



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΑΕΙΦΟΡΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ,
ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ & ΣΤΗΝ ΑΓΡΟΜΕΤΕΩΡΟΛΟΓΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Έλεγχος της προσαρμοστικότητας δυο γηγενών ποικιλιών αμπέλου
της Περιφέρειας Ηπείρου, μέσω της μελέτης γενετικών και επιγενετικών
μηχανισμών, σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης

Γρηγόριος Κ. Μανιάτης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Τάνη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Έλεγχος της προσαρμοστικότητας δυο γηγενών ποικιλιών αμπέλου της Περιφέρειας Ηπείρου, μέσω της μελέτης γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών, σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης

Stress-related gene expression and epigenetic modifications in indigenous grapevine varieties from the ‘Epirus’ region of Greece with differential responses upon consecutive drought stress

Γρηγόριος Κ. Μανιάτης

Εξεταστική Επιτροπή

Τάνη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ (Επιβλέπουσα)
Καπάζογλου Αλίκη, Κύρια Ερευνήτρια, ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ
Μπεμπέλη Πηνελόπη, Καθηγήτρια, ΓΠΑ

Έλεγχος της προσαρμοστικότητας δυο γηγενών ποικιλιών αμπέλου της περιφέρειας Ηπείρου, μέσω της μελέτης γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών, σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης

ΠΜΣ Καινοτόμες Εφαρμογές στην Αειφορική Γεωργία, στη Βελτίωση Φυτών & στην Αγρομετεωρολογία
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών & Γεωργικού Πειραματισμού

Περίληψη

Οι επιδράσεις της κλιματικής μεταβλητότητας, επηρεάζουν ιδιαίτερα τους βιολογικούς κύκλους των φυτών, επιδρώντας στην προσαρμοστικότητα, την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα του συνόλου των καλλιεργειών. Μία από τις βασικότερες όψεις της εντεινόμενης αυτής συνθήκης για τα φυτά είναι η υδατική καταπόνηση. Η άμπελος αποτελεί μια από τις σημαντικότερες καλλιέργειες στον ελλαδικό χώρο, και πλήττεται ιδιαίτερα από την υδατική καταπόνηση. Μετά από πειραματική καλλιέργεια και καταπόνηση σειράς γηγενών ποικιλιών της Ηπείρου, επιλέχθηκε η ποικιλία Ντεμπίνα και η ποικιλία Διχάλι. Η ανάλυση των μορφολογικών και φυσιολογικών αποκρίσεων σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης, παρουσίασε αξιοσημείωτες διαφορές στη συμπεριφορά των δύο συγκεκριμένων ποικιλιών τόσο σε αυτόριζα όσο και σε εμβολιασμένα φυτά, με την ποικιλία Διχάλι να αποτυπώνει υψηλότερη αντοχή στην καταπόνηση. Οι ποικιλίες επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη με στόχο τον προσδιορισμό των γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών που πιθανόν εμπλέκονται στην απόκριση σε υδατική καταπόνηση. Συγκεκριμένα, οι ποικιλίες υποβλήθηκαν σε δύο φάσεις καταπόνησης (άρδευση με 50% και 25% της υδατοχωρητικότητας) και μια περίοδο ανάκαμψης μεταξύ των δύο φάσεων με στόχο τον εντοπισμό επιγενετικών μηχανισμών και παραγόντων που ρυθμίζουν την προσαρμοστικότητα. Μέσω qPCR ανάλυσης μελετήθηκαν δύο miRNAs και τα γονίδια στόχοι τους, που περιλαμβάνουν: Α) το *miRNA159* και τα γονίδια-στόχους *VnMYB101*, *VnGATA-26 like*, *VnTOPLESS-4 like*, Β) το *miRNA156* και το γονίδιο-στόχος *VnCONSTANS-5*. Τα γονίδια αυτά αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες ρύθμισης διαφόρων βιοχημικών διεργασιών που σχετίζονται με την αύξηση και την ανάπτυξη, και το γονίδιο *VnTOPLESS-4 like* αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα αναστολής. Η συγκριτική ανάλυση κατέδειξε μεγάλη απόκλιση στην έκφραση των miRNAs αλλά και των γονιδίων στόχων στις δύο ποικιλίες, μεταξύ των εμβολιασμένων και των αυτόριζων φυτών σε όλες τις φάσεις της καταπόνησης. Ειδικότερα, στα εμβολιασμένα φυτά παρατηρείται ένα αρκετά σταθερό προφίλ έκφρασης, τόσο στις δύο φάσεις καταπόνησης όσο και στην περίοδο της ανάκαμψης. Αντίθετα στα αυτόριζα φυτά, η διακύμανση της έκφρασης είναι μεγάλη σε όλα τα στάδια του πειράματος, τόσο στα miRNAs όσο και στα γονίδια στόχους. Τα εμβολιασμένα φυτά δείχνουν να παρουσιάζουν υψηλότερη αντοχή στην καταπόνηση από τα αυτόριζα, πιθανώς λόγω της επίδρασης του υποκειμένου. Η ανάλυση της έκφρασης του *VnTOPLESS-4 like*, παρουσιάζει αξιοσημείωτα αποτελέσματα, καθώς είναι πολλαπλάσια στην ποικιλία Ντεμπίνα σε σχέση με την ποικιλία Διχάλι, και παρουσιάζει σχετικά αντίστροφο προφίλ από το *miRNA159* του οποίου αποτελεί γονίδιο στόχο. Η έκφραση των υπολοίπων γονιδίων αποτυπώνεται υψηλότερη στην ποικιλία Διχάλι. Τα παραπάνω αποτελέσματα πιθανώς να αιτιολογούν την μορφολογική υπεροχή της ποικιλίας Διχάλι ως προς την αντίδραση στην υδατική καταπόνηση. Περαιτέρω μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *VnTOPLESS-4 like*, αλλά και της αντίδρασης της ποικιλίας Διχάλι στην υδατική καταπόνηση, πιθανόν να δώσει νέα στοιχεία για την αντιμετώπιση των επιδράσεων της συγκεκριμένης καταπόνησης.

Επιστημονική περιοχή: Γενετική Βελτίωση Φυτών

Λέξεις κλειδιά: υδατική καταπόνηση, έκφραση γονιδίων, επιγενετική, *MYB*, *GATA*, *TOPLESS*, *CONSTANS*, *miRNA159*, *miRNA156*, άμπελος

Stress-related gene expression and epigenetic modifications in indigenous grapevine varieties from the Epirus region of Greece with differential responses upon consecutive drought stress

MSc Innovative Applications in Sustainable Agriculture, Plant Breeding and Agrometeorology
Department of Crop Science
Laboratory of Plant Breeding and Biometry

Abstract

Climate change influences the biological cycles of plants, affecting the adaptability, growth, and productivity of all crops. One of the main aspects of this intensifying condition for plants is drought stress. Grapevine is one of the most important cultivars in Greece and is particularly affected by drought stress. After experimental cultivation and drought exposure of a series of autochthonous grapevine varieties from Epirus, 'Debina' and 'Dichali' were selected. The analysis of morphological and physiological responses to drought stress, showed remarkable differences in the behavior of the two specific varieties in both self-rooted and grafted plants. 'Dichali' displayed higher tolerance to dehydrating conditions. The varieties were further studied with the aim of identifying the genetic and epigenetic mechanisms likely involved in the response to drought stress. In particular, self-rooted and grafted plants underwent two stress phases (irrigation with 50% and 25% of water capacity) and a recovery period between the two phases, aiming at identifying epigenetic mechanisms and factors regulating adaptability. Through qPCR analysis two miRNAs and their target genes were studied, including: A) *miRNA159* and target genes *VvMYB101*, *VvGATA-26* like, and *VvTOPLESS-4* like, B) *miRNA156* and the target gene *VvCONSTANS-5*. These target genes encode transcription factors regulating the various biochemical processes associated with growth and development, and the *VvTOPLESS-4* like gene constitutes a transcriptional corepressor. Comparative analysis showed a large fluctuation in the expression of miRNAs and target genes in the two varieties, between the grafted and self-rooted plants in all phases of stress. In particular, in grafted plants, a fairly stable expression profile is observed, both in the stress phases and in the recovery period. In contrast, in self-rooted plants, the variation in expression is high at all phases of the experiment, both for miRNAs and target genes. Grafted plants appear to show higher resistance to stress than the self-rooted ones, probably due to the influence of the rootstock. The analysis of the expression of *VvTOPLESS-4* like, shows remarkable results, as it is much higher in 'Debina' as compared to 'Dichali', and reveals an expression profile inversely related to that of *miRNA159* of which it is a target gene. Analysis of the remaining genes demonstrated higher expression in the 'Dichali' variety. The above results may justify the morphological superiority of the 'Dichali' variety in terms of drought stress response. Further study of the *VvTOPLESS-4* like gene, but also of the 'Dichali' response to drought, may provide new evidence to be utilized for efficient management of drought stress in grapevine.

Scientific Area: Plant Breeding

Key words: drought stress, gene expression, epigenetics, *MYB*, *GATA*, *TOPLESS*, *CONSTANS*, *miRNA159*, *miRNA156*, grapevine

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην καθηγήτρια και επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτρια Ελένη Τάνη, για την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγηση της σε όλα τα στάδια αυτής της εργασίας. Το ενδιαφέρον και η συνεχής υποστήριξη της ήταν κομβικής σημασίας για ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κύρια Ερευνήτρια του ΤΑ – ΙΕΛΥΑ - ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ, Δρ Αλίκη Καπάζογλου, όπως και την Καθηγήτρια Πηνελόπη Μπεμπέλη, για την βοήθεια τους και για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας μελέτης, καθώς επίσης και το μέλος Ε.ΔΙ.Π. του εργαστήριου Αναστάσιο Κατσιλέρο και τη Θεοδώρα Πιτσώλη (M.Sc.) μέλος του Τεχνικού Επιστημονικού Προσωπικού του ΤΑ-ΙΕΛΥΑ-ΕΛΓΟ Δήμητρα.

Ακόμα ευχαριστώ ιδιαιτέρως την υποψήφια διδακτόρισα Έφη Σαρρή, καθώς και την υποψήφια διδακτόρισα Μαρία Γερακάρη για την άριστη συνεργασία, την καθοδήγηση και τον χρόνο που διέθεσαν.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την συνεχή στήριξη που μου προσφέρουν όλα αυτά τα χρόνια.

ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος, Γρηγόριος Μανιάτης 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.

Μανιάτης Γρηγόριος, Αθήνα, 30/10/2022

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή.....	14
1.1 Ιστορικά στοιχεία αμπέλου.....	14
1.2 Βοτανική καταγωγή της αμπέλου	15
1.3 Ελληνικά και παγκόσμια στοιχεία παραγωγής αμπέλου.....	16
1.4 Άμπελος και κλιματολογικές συνθήκες	19
1.4.1. Μεσογειακό κλίμα	19
1.4.2. Υδατικές ανάγκες αμπέλου	20
1.5 Προσαρμογή της καλλιέργειας υπό το πρίσμα της κλιματικής μεταβλητότητας.	20
1.6 Υδατική καταπόνηση	21
1.6.1 Επίδραση υδατικής καταπόνησης στην αύξηση, στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή της αμπέλου	21
1.6.2 Επίδραση υδατικής καταπόνησης στην φωτοσύνθεση	22
1.6.3 Επίδραση υδατικής καταπόνησης στην ράγα.....	23
1.7 Φυτογενετικοί Πόροι.....	23
1.7.1 Παραδοσιακές ποικιλίες.....	24
1.8 Ποικιλία ‘Ντεμπίνα’	25
1.9 Ποικιλία Διχάλι.....	27
1.10 Εμβολιασμός.....	27
1.10.1 Υποκείμενο 110 Richter.....	28
1.11 Επιγενετική.....	29
1.11.1 Επιγενετική και υδατική καταπόνηση.....	30
1.12 micro-RNAs.....	31
1.12.1 micro-RNA και υδατική καταπόνηση.....	33
1.13 miRNA159, miRNA156.....	34
1.14 Μεταγραφικοί παράγοντες	35
1.15 Έκφραση γονιδίου <i>MYB</i>	35
1.16 Έκφραση γονιδίου <i>GATA</i>	36
1.17 Έκφραση γονιδίου <i>TOPLESS</i>	37

1.18 Έκφραση γονιδίου <i>CONSTANS</i>	39
1.19 Σκοπός της παρούσας μελέτης	39
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	40
2.1 Φυτικό υλικό.....	40
2.2 Απομόνωση RNA	41
2.3 Μέτρηση συγκέντρωσης RNA	43
2.4 cDNA σύνθεση	43
2.5 Σχετική έκφραση γονιδίων – qPCR ανάλυση	44
2.6 cDNA σύνθεση για miRNAs.....	46
2.7 Σχετική ποσοτική έκφραση miRNAs – qPCR ανάλυση.....	47
2.8 Στατιστική ανάλυση.....	48
3. Αποτελέσματα	49
3.1 Έκφραση γονιδίου <i>MYB</i>	50
3.1.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του γονιδίου <i>MYB</i>	51
3.2 Έκφραση γονιδίου <i>GATA</i>	54
3.2.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του γονιδίου <i>GATA</i>	56
3.3 Έκφραση γονιδίου <i>TOPLESS</i>	58
3.3.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του γονιδίου <i>TOPLESS</i>	60
3.4 Έκφραση <i>miRNA159</i>	62
3.4.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του <i>miRNA159</i>	64
3.5 Έκφραση γονιδίου <i>CONSTANS</i>	66
3.5.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του γονιδίου <i>CONSTANS</i>	68
3.6 Έκφραση <i>miRNA156</i>	70
3.6.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του <i>miRNA156</i>	72
4. Συζήτηση.....	74
Παράρτημα.....	82
Βιβλιογραφία.....	88
Ελληνική Βιβλιογραφία	88
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	88
Διαδικτυακές Αναφορές.....	97

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Μεταβολή της διαθέσιμης έκτασης για την καλλιέργεια αμπέλου α)σε Ευρωπαϊκές και β) Ασιατικές χώρες την περίοδο 2000-2010. Πηγή: ΟΙΥ.....	17
Εικόνα 2: Σημαντικότερη Οινοποιήσιμη Ποικιλία ανά Περιφέρεια, έτος 2020. Πηγή: Εθνική Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών https://www.etheas.gr/el/products/details/ENIMEROSI/I-aktinografia-toy-ellinikoy-ampelona	18
Εικόνα 3: Ποικιλία Ντεμπίνα ΠΗΓΗ: προσωπικό αρχείο Δώρας Πιτσώλη	26
Εικόνα 4: Ποικιλία Διχάλι Πηγή: https://zoinos.gr	27
Εικόνα 5: Τρεις βασικές κατηγοριοποιήσεις των επιγενετικών μηχανισμών. Λήψη από ΠΗΓΗ:(Dubey et al., 2022).....	30
Εικόνα 6: Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των micro-RNAs στα φυτά. Λήψη από Πηγή: (J. Wang et al., 2019).....	33
Εικόνα 7: Σχηματική αποτύπωση της ρύθμισης των μηχανισμών απόκρισης σε αβιοτικές καταπονήσεις απο micro-RNAs. Λήψη από ΠΗΓΗ:(Pervaiz et al., 2022).....	34
Εικόνα 8:Αποτύπωση της εμπλοκής του TOPLESS σε μια σειρά διεργασιών του φυτού, Πηγή: (A. Plant et al., 2021).....	38
Εικόνα 9: Γραφική αποτύπωση της διαδικασίας καταπόνησης.	41
Εικόνα 10:Καμπύλη της θερμοκρασίας μετουσίωσης του γονιδίου GATA στην ποικιλία Ντεμπίνα.....	46
Εικόνα 11:Ρυθμός ανάπτυξης βλαστού, ποικιλία Ντεμπίνα	49
Εικόνα 12: Ρυθμός ανάπτυξης βλαστού, ποικιλία Διχάλι.....	49
Εικόνα 13 : Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου MYB σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.....	50
Εικόνα 14: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου MYB σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.....	51
Εικόνα 15 Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου MYB σε αυτόριζα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14	52

Εικόνα 16: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου MYB σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14	53
Εικόνα 17: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου GATA σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.....	54
Εικόνα 18: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου GATA σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.....	55
Εικόνα 19: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου GATA σε αυτόριζα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14	56
Εικόνα 20: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου GATA σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro	57
Εικόνα 21: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου TOPLESS σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.....	58
Εικόνα 22: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου TOPLESS σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι	59
Εικόνα 23: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου TOPLESS σε αυτόριζα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 1	60
Εικόνα 24: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου TOPLESS σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP P.....	61
Εικόνα 25: Διάγραμμα έκφρασης του miRNA159 σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.....	62
Εικόνα 26: Διάγραμμα έκφρασης του miRNA159 σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.....	63
Εικόνα 27: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του miRNA159 σε αυτόριζα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η	

ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.....	64
Εικόνα 28: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του miRNA159 σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14	65
Εικόνα 29: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου CONSTANS σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.....	66
Εικόνα 30: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου CONSTANS σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι	67
Εικόνα 31: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου CONSTANS σε αυτόριζα φυτά.Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows–JMP Pro 14	68
Εικόνα 32: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του CONSTANS σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows–JMP Pro 14	69
Εικόνα 33: Διάγραμμα έκφρασης του miRNA156 σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.....	70
Εικόνα 34: Διάγραμμα έκφρασης του miRNA156 σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.....	71
Εικόνα 35: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του miRNA156 σε αυτόριζα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.....	72
Εικόνα 36: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του miRNA156 σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14	73

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1:Συστηματική κατάταξη της αμπέλου. Πηγή: Νικολάου Α.Ν. 2011.....	16
Πίνακας 2: Στοιχεία παραγωγής αμπέλου στην Ελλάδα. Πηγή: ΕΛΣΤΑΤ	18
Πίνακας 3:: Στάδια υδατικής καταπόνησης.....	40
Πίνακας 4: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου MYB σε αυτόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.	52
Πίνακας 5:Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου MYB σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.....	53
Πίνακας 6: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου GATA σε αυτόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.	56
Πίνακας 7: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου GATA σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.....	57
Πίνακας 8: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου TOPLESS σε αυτόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.....	60
Πίνακας 9: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου TOPLESS σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.....	61
Πίνακας 10: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του miRNA159 σε αυτόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14	64
Πίνακας 11: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του miRNA159 σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο	

του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.	65
Πίνακας 12: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου CONSTANS σε αυτόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.....	68
Πίνακας 13: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου CONSTANS σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.....	69
Πίνακας 14: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του miRNA156 σε αυτόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14	72
Πίνακας 15: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του miRNA156 σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.	73

1.Εισαγωγή

1.1 Ιστορικά στοιχεία αμπέλου

Η άμπελος αποτελεί ένα από τα πρώτα βρώσιμα είδη που καταναλώθηκαν από τον άνθρωπο-τροφοσυλλέκτη, ήδη από τη μεσολιθική περίοδο. Άγριοι συγγενείς της αμπέλου εμφανίζονται από την μεσολιθική και την νεολιθική περίοδο, και οι πρώτες ενδείξεις εξημέρωσης και καλλιέργειας της αμπέλου παρουσιάζονται στην μέση Ανατολή. Οι παλαιότερες ενδείξεις οινοποίησης συναντώνται στα βουνά του βόρειου Ιράν ήδη από την 6^η χιλιετηρίδα Η συστηματική καλλιέργεια εμφανίζεται περί του 5000-4000 π.Χ., τόσο στους Αιγύπτιους όσο και στους Σουμέριους (This et al., 2006). Στον ελλαδικό χώρο, βάσει των ευρημάτων, η χρήση αυτοφυούς αμπέλου χρονολογείται πριν το 5000 π.Χ. Η καλλιέργεια της αμπέλου και οι καλλιεργητικές τεχνικές εισέρχονται από περιοχές της ανατολής, και περί το 2000 π.Χ., η άμπελος αποτελεί ένα από τα βασικότερα καλλιεργήσιμα ήδη. Σύμφωνα με τα αρχαιολογικά ευρήματα η παλαιότερη ένδειξη οινοποίησης στον ευρύτερο ελλαδικό χώρο αποτυπώνεται στην ευρύτερη περιοχή της Δράμας, συγκεκριμένα κοντά στην αρχαία πόλη των Φιλίππων (ανασκαφή "Ντικιλί Τας"), όπου εμφανίζεται συστηματοποιημένη οινοποίηση ήδη από τα τέλη της 5^{ης} χιλιετηρίδας π.Χ. (Valamoti et al., 2007). Τα ευρήματα της περιοχής καταδεικνύουν την πιθανότητα η οινοποίηση να προέρχεται από εξαιρετικά πρόωμη περίοδο εξημέρωσης καλλιέργειας, σχεδόν χίλια χρόνια πριν την παγίωση των καλλιεργητικών τεχνικών κατά τον Κυκλαδίτικο και Μινωικό πολιτισμό (Garnier & Valamoti, 2016). Η αμπελουργία και οινοποίηση ακμάζουν κατά τα Μινωικά χρόνια στην Κρήτη, όπου πλήθος πέτρινων λινών διασώζεται μέχρι και σήμερα, και εξαπλώνεται σε όλο την νότια Ελλάδα με την άνθιση του εμπορίου του οίνου κατά την ανάπτυξη του Μυκηναϊκού Πολιτισμού (Νικολάου, 2011).

Με την εξάπλωση των ελληνικών αποικιών η αμπελουργία και η οινοποίηση μεταφέρεται στην Ιταλία, και μετέπειτα κατά την Ρωμαϊκή αυτοκρατορία σε όλη την Ευρώπη. Στην Γαλλία οι αμφορείς αντικαθίστανται για πρώτη φορά με ξύλινα βαρέλια από τους Γαλάτες, ενώ η βελτίωση την χρήσης και της επεξεργασίας του γυαλιού και οι πρώτες μορφές εμφιάλωσης δίνουν στην εξάπλωση της αμπελουργίας και στην οινοποίηση ακόμα μεγαλύτερη ώθηση (Νικολάου, 2011). Κατά τον 16^ο αιώνα η άμπελος μεταφέρεται σε περιοχές που δεν εμφανιζόταν ως αυτοφύες φυτό, όπως η Αμερική, η Νότια Αφρική και η Νέα Ζηλανδία

αργότερα. Ειδικά στην Αμερική μεταφέρθηκαν και καλλιεργήθηκαν συστηματικά αρχικά σπόροι και μετέπειτα μοσχεύματα από Γαλλικές, Ιταλικές, Γερμανικές αλλά και Ισπανικές ποικιλίες (This et al., 2006).

Μετά από χιλιετίες συστηματικής καλλιέργειας και γεωγραφικής εξάπλωσης, κατά τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, οι ευρωπαϊκοί αμπελώνες υπέστησαν σημαντικές ζημιές, καθώς παράγοντες που εισήχθησαν κυρίως από την Αμερική, όπως η Φυλλοξήρα (*Daktulosphaira vitifoliae*), πρόσβαλλαν το μεγαλύτερο μέρος της καλλιέργειας, υποβαθμίζοντας δραστικά την βιοποικιλότητα της αμπέλου, στο βαθμό που η υπάρχουσα ποικιλότητα παρουσιάζεται ως κλάσμα της ποικιλότητας που αποτυπωνόταν πριν την εμφάνιση της Φυλλοξήρας. Οι αμπελώνες διασώθηκαν με την εκτεταμένη χρήση ανθεκτικών υποκειμένων από φυτά *Vitis* που δεν ανήκουν στο είδος *vinifera*. Τα τελευταία χρόνια συντελείται ακόμα μια δραστική μείωση της διαθέσιμης βιοποικιλότητας, εξαιτίας της παγκοσμιοποίησης της αγοράς των προϊόντων της αμπέλου, και της δημιουργίας πολυεθνικών εταιριών οινοποίησης: η υπερκαλλιέργεια συγκεκριμένων ποικιλιών σε παγκόσμια κλίμακα οδήγησε στην υποβάθμιση ή εξαφάνιση χιλιάδων μικρότερης εμπορικής αξίας τοπικών και παραδοσιακών ποικιλιών (This et al., 2006)

1.2 Βοτανική καταγωγή της αμπέλου

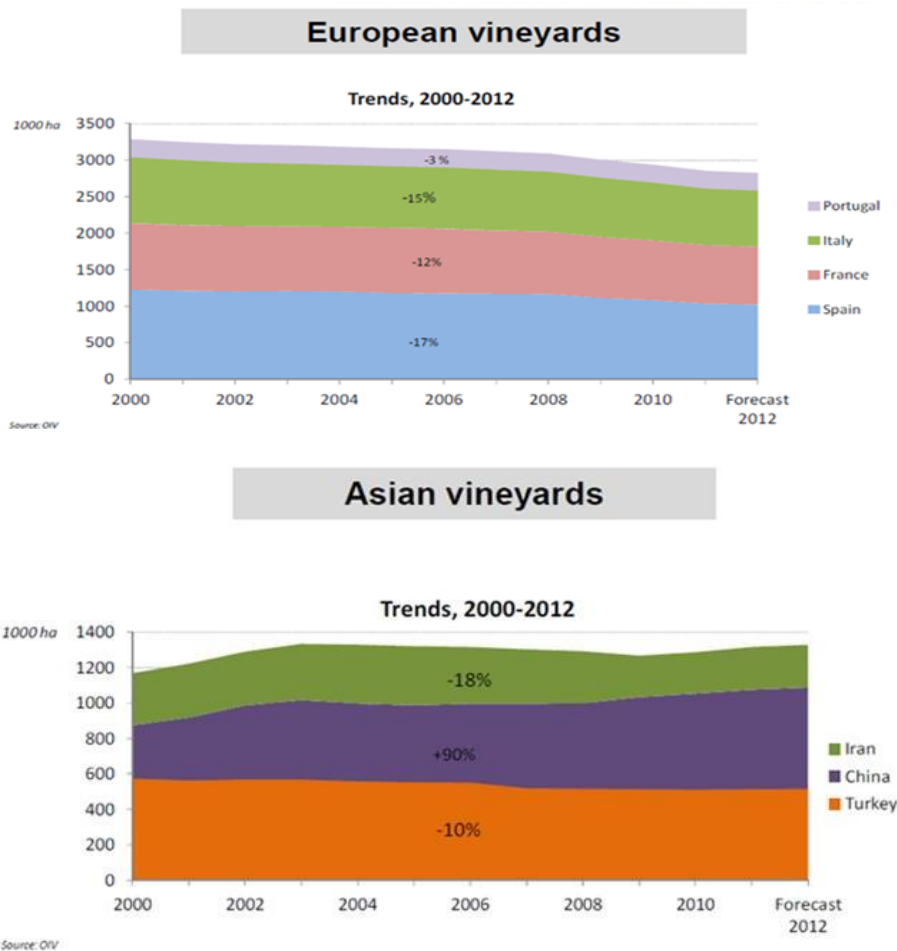
Η άμπελος ανήκει στην οικογένεια Vitaceae, με βάση την συστηματική της κατάταξη, όπως αποτυπώνεται στον Πίνακα 1. Πριν την περίοδο των παγετώνων (65-2 εκατομμύρια χρόνια πριν), οι θερμοκρασίες που παρουσιαζόταν σε περιοχές με βόρεια γεωγραφικά πλάτη, ήταν υψηλότερες από τις σημερινές, με αποτέλεσμα η εξάπλωση των Vitaceae να διαφέρει σημαντικά από αυτή που είναι σήμερα. Ενδείξεις ύπαρξης συγγενών και προγόνων της σύγχρονης αμπέλου εμφανίζονται στην βόρεια Γαλλία (*Vitis sezannenses*), στην Αγγλία (*Vitis minuta*), μέχρι και στην Γροιλανδία (*Vitis arctica*). Κατά την τελευταία περίοδο των παγετώνων η οικογένεια Vitaceae μετανάστευσε σε θερμότερα κλίματα, από περιοχές νότια του Καυκάσου, στην Μεσόγειο, αλλά μέχρι και τις κοιλάδες του Ινδού ποταμού (Νικολάου, 2011).

ΚΛΑΣΗ	<i>DICOTYLEDONES</i>
ΤΑΞΗ	<i>RAMNALES</i>
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	<i>VITACEAE</i>
ΓΕΝΟΣ	<i>VITIS</i>
ΥΠΟΓΕΝΟΣ	<i>EUVITIS</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>VITIS VINIFERA L.</i>

Το υπογένος *Euvitis* περιλαμβάνει πάρα πολλά είδη, με βασικότερο αυτών το *Vitis Vinifera L.*, που αποτελεί το βασικό είδος της καλλιεργούμενης αμπέλου. Από άλλα είδη του υπογένους *Euvitis* προέρχονται βιότυποι χρησιμοποιούνται ευρέως ως υποκείμενα, με επιθυμητά χαρακτηριστικά για τις καλλιεργούμενες ποικιλίες.

1.3 Ελληνικά και παγκόσμια στοιχεία παραγωγής αμπέλου

Σύμφωνα με τον ΟΙV- (International Organisation of Vine and Wine, Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου) το 2014 το σύνολο της έκτασης που διατέθηκε για την παγκόσμια παραγωγή αμπέλου, και επιτραπέζιων και οινοποιήσιμων ποικιλιών, προσέγγιζε τα 75.000.000 στρέμματα, με την μεγαλύτερη έκταση να κατέχει ο αμπελώνας της Ευρώπης, ενώ ακολουθούν οι αμπελώνες της Ασίας, της Αμερικής, της Αφρικής και της Αυστραλίας. Κατά τον Νικολάου (2012) η έκταση που διατίθεται σε παγκόσμιο επίπεδο, παραμένει σταθερή τα τελευταία χρόνια, παρουσιάζοντας μικρή μείωση συγκρινόμενη με την δεκαετία του 1990. Όμως όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1a,b, παρατηρείται υποχώρηση των στρεμμάτων καλλιεργούμενων στην Ευρώπη, και σχετική αύξηση σε περιοχές της Ασίας (κυρίως στην Κίνα) και της Λατινικής Αμερικής. Παρά την μείωση της καλλιεργούμενης έκτασης στην Ευρώπη τα τελευταία χρόνια (5.000.000 στρέμματα το διάστημα 2008-2011) η παραγωγή σημείωσε μικρή αύξηση, κυρίως λόγω της υιοθέτησης νέων πιο προσοδοφόρων καλλιεργητικών τεχνικών.



Εικόνα 1: Μεταβολή της διαθέσιμης έκτασης για την καλλιέργεια αμπέλου α)σε Ευρωπαϊκές και β) Ασιατικές χώρες την περίοδο 2000-2010. Πηγή: OIV

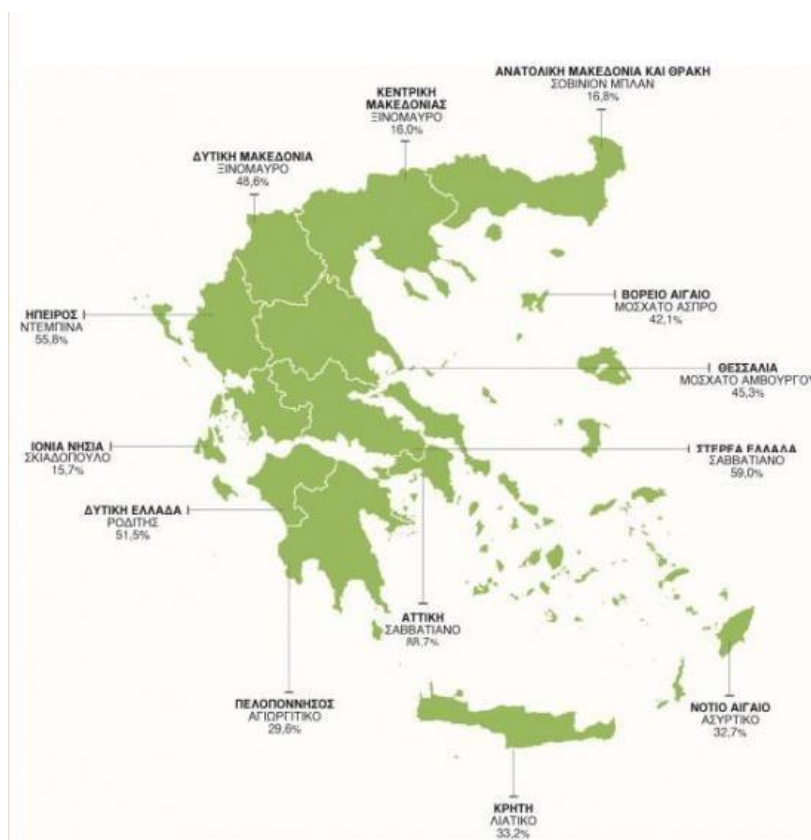
Παραδοσιακά η άμπελος στην Ελλάδα βρίσκεται στις υψηλότερες θέσεις ανάμεσα στα είδη που καλλιεργούνται συστηματικά. Υπολογίζεται ότι στο παρελθόν η καλλιεργούμενη έκταση που απασχολούσε η άμπελος ήταν πολλαπλάσια της σημερινής. Μετά όμως από τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο και τον Εμφύλιο, και την καταστροφή των γεωργικών εκμεταλλεύσεων η παραγωγή μειώθηκε σημαντικά. Επίσης σημαντικό αίτιο μεταβολής της καλλιέργειας, ήταν η εισαγωγή της φυλλοξήρας στην αρχή του 20^{ου} αιώνα. Καθώς έπληξε τις παραδοσιακές καλλιεργούμενες ποικιλίες, ώθησε τους καλλιεργητές, είτε στην καθολική χρήση ανθεκτικών υποκειμένων, είτε στην ολοκληρωτική αντικατάσταση των ποικιλιών, είτε στην εγκατάλειψη της παραγωγής.

Σήμερα η ελληνική αμπελουργία έχει να παρουσιάσει υψηλής ποιότητας προϊόντα αμπέλου στα οποία εξέχουσα θέση καταλαμβάνει ο οίνος, όπως αποδεικνύεται και από τα στοιχεία της ΕΛΣΤΑΤ που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, είτε σε επίπεδο μεγάλων εξαγωγικών οينوποιητικών μονάδων είτε ως οινοποιία μικρής κλίμακας.

Πίνακας 2: Στοιχεία παραγωγής αμπέλου στην Ελλάδα. Πηγή: ΕΛΣΤΑΤ

2020	Αριθμός Εκμεταλλεύσεων	Έκταση (στρέμματα)
Αμπελώνες Οίνου	166.492	644.088
Σταφιδαμπελώνες	46.220	385.261
Σύνολο Αμπελώνων	193.252	1.029.349

Αναφορικά με την περιφερειακή κατανομή των συνολικών εκτάσεων με αμπελώνες οι περισσότερες εκτάσεις καταγράφονται στην Πελοπόννησο. Ακολουθούν η Κρήτη και η Δυτική Ελλάδα. Η Πελοπόννησος φέρει και την μεγαλύτερη έκταση οινοποιήσιμων αμπελώνων, με την Δυτική Ελλάδα να ακολουθεί. Στην Εικόνα 2 αποτυπώνεται η διαφοροποίηση της κυρίαρχα καλλιεργούμενης ποικιλίας σε κάθε περιφέρεια με βάση τα ειδικά εδαφοκλιματικά χαρακτηριστικά αλλά και τις ιδιαίτερες καλλιεργητικές τεχνικές και παραδόσεις της περιοχής.



Εικόνα 2: Σημαντικότερη Οινοποιήσιμη Ποικιλία ανά Περιφέρεια, έτος 2020. Πηγή: Εθνική Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών <https://www.etheas.gr/el/products/details/ENIMEROSI/aktinografia-toy-ellinikoy-ampelona>

1.4 Άμπελος και κλιματολογικές συνθήκες

Η άμπελος απαιτεί για την ανάπτυξη της ένα συγκεκριμένο εύρος κλιματολογικών συνθηκών, γεγονός που περιορίζει την γεωγραφική της εξάπλωση. Οι ανάγκες για πεδία με σχετικά υψηλή μέση θερμοκρασία ορίζουν για την Ευρώπη τον 50°-51° παράλληλο ως το βορειότερο γεωγραφικό πλάτος στο οποίο είναι δυνατή η καλλιέργεια της αμπέλου, και συγκεκριμένα τις περιοχές της κοιλάδας του Ρήνου. Στο Νότιο ημισφαίριο αντίστοιχα, ο 39° παράλληλος αποτελεί το νότιο όριο της ανάπτυξης της αμπέλου από την Νότια Αμερική έως και την Νέα Ζηλανδία.

Το υψόμετρο αποτελεί επίσης σημαντικό παράγοντα περιορισμού αλλά και διαφοροποίησης της καλλιέργειας της αμπέλου. Η θερμοκρασία μειώνεται προοδευτικά με την αύξηση του υψόμετρου περίπου κατά 0,5 βαθμούς ανά 100 μέτρα (μέχρι τα 1.000 μέτρα υψόμετρο). Η σχέση αυτή υψόμετρου-θερμοκρασίας ευνοεί την ανάπτυξη της αμπέλου σε θερμότερες περιοχές, αλλά αποτελεί παράγοντα περιορισμού σε ψυχρότερα κλίματα. Ακόμα η μείωση της μέσης θερμοκρασίας οδηγεί το φυτό σε καθυστέρηση της ωρίμανσης με ρυθμό περίπου δύο ημερών ανά βαθμό Κελσίου (Νικολάου, 2011). Κατά συνέπεια το υψόμετρο ακόμα και σε περιοχές που ανήκουν στον ίδιο γεωγραφικό τόπο, αποτελεί σημαντικό παράγοντα διαφοροποίησης αλλά και περιορισμού της καλλιέργειας της αμπέλου.

1.4.1. Μεσογειακό κλίμα

Το λεγόμενο μεσογειακό κλίμα αποτελεί τον ιδανικότερο συνδυασμό κλιματολογικών παραγόντων, για την καλλιέργεια και την ανάπτυξη της αμπέλου. Τοποθετείται κατά βάση ανάμεσα στον 30° και 44° παράλληλο, και στον 30° και 39° παράλληλο στο βόρειο και στον νότιο ημισφαίριο αντίστοιχα. Βασικό χαρακτηριστικό του κλίματος αποτελεί η ύπαρξη θαλάσσιων όγκων σε σχετικά μικρή απόσταση από τις καλλιεργήσιμες εκτάσεις, με αποτέλεσμα μία ήπια χειμερινή περίοδο. Οι θερμοκρασίες του καλοκαιριού είναι σχετικά υψηλές, με τον μέσο όρο των δύο θερμότερων μηνών να ξεπερνά τους 20-25 βαθμούς Κελσίου. Ο ώρες ηλιοφάνειας αν και διαφοροποιούνται σε σχέση με το γεωγραφικό πλάτος, παραμένουν

ιδιαίτερα υψηλές. Το ύψος της βροχής είναι ιδιαίτερα περιορισμένο κατά τους καλοκαιρινούς μήνες ενώ αυξάνει σχετικά κατά την περίοδο του χειμώνα (Νικολάου, 2011).

1.4.2. Υδατικές ανάγκες αμπέλου

Η άμπελος και συγκεκριμένα η *Vitis vinifera L.* δεν παρουσιάζει υψηλές υδατικές απαιτήσεις. Τα 350 χιλιοστά θεωρούνται ο ελάχιστο ικανό ύψος βροχής, ώστε να είναι δυνατή η ανάπτυξη και η καλλιέργεια. Η ποσότητα υγρασίας που χρειάζεται το φυτό δεν είναι ίδια κάθε μήνα και κάθε εποχή. Καθορίζεται από το αναπτυξιακό στάδιο και την ηλικία της αμπέλου. Η δυνατότητα για παράδειγμα της αμπέλου να αναπτύσσει ριζικό σύστημα μεγάλου μεγέθους και ικανού να αξιοποιεί και την ελάχιστη εδαφική υγρασία (Chaves et al., 2010) εξαρτάται από την υδατική επάρκεια σε νεαρή ηλικία.

Κατά τους χειμερινούς μήνες απαιτείται υψηλή ποσότητα υγρασίας από την εκβλάστηση έως και την ανθοφορία. Το απαιτούμενο ποσό νερού καλύπτεται από τις βροχοπτώσεις, ως επί το πλείστον. Η ανάγκη για νερό αυξάνει κατά την ανθοφορία έως και την καρπόδεση. Η διαθέσιμη ποσότητα επηρεάζει την γονιμοποίηση των άνθων και κατ' επέκταση την παραγωγή και τον τρύγο (Νικολάου, 2012). Από την καρπόδεση έως και τον περκασμό η άμπελος έχει υψηλά ποσά διαπνοής και αναπνοής. Το φυτό, ακόμα, τελειοποιεί τη βλαστική ανάπτυξη και αύξηση, ολοκληρώνει τα όργανα αναπαραγωγής και συμπληρώνει το φύλλωμα και τις ράγες. Με βάση όλες τις παραπάνω διεργασίες κατά το στάδιο αυτό, οι ανάγκες άρδευσης, βρίσκονται στο μέγιστο σημείο, ενώ μειώνονται σταδιακά ως τον τρύγο. Οι σχετικά αυξημένες απαιτήσεις του φθινοπώρου για την ξυλοποίηση, καλύπτονται συνήθως από τις βροχοπτώσεις.

1.5 Προσαρμογή της καλλιέργειας υπό το πρίσμα της κλιματικής μεταβλητότητας

Το βασικό ζήτημα που προκύπτει για τις καλλιέργειες υπό το πρίσμα της κλιματικής αλλαγής, είναι η έλλειψη σταθερότητας των κλιματικών μεταβολών, αλλά κυρίαρχα η αύξηση των αβιοτικών καταπονήσεων, με τη θερμική και την υδατική καταπόνηση να παίζουν τον κυρίαρχο ρόλο. Ασταθείς θερμοκρασίες αλλά κυρίαρχα η διαρκώς αυξανόμενη μέση θερμοκρασία, η

αύξησή των αερίων του θερμοκηπίου, ιδιαίτερα του CO₂, καθώς και η μεταβολή της συχνότητας και της έντασης των κατακρημνίσεων. Μπορούμε να ορίσουμε την κλιματική μεταβλητότητα ως το σύνολο των παραπάνω μεταβολών υπό την καταλυτική δράση του ανθρώπινου παράγοντα (Korres et al., 2016). Η Μεσόγειος αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα κλιματικής μεταβολής (Olesen et al., 2011) με τα αποτελέσματα της αύξησης της μέσης θερμοκρασίας αλλά και της μείωσης του ετήσιου ύψους βροχής (μέχρι και 10% σε κάποιες περιοχές), να είναι ήδη εμφανή.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνει στην υδατική καταπόνηση ως διαρκώς εντεινόμενη όψη της κλιματικής αλλαγής, και την επίδραση της στην καλλιέργεια συγκεκριμένων τοπικών ποικιλιών αμπέλου. Η επίδραση της υδατικής καταπόνησης, αν και εξαρτάται από την ένταση της καταπόνησης, την ποικιλία της αμπέλου, τις καλλιεργητικές παραδόσεις της περιοχής και μιας σειράς παραγόντων, φέρει ως επί το πλείστον σειρά αλλαγών σε μορφολογικό φυσιολογικό αλλά και μοριακό επίπεδο (Fahad et al., 2017; Farooq et al., 2012).

1.6 Υδατική καταπόνηση

Η υδατική καταπόνηση αποτελεί την κατάσταση όπου η ποσότητα του διαθέσιμου νερού δεν επαρκεί, ώστε να καλύψει το σύνολο των διεργασιών και των αναγκών του φυτού. Η έλλειψη διαθέσιμου νερού σε συνδυασμό με υψηλές θερμοκρασίες αποτελεί τον βασικότερο παράγοντα υπονόμησης των περισσότερων καλλιεργειών. Η υδατική καταπόνηση προκύπτει συνήθως ως συνδυασμός της περιορισμένης ποσότητας νερού στο έδαφος, και της αυξημένης για το διαθέσιμο υδατικό απόθεμα, εξατμισοδιαπνοής. Οι επιπτώσεις όμως στο φυτό και η αντίδραση του, εξαρτάται από την ικανότητα αυτού να προσαρμοστεί και ρυθμίσει τις βασικές του λειτουργίες στις νέες συνθήκες, αλλά και από την διάρκεια και την ένταση της καταπόνησης (Καραμπουρνιώτης, 2012). Η υδατική καταπόνηση επηρεάζει τόσο την φωτοσύνθεση όσο και στη βλαστική και αναπαραγωγική δραστηριότητα του φυτού (Schultz & Matthews, 1988)

1.6.1 Επίδραση υδατικής καταπόνησης στην αύξηση, στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή της αμπέλου

Η υδατική καταπόνηση προκαλεί πολλαπλές αρνητικές επιδράσεις στη βλαστική αύξηση και ανάπτυξη. Η έλλειψη υγρασίας στο έδαφος μειώνει το ωσμωτικό δυναμικό σε μεγάλο βαθμό. Εάν το ωσμωτικό δυναμικό του φυτού ξεπεράσει αυτό του εδάφους, η απορρόφηση του νερού γίνεται ολόενα και πιο δύσκολη (ωσμωτική καταπόνηση). Η παραπάνω συνθήκη οδηγεί στη μείωση της διαθέσιμης υγρασίας εντός των κυττάρων και την αύξηση της συγκέντρωσης των ανόργανων ιόντων (Μανέτας, 2009).

Βασική συνέπεια των παραπάνω είναι η μείωση της σπαργής λόγω απουσίας υγρασίας, η αύξηση της υδραυλικής αντίστασης και η αποξήρανση του φύλλου. Μακροπρόθεσμα προκαλείται σημαντική μείωση της μεταβολικής και λειτουργικής δραστηριότητας του κυττάρου, αποσταθεροποίηση και κατάρρευση των κυτταρικών μεμβρανών, περιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, και παραγωγή ROS. Ακόμα επέρχεται κλείσιμο των στομάτων και αποκοπή φύλλων. Κατά την περίοδο της ανθοφορίας η υδατική καταπόνηση, οδηγεί σε σημαντική μείωση της παραγωγής καθώς προκαλεί πτώση των άνθων (Taiz & EM, 2006).

1.6.2 Επίδραση υδατικής καταπόνησης στην φωτοσύνθεση

Η φωτοσυνθετική ικανότητα εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την διαθέσιμη ποσότητα νερού. Μέσω της αντίδρασης Hill, από το νερό παράγονται πρωτόνια μέσω των οποίων τα NADP^+ ανάγονται σε NADPH_2 . Ακόμα μέσω του νερού το φωτοσύστημα II, τροφοδοτείται με ηλεκτρόνια (Γανωτάκης και Κοτζαμπάσης, 2009). Πέραν των παραπάνω η έλλειψη διαθέσιμης ποσότητας νερού μειώνει την διαπνοή, με αποτέλεσμα την μείωση της φυλλικής επιφάνειας, μέσω της συστροφής των φύλλων. Η μείωση της διαπνοής προκαλείται είτε με απώλεια σπαργής είτε με κλείσιμο των στομάτων. Όλες οι παραπάνω διεργασίες που σχετίζονται με τη διαπνοή και προκαλούνται από την υδατική καταπόνηση έχουν δυσμενή επίδραση στην φωτοσύνθεση.

Η βασικότερη όμως αιτία μείωσης της φωτοσύνθεσης, σχετίζεται ξανά με τη σχέση διαπνοής-υδατικής καταπόνησης. Είναι η μειωμένη πρόσληψη διοξειδίου του άνθρακα από την ατμόσφαιρα κυρίως λόγω του κλεισίματος των στομάτων. Ακόμα η διακύμανση της στοματικής αγωγιμότητας σε συνθήκες έλλειψης υγρασίας και ειδικά η προοδευτική μείωση της αγωγιμότητας επηρεάζει σημαντικά την φωτοσυνθετική δραστηριότητα του φυτού (Flexas et al., 2002; Medrano et al., 2002).

1.6.3 Επίδραση υδατικής καταπόνησης στην ράγα

Ένας από του πιο κρίσιμους παράγοντες για την ποιότητα των προϊόντων της αμπέλου είναι το νερό. Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της έλλειψης υγρασίας, την ένταση και την διάρκεια της δηλαδή, η ράγα επηρεάζεται διαφορετικά. Ακόμα η επίδραση αυτή διαφοροποιείται με βάση τον γονότυπο, και εκδηλώνεται με διαφορετικό τρόπο σε διαφορετικούς ιστούς(φλοιός, σάρκα). Με βάση τα προηγούμενα , είναι κατανοητό ότι η ένταση της καταπόνησης αλλά και η χρονική περίοδος που αυτή συμβαίνει, μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικές συμπεριφορές της ράγας. Κατά κοινή ομολογία η λιγότερο επιθυμητή χρονική περίοδος καταπόνησης είναι μετά τον περκασμό, διότι οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση σακχάρων αλλά και σε περιορισμό της φωτοσύνθεσης. Η επίδραση της υδατικής καταπόνησης με βάση τους παράγοντες που αναλύθηκαν προηγουμένως, σε καταπόνηση που προκαλεί αυξητική τάση στη συγκέντρωση σακχάρων και ανθοκυανών (πρώιμη ωρίμανση)(McCarthy & Coombe, 1985), είτε σε καταπόνηση που προκαλεί τάση μείωσης(Santesteban & Royo, 2006) Ακόμα η συγκέντρωση των σακχάρων επηρεάζεται από τη βλαστική αύξηση και το μέγεθος της ράγας, που βρίσκεται σε άμεση συσχέτιση με την ένταση της υδατικής καταπόνησης. Την συγκέντρωση σακχάρων στη ράγα επηρεάζει και το ωσμωτικό δυναμικό, καθώς σε συνθήκες έλλειψης υγρασίας η συσσώρευση μπορεί να συνεχιστεί, ακόμα και αν η αύξηση δεν μπορεί.

Τέλος η υδατική καταπόνηση, ειδικά εάν επέλθει αρκετά νωρίς μπορεί να δράσει ως παράγοντας αύξησης της συγκέντρωσης ανθοκυανών στους φλοιούς(Alatzas et al., 2021).

1.7 Φυτογενετικοί Πόροι

Ως φυτογενετικοί πόροι ορίζονται το σύνολο του γενετικού υλικού των φυτών, που είτε είναι καλλιεργούμενα είδη, και διατηρούνται σε έναν τόπο, είτε άγριοι συγγενείς καλλιεργούμενων ειδών, που συχνά φέρουν ιδιαίτερα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά. Οι φυτογενετικοί πόροι αποτελούν βασικό στοιχείο της βιοποικιλότητας και είναι εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για την στοχευμένη βελτίωση των φυτών (Μυλωνά, 2017).

Σύμφωνα με την Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ (FAO), η προστασία, η συστηματική μελέτη και η στοχευμένη χρήση των φυτογενετικών πόρων, είναι κρίσιμο στοιχείο της διαίωσισης και της εξέλιξης των καλλιεργειών, αλλά και της διασφάλισης της διατροφικής επάρκειας σε συνθήκες κλιματικής αλλαγής. Η απάντηση στις προκλήσεις της

κλιματικής αλλαγής, περιλαμβάνει τόσο την αξιοποίηση των φυτογενετικών πόρων ως επαναξιοποίηση των παραδοσιακών καλλιεργειών, όσο και την συνεχή παραγωγή νέων βελτιωμένων ποικιλιών, προσαρμοσμένων κατά τόπους, στις διάφορες ειδικές αγροκλιματικές συνθήκες του εκάστοτε τόπου. Η καταστροφή των φυτογενετικών πόρων από τη μία μειώνει δραματικά τη διαθέσιμη αγροβιοποικιλότητα και την αξιοποιούμενη παραδοσιακή γνώση και τεχνική καλλιέργειας των παραδοσιακών ποικιλιών που εξαφανίζονται, ενώ από την άλλη περιορίζει την δυνατότητα χρήσης του γενετικού υλικού είτε ως καλλιεργήσιμη ποικιλία είτε ως υλικό αναγκαίο σε στοχευμένες κατά τόπους και κατά αγροκλιματικές συνθήκες, βελτιωτικές μελέτες.

Σύμφωνα με τη Διεθνή Δέσμευση για τους Φυτογενετικούς Πόρους για τη Διατροφή και τη Γεωργία (International Undertaking on Plant Genetic Resources - IUPGR), «φυτογενετικοί πόροι είναι το υλικό αναπαραγωγής και αγενους πολλαπλασιασμού των ακόλουθων κατηγοριών»: 1) Καλλιεργούμενων και νεοαναπτυσσόμενων ποικιλιών. 2) Παλαιών ποικιλιών. 3) Εγχώριων παραδοσιακών ποικιλιών. 4) Άγριων και ημιάγριων ειδών που είναι συγγενικά των καλλιεργούμενων ειδών. 5) Ειδικών γενετικών αποθεμάτων.

1.7.1 Παραδοσιακές ποικιλίες

Σύμφωνα με τη Διεθνή Δέσμευση για τους Φυτογενετικούς Πόρους για τη Διατροφή και τη Γεωργία (International Undertaking on Plant Genetic Resources - IUPGR), οι παραδοσιακές ποικιλίες αποτελούν μια κατηγορία των φυτογενετικών πόρων. Αν και δεν υπάρχει κοινά αποδεκτός ορισμός της έννοιας της παραδοσιακής ποικιλίας στη βιβλιογραφία, μπορούν να περιγράφουν με σαφήνεια κάποια χαρακτηριστικά.

Κάθε παραδοσιακή ποικιλία φέρει κάποια μοναδικά ποιοτικά και ποσοτικά γνωρίσματα, που συνδέονται άμεσα με τον τόπο από τον οποίον η ποικιλία προέρχεται. Τα γνωρίσματα αυτά προκύπτουν από τον συνδυασμό των γενετικών χαρακτηριστικών των προγόνων της συγκεκριμένης τοπικής ποικιλίας, των ειδικών κλιματολογικών συνθηκών που επικρατούν στον τόπο καταγωγής καθώς και το σύνολο των παραδοσιακών καλλιεργητικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται ή είχαν χρησιμοποιηθεί στον συγκεκριμένο τόπο (Brush, 2000).

Συγκριτικά με τις βελτιωμένες ποικιλίες, οι παραδοσιακές δεν παρουσιάζουν υψηλή γενετική ομοιογένεια. Αντίθετα έχουν μεγάλη γενετική ποικιλομορφία και συνήθως φέρουν πλήθος

σπανίων γονοτύπων. Η γενετική ανομοιομορφία παρέχει την απαραίτητη αντοχή στους πληθυσμούς των παραδοσιακών ποικιλιών, απέναντι σε πλήθος βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων, δίνοντας τους μεγάλη προσαρμοστική δυνατότητα. Ως επί το πλείστον η γενετική αυτή ποικιλότητα, προκύπτει ως αποτέλεσμα επιλογής, από τους καλλιεργητές με βασικό πρόσημο τον συνδυασμό αντοχής στις καταπονήσεις, σταθερότητας της ποικιλίας, και παραγωγικότητας (Brush, 2000). Οι παραδοσιακές ποικιλίες με βάση τα όσα αναφέρθηκαν, είναι πιο ευπροσάρμοστες, παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα και υψηλότερη παραγωγικότητα, σε σχέση με τις βελτιωμένες ποικιλίες μεγάλης κλίμακας, όταν αντιμετωπίζουν έντονες ή και απρόβλεπτες καταπονήσεις που προκύπτουν από το φυσικό περιβάλλον του τόπου από τον οποίο κατάγονται (Zeven, 1998).

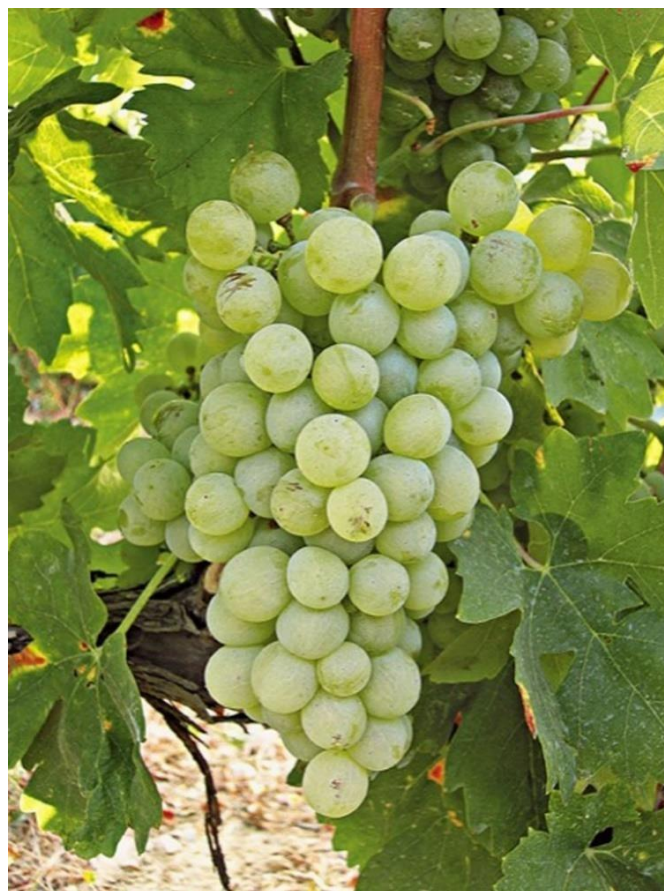
Στην Ελλάδα μετά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο και ιδιαίτερα την περίοδο 1960-1980 καλλιεργήθηκαν πολύ εντατικά μόνο συγκεκριμένες ελληνικές ποικιλίες, καθώς και οι κυρίαρχες εισαγόμενες, με αποτέλεσμα τόσο τον δραστικό περιορισμό της καλλιέργειας και αξιοποίησης των πολλών μικρότερων παραδοσιακών ποικιλιών, όσο και τη σημαντική γενετική διάβρωση της βιοποικιλότητας (Banilas et al., 2009). Τα τελευταία χρόνια όμως λαμβάνουν χώρα μια σειρά από έρευνες χαρτογράφησης και ανάλυσης της βιοποικιλότητας της αμπέλου, όπως και η παρούσα μελέτη, τόσο σε παραδοσιακές ποικιλίες όσο και στους ακόμα πιο σπάνιους άγριους συγγενείς. Βασικές κατευθύνσεις των προσπαθειών αυτών αποτύπωση των ειδικών χαρακτηριστικών που φέρει η κάθε ποικιλία σε συνάρτηση με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες που την περιβάλλουν σε μορφολογικό, φυσιολογικό και μοριακό επίπεδο, αλλά και η επαναξιοποίηση των ποικιλιών αυτών.

1.8 Ποικιλία ‘Ντεμπίνα’

Η παραδοσιακή ποικιλία ‘Ντεμπίνα’ που διακρίνεται στην Εικόνα 3, καλλιεργείται στην αμπελοργική περιοχή των Ιωαννίνων και συγκεκριμένα στην περιοχή Ζίτσα από την οποία παίρνουν και οι οίνοι που παράγονται το όνομα τους. Φέρουν μάλιστα και την χαρακτηριστική ένδειξη Π.Ο.Π. «ΖΙΤΣΑ». Κατά πάσα πιθανότητα αποτελεί παλαιά γηγενή ποικιλία της Ηπείρου. Υπάρχουν αναφορές ότι χρονολογείται στον 16^ο αιώνα, παρόλο που δεν υπάρχουν σαφείς ιστορικές καταγραφές. Το όνομα της προέρχεται είτε από το χωριό Νταμπένι, είτε από το Ιταλικό ‘de vino’, καθώς σύμφωνα με την Κεντρική Συνεταιριστική Ένωση Αμπελοοινικών Προϊόντων (ΚΕΟΣΟΕ), εικάζεται πως η ποικιλία έχει Ιταλική προέλευση. Κατά την αμπελογραφική της περιγραφή η ποικιλία φέρει βλαστό ως επί το πλείστον χωρίς τριχίδια,

πράσινο, με σημεία που κοκκινίζουν από την πλευρά του ήλιου. Τα φύλλα είναι μεγάλα φέρουν πέντε λοβούς και σχετικά κυκλικά, ενώ τα άνθη μορφολογικά και φυσιολογικά ερμαφρόδιτα. Η ράγα είναι σχετικά μεγάλου μεγέθους με μαλακή χυμώδη σάρκα, και φέρει πρασινοκίτρινο φλοιό.

Η ποικιλία είναι λευκή με μεγάλη προσαρμοστικότητα και ιδιαίτερα ζωνρή. Στην περιοχή καλλιέργειας αναπτύσσεται σε εδάφη αβαθή, ξηρικά και πετρώδη σε υψόμετρο περίπου 700 μέτρων (Νικολάου Α.Ν., 2012). Κατά την ΚΕΟΣΟΕ η εγκατάσταση των αμπελώνων σε μεσημβρινό προσανατολισμό προφυλάσσει από την καλοκαιρινή υγρασία και από τα χειμερινά ψυχρά ρεύματα. Η βασική αδυναμία της ποικιλίας, είναι η ευαισθησία της σε μυκητολογικές προσβολές και ιδιαίτερα προσβολές βοτρυτή, ωιδίου και περονόσπορου. Η ποικιλία παρόλες τις σχετικά δυσμένειες συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται, είναι ιδιαίτερα παραγωγική με στρεμματική απόδοση που μπορεί να φτάσει τα 1.500 κιλά. Κατά την χρόνια καλλιέργεια της στον πειραματικό αμπελώνα του ΑΠΘ, παρατηρήθηκε ότι περίπου στις 12/4 εκδηλώνεται η εκβλάστηση, η ανθοφορία ξεκινά στις 28/5, ενώ ο περκασμός και η ωρίμανση στις 29/8 και 10/9 αντίστοιχα (Νικολάου, 2012). Η ποικιλία παράγει οίνους ημιαφρώδεις ξηρούς, ξηρούς και ημιαφρώδεις ημίγλυκους.



Εικόνα 3: Ποικιλία Ντεμπίνα. ΠΗΓΗ: προσωπικό αρχείο Δώρας Πιτσώλη

1.9 Ποικιλία Διχάλι

Η παραδοσιακή ποικιλία ‘Διχάλι’, που διακρίνεται στην Εικόνα 4 καλλιεργείται κατά βάση στην αμπελουργική περιοχή της Πρέβεζας και συγκεκριμένα κοντά στην περιοχή του Ζαλόγγου. Η ποικιλία φέρει εξαιρετικά χαρακτηριστικό έντονο μαύρο χρώμα στον φλοιό της ράγας. Οиноποιείται σχεδόν αποκλειστικά για την παραγωγή ερυθρών οίνων, πολύ σκούρου χρώματος και έντονων αρωμάτων. Η ποικιλία (όπως και τα οινοποιήσιμα προϊόντα που προκύπτουν από αυτήν) είναι εξαιρετικά δυσεύρετη. Ο οίνος που παράγεται από το ‘Διχάλι’ χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα πλούσια γεύση, υψηλά σάκχαρα και ανεβασμένες ταννίνες. Έχει ακόμα αρκετά βαρύ άρωμα. Ως εκ τούτου ο παραγόμενος οίνος χρειάζεται παλαίωση ώστε να φτάσει σε σημείο να αναδείξει στο έπακρον τα χαρακτηριστικά του (Τσουμάνης, 2018).



Εικόνα 4: Ποικιλία Διχάλι Πηγή: <https://zoinos.gr>

1.10 Εμβολιασμός

Κατά τα τέλη του 19^{ου} αιώνα η είσοδος της φυλλοξήρας στην Ευρώπη άλλαξε ριζικά τις πρακτικές αμπελουργίας στην ήπειρο. Το παράσιτο καταστρέφει το ριζικό σύστημα της Ευρωπαϊκής αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) καθώς κατά την φάση εκβλάστησης προσβάλλει το φυτό από το έδαφος. Όλες σχεδόν οι ποικιλίες βρέθηκαν σε κίνδυνο καθώς ανήκουν στο είδος της *Vitis vinifera* L (Νικολάου, 2012). Μετά από την χρήση διάφορων τεχνικών και μέσων

αντιμετώπισης, επικράτησε η άποψη ότι είδη αμπέλου από την Αμερική, με ανθεκτικότητα στην φυλλοξήρα έπρεπε να χρησιμοποιηθούν ως υποκείμενα. Επιλέχθηκαν κατά συνέπεια είδη συγγενικά ως προς την *Vitis vinifera* L., με γνωστή αντοχή στο παράσιτο. Προέκυψαν όμως πληθώρα προβλημάτων προσαρμογής στις εκάστοτε ειδικές κλιματολογικές συνθήκες, καθώς επίσης και προβλήματα συμβατότητας. Με βάση τα παραπάνω ξεκίνησε μια μεγάλη βελτιωτική προσπάθεια που κατέληξε στη δημιουργία πληθώρας εξειδικευμένων βιοτύπων υποκειμένων, με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά προσαρμοστικότητας και συμβατότητας (Mudge et al., 2009; Warschefsky et al., 2016). Ο εμβολιασμός είναι η τεχνική της ένωσης ιστών από διαφορετικά φυτά με στόχο τη δημιουργία ενός ολοκληρωμένου φυτού με πλήρη ικανότητα αύξησης, ανάπτυξης και καρποφορίας (Hartmann et al. Kester Dale E., 1975). Το εμβολιασμένο φυτό αποτελείται από τρεις διαφορετικές ζώνες. Τη ζώνη του εμβολίου, που συμβάλλει στην ανάπτυξη της κόμης και των βλαστών, του συνόλου του φυτού άνω της ζώνης εμβολιασμού και τέλος του υποκειμένου που προσφέρει το ριζικό σύστημα. Το εμβόλιο και το υποκείμενο χαρακτηρίζονται ως συμβαλλόμενα μέρη ή ως συμβιωτές (Σταυρακάκης, 2013). Μετά την ολοκλήρωση μιας επιτυχημένης ζεύξης εμβολίου-υποκειμένου το νέο φυτό αποτελεί ενιαία οντότητα τόσο φυσιολογικά, όσο βιοχημικά και μοριακά.

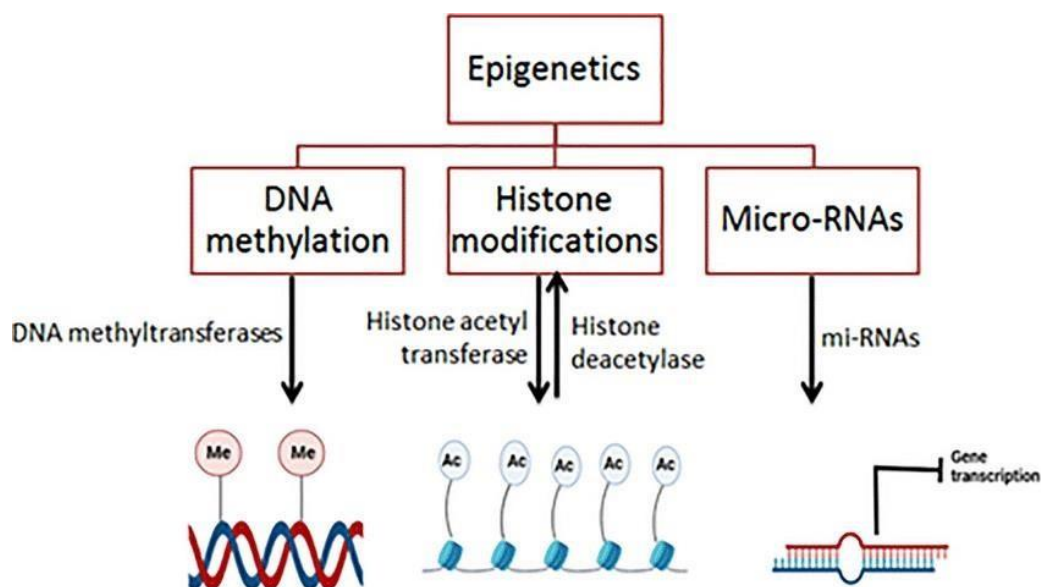
1.10.1 Υποκείμενο 110 Richter

Το 110 Richter αποτελεί προϊόν της διασταύρωσης των *V. berlandieri* Resseguier No2 και *V. rupestris* Martin και η ανάπτυξη του ξεκίνησε το 1914. Μορφολογικά παρουσιάζει βλαστό μαλακό και λείο, κορυφή ανοιχτή, λευκή με κόκκινα ψιλά τριχίδια. Είναι υποκείμενο που φέρει υψηλή ζοηρότητα (Νικολάου, 2012). Την ζοηρότητα αυτή, μεταδίδει και στο εμβόλιο, με αποτέλεσμα την σχετική επιβράδυνση της παραγωγής. Σε υψηλή ένταση αυτά τα χαρακτηριστικά μπορεί να οδηγήσουν σε αρνητικές επιπτώσεις, όπως πτώση των άνθεων και συγκέντρωση υψηλής οξύτητας στη ράγα.

Φέρει αξιοσημείωτη αντοχή στην φυλλοξήρα ειδικά στην ριζόβια φυλλοξήρα, ενώ παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στους νηματώδης του εδάφους, κυρίαρχα σε νηματώδεις του είδους *Meloidogyne inconita* (Νικολάου, 2012). Παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στην ξηρασία και προσαρμόζεται σε εδάφη συμπαγή και ξηρά. Φέρει σχετική ευαισθησία στην υψηλή αλατότητα και την υψηλή υγρασία.

1.11 Επιγενετική

Η επιγενετική είναι η μελέτη των κληρονομικών αλλαγών οι οποίες επηρεάζουν ποικιλοτρόπως τη γονιδιακή έκφραση ενός οργανισμού που όμως δεν ταυτοποιούνται με αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, βρίσκονται δηλαδή εκτός της κλασικής γενετικής. Η επιγενετική συχνά περιλαμβάνει αλλαγές που επηρεάζουν τη γονιδιακή δραστηριότητα και έκφραση, αλλά αναφέρεται και στις κληρονομήσιμες φαινοτυπικές αλλαγές (Dupont et al., 2009). Τέτοιες επιδράσεις στα κυτταρικά και φυσιολογικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μπορεί να προέρχονται από εξωτερικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες ή να αποτελούν μέρος της φυσιολογικής ανάπτυξης. Ο τυπικός ορισμός της επιγενετικής απαιτεί αυτές οι αλλαγές να κληρονομούνται στους απογόνους των κυττάρων ή οργανισμών (Berger et al., 2009). Με βάση τα παραπάνω το επιγονιδίωμα περιλαμβάνει όλες τις βιοχημικές και μοριακές μεταβολές που συμβαίνουν στο πυρηνικό DNA, στο RNA, τις μεταβολές και τις τροποποιήσεις των ιστονών και των χρωματίδων, καθώς και τη δράση μη κωδικοποιούμενων (non-coding) RNA. Άρα καθώς οι βιοχημικές και μοριακές διεργασίες επηρεάζονται από το περιβάλλον, γίνεται κατανοητό ότι το επιγονιδίωμα δεν είναι σταθερό και αμετάβλητο, αλλά μεταβάλλεται ανάλογα με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που δέχεται. Αποτελεί δηλαδή μια ελεγκτική γέφυρα της γονιδιακής έκφρασης (ειδικά κατά την μετάφραση και τη μεταγραφή), ανάμεσα στο αμετάβλητο πυρηνικό DNA και στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Άρα το επιγονιδίωμα ελέγχει με βάση τα εκάστοτε ειδικά χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος, τις κυτταρικές λειτουργίες και επομένως και τις φαινοτυπικές μεταβολές. Βασική προϋπόθεση όμως για να χαρακτηριστεί μια συγκεκριμένη διεργασία με αυτά τα στοιχεία, επιγενετικό χαρακτηριστικό, δεν αρκεί μόνο η σταθερότητα του μηχανισμού της μεταβολής του γονότυπου αλλά και δυνατότητας του να κληρονομείται στο έπακρον, η μεταβολή του γενετικού υλικού ή των ιστονών και των χρωματίδων, υπό τις κατάλληλες συνθήκες (Dupont et al., 2009). Με τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι η φαινομενικά μη αναλογική σχέση μεταξύ της μεγάλης παραλλακτικότητας των φαινοτύπων και το πλήθος των γενετικών μεταλλάξεων, μπορεί να γεφυρωθεί μέσω των επιγενετικών μηχανισμών (Skinner, 2015). Οι τρεις βασικές κατηγοριοποιήσεις των επιγενετικών μηχανισμών, είναι η DNA μεθυλίωση, η μετα-μεταγραφική τροποποίηση των ιστονών και η εμπλοκή των μη κωδικοποιούμενων -ncRNAs (micro RNA-miRNAs και small interfering RNAs-siRNAs), όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Τρεις βασικές κατηγοριοποιήσεις των επιγενετικών μηχανισμών. Λήψη από ΠΗΓΗ:(Dubey et al., 2022)

1.11.1 Επιγενετική και υδατική καταπόνηση

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί επιτελούν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης υπό το πρίσμα των περιβαλλοντικών επιδράσεων. Οι τροποποιήσεις των ιστονών και η DNA μεθυλίωση είναι γνωστό πως μεταβάλλουν την τρισδιάστατη μορφή της χρωματίνης, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τις διάφορες καταπονήσεις σε μεταγραφικό και μέτα-μεταγραφικό επίπεδο, αλλάζοντας τα χαρακτηριστικά της χρωματίνης σε αυτά τα γονίδια (Zhang et al., 2018). Η DNA μεθυλίωση που κατευθύνεται από RNAs (RNA-directed DNA methylation -RdDM) και στοχεύει μεταγραφικούς παράγοντες έχει καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (Porova et al., 2013).

Η φυτοορμόνη ABA ενισχύει την αντοχή στην υδατική καταπόνηση, και το μεταβολικό μονοπάτι της σύνθεσης της ενεργοποιείται από το αντίστοιχο περιβαλλοντικό ερέθισμα. Η ABA ελέγχει μια σειρά διεργασιών που σχετίζονται με την ανάπτυξη. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την σύνθεση της και σχετίζονται με την απόκριση στην υδατική καταπόνηση, έχουν συσχετιστεί με αλλαγές στο δυναμικό των ιστονών (J.-M. Kim et al., 2015). Κατ' επέκταση οι τροποποιήσεις των ιστονών επιτελούν ρόλο καθοριστικού ρυθμιστή στην σύνθεση της ABA, ενώ αντίστοιχα επηρεάζουν την ρύθμιση μιας σειράς βιοχημικών διεργασιών

σχετιζόμενων με την απόκριση στην υδατική καταπόνηση (Miryeganeh, 2021). Ακόμα πέραν των τροποποιήσεων των ιστονών και συγκεκριμένες DNA μεθυλίωσεις εμφανίζονται να ελέγχουν ρυθμιστικά γονίδια που συσχετίζονται με την σύνθεση της ABA (J.-S. Kim et al., 2019). Οι DNA μεθυλίωσεις όπως και οι τροποποιήσεις ιστονών συμβάλλουν καθοριστικά στην ρύθμιση γονιδίων σχετιζόμενων με την υδατική καταπόνηση. Έχει παρατηρηθεί ότι η υδατική καταπόνηση προκαλεί μεταβολές στα επίπεδα μεθυλίωσης επηρεάζοντας τα μοτίβα έκφρασης πολλών γονιδίων σχετιζόμενων με την απόκριση στην καταπόνηση. Ακόμα παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα μεθυλιωμένων κυτοσινών είναι ιδιαίτερα αυξημένα σε καταπονειμένα φυτά και τα υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης οδηγούν σε σίγαση γονιδίων (Miryeganeh, 2021). Τέλος ιδιαίτερα βασικές ρυθμίσεις γονιδιακής έκφρασης που σχετίζονται με την απόκριση σε αβιοτικές καταπονήσεις, προκύπτουν από την εμπλοκή των μη κωδικοποιούμενων RNA μορίων (ncRNAs). Τα ncRNAs αλληλοεπιδρούν με τα γονίδια στόχους, δημιουργώντας ρυθμιστικά δίκτυα που έχουν την δυνατότητα να ελέγχουν πολύπλευρες λειτουργίες απόκρισης των φυτών. Πολλά μικρότερα η μεγαλύτερα ncRNAs έχουν αναγνωριστεί σε διάφορα βιοχημικά μονοπάτια (small interfering RNAs, micro RNAs, Long Noncoding RNA), με τα micro RNA να είναι τα περισσότερο μελετημένα (Gelaw & Sanan-Mishra, 2021).

1.12 micro-RNAs

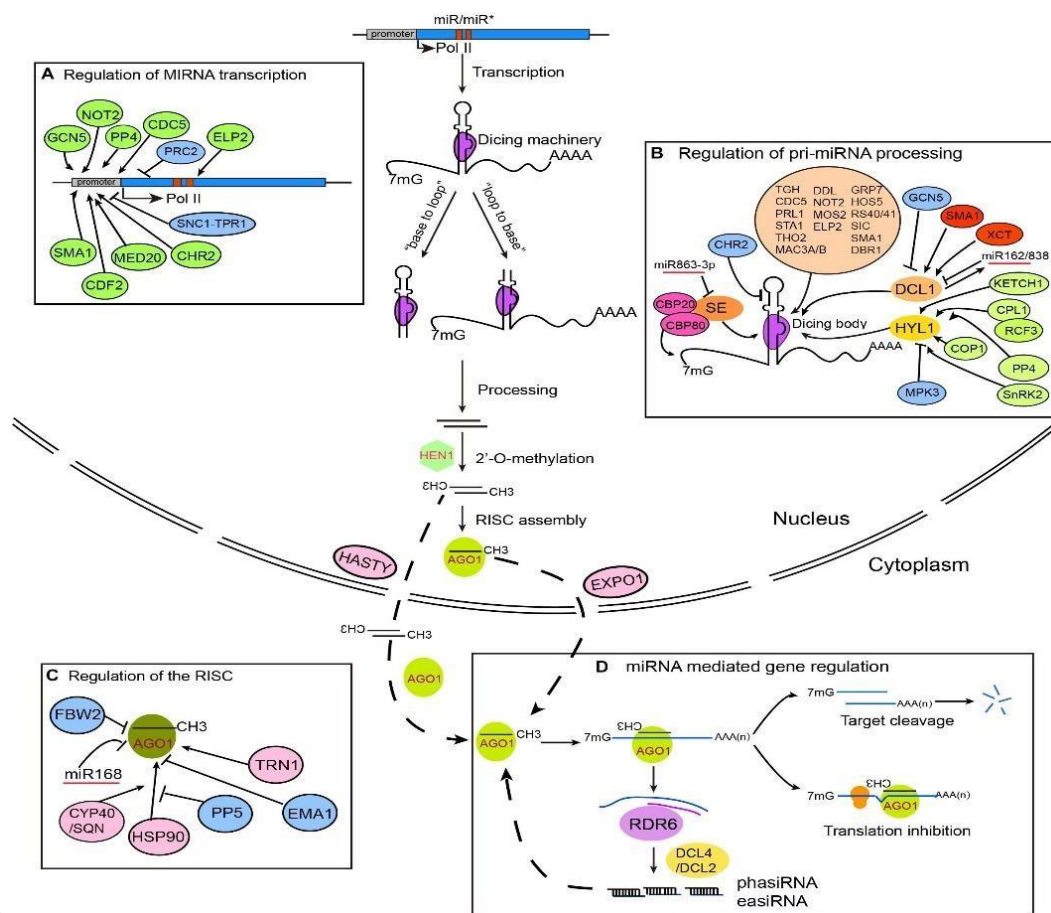
Τα micro-RNAs (miRNAs) ανήκουν στην κατηγορία των φυσικά παραγόμενων, μικρών μη κωδικοποιούμενων RNA μορίων, με μέγεθος που κυμαίνεται από 21 σε 25 ζεύγη βάσεων. Τα miRNAs είναι κατά ένα μέρος, συμπληρωματικά σε ένα ή περισσότερα μόρια αγγελιοφόρου RNA (messenger RNA-mRNA), και η βασική τους λειτουργία είναι να καταστέλλουν την γονιδιακή έκφραση με μια σειρά διαφορετικών μηχανισμών όπως καταστολή της μετάφρασης, τεμαχισμό του mRNA, αποαδενυλίωση (η σταδιακή αποικοδόμηση της poly(A) ουράς στο 3' άκρο). Αρχικά περιεγράφηκαν το 1993 από τον Lee, (R. C. Lee et al., 1993; Y. Lee et al., 2004) ενώ ο όρος micro-RNA κατοχυρώθηκε το 2001 (Gary, 2001). Χιλιάδες miRNAs έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα σε διάφορους οργανισμούς, μέσω κλωνοποίησης, αλληλούχισης, και υπολογιστικών συστημάτων ανάλυσης και πρόβλεψης.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα miRNAs είναι πολύ μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα τελικά ώριμα miRNAs. Πολλά miRNAs έχει αποδειχτεί ότι βρίσκονται σε περιοχές ιντρονίων

(introns) των γονιδίων από τα οποία προκύπτουν τα mRNA στόχοι, και έτσι χρησιμοποιούν τα ρυθμιστικά ένζυμα και τις διεργασίες μεταγραφής του στόχου, ενώ έχουν κοινό προφίλ έκφρασης. Για υπόλοιπα miRNAs που κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρουν τους δικούς τους εκκινητές και τις δικές τους ρυθμιστικές διεργασίες, λιγότερα μεταγραφήματα έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα.

Τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II ως μεγάλα RNA μακρομόρια, που ονομάζονται pri-miRNAs και εμπεριέχουν μια 5' καλύπτρα και μια 3' πολύ(A) ουρά(Y. Lee et al., 2004). Σειρά βιοχημικών διεργασιών αλλάζουν την δομή και τα χαρακτηριστικά των pri-miRNAs. Τα παραγόμενα pre-miRNAs πλέον, μήκους περίπου 70 ζευγών βάσεων, διπλώνονται σε δομές ατελούς θηλιάς(stem-loop structures). Τα pre-miRNAs μετέπειτα εξάγονται στο κυτταρόπλασμα από την Exportin 5 και το Ran-GTP σύμπλοκο (Yi et al., 2003). Η Exportin 5 είναι μια μικρή GTP binding πρωτεΐνη που ανήκει στην υπερ-οικογένεια RAS και παίζει καθοριστικό ρόλο στην μεταγκατάσταση των RNAs και των πρωτεϊνών μέσω του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων(Moore & Blobel, 1993). Αφού βρεθεί στο κυτταρόπλασμα το pre-miRNA, περνά μία ακόμα επεξεργασία κοπής από το RNase III ένζυμο Dicer(Bernstein et al., 2001), που αφαιρεί την θηλιά παράγοντας το ώριμο δίκλωνο miRNA, ένα RNA διπλής έλικας με μήκος περίπου 22 νουκλεοτιδικών βάσεων. Το Dicer ακόμα εκκινεί τον σχηματισμό ενός συμπλόκου σίγασης (RNA-induced silencing complex - RISC)(Hammond, 2005) στο οποίο μόνο η μία αλυσίδα του miRNA θα ενσωματωθεί (guide strand) Τα παραπάνω αποτυπώνονται στην σχηματικά στην Εικόνα 6. Το σύμπλοκο RISC είναι υπεύθυνο για την αποσιώπηση των γονιδίων στόχων εξαιτίας της πρόσδεσης του miRNA στο αντίστοιχο αγγελιοφόρο mRNA στόχο που πραγματοποιείται μέσω του RISC

Τα miRNAs στα φυτά ανακαλύφθηκαν το 2002 και μελετήθηκαν συστηματικά για πρώτη φορά στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* από τρία διαφορετικά ανεξάρτητα εργαστήρια (Llave et al., 2002; Park et al., 2002), μεταξύ των οποίων και της ερευνητικής ομάδας των Bartel (Reinhart et al., 2002) . Η συγκεκριμένη ανακάλυψη και οι βασικές επόμενες μελέτες για τη βιοσύνθεση των miRNAs όπως αυτή των ομάδων του Baulcombe (Baulcombe, 2004) και του Voinnet (Voinnet, 2009) άλλαξε την αντίληψη για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, αλλά και της αλληλεπίδρασης της με το περιβάλλον στα φυτά(Mirlohi & He, 2016)

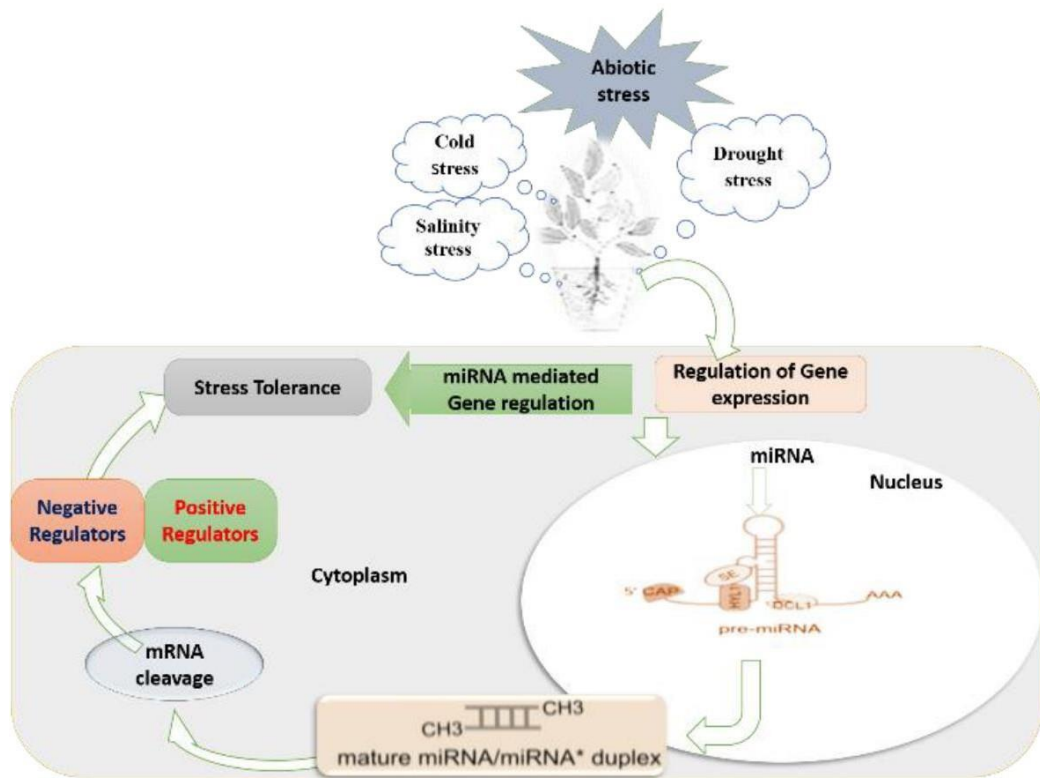


Εικόνα 6: Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των *micro*-RNAs στα φυτά. Λήψη από Πηγή: (J. Wang et al., 2019)

1.12.1 *micro*-RNA και υδατική καταπόνηση

Τα *micro*-RNAs συμμετέχουν στις περισσότερες αποκρίσεις σε καταπονήσεις στα φυτά (Εικόνα 7). Ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στόχων αναστέλλοντας την. Πολλά από τα γονίδια στόχοι είναι ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες που επηρεάζουν μια σειρά λειτουργιών σχετιζόμενες με την αύξηση, την ανάπτυξη, τον έλεγχο του ωσμωτικού δυναμικού ή την αντοχή σε καταπονήσεις όπως η υδατική. Η υπερέκφραση συγκεκριμένων *mi*RNAs (*Osa-miR535*, *miR160*, *miR408*, *Osa-miR393*, *Osa-miR319*, *Gma-miR394*) σχετιζόμενων με την απόκριση στην υδατική καταπόνηση οδήγησε σε μια σειρά φυτών στην αύξηση της αντοχής στην καταπόνηση. Αντίστοιχα σίγαση της έκφρασης συγκεκριμένων *mi*RNAs υπεύθυνα για διαφορετικές λειτουργίες (*miR166/miR398c*) οδήγησε επίσης στην αύξηση της αντοχής στην υδατική καταπόνηση (Singh et al., 2022). Ακόμα, με τη χρήση νέων τεχνικών έχει παρουσιαστεί ότι μια σειρά από *micro*-RNAs μεταξύ των οποίων και το *miRNA159*, εμπλέκονται σε πολλαπλές διεργασίες και μεταβολικά μονοπάτια, και κατ' επέκταση έχουν

σημαντικότερο ρόλο στην απόκριση των φυτών σε καταπονήσεις όπως η υδατική (Asefpour Vakilian, 2020).



Εικόνα 7: Σχηματική αποτύπωση της ρύθμισης των μηχανισμών απόκρισης σε αβιοτικές καταπονήσεις από microRNAs. Λήψη από ΠΗΓΗ: (Pervaiz et al., 2022)

1.13 miRNA159, miRNA156

Στη συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζεται η επίδραση της υδατικής καταπόνησης σε δύο ποικιλίες αμπέλου από την Ήπειρο, σε γενετικό αλλά και επιγενετικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα η συμβολή του επιγενετικού μηχανισμού της δράσης των μη κωδικοποιημένων RNA και συγκεκριμένα των microRNAs, στην προσαρμογή στην υδατική καταπόνηση. Σύμφωνα με την Pagliarani et al. (2017), τα miRNAs που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στην υδατική καταπόνηση είναι τα *miRNA159*, *miRNA156*. Το *miRNA159* ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *MYB*, *GATA*, *TOPLESS*, ενώ το *miRNA156* του γονιδίου *CONSTANS*. (Pagliarani et al., 2017).

1.14 Μεταγραφικοί παράγοντες

Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο, καθορίζει τα χαρακτηριστικά μιας σειράς διεργασιών που σχετίζονται με την αύξηση, την ανάπτυξη και την προσαρμοστικότητα στις περιβαλλοντικές μεταβολές. Κυρίαρχο ρόλο σε αυτήν τη διαδικασία έχουν οι μεταγραφικοί παράγοντες, οικογένειες γονιδίων που οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από αυτά, επιτελούν δύο βασικές διεργασίες. Να επηρεάσουν την έκφραση άλλων γονιδίων στόχων, και να εμπλέκουν διάφορες πρωτεΐνες σε μεταγραφικές διαδικασίες (Strader et al., 2022). Οι μεταγραφικοί παράγοντες κατέχουν σημαίνοντα ρόλο τόσο στην μεταφορά σήματος από το περιβαλλοντικό ερέθισμα, ειδικότερα από καταπονήσεις, όσο και στην διαδικασία έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στην καταπόνηση. Ο μεταγραφικοί παράγοντες κατ' επέκταση αποτελούν εξαιρετικά σημαντικά εργαλεία ρύθμισης διεργασιών που σχετίζονται με τις καταπονήσεις, καθώς ελέγχουν ταυτόχρονα πολλαπλά μονοπάτια μεταφοράς σήματος. Τα τελευταία χρόνια αναγνωρίζονται ολοένα και περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με την υδατική καταπόνηση και λοιπές αβιοτικές καταπονήσεις, και αποτελούν ένα από τα βασικότερα εργαλεία των βελτιωτικών προγραμμάτων που στοχεύουν στην αύξηση της αντοχής και της προσαρμοστικότητας σε αντίστοιχες συνθήκες (Higmona & και Hussain, 2021). Συμπερασματικά η αναγνώριση της λειτουργίας και των εξειδικευμένων χαρακτηριστικών του εκάστοτε μεταγραφικού παράγοντα προσδίδει νέες πληροφορίες για ρυθμιστικές διεργασίες προσαρμογής των φυτών, για τις μετατροπές των μετα-μεταγραφικών μοτίβων έκφρασης, για της αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών, καθώς επίσης εμπλουτίζει την δυνατότητα βελτιωτικών παρεμβάσεων (Manna et al., 2021)

1.15 Έκφραση γονιδίου MYB

Ο μεταγραφικός παράγοντας MYB, που προκύπτει από την έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου ανακαλύφθηκε σε ιό λεύκανσης των πτηνών (avian leukosis virus- ALV) και ονομάστηκε “v-MYB” virus. Ολόκληρη η πρωτεΐνη αποτελείται από μια δομή τριών τμημάτων. Τη περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA binding region – DBD), την περιοχή ενεργοποίησης την μεταγραφής και την περιοχή αρνητικής ρύθμισης (Ogata et al., 1996).

Οι R2R3-MYB πρωτεΐνες είναι εξειδικευμένες στα φυτά και αποτελούν μια από τις πιο συχνές κατηγορίες πρωτεϊνών που υπάρχουν στα φυτά, με πάνω από 100 R2R3-MYB να εμφανίζονται

στα γονιδιώματα των δικοτυλήδων και των μονοκοτυλήδων. Αβιοτικές καταπονήσεις όπως υδατική, αλατότητα, υψηλή θερμοκρασία ή ψύχος, περιορίζουν την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών. Η ικανότητα των φυτών να αντέχουν στις συγκεκριμένες καταπονήσεις είναι αλληλένδετη με την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με τις καταπονήσεις. Οι *MYB* μεταγραφικοί παράγοντες βρίσκονται παντού στα φυτά και εμπλέκονται σχεδόν σε κάθε πλευρά της ανάπτυξης ή του μεταβολισμού των φυτών. Μπορούν να ρυθμίσουν την μορφολογία και τα χαρακτηριστικά των κυττάρων. Όταν τα φυτά δέχονται αβιοτικές καταπονήσεις από κάποιο περιβαλλοντικό ερέθισμα, οι *MYB* μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να ρυθμίσουν αποτελεσματικά την έκφραση λειτουργικών γονιδίων που σχετίζονται με την καταπόνηση, ενεργοποιώντας μια σειρά φυσιολογικών αντιδράσεων. Σχηματίζονται έτσι μια σειρά από ελεγχόμενα δίκτυα βιοχημικών αντιδράσεων όπου περιορίζουν ή εξουδετερώνουν τις αρνητικές επιδράσεις της καταπόνησης στο φυτό. Αυτή η αντίδραση των φυτών, είναι περίπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει ενεργοποίηση πολλών γονιδίων και τη χρήση διαφόρων βιοχημικών μονοπατιών. Ο μεταγραφικός έλεγχος των *MYB* παίζει καθοριστικό ρόλο στον συντονισμό αυτών των διαδικασιών αντίδρασης στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Li et al., 2019)

Οι περισσότεροι *MYB* μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται στις αντιδράσεις ανοχής στην υδατική καταπόνηση. Τα DBDs των *MYB*, τα σημεία πρόσδεσης τους δηλαδή, συνδέονται τις περιοχές εκκίνησης μιας σειράς λειτουργικών γονιδίων που σχετίζονται με την υδατική καταπόνηση, ενεργοποιώντας την έκφραση του επάγοντας την αντίδραση στην καταπόνηση. Στην Αραβίδωση (*Arabidopsis thaliana*) αποδείχθηκε πως η υπερέκφραση του *MYB* και συγκεκριμένα του *AtMYB2* αύξησε την έκφραση της παραγόμενης από ABA αντίδρασης στην υδατική καταπόνηση, προκαλώντας υπερέκφραση διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με την καταπόνηση, όπως τα γονίδια *RD22* και *ADHI* (Abe et al., 2003).

1.16 Έκφραση γονιδίου *GATA*

Η οικογένεια γονιδίων *GATA* είναι μια από τις καλά διατηρημένες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, και παίζει καθοριστικό ρόλο σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες, σε μια μεγάλη γκάμα οργανισμών από τους μύκητες έως τα αγγειόσπερμα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες *GATA* είναι πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA, έχοντας ένα μοτίβο IV σαν κεφαλή ψευδαργύρου (zinc-finger motif) CX₂CX₁₇–20CX₂C που

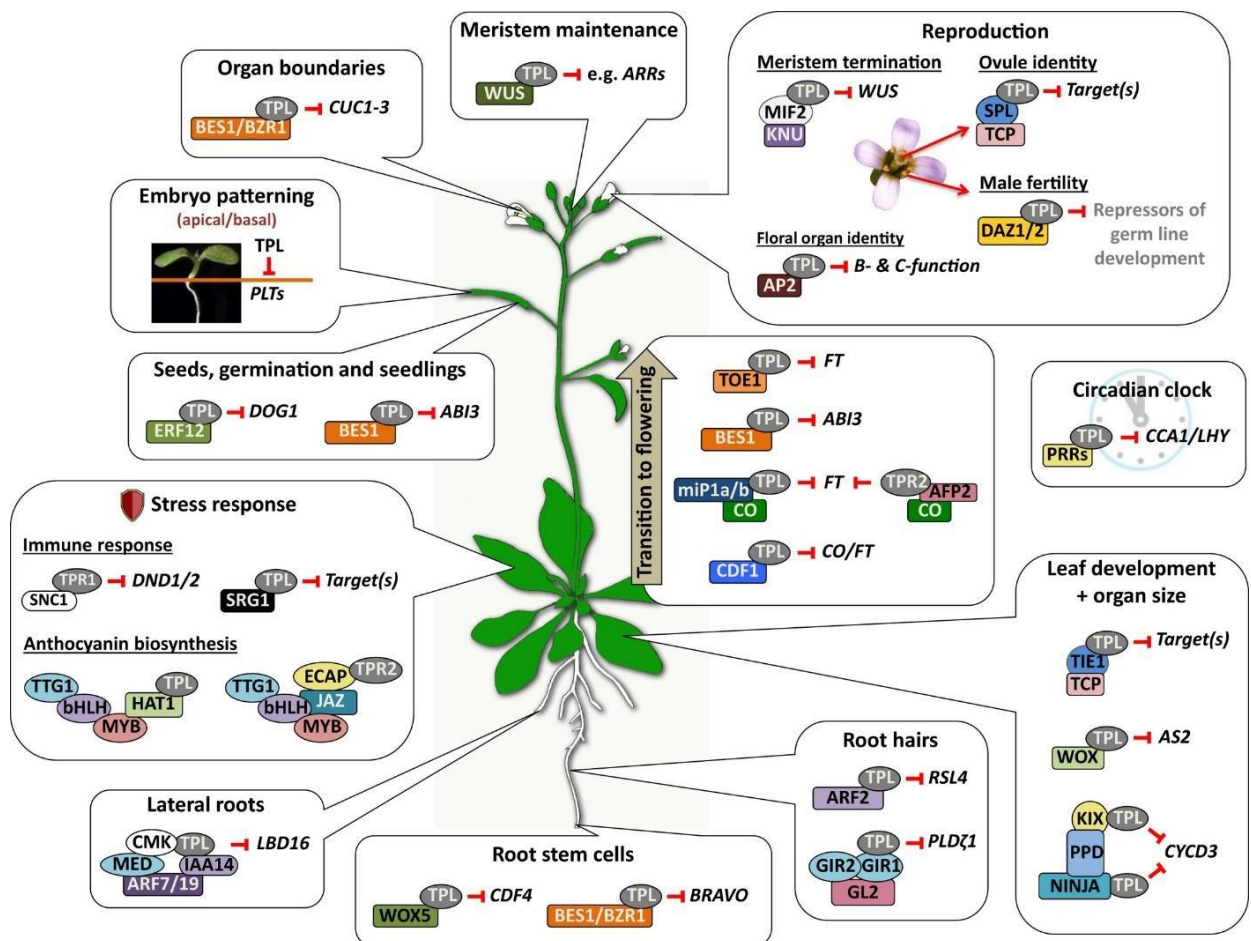
ακολουθείται από μια έντονα βασική περιοχή που προσδένεται σε αλληλουχία W-G-A-TA-R (W = T/A, R = G/A)(Merika & Orkin, 1993;)(Flexas et al., 2002; Medrano et al., 2002). Στα φυτά τα *GATA* είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με την φωτοπερίοδο, καθώς και με αυτά που σχετίζονται με την απορρόφηση των νιτρικών. Μελέτη στο ρύζι, κατέδειξε ότι διαφορετικά μέλη της οικογένειας *GATA* αποτυπώνουν διαφορετικό προφίλ έκφρασης όταν δέχονται ερέθισμα από διαφορετικές αβιοτικές καταπονήσεις, όπως υδατική καταπόνηση, αλατότητα ή υψηλή θερμοκρασία, καθώς και εξωγενής εφαρμογή ABA. Ένα μέλος της κλάσης IV, το *OsGATA23a* παρουσιάστηκε ως μεταγραφικός παράγοντας συσχετιζόμενος με πολλές καταπονήσεις, επάγοντας την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενα με την αντοχή τόσο στην υδατική καταπόνηση όσο και στην αλατότητα. Ωστόσο το *OsGATA23b*, μια άλλη παραλλαγή του *OsGATA23* δεν ανταποκρίθηκε στις παραπάνω καταπονήσεις. Με βάση τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι αποτυπώνονται διαφορετικά μοτίβα έκφρασης και αλληλεπίδρασης των *GATA* με τις περιβαλλοντικές καταπονήσεις, με ειδικά χαρακτηριστικά κάθε μέλους των *OsGATA* γονιδίων να επιτελεί μια εξειδικευμένη ρυθμιστική λειτουργία έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων ως προσαρμογή σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες(Reyes et al., 2004).

1.17 Έκφραση γονιδίου *TOPLESS*

Τα γονίδια *Topless* (TPL) και οι πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τα *Topless* (TRP) συνιστούν οικογένεια μεταγραφικών αναστολέων, που στα φυτά ρυθμίζουν την ανάπτυξη, την αντίδραση σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις, και την ορμονική ισορροπία μέσω αλληλεπιδράσεων με παράγοντες αντίδρασης αιθυλενίου που σχετίζονται με τον αμφιφιλικό περιορισμό (Ethylene response factor-associated Amphiphilic Repression (EAR)(A. R. Plant et al., 2021a). Ένα εξαιρετικά χαρακτηριστικό παράδειγμα εμπλοκής των TPL/TRP αποτελεί, η σχέση τους με τις πρωτεΐνες προσαρμογής των σημάτων της αυξίνης. Οι πρωτεΐνες προσαρμογής της αυξίνης σχετίζονται και αλληλοεπιδρούν με την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων αντίδρασης στην αυξίνη (ARFs), οι οποίοι χρησιμοποιούν τα TPL/TRP για να καταστείλουν την αντίδραση-απάντηση της αυξίνης. Για την εμπλοκή των TPL/TRP αναγκαία είναι η παρουσία των EAR μοτίβων της αυξίνης(Szemenyei et al., 2008).

Πάνω από εκατό παράγοντες αλληλεπίδρασης TPL/TRP από περισσότερες από είκοσι οικογένειες πρωτεϊνών, σχετιζόμενων με την μεταγραφή, έχουν ανακαλυφθεί τα τελευταία χρόνια καταδεικνύοντας ότι τα TPL/TRP αποτελούν καθοριστικό παράγοντα για αμέτρητες βιοχημικές διεργασίες (Causier et al., 2012). Με την εμπλοκή τους σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος τη ρύθμιση αναπτυξιακών διαδικασιών, τα TPL/TRP επιτελούν καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της αύξησης, της ανάπτυξης αλλά και της προσαρμοστικότητας των φυτών, όπως αποτυπώνεται ενδεικτικά στην Εικόνα 8 (A. R. Plant et al., 2021a).

Τα *Topless* συνδέονται με την αντίδραση των φυτών σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις μέσω της σύνδεσής τους με τη ρύθμιση μιας σειράς φυτοορμονών (Causier et al., 2012).



Εικόνα 8: Αποτύπωση της εμπλοκής του TOPLESS σε μια σειρά διεργασιών του φυτού, Πηγή: (A. Plant et al., 2021)

1.18 Έκφραση γονιδίου *CONSTANS*

Τα γονίδια *CONSTANS (CO)-like* έχουν μελετηθεί διεξοδικά για τον ρόλο τους στη ρύθμιση της άνθισης σε σχέση με την φωτοπερίοδο, αλλά ελάχιστες πληροφορίες έχουν δοθεί για τη δράση τους σε άλλες βιοχημικές διεργασίες (Putterill et al., 1995). Βρέθηκε ότι το γονίδιο *Ghd2*, ένα *CONSTANS (CO)-like* γονίδιο, μπορεί να προκαλέσει αύξηση της απόδοσης στο ρύζι, υπό κανονικές συνθήκες καλλιέργειας, ενώ ένα ομόλογο του το *Ghd7* εμπλέκεται στη ρύθμιση της ευαισθησίας των φύλλων και της αντοχής στην υδατική καταπόνηση. Η υπερέκφραση του *Ghd7* επάγεται κάτω από ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες, και οδηγεί σε μείωση της αντοχής σε υδατική καταπόνηση (Weng et al., 2014). Σε άλλες αναφορές, η υποέκφραση του αποτελεί αντίδραση στην υψηλή θερμοκρασία και στην έλλειψη υγρασίας και ρυθμίζεται από miRNA. Παρόλη τη σημασία του *Ghd7* *CONSTANS (CO)-like*, λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκεται (Weng et al., 2014). Το *Ghd2* στο ρύζι εκφράζεται κυρίως στο φύλλο, και ρυθμίζεται σε κατεύθυνση υποέκφρασης σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Η υπερέκφραση του σημαίνει σημαντική μείωση της αντοχής σε συνθήκες ξηρασίας, ενώ η σίγαση του εμφανίζει αυξημένη αντοχή. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι το *Ghd2* *CONSTANS (CO)-like* παίζει καθοριστικό ρόλο στο να επιταχύνει την διαδικασία του κυτταρικού γήρατος που προκαλείται από την υδατική καταπόνηση στο ρύζι. Οι μελέτες καταδεικνύουν ότι το *Ghd2* *CONSTANS (CO)-like* λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας που χρησιμοποιεί τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα στην διαδικασία της γήρανσης, ως μοντέλο ανάπτυξης αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών (Liu et al., 2016a).

1.19 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην ανάλυση της σχετικής έκφρασης micro-RNAs και των γονιδίων στόχων τους, που εμπλέκονται σε αβιοτικές καταπονήσεις, και στη συσχέτιση της με τις φυσιολογικές και μορφολογικές μετρήσεις των φυτών δειγμάτων. Συγκεκριμένα στοχεύει στην έκφραση των miRNA156 και miRNA159, που στοχεύουν αντίστοιχα τα γονίδια *VvCONSTANS-5* και *VvMYB101*, *VvGATA-26 like*, *VvTOPLESS-4 like*, σε φυτά αμπέλου υπό ελεγχόμενες συνθήκες υδατικής καταπόνησης.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

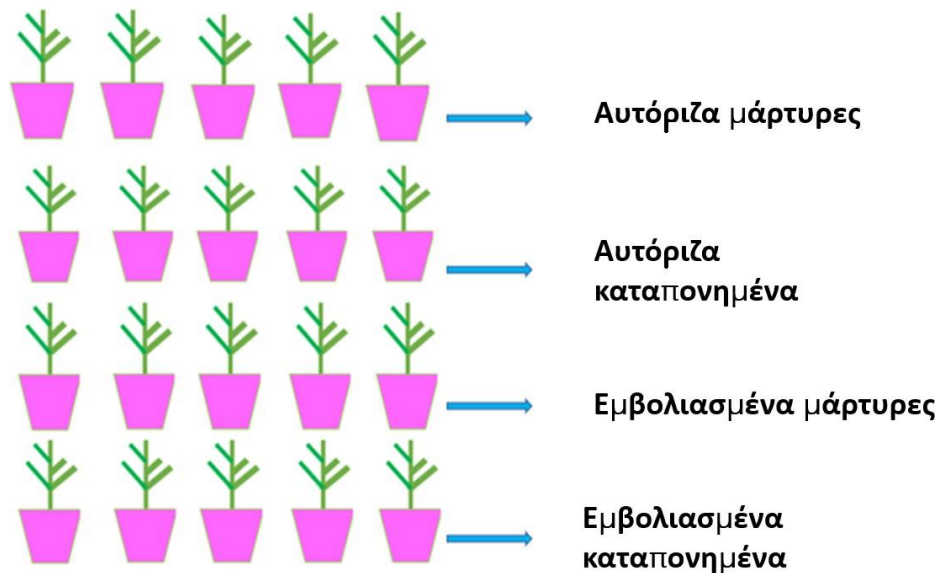
Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκαν οι παραδοσιακές (τοπικές/γηγενείς) ποικιλίες της περιφέρειας Ηπείρου, Ντεμπίνα και Διχάλι ως προς την απόκριση τους στην υδατική καταπόνηση. Για τη μελέτη των γενετικών και επιγενετικών χαρακτηριστικών των ποικιλιών, και για την έκφραση των τεσσάρων γονιδίων και δύο micro-RNAs που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το αποθηκευμένο φυτικό υλικό(φύλλα), διατηρημένο σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-80°C). Τα φύλλα είχαν ληφθεί από φυτά που είχαν φυτευθεί σε γλάστρες στο θερμοκήπιο του Τμήματος Αμπέλου, του Ινστιτούτου Ελιάς, Υποτροπικών φυτών και Αμπέλου (ΙΕΛΥΑ), Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός - ΔΗΜΗΤΡΑ (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ), στη Λυκόβρυση, Αττικής Και οι δύο ποικιλίες έφεραν τόσο αυτόριζα όσο και εμβολιασμένα φυτά σε υποκείμενο 110 Richter. Όπως αποτυπώνεται και στον Πίνακα 3, τα φυτά υποβλήθηκαν σε δύο φάσης υδατικής καταπόνησης, στο 25% και στο 50% της υδατοχωρητικότητας τους, αντίστοιχα, ενώ ανάμεσα στις δύο φάσεις καταπόνησης μεσολάβησε περίοδος ανάκαμψης. Ακόμα για κάθε κατηγορία (αυτόριζο/εμβολιασμένο) χρησιμοποιήθηκαν φυτά μάρτυρες. Οι τέσσερις μεταχειρίσεις εμφανίζονται στην Εικόνα 9. Μετά το πέρας κάθε φάσης, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες τριών επαναλήψεων.

Πίνακας 3:: Στάδια υδατικής καταπόνησης

Χρονικό Διάστημα	Μάρτυρες	Καταπονημένα
1η Καταπόνηση 29/05/2020 και είχε διάρκεια 2 βδομάδες.	100% RSWC	50% RSWC
Φάση Ανάκαμψης 15/06/2020	Μέχρι Κορεσμό	Μέχρι Κορεσμό

και διήρκησε 3 εβδομάδες.		
2η Καταπόνηση 6/07/2020 και είχε διάρκεια 2 βδομάδες.	100% RSWC	25% RSWC

Πειραματική διαδικασία



Εικόνα 9: Γραφική αποτύπωση της διαδικασίας καταπόνησης.

2.2 Απομόνωση RNA

Αρχικά τα δείγματα λειοτριβήθηκαν με χρήση υγρού αζώτου, σε αποστειρωμένα δοχεία και γουδιά. Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε το Spectrum™ Plant Total RNA Kit της εταιρίας SIGMA-ALDRICH.

- Σε Πλαστικά σωληνάρια Eppendorf 1,5 ml, προστέθηκε ο λειοτριβημένος παγωμένος ιστός του κάθε δείγματος περίπου 0,1 g.

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 500 μL Lysis Solution και 5 μL 2-mercaptoethanol (2-ME).
- Τα tubes μεταφέρθηκαν σε μηχανήμα Vortex, για ανάδευση ενός λεπτού.
- Στη συνέχεια τα tubes μεταφέρθηκαν σε μηχανήμα heat block και παρέμειναν σε σταθερή θερμοκρασία 56 βαθμών κελσίου, για 5 λεπτά.
- Τα δείγματα πέρασαν φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 14.000 g.
- Μετά τη φυγόκεντρο το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε μεταφέρθηκε σε νέο tube 2 ml, με στήλη διήθησης (Filtration Column).
- Μετά από 1 λεπτό φυγόκεντρο το υγρό πέρασε το Filtration Column, και σε αυτό προστέθηκαν 250 μL διαλύματος πρόσδεσης (Binding Solution).
- Στη συνέχεια το υγρό συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε νέο tube 2 ml, με στήλη πρόσδεσης (Binding Column), και φυγοκεντρίθηκε για 2 λεπτά στα 14.000 g.
- Το υγρό που πέρασε από το Binding Column απορρίφθηκε, και στο Binding Column προστέθηκαν 500 μL διάλυμα πλύσης 1 (Wash Solution 1).
- Τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν για 1 λεπτό και το υγρό που πέρασε από τα Binding Columns απορρίφθηκε ξανά.
- Προστέθηκαν 500 μL από το διάλυμα πλύσης 2 (Wash Solution 2) στο Binding Column, τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν για ένα λεπτό και το υγρό απορρίφθηκε. Η διαδικασία αυτού του βήματος επαναλήφθηκε άλλη μία φορά.
- Ακολούθησε άλλη μια φυγόκεντρος και απόρριψη και του τελευταίου υγρού που είχε παραμείνει.
- Τα Binding Columns μεταφέρθηκαν σε νέα tubes 2 ml, και προστέθηκαν σε αυτά 30 μL Elution Solution. Μετά από αναμονή 2 λεπτών τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν για 1 λεπτό. Η διαδικασία αυτού του βήματος επαναλήφθηκε άλλη μία φορά.
- Τα Binding Columns απορρίφθηκαν, και το RNA παρέμεινε στα πλαστικά σωληνάρια (tubes).

Στη συνέχεια οι διάφορες επαναλήψεις της ίδια μεταχείρισης ενοποιήθηκαν σε ενιαίο RNA mix της κάθε μεταχείρισης. Κατόπιν τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C

2.3 Μέτρηση συγκέντρωσης RNA

Το απομονωμένο RNA, οφείλει να είναι καθαρό από πρωτεΐνες και λοιπές βιοχημικές ουσίες. Η μέτρηση της καθαρότητας αλλά και της συγκέντρωσης του RNA πραγματοποιείται μέσω του μηχανήματος Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer). Στην υποδοχή του μηχανήματος τοποθετείται δείγμα σε υγρή κατάσταση, ποσότητας 1 μL . Με XENON φως γραμμικής διάταξης CCD, το μηχάνημα αναλύει το δείγμα.

- Αρχικά τοποθετείται στη υποδοχή 1 μL , καθαρού μοριακού νερού, ώστε το μηχάνημα να πάρει μηδενική μέτρηση και να ρυθμίσει το λογισμικό.
- Στη συνέχεια μετά από καθαρισμό της υποδοχής, τοποθετείτε κάθε δείγμα ξεχωριστά σε ποσότητα 1 μL , και αναλύεται ξεχωριστά.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε μορφή τριών λόγων:

- 260/280: αποτυπώνεται στα 260 nm η απορρόφηση του DNA / RNA και στα 280 nm των πρωτεϊνών. Για δείγμα RNA ο λόγος πρέπει να είναι περίπου 2 για να είναι αποδεκτός. Λόγος χαμηλότερος του 2 αποτυπώνει την ύπαρξη πρωτεϊνών, φαινολών ή άλλων.

- 260/230 : Υπολογισμός καθαρότητας DNA/RNA. Η τιμή του λόγου πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 1,8 και 2,2, αλλιώς υποδηλώνεται παρουσία αλάτων και δευτερευόντως λοιπών ενώσεων.

- ng/ μl : η συγκέντρωση που ο λόγος παρουσιάζει βασίζεται στην απορρόφηση του DNA / RNA στα 260 nm και η τιμή της είναι αποδεκτή σε ανώτερα αποτελέσματα από 40 ng/ μl για το RNA.

2.4 cDNA σύνθεση

Για την αποφυγή επιμολύνσεων κατά την επεξεργασία του RNA και την προετοιμασία της διεργασίας, χρησιμοποιήθηκαν μόνο αποστειρωμένα εργαλεία και αναλώσιμα. Ο χώρος και τα εργαλεία απολυμάνθηκαν ξανά υπό UV ακτινοβολία. Για την σύνθεση cDNA, από δείγματα RNA γνωστών και αποδεκτών λόγων και συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκε το PrimeScript™

RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) της εταιρίας TAKARA BIO INC. Κάθε βήμα της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε εντός δοχείου με πάγο.

- Από κάθε δείγμα απαιτείται μέχρι 1 µg RNA για 7 µL όγκο. Με βάση αυτό υπολογίστηκε η ποσότητα που λήφθηκε από κάθε δείγμα και εάν συμπληρώθηκε με H₂O έως τα 7 µL, όπου ήταν αναγκαίο.
- Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 1µL από το gDNA Eraser και 2 µL από το 5X gDNA Eraser Buffer.
- Τα δείγματα μετά από τις προσθήκες παρέμειναν σε PCR μηχανήμα για 2 λεπτά στους 42 βαθμούς κελσίου.
- Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστέθηκαν: 4 µL από 5X PrimeScript Buffer 2 (for Real Time), 1 µL από PrimeScript RT Enzyme Mix I, 1 µL από RT Primer Mix * 4 και 4µL RNase Free dH₂O.
- Τα δείγματα τέλος μεταφέρθηκαν σε PCR μηχανήμα και ακολούθησαν τις ακόλουθες συνθήκες: 37 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά και 85 βαθμούς κελσίου για 5 δευτερόλεπτα.

Στη συνέχεια τα δείγματα του cDNA αποθηκευτήκαν σε συνθήκες κατάψυξης (-20°C).

2.5 Σχετική έκφραση γονιδίων – qPCR ανάλυση

Για την σχετική έκφραση των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems. Για την αποφυγή επιμολύνσεων κατά την επεξεργασία του RNA και την προετοιμασία της διεργασίας, χρησιμοποιήθηκαν μόνο αποστειρωμένα εργαλεία και αναλώσιμα. Τα δείγματα φορτώθηκαν σε ειδικά tubes 0,1 ml στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ειδικό plate, και μεταφέρθηκαν στην θήρα υποδοχής της συσκευής. Τα tubes φορτώθηκαν με το cDNA του εκάστοτε δείγματος, με το διαλυμα ενζύμου Syber Select Buffer, καθώς και με εκκινητές του αντίστοιχου γονιδίου στόχου και εκκινητές του γονιδίου αναφοράς της ακτίνης σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- 2 µL cDNA του εκάστοτε δείγματος
- 10 µL Syber Select Buffer
- 7,6 µL Μοριακό Νερό
- 0,2 Primer Forward

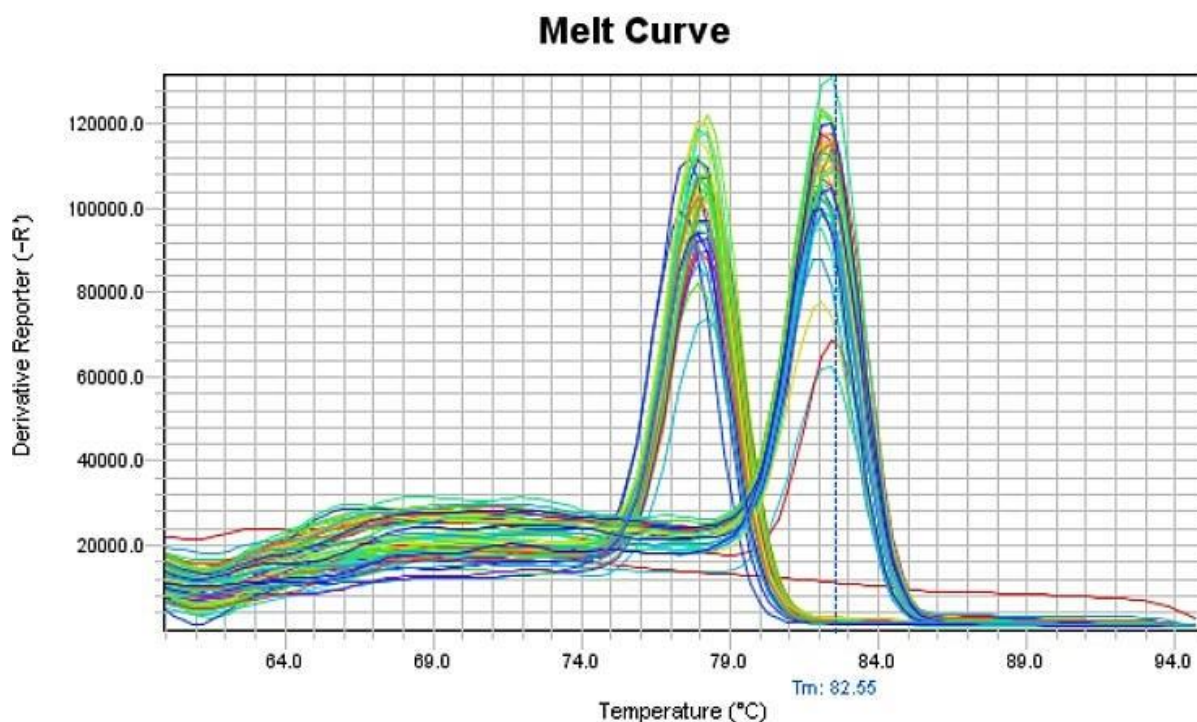
- 0,2 Primer Reverse

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα γονίδια και τα αντίστοιχα miRNAs επιλέχθηκαν με βάση τη μελέτη της Pagliarani et al. (2017).

Σε κάθε plate φορτώθηκε ένα γονίδιο στόχος και το γονίδιο αναφοράς ακίνη. Τα δύο πρώτα tubes λειτουργούν ως negatives, και δεν εμπεριέχουν cDNA. Για τα υπόλοιπα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν από τρεις επαναλήψεις σε κάθε δείγμα τόσο για το γονίδιο στόχος όσο και για το γονίδιο αναφοράς. Ως δείγμα αναφοράς για τη συσκευή τέθηκε σε κάθε διαδικασία, ο αυτόριζος μάρτυρας της πρώτης δειγματοληψίας, ενώ για την ανάλυση, ο αυτόριζος μάρτυρας της κάθε δειγματοληψίας. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στη συσκευή ήταν το παρακάτω:

- Αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά
- 40 κύκλοι σε 2 στάδια :
 - αποδιάταξη στους 95 °C για 15 δευτερόλεπτα
 - υβριδισμός - επιμήκυνση του εκκινητή στους 60 °C για 1 λεπτό
- Σχηματισμός της καμπύλης της θερμοκρασίας μετουσίωσης του 50% των προϊόντων της qPCR(ενδεικτικά παρουσιάζεται η καμπύλη του *GATA* στην ποικιλία Ντεμπίνα στην Εικόνα 10):
 - 95 °C για 15 δευτερόλεπτα
 - 60 °C για 1 λεπτό
 - 95 °C για 15 δευτερόλεπτα. Από τους 60 °C μέχρι τους 95 °C ,κάθε 0,3 °C λαμβάνονται νέες τιμές για εμφάνιση προϊόντων.

Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται από τη συσκευή με τη χρήση μετρήσιμων φθορίζοντων χρωστικών, μέσω των οποίων υπολογίζεται σε κάθε κύκλο το προϊόν της PCR. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή του threshold C_T , μέσω της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση της έκφρασης του γονιδίου στόχου στα δείγματα.



Εικόνα 10: Καμπύλη της θερμοκρασίας μετουσίωσης του γονιδίου GATA στην ποικιλία Ντεμπίνα.

2.6 cDNA σύνθεση για miRNAs

Για την σύνθεση cDNA από τα miRNAs που στοχεύουν τα γονίδια που επιλέχθηκαν από την μελέτη των Pagliarani et al.(2017), χρησιμοποιήθηκε το Mir-X miRNA First-Strand Synthesis and TB Green® kit της εταιρίας TAKARA BIO INC. Αφού αποστειρώθηκαν όλα τα απαραίτητα εργαλεία, η διαδικασία ξεκίνησε με τον προσδιορισμό του απαιτούμενου όγκου RNA από κάθε δείγμα καθώς τα αποδεκτά όρια του πρωτοκόλλου είναι 0,25- 8 μg. Μετά από τους απαραίτητους υπολογισμούς και τις απαραίτητες αραιώσεις ώστε να επιτευχθεί η κατώτερη επιτρεπτή συγκέντρωση, 0,25 μg σε όλα τα δείγματα, εκτελέστηκε το πρωτόκολλο της αντίστροφης μεταγραφής των miRNAs:

- 5 μL mRQ Buffer (2x),
- 3,75 μL δείγματος RNA ,
- 1,25 μL mRQ Enzyme,

Σε RNase-free tube 0,2 ml.

Τα δείγματα στη συνέχεια φορτώθηκαν σε συσκευή PCR και ακολουθήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα:

- 37°C για 1 ώρα
- 85°C για 5 λεπτά για απενεργοποίηση των ενζύμων.

Μετά το πέρας της διαδικασίας προστέθηκαν άλλα 90μL μοριακό νερό σε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκευτήκαν σε συνθήκες κατάψυξης(-20°C).

2.7 Σχετική ποσοτική έκφραση miRNAs – qPCR ανάλυση

Όπως και στη σχετική ποσοτική έκφραση γονιδίων η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems. Για την αποφυγή επιμολύνσεων όλα τα εργαλεία απολυμάνθηκαν είτε σε χύτρα αποστείρωσης, είτε υπό έκθεση σε UV ακτινοβολία. Τα δείγματα φορτώθηκαν σε tubes 1μL, σε ειδικό plate και αυτό με τη σειρά του στην ειδική θήρατη συσκευής, όπου ακολουθήθηκε η διαδικασία σχετικής ποσοτικής έκφρασης που τα θεωρητικά χαρακτηριστικά της παρουσιάστηκαν με σαφήνεια στην ενότητα της σχετικής ποσοτικής έκφρασης γονιδίων (βλ. 2.5), με τη διαφορά πως στην συγκεκριμένη περίπτωση μελετήθηκε η έκφραση των miRNAs. Ως γονίδιο αναφοράς τοποθετήθηκε το U6 το οποίο αποτελεί μικρό πυρηνικό RNA και εμφανίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα είδη, γεγονός που το καθιστά το πιο διαδεδομένο γονίδιο αναφοράς για miRNAs(Duan et al., 2018).

Χρησιμοποιήθηκαν τα kit, TB Green® Advantage® qPCR Premix καθώς και το Mir-X miRNA First-Strand Synthesis and TB Green® της εταιρίας TAKARA BIO INC. Τα δείγματα φορτώθηκαν ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

- 10 μl από το TB Green Advantage qPCR Premix (2X)
- 0.4 μl από τη χρωστική ROX Reference Dye LMP (50X)
- 0.4 μl από τον miRNA Primer Forward
- 0.4 μl από τον universal miRNA Primer reverse, mRQ 3'
- 6.8 μl μοριακό νερό
- 2 μl miRNA cDNA δείγμα

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την qPCR στη συσκευή ήταν το ακόλουθο:

- Αποδιάταξη στους 95°C για 20 δευτερόλεπτα
- 40 κύκλοι σε 2 στάδια :
-αποδιάταξη στους 95 °C για 5 δευτερόλεπτα

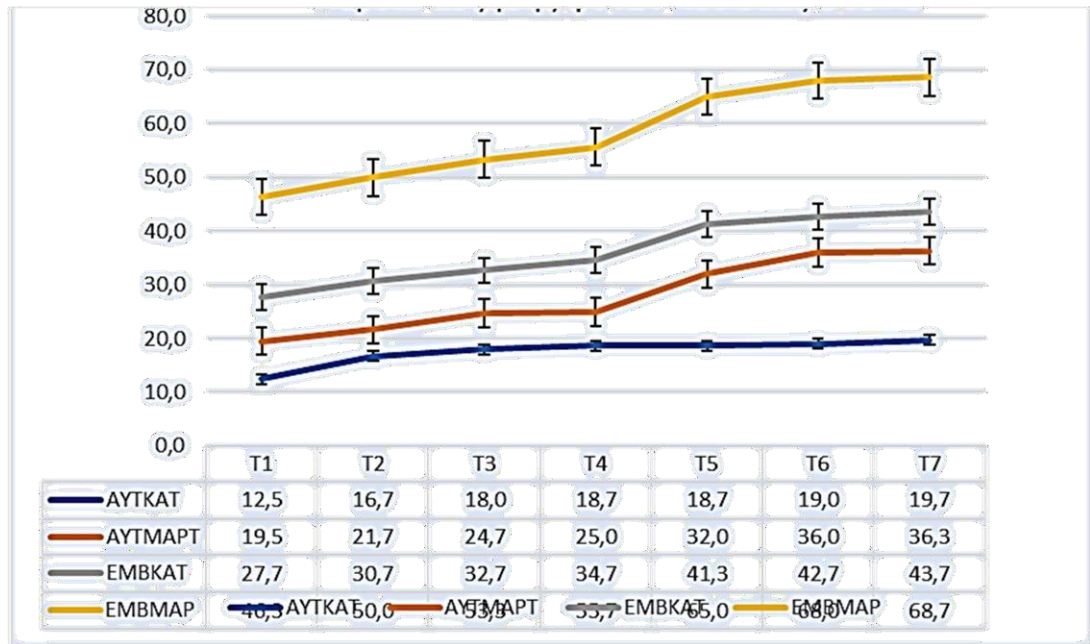
- υβριδισμός - επιμήκυνση του εκκινητή στους 65 °C για 34 δευτερόλεπτα
- Σχηματισμός της καμπύλης της θερμοκρασίας μετουσίωσης του 50% των προϊόντων της qPCR:
 - 95 °C για 60 δευτερόλεπτα
 - 55 °C για 30 δευτερόλεπτα
 - 95 °C για 30 δευτερόλεπτα. Από τους 60 °C μέχρι τους 95 °C ,κάθε 0,3 °C λαμβάνονται νέες τιμές για εμφάνιση προϊόντων.

2.8 Στατιστική ανάλυση

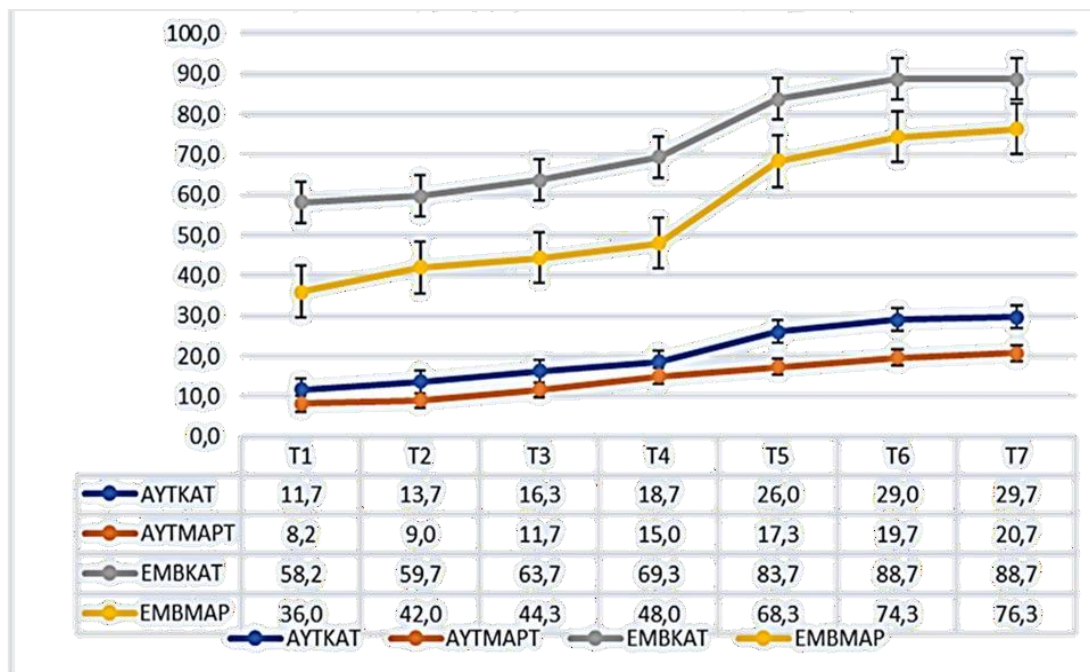
Η ανάλυση των διαφορών μεταξύ των γονιδίων και μεταξύ των miRNAs ως προς τη σχετική ποσοτική τους έκφραση στις διάφορες φάσεις του πειράματος έγινε με Ανάλυση της Διακύμανσης (ANOVA), ενώ η σύγκριση με επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το κριτήριο Tukey. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του του στατιστικού πακέτου JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

3. Αποτελέσματα

Οι μορφολογικές μετρήσεις που προέκυψαν μετά το πείραμα της υδατικής καταπόνησης (φάση 1) των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διγάλι, αυτόριζων και εμβολιασμένων φυτών, στο θερμοκήπιο, και αποτυπώνονται στα διαγράμματα των Εικόνων 11,12.



Εικόνα 11: Ρυθμός ανάπτυξης βλαστού, ποικιλία Ντεμπίνα

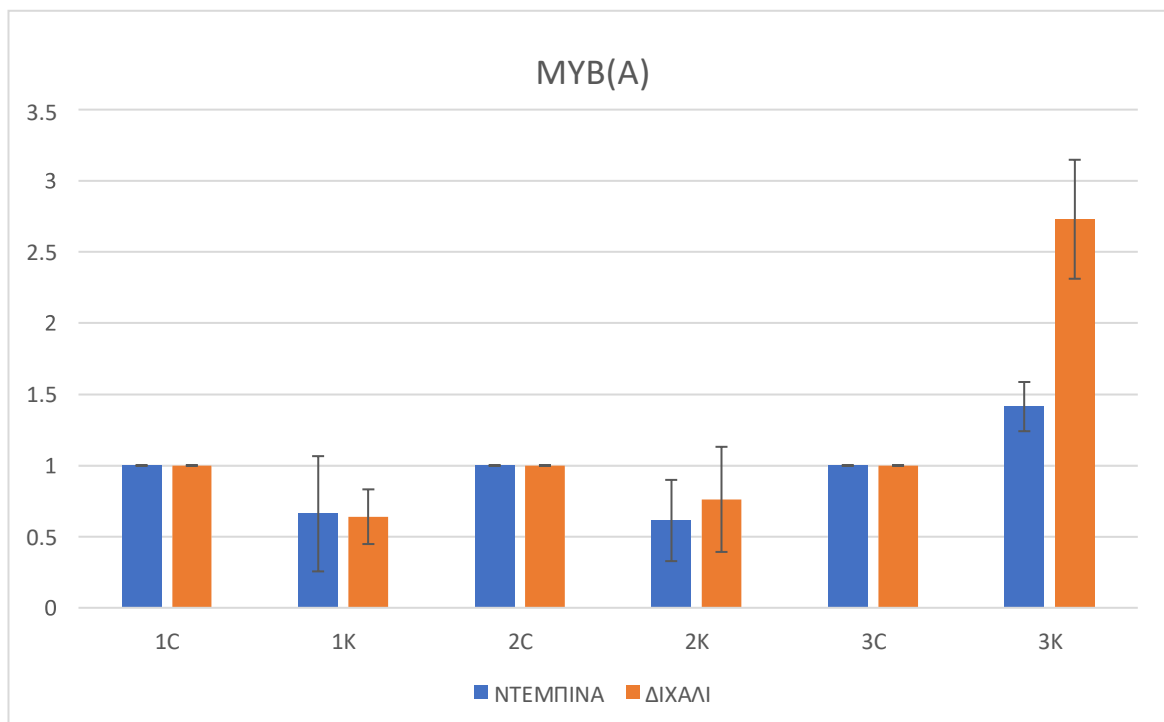


Εικόνα 12: Ρυθμός ανάπτυξης βλαστού, ποικιλία Διγάλι.

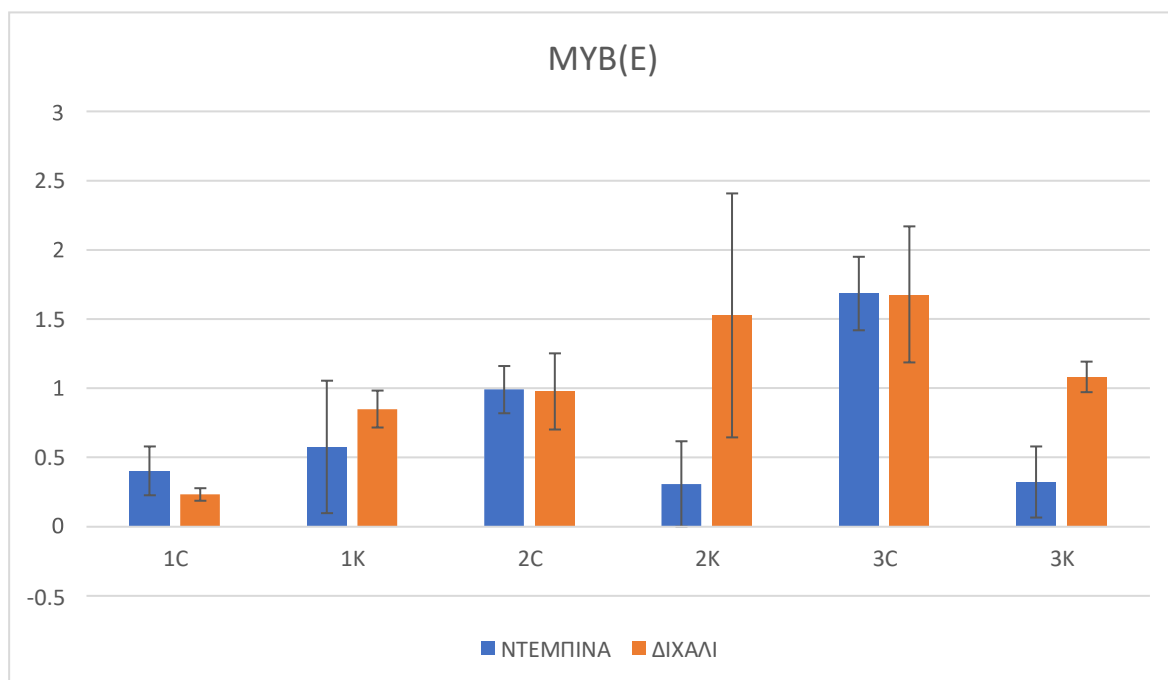
Από τα διαγράμματα των Εικόνων 11,12 γίνεται κατανοητό ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των βλαστών στα καταπονημένα φυτά της ποικιλίας Ντεμπίνα είναι αρκετά χαμηλότερος από αυτών των φυτών μαρτύρων τόσο στα αυτόριζα όσο και στα εμβολιασμένα φυτά. Αντίθετα η ποικιλία Διχάλι δεν παρουσιάζει πτωτική τάση στον ρυθμό ανάπτυξης στα φυτά που υπεβλήθησαν σε υδατική καταπόνηση.

3.1 Έκφραση γονιδίου MYB

Μετά qPCR ανάλυση των δειγμάτων του γονιδίου MYB, στη συσκευή StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems με βάση τα προαναφερθέντα πρωτόκολλα, και μετά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των επαναλήψεων της διαδικασίας, προέκυψαν τα εξής στοιχεία, όπως αποτυπώνονται στην Εικόνα 13 για τα αυτόριζα φυτά, και στην Εικόνα 14 για τα εμβολιασμένα



Εικόνα 13 : Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου MYB σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.



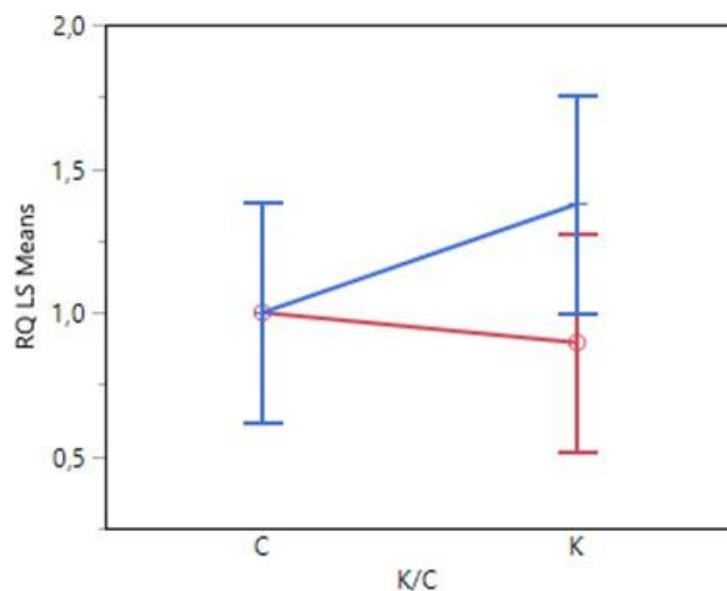
Εικόνα 14: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου MYB σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα αποτυπώνεται στα αυτόριζα φυτά τάση υπερεκφράσης του γονιδίου MYB στα δείγματα που έχουν υποστεί υδατική καταπόνηση στην ποικιλία 'Διχάλι', ενώ η ποικιλία 'Ντεμπίνα' δεν παρουσιάζει αντίστοιχη συμπεριφορά, σε υπολογίσιμο βαθμό.

Στα εμβολιασμένα φυτά αναδεικνύεται μια αυξητική τάση στην έκφραση του γονιδίου MYB κατά την εξέλιξη του πειράματος στην ποικιλία 'Διχάλι'. Αντίθετα η ποικιλία 'Ντεμπίνα' παρουσιάζει μια σχετική υποέκφραση του γονιδίου.

Η μελέτη της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι η συμπεριφορά της οικογένειας MYB σχετίζεται με την μεταγωγή σημάτων σε μια σειρά γονίδια που σχετίζονται με την αντίδραση στην υδατική καταπόνηση.

3.1.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του γονιδίου MYB



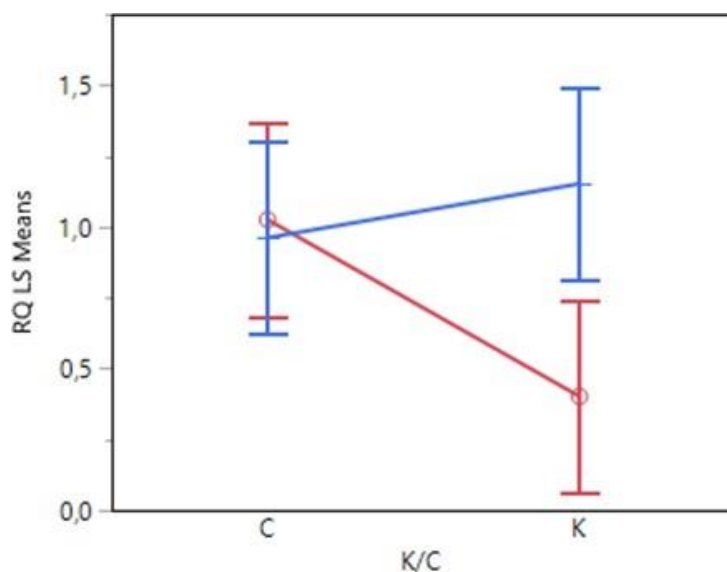
Εικόνα 15 Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου MYB σε αυτόριζα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Πίνακας 4: Διαφορές μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου MYB σε αυτόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Level		Least Sq Mean
ΔΙΧ,Κ	A	1,3775000
ΝΤ,С	A	1,0000000
ΔΙΧ,С	A	1,0000000
ΝΤ,Κ	A	0,8956667

Για τα αυτόριζα φυτά, με βάση τα στοιχεία του Πίνακα 4 δεν αποτυπώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας

0,05, μεταξύ των ποικιλιών αλλά ούτε και μεταξύ της σχέσης καταπονημένων φυτών – φυτών μαρτύρων. Παρόλα αυτά η τάση υπερεκφράσης που εμφανίζει το Διχάλι επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα της Εικόνας 15.



Εικόνα 16 Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου MYB σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Πίνακας 5: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου MYB σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

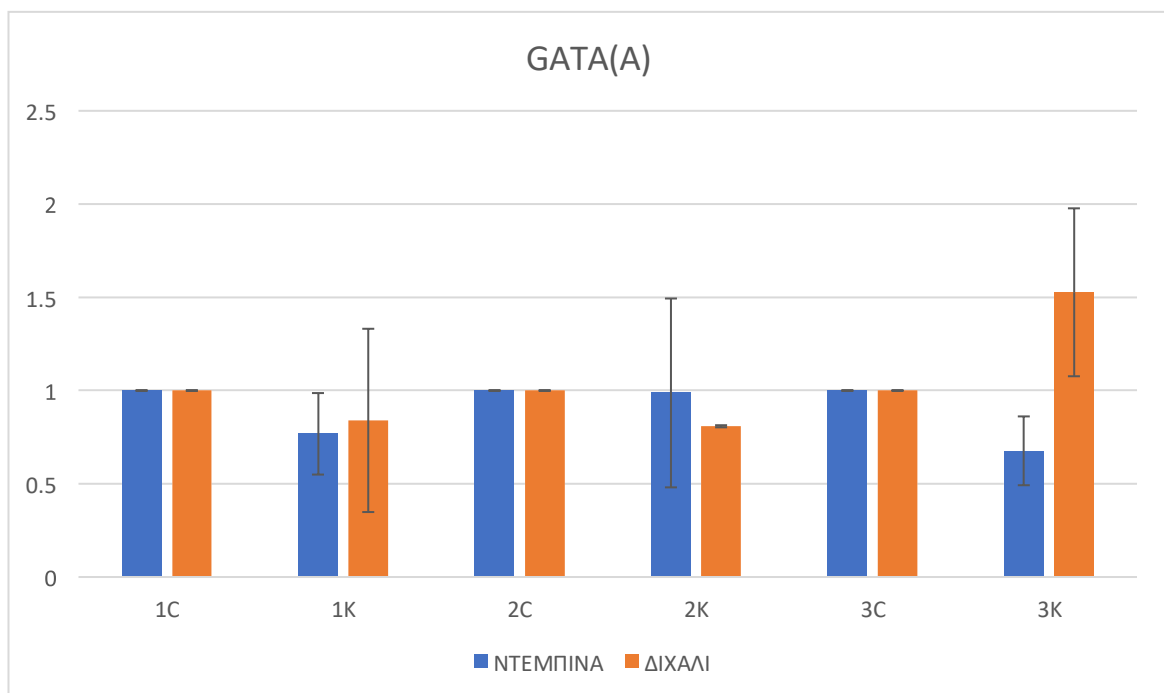
Level			Least Sq Mean
ΔΙΧ,Κ	A		1,1525
ΝΤ,С	A	B	1,0255
ΔΙΧ,С	A	B	0,962
ΝΤ,Κ		B	0,402

Στα εμβολιασμένα φυτά αποτυπώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05 στην έκφραση των καταπονημένων

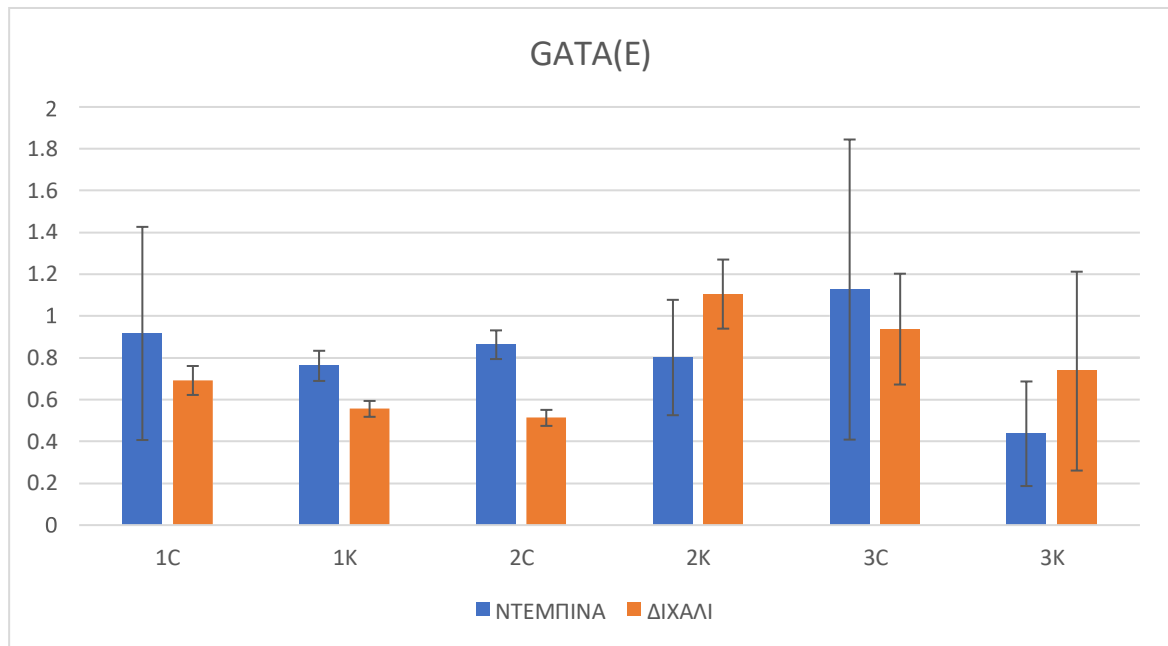
φυτών μεταξύ των δύο ποικιλιών, όπως εμφανίζεται στον Πίνακα 5, και επιβεβαιώνεται από την αποτύπωση του διαγράμματος της Εικόνας 16.

3.2 Έκφραση γονιδίου *GATA*

Μετά qPCR ανάλυση των δειγμάτων του γονιδίου *GATA*, στη συσκευή StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems με βάση τα προαναφερθέντα πρωτόκολλα, και μετά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των επαναλήψεων της διαδικασίας, προέκυψαν τα εξής στοιχεία, όπως αποτυπώνονται στην Εικόνα 17 για τα αυτόριζα φυτά, και στην Εικόνα 18 για τα εμβολιασμένα.



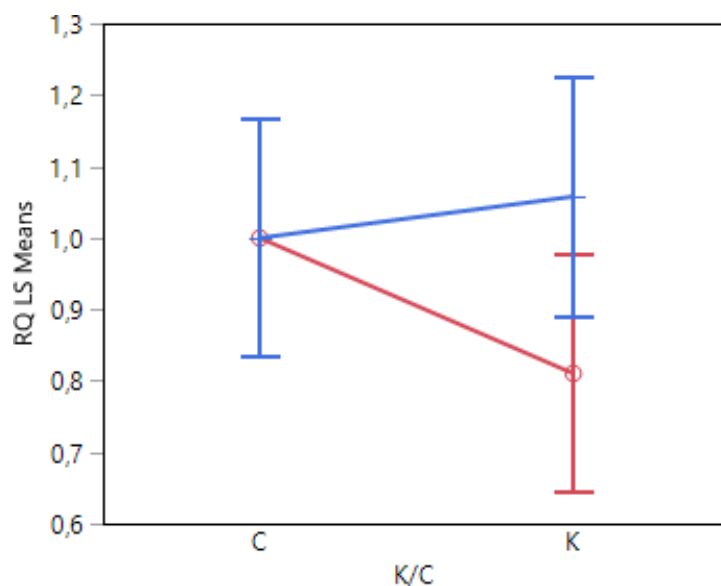
Εικόνα 17: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου *GATA* σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι



Εικόνα 18: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου *GATA* σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών *Ντεμπίνα* και *Διχάλι*.

Η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της έκφρασης του γονιδίου *GATA*, καταδεικνύει μικρές διαφοροποιήσεις στην έκφραση, τόσο στην ποικιλία *Ντεμπίνα* όσο και στην ποικιλία *Διχάλι*. Κατά συνέπεια αποτυπώνεται σχετική σταθερότητα στην έκφραση του γονιδίου *GATA* και στις τρεις φάσεις του πειράματος.

3.2.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του γονιδίου GATA



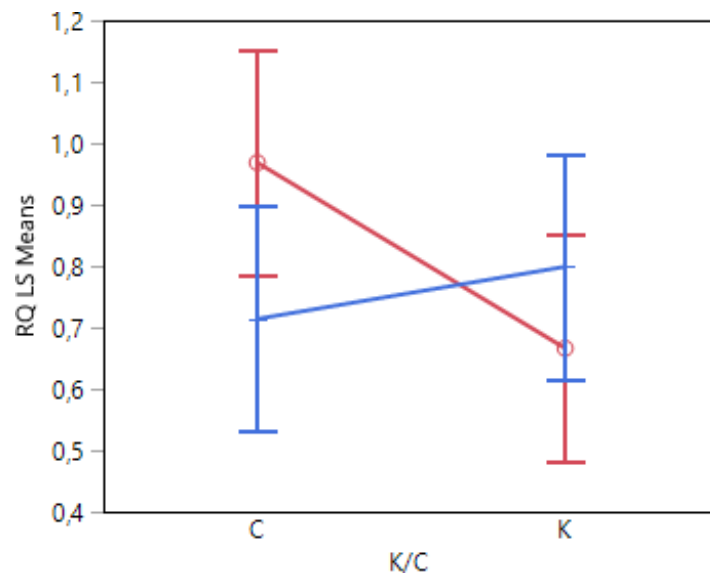
Εικόνα 19: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου GATA σε αυτόριζα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Πίνακας 6: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου GATA σε αυτόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Level		Least Sq Mean
ΔΙΧ,Κ	A	1,0580000
ΝΤ,С	A	1,0000000
ΔΙΧ,С	A	1,0000000
ΝΤ,Κ	A	0,8103333

Για τα αυτόριζα φυτά, με βάση τα στοιχεία του Πίνακα 6, δεν αποτυπώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας

0,05, μεταξύ των ποικιλιών αλλά ούτε και μεταξύ της σχέσης καταπονημένων φυτών – φυτών μαρτύρων.



Εικόνα 20: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου GATA σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro

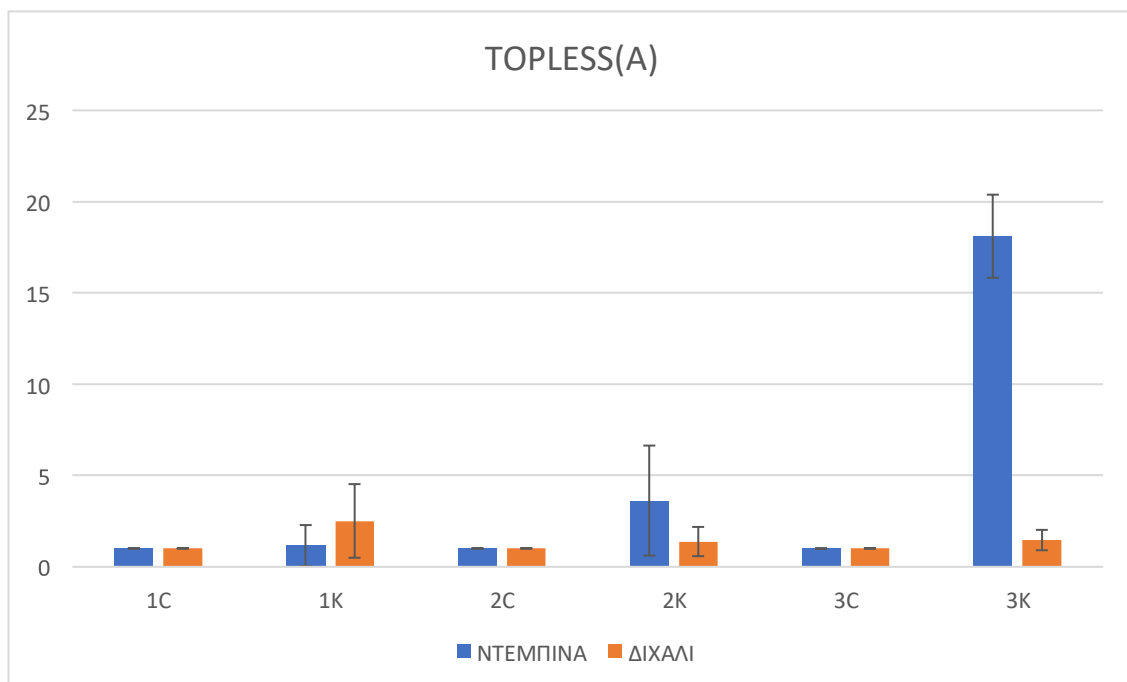
Πίνακας 7: Διαφορές μέσης τιμή ελαχίστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου GATA σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Level		Least Sq Mean
NT,C	A	0,9685
ΔΙΧ,K	A	0,799167
ΔΙΧ,C	A	0,714167
NT,K	A	0,666333

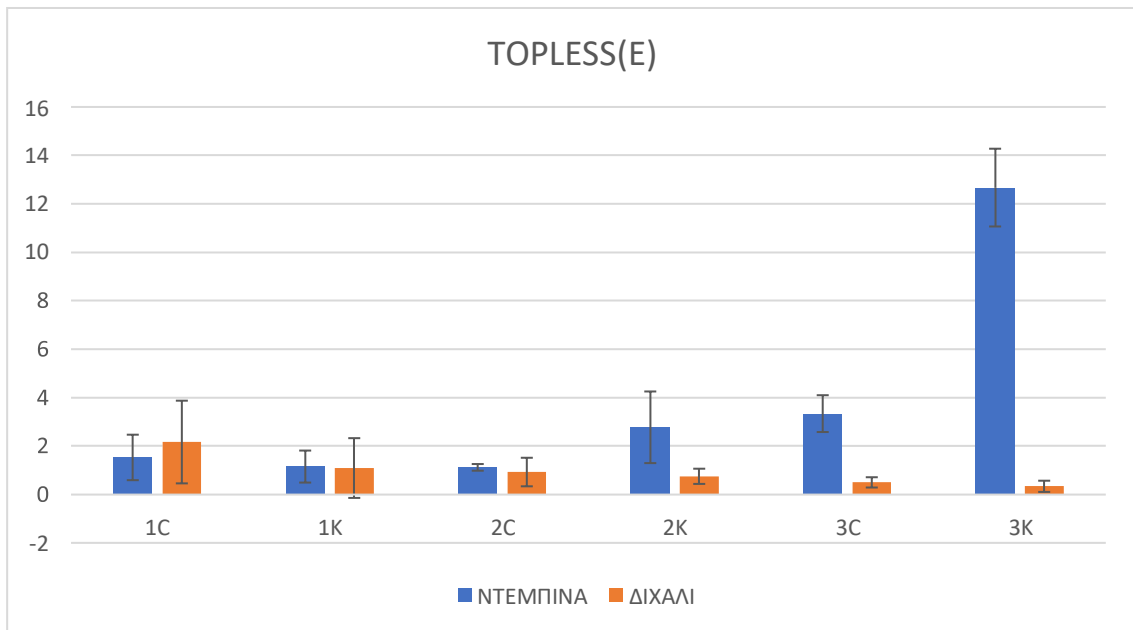
Για τα εμβολιασμένα φυτά, με βάση τα στοιχεία του Πίνακα 7 καθώς και του διαγράμματος της Εικόνας 20, δεν αποτυπώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05, μεταξύ των ποικιλιών αλλά ούτε και μεταξύ της σχέσης καταπονημένων φυτών – φυτών μαρτύρων.

3.3 Έκφραση γονιδίου *TOPLESS*

Μετά qPCR ανάλυση των δειγμάτων του γονιδίου *TOPLESS*, στη συσκευή StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems με βάση τα προαναφερθέντα πρωτόκολλα, και μετά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των επαναλήψεων της διαδικασίας, προέκυψαν τα εξής στοιχεία, όπως αποτυπώνονται στην Εικόνα 21 για τα αυτόριζα φυτά, και στην Εικόνα 22 για τα εμβολιασμένα.



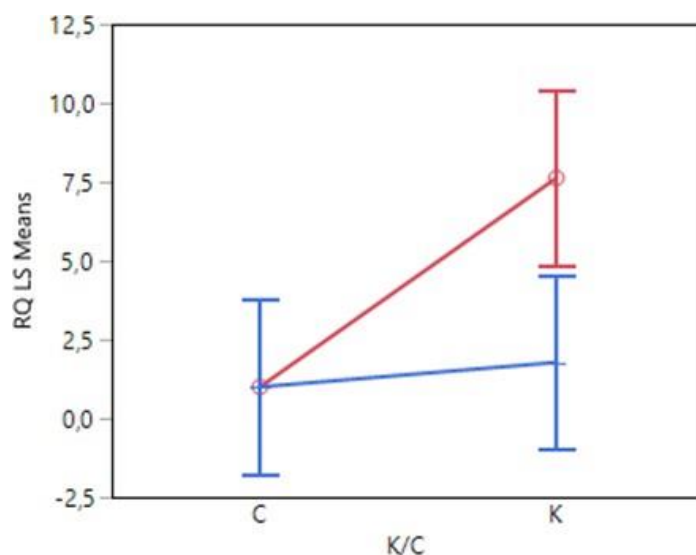
Εικόνα 21: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου *TOPLESS* σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι



Εικόνα 22: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου *TOPLESS* σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.

Από τα διαγράμματα σχετικής έκφρασης του γονιδίου *TOPLESS*, αποτυπώνεται μια ιδιαίτερα σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου στην ποικιλία Ντεμπίνα στη Τρίτη φάση του πειράματος, και στα αυτόριζα, ενώ στα εμβολιασμένα φυτά η αύξηση αποτυπώνεται πιο συγκρατημένη αλλά εξίσου σημαντική. Αντίστοιχη τάση δεν παρουσιάζει η έκφραση του γονιδίου *TOPLESS* στην ποικιλία Διχάλι που τόσο στα αυτόριζα όσο και στα εμβολιασμένα φυτά χαρακτηρίζεται από σταθερή και χαμηλή έκφραση.

3.3.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του γονιδίου *TOPLESS*

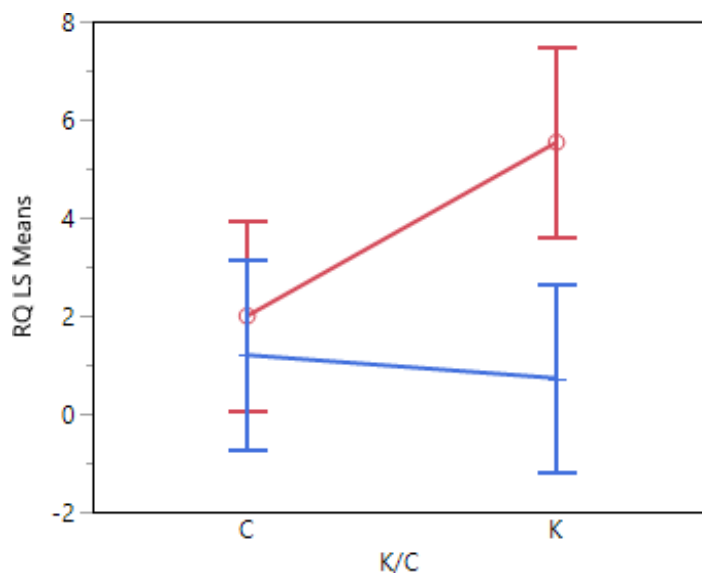


Εικόνα 23: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου *TOPLESS* σε αυτόριζα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 1

Πίνακας 8: Διαφορές μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου *TOPLESS* σε αυτόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Level			Least Sq Mean
NT,K	A		7,625
ΔΙΧ,K		B	1,777333
ΔΙΧ,C		B	1
NT,C		B	1

Σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου *TOPLESS* στα αυτόριζα φυτά, με βάση τα στοιχεία του Πίνακα 8, αλλά και την Εικόνας 23, αποτυπώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05, μεταξύ των καταπονημένων φυτών της ποικιλίας Ντεμπίνα με τα φυτά μάρτυρες της ποικιλίας, αλλά και με όλα τα φυτά (καταπονημένα και μάρτυρες) της ποικιλίας Διχάλι.



Εικόνα 24: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου *TOPLESS* σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP P

Πίνακας 9: Διαφορές μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου *TOPLESS* σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

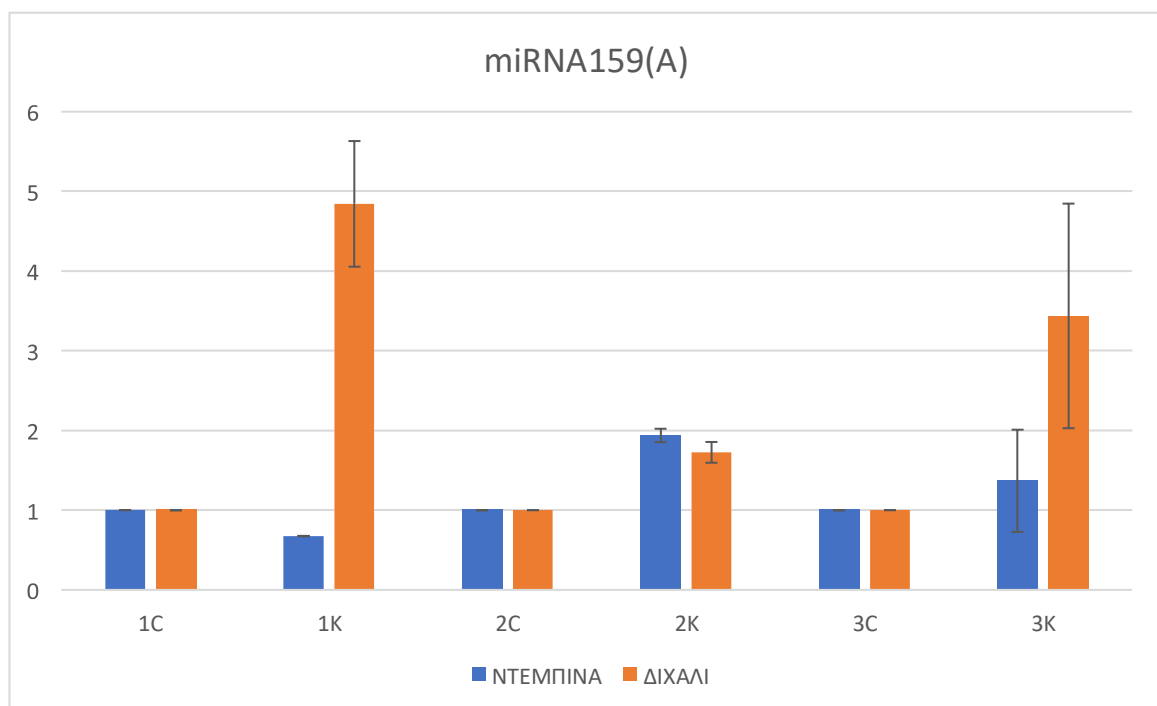
Level			Least Sq Mean
NT,K	A		5,534667
NT,C	A	B	1,9965
ΔΙΧ,C		B	1,199

ΔΙΧ,Κ		B	0,728667
-------	--	---	----------

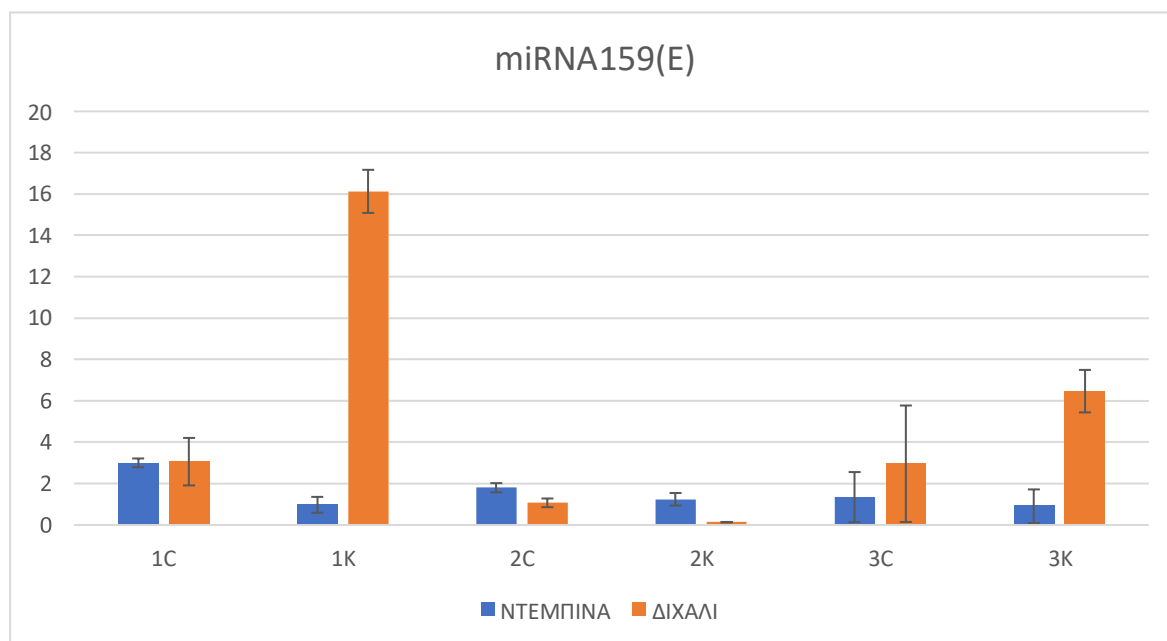
Στα εμβολιασμένα φυτά, για την έκφραση του γονιδίου *TOPLESS*, με βάση τα στοιχεία του Πίνακα 9, αλλά και την Εικόνα 24, αποτυπώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05, μεταξύ των καταπονημένων φυτών της ποικιλίας Ντεμπίνα με τα φυτά, καταπονημένα και μάρτυρες, της ποικιλίας Διχάλι.

3.4 Έκφραση *miRNA159*

Μετά qPCR ανάλυση των δειγμάτων του *miRNA159*, στη συσκευή StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems με βάση τα προαναφερθέντα πρωτόκολλα, και μετά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των επαναλήψεων της διαδικασίας, προέκυψαν τα εξής στοιχεία, όπως αποτυπώνονται στην Εικόνα 25 για τα αυτόριζα φυτά, και στην Εικόνα 26 για τα εμβολιασμένα.



Εικόνα 25: Διάγραμμα έκφρασης του *miRNA159* σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.

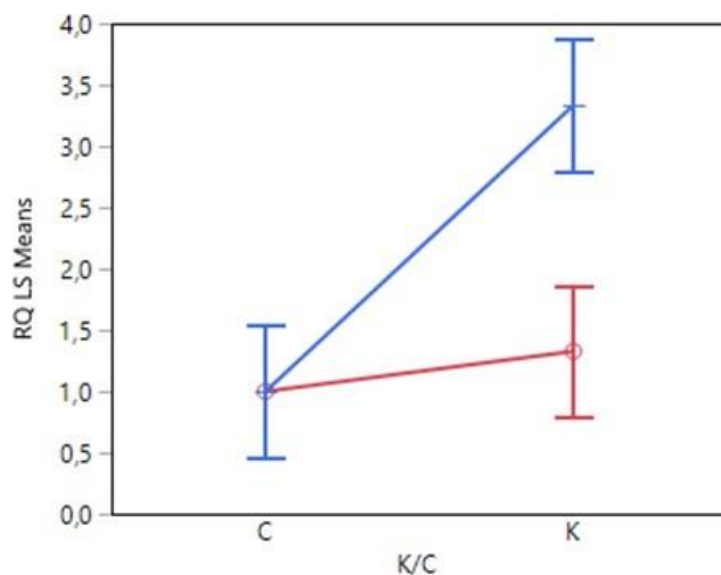


Εικόνα 26: Διάγραμμα έκφρασης του *miRNA159* σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.

Τα διαγράμματα έκφρασης του *miRNA159* αποτυπώνουν σχετικά αντιπαραθετική τάση από αυτήν του *TOPLESS* ένα έκ των βασικών γονιδίων στόχων του, κάτι το οποίο προβλέπεται και από την ρυθμιστική σχέση των δύο. Η σχετική αυτή τάση αποτυπώνεται κατά κύριο λόγο στην ιδιαίτερα χαμηλή έκφραση του *miRNA159* στην Τρίτη φάση του πειράματος στην ποικιλία Ντεμπίνα, αλλά και στην σχετικά αυξημένη έκφραση στην ποικιλία Διχάλι. Επίσης σημαντικό στοιχείο είναι ότι σε αντίθεση με την γονιδιακή έκφραση, το *miRNA159* αποτυπώνει πιο αυξημένη έκφραση στα εμβολιασμένα και όχι στα αυτόριζα φυτά έστω και αν η διαφορά είναι περιορισμένη.

Η μη ταύτιση των αποτελεσμάτων της έκφρασης του *miRNA159* με αυτήν που θα αναμενόταν, από την μελέτη της έκφρασης των *MYB*, *GATA* αλλά κυρίαρχα του *TOPLESS*, προκύπτει από την ιδιότητα του *miRNA159* να αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα της έκφρασης και πολλών άλλων γονιδίων.

3.4.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του *miRNA159*



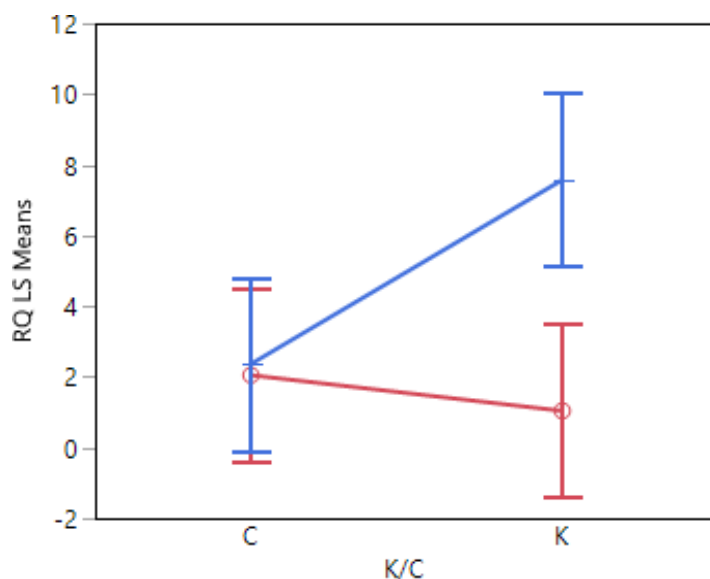
Εικόνα 27: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του *miRNA159* σε αυτόριζα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Πίνακας 10: Διαφορές μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του *miRNA159* σε αυτόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Level			Least Sq Mean
ΔΙΧ,Κ	A		3,3345
ΝΤ,Κ		B	1,3275
ΔΙΧ,С		B	1
ΝΤ,С		B	1

Η έκφραση του *miRNA159* στα αυτόριζα φυτά, με βάση τα στοιχεία του Πίνακα 10, αλλά και την Εικόνα 27, αποτυπώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05, μεταξύ των καταπονημένων φυτών της ποικιλίας

Διχάλι με τα φυτά μάρτυρες της ποικιλίας, αλλά και με όλα τα φυτά (καταπονημένα και μάρτυρες) της ποικιλίας Ντεμπίνα .



Εικόνα 28: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του *miRNA159* σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

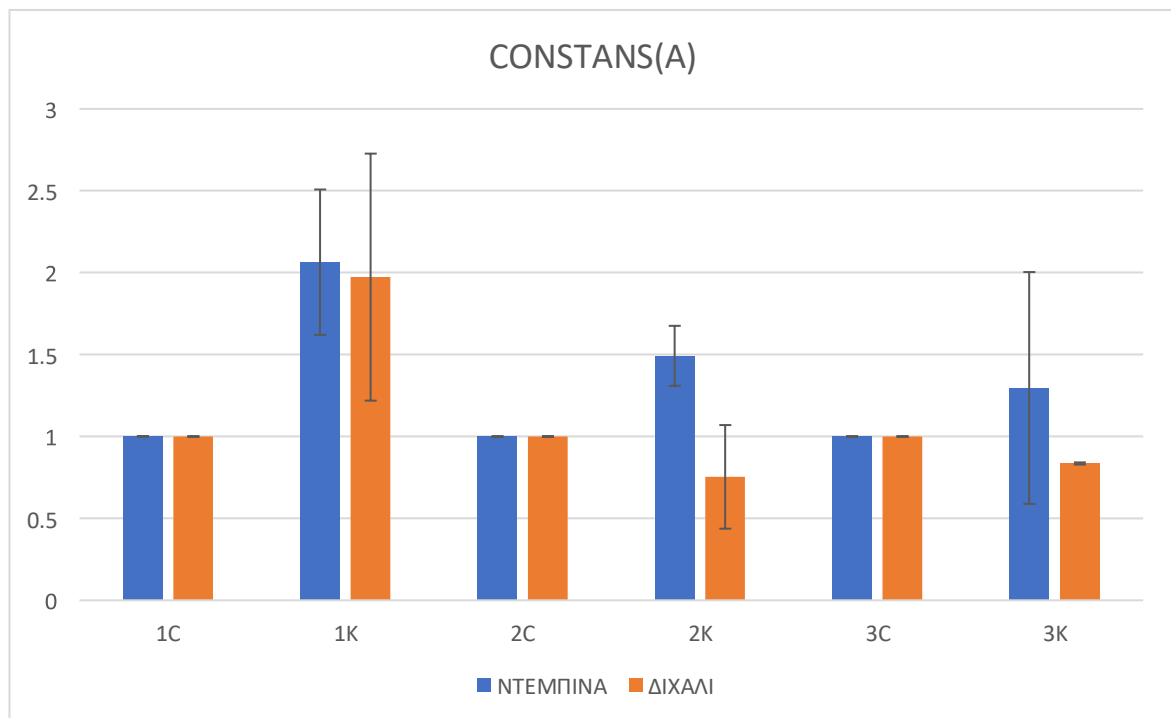
Πίνακας 11: Διαφορές μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του *miRNA159* σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Level			Least Sq Mean
ΔIX,K	A		7,579667
ΔIX,C		B	2,366667
NT,C		B	2,052333
NT,K		B	1,0435

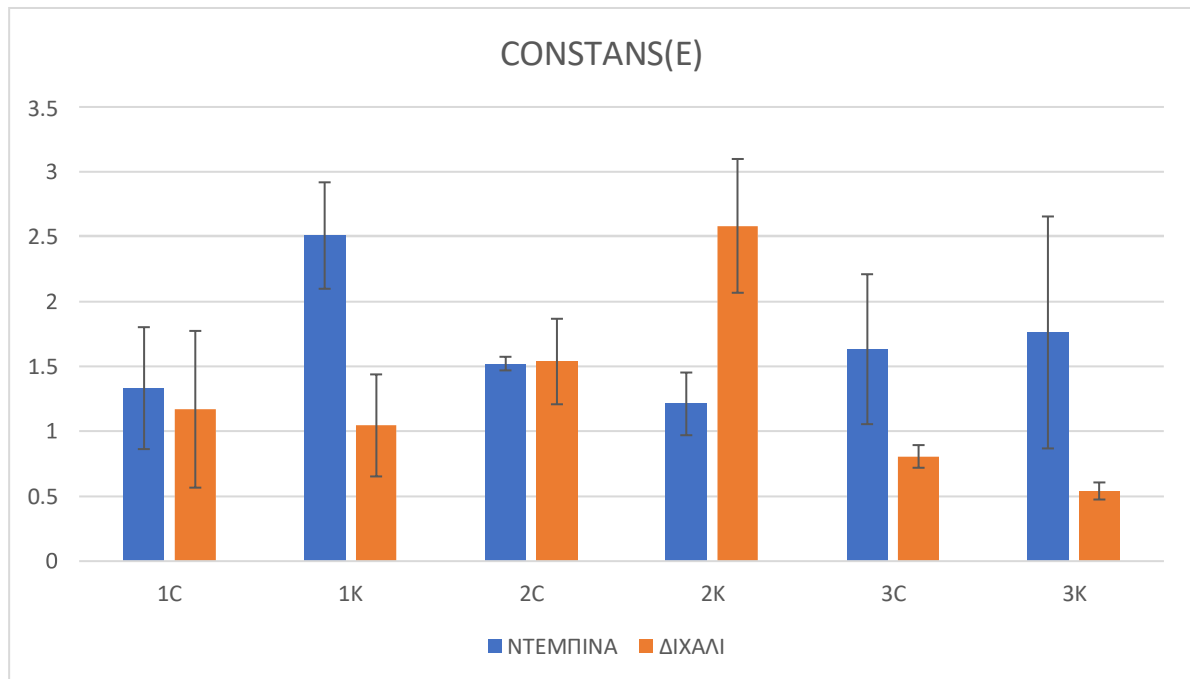
Στα εμβολιασμένα φυτά, η έκφραση του *miRNA159* παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με αυτήν της έκφρασης στα αυτόριζα, σχετικά με την στατιστική σημαντικότητα των διαφορών, όπως καταδεικνύεται από τον Πίνακα 11, αλλά και την Εικόνας 28.

3.5 Έκφραση γονιδίου *CONSTANS*

Μετά qPCR ανάλυση των δειγμάτων του γονιδίου *CONSTANS*, στη συσκευή StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems με βάση τα προαναφερθέντα πρωτόκολλα, και μετά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των επαναλήψεων της διαδικασίας, προέκυψαν τα εξής στοιχεία, όπως αποτυπώνονται στην Εικόνα 29 για τα αυτόριζα φυτά, και στην Εικόνα 30 για τα εμβολιασμένα.



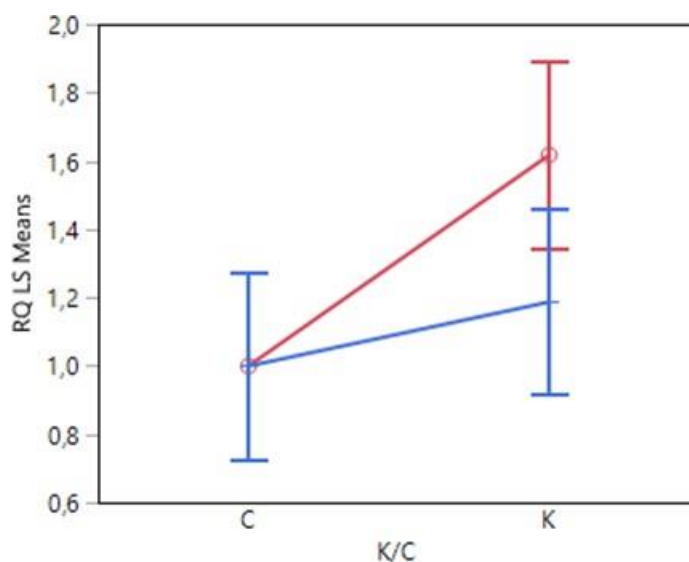
Εικόνα 29: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου *CONSTANS* σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.



Εικόνα 30: Διάγραμμα έκφρασης γονιδίου *CONSTANS* σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.

Τα διαγράμματα έκφρασης του γονιδίου *CONSTANS* αποτυπώνουν ένα αρκετά σταθερό μοτίβο, τόσο στην ποικιλία Ντεμπίνα όσο και στην ποικιλία Διχάλι. Μια ελάχιστη ανοδική τάση αποτυπώνεται τόσο στα αυτόριζα όσο και στα εμβολιασμένα φυτά, κατά τις φάσεις καταπόνησης, παρόλα αυτά το γονίδιο παρουσιάζει σχετικά σταθερή έκφραση.

3.5.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του γονιδίου *CONSTANS*



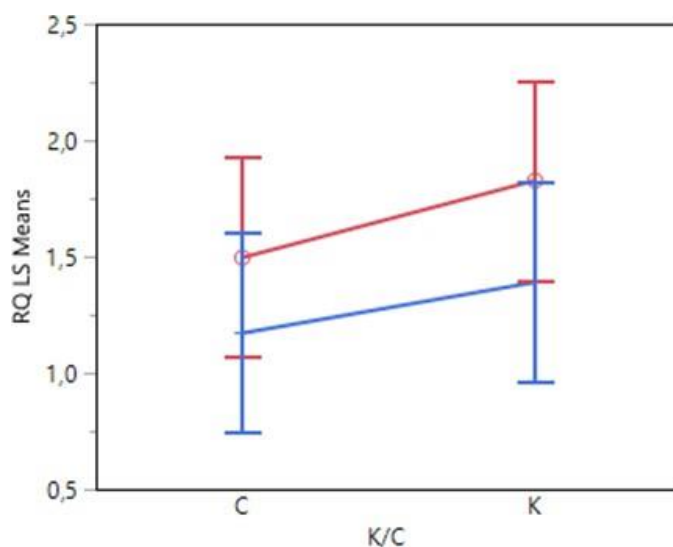
Εικόνα 31: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου *CONSTANS* σε αυτόριζα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows–JMP Pro 14

Πίνακας 12: Διαφορές μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου *CONSTANS* σε αυτόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Level			Least Sq Mean
NT,K	A		1,617667
ΔΙΧ,K	A	B	1,187333
NT,C		B	1
ΔΙΧ,C		B	1

Η έκφραση του γονιδίου *CONSTANS* στα αυτόριζα φυτά, αποτυπώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05, μεταξύ

των καταπονημένων φυτών της ποικιλίας Ντεμπίνα με τα τα φυτά μάρτυρες και της ποικιλίας Ντεμπίνα και της ποικιλίας Διχάλι, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 12.



Εικόνα 32: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του *CONSTANS* σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows–JMP Pro 14

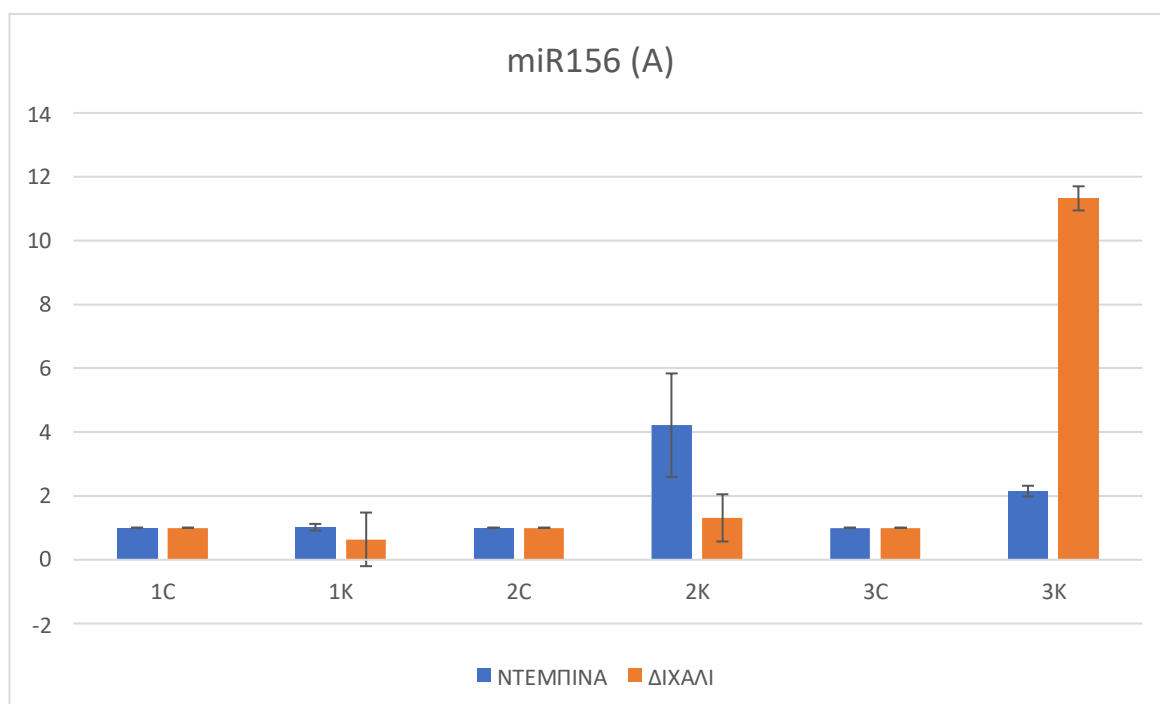
Πίνακας 13: Διαφορές μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του γονιδίου *CONSTANS* σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Level		Least Sq Mean
NT,K	A	1,827667
NT,C	A	1,496167
ΔIX,K	A	1,39
ΔIX,C	A	1,171667

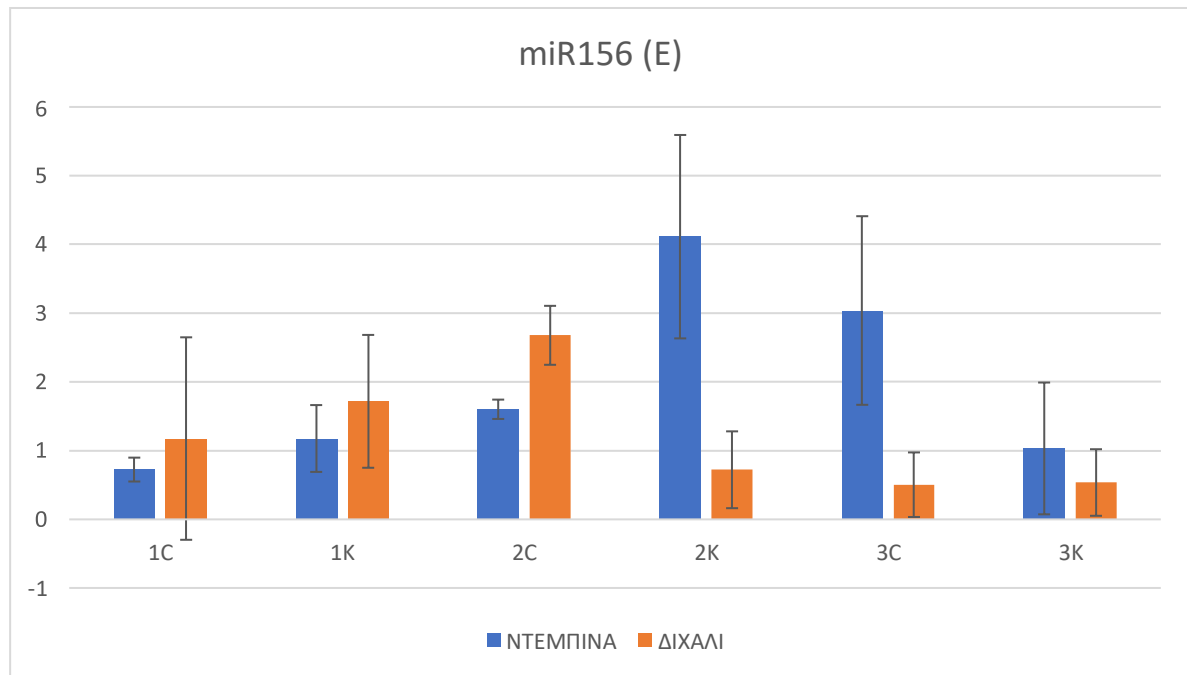
Με βάση τον Πίνακα 13 και το διάγραμμα της Εικόνας 32, η έκφραση του γονιδίου *CONSTANS* στα εμβολιασμένα φυτά, δεν αποτυπώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

3.6 Έκφραση *miRNA156*

Μετά qPCR ανάλυση των δειγμάτων του *miRNA156*, στη συσκευή StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems με βάση τα προαναφερθέντα πρωτόκολλα, και μετά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των επαναλήψεων της διαδικασίας, προέκυψαν τα εξής στοιχεία, όπως αποτυπώνονται στην Εικόνα 33 για τα αυτόριζα φυτά, και στην Εικόνα 34 για τα εμβολιασμένα.



