

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείρισης Περιβάλλοντος



Διδακτορική διατριβή

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΣΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ
ΦΥΤΩΝ ΦΡΑΟΥΛΑΣ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΑΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΩΝ

Αναστάσης Χρίστου

Λεμεσός 2014

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείρισης Περιβάλλοντος
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΣΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ
ΦΥΤΩΝ ΦΡΑΟΥΛΑΣ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΑΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΠΙΟΝΗΣΕΩΝ

του
Αναστάση Χρίστου

Λεμεