε φορά γινόταν, πριν την τοποθέτηση επόμενου δείγματος, καθαρισμός του «βάθρου» ώστε να μην υπάρξει κάποια πρόσμιξη και αλλοίωση των αποτελεσμάτων.

β) Με την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης με gel αгарόζης.

Προετοιμασία του gel

- Σε μια κωνική φιάλη προστίθενται:
 - 100 ml από 1X TBE Buffer (Tris/Borate/EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)).
 - 0,8 g αгарόζης
- Η κωνική φιάλη θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων, έτσι ώστε το διάλυμα να γίνει απόλυτα διαυγές.
- Στη συνέχεια προστίθενται στην κωνική 4-6 μl χρωστικής **MIDORIGreen Advance**, η οποία αποτελεί μια ασφαλή εναλλακτική λύση σε σχέση με το παραδοσιακό βρωμιούχο αιθίδιο . Είναι μη καρκινογόνα και λιγότερο μεταλλαξιγόνα χρωστική για την ανίχνευση dsDNA, ssDNA και RNA σε πηκτική αгарόζης με πολύ υψηλή ευαισθησία. Το MIDORIGreen Advance μπορεί να χρησιμοποιηθεί με υπεριώδη ακτινοβολία (UV).
- Το διάλυμα τοποθετείται στην ειδική φόρμα της συσκευής ηλεκτροφόρησης, ώστε να πάρει το επιθυμητό σχήμα και να σχηματιστούν τα επιθυμητά «πηγάδια» στα οποία θα τοποθετηθούν τα δείγματα, και αφήνεται να κρυώσει.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στην πηκτική αгарόζης μαζί με ειδική μπλε χρωστική ουσία (3μl δείγμα+ 2μl χρωστικής).
- Αφήνουμε το gel να «τρέξει» στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για τουλάχιστον 30'-40'.

Στο τέλος γίνεται η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσα σε σκοτεινό δωμάτιο με την βοήθεια λάμπας UV και του προγράμματος GELCAPTURE, στην οθόνη του υπολογιστή, με σκοπό να επιβεβαιωθεί έχει απομονωθεί RNA προϊόν καλής ποιότητας.

2.4 Καθαρισμός απομονωμένων RNA δειγμάτων

Μετά την μέτρηση της συγκέντρωσης RNA διαπιστώθηκαν ορισμένα 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-ισοαμυλικής αλκοόλης με αναλογία 25:24:1
- Χρήση Vortex και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καινούρια σωληνάρια
- Προσθήκη 1 όγκου χλωροφορμίου (50 μl)
- Ακολούθησε Vortex και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καινούρια σωληνάρια
- Προσθήκη μισού όγκου (50 μl) NaOAc 3M και 2 (200μ) όγκων 100% EtOH
- Παραμονή των δειγμάτων όλη τη νύχτα στους -80 °C.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4°C
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Ξέπλυμα του ιζήματος με 100-150μl 75% αιθανόλη (EtOH) παγωμένη
- Στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4°C
- Και τέλος, παρέμειναν τα σωληνάρια με ανοιχτά τα καπάκια για στέγνωμα του pellet.
- Επαναδιάλυση σε 50μl καθαρού νερού 65 °C

Μετά τον καθαρισμό των δειγμάτων ακολουθήθηκε ξανά η διαδικασία ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του RNA, όπως περιεγράφηκε παραπάνω στην ενότητα 2.3.

2.5 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης για τη δημιουργία cDNA

Η επιλογή του τρόπου με τον οποίο θα γίνει η απομόνωση του γενετικού υλικού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το είδος του φυτικού οργάνου που επιθυμούμε να απομονώσουμε και τον τρόπο με τον οποίο θέλουμε να χειριστούμε το απομονωμένο γενετικό υλικό.

Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια εξαρτώμενη από το RNA, DNA πολυμεράση, η οποία καταλύει τη σύνθεση του DNA χρησιμοποιώντας RNA ως πρότυπο (εκμαγείο). Το τελικό προϊόν είναι γνωστό ως συμπληρωματικό DNA (cDNA), είναι δηλαδή μια μονόκλωνη αλληλουχία DNA, συμπληρωματική του mRNA του φυτού. Το cDNA δεν υπόκειται σε αποικοδόμηση λόγω δράσης της RNase, καθιστώντας το πιο σταθερό από το RNA (Daniel, 2009.)

Στη παρούσα εργασία έγινε παρασκευή cDNA όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Το πρώτο βήμα πριν να ξεκινήσει η παρασκευή του cDNA είναι ο υπολογισμός του όγκου του κάθε δείγματος RNA που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση RNA 0,5 µg για κάθε αντίδραση παρασκευής cDNA.
- Τα υλικά των αντιδράσεων για την κατασκευή του cDNA περιέχονται στο “PrimeScript™ RT Reagent KIT with gDNA Eraser” της TAKARA BIO INC.
- Όλα τα υλικά (δείγματα RNA, υλικά των αντιδράσεων από το KIT) βρίσκονται πάντα μέσα σε πάγο κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας.

Υπολογίστηκε για κάθε δείγμα ο όγκος RNA που απαιτείται ώστε να υπάρχει αρχική συγκέντρωση RNA ίση με 0,5µg. Στον Πίνακα 6, παρακάτω, φαίνονται οι συγκεντρώσεις του RNA των δειγμάτων καθώς και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν απ’ το καθ’ ένα για την παρασκευή του cDNA.

Πίνακας 6: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του cDNA, οι συγκεντρώσεις RNA τους μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό των δειγμάτων, καθώς και η ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία του cDNA.

Δείγμα	RNA (ng/uL)	Όγκος RNA/ δείγμα (μl)	Όγκος H ₂ O/ δείγμα (μl)
IT Δ.1	97,6	5	2
IT Δ.2	77,9	6,5	0,5
70 Δ.1	112,8	5	2
27 Δ.1	165,6	3	4
27 Δ.2	401,9	1,25	5,75
21 Δ.1	105,4	5	2
21 Δ.2	125,5	4	3
21 Δ.3	97,8	5,2	1,8

Στην αρχή της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε η απομάκρυνση του γενωμικού DNA που τυχόν υπήρχε στα δείγματα του RNA σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (step 1):

- 5X gDNA Eraser Buffer: 2μL
- gDNA Eraser: 1μL
- Total RNA: ~ 0,5μg.
- RNase Free dH₂O: ΧμL.
- TOTAL SOLUTION: 10μL.

* Τα δύο πρώτα συστατικά της αντίδρασης αποτελούν το MasterMix 1, η ποσότητά τους υπολογίζεται για όλα τα δείγματα cDNA που θα κατασκευαστούν και στη συνέχεια μοιράζονται από 3μL. του MM1 σε κάθε

μικροσωληνίσκο. Το RNA προστίθεται τελευταίο στη σειρά και ακολουθεί καλό πιπτετάρισμα για καλή ανάμειξη των υλικών.

Στη συνέχεια, μεταφέρονται (πάντα μέσα σε τριμμένο πάγο) στο θερμοκυκλοποιητή όπου και παραμένουν σε θερμοκρασία 42°C για 3 λεπτά. Αφού παρέλθει ο χρόνος αυτός, οι μικροσωληνίσκοι τοποθετούνται πάλι μέσα στον πάγο για συνέχιση της διαδικασίας. Η απομάκρυνση του γενωμικού DNA έχει ολοκληρωθεί.

Μετά την επιτυχή απομάκρυνση του γενωμικού DNA, η διαδικασία συνεχίζεται με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription- RT), όπου χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά (step 2):

- Reaction solution from Step 1: 10μL.
- 5X PrimeScript Buffer 2 (for Real Time): 4μL.
- PrimeScript RT Enzyme Mix 1: 1μL.
- RT Primer Mix: 1μL.
- RNase Free dH₂O: 4μL.
- TOTAL SOLUTION: 20μL.

** Τα τελευταία αυτά συστατικά αποτελούν το MasterMix 2 (MM2), η ποσότητά τους υπολογίζεται συνολικά για όλα τα δείγματα cDNA που θα κατασκευαστούν και στη συνέχεια μοιράζεται ποσότητα MM2 ίση με 10μL/δείγμα. Ακολουθεί καλή ανάδευση με την βοήθεια της πιπέτας.

Στη συνέχεια, οι μικροσωληνίσκοι μεταφέρονται εκ νέου στο θερμοκυκλοποιητή όπου και παραμένουν σε θερμοκρασία 37°C. για 15 λεπτά. Αφού περάσει αυτός ο χρόνος, η διαδικασία μέσα στο θερμοκυκλοποιητή τελειώνει με την παραμονή των μικροσωληνίσκων για άλλα 5 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 85°C.

Με την αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε η κατασκευή των cDNAs. Οι μικροσωληνίσκοι με τα δείγματα παραμένουν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την επαναχρησιμοποίησή τους.

2.6 Επιλογή των εκκινήτων για αλληλούχιση

Έπειτα από εκτενή έρευνα στην ήδη υπάρχουσα δημοσιευμένη βιβλιογραφία, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν εκκινήτες οι οποίοι είχαν

χρησιμοποιηθεί και στο πρόσφατο παρελθόν για το σκοπό αυτό, για την ανίχνευση δηλαδή της στοχευμένης ανθεκτικότητας στο glyphosate στο *L. rigidum* και πιο συγκεκριμένα στην προλίνη 106 του γονιδίου *EPSPS*. Οι εκκινητές λοιπόν οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν, πάρθηκαν από την δημοσιευμένη εργασία των Kaundun et. al., 2011 και είναι οι ακόλουθοι:

Ersps πρόσθιος εκκινητής→ 5' TCTTCTTGGGGAACGCTGGA 3'

Ersps ανάστροφος εκκινητής→ 5' TAACCTTGCCACCAGGTAGCCCTC 3'

2.7 Προετοιμασία και εκτέλεση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Η προετοιμασία των δειγμάτων καθώς και η διαδικασία εκτέλεσης των κύκλων της αντίδρασης βασίστηκαν στην δημοσιευμένη εργασία των Kaundun, et.al., 2011.

Προετοιμασία δειγμάτων:

Σε μικροσωληνίσκους των 0,2ml τοποθετήθηκαν:

- **3μl cDNA** δείγματος, 50ng
- **22μl Master Mix** το οποίο περιείχε τα παρακάτω:
 - 2mM MgCl₂
 - 0,2mM dNTPs
 - 0,2mM από κάθε εκκινητή
 - 1X Buffer με Mg
 - 0.625 units ένζυμο πολυμεράσης
 - H₂O, τόσο ώστε ο **τελικός όγκος** ανά δείγμα να είναι **25 μl**.

Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή και το πρόγραμμα το οποίο τους εφαρμόστηκε ήταν ρυθμισμένο ως εξής:

1. Ένας κύκλος στους 95°C για 5'
2. 40 κύκλοι με τα εξής στάδια:
 - 95°C για 30''
 - 60°C για 30''
 - 72°C για 2'

3. Τελευταίος κύκλος στους 72oC για 10'

Μετά το πέρας της διαδικασίας τα δείγματα τοποθετούνται σε κατάψυξη σε συνθήκες θερμοκρασίας -20 °C.

2.8 Έλεγχος τελικού προϊόντος

Πριν σταλούν τα υπό μελέτη δείγματα για αλληλούχιση, γίνεται έλεγχος του προϊόντος της PCR, και οπτικοποίηση αυτού, με την βοήθεια της ηλεκτροφόρησης με πηκτή αγαρόζης.

Η διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω (παράγραφος 2.3) με μόνη διαφορά την τοποθέτηση στο πρώτο πηγάδι της σειράς, ενός DNA Ladder, ή αλλιώς μιας «σκάλας» DNA . Ο DNA Ladder είναι ένα σύνολο πρότυπων μορίων και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών τα οποία «μετακινούνται» μέσω την πηκτής αγαρόζης και την δημιουργία ενός ηλεκτρομαγνητικού πεδίου από την άνοδο στην κάθοδο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, βασισμένα στην αρχή πως το μοριακό βάρος είναι αντιστρόφως ανάλογο του ρυθμού μετανάστευσης μέσω μιας πηκτής αγαρόζης και επομένως τα μόρια με μεγαλύτερο μοριακό βάρος είναι αυτά που εμφανίζονται στις πιο πάνω ζώνες, ενώ αντίθετα τα μόρια με μικρότερο μοριακό βάρος «τρέχουν» γρηγορότερα, μιας και μπορούν να μετακινηθούν πιο εύκολα, με αποτέλεσμα να οπτικοποιούνται ως οι πιο κάτω ζώνες της πηκτής αγαρόζης (μικρότερου μοριακού βάρους). Επιπλέον με την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης γίνεται και έλεγχος για το αν έγινε επιτυχημένος πολλαπλασιασμός του υπό μελέτη τμήματος DNA.

Τέλος, μετά την διεξαγωγή όλων των παραπάνω διαδικασιών, τα δείγματά μας στάλθηκαν για αλληλούχιση. Επιπλέον έγινε μελέτη της μη στοχευμένης ανθεκτικότητας για δύο βιοτύπους ήρας, έναν πιθανά ανθεκτικό και έναν πιθανά ευαίσθητο στο ζιζανιοκτόνο glyphosate (Πίνακες 4,5). Τα αποτελέσματα των πειραματικών αυτών διαδικασιών αναφέρονται στο κεφάλαιο 3.

2.9 Επιλογή γονιδίων για την Real Time PCR

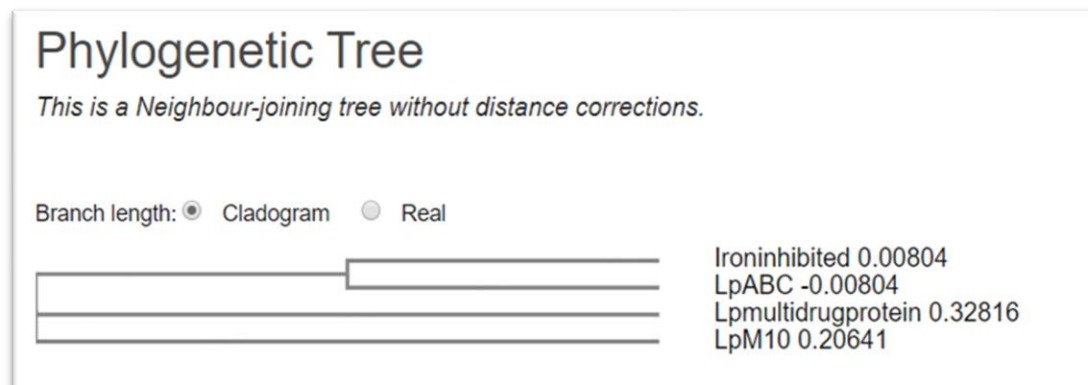
Η PCR χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του προϊόντος της σύνθεσης cDNA για δύο υπό μελέτη βιότυπους. Τον βιότυπο 21, που θεωρείται πιθανά

ανθεκτικός και τον βιότυπο 27 που θεωρείται πιθανά ευαίσθητος. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές του γονιδίου αναφοράς *cinnamoyl-CoA reductase* (CCR). Το γονίδιο αυτό εκφράζεται συστηματικά και υπάρχει ως μονό αντίγραφο στην ήρα (Salas et al. 2012).

Μετά από εκτεταμένη έρευνα στην υπάρχουσα δημοσιευμένη βιβλιογραφία (Byrne et.al., 2010, Salas et.al. 2015, Tani et al., 2015) και στη βάση δεδομένων NCBI, αποφασίστηκε η επιλογή γονιδίων που ανήκουν στην κατηγορία *ABC μεταφορέων*. Ο λόγος για τον οποίο έγινε αυτή η επιλογή γονιδίων, είναι διότι ποικίλες μελέτες υποδεικνύουν πως ο τρόπος που το glyphosate μεταφέρεται, κυρίως στο χυμοτόπιο ανθεκτικών φυτών, είναι παρόμοιος με αναφορές σχετικά με τον τρόπο δράσης του συστήματος μεταφοράς των *ABC μεταφορέων* για αποτοξίνωση (Ge et.al.,2010). Στο Παράρτημα 1 παρατίθενται τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία. Η Multidrug resistance associated πρωτεΐνη, η ABC τύπου III πρωτεΐνη, καθώς και η Iron inhibited πρωτεΐνη ανήκουν στην οικογένεια των C πρωτεϊνών, μιας ομάδας πρωτεϊνών που ονομάζονται ATP-binding cassette (ABC) μεταφορείς. Είναι κυρίως λιπόφιλοι ανιονικοί μεταφορείς και αναφέρεται ότι μεταφέρουν ουσίες (φάρμακα), όπως το glyphosate, που ποικίλουν τόσο στη δομή, όσο και σε διάφορους μηχανισμούς (Sodani et.al, 2012; Moons, 2003). Ο ABC μεταφορέας *M10* παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς έχει αναφερθεί σε ποικίλες μελέτες πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την απόκριση των φυτών σε επαγόμενη καταπόνηση που προκαλείται από την εφαρμογή ζιζανιοκτόνων και όχι ως τμήμα του μηχανισμού ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Moretti et al. 2017) και παρουσιάζει ομολογία με το αντίστοιχο γονίδιο που έχει μελετηθεί στην κόνυζα (Peng et al 2010; Tani et al 2015).

Παρακάτω, στην Εικόνα 7 απεικονίζεται το φυλογενετικό δέντρο και η γενετική συγγένεια μεταξύ των τεσσάρων υπό μελέτη γονιδίων-μεταφορέων. Όσο πιο κοντά σε μήκος είναι οι γραμμές που συνδέουν τα γονίδια μεταξύ τους, τόσο μεγαλύτερη είναι η γενετική συγγένεια μεταξύ αυτών. Όπως φαίνεται και στην εικόνα δεν υπάρχει σημαντική γενετική απόσταση μεταξύ των γονιδίων και μάλιστα τα γονίδια *Ironinhibited* και *LpABC* φαίνεται να έχουν την πιο στενή γενετική συγγένεια μεταξύ τους. Η δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου έγινε

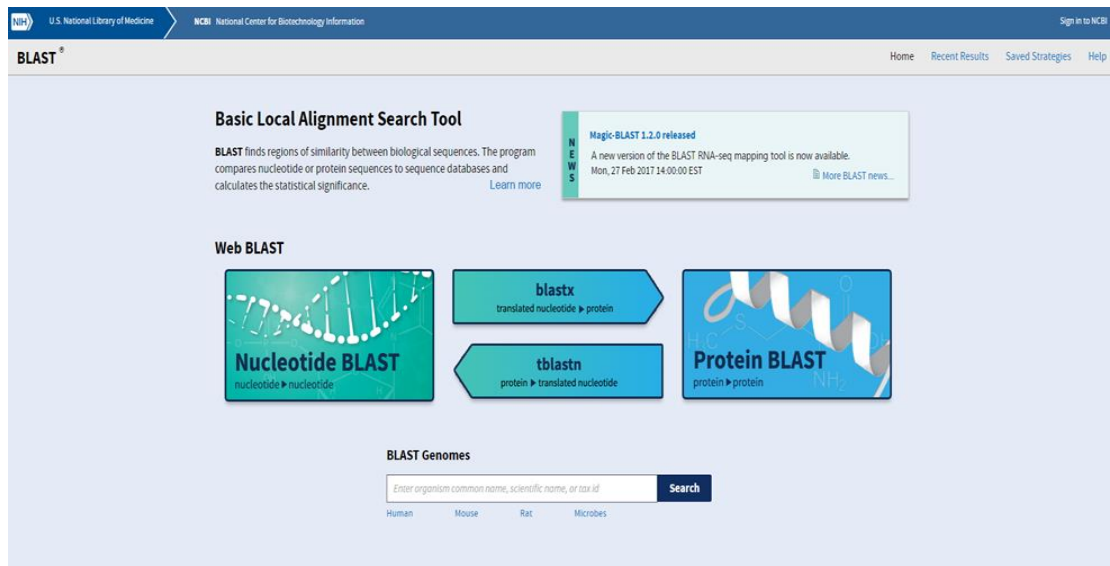
με τη βοήθεια του εργαλείου ανάλυσης δεδομένων *Multiple Sequence Alignment-Clustal Omega* του EBI.



Εικόνα 7:Φυλογενετικό δέντρο στο οποίο παρουσιάζεται η γενετική συγγένεια των τεσσάρων υπό μελέτη γονιδίων.

2.9.1. Σχεδιασμός των εκκινήτων

Για το σχεδιασμό των εκκινήτων των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες μεταφορείς, χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεταφορείς σε φυτά ρυζιού *Oryza sativa*, σιταριού *Triticum aestivum*, κόνυζας (*Conyza canadensis*) και *Aegilops tauschii subsp. tauschii*. Τις αλληλουχίες αυτές τις θέσαμε στη βάση δεδομένων του NCBI-NCBI Database-(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) , προκειμένου να βρεθεί κάποια ομολογία(ομοιότητα), κάποιο αντίστοιχο EST στο αντίστοιχο γονιδίωμα για το φυτό *L. rigidum* (Εικόνα 12).



Εικόνα 8: Blast program, NCBI Database. (Πηγή: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Κατά το σχεδιασμό των εκκινήτων (forward και reverse), δόθηκε προσοχή στα εξής:

- Οι εκκινήτες να μην υβριδίζουν με τον εαυτό τους, παρά μόνο με το τμήμα του DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε.
- Η θερμοκρασία μετουσίωσης των εκκινήτων να είναι γύρω στους 60°C.
- Να μην κάνουν loops μεταξύ τους (αριθμός loops ίσος με τη μονάδα).
- Προσοχή στη θερμοκρασία στην οποία υβριδίζουν με το DNA, η οποία θα είναι και η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινήτων με το μονόκλωνο cDNA κατά τη διαδικασία της real time-q-pcr.
- Η περιοχή που πολλαπλασιάζουν να είναι σχετικά μεγάλη ώστε το προϊόν του πολλαπλασιασμού να είναι specific. Ωστόσο, το μέγεθος του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος είναι καλό να μην ξεπερνάει τα 200bp (ζεύγη βάσεων).

Όσον αφορά το σχεδιασμό των εκκινήτων των γονιδίων που κωδικοποιούν το ένζυμο EPSPS και το ένζυμο αναφοράς για τον ενδογενή έλεγχο, CCR, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινήτες με βάση το άρθρο των Salas et al. (2012), χρησιμοποιήθηκαν δηλαδή τα ζεύγη των εκκινήτων που αναφέρονται στο εν λόγω άρθρο.

Αναλυτικά οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

Γονίδιο αναφοράς:

LpCCR-F: GATGTCGAACCAGAAGCTCCA (21)

LpCCR-R: GCAGCTAGGGTTTCCTTGTCC (21)

Γονίδια ενδιαφέροντος:

A. Lpmultidrugprotein-F: GGTCATGGACTGCGACAGAG (20)

Lpmultidrugprotein-R: CACGTCAGATGACCGGTTTG (20)

B. LpABC1-F: AGAGCTGCAAAGGCTGGTAG (20)

LpABC1-R: TCTAAGCGGAAGCAAAGCCA (20)

C. LpironinhibitedABC-F: TAAACTCCCACCACCAGTGC (20)

LpironinhibitedABC-R: TCACCGGTCATGAGCTTCAG (20)

D. LpM10-F: TATGTTGTGGCTGACACGCT (20)

LpM10-R: ATCGGCGTTGTGCAAGAAAT (20)

2.9.2 Παρασκευή των διαλυμάτων των εκκινητών

Πρώτα παρασκευάστηκαν τα διαλύματα stock και στη συνέχεια τα διαλύματα εργασίας.

2.9.3 Παρασκευή των stock solutions (διαλύματα stock) των εκκινητών

Αφού παραλήφθηκαν οι σωληνίσκοι με τους εκκινητές υπό μορφή σκόνης, έγινε προσθήκη μοριακού νερού (ελεύθερου των ενζύμων DNase και RNase), τέτοιας ποσότητας έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του κάθε εκκινητή στο τελικό διάλυμα να είναι ίση με 100pmol/μL. Σε κάθε εκκινητή προστέθηκε διαφορετική ποσότητα μοριακού νερού, ανάλογα με τις υποδείξεις της κατασκευαστικής τους εταιρίας (Eurofins Genomics). Ακολούθησε αμέσως VORTEX για καλή ανάμειξη των υλικών και αποθήκευση των σωληνίσκων στους -20°C.

2.10 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Εικόνα 9). 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 εναπομείναντα φθορισμό που εκπέμπεται από τα πηγάδια σε ένα σταθερό χρονικό διάστημα και τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στο εύρος μήκους κύματος εκπομπής. Η μελέτη της σχετικής έκφρασης γίνεται με τον υπολογισμό των $\Delta\Delta Ct$ των δειγμάτων σύμφωνα με τον τύπο $\Delta\Delta Ct = \Delta CTE - \Delta CTC$ και τον παρακάτω πίνακα 7.

Πίνακας 7: Τα δεδομένα που απαιτούνται να συμπληρωθούν έτσι ώστε να υπολογιστεί η σχετική έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων για την μέθοδο ανάλυσης $\Delta\Delta Ct$.

	Experimental Well 1	Experimental Well 2	Experimental Well 3	Control Well 1	Control Well 2	Control Well 3	Average Experimental Ct Value	Average Experimental Ct Value	Average Control Ct Value	Average Control Ct Value	ΔCt Value (Experimental)	ΔCt Value (Control)	Delta Delta Ct Value	Expression Fold Change
	Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	TE	HE	TC	HC	ΔCTE	ΔCTC	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Housekeeping Gene														
Gene being Tested														

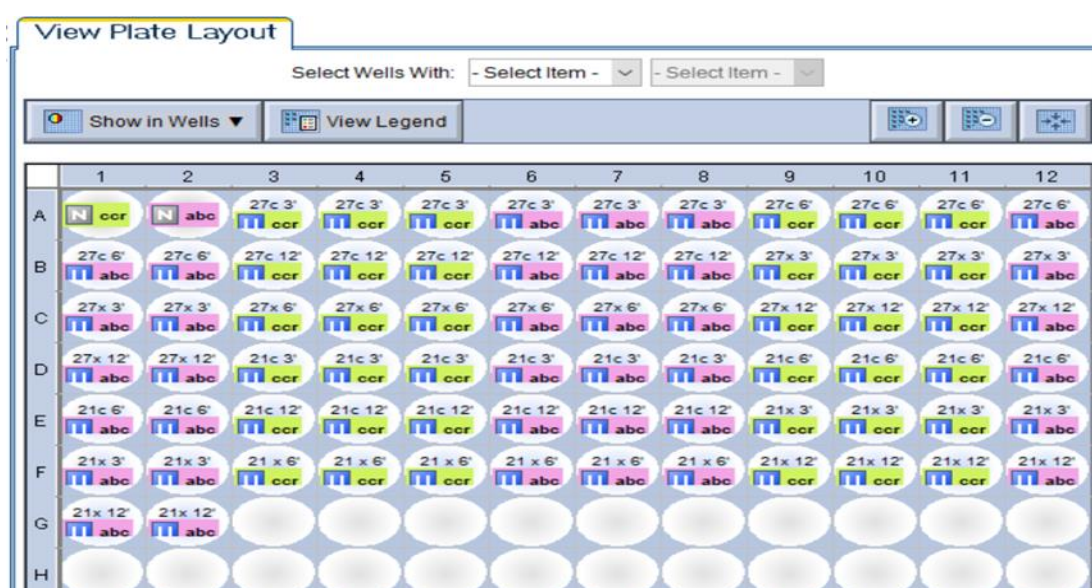


Εικόνα 9: Α: Συσκευή StepOnePlus, Real – Time PCR της AB – Applied Biosystems με Β: θήκη υποδοχής των strips για τα προς πολλαπλασιασμό δείγματα cDNAs.

Η μελέτη της σχετικής έκφρασης έγινε με την μέθοδο των σχετικών (threshold cycle) C_T κατά την οποία μπορεί να γίνει προσδιορισμός της σχετικής έκφρασης ενός γονιδίου στόχου στα δείγματα (Πίνακας 7). Μετά το πέρας της qPCR, βλέπουμε τις τιμές C_t (threshold cycle) οι οποίες είναι το σημείο τομής μεταξύ της καμπύλης ενίσχυσης και της τιμής κατωφλίου. Είναι ένας σχετικός προσδιορισμός σχετικά με το μετά από πόσους κύκλους της PCR έχουμε παραχθέν προϊόν). Τα αποτελέσματα εξάγονται σύμφωνα με την συσχέτιση ενός δείγματος αναφοράς και κανονικοποιούνται με βάση ένα ενδογενές γονίδιο αναφοράς όπου στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν το γονίδιο CCR. Δείγμα αναφοράς για τον πιθανά ανθεκτικό βióτυπο (21) ήταν το αφέκαστο δείγμα που συλλέχθηκε στις τρεις ώρες μετά τον ψεκασμό (21C3'), ενώ για τον πιθανά ευαίσθητο το αντίστοιχο (27C3'). Επίσης για την μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις και ένας μάρτυρας (negative sample) που δεν περιείχε DNA δείγματος για το κάθε γονίδιο (Εικόνα 10).

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.



Εικόνα 10: Τοποθέτηση δειγμάτων στο plate της RT-PCR για το γονίδιο ABC.

2.11 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 °C για 15 δευτερόλεπτα
 - υβριδισμός και επιμήκυνση του εκκινήτη στους 60 °C για 1 λεπτό
3. Σχηματισμός της καμπύλης όπου φανερώνει την θερμοκρασία όπου μετουσιώνονται το 50% των προϊόντων της Real-Time και την σωστή διαδικασία ποσοτικοποίησης (ποσοτικοποίηση του συγκεκριμένου προϊόντος)
 - Στους 95 °C για 15 δευτερόλεπτα
 - Στους 60 °C για 1 λεπτό
 - Και τέλος στους 95 °C για 15 δευτερόλεπτα. Από τους 60 °C μέχρι τους 95 °C κάθε 0,3 βαθμοί Κελσίου λαμβάνονται νέες τιμές για εμφάνιση των καμπύλων μετουσίωσης (melting curves).


```

L.rigidum -----FLGNAGTAMRPLTAAVVAAGGNATYVLDGVPRM 33
21sample1 QVALPCHQVALLPXHQVAXLXGHPXAFFLGNAGTAMRPLTAAVVAAGGNATYVKDGGPRX 60
***** ** **

```

- **Βιότυπος 21 δείγμα 2**

```

L.rigidum MRPLTAAVVAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGANVDCFLGTDCPPVRINGI 68
21sample2 MRPVAAAVVVEGGNPTYVKDGGPRXRKGPXXXG-----GN-----V 96
***.:***. *** ** * * * *: * . * :

```

- **Βιότυπος 21 δείγμα 3**

```

L.rigidum -----FLGNAGTAMRPLTAAVVAAGGNATYVLDGVPRMRER 36
21sample3 ALKXHRVAFLPWHQVALPGHPVAFFLGNAGTAMRPLTAAVVAAGGNATYVLDGVPRMRER 60
*****

```

- Στον ανθεκτικό Ιταλικό βιότυπο, η σιωπηλή μετάλλαξη της προλίνης στη θέση 106 από CCA σε CCG συνοδεύεται από επίσης σιωπηλή μετάλλαξη της αλανίνης στη θέση 109 από GCT σε GCG.

- Στα δείγματα των ανθεκτικών βιοτύπων 70 και 21 που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις στην προλίνη, ωστόσο η αλανίνη κωδικοποιείται σε όλα τα δείγματα με το κωδικόνιο GCA έναντι του GCT.

- Στον ευαίσθητο βιότυπο 27 η αλληλούχιση δεν μπόρεσε να δώσει κάποιο σαφές αποτέλεσμα.

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης δεν παρατηρείται καμία σημειακή μετάλλαξη στην προλίνη 106 τόσο στους ευαίσθητους όσο και στους ανθεκτικούς βιότυπους ήρας, εν αντιθέσει με σχετικές μελέτες (Fidel González-Torralva et.al.,2012)

Γενικότερα παρατηρήθηκε μία συσχέτιση μεταξύ των θέσεων 106 και 109 στην αμινοξική αλληλουχία (Πίνακας 5). Η σύνδεση συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε αυτές τις θέσεις για φυτά ανθεκτικά και ευαίσθητα, υποδηλώνει έντονα ότι η ανθεκτικότητα ξεκίνησε ανεξάρτητα περισσότερες από μία φορές (Jasieniuk et.al.,2008).

Πίνακας 8: Κωδικόνια αμινοξέων προλίνης (Pro 106) και αλανίνης (Ala 109) για τους υπό μελέτη βιότυπους (ανθεκτικούς, Resistant-R & ευαίσθητο, susceptible-(S))

ΒΙΟΤΥΠΟΣ	Pro 106 CCA	Ala 109 GCT
ΙταλικόςΔ.1(R)	CCG	GCG
ΙταλικόςΔ.2(R)	CCG	GCG
70 s1 (R)	CCA	GCA
27 s1 (S)	CCA	–
27 s2 (S)	CCA	–
21 s1 (R)	CCA	GCA
21 s2 (R)	CCA	GCA
21 s3 (R)	CCA	GCG
21 s4 (R)	CCA	GCG

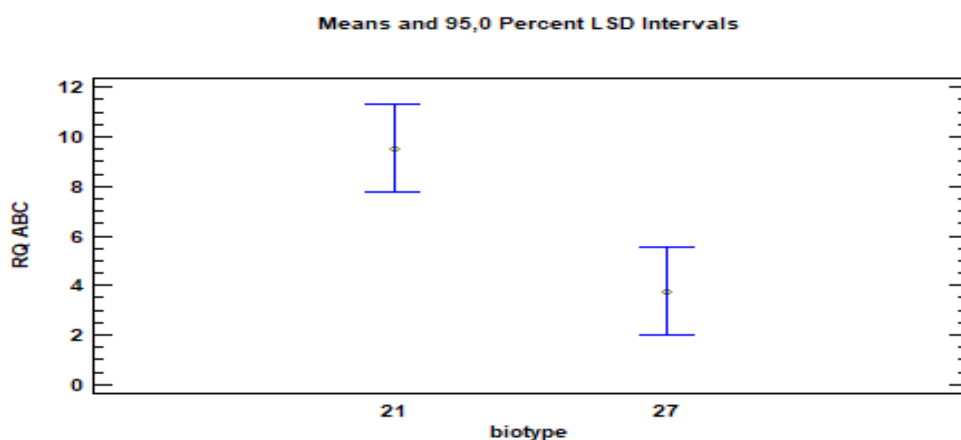
3.2 Αποτελέσματα για την διερεύνηση μηχανισμών μη-στοχευμένης ανθεκτικότητας (non-target-site resistance)

Η ανάλυση της σχετικής έκφρασης γονιδίων των αποτελεσμάτων της μη-στοχευμένης ανθεκτικότητας έγινε με δύο τρόπους, αρχικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης Relative Quantification (RQ) του *Software StetOne and StepOnePlus Real-Time PCR System Software Version 2.3* και στη συνέχεια στα δεδομένα έγινε έλεγχος ANOVA με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου ανάλυσης Statgraphics. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε η *Comparative Ct (ΔΔC_T) ανάλυση Double Delta Ct Analysis (2^{-ΔΔC_T} Method)* (Livak and Schmittgen 2001). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται παρακάτω.

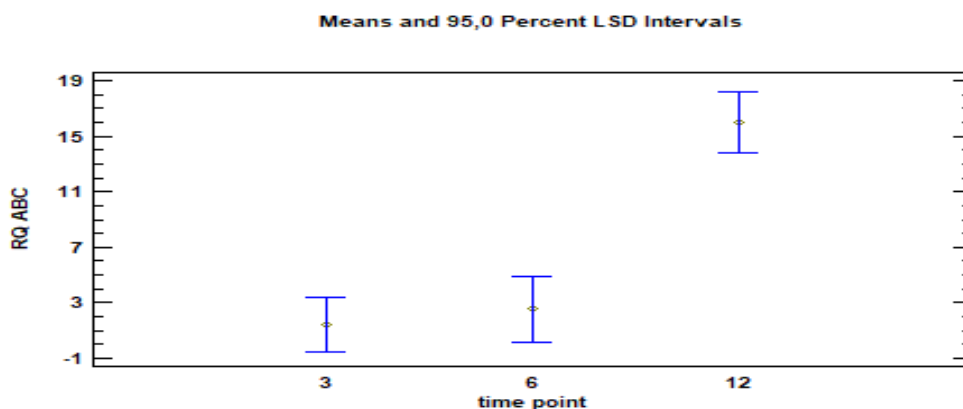
3.2.1 Ανάλυση σχετικής έκφρασης γονιδίων Relative Quantification (RQ)

3.2.1.1 Η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα ABC συναρτήσσει των τριών υπό μελέτη παραγόντων.

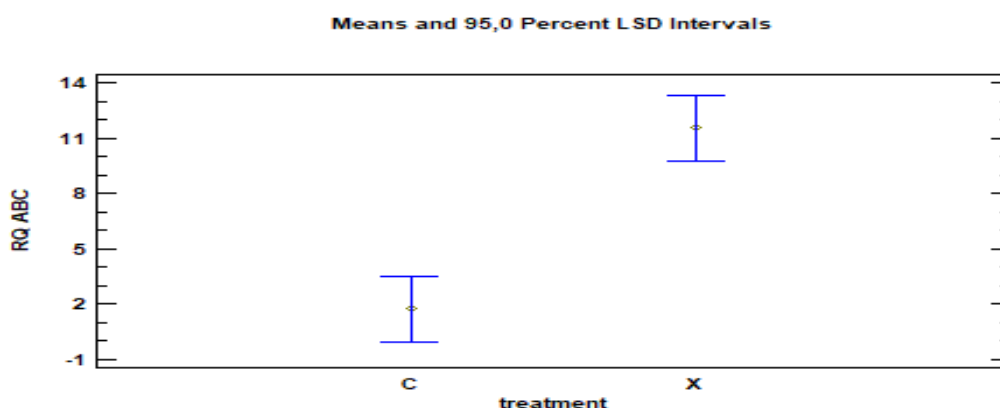
Από τα παρακάτω διαγράμματα παρατηρείται πως η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα ABC παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των υπό μελέτη βιοτύπων, με τον 21-ανθεκτικό βιότυπο να εκφράζει το γονίδιο αυτό πολύ περισσότερο συγκριτικά με τον 27-ευαίσθητο βιότυπο. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάζουν επίσης, τόσο η έκφραση του γονιδίου στις 12 ώρες μετά τον ψεκασμό, συγκριτικά με τις 3 και 6 ώρες, όσο και η έκφραση του γονιδίου στα ψεκασμένα φυτά συγκριτικά με τα αφέκαστα, στα οποία η έκφραση του γονιδίου μεταφορέα είναι σαφώς υψηλότερη. Στο παράρτημα 2 παρατίθεται οι πίνακες ανάλυσης διακύμανσης και τα test πολλαπλών συγκρίσεων που προκύπτουν απ' την μέθοδο ανάλυσης ANOVA.



Διάγραμμα 1: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα ABC για τους δύο υπό μελέτη βιοτύπους, τον 21(πιθανά ανθεκτικός) και 27(πιθανά ευαίσθητος).



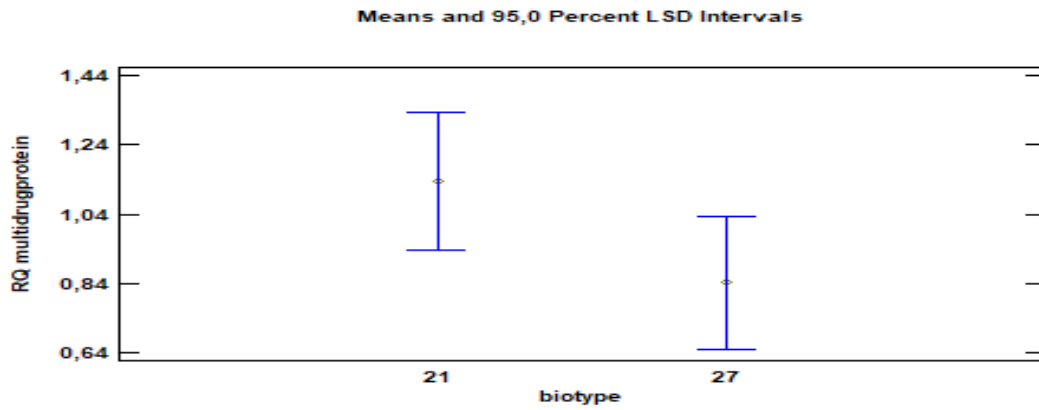
Διάγραμμα 2: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα ABC για τις τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές στις οποίες διεξήχθη η δειγματοληψία μετά τον ψεκασμό.



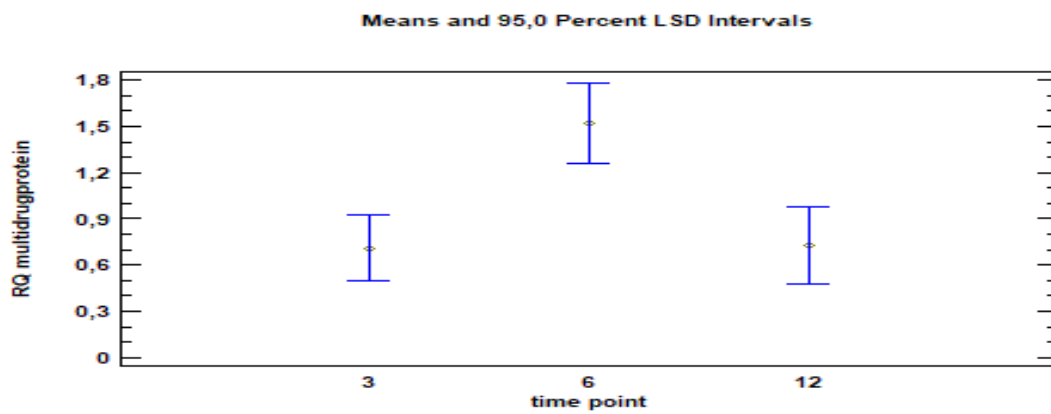
Διάγραμμα 3: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα ABC για τις δύο μεταχειρίσεις, ψεκασμένα φυτά (X) και φυτά χωρίς εφαρμογή ψεκασμού (C).

3.2.1.2 Η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Multidrugprotein συναρτήσεϊ των τριών υπό μελέτη παραγόντων.

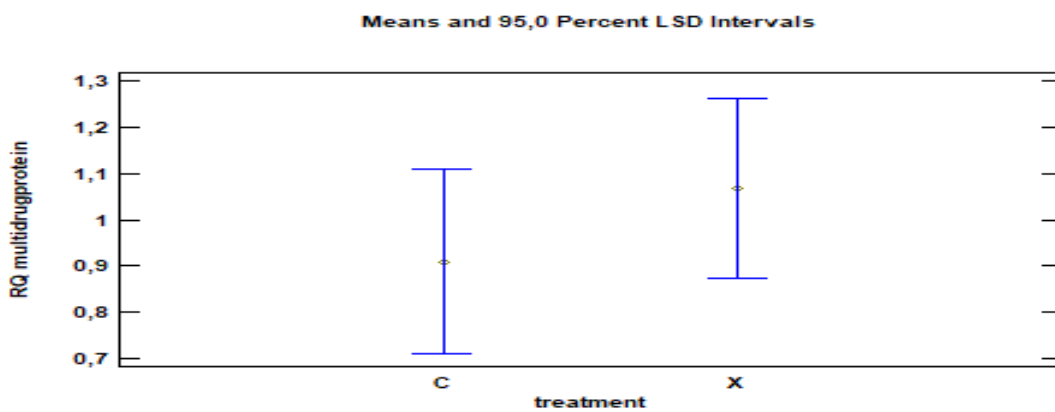
Από τα παρακάτω διαγράμματα παρατηρείται πως η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Multidrugprotein δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο μεταξύ των υπό μελέτη βιοτύπων όσο και μεταξύ των μεταχειρίσεων ψεκασμένων και μη φυτών. Η μοναδική στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρείται είναι μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών που μετρήθηκε η γονιδιακή έκφραση μετά τον ψεκασμό, με τις 6 ώρες να παρουσιάζουν την υψηλότερη γονιδιακή έκφραση, ωστόσο δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα από την παρατήρηση αυτή. Στο παράρτημα 2 παρατίθεται οι πίνακες ανάλυσης διακύμανσης και τα test πολλαπλών συγκρίσεων που προκύπτουν απ' την μέθοδο ανάλυσης ANOVA.



Διάγραμμα 4: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Multidrugprotein για τους δύο υπό μελέτη βιοτύπους, τον 21(πιθανά ανθεκτικός) και 27(πιθανά ευαίσθητος).



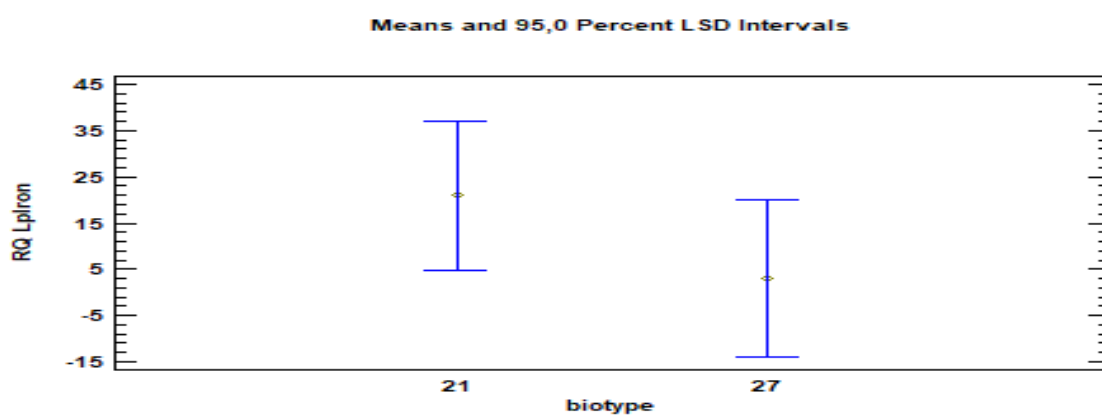
Διάγραμμα 5: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Multidrugprotein για τις τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές στις οποίες διεξήχθη η δειγματοληψία μετά τον ψεκασμό.



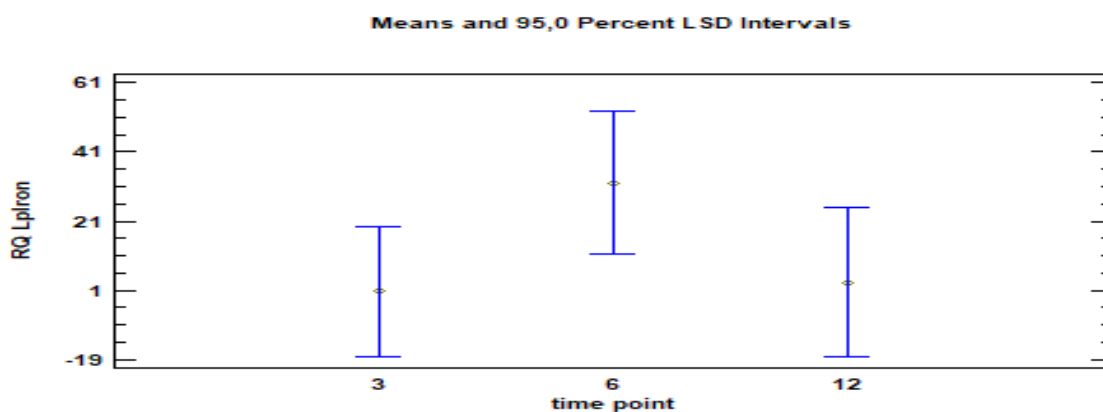
Διάγραμμα 6: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Multidrugprotein για τις δύο μεταχειρίσεις, ψεκασμένα φυτά (X) και φυτά χωρίς εφαρμογή ψεκασμού (C).

3.2.1.3 Η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Lprioninhibited συναρτήσει των τριών υπό μελέτη παραγόντων.

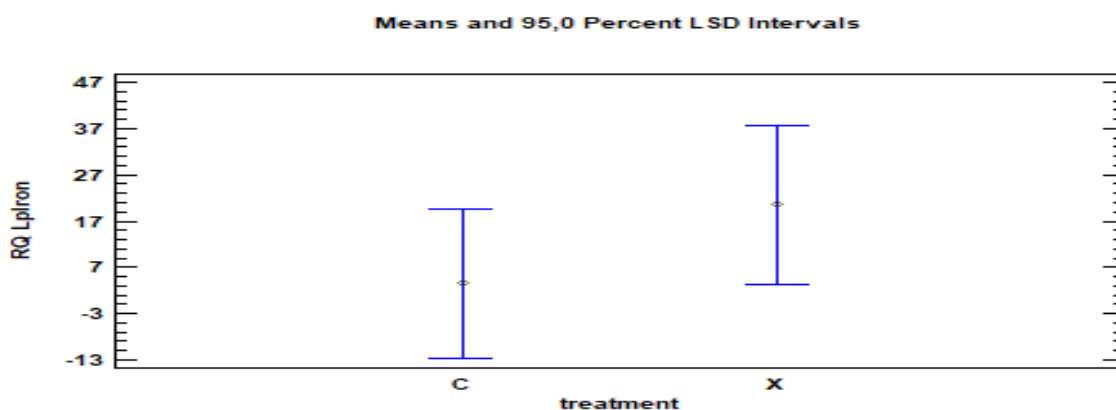
Από τα παρακάτω διαγράμματα παρατηρείται πως η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Lprioninhibited δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά για κανέναν από τους παράγοντες οι οποίοι μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Στο παράρτημα 2 παρατίθεται οι πίνακες ανάλυσης διακύμανσης και τα test πολλαπλών συγκρίσεων που προκύπτουν απ' την μέθοδο ανάλυσης ANOVA.



Διάγραμμα 7: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Lprioninhibited για τους δύο υπό μελέτη βιοτύπους, τον 21(πιθανά ανθεκτικός) και 27(πιθανά ευαίσθητος).



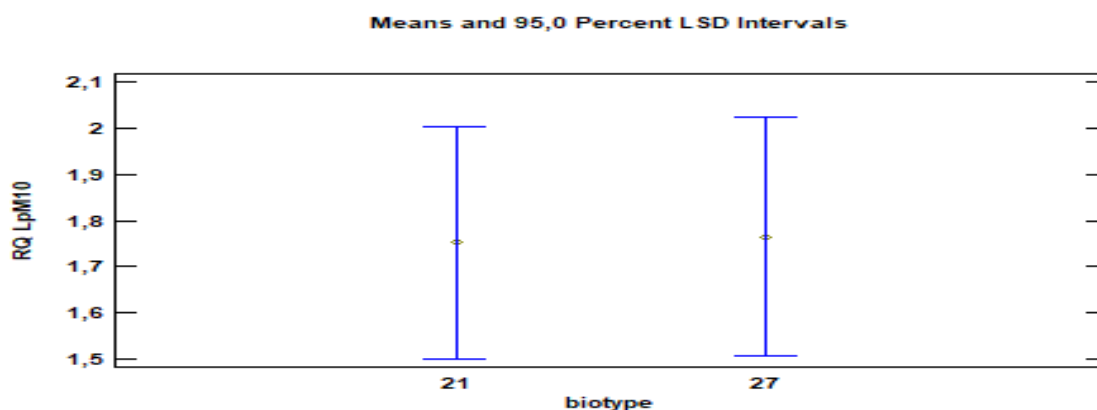
Διάγραμμα 8: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Lprioninhibited για τις τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές στις οποίες διεξήχθη η δειγματοληψία μετά τον ψεκασμό.



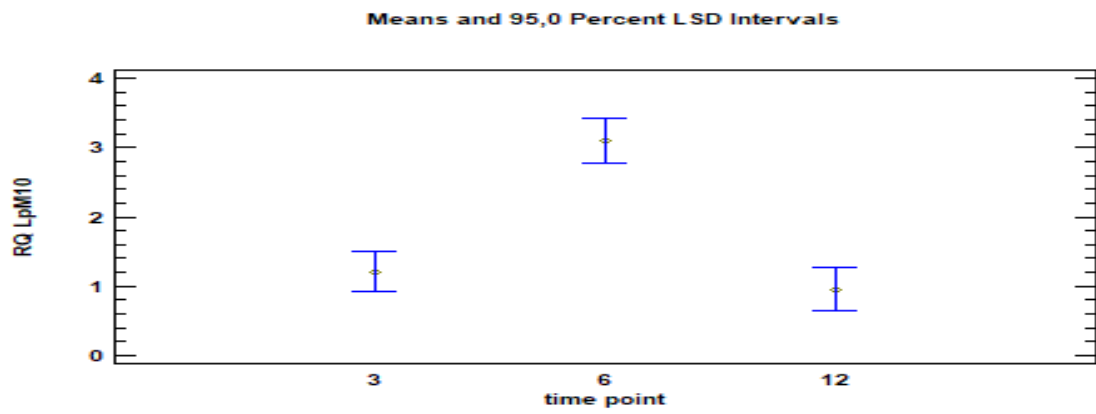
Διάγραμμα 9: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα Lpironinhibited για τις δύο μεταχειρίσεις, ψεκασμένα φυτά (X) και φυτά χωρίς εφαρμογή ψεκασμού (C).

3.2.1.4 Η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα LpM10 συναρτήσει των τριών υπό μελέτη παραγόντων.

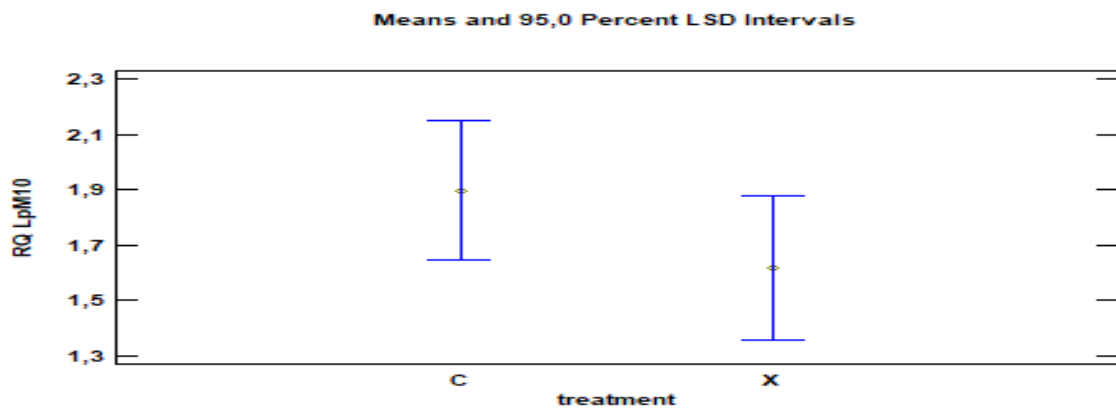
Από τα παρακάτω διαγράμματα παρατηρείται πως η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα LpM10 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο μεταξύ των υπό μελέτη βιοτύπων όσο και μεταξύ των μεταχειρίσεων ψεκασμένων και μη φυτών. Η μοναδική στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρείται είναι μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών που μετρήθηκε η γονιδιακή έκφραση μετά τον ψεκασμό, με τις 6 ώρες να παρουσιάζουν την υψηλότερη γονιδιακή έκφραση, ωστόσο δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα από την παρατήρηση αυτή. Στο παράρτημα 2 παρατίθεται οι πίνακες ανάλυσης διακύμανσης και τα test πολλαπλών συγκρίσεων που προκύπτουν απ' την μέθοδο ανάλυσης ANOVA.



Διάγραμμα 10: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα LpM10 για τους δύο υπό μελέτη βιοτύπους, τον 21(πιθανά ανθεκτικός) και 27(πιθανά ευαίσθητος).

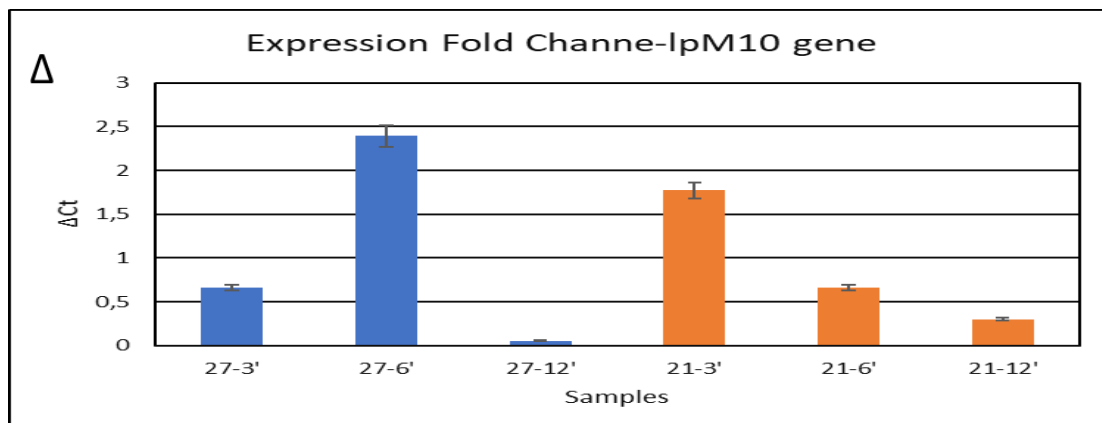
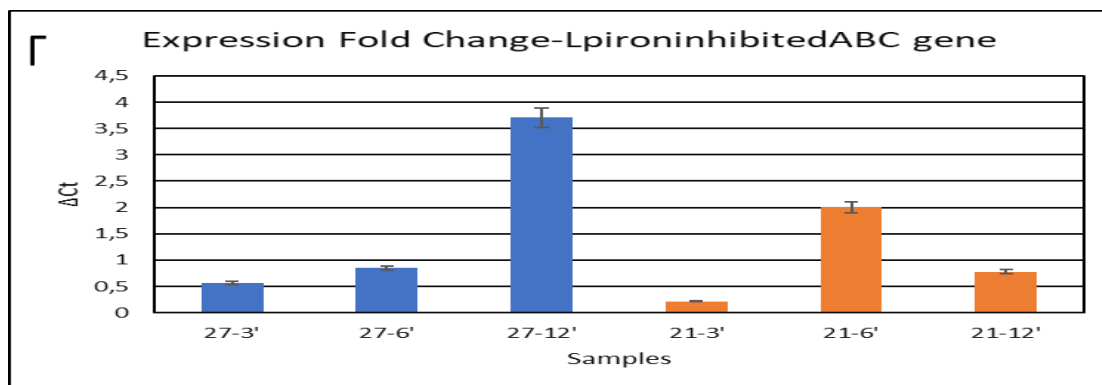
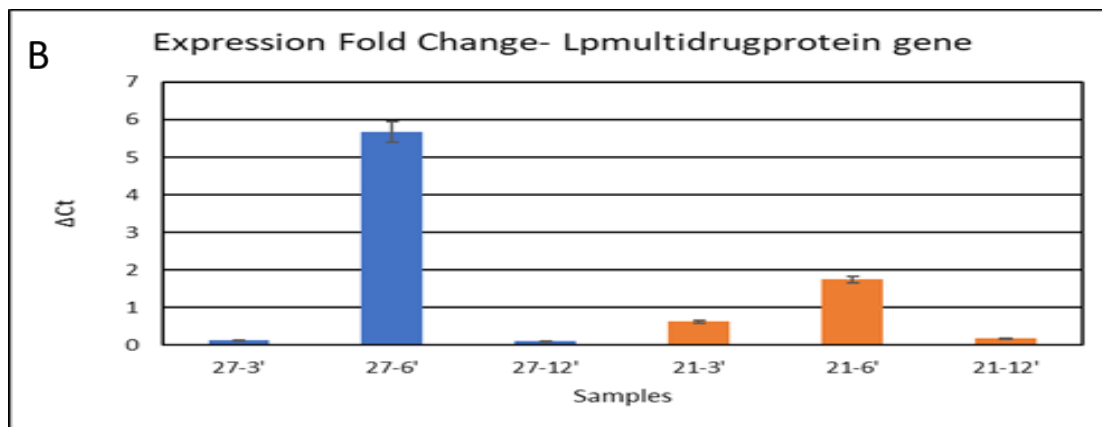
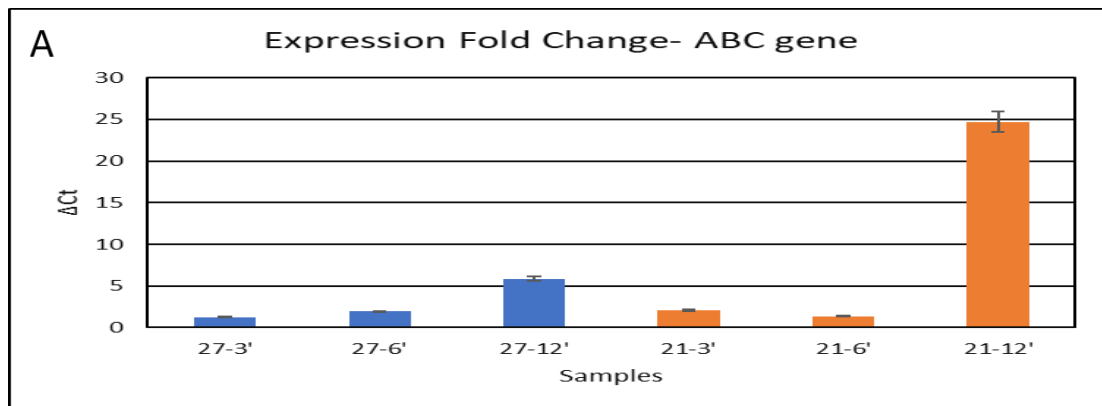


Διάγραμμα 11: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα LpM10 για τις τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές στις οποίες διεξήχθη η δειγματοληψία μετά τον ψεκασμό.



Διάγραμμα 12: Η έκφραση του γονιδίου-μεταφορέα LpM10 για τις δύο μεταχειρίσεις, ψεκασμένα φυτά (X) και φυτά χωρίς εφαρμογή ψεκασμού (C).

3.2.2 Ανάλυση Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$) - Double Delta Ct Analysis ($2^{\Delta\Delta Ct}$ Method)



Εικόνα 15:Γονιδιακή έκφραση των ABC transporter γονιδίων για τον ανθεκτικό και ευαίσθητο βιότυπο. Η ποσοτική ανάλυση PCR του γονιδίου-μεταφορέα ABC τύπου 3 (A), του γονιδίου Lpmultidrugprotein (B), του γονιδίου του σιδήρου αναστέλλει το γονίδιο ABC (Γ) και του γονιδίου LpM10 (Δ) σε φύλλα που έχουν υποστεί εφαρμογή glyphosate. (3,6,12 ώρες μετά τον ψεκασμό με glyphosate). Τα διαφορετικά γραφήματα δείχνουν τους διαφορετικούς τρόπους εκτίμησης του λόγου σχετικής έκφρασης. Τα γραφήματα προέκυψαν με τη διεξαγωγή της μεθόδου ΔΔCT (Livak and Schmittgen 2001). (Διευκρινιστικά: οι γραφικές παραστάσεις αριστερά 27C3-27 βιοτύπου αφέκαστου μάρτυρα (Control) 3hours/ 27X3-27bioType 3 ώρες μετά τον ψεκασμό, κ.τ.λ., γραφήματα στα δεξιά 27'-3: βιοτύπου 27, 3 ώρες μετά τον ψεκασμό κ.λ.π.).

- Η πιο αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των δύο υπό μελέτη βιοτύπων, τον 21 που θεωρείται πιθανά ανθεκτικός και του 27 που θεωρείται πιθανά ευαίσθητος (21,27), παρατηρείται για τη σχετική έκφραση του γονιδίου ABC τύπου 3 στις 12 ώρες μετά τον ψεκασμό με glyphosate.
- Αυτό το γονίδιο μπορεί να θεωρηθεί υποψήφιο ως πιθανό γονίδιο «δείκτης» για τη διάκριση μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων βιοτύπων *L. rigidum* για ανθεκτικότητα στο glyphosate σε πολύ πρώιμα αναπτυξιακά στάδια.
- Όσον αφορά το γονίδιο Lpmultidrugprotein, δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα σχετικά με την γονιδιακή του έκφραση μεταξύ ανθεκτικού και ευαίσθητου βιοτύπου καθότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές. Παρόλου που στον ευαίσθητο βιότυπο στις 6 ώρες μετά τον ψεκασμό παρατηρείται υπερέκφραση σε σύγκριση με τον ανθεκτικό, η γονιδιακή έκφραση φτάνει στο ίδιο επίπεδο και για τους δύο βιότυπους στις 12 ώρες μετά τον ψεκασμό.
- Το γονίδιο μεταφορέας LpironinhibitedABC φαίνεται να εκφράζεται νωρίτερα στον ευαίσθητο βιότυπο σε σχέση με τον ανθεκτικό, δηλαδή στις 3 ώρες μετά τον ψεκασμό και να υπερεκφράζεται στις 12 ώρες μετά τον ψεκασμό, ενώ στον ανθεκτικό βιότυπο η υψηλότερη γονιδιακή έκφραση καθυστερεί να ξεκινήσει περισσότερο, δηλαδή παρατηρείται στις 6 ώρες μετά τον ψεκασμό, ενώ μειώνεται αισθητά στις 12 ώρες μετά τον ψεκασμό, εν συγκρίσει ειδικά με την έκφραση στον ευαίσθητο βιότυπο.
- Το γονίδιο μεταφορέας LpM10 υπερεκφράζεται σε πρώιμο χρονικό στάδιο στον ανθεκτικό βιότυπο (21) σε σύγκριση με το ευαίσθητο (27) στις 3 μετά τον ψεκασμό glyphosate, ωστόσο στις 6 ώρες μετά τον ψεκασμό παρατηρούμε μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου στον ευαίσθητο βιότυπο συγκριτικά με τον ανθεκτικό, ενώ στις 12 ώρες μετά τον ψεκασμό υποεκφράζεται ξανά το γονίδιο για τον ευαίσθητο βιότυπό μας εν συγκρίσει με τον ανθεκτικό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Στοχευμένη έκφραση ανθεκτικότητας

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται σαφές πως οι βιότυποι οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα, στην πλειονότητά τους, φέρουν το αμινοξύ της προλίνης που κωδικοποιείται από το κωδικόνιο CCA, ωστόσο δεν παρατηρείται καμία μετάλλαξη στους ανθεκτικούς βιοτύπους, όπως έχει αναφερθεί σε παρόμοιες μελέτες, εκτός από τον Ιταλικό βιότυπο, ο οποίος θα αναλυθεί παρακάτω. Σε αντίστοιχη μελέτη των Yanniccari et.al. το 2017, στο *Lolium perenne*, στην οποία διερευνήθηκε, τόσο η στοχευμένη όσο και η μη-στοχευμένη ανθεκτικότητα στο glyphosate παρουσιάστηκαν αντίστοιχα αποτελέσματα. Τόσο οι ευαίσθητοι όσο και οι ανθεκτικοί στο glyphosate βιότυποι δεν αποκάλυψαν κάποια σημειακή μετάλλαξη η οποία να υποδηλώνει πως η ανθεκτικότητα στο glyphosate οφείλεται σε επαγωγή μηχανισμών στοχευμένης ανθεκτικότητας (Yanniccari et.al. το 2017).

Ωστόσο, σε μελέτη που έγινε για το *Lolium perenne* και το *Lolium multiflorum*, υπήρξε σημειακή μετάλλαξη στην 106-Pro σε 106-Ser, στον ανθεκτικό βιότυπο του *Lolium perenne* (Fernández-Moreno et al., (b) 2017). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την γνώση από προηγούμενες μελέτες, συνοψίζει ότι η μετάλλαξη Pro-106-Ser έχει αναφερθεί σε *L. multiflorum* (Perez-Jones et al., 2007; Jasieniuk et al., 2008; González-Torralva et al., 2012), *L. rigidum* (Simarmata and Penner, 2008; Bostaman et al., 2012; Fernandez et al., 2015) και *L. perenne* (Ghanizadeh et al., 2015). Επίσης έχουν ταυτοποιηθεί οι μεταλλάξεις 106-Pro-Thr (Wakelin and Preston, 2006; Bostaman et al., 2012), Pro-106-Leu (Kaundun et al., 2011), και Pro-106-Ala (Yu et al., 2007) στο *L. rigidum*. Αυτή η πληθώρα σημειακών μεταλλάξεων των αμινοξέων επηρεάζει την αποτελεσματικότητα glyphosate, οδηγώντας σε διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας (Preston et al., 2009).

Οι Fidel González-Torralva et.al. σε αντίστοιχο πείραμα όπου έγινε το 2012, σύγκριναν το γονιδίωμα της *A. thaliana* τόσο με ανθεκτικούς όσο και με ευαίσθητους βιοτύπους *L. rigidum*, και παρατήρησαν πως στους ανθεκτικούς βιότυπους υπήρξε μετάλλαξη της προλίνης σε σερίνη. Ωστόσο σε μελέτη που

έγινε στο είδος *Eleusine indica* για ανθεκτικότητα στο glyphosate σε τρεις ανθεκτικούς και έναν ευαίσθητο βιότυπο, παρατηρήθηκε σημειακή μετάλλαξη στην προλίνη 106 μόνο στους δύο από τους τρεις ανθεκτικούς βιότυπους (Chen J. et.al.2015).

Στην παρούσα μελέτη αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί το ότι από τους υπό μελέτη βιότυπους, ο Ιταλικός, ήταν ο μοναδικός που περιείχε το αμινοξύ της προλίνης, το οποίο ωστόσο δεν κωδικοποιείται από το κωδικόνιο CCA, όπως στους υπόλοιπους βιότυπους, αλλά από το CCG . Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται ως σημειακή σιωπηλή μετάλλαξη η οποία απαντάται κυρίως σε ευαίσθητους βιότυπους και προσδίδει διαφορετικό επίπεδο ανθεκτικότητας (Jasieniuk et.al.,2008). Ωστόσο στην παρούσα εργασία η σιωπηλή αυτή μετάλλαξη φαίνεται να επισυμβαίνει και σε ανθεκτικούς βιότυπους.

Σε αντίστοιχες μελέτες οι γνωστές μεταλλάξεις στο γονίδιο *EPSPS* που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο glyphosate δεν βρέθηκαν ούτε σε πιθανά ανθεκτικούς, ούτε σε άκρως ανθεκτικούς Ιταλικούς βιότυπους *Lolium sp.* (Salas et.al.,2015). Αντίθετα οι Bostamam et.al. σε μια αντίστοιχη μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2012 παρατήρησαν ανθεκτικούς βιότυπους ήρας να συσσωρεύουν λιγότερη ποσότητα glyphosate. Συγκεκριμένα παρατήρησαν 12% και 17% απορροφημένο glyphosate, σε βλαστούς ανθεκτικών βιότυπων σε σύγκριση με 26% απορροφημένο glyphosate που παρατηρήθηκε σε ευαίσθητο πληθυσμό. Επιπροσθέτως, ταυτοποιήθηκε μια μετάλλαξη εντός της ενζυμικής 5-ενολοπυρουβουλσικιματικής-3-φωσφορικής συνθάσης στόχου (*EPSPS*) όπου η προλίνη Pro106 είχε υποκατασταθεί είτε από σερίνη είτε από θρεονίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση αυτή βρέθηκε ταυτόχρονη έκφραση δύο διαφορετικών μηχανισμών αντίστασης.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως η μετάλλαξη στην προλίνη Pro106 δεν είναι απαραίτητο ότι προσδίδει πάντοτε ανθεκτικότητα. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες, είτε μόνη της, είτε με μια σειρά σημειακών μεταλλάξεων, είτε μέσω σιωπηλών σημειακών μεταλλάξεων, παρατηρείται μηχανισμός ανάπτυξης στοχευμένης ανθεκτικότητας, ενώ σε άλλες περιπτώσεις οι ανθεκτικοί βιότυποι δεν δείχνουν να φέρουν κανένα μηχανισμό στοχευμένης ανθεκτικότητας. Λαμβάνοντας υπόψη τα

αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στη παρούσα εργασία καθώς και το ότι πολλές μελέτες αναφέρουν πως η στοχευμένη έκφραση ανθεκτικότητας δεν ανιχνεύεται σε εξαιρετικά ανθεκτικούς βιότυπους στο glyphosate, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως το είδος αυτής της ανθεκτικότητας δεν αποτελεί βασικό μηχανισμό ανάπτυξης ανθεκτικότητας των φυτών έναντι στο glyphosate. Θα μπορούσε επίσης να θεωρηθεί πως η ανθεκτικότητα στοχευμένης-θέσης είναι ένας σπάνιος μηχανισμός ανθεκτικότητας των βιοτύπων *Lolium sp.*, σε σχέση με τη μη-στοχευμένη έκφραση, για λόγους που δεν είναι ακόμη γνωστοί (Salas et.al.,2015).

4.2 Μη - στοχευμένη έκφραση ανθεκτικότητας

Για τη μη-στοχευμένη έκφραση ανθεκτικότητας στο glyphosate τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υπέδειξαν το *γονίδιο-μεταφορέας ABC* ως ένα δυνητικά υποψήφιο γονίδιο ανίχνευσης ανθεκτικότητας στο glyphosate, κάτι που απαντάται και σε παρόμοια μελέτη για το είδος *Conyza sp.*, σύμφωνα με την οποία τέσσερις *ABC μεταφορείς* βρέθηκαν να υπερεκφράζονται, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεταβολομική ανάλυση στα χυμοτόπια μπορεί να βοηθήσει στο να κατανοηθεί καλύτερα και σε μεγαλύτερο βάθος ο τρόπος λειτουργίας του glyphosate και η ανάπτυξη ανθεκτικότητα (Yuan et.al.,2010).

Ο μηχανισμός ανάπτυξης στοχευμένης ανθεκτικότητας στο glyphosate δεν βρέθηκε να οφείλεται μια σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 106 της προλίνης του γονιδίου *EPSPS* (αντίσταση στο σημείο-στόχο), σε μελέτη που έγινε σε φυτά του είδους *Conyza canadensis*, παρατηρήθηκε συγχρονισμός στην υπερ-έκφραση του γονιδίου *EPSPS* και γονιδίων-*μεταφορέων ABC*. Αυτός ο μηχανισμός συγχρονισμού στην υπερ-έκφραση αυτών των δύο γονιδίων βασίστηκε τόσο στο χρόνο επαγωγής και τη διάρκεια της γονιδιακής υπερ-έκφρασης, όσο και στη ρύθμιση από το αρχικό «φορτίο» glyphosate (Tani et al 2015).

Λαμβάνοντας υπόψη τους μηχανισμούς μη-στοχευμένης έκφρασης ανθεκτικότητας, σε διάφορα είδη *Conyza sp*, φαίνεται ότι η αντίσταση στο glyphosate έχει εξελιχθεί αρκετά γρήγορα (Yuan et.al.,2010). Αντίστοιχη είναι και η κατάσταση και για τα φυτικά είδη του ζιζανίου *Lolium sp.*.Αυξημένη

εφαρμογή του glyphosate στη γεωργία θα μπορούσε να οδηγήσει στην εξέλιξη ακόμη περισσότερων (Duke and Powles, 2008).

Επιπλέον σε μελέτη στο *L. rigidum*, όλοι οι ανθεκτικοί πληθυσμοί *L. rigidum* που μελετήθηκαν, εμφάνισαν μη-στοχευμένη ανθεκτικότητα με μειωμένη μετατόπιση του glyphosate. Επιπλέον, τέσσερις πληθυσμοί εμφάνισαν στοχευμένη ανθεκτικότητα, με σημειακή μετάλλαξη της Pro-106 σε Ser-106 στο *EPSPS*. Η εμφάνιση και των δύο μηχανισμών ανθεκτικότητας οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα αντοχής. Ωστόσο θα πρέπει να μελετηθούν περισσότεροι πληθυσμοί, καθώς και η διασπορά τους σε νέες περιοχές προκειμένου να εκτιμηθεί καλύτερα και σε βάθος η ανθεκτικότητά τους στον αγρό (Fernández-Moreno et al., (a) 2017).

Οι περισσότερες από τις περιπτώσεις ανάπτυξης μη-στοχευμένης ανθεκτικότητας σε ζιζανιοκτόνα διαπιστώθηκαν χρησιμοποιώντας διάφορες αναλύσεις, όπως μεταβολομικές, αλλά ελάχιστα γονίδια ανθεκτικότητας στην πραγματικότητα κλωνοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από ζιζάνια (με εξαίρεση της *Arabidopsis*, που δεν θεωρείται ζιζάνιο). Πολλές ερωτήσεις-«κλειδιά» σχετικά με τους μηχανισμούς μη-στοχευμένης ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα παραμένουν αναπάντητες. Το αποτέλεσμα της ανθεκτικότητας προκύπτει από την μεταγραφομική λειτουργία των γονιδίων, την αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας, την εξειδίκευση των γονιδίων ή από κάποιο συνδυασμό των τριών; Η αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας συνεπάγεται σημειακή μετάλλαξη; Εάν ναι, ποια είναι αυτή η μετάλλαξη και πώς προσδίδει ισχυρότερη ανθεκτικότητα; Είναι σημαντικό να απαντηθούν αυτά τα ερωτήματα για την ανάπτυξη περισσότερων αποτελεσματικών ζιζανιοκτόνων, καθώς και για την κατανόηση της εξέλιξης της ανάπτυξης ανθεκτικότητας και για τη διαχείρισή της, έτσι ώστε να αποκτηθούν γνώσεις και για παρόμοιες φυσιολογικές διεργασίες χρήσιμες στην φυτοπροστασία. Η ανακάλυψη γονιδίων είναι το κλειδί για να απαντηθούν αυτά τα ερωτήματα. Το κύριο εμπόδιο για την κλωνοποίηση και τον χαρακτηρισμό των γονιδίων που κωδικοποιούν μηχανισμούς ανάπτυξης μη-στοχευμένης ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα, είναι οι περιορισμένοι γενετικοί πόροι ειδών ζιζανίων που υπάρχουν διαθέσιμοι (Yuan et al., 2007).

Συνοψίζοντας, για να μπορέσουν να εξαχθούν περισσότερο ασφαλή συμπεράσματα για όσα ειπώθηκαν παραπάνω, προτείνεται η περεταίρω

διερεύνηση των μηχανισμών που αφορούν την ανάπτυξη τόσο της στοχευμένης όσο και της μη-στοχευμένης ανθεκτικότητας στο *L. rigidum*, μέσω της μελέτης περισσότερων γονιδίων-μεταφορέων και μελέτης περισσότερων αλληλουχημένων γονιδιωμάτων, σε όσο το δυνατόν περισσότερους ανθεκτικούς βιοτύπους του ζιζανίου.

Στο πλαίσιο αυτό, η επιστήμη της βελτίωσης φυτών μπορεί να διαδραματίσει πρωτεύοντα και καθοριστικό ρόλο, καθώς διαθέτει όλα τα απαραίτητα εργαλεία έτσι ώστε να μπορέσουν να διερευνηθούν και να κατανοηθούν οι μηχανισμοί εκείνοι που είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη πάσης φύσεως ανθεκτικότητας τόσο σε βιοτικές καταπονήσεις, όπως είναι τα ζιζάνια, όσο και σε αβιοτικές καταπονήσεις, όπως είναι τα ζιζανιοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των πρώτων.

Με την βοήθεια μοριακών εργαλείων και τεχνικών όπως η αλληλούχιση του γονιδιώματος του οργανισμού ενδιαφέροντος, η ποσοτικοποίηση της σχετικής γονιδιακής έκφρασης σε πραγματικό χρόνο, η χρήση ομικών τεχνολογιών και πολλών άλλων, καθίσταται πιο εφικτή η μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας σε βιοτικές κι αβιοτικές καταπονήσεις και η αξιοποίηση αυτής της γνώσης για την βελτίωση των καλλιεργούμενων ειδών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βουλγαρίδης Μ. (2014). Μελέτη της συμπεριφοράς του ζιζανιοκτόνου glyphosate στο έδαφος και της δράσης του στα φυτά μετά από απορρόφηση από τις ρίζες. Πτυχιακή εργασία, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Ηράκλειο.

Βακαλουνάκης Δ.Ι. κ.α..2003. Φυτοπαθοβελτίωση με έμφαση στην τομάτα και τα κολοκυνθοειδή. Εκδόσεις ΤΥΠΟΚΡΕΤΑ Α.Ε.. σελ. 24

Ελευθεροχωρινός Η. 1992.Ζιζανιολογία, Βιολογία και Καταπολέμηση των ζιζανίων.

Ελευθεροχωρινός Η. 2008. Ζιζανιολογία: Ζιζάνια, Ζιζανιοκτόνα, Περιβάλλον, Αρχές και Μέθοδοι Διαχείρισης. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα, σελ. 333-359

Ελευθεροχωρινός Η. & Γιαννοπολίτης Κ. (2009). Ζιζάνια: Οδηγός Αναγνώρισης, Εκδόσεις Αγρότυπος, σελ. 144-145

Ζιώγας Β. & Μάρκογλου Α. (2010). Γεωργική Φαρμακολογία: Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήση των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων, Εκδόσεις Ζιώγας & Μάρκογλου, σελ. 513-704

Λόλας Π. 1997. Ζιζάνια στην Ελλάδα. Γεωργική Τεχνολογία.

Μουρκίδου Ε.Π. (2008). Χημεία, Φαρμακολογία (Φαρμακοκινητική/Μεταβολισμός/Τρόπος δράσης), Τοξικολογία, Οικοτοξικολογία και Συμπεριφορά στο περιβάλλον. Εκδόσεις Μέθεξης, Θεσσαλονίκη, σελ.569.