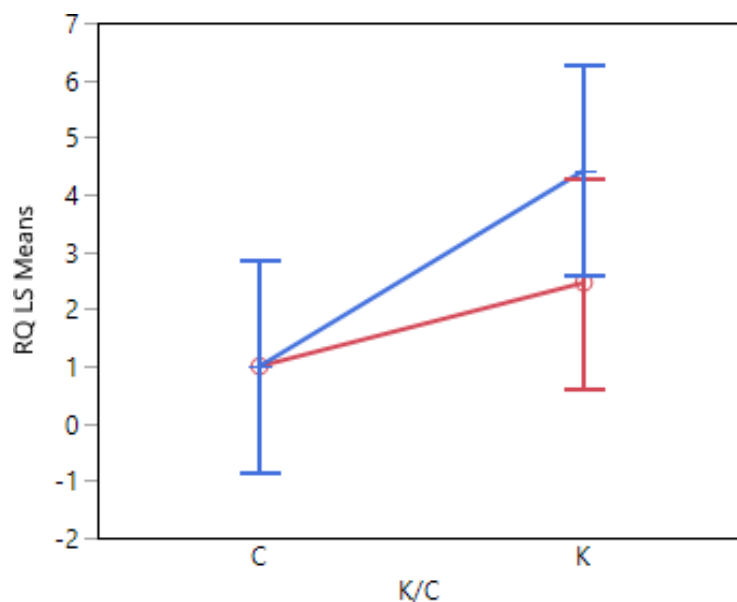
Εικόνα 33: Διάγραμμα έκφρασης του *miRNA156* σε αυτόριζα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.



Εικόνα 34: Διάγραμμα έκφρασης του *miRNA156* σε εμβολιασμένα φυτά των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι.

Το *miRNA156* με βάση τα διαγράμματα έκφρασης, εμφανίζει ένα σχετικά σταθερό προφίλ. Εμφανίζει μια μικρή αύξηση της έκφρασης στην φάση ανάκαμψης του πειράματος στην ποικιλία Ντεμπίνα τόσο στα αυτόριζα όσο και στα εμβολιασμένα φυτά. Στην ποικιλία Διχάλι στα αυτόριζα φυτά εμφανίζεται στην Τρίτη φάση του πειράματος, πολύ μεγάλη αύξηση της έκφρασης, σε αντίθεση με τα εμβολιασμένα φυτά όπου παρουσιάζεται πολύ μικρή μείωση της έκφρασης στην ποικιλία Διχάλι. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά εκδηλώνονται καθώς το *miRNA156* στοχεύει μια σειρά γονιδίων πέραν του σχετικά σταθερής έκφρασης *CONSTANS*.

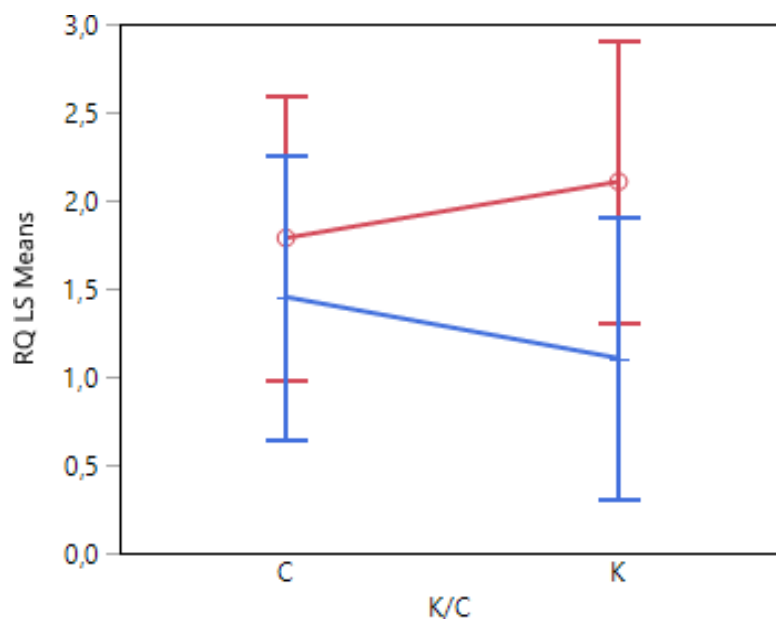
3.6.1 Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης του *miRNA156*



Εικόνα 35: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του *miRNA156* σε αντόριζα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Πίνακας 14: Διαφορές μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του *miRNA156* σε αντόριζα φυτά, σύμφωνα με το με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Level		Least Sq Mean
ΔΙΧ,Κ	A	4,420833
ΝΤ,Κ	A	2,459667
ΔΙΧ,Σ	A	1
ΝΤ,Σ	A	1



Εικόνα 36: Διάγραμμα μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του *miRNA156* σε εμβολιασμένα φυτά. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ποικιλία Ντεμπίνα και με μπλε η ποικιλία Διχάλι. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Πίνακας 15: Διαφορές μέσης τιμή ελάχιστων τετραγώνων των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι για την έκφραση του *miRNA156* σε εμβολιασμένα φυτά, σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Εκ του JMP Home for Windows – JMP Pro 14.

Level		Least Sq Mean
NT,K	A	2,106833
NT,C	A	1,787333
ΔΙΧ,C	A	1,452833
ΔΙΧ,K	A	1,105833

Η έκφραση του *miRNA156* τόσο στα εμβολιασμένα όσο και στα αυτόριζα φυτά, δεν αποτυπώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το με το κριτήριο του Tukey, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05, όπως αποδεικνύεται από τους Πίνακες 14, 15 καθώς και από τις Εικόνες 35,36 σε καμία από τις δύο ποικιλίες.

4. Συζήτηση

Η αμπελοκαλλιέργεια στην Ήπειρο, ειδικά η καλλιέργεια οινοποιήσιμων ποικιλιών αμπέλου, αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό κομμάτι της αγροτικής και της πρωτογενούς παραγωγής της περιοχής. Η κλιματική μεταβλητότητα όμως και οι εντεινόμενες επιδράσεις της στην παραγωγή, δημιουργούν την ανάγκη για μελέτη και κατανόηση των ειδικών χαρακτηριστικών των τοπικών ποικιλιών, που σχετίζονται με την αντίδραση σε αυτές τις επιδράσεις. Πρωτεύοντα ρόλο σε αυτή τη διαδικασία κατέχει η επίδραση της υδατικής καταπόνησης στις ποικιλίες. Σε αυτά τα πλαίσια η συγκεκριμένη μελέτη, ως τμήμα του προγράμματος της Περιφέρειας Ηπείρου με σκοπό τον «ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ, ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΟΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΓΗΓΕΝΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΣ ΗΠΕΙΡΟΥ-Πύρρου Άμπελος», εστιάζει στην μοριακή ανάλυση έπειτα από υδατική καταπόνηση στις ποικιλίες Ντεμπίνα και Διχάλι, που παρουσίασαν ενδιαφέροντα μορφολογικά αποτελέσματα και φυσιολογικά αποτελέσματα και διαφορετικές αποκρίσεις κατά την ελεγχόμενη καταπόνηση τους στο θερμοκήπιο του Τμήματος Αμπέλου-Ινστιτούτο Ελιάς Υποτροπικών φυτών και Αμπέλου-ΕΛΓΟ Δήμητρα, Λυκόβρυση Αττικής. Πιο συγκεκριμένα, η ποικιλία Ντεμπίνα, που αποτελεί καλλιεργητικά την σημαντικότερη ποικιλία της Ηπείρου, παρουσίασε στις μορφολογικές μετρήσεις μια σαφή πτώση του ρυθμού ανάπτυξης του βλαστού στις καταπονημένες μεταχειρίσεις του πειράματος τόσο στα αυτόριζα όσο και στα εμβολιασμένα φυτά, σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες. Επίσης παρατηρήθηκε συνολικά καλύτερη απόδοση στα εμβολιασμένα φυτά από τι στα αυτόριζα, γεγονός που εκτιμάται ότι αποδίδεται στη δράση του υποκειμένου Richter 110. Η ποικιλία Διχάλι από την άλλη παρουσίασε αξιοσημείωτη αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης υπό την επίδραση της υδατικής καταπόνησης καθώς οι καταπονημένες μεταχειρίσεις παρουσίασαν υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες τόσο σε αυτόριζα όσο και σε εμβολιασμένα φυτά. Και σε αυτήν την ποικιλία τα εμβολιασμένα φυτά έδειξαν υψηλότερη αντοχή και κατ' επέκταση υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης του βλαστού από τα αυτόριζα.

Με βάση τα παραπάνω πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση ώστε να βρεθεί πιθανή συσχέτιση μεταξύ επιγενετικής και η γενετικής έκφρασης micro-RNAs και γονιδίων στόχων με τις μορφολογικές μετρήσεις. Ως σημείο αναφοράς και αναζήτησης miRNAs και των γονιδίων στόχων τους στο αμπέλι, που να σχετίζονται με την υδατική καταπόνηση, χρησιμοποιήθηκε σχετική μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2017 από την Chiara Pagliarani και την ερευνητική της ομάδα (Pagliarani et al., 2017). Με βάση την παραπάνω μελέτη επιλέχθηκαν τα micro-RNAs *miRNA159* και *miRNA156* και τα γονίδια στόχοι *VvMYB101*, *VvGATA-26 like*, *VvTOPLESS-4*

like και *VvCONSTANS-5* αντίστοιχα. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης έγινε με την μέθοδο της Real-Time PCR.

Η σχέση της ανάπτυξης του φυτού με την υδατική καταπόνηση, αλλά και η αντίδραση στην καταπόνηση, ρυθμίζεται εν μέρη μέσω μιας σειράς μονοπατιών που σχετίζονται με την υπερεκφράση ή την υποέκφραση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, που ρυθμίζουν με τη σειρά τους βιοχημικές και μοριακές διεργασίες απόκρισης στην καταπόνηση. Οι οικογένειες γονιδίων *MYB*, *GATA*, *TOPLESS*, *CONSTANS* αποτελούν ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Τα γονίδια που εντάσσονται στις παραπάνω οικογένειες δεν είναι γονίδια απόκρισης στην υδατική καταπόνηση (stress responsive genes), ακόμα και αν παρουσιάζουν και δευτερεύουσες λειτουργίες αυτού του τύπου ορισμένες φορές. Είναι όμως γονίδια κομβικής σημασίας για την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών, που η έκφραση τους μεταβάλλεται ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Κατ' επέκταση παρουσιάζεται σημαντική συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών, άρα και της αύξησης και της ανάπτυξης των συγκεκριμένων ποικιλιών αμπέλου, με τις εντεινόμενες επιδράσεις της κλιματικής μεταβλητότητας, άρα και η μελέτη της έκφρασης αυτών αλλά και των miRNAs που τα στοχεύουν αποκτά ιδιαίτερη αξία υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες.

Η έκφραση του *MYB* γονιδίου στην ποικιλία Διχάλι παρουσιάζεται αυξημένη στα καταπονημένα φυτά και είναι η τάση που αποτυπώνεται πιο ξεκάθαρα στα αυτόριζα φυτά. Αντίθετα η ποικιλία Ντεμπίνα παρουσιάζει μια χαμηλή σχετική έκφραση (υποέκφραση) του γονιδίου. Σε αντίστοιχη πρόσφατη μελέτη, επισημάνθηκε ότι μέλος της οικογένειας γονιδίων *MYB*, απομονωμένο από φύλλα αμπέλου, εκφράστηκε έως και 25 φορές περισσότερο σε φυτά που έχουν υποστεί υδατική καταπόνηση (Zhu et al., 2022). Παράλληλα η ίδια μελέτη αποτυπώνει σαφή συσχέτιση της αύξησης της αντοχής στην καταπόνηση και της υπερέκφρασης του *MYB* γονιδίου. Ακόμα σε διαγονιδιακά φυτά *Nicotiana benthamiana* L παρατηρήθηκε ότι τα καταπονημένα φυτά παρουσίασαν σαφώς χαμηλότερα ποσοστά μαρασμού των φύλλων, έως και 30% λιγότερο, καθώς και χαμηλότερη σχετική ηλεκτραγωγιμότητα, άρα και υψηλότερη αντοχή στην υδατική καταπόνηση, σε σχέση με τα φυτά που δεν φέρουν το γονίδιο. Τέλος στην ίδια μελέτη παρουσιάζεται υψηλότερη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος καθώς και υψηλότερη ικανότητα αξιοποίησης της διαθέσιμης εδαφικής υγρασίας στα φυτά που φέρουν το *MYB* γονίδιο (Zhu et al., 2022). Τα *MYB* γονίδια ρυθμίζουν κατά την έκφραση τους την λειτουργία αντιοξειδωτικών ενζύμων που οδηγούν μεταξύ άλλων και στον περιορισμό των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), με αποτέλεσμα την αύξηση της αντοχής στην καταπόνηση (Zhao et al., 2017). Με βάση σχετική μελέτη δημοσιευμένη το 2021, από τον Wang W και την ερευνητική του ομάδα, η αύξηση της

συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών ενζύμων, ρυθμιζόμενη από μεταγραφικούς παράγοντες και γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο όπως τα *MYB*, τα οποία εμπλέκονται και στη σύνθεση φυτοορμονών, αποτελεί πιθανώς στοιχείο επιτυχούς απόκρισης σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης (W. Wang et al., 2021). Με βάση τα παραπάνω αναδεικνύεται η πιθανή σχέση της ρυθμιστικής λειτουργίας των γονιδίων της οικογένειας *MYB* στην αύξηση και την ανάπτυξη, με την απόκριση στην υδατική καταπόνηση. Η πιθανή αυτή σχέση δείχνει να επιβεβαιώνεται από την αυξημένη έκφραση του *VvMYB101* στην ποικιλία Διχάλι, συγκριτικά με την χαμηλότερη έκφραση στην ποικιλία Ντεμπίνα.

Η οικογένεια γονιδίων *GATA* συνδέεται με την ρύθμιση μιας σειράς παραγόντων που ελέγχουν την ανάπτυξη των φυτών, καθώς και με την ρύθμιση φυτοορμονών. Τα συγκεκριμένα γονίδια δεν είναι γονίδια απόκρισης στην υδατική καταπόνηση, άρα και η σχετική βιβλιογραφία που περιγράφει τη σχέση των *GATA* με την υδατική καταπόνηση της αμπέλου είναι εξαιρετικά περιορισμένη. Σύμφωνα με την μελέτη των Behringer & Schwechheimer (2015), τα γονίδια *GATA* εμπλέκονται στην ενεργοποίηση μιας σειράς γονιδίων σχετιζόμενων με τη ρύθμιση της απόκρισης στις αλλαγές της φωτοπεριόδου. Ακόμα διάφορα μέλη της οικογένειας, και παραλλαγές τους, δρουν ως τα βασικά γονίδια για την ρύθμιση της συσσώρευσης της χλωροφύλλης, ενώ αποτελούν κομβικό σημείο στα βιοχημικά μονοπάτια μεταφοράς σήματος που επάγεται από την διαθεσιμότητα νιτρικών, και καταλήγουν να ρυθμίζουν την φωτοσυνθετική ικανότητα (Behringer & Schwechheimer, 2015). Σε συνέχεια των παραπάνω, σχετική μελέτη της LaPlante και της ομάδας της, αναφέρει ότι τα συγκεκριμένα γονίδια ρυθμίζουν την γωνία έκπτυξης του φύλλου σε σχέση με τον βλαστό, αλλά και το σχήμα των φύλλων στην άμπελο (Laplante et al., 2021). Παρόλα αυτά η ρυθμιστική λειτουργία των συγκεκριμένων γονιδίων επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές μεταβολές, άρα και έκφραση τους έμμεσα από την υδατική καταπόνηση. Στην παρούσα μελέτη η έκφραση του γονιδίου *VvGATA-26 like* δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη μεταβολή μεταξύ των καταπονημένων φυτών και των φυτών μαρτύρων, και παρατηρήθηκε μόνο μια μικρή τάση αύξησης στην έκφραση των καταπονημένων αυτόριζων φυτών της ποικιλίας Διχάλι. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και παρόλη τη σημαντικότητα της συγκεκριμένης οικογένειας γονιδίων, μάλλον δεν παρατηρείται σημαντική συμβολή του *VvGATA-26 like*, στην συσχέτιση της υδατικής καταπόνησης και της ανάπτυξης των φυτών στις δύο ποικιλίες της συγκεκριμένης μελέτης.

Το γονίδιο *VvTOPLESS-4 like* και τα αποτελέσματα της έκφρασης του μέσω της qPCR ανάλυσης, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα πλαίσια της συγκεκριμένης έρευνας. Η διαφοροποίηση των δύο ποικιλιών είναι ιδιαίτερα μεγάλη ως προς την έκφραση του γονιδίου. Τα καταπονημένα φυτά της ποικιλίας 'Ντεμπίνα', υπερεκφράζουν το γονίδιο *VvTOPLESS-4*

like σε πολλαπλάσιο βαθμό από κάθε άλλο γονίδιο της έρευνας, και στα αυτόριζα και στα εμβολιασμένα φυτά. Αντίθετα με την ιδιαίτερα σημαντική αύξηση της έκφρασης στην ‘Ντεμπίνα’, στην ποικιλία ‘Διχάλι’ η έκφραση του γονιδίου παρουσιάζει σταθερή έως και ελαφρώς μειωμένη έκφραση στα καταπονημένα φυτά. Η οικογένεια *TOPLESS* δεν σχετίζεται άμεσα με την απόκριση στην υδατική καταπόνηση, και όπως και στην οικογένεια γονιδίων *GATA*, η διαθέσιμη βιβλιογραφία για την άμεση συσχέτιση των δύο είναι εξαιρετικά περιορισμένη. Τα *TOPLESS* γονίδια, καθώς και πρωτεΐνες σχετιζόμενες με αυτά, TPL, TRP αντίστοιχα, αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες αναστολής, η έκφραση των οποίων περιορίζει ή αναστέλλει μια σειρά βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με την παραγωγή φυτοορμονών κρίσιμων για την αύξηση και την ανάπτυξη (A. R. Plant et al., 2021b). Σύμφωνα με σχετική μελέτη των Saini και Nandi, τα γονίδια *TOPLESS* και οι TRP ρυθμίζουν, με βάση τις περιβαλλοντικές επιδράσεις, το βέλτιστο φυτοορμονικό προφίλ ανάπτυξης. Τα *TOPLESS* μαζί με άλλα ρυθμιστικά γονίδια ελέγχουν, μέσω της ρύθμισης του σήματος, την παραγωγή της αυξίνης, της γιββερελλίνης, του ιασμονικού οξέος, της στριγκολακτόνης και άλλων κρίσιμων φυτοορμονών. Η δράση τους στα διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια παραγωγής των περισσότερων φυτοορμονών έχει σχετικά κοινά χαρακτηριστικά. Καταστέλλουν τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος με σκοπό τον περιορισμό της ενεργοποίησης των σημάτων των φυτοορμονών σε καταστάσεις που η παραγωγή τους δεν είναι ωφέλιμη για τον φυτό. Η σημαντικότητα της ρύθμισης των παραπάνω φυτοορμονών από τα *TOPLESS*-γονίδια που αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες αναστολής, αναδεικνύει τη σημασία της εμπλοκής των συγκεκριμένων γονιδίων στην ανάπτυξη των φυτών τόσο υπό κανονικές συνθήκες, αλλά ειδικά υπό συνθήκες καταπόνησης (Saini & Nandi, 2022). Ακόμα μία έρευνα δημοσιευμένη το 2022 από τον Bindics και την ερευνητική του ομάδα, παρουσιάζει, μέσω γενετικών και βιοπληροφορικών αναλύσεων, μια σειρά πρωτεϊνών που συνδέονται και αλληλοεπιδρούν με τα *TOPLESS*, και αποτελούν παράγοντες που παρεμβαίνουν στη μετάδοση σήματος της αυξίνης. Μέσω τεχνικών CRISPR-Cas9 και ανάλυση του στελέχους διαγραφής, αποτυπώνεται η ρυθμιστική σχέση μεταξύ *TOPLESS* και αυξίνης και η σημασία της, καθώς παρουσιάζονται περιπτώσεις όπου οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από *TOPLESS* γονίδια αποτελούν συχνά στόχους εχθρών και βιοτικών καταπονήσεων (Bindics et al., 2022). Κατ’ επέκταση τα *TOPLESS* γονίδια αποτελούν εκ των βασικών ρυθμιστών της σχέσης ανάπτυξης – περιβαλλοντικών επιδράσεων. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία προκύπτει η σημαντικότητα της διαφοράς στην έκφραση του γονιδίου *VvTOPLESS-4 like* μεταξύ των ποικιλιών Ντεμπίνα και Διχάλι, καθώς επίσης πιθανώς να αποτελεί αιτιολόγηση των μεγάλων μορφολογικών διαφορών που παρουσίασαν μετά την καταπόνηση οι δύο ποικιλίες.

Η οικογένεια γονιδίων *CONSTANS* σύμφωνα με μελέτη του Valverde, αποτελεί έναν εκ των βασικών μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την παραγωγή της φυτοορμόνης άνθισης *Flower Locus T*, η οποία προκαλεί διαφοροποίηση των άνθων. Με τον τρόπο αυτό τα *CONSTANS* γονίδια, λαμβάνοντας τα αντίστοιχα περιβαλλοντικά ή εσωτερικά βιοχημικά ερεθίσματα, ρυθμίζουν τον χρόνο και τα χαρακτηριστικά της ανθοφορίας. Τα *CONSTANS* κατ' επέκταση, επιτελούν ρυθμιστικό ρόλο στο φωτοπεριοδικό μονοπάτι που συνδέει τη διάρκεια της ημέρας με την άνθιση (Valverde, 2011). Ακόμα μελέτη της ερευνητικής ομάδας του Liu, καταδεικνύει την πιθανότητα τα γονίδια *CONSTANS* να ρυθμίζουν καθοριστικά και άλλες βιολογικές διεργασίες, πέραν της άνθισης. Συγκεκριμένα μέλη της γονιδιακής οικογένειας, παρατηρήθηκε ότι σχετίζονται με την ρύθμιση της παραγωγικότητας καθώς η υπερέκφραση του γονιδίου συσχετίστηκε με αύξηση της παραγωγής, υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας (Liu et al., 2016b). Με βάση τα παραπάνω η γονιδιακή οικογένεια *CONSTANS* φαίνεται να παρουσιάζει εξαιρετική υψηλή βιολογική σημασία. Στην συγκεκριμένη μελέτη ωστόσο το γονίδιο *VnCONSTANS-5* δεν παρουσίασε κάποια αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στην έκφραση του μεταξύ των δύο ποικιλιών, καθώς παρουσιάζεται σχετικά σταθερή αλλά περιορισμένη αύξηση της έκφρασης στα καταπονημένα φυτά και των δύο ποικιλιών, με μια ελαφρώς αυξημένη τάση στα καταπονημένα φυτά της ποικιλίας Ντεμπίνα. Έτσι παρόλη την βιολογική σημαντικότητα της γονιδιακής οικογένειας στην συγκεκριμένη μελέτη η έκφραση του γονιδίου *VnCONSTANS-5* δεν αποτυπώνει ιδιαίτερα καθοριστικά αποτελέσματα.

Σύμφωνα με την δημοσίευση του 2017 της Pagliarani και της ερευνητικής της ομάδας, στα στοιχεία της οποίας βασίζεται εν μέρη και η συγκεκριμένη μελέτη, το κατά πόσο εμφανίζονται σε αφθονία, καλά συντηρημένα *micro-RNAs*, που σχετίζονται με αβιοτικές καταπονήσεις, εξαρτάται τόσο από την ένταση και τα χαρακτηριστικά της καταπόνησης, όσο και από έναν συνδυασμό παραγόντων που περιλαμβάνει το είδος του φυτού, την ύπαρξη ή όχι εμβολίου και τον συγκεκριμένο φυτικό ιστό. Κατά συνέπεια η έκφραση αλλά και η συμπεριφορά των *micro-RNAs* υπό αντίστοιχες συνθήκες καταπόνησης μπορεί να διαφέρει ανάμεσα σε ένα φυτό μοντέλο και σε άλλο υπό μελέτη είδος (Pagliarani et al., 2017). Δύο μελέτες του 2018, των Luo M και Wang C και των ομάδων τους, ανέδειξαν τα *miRNA156* και *miRNA159*, ως *micro RNAs* σχετιζόμενα με την υδατική καταπόνηση (Luo et al., 2018; C. Wang et al., 2018). Στην μελέτη της Pagliarani παρουσιάζεται ρυθμιστική σχέση μεταξύ του εξαιρετικά άφθονου και συντηρημένου *miRNA156* που σχετίζεται με την ρύθμιση της άνθισης και μεταξύ άλλων γονιδίων στοχεύει το *VnCONSTANS-5*, και του *miRNA159* το οποίο παρουσιάζει αντιστρόφως ανάλογη έκφραση σε σχέση με τους στόχους του, τα γονίδια *VnMYB101*, *VnGATA-26 like*,

VnTOPLESS-4 like. Ακόμα η εντεινόμενη υδατική καταπόνηση εμφανίζει μειωμένη έκφραση των δύο αυτών micro-RNA. Η έκφραση των miRNA156 και miRNA159, παρουσιάστηκε μειωμένη στα καταπονημένα φυτά αμπέλου, στοιχείο που διαφοροποιεί την έκφραση και την λειτουργία των συγκεκριμένων micro-RNA, στα φυτά της αμπέλου σε σχέση με το φυτό μοντέλο της αραβίδουψης (*Arabidopsis thaliana*) (Pagliarani et al., 2017). Τα συγκεκριμένα στοιχεία βρίσκονται σε ισορροπία με τα αποτελέσματα των qPCR αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η έκφραση του *miRNA156* παρουσιάζεται σχετικά αυξημένη στα καταπονημένα φυτά της ποικιλίας Ντεμπίνα σε σχέση με την ποικιλία Διχάλι, χαρακτηριστικό το οποίο αν και δεν αποτυπώνει κάποια συγκεκριμένη τάση μπορεί να σχετίζεται με τα μορφολογικά αποτελέσματα της ποικιλίας, ως προς την αντοχή στην υδατική καταπόνηση. Η έλλειψη άμεσης συσχέτισης της έκφρασης του *miRNA156* με τα αποτελέσματα της έκφρασης του γονιδίου *VnCONSTANS-5*, πιθανώς να αιτιολογείται στην βάση του μεγάλους εύρους των γονιδίων που στοχεύει το συγκεκριμένο micro-RNA, και δεν συμπεριλαμβάνονται στην μελέτη. Η ανάλυση της έκφρασης του *miRNA159* αποτυπώνει ενδιαφέροντα αποτελέσματα καθώς υπάρχει σαφής υπερέκφραση του micro-RNA στα εμβολιασμένα φυτά, τα οποία πιθανώς λόγω της επίδρασης του υποκειμένου Richter 110, εμφανίζουν υψηλότερη αντοχή. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό βρίσκεται σε αντιπαράβολη με τα γονίδια στόχους του συγκεκριμένου micro-RNA, τα οποία αποτυπώνουν υψηλότερη έκφραση στα αυτόριζα φυτά. Ακόμα το μοτίβο έκφρασης του είναι αντιστρόφως ανάλογο με του γονιδίου *VnTOPLESS-4 like*, που παρουσιάζει το πιο έντονο και χαρακτηριστικό μοτίβο έκφρασης από τα γονίδια στόχους, και αποτελεί την πιο ξεκάθαρη αποτύπωση της ρυθμιστικής σύνδεσης που διέπει αυτό και το *miRNA159*. Τα παραπάνω στοιχεία βρίσκονται σε συμφωνία με τα συμπεράσματα της μελέτη της Pagliarani, και πιθανώς να αιτιολογούν και τις μορφολογικές μετρήσεις των δύο ποικιλιών.

Συμπερασματικά:

- Τα εμβολιασμένα φυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή στην υδατική καταπόνηση σε σχέση με τα αυτόριζα, πιθανόν εξαιτίας της επίδρασης του υποκειμένου Richter110
- Και στις δύο ποικιλίες, η έκφραση των γονιδίων είναι σαφώς πιο αυξημένη στα αυτόριζα, σε σχέση με τα εμβολιασμένα φυτά που παρουσιάζουν πιο χαμηλή και σταθερή έκφραση.
- Το σταθερό και χαμηλό μοτίβο έκφρασης των γονιδίων *VnGATA-26 like* και *VnCONSTANS-5* αποτυπώνει ότι ενώ τα συγκεκριμένα γονίδια παρουσιάζουν υψηλή

βιολογική σημασία, στην συγκεκριμένη μελέτη, δεν επιτελούν καθοριστικό ρόλο στη συσχέτιση της ανάπτυξης των φυτών υπο συνθήκες υδατικής καταπόνησης.

- Το *VnMYB101* γονίδιο παρουσιάζει μια σχετικά αυξημένη έκφραση στην ποικιλία Διχάλι, σε σχέση με την ποικιλία Ντεμπίνα στα καταπονημένα φυτά, ιδιαίτερα στα αυτόριζα.
- Το *miRNA156* ρυθμίζει σειρά γονιδίων σχετιζόμενων κυρίως με την άνθιση, ένα εκ των οποίων είναι το *VnCONSTANS-5*. Κατά συνέπεια δεν μπορούν να παραχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη ρυθμιστική σχέση του συγκεκριμένου micro-RNA μόνο από τη μελέτη της έκφρασης του *VnCONSTANS-5*.
- Το *miRNA159* παρουσιάζει ένα σαφές μοτίβο έκφρασης, υψηλότερο στα εμβολιασμένα φυτά, και η έκφραση του συμβαδίζει με την έκφραση των γονιδίων στόχων του, ειδικά με την έκφραση του *VnTOPLESS-4 like*.
- Το γονίδιο *VnTOPLESS-4 like* παρουσιάζει εξαιρετικά χαρακτηριστικό μοτίβο έκφρασης. Η αξιοσημείωτα υψηλότερη έκφραση του στα καταπονημένα φυτά της ποικιλίας 'Ντεμπίνα', σε σχέση με την ποικιλία 'Διχάλι', που πιθανώς να αιτιολογεί τις μορφολογικές διαφορές των δύο ποικιλιών υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, καθώς και η ρυθμιστική σχέση που παρουσιάζει με το *miRNA159*, το καθιστούν ως το κομβικό γονίδιο, μεταξύ όσων μελετήθηκαν, για την επιτυχημένη αποκρίση της ποικιλίας 'Διχάλι' στην υδατική καταπόνηση. Με βάση τα παραπάνω, η μελέτη της δράσης του γονιδίου, αλλά και συνολικά της γονιδιακής οικογένειας *TOPLESS* υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, και σε άλλες ποικιλίες αμπέλου, μπορεί να δώσει νέα στοιχεία για τους μηχανισμούς απόκρισης στην συγκεκριμένη καταπόνηση.
- Η ποικιλία 'Διχάλι' παρουσιάζει τόσο με βάση τις μορφολογικές μετρήσεις, όσο και με τις μοριακές αναλύσεις, αξιοσημείωτη αντίδραση στην υδατική καταπόνηση. Σε αντίθεση με την ποικιλία 'Ντεμπίνα', τα καταπονημένα φυτά της ποικιλίας 'Διχάλι' παρουσίασαν σταθερό ρυθμό ανάπτυξης αντίστοιχο με αυτό των μαρτύρων. Ακόμα η ποικιλία 'Διχάλι' παρουσίασε υψηλότερη έκφραση των ρυθμιστικών γονιδίων που μελετήθηκαν, εκτός από το παράγοντα αναστολής *TOPLESS*, ο οποίος παρουσίασε πολλαπλάσια έκφραση στην ποικιλία 'Ντεμπίνα'. Τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά καθιστούν την ποικιλία Διχάλι ιδανικό υποψήφιο για μελέτες που σχετίζονται με τα

μοριακά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της απόκρισης στην υδατική καταπόνηση, αλλά και συμβάλλουν στην περεταίρω αξιοποίηση της σε βελτιωτικά προγράμματα και σε εμπορική κλίμακα.

Παράρτημα

Παρατίθενται αναλυτικά τα Ct κάθε δείγματος κάθε γονιδίου, και των δύο ποικιλιών, μετά την qPCR ανάλυση των δειγμάτων, στη συσκευή StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems, καθώς και τα ΔΔCt που προέκυψαν από αυτά, τα οποία συνεισέφεραν στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Sample Name	Gene	Average Experimental CT Value	Average Experimental CT Value
		TE K gene	HE K act
		ΝΤΕΜΠΙΝΑ	ΝΤΕΜΠΙΝΑ
1A	MYB	30,1405	20,75217
1E	MYB	30,47517	20,73383
2A	MYB	30,55967	20,6695
2E	MYB	30,63	20,9905
3A	MYB	29,2844	21,3215
3E	MYB	31,8075	21,4306
1A	GATA	25,82233	20,68983
1E	GATA	25,19017	20,07217
2A	GATA	27,11733	24,51
2E	GATA	25,94417	20,33933
3A	GATA	25,88217	20,88733
3E	GATA	26,4492	20,63733
1A	TOPLESS	28,48867	20,4035
1E	TOPLESS	27,83283	20,08633
2A	TOPLESS	31,1926	23,77183
2E	TOPLESS	26,46	18,96467
3A	TOPLESS	28,487	20,54517
3E	TOPLESS	28,8388	20,5676
1A	miR159	27,3916	17,0976
1E	miR159	28,5284	15,4465
2A	miR159	31,33733	25,23867
2E	miR159	33,11533	23,164
3A	miR159	36,66367	30,87817
3E	miR159	27,4185	18,8835
1A	CONSTANS	22,54117	21,036
1E	CONSTANS	22,80983	21,69767

2A	CONSTANS	23,0404	20,649
2E	CONSTANS	22,717	20,05567
3A	CONSTANS	23,0824	20,47467
3E	CONSTANS	22,9135	20,6605
1A	mir156	30,50367	21,6068
1E	mir156	31,219	22,2455
2A	mir156	33,89933	26,93267
2E	mir156	33,8588	26,35433
3A	mir156	36,8215	30,9418
3E	mir156	29,3862	20,13783

ΔΙΧΑΛΙ	ΔΙΧΑΛΙ	ΔΙΧΑΛΙ	ΔΙΧΑΛΙ
---------------	---------------	---------------	---------------

1A	MYB	29,9834	20,772
1E	MYB	29,4885	20,72583
2A	MYB	29,81167	20,47167
2E	MYB	30,93267	22,553
3A	MYB	29,15717	20,59883
3E	MYB	31,37183	21,5312
1A	GATA	25,37233	20,71917
1E	GATA	26,25483	21,13533
2A	GATA	25,45733	20,4375
2E	GATA	27,6265	23,089
3A	GATA	25,32267	21,12933
3E	GATA	27,23633	21,8555
1A	TOPLESS	26,42	20,63283
1E	TOPLESS	28,31267	20,88317
2A	TOPLESS	25,70383	20,24483
2E	TOPLESS	28,68867	22,6312
3A	TOPLESS	26,173	20,97217
3E	TOPLESS	29,3315	21,90217
1A	miR159	31,1265	19,51
1E	miR159	30,20133	20,1656
2A	miR159	30,785	18,5485
2E	miR159	32,1308	16,91283
3A	miR159	31,403	19,81425
3E	miR159	31,89017	19,2118
1A	CONSTANS	22,1554	21,8644
1E	CONSTANS	23,0268	21,8188
2A	CONSTANS	22,5482	20,74787
2E	CONSTANS	22,9692	22,65567
3A	CONSTANS	22,45733	21,0576
3E	CONSTANS	24,9046	22,6688
1A	mir156	29,4368	16,595
1E	mir156	29,4765	17,37533
2A	mir156	29,21075	17,1146
2E	mir156	29,7965	16,13267
3A	mir156	25,41267	19,166
3E	mir156	30,86025	18,9855

Sample Name	Gene	Average Control CT Value	Average Control CT Value
		TC C gene	HC C act
ΝΤΕΜΠΙΝΑ	ΝΤΕΜΠΙΝΑ	ΝΤΕΜΠΙΝΑ	ΝΤΕΜΠΙΝΑ
1A	MYB	31,34683	22,70783
1E	MYB	30,71283	20,68967
2A	MYB	29,48483	20,38433
2E	MYB	29,879	20,77117
3A	MYB	30,79283	22,3225
3E	MYB	29,32483	22,225
1A	GATA	26,5255	21,804
1E	GATA	25,6875	20,71883
2A	GATA	25,40633	20,16567
2E	GATA	25,58933	20,13233
3A	GATA	26,83683	22,43317
3E	GATA	25,29767	20,902
1A	TOPLESS	28,96617	21,13933
1E	TOPLESS	27,6142	20,5066
2A	TOPLESS	28,551	19,69233
2E	TOPLESS	29,09433	20,39433
3A	TOPLESS	34,42783	22,66017
3E	TOPLESS	25,566	20,5872
1A	miR159	27,3955	17,6085
1E	miR159	29,89	19,3868
2A	miR159	30,4252	19,34125
2E	miR159	28,6536	19,00133
3A	miR159	30,61433	21,961
3E	miR159	29,25333	21,19833
1A	CONSTANS	24,0344	21,49383
1E	CONSTANS	22,09983	20,03867
2A	CONSTANS	23,35567	20,2815
2E	CONSTANS	22,45917	19,85517
3A	CONSTANS	24,3868	21,35767
3E	CONSTANS	22,4785	21,336
1A	mir156	30,53967	21,3985
1E	mir156	30,39025	20,7605
2A	mir156	33,413	20,266
2E	mir156	30,757	20,50325
3A	mir156	31,07	23,6896
3E	mir156	29,76375	25,32225
ΔΙΧΑΛΙ	ΔΙΧΑΛΙ	ΔΙΧΑΛΙ	ΔΙΧΑΛΙ
1A	MYB	30,6154	22,0885
1E	MYB	31,25883	20,61967
2A	MYB	28,96283	20,105
2E	MYB	28,454	19,53217
3A	MYB	30,83567	20,83667

3E	MYB	31,09567	21,8115
1A	GATA	26,908	22,6435
1E	GATA	25,6775	20,87783
2A	GATA	25,0598	20,307
2E	GATA	25,61867	19,943
3A	GATA	25,6418	20,7925
3E	GATA	26,96267	22,06867
1A	TOPLESS	29,0615	22,22967
1E	TOPLESS	26,67233	20,69217
2A	TOPLESS	25,6835	19,06583
2E	TOPLESS	26,49825	20,35525
3A	TOPLESS	26,28483	20,5985
3E	TOPLESS	28,6	21,9215
1A	miR159	32,4822	17,05267
1E	miR159	30,609	17,7432
2A	miR159	30,54733	17,2028
2E	miR159	30,86967	18,9116
3A	miR159	31,44925	15,994
3E	miR159	30,4866	20,755
1A	CONSTANS	23,529	22,35633
1E	CONSTANS	22,4408	21,3766
2A	CONSTANS	22,08633	20,939
2E	CONSTANS	20,8146	20,3834
3A	CONSTANS	22,9465	21,7506
3E	CONSTANS	23,8338	22,1878
1A	mir156	26,755	16,7195
1E	mir156	28,6225	17,1898
2A	mir156	30,0768	17,1288
2E	mir156	29,262	18,30567
3A	mir156	27,73825	16,1585
3E	mir156	31,1055	19,768

Sample Name	Gene	ΔCt Value (Experimental)	ΔCt Value (Control)	Delta Delta Ct Value	Expression Fold Change
		ΔCTE	ΔCTC	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
NTEMPINA	NTEMPINA	NTEMPINA	NTEMPINA	NTEMPINA	NTEMPINA
1A	MYB	9,388333	8,639	0,749333	0,594878
1E	MYB	9,741333	10,02317	-0,28183	1,215739
2A	MYB	9,890167	9,1005	0,789667	0,578478
2E	MYB	9,6395	9,107833	0,531667	0,691755
3A	MYB	7,9629	8,470333	-0,50743	1,421519

3E	MYB	10,3769	7,099833	3,277067	0,103158
1A	GATA	5,1325	4,7215	0,411	0,752102
1E	GATA	5,118	4,968667	0,149333	0,901667
2A	GATA	2,607333	5,240667	-2,63333	6,204579
2E	GATA	5,604833	5,457	0,147833	0,902605
3A	GATA	4,994833	4,403667	0,591167	0,663806
3E	GATA	5,811867	4,395667	1,4162	0,374698
1A	TOPLESS	8,085167	7,826833	0,258333	0,836053
1E	TOPLESS	7,7465	7,1076	0,6389	0,642202
2A	TOPLESS	7,420767	8,858667	-1,4379	2,709262
2E	TOPLESS	7,495333	8,7	-1,20467	2,30484
3A	TOPLESS	7,941833	11,76767	-3,82583	14,18047
3E	TOPLESS	8,2712	4,9788	3,2924	0,102068
1A	miR159	10,294	9,787	0,507	0,703684
1E	miR159	13,0819	10,5032	2,5787	0,167392
2A	miR159	6,098667	11,08395	-4,98528	31,67523
2E	miR159	9,951333	9,652267	0,299067	0,812778
3A	miR159	5,7855	8,653333	-2,86783	7,299681
3E	miR159	8,535	8,055	0,48	0,716978
1A	CONSTANS	1,505167	2,540567	-1,0354	2,049682
1E	CONSTANS	1,112167	2,061167	-0,949	1,930534
2A	CONSTANS	2,3914	3,074167	-0,68277	1,605215
2E	CONSTANS	2,661333	2,604	0,057333	0,961039
3A	CONSTANS	2,607733	3,029133	-0,4214	1,339227
3E	CONSTANS	2,253	1,1425	1,1105	0,463133
1A	mir156	8,896867	9,141167	-0,2443	1,184518
1E	mir156	8,9735	9,62975	-0,65625	1,575981
2A	mir156	6,966667	13,147	-6,18033	72,52132
2E	mir156	7,504467	10,25375	-2,74928	6,72383
3A	mir156	5,8797	7,3804	-1,5007	2,8298
3E	mir156	9,248367	4,441504	4,806862	0,035726
ΔΙΧΑΛΙ	ΔΙΧΑΛΙ	ΔΙΧΑΛΙ	ΔΙΧΑΛΙ	ΔΙΧΑΛΙ	ΔΙΧΑΛΙ
1A	MYB	9,2114	8,5269	0,6845	0,622221
1E	MYB	8,762667	10,63917	-1,8765	3,671832
2A	MYB	9,34	8,857833	0,482167	0,715902
2E	MYB	8,379667	8,921833	-0,54217	1,456158
3A	MYB	8,558333	9,999	-1,44067	2,714463
3E	MYB	9,840633	9,284167	0,556467	0,679965
1A	GATA	4,653167	4,2645	0,388667	0,763835
1E	GATA	5,1195	4,799667	0,319833	0,801162
2A	GATA	5,019833	4,7528	0,267033	0,831027
2E	GATA	4,5375	5,675667	-1,13817	2,201011
3A	GATA	4,193333	4,8493	-0,65597	1,575671
3E	GATA	5,380833	4,894	0,486833	0,71359
1A	TOPLESS	5,787167	6,831833	-1,04467	2,06289
1E	TOPLESS	7,4295	5,980167	1,449333	0,366191
2A	TOPLESS	5,459	6,617667	-1,15867	2,23251
2E	TOPLESS	6,057467	6,143	-0,08553	1,06108
3A	TOPLESS	5,200833	5,686333	-0,4855	1,400071
3E	TOPLESS	7,429333	6,6785	0,750833	0,59426

1A	miR159	11,6165	15,42953	-3,81303	14,05521
1E	miR159	10,03573	12,8658	-2,83007	7,11107
2A	miR159	12,2365	13,34453	-1,10803	2,155516
2E	miR159	15,21797	11,95807	3,2599	0,104393
3A	miR159	11,58875	15,45525	-3,8665	14,58587
3E	miR159	12,67837	9,7316	2,946767	0,129698
1A	CONSTANS	0,291	1,172667	-0,88167	1,842503
1E	CONSTANS	1,208	1,0642	0,1438	0,905132
2A	CONSTANS	1,800333	1,147333	0,653	0,635957
2E	CONSTANS	0,313533	0,4312	-0,11767	1,084979
3A	CONSTANS	1,399733	1,1959	0,203833	0,868241
3E	CONSTANS	2,2358	1,646	0,5898	0,664435
1A	mir156	12,8418	10,0355	2,8063	0,142962
1E	mir156	12,10117	11,4327	0,668467	0,629175
2A	mir156	12,09615	12,948	-0,85185	1,804814
2E	mir156	13,66383	10,95633	2,7075	0,153095
3A	mir156	6,246667	11,57975	-5,33308	40,31049
3E	mir156	11,87475	11,3375	0,53725	0,689083

Βιβλιογραφία

Ελληνική Βιβλιογραφία

Γαλάτης Β., Γανιωτάκης Δ., Γκάνη-Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε.Ι., Μανέττας Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ.Α., 2009. Φυσιολογία φυτών, από το μόριο στο περιβάλλον. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Ελληνική Στατιστική Αρχή. 2020. Έρευνα Αμπελουργικών Καλλιεργειών

Καραμπουρνιώτης Α.Γ., Λιακόπουλος Γ, Νικολόπουλος Δ. 2012. Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών. Έμβρυο.

Μυλωνά Φ., 2017. Τράπεζα Γενετικού Υλικού: Διατήρηση και αξιοποίηση της γενετικής ποικιλότητας Περιοδικό Δήμητρα. Τεύχος 20. σελ 4

Νικολάου Α.Ν. 2011. Αμπελουργία. Σύγχρονη παιδεία.

Νικολάου Α.Ν. 2012. Αμπελογραφία. Σύγχρονη παιδεία.

Νικολάου Ν.Α., 2012. Τεχνικές καλλιέργειας της αμπέλου. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Σταυρακάκης Μ., 2013, Αμπελουργία, Τροπή

Τσουμάνης Σ., 2018, Η Αμπελοκαλλιέργεια στο Νομό Πρέβεζας, Πτυχιακή εργασία, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής, ΤΕΙ Ηπείρου

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell*, 15(1), 63–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.006130>

- Alatzas, A., Theocharis, S., Miliordos, D. E., Leontaridou, K., Kanellis, A. K., Kotseridis, Y., Hatzopoulos, P., & Koundouras, S. (2021). The effect of water deficit on two greek vitis vinifera l. Cultivars: Physiology, grape composition and gene expression during berry development. *Plants*, *10*(9). <https://doi.org/10.3390/plants10091947>
- Asefpour Vakilian, K. (2020). Machine learning improves our knowledge about miRNA functions towards plant abiotic stresses. *Scientific Reports*, *10*(1), 3041. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59981-6>
- Banilas, G., Korkas, E., Kaldis, P., & Hatzopoulos, P. (2009). Olive and Grapevine Biodiversity in Greece and Cyprus – A Review. In *Sustainable agriculture reviews* (Vol. 2, pp. 401–428). https://doi.org/10.1007/978-90-481-2716-0_14
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, *431*(7006), 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature02874>
- Behringer, C., & Schwechheimer, C. (2015). B-GATA transcription factors – insights into their structure, regulation, and role in plant development. *Frontiers in Plant Science*, *6*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00090>
- Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhatar, R., & Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes and Development*, *23*(7), 781–783. <https://doi.org/10.1101/gad.1787609>
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, *409*(6818), 363–366. <https://doi.org/10.1038/35053110>
- Bindics, J., Khan, M., Uhse, S., Kogelmann, B., Baggely, L., Reumann, D., Ingole, K. D., Stirnberg, A., Rybecky, A., Darino, M., Navarrete, F., Doehlemann, G., & Djamei, A. (2022). Many ways to TOPLESS – manipulation of plant auxin signalling by a cluster of fungal effectors. *New Phytologist*, *236*(4), 1455–1470. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.18315>
- Brush, S. (2000). Genes in the Field. On-Farm Conservation of Crop Diversity. *SERBIULA (Sistema Librum 2.0)*.

- Causier, B., Lloyd, J., Stevens, L., & Davies, B. (2012). TOPLESS co-repressor interactions and their evolutionary conservation in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 325–328. <https://doi.org/10.4161/psb.19283>
- CHAVES, M. M. (1991). Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 42(1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/jxb/42.1.1>
- Chaves, M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, M., Santos, T., Regalado, A., Rodrigues, M., & Lopes, C. (2010). Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of Botany*, 105, 661–676. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq030>
- Duan, Z. Y., Cai, G. Y., Li, J. J., Bu, R., Wang, N. N., Yin, P., & Chen, X. M. (2018). U6 can be used as a housekeeping gene for urinary sediment miRNA studies of IgA nephropathy. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29297-7>
- Dubey, R., Prabhakar, D. P., & Gupta, J. (2022). Epigenetics: key to improve delayed wound healing in type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 477, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04285-0>
- Dupont, C., Armant, D. R., & Brenner, C. A. (2009). Epigenetics: Definition, mechanisms and clinical perspective. In *Seminars in Reproductive Medicine* (Vol. 27, Issue 5, pp. 351–357). <https://doi.org/10.1055/s-0029-1237423>
- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, S., Ihsan, M. Z., Alharby, H., Wu, C., Wang, D., & Huang, J. (2017). Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01147>
- Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., & Siddique, K. (2012). Drought Stress in Plants: An Overview. In *Plant responses to drought stress* (pp. 1–33). https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_1
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J., Sampol, B., & Medrano, H. (2002). Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: An evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology - FUNCT PLANT BIOL*, 29. <https://doi.org/10.1071/PP01119>

- Garnier, N., & Valamoti, S. M. (2016). Prehistoric wine-making at Dikili Tash (Northern Greece): Integrating residue analysis and archaeobotany. *Journal of Archaeological Science*, 74, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2016.03.003>
- Gary, R. (2001). Glimpses of a Tiny RNA World. *Science*, 294(5543), 797–799. <https://doi.org/10.1126/science.1066315>
- Gelaw, T. A., & Sanan-Mishra, N. (2021). Non-coding RNAs in response to drought stress. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222212519>
- Hartmann Kester Dale E., H. T. (1975). *Plant propagation; principles and practices*. Prentice-Hall.
- Hrmova, M., & Hussain, S. S. (2021). Plant transcription factors involved in drought and associated stresses. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22115662>
- Kim, J.-M., Sasaki, T., Ueda, M., Sako, K., & Seki, M. (2015). Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00114>
- Kim, J.-S., Lim, J. Y., Shin, H., Kim, B.-G., Yoo, S.-D., Kim, W. T., & Huh, J. H. (2019). ROS1-Dependent DNA Demethylation Is Required for ABA-Inducible NIC3 Expression. *Plant Physiology*, 179(4), 1810–1821. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01471>
- Korres, N., Norsworthy, J., Tehranchian, P., Gitsopoulos, T., Loka, D., Oosterhuis, D., Gealy, D., Moss, S., Burgos, N., Miller, M., & Palhano, M. (2016). Cultivars to face climate change effects on crops and weeds. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36. <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0350-5>
- Laplante, E. R., Fleming, M. B., Migicovsky, Z., & Weber, M. G. (2021). Genome-Wide Association Study Reveals a Genomic Region Associated with Mite-Recruitment Phenotypes in the Domesticated Grapevine (*Vitis vinifera*). *Genes*, 12, 1013. <https://doi.org/10.3390/genes>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambrost, V. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-4*. In *Cell* (Vol. 75).

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, *23*(20), 4051–4060. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Li, J., Han, G., Sun, C., & Sui, N. (2019). Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding. In *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 14, Issue 8). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1613131>
- Liu, J., Shen, J., Xu, Y., Li, X., Xiao, J., & Xiong, L. (2016a). Gh2, a CONSTANS-like gene, confers drought sensitivity through regulation of senescence in rice. *Journal of Experimental Botany*, *67*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw344>
- Liu, J., Shen, J., Xu, Y., Li, X., Xiao, J., & Xiong, L. (2016b). Gh2, a CONSTANS -like gene, confers drought sensitivity through regulation of senescence in rice. *Journal of Experimental Botany*, *67*(19), 5785–5798. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw344>
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K., & Carrington, J. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA Targets Directed by a Class of Arabidopsis miRNA. *Science (New York, N.Y.)*, *297*, 2053–2056. <https://doi.org/10.1126/science.1076311>
- Luo, M., Gao, Z., Li, H., Li, Q., Zhang, C., Xu, W., Song, S., Ma, C., & Wang, S. (2018). Selection of reference genes for miRNA qRT-PCR under abiotic stress in grapevine. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22743-6>
- Manna, M., Thakur, T., Chirom, O., Mandlik, R., Deshmukh, R., & Salvi, P. (2021). Transcription factors as key molecular target to strengthen the drought stress tolerance in plants. *Physiologia Plantarum*, *172*(2), 847–868. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppl.13268>
- McCarthy, M. G., & Coombe, B. G. (1985). WATER STATUS AND WINEGRAPE QUALITY. *Acta Horticulturae*, *171*, 447–456. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1985.171.42>
- Medrano, H., Escalona, J., Bota, J., Gulias, J., & Flexas, J. (2002). Regulation of Photosynthesis of C3 Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance as a Reference Parameter. *Annals of Botany*, *89 Spec No*, 895–905. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf079>

- Merika, M., & Orkin, S. H. (1993). DNA-Binding Specificity of GATA Family Transcription Factors. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 13, Issue 7).
<https://journals.asm.org/journal/mcb>
- Mirlohi, B. S., & He, Y. (2016). Small RNAs in Plant Response to Abiotic Stress. In A. K. Shanker & C. Shanker (Eds.), *Abiotic and Biotic Stress in Plants* (p. Ch. 3). IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/61834>
- Miryeganeh, M. (2021). Plants' epigenetic mechanisms and abiotic stress. In *Genes* (Vol. 12, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes12081106>
- Moore, M. S., & Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, 365(6447), 661–663. <https://doi.org/10.1038/365661a0>
- Mudge, K., Janick, J., Scofield, S., & Goldschmidt, E. E. (2009). A History of Grafting. In *Horticultural Reviews* (pp. 437–493).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470593776.ch9>
- Ogata, K., Kanei-Ishii, C., Sasaki, M., Hatanaka, H., Nagadoi, A., Enari, M., Nakamura, H., Nishimura, Y., Ishii, S., & Sarai, A. (1996). The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nature Structural Biology*, 3(2), 178–187. <https://doi.org/10.1038/nsb0296-178>
- Olesen, J., Trnka, M., Kersebaum, K., Skjelvåg, A., SEGUIN, B., Peltonen-Sainio, P., Rossi, F., Jerzy, K., & Micale, F. (2011). Impacts and adaptation of European crop production systems to climate change. *European Journal of Agronomy*, 34, 96–112.
<https://doi.org/10.1016/j.eja.2010.11.003>
- Pagliarani, C., Vitali, M., Ferrero, M., Vitulo, N., Incarbone, M., Lovisolo, C., Valle, G., & Schubert, A. (2017). The accumulation of miRNAs differentially modulated by drought stress is affected by grafting in grapevine. *Plant Physiology*, 173(4), 2180–2195.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01119>
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in Arabidopsis thaliana. In *Current Biology* (Vol. 12). www.Arabidopsis.org/Blast/
- Pervaiz, T., Amjid, M. W., El-Kereamy, A., Niu, S. H., & Wu, H. X. (2022). Microrna and cdna-microarray as potential targets against abiotic stress response in plants: Advances

- and prospects. In *Agronomy* (Vol. 12, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010011>
- Plant, A., Larrieu, A., & Causier, B. (2021). Repressor for Hire! The vital roles of TOPLESS-mediated transcriptional repression in plants. *The New Phytologist*, 231. <https://doi.org/10.1111/nph.17428>
- Plant, A. R., Larrieu, A., & Causier, B. (2021a). Repressor for hire! The vital roles of TOPLESS-mediated transcriptional repression in plants. *New Phytologist*, 231(3), 963–973. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.17428>
- Plant, A. R., Larrieu, A., & Causier, B. (2021b). Repressor for hire! The vital roles of TOPLESS-mediated transcriptional repression in plants. *New Phytologist*, 231(3), 963–973. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.17428>
- Popova, O. v, Dinh, H. Q., Aufsatz, W., & Jonak, C. (2013). The RdDM Pathway Is Required for Basal Heat Tolerance in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 6(2), 396–410. <https://doi.org/10.1093/mp/sst023>
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., & Coupland, G. (1995). The CONSTANS gene of arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80(6), 847–857. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90288-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90288-0)
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes and Development*, 16(13), 1616–1626. <https://doi.org/10.1101/gad.1004402>
- Reyes, J. C., Muro-Pastor, M. I., & Florencio, F. J. (2004). The GATA family of transcription factors in arabidopsis and rice. *Plant Physiology*, 134(4), 1718–1732. <https://doi.org/10.1104/pp.103.037788>
- Saini, R., & Nandi, A. K. (2022). TOPLESS in the regulation of plant immunity. *Plant Molecular Biology*, 109(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11103-022-01258-9>
- Santesteban, L., & Royo, J. (2006). Water status, leaf area and fruit load influence on berry weight and sugar accumulation of cv. ‘Tempranillo’ under semiarid conditions. *Scientia Horticulturae - SCI HORT-AMSTERDAM*, 109, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.03.003>

- Schultz, H. R., & Matthews, M. A. (1988). Resistance to Water Transport in Shoots of *Vitis vinifera* L. 1: Relation to Growth at Low Water Potential. *Plant Physiology*, 88(3), 718–724. <https://doi.org/10.1104/pp.88.3.718>
- Singh, A., Jain, D., Pandey, J., Yadav, M., Bansal, K. C., & Singh, I. K. (2022). Deciphering the role of miRNA in reprogramming plant responses to drought stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–15. <https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2047880>
- Skinner, M. K. (2015). Environmental Epigenetics and a Unified Theory of the Molecular Aspects of Evolution: A Neo-Lamarckian Concept that Facilitates Neo-Darwinian Evolution. *Genome Biology and Evolution*, 7(5), 1296–1302. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv073>
- Strader, L., Weijers, D., & Wagner, D. (2022). Plant transcription factors — being in the right place with the right company. *Current Opinion in Plant Biology*, 65, 102136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102136>
- Szemenyei, H., Hannon, M., & Long, J. A. (2008). TOPLESS Mediates Auxin-Dependent Transcriptional Repression During Arabidopsis Embryogenesis. *Science*, 319(5868), 1384–1386. <https://doi.org/10.1126/science.1151461>
- Taiz, L., & EM, Z. (2006). *Plant Physiology*.
- This, P., Lacombe, T., & Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22(9), 511–519. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.07.008>
- Valamoti, S. M., Mangafa, M., Koukouli-Chrysanthaki, Ch., & Malamidou, D. (2007). Grape-pressings from northern Greece: the earliest wine in the Aegean? *Antiquity*, 81(311), 54–61. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0003598X00094837>
- Valverde, F. (2011). CONSTANS and the evolutionary origin of photoperiodic timing of flowering. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2453–2463. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq449>
- Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. In *Cell* (Vol. 136, Issue 4, pp. 669–687). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046>
- Wang, C., Jogaiah, S., Zhang, W., Abdelrahman, M., & Fang, J. G. (2018). Spatio-temporal expression of miRNA159 family members and their GAMYB target gene during the

- modulation of gibberellin-induced grapevine parthenocarpy. *Journal of Experimental Botany*, 69(15), 3639–3650. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery172>
- Wang, J., Mei, J., & Ren, G. (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00360>
- Wang, W., Min, Z., Wu, J., Liu, B., Xu, X., Fang, Y., & Ju, Y. (2021). Physiological and transcriptomic analysis of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) reveals the alleviating effect of exogenous strigolactones on the response of grapevine to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 400–409. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.08.010>
- Warschefsky, E. J., Klein, L. L., Frank, M. H., Chitwood, D. H., Londo, J. P., von Wettberg, E. J. B., & Miller, A. J. (2016). Rootstocks: Diversity, Domestication, and Impacts on Shoot Phenotypes. *Trends in Plant Science*, 21(5), 418–437. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.008>
- Weng, X., Wang, L., Wang, J., Hu, Y., Du, H., Xu, C., Xing, Y., Li, X., Xiao, J., & Zhang, Q. (2014). Grain Number, Plant Height, and Heading Date⁷ Is a Central Regulator of Growth, Development, and Stress Response . *Plant Physiology*, 164(2), 735–747. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231308>
- Zeven, A. C. (1998). Landraces: A review of definitions and classifications. *Euphytica*, 104(2), 127–139. <https://doi.org/10.1023/A:1018683119237>
- Zhang, H., Lang, Z., & Zhu, J.-K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(8), 489–506. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0016-z>
- Zhao, Y., Tian, X., Wang, F., Zhang, L., Xin, M., Hu, Z., Yao, Y., Ni, Z., Sun, Q., & Peng, H. (2017). Characterization of wheat MYB genes responsive to high temperatures. *BMC Plant Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1158-4>
- Zhu, Z., Quan, R., Chen, G., Yu, G., Li, X., Han, Z., Xu, W., Li, G., Shi, J., & Li, B. (2022). An R2R3-MYB transcription factor VyMYB24, isolated from wild grape *Vitis yanshanensis* J. X. Chen., regulates the plant development and confers the tolerance to drought. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.966641/FULL>

Διαδικτυακές Αναφορές

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), “Seeds and Plant Genetic Resources”, Ιστότοπος: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/seeds-pgr/en/>

Εθνική Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών, Ιστότοπος: <https://www.etheas.gr/>

Διεθνής Συνθήκη σχετικά με τους Φυτογενετικούς Πόρους, τη Διατροφή και την Γεωργία, «Άρθρο 2 – Χρήση όρων», Ιστότοπος: ftp://ftp.fao.org/ag/agp/planttreaty/texts/treaty_greek.pdf

Κεντρική Συνεταιριστική Ένωση Αμπελοοινικών Προϊόντων (ΚΕΟΣΟΕ), Ιστότοπος: <https://www.keosoe.gr/keosoe.html>