Φανουράκης Ν. 2010. Γενετική Βελτίωση Φυτών Βασικές Αρχές. Εκδόσεις «ΙΩΝ». Σελ.288

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Baerson S.R., Rodriguez D.J., Tran M., Feng Y., Biest N.A. & Dill G.M. (2002). Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol* 129:1265-1275

Bell M.S., Hager A.G., Tranel P.J. (2013). Multiple resistance to herbicides from four site-of-action groups in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Sci* 61:460-468

Balfourier F., Imbert C. & Charmet G. (2000). Evidence for phylogeographic structure in *Lolium* species related to the spread of agriculture in Europe. A cpDNA study. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 131-138

Baylis, A.D., 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science* 56: 299-308.

Bennett S.J., Hayward M.D., Marshall D.F. (2000). Morphological differentiation in four species of the genus *Lolium*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47(3): 247-255

Bennett S.J., Hayward M.D., Marshall D.F. (2002). Electrophoretic variation as a measure of species differentiation between four species of the genus *Lolium*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 49(1): 59-66

Bostamam, Y., Malone, J., Dolman, F., Boutsalis, P., & Preston, C, 2012. Rigid Ryegrass (*L. rigidum*) Populations Containing a Target Site Mutation in *EPSPS* and Reduced Glyphosate Translocation Are More Resistant to Glyphosate. *Weed Science*, 60(3), 474-479. doi:10.1614/WS-D-11-00154.1

Burnet MWM; Barr AR; Powles SB, 1994. Chloroacetamide resistance in rigid ryegrass (*L. rigidum*). *Weed Science*, 42(2):153-157.

Burnet MWM; Hart Q; Holtum JAM; Powles SB, 1994. Resistance to nine herbicide classes in a population of rigid ryegrass (*L. rigidum*). *Weed Science*, 42(3):369-377.

Busi R., Vila-Aiub M.M., Powles S.B. (2011). Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *L. rigidum*. *Heredity* 106:817-824

Byrne, S., Durandean, K., Nagy, I. and Barth, S. (2010). Identification of ABC transporters from *Lolium perenne* L. that are regulated by toxic levels of selenium. *Planta*, 231(4), pp.901-911.

Cheimona, N. & I.S. Travlos (2019). DIFFERENT LEVELS OF GLYPHOSATE-RESISTANT *LOLIUM RIGIDUM* L. BIOTYPES IN PERENNIALS CROPS OF GREECE. 18th International Conference "Life Sciences for Sustainable Development", University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine from Cluj-Napoca, Romania.

Chen J, Huang H, Zhang C, Wei S, Huang Z, Chen J, Wang X. 2015. Mutations and amplification of *EPSPS* gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta* 242, 859-868.

Coleman RK; Gill GS; Rebetzke GJ, 2001. Identification of quantitative trait loci for traits conferring weed competitiveness in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 52(11/12):1235-1246; 39 ref.

de Carvalho L.B., Alves P.L., Gonzalez-Torralva F., Cruz-Hipolito H.E., Rojano-Delgado A.M., De Prado R., Gil-Humanes J., Barro F., de Castro M.D. (2012.) Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. *J Agric Food Chem* 60:615-622

Daniel H. Farkas, Carol A. Holland, in *Cell and Tissue Based Molecular Pathology*, 2009

De Prado J.L., Osuna M.D., Heredia A., De Prado R. (2005). *L. rigidum*, a pool of resistance mechanisms to ACCase inhibitor herbicides. J Agric Food Chem 53:2185-2191

Delye C., Jaseniuk M. & Le Corre V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. Trends in Genetics (TIGS) 1063: 1-10.

Dill G.M., CaJacob C.A., Padgett S.R. (2008). Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. Pest Manag Sci 64:326-331

Dinelli G., Bonetti A., Lucchese C., Catizone P., Bravin F., Zanin G. (2002). Taxonomic evaluation of Italian populations of *Lolium* spp. Resistant and susceptible to diclofop-methyl. Weed Research (Oxford), 42(2): 156-165; 40 ref.

Dinelli G., Marotti I., Bonetti A., Minelli M., Catizone P., Barnes J. (2006). Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. Pestic Biochem Physiol 86:30-41

Dinelli G., Marotti I., Bonetti A., Catizone P., Urbano J.M., Barnes J. (2008). Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. Weed Research 48:257-265

Duke, S.O., Powles, S.B., 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science 64:319-325.

Fernandez, P., Gauvrit, C., Barro, F., Menendez, J., and De Prado, R. (2015). First case of glyphosate resistance in France. Agron. Sustain. Dev. 35, 1469–1476.doi: 10.1007/s13593-015-0322-1

(a)Fernández-Moreno P, Alcántara-de la Cruz R, Smeda R, De Prado R. 2017b. Differential Resistance Mechanisms to Glyphosate Result in Fitness Cost for *Lolium perenne* and *L. multiflorum*. Frontiers in Plant Science 8.

(b) Fernández-Moreno P, Travlos I, Brants I, De Prado R. 2017b. Different levels of glyphosate-resistant *L. rigidum* L. among major crops in southern Spain and France. *Scientific Reports* 7.

Fernandez-Moreno, P.T., I. Travlos, I. Brants and R. De Prado (2017). Different levels of glyphosate-resistant *Lolium rigidum* L. among major crops in southern Spain and France. *Scientific Reports (NATURE)* 7: 13116.

Ge X., d'Avignon D.A., Ackerman J.J.H., Sammons R.D. (2010). Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Manag Sci* 66:345-348

Ghanizadeh, H., Harrington, K. C., James, T. K., Woolley, D. J., and Ellison, N. W.(2015). Mechanisms of glyphosate resistance in two perennial ryegrass (*Lolium perenne*) populations. *Pest Manag. Sci.* 71, 1617–1622. doi:10.1002/ps.3968

Gill GS; Holmes JE, 1997. Efficacy of control methods for combating herbicide resistant *L. rigidum*. Resistance '97. Integrated approach to combating resistance. *Pesticide Science*, 51(3):352-358.

Gill G.S., Dowling P., Medd R. (1996). Ecology of annual ryegrass. Wild oats, annual ryegrass and vulpia. Proceedings of a workshop held at Orange, New South Wales, Australia. *Plant Protection Quarterly* 11: 198-200

Gill GS, 1995. Development of herbicide resistance in annual ryegrass populations (*L. rigidum* Gaud.) in the cropping belt of Western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 35(1):67-72.

Gonzalez-Gutierrez J; Prado R de, 1997. Control of a simazine resistant *L. rigidum* biotype at low rates of different glyphosate formulations. Proceedings of the 1997 Congress of the Spanish Weed Science Society, Valencia, Spain. Madrid, Spain: Sociedad Espanola de Malherbologia, 83-87.

Gonzalez-Torralva F., Rojano-Delgado A.M., Luque de Castro M.D., Mulleder N., De Prado R. (2012). Two non-target site mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *J Plant Physiol* 169:1673-1679

Gramshaw D. & Stearn W.R. (1977). Survival of annual ryegrass (*L. rigidum* Gaud.) seed in a Mediterranean type environment. II. Effects of short term burial on persistence of viable seed. *Australian Journal of Agricultural Research*. 28: 93-101.

Gressel J. (2002). *Molecular Biology of Weed Control*. New York: Taylor and Francis

Gut D, 1998. First weed resistant to glyphosate. *Obst- und Weinbau*, 134(8):223-224; 5 ref.

Hatzios K.K. (2001). Mechanism of resistance to herbicides. In: R. De Prado and J.V. Jorin, eds. *Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI*. Cordoba, Spain: Servicio Pulicaciones Universidad de Cordoba. pp. 275-287

Healy-Fried M.L., Funke T., Priestman M.A., Han H., Schonbrunn E. (2007). Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro(106) in *Escherichia coli EPSPS*. *J Biol Chem* 282:32949-32955

Heap I, 2004. International survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.org/in.asp>.

Hole SJW; Powles SB, 1997. Reduced efficacy and enhanced degradation of carbetamide after repeated application in Australia. *Weed Research (Oxford)*, 37(3):165-170; 5 ref

James C. (2006). *Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006*. ISAAA Briefs No.35. ISAAA, Ithaca, NY

Jasieniuk, M., Ahmad, R., Sherwood, A., Firestone, J., Perez-Jones, A., Lanini, W., Mallory-Smith, C. and Stednick, Z. (2008). Glyphosate-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: Distribution, Response to Glyphosate, and Molecular Evidence for an Altered Target Enzyme. *Weed Science*, 56(4), pp.496-502.

Kaloumenos, N. S. Tsioni, V. S., Daliani, E. G., Papavassileiou, S. E., Vassileiou, A. G. Laoutidou, P. N. and I. G. Eleftherohorinos. 2012. Multiple Pro-197 substitutions in the acetolactate synthase of rigid ryegrass (*L. rigidum*) and their impact on chlorsulfuron activity and plant growth. *Crop Protection* 38:35-43.

Kaundun, S. S., Dale, R. P., Zelaya, I. A., Dinelli, G., Marotti, I., and McIndoe, E., 2011. A novel P106L mutation in *EPSPS* and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *L. rigidum*. *J. Agric. Food Chem.* 59, 3227–3233. doi: 10.1021/jf104934j

Kloot, P. M. 1983. 'The genus *Lolium* in Australia', *Australian Journal of Botany*, vol. 31:421-435.

Kondrashov FA (2012). Gene duplication as a mechanism of genomic adaptation to a changing environment. *Proc R Soc B Biol Sci* 279:5048-5057

Lane T, Rempe C, Davitt J et al. 2016. Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology. *BMC Biotechnology* 16.

LeBaron H.M. & Gressel J. (1982). *Herbicide Resistance in Plants*. Wiley, New York

Lemerle D; Verbeek B; Orchard B, 2001. Ranking the ability of wheat varieties to compete with *L. rigidum*. *Weed Research (Oxford)*, 41(3):197-209; 26 ref.

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.

Lorraine-Colwill D, Powles S, Hawkes T, Hollinshead P, Warner S, Preston C. 2002. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *L. rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74, 62-72.

Mamarot J; Rodriguez A, 1997. Sensibilité des Mauvaises Herbes aux Herbicides. 4th edition. Paris, France: Association de Coordination Technique Agricole.

Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu Ü, Müller-Röber B, Schulz B. 2001. Multifunctionality of plant ABC transporters – more than just detoxifiers. *Planta* 214, 345-355

Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K. & Amrhein N. (1993). ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249

Matthews J, 2002. Broadcast sowing, crop row spacing and crop density for the suppression of ryegrass in wheat rotations. 13th Australian Weeds Conference: weeds "threats now and forever?", Sheraton Perth Hotel, Perth, Western Australia, 8-13 September 2002: papers and proceedings, 709-711; 3 ref.

Matthews J; Llewellyn R; Reeves TG and Powles SB, 1996. Integrated management for the control of herbicide resistant ryegrass. Proceedings of the 8th Australian Agronomy Conference, Toowoomba, Australia, 417-420.

Medd RW; Auld BA; Kemp DR; Murison RD, 1985. The influence of wheat density and spatial arrangement on annual ryegrass, *L. rigidum* Gaudin, competition. *Australian Journal of Agricultural Research*, 36(3):361-371

Moons A. 2003. Ospdr9, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots1. FEBS Letters 553, 370-376.

Moretti M.L., Alárcon-Reverte R., Pearce S., Morran S. and Hanson B. D. 2017. Transcription of putative tonoplast transporters in response to glyphosate and paraquat stress in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* and selection of reference genes for qRT-PCR. PLoS One 12, e0180794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180794>.

Nandula V.K., Ray J.D., Ribeiro D.N., Pan Z., Reddy K.N. (2013). Glyphosate resistance in tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Mississippi is due to both altered target-site and nontarget-site mechanisms. Weed Sci 61:374-383

Ng C.H., Wickneswari R., Salmijah S., Teng Y.T., Ismail B.S. (2003.) Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. Weed Research 43:108-115

Niknam S.R., Moerkerk M. & Cousens R. (2002). Weed seed contamination in cereal and pulse crops. 13th Australian Weeds Conference: weeds “threats now and forever?”, Sheraton Perth Hotel, Perth, Western Australia, 8-13 September 2002: papers and proceedings, pp 59-62; 3 ref.

Pearce G.A. & Quinlivan B.J. (1971). The control of annual (“Wimmera”) ryegrass in cereal crops. Journal of Agriculture, Western Australia, 12: 58-62

Peltzer S.C. & Matson P.T. (2002). How fast do seedbanks of five annual cropping weeds deplete in the absence of weed seed input? 13th Australian Weed Conference: weeds “threats now and forever?”, Sheraton Perth Hotel, Perth, Western Australia, 8-13 September 2002: papers and proceedings, pp 553-555; 12 ref.

Perez-Jones A., Park K.W., Polge N., Colquhoun J., Mallory-Smith C.A. (2007). Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* 226:395-404

Planes J; Brieno R; Recasens J, 1999. Does the cereal sowing date influence in the management of herbicide-resistant *L. rigidum* populations ? SEMh Congreso 1999: Sociedad Espanola de malherbologia, Actas, Logrono, Spain. Departamento Hortofruticultura, Botanica I Jardineria, Lerida, Spain, 397-393.

Powles SB; Lorraine-Colwill DF; Dellow JJ; Preston C, 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*L. rigidum*) in Australia. *Weed Science*, 46(5):604-607; 24 ref.

Powles SB; Matthews JM, 1996. Integrated weed management for the control of herbicide resistant annual ryegrass (*L. rigidum*). Proceedings of the 2nd International Weed Control Congress, Copenhagen, Denmark. Slagelse, Denmark: Department of Weed Control and Pesticide Ecology, 407-414.

Prado Rde; Prado JLde; MenTndez J, 1997. Resistance to substituted urea herbicides in *L. rigidum* biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 57(2):126-136; 36 ref.

Preston, C., Wakelin, A. M., Dolman, F. C., Bostaman, Y., and Boutsalis, P., 2009. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. *Weed Sci.* 57, 435–441. doi: 10.1614/WS-08-181.1

Reeves TG; Smith IS, 1975. Pasture management and cultural methods for the control of annual ryegrass (*L. rigidum*) in wheat. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 15(75):527-530

Rerkasem K., Stearn W.R. & Goodchild N.A. (1980). Associated growth of wheat and annual ryegrass (*L. rigidum*). Proceedings of the 2nd International Weed Control Congress, Copenhagen, Denmark, Slagelse, Denmark: Department of Weed Control and Pesticide Ecology, pp 407-414.

Salas, R., Scott, R., Dayan, F. and Burgos, N. (2015). *EPSPS* Gene Amplification in Glyphosate-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) Populations from Arkansas (United States). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(25), pp.5885-5893.

Salas R.A., Dayan F.E., Pan Z., Watson S.B., Dickson J.W., Scott R.C. et al. (2012). *EPSPS* gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas. *Pest Manag Sci* 68:1223-1230

Sammons R.D., Gaines T.A. (2014). Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Manag Sci*. 70:1366-1367

Shaner, D. 2009. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Sci*. 57:118–123.

Simarmata M., Penner D. (2008). The basis for glyphosate resistance in rigid ryegrass (*L. rigidum*) from California. *Weed Science* 56:181-188

Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R. J., & Chen, Z. S. (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese journal of cancer*, 31(2), 58–72. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10329>

Stanton R; Piltz J; Pratley J; Kaiser A; Hudson D; Dill G, 2002. Annual ryegrass (*L. rigidum*) seed survival and digestibility in cattle and sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42(2):111-115; 14 ref.

Steadman K.J, Crawford A.D. & Gallagher R.S. (2003). Dormancy release in *L. rigidum* seeds is a function of thermal after-ripening time and seed water content. *Functional Plant Biology*, 30(3): 345-352; 31 ref.

Tani E. , Chachalis D. & Travlos I.S. 2015. A Glyphosate Resistance Mechanism in *Conyza canadensis* Involves Synchronization of *EPSPS* and ABC-transporter Genes. *Plant Mol Biol Rep*. DOI 10.1007/s11105-015-0868-8

Terrell E. (1968). A taxonomic revision of the genus *Lolium*. Technical Bulletin of the USDA 1392: 1-65

Travlos, I.S., S. Fountas, D. Bilalis, N. Cheimona, E. Anastasiou and A. Tsekoura (2018). In-season discrimination of herbicide resistant and susceptible weeds by means of vegetation indices. In Proceedings of the 18th European Weed Research Society Symposium “New approaches for smarter weed management”, 17-21 June 2018, Ljubljana, Slovenia, p.90.

Yannicari M, Gómez-Lobato M, Istilart C, Natalucci C, Giménez D, Castro A. 2017. Mechanism of Resistance to Glyphosate in *Lolium perenne* from Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5.

Young B.G. (2006). Changes in Herbicide Use Patterns and Production Practises Resulting from Glyphosate-Resistant Crops. *Weed Technology* 20(2): 301-307.

Yuan J, Tranel P, Stewart C. 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* 12, 6-13.

Yuan, J., Abercrombie, L., Cao, Y., Halfhill, M., Zhou, X., Peng, Y., . . . Stewart, C. (2010). Functional Genomics Analysis of Horseweed (*Conyza canadensis*) with Special Reference to the Evolution of Non–Target-Site Glyphosate Resistance. *Weed Science*, 58(2), 109-117. doi:10.1614/WS-D-09-00037.1

Vila-Aiub M.M., Gundel P.E., Yu Q. & Powles S.B. (2013). Glyphosate resistance in *Sorghum halepense* and *L. rigidum* is reduced at suboptimal growing temperatures. *Pest. Manag. Science* 69: 228-232.

Wakelin A.M., Preston C. (2006). A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *L. rigidum* population. *Weed Research* 46:432-440

Yu, Q., Cairns, A., and Powles, S. (2007). Glyphosate, paraquat, and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *L. rigidum* biotype. *Planta* 225, 499–513. doi: 10.1007/s00425-006-0364-3

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Πίνακας 1: *Invasive Species Compendium*
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/31167#None>

Εικόνα 1: Murrumbidgee Catchment Management Authority
http://archive.ils.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0008/495332/archive-annual-ryegrass.pdf

Εικόνα 2: *Invasive Species Compendium*
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/31167#None>

Εικόνα 3: Wageningen University & Research
<https://www.wur.nl/en/newsarticle/Development-of-an-integrated-weed-management-strategy.htm>

Εικόνα 12: Blast program, NCBI Database.
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Σελίδα 30: https://www.neb.com/-/media/catalog/application-notes/mvs_analysis_of_na_concentration_and_purity.pdf?la=en&rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1: Τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της Real-Time PCR

1. *Lolium perenne* ABC transporter 3

JZ166942.1 sb_007b_a07 *Lolium perenne* sb *Lolium perenne* cDNA, mRNA sequence

GACAGCTGCATACAAGACATCAACTCTGTTTTTCAACAAGATGCATATGT
CCATATTCAGGGCTCCTATGTCTTTCTTCGATTCAACTCCGAGTGGGCGC
ATCTTGAATAGAGCTTCAGCTGATCAAAGTGAAGTGGACACCAGCATTGC
TGAACAAATGGGTTCTGTGCGATTTTCCATCATACAACACTAGTTGGAATTAT
TGTTGTGATGTCTCAGGTTGCATGGCAGGTGTTTGTGTTTTTGTTCGCGC
TAACTGTGGCCTGCTTCTGGTATCAGCGCTACTACATTGATACAGCCAGA
GAGCTGCAAAGGCTGGTAGGGGTTTGCAAAGCTCCTATAATACAACATT
TTGCAGAATCCATTACTGGATCAGCAACCATCAGAAGTTTTGGCAAGGAA
AATCAGTTCABCATCAACTAATAGTGATCTAATGGATGCCTTCTCTCG
ACCAAATTTCTATAACGCTGCAGCAAGGGAGTGGCTTTGCTTCCGCTTA
GATACGCTATCATGCCTTACATTTGCGTTCTCCTTGATATTTCTGATCAGT
CTACCGACTGGTCTCATTGATCCAGCAATTGCTGGTCTCGCTGTACATA
TGGGCTTAATTTGAATACTCTGCAAGCAT

Παρακάτω φαίνεται η χαρακτηρισμένη ακολουθία με την υψηλότερη ομολογία και τα αποτελέσματα ευθυγράμμισης.

PREDICTED: *Oryza sativa* Japonica Group ABC transporter C family member 3 (LOC4327122), mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_015762000.2

>XM_015762000.2:3233-3857 PREDICTED: *Oryza sativa* Japonica Group ABC transporter C family member 3 (LOC4327122), mRNA

>ACAGCTGCATACAAGACAGCAACTCTGTTGTTCAACAAGATGCATATGT
CCATATTCAGAGCTCCAATGTCATTCTTTGATTCCACTCCTAGTGGGCGC
ATTTTGAATAGAGCTTCAACGGATCAAAGCGAAGTGGACACCAGCATTG
CTTACCAGATGGGATCTGTTGCATTTTCCATCATACAACCTTGTGGAATTA

TTGCTGTGATGTCTCAGGTTGCATGGCAGGTTTTTGTGTTTTTATTCTG
 TGCTTGCTGCCTGCTTCTGGTATCAGCGTTACTACATCGATACAGCCAGA
 GAGTTGCAAAGACTAGTAGGGGTTTGCAAAGCTCCCATCATAACAGCATT
 TGCAGAATCAATAACAGGATCAACAACCATCAGAAGTTTTGGCAAAGAAA
 ACCAGTTTGTATCAACTAATAGCCATTTAATGGATGCATTTTCTAGACCAA
 AATTTTATAATGCTGCAGCAATGGAATGGCTTTGCTTCCGCCTGGATATG
 CTGTCATCCCTTACATTTGCCTTCTCTTTGATATTTTTGGTCAATCTTCCG
 ACTGGTCTCATCGATCCAGGAATTTCTGGTCTAGCAGTCACATACGGGC
 PTAATCTGAACATGCTGCAAGCAT

image 1: 5255 to 5357 [GenBank](#) [Statistics](#) [NEXT IMAGE](#) [PREVIOUS IMAGE](#) [Kefate](#)
[Gene - a](#)
[Genome](#)
 genomic

core	Expect	Identities	Gaps	Strand
45 bits(403)	0.0	551/625(88%)	0/625(0%)	Plus/Plus
lery 2	ACAGCTGCATACAAGACATCAACTCTGTTTTTCAACAAGATGCATATGTCCATATT CAGG			61
ljct 3233	ACAGCTGCATACAAGACAGCAACTCTGTTGTTCAACAAGATGCATATGTCCATATT CAGA			3292
lery 62	GCTCCTATGTCTTCTTCGATTCAACTCCGAGTGGGCGCATCTTGAATAGAGCTT CAGCT			121
ljct 3293	GCTCCTATGTCTTCTTTCGATTCAACTCCGAGTGGGCGCATCTTGAATAGAGCTT CAACG			3352
lery 122	GATCAAAGTGAAGTGGACACCAGCATTGCTGAACAAATGGGTTCTGTCGATTTTCCATC			181
ljct 3353	GATCAAAGTGAAGTGGACACCAGCATTGCTTACCAGATGGGATCTGTTGCATTTTCCATC			3412
lery 182	ATACAACAGTGGGAATATTGTTGTGATGTCTCAGGTTGCATGGCAGGTTTGTGTTT			241
ljct 3413	ATACAACAGTGGGAATATTGCTGTGATGTCTCAGGTTGCATGGCAGGTTTGTGTTT			3472
lery 242	TTTGTTCGCTAACTGTGGCTGCTTCTGGTATCAGCGCTACTACATTGATACAGCCAGA			301
ljct 3473	TTTATTCCTGTGCTTGTGCTGCTTCTGGTATCAGCGTACTACATCGATACAGCCAGA			3532
lery 302	GAGCTGCAAAGGCTGGTAGGGGTTTGCAAAGCTCCTATAATACAACATTTTGCAGAATCC			361
ljct 3533	GAGTTGCAAAGACTAGTAGGGGTTTGCAAAGCTCCCATACAGCATTTTGCAGAATCA			3592
lery 362	ATTACTGGATCAGCAACCATCAGAAGTTTTGGCAAGGAAAATCAGTTCGTATCAACTAAT			421
ljct 3593	ATAACAGGATCAACAACCATCAGAAGTTTTGGCAAAGAAAACAGTTTGTATCAACTAAT			3652
lery 422	AGTGATCTAATGGATGCCTTCTCTGACCAAATTTATAACGCTGCAGCAAGGGAGTGG			481
ljct 3653	AGCCATTTAATGGATGCATTTCTAGACCAAATTTATAATGCTGCAGCAATGGAATGG			3712
lery 482	CTTTGCTTCCGCTTAGATACGCTATCATGCTTACATTTGCGTTCTCCTTGATATTTCTG			541
ljct 3713	CTTTGCTTCCGCTGGATATGCTGTCATCCCTTACATTTGCTTCTCTTTGATATTTTGG			3772
lery 542	ATCAGTCTACCGACTGGTCTCATTGATCAGCAATTGCTGGTCTCGCTGTACATATGGG			601
ljct 3773	GTCAATCTTCCGACTGGTCTCATCGATCCAGGAATTTCTGGTCTAGCAGTCACATACGGG			3832
lery 602	CTTAATTTGAATACTCTGCAAGCAT	626		
ljct 3833	CTTAATCTGAACATGCTGCAAGCAT	3857		

Αποτελέσματα ευθυγράμμισης μεταξύ του γονιδίου ενδιαφέροντος και του ομόλογου γονιδίου που έχει αλληλουχιστεί στο ρύζι.

2. Iron inhibited ABC transporter 2

>JF747419.1 *Lolium perenne* putative iron inhibited ABC transporter 2 mRNA, partial

```
ACATCGCACGGTTTGGTCATGGATCTGCAAAGCTTGCTCGCCAGGCTCA
GAGCAAAGAGAAAACCTCTTGCAAAGATGGAGCGTGCTGGTCTTGCTGAG
AAGGTTGTCAATGACAAGATTCTGGTGTTCGGCTTTACAGATGTTGGTAA
ACTCCCACCACCAGTGCTACAGTTCGCTGATGTGACATTTGGATACACTC
CAGATAATCTCATTTACAAGAACCTTGACTTTGGTGTGACCTTGACTCAA
GAGTTGCACTGGTCGGCCCCAATGGTGCGGGGAAAAGCACACTTCTGA
AGCTCATGACCGGTGACCTAACTCCATTGGACGGCATGGTTAGGCGCCA
CAATCACCTACGCATTGCACAGTTCATCAACATCTCACTGAGAAGCTGG
ACCTAGACATGCCAGCCCTGCAGT
```

Παρακάτω φαίνεται η χαρακτηρισμένη ακολουθία με την υψηλότερη ομολογία και τα αποτελέσματα ευθυγράμμισης.

>MG596298.1:971-1390 *Triticum aestivum* ABCF1a mRNA, complete cds

```
ACATTGCACGATTTGGTCATGGATCTGCGAAGCTTGCTCGTCAGGCTCA
GAGCAAAGAGAAGACTCTTGCAAAGATGGAGCGTGGTGGTCTTGCTGAG
AAGGTTGTCAATGACAGGATTCTTGTATTCCGCTTTACAGATGTTGGCAA
ACTCCCACCACCAGTGCTGCAGTTTGCTGATGTACATTTGGTTACACTC
CGGATAATCTCATCTACAAGAACCTTGACTTCGGTGTGACCTTGACTCG
AGAGTTGCACTGGTCGGTCCCAATGGGGCTGGTAAGAGCACACTTCTGA
AGCTCATGACAGGTGACCTATCTCCGTTGGATGGCATGGTCAGACGCCA
CAACCACCTACGCATTGCACAATTCCATCAACATCTCACTGAGAAGCTGG
ACCTGGACATGCCGGCCCTGCAGT
```

Triticum aestivum ABCF1d mRNA, complete cds

Sequence ID: [MG596300.1](#) Length: 1779 Number of Matches: 1

Range 1: 971 to 1390 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
593 bits(321)	2e-165	387/420(92%)	0/420(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACATCGCACGGTTTGGTCATGGATCTGCAAAGCTTGCTCGCCAGGCTCAGAGCAAAGAGA	60		
Sbjct 971	ACATTGCCCGATTTGGTCATGGATCTGCGAAGCTTGCTCGTCAGGCTCAGAGCAAAGAGA	1030		
Query 61	AAACTCTTGCAAAGATGGAGCGTGTGGTCTTGCTGAGAAGGTTGTCAATGACAAGATTC	120		
Sbjct 1031	AGACTCTTGCAAAGATGGAGCGTGGTGGTCTTGCTGAGAAGGTTGTCAATGACAGGATTC	1090		
Query 121	TGGTGTTCGGCTTTACAGATGTTGGTAAACTCCCACCACCAGTGTACAGTTCGCTGATG	180		
Sbjct 1091	TTGTTTTCCGCTTTACAGATGTTGGCAAACCTCCCACCACCAGTGTGCAGTTTGGTGTGATG	1150		
Query 181	TGACATTTGGATACACTCCAGATAATCTCATTTACAAGAACCTTGACTTTGGTGTGACC	240		
Sbjct 1151	TGACATTTGGTTACACTCCGGATAATCTCATCTACAAGAACCTTGACTTCGGTGTGACC	1210		
Query 241	TTGACTCAAGAGTTGCACTGGTCGGCCCAATGGTGGGGAAAAGCACACTTCTGAAGC	300		
Sbjct 1211	TTGACTCGAGAGTTGCACTGGTCGGTCCCAATGGGGCAGGTAAGAGCACACTTCTGAAGC	1270		
Query 301	TCATGACCGGTGACCTAACTCCATTGGACGGCATGGTTAGGCGCCACAATCACCTACGCA	360		
Sbjct 1271	TCATGACAGGTGACCTATCTCCGTTGGATGGCATGGTCAGACGCCACAACCACCTACGCA	1330		
Query 361	TTGCACAGTTCCATCAACATCTCACTGAGAAGCTGGACCTAGACATGCCAGCCCTGCAGT	420		
Sbjct 1331	TTGCACAATTCCATCAACATCTCACTGAGAAGCTGGACCTGGACATGCCGGCCCTGCAGT	1390		

Αποτελέσματα ευθυγράμμισης μεταξύ του γονιδίου ενδιαφέροντος και του ομόλογου γονιδίου που έχει αλληλουχιστεί στο σιπάρι.

3. Multidrug resistance-associated protein

>JF747403.1 *Lolium perenne* multidrug resistance-associated protein mRNA, partial cds

ACAATCATCAGCATTGCGCACAGGATACCGACGGTCATGGACTGCGACA
 GAGTCCTGGTCATAGATGCAGGACTAGCCAAGGAGTTTGACCGGCCTGC
 CGCCCTGATTGAAAGGCCATCGCTCTTTGGAGCATTGGTTCAAGAGTAT
 GCAAACCGGTCATCTGACGTGTAGCCAATGAGGTAATGGCCAATTTTTG
 AGTTCAAAATTTGGGAGGAATTCCTGGATGGGGATCTTCAGGAGGTGAC
 ACGAGCAACCATCATTCAAGCTCTTTGAGCAGCATGTCCTAAAAAATATG
 TGAGCTGTGATTGATCATGAGAAAGATTAGGAGAAGCCAGAGTGTGAGG
 TAGGCATCGAGATGTGCAGAGACAAACTCCAAGATATCTTTGAGCTTATC
 AAGCTTGAATGTTTTCTACTACTATGAGCTGAAGCTGGTATATAATGTATT
 TTGCAAATATTTTTAGTTCAACGGTGACCTGTATGAAACTGAGTCTCAG

GGATTTGAAGAACATTTCTTTGTCCGAGAGAATGTGAAAACGTTTGGTTC
 GTGCTGTTTATACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Παρακάτω παρουσιάζεται η χαρακτηρισμένη ακολουθία με την υψηλότερη ομολογία και τα αποτελέσματα ευθυγράμμισης.

>AY064479.1:2127-2579 *Triticum aestivum* multidrug resistance-associated protein MRP1 mRNA, partial cds

ACCATCATCAGCATTGCGCACAGGATACCGACGGTCATGGACTGCGACA
 GAGTCCTGGTAGTTGATGCAGGACTAGCAAAGGAGTTTGACCGACCTGC
 CGCCCTGATCGAAAGACCGTCGCTCTTTGGAGCATTGGTTCAAGAGTAC
 GCAAACCGGTCGTCTGACATGTAGCCGATGAGAGGAATGGCCAATTTTC
 TGCTTCAAGACTTGGGAGGGATTTCAGGGATGGAGATTTCTCCAGGAGGT
 GGCATGAGCAGCCTGCACTCGTACTCTGAAAACCAAGTCCTAAAAAATAT
 GTCACCGGCGGTGATTGATCTTGAGCAAGGTCAAGGAGAAGCCAGTGT
 GAGATAGGCATATGATCCGCAGAGATTAATTCCATGATTTCAATCAACCC
 ATTAAGCTGGAGTTTTTCTGTCACTAGTATGAGCTGACGATGGTGTATGA
 TGTATTATGC

[Download](#) [GenBank Graphics](#)

Triticum aestivum multidrug resistance-associated protein MRP1 mRNA, partial cds
 Sequence ID: [AY064479.1](#) Length: 2647 Number of Matches: 1

Range 1: 2127 to 2579 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
374 bits(202)	3e-99	377/460(82%)	18/460(3%)	Plus/Plus
Query 1	ACAATCATCAGCATTGCGCACAGGATACCGACGGTCATGGACTGCGACAGAGTCCTGGTC			60
Sbjct 2127	ACCATCATCAGCATTGCGCACAGGATACCGACGGTCATGGACTGCGACAGAGTCCTGGTA			2186
Query 61	ATAGATGCAGGACTAGCCAAGGAGTTTGACCGCCCTGCCGCCCTGATTGAAAGGCCATCG			120
Sbjct 2187	GTTGATGCAGGACTAGCAAAGGAGTTTGACCGACCTGCCGCCCTGATCGAAAGACCGTCG			2246
Query 121	CTCTTTGGAGCATTGGTTCAAGAGTATGCAAACCGGTCATCTGACGTGTAGCCAATGAG-			179
Sbjct 2247	CTCTTTGGAGCATTGGTTCAAGAGTACGCAAACCGGTCGTCTGACATGTAGCCGATGAGA			2306
Query 180	GTAATGGCCAATTTT-TGAGTTCAAATTTGGGAGGAATTCCTGGATGGGGATCT-T-CA			236
Sbjct 2307	GGAATGGCCAATTTTCTGC-TTCAAGACTTGGGAGGGATTTCAGGGATGGAGATTTCTCCA			2365
Query 237	GGAGGTGACACGAGCAACCATCATTCAAGCTCTTTGAGCAGCATGTCTAAAAAATATGT			296
Sbjct 2366	GGAGGTGGCATGAGCAGCCTGCACTCGTACTC--TGAAAACCAAGTCTAAAAAATATGT			2423
Query 297	GA---GCTGTGATTGATCATGAGAAAAGATTA-GGAGAAGCCAGAGTGTGAGGTAGGCATC			352
Sbjct 2424	CACCGGCGGTGATTGATCTTGAGCAAGGTCAAGGAGAAGCC--AGTGTGAGATAGGCATA			2481
Query 353	GAGATGTGCAGAGACAAACTCCAAGATATCTTTGAGCTTATCAAGCTTGAATGTTTTCT-			411
Sbjct 2482	T-GATCCGCAGAGATTAATTCCATGATTTCAATCAACCCATTAAGCTGGAGT-TTTTCTG			2539
Query 412	--ACTACTATGAGCTGAAGCTGGTATATAATGTATTTTGC		449	
Sbjct 2540	TCACTAGTATGAGCTGACGATGGTGTATGATGTATTATGC		2579	

Αποτελέσματα ευθυγράμμισης μεταξύ του γονιδίου ενδιαφέροντος και του ομόλογου γονιδίου που έχει αλληλουχηθεί στο σιτάρι.

4. LpM10

aatgcatcttagatacattttgattcatgaaaaattgaaacaaaaactacaggttagacaagaaagaa
aaaaaagttcaatcatgtttcgggtgtatatcattgtacacaagccacaccataacaaatattccactttct
ggcaacattacatcaaaccgctgtattaacgaattttagtgatgaatcctgctgcatccaatacttcgatctac
atattttaaacgatttttaattatcatgtttccaagaataaaaactcatgtttggtgcaatgatgcatagatactgaa
ccagttctgaaactgtttgcaggtgaaggtgtgcggcacgacagacagcgcatggatccagaacggcacta
tcgaggagaacatcctgtttgggctgccaatggacggggagcgggtacaaggaggtgatcaggggtgtgctg
cctggagaaggacatggagatgatggagttcggcgaccagacagagatcggcgagcggggatcaac
ctcagcggcgggcagaagcagcgcacccagccgtctaccaggactgtgacatctacctcctcgacgacgt
gttcagtgacgttgatgcgcatcagggcagtgagatctcaaggtacttactgtacattatgttggtgacac
gctagctagactgaactgaatgttttaattgtctgaattctgaagtctgtttgcttaattatgtttctgcaggaatg
tgtgagaggtgctctgaagaacaagactgtggtactgtgactcaccaagtcgattctgcacaacgccgat
atcatatatgtaagcccaagtcgtatcattgcaaattcgagcagtagctgggcattgctgctaatacttcaa
acgtatgctgtgtacttgacaggtgatgggatgggacgatagcccaatctggcaagtacgacgagctca
tccagcgcggctcagactcgcggcgctcgtcggcgccacgacagctccatggagctcgtcgagagcgc
ggcgccagtgaccgagaaggagatgcccggcagctctcccggcagccgtccgccaacggccacggc
agcagcacgtcgaacggagacgtgtctgtggtggcgccaaggcggagaaggcgtcggcccggctgat
caaggaggaggagcgcgcgagtgggcacgtgagcctggccgtgtacaagcagtagatgacagaggca
tgggggtggtggggctggcgctggtcatcgccgtgtcctggcgtggcaggggtccgtaatggccagcagct
attggctcgcctacgagacctctgcagagaacgccgccacattccagccgtcgttttcatccatgtttatgcc
atcctggccggctcctcgtggtgctcgtgtcggggcggtcttctcctggtgattcatcggcctccgaccgcc
aattccttctcaagcagatcctcaacagcatcctccacgcgccatgtccttctcgacaccacccatccg
gcaggatcctcagcaggttacgcacgtagcaaactgtaattgttttctgtactttgacacgatgatgatgat
gttaattccatcctgaacacggtttcgactctcctcgatcttcaggcctcgtcagatcagacgaacgtcagc
tgttctgccgttctcgtctggtcagcgtgtccatgtacatcacgggtgatcagcgtgctgatcgtcacatgcc
gggtggcgtggccctcggatcgcctatcatccctctgctcattctcaatatgtggtaccgggtaagttattagct
accgctgccaatgaacctggtgcatacatacgtttgttttaaccgacaccttagtaagttcctatttgattgca
gggctactacctggcaacatcaggggagctgactcgcctcagttcatcaccaaggctccgggtgatccacc
acttctcagagacgggtcaggggtgatgacctcaggtgcttcaggaagggggatagcttctccaggaga
acctcaaccgggtcaattccagcttgaggatggactccacaacaatggcg

Η παραπάνω αλληλουχία ανακτήθηκε από το NCBI μετά από αναζήτηση όταν θέσαμε ως ερώτημα την αλληλουχία του γονιδίου- μεταφορέα ABC, M10, από το είδος *C. Canadensis*.

Παρακάτω παρουσιάζεται η χαρακτηρισμένη ακολουθία με την υψηλότερη ομολογία και τα αποτελέσματα ευθυγράμμισης.

>XM_020318248.1:2767-3394 PREDICTED: *Aegilops tauschii* subsp. *tauschii* ABC transporter C family member 14-like (LOC109759425), mRNA
 GTGATGAAGGAGGGTACGATAGTGCAATCCGGCAAGTACGACAAGCTCA
 TCCAGCGCGGCTCCGACTTTGCTGCGCTCGTCGCGGCGCACGACAGCT
 CCATGGAGCTCGTGGAGGGCGCGGGCGCCGGTGTCTGACGAGAAGGGG
 GAGACGCTGGCCATCTCCCGGCAGCCGTCCAGAAAGGGCAGTGGCAGA
 AGGCCGTGCAACGGGGAGGCGTCCGTGGTGGCGGAGAAGGCGTCCGGC
 GCGGCTGATCAAGGAGGAGGAGCGCGCGAGCGGGCACGTGAGCCTGG
 CCGTGTACAAGCAGTACATGACGGAGGCGTGGGGGTGGTGGGGCGTG
 GCGCTGGTGGTGGCCGTGTCCGTGGCATGGCAGGGGTCCGTGCTGGC
 CAGCGACTACTGGCTGGCCTACGAGACCGACGCCGAGAACGCCGCGTC
 GTTCCGGCCCGGCGCTGTTTCATCGAGGTGTACGCCATCATCGCCGTCCG
 GTCGGTGGTGTCTCGTGTCCGGCCGGTCCCTTCTGGTGGCCTTCATCGG
 CCTCCAGACCGCCAACCTCCTTCTTCAAGCAGATCCTCAACAGCATCCTC

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
647 bits(350)	0.0	545/638(85%)	17/638(2%)	Plus/Plus
Query 902		GTCATGAGGGATGGGACGATAGCCCAATCTGGCAAGTACGACGAGCTCATCCAGCGCGGGC		961
Sbjct 2767		GTGATGAAGGAGGGTACGATAGTGCAATCCGGCAAGTACGACAAGCTCATCCAGCGCGGGC		2826
Query 962		TCAGAC-TCGCGGCGCTCGTCGCGGCGCACGACAGCTCCATGGAGCTCGTCGAGAGCGCG		1020
Sbjct 2827		TCCGACTTTGCTGCGCTCGTCGCGGCGCACGACAGCTCCATGGAGCTCGTGGAGGGCGCG		2886
Query 1021		GCGCCAGTGAC---CGAAGAGGAGATGCGCCGGCAGTCTCCCGGAGCCGTCCGCCAAC		1077
Sbjct 2887		GCGCCGGTGTCTGACGAGAAGGGGAGACGCTGGCCATCTCCCGGAGCCGTCC-AGAAA		2945
Query 1078		GGCCA-CGGCAGCAGCACGTCGAACGGAGACGTGTCTGTGGTGGCGGCCAAGGCGGAGAA		1136
Sbjct 2946		GGGCAGTGGCAGAAAGGCCGTGAAACGGGGAGGCGTCCGTGGT-----GGCGGAGAA		2996
Query 1137		GGCGTCGGCCCGGCTGATCAAGGAGGAGGAGCGCGGAGTGGGCACGTGAGCCTGGCCGT		1196
Sbjct 2997		GGCGTCGGCGCGGCTGATCAAGGAGGAGGAGCGCGGAGCGGGCACGTGAGCCTGGCCGT		3056
Query 1197		GTACAAGCAGTACATGACAGAGGCATGGGGGTGGTGGGGC-TGGCGCTGGTTCATCGCCGT		1255
Sbjct 3057		GTACAAGCAGTACATGACAGAGGCATGGGGGTGGTGGGGC-TGGCGCTGGTGGTGGCCGT		3116
Query 1256		GTCCTTGGCGTGGCAGGGTTCGTAATGGCCAGCGACTATTGGCTCGCCTACGAGACCTC		1315
Sbjct 3117		GTCCGTGGCATGGCAGGGTCCGTGCTGGCCAGCGACTACTGGCTGGCCTACGAGACCGA		3176
Query 1316		TGCAGAGAACGCCGCCACATTCAGCCGTGCTTTTCATCCATGTTTATGCCATCCTGGC		1375
Sbjct 3177		CGCCGAGAACGCCCGCGCTGTTCCGGCCGGCGCTGTTTCATCGAGGTGTACGCCATCATCGC		3236
Query 1376		CGCGGTCCTCCGTGGTGCCTCGTGTCCGGGCGGGTCTTTCCCTCGTGGCATTTCATCGGCCCTCC-		1434
Sbjct 3237		CGTCCGCTCGGTGGTGTCTGTCGTCCGGGCGGGTCCCTTCCCTGGTGGCCTTCATCGGCCCTCA		3296
Query 1435		GACCCGCAATTCCTTCTTCAAGCAGATCCTCAACAGCATCCTCCAGCGGCCCATGTCCCTT		1494
Sbjct 3297		GACCCGCAACTCCTTCTTCAAGCAGATCCTCAACAGCATCCTCCAGCGGCCCATGTCCCTT		3356
Query 1495		CTTCGACACCACCCATCCGGCAGGATCCTCAGCAGGG	1532	
Sbjct 3357		CTTCGACACCACCCGTCGGCAGGATACTGAGCAGGG	3394	

Αποτελέσματα ευθυγράμμισης μεταξύ του γονιδίου ενδιαφέροντος από το φυτό *C. canadensis* και του ομόλογου γονιδίου που έχει αλληλουχηθεί στο *Aegilops tauschii* subsp. *tauschii*.

Method: 95,0 percent Duncan

<i>time point</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
3	12	1,409	1,30278	X
6	8	2,52463	1,59557	X
12	10	16,0212	1,45655	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
3 - 6		-1,11563
3 - 12	*	-14,6122

Multiple Range Tests for RQ ABC by treatment

Method: 95,0 percent Duncan

<i>treatment</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
C	15	1,75192	1,18927	X
X	15	11,5513	1,18927	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
C - X	*	-9,79939

Multidrugprotein gene

Analysis of Variance for RQ multidrugprotein - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:biotype	0,602491	1	0,602491	2,48	0,1341
B:time point	3,73389	2	1,86695	7,67	0,0042
C:treatment	0,177261	1	0,177261	0,73	0,4053
INTERACTIONS					
AB	2,57485	2	1,28742	5,29	0,0164
AC	2,3986	1	2,3986	9,85	0,0060
BC	12,8943	2	6,44715	26,49	0,0000
ABC	0,700673	2	0,350337	1,44	0,2646
RESIDUAL	4,13819	17	0,243423		
TOTAL (CORRECTED)	26,9106	28			

Multiple Range Tests for RQ multidrugprotein by biotype

Method: 95,0 percent Duncan

<i>biotype</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
27	15	0,841389	0,130017	X
21	14	1,13544	0,134281	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
21 - 27		0,294056

Multiple Range Tests for RQ multidrugprotein by time point

Method: 95,0 percent Duncan

<i>time point</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
3	12	0,710667	0,142426	X
12	9	0,731208	0,16701	X
6	8	1,52338	0,174436	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
3 - 6	*	-0,812708
3 - 12		-0,0205417

Multiple Range Tests for RQ multidrugprotein by treatment

Method: 95,0 percent Duncan

<i>treatment</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
C	14	0,908667	0,134281	X

X	15	1,06817	0,130017	x
---	----	---------	----------	---

Contrast	Sig.	Difference
C - X		-0,1595

Lpironinhibited

Analysis of Variance for RQ LpIron - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:biotype	2177,25	1	2177,25	1,31	0,2692
B:time point	5486,38	2	2743,19	1,65	0,2229
C:treatment	1969,73	1	1969,73	1,19	0,2924
INTERACTIONS					
AB	4520,13	2	2260,06	1,36	0,2847
AC	2645,78	1	2645,78	1,59	0,2251
BC	5369,21	2	2684,61	1,62	0,2295
ABC	5236,26	2	2618,13	1,58	0,2373
RESIDUAL	26583,9	16	1661,5		
TOTAL (CORRECTED)	51525,9	27			

Multiple Range Tests for RQ LpIron by biotype

Method: 95,0 percent Duncan

biotype	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
27	13	3,025	11,4353	x
21	15	20,9848	10,7416	x

Contrast	Sig.	Difference
21 - 27		17,9598

Multiple Range Tests for RQ LpIron by time point

Method: 95,0 percent Duncan

time point	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	11	0,677	12,4806	x
12	8	3,26338	14,4113	x
6	9	32,0744	13,7978	x

Contrast	Sig.	Difference
3 - 6		-31,3974
3 - 12		-2,58638

Multiple Range Tests for RQ LpIron by treatment

Method: 95,0 percent Duncan

treatment	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
C	15	3,46367	10,7416	x
X	13	20,5462	11,4353	x

Contrast	Sig.	Difference
C - X		-17,0825

LpM10

Analysis of Variance for RQ LpM10 - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:biotype	0,00090796	1	0,00090796	0,00	0,9614
B:time point	22,8497	2	11,4248	30,52	0,0000
C:treatment	0,513571	1	0,513571	1,37	0,2597
INTERACTIONS					

AB	2,4603	2	1,23015	3,29	0,0655
AC	1,95448	1	1,95448	5,22	0,0373
BC	2,96282	2	1,48141	3,96	0,0417
ABC	13,6427	2	6,82135	18,23	0,0001
RESIDUAL	5,61423	15	0,374282		
TOTAL (CORRECTED)	49,8915	26			

Multiple Range Tests for RQ LpM10 by biotype

Method: 95,0 percent Duncan

<i>biotype</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
21	14	1,75222	0,166507	x
27	13	1,764	0,171632	x

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
21 - 27		-0,0117778

Multiple Range Tests for RQ LpM10 by time point

Method: 95,0 percent Duncan

<i>time point</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
12	9	0,957958	0,20709	x
3	10	1,21263	0,197453	x
6	8	3,10375	0,216299	x

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
3 - 6	*	-1,89113
3 - 12		0,254667

Multiple Range Tests for RQ LpM10 by treatment

Method: 95,0 percent Duncan

<i>treatment</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
X	13	1,61806	0,171632	x
C	14	1,89817	0,166507	x

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
C - X		0,280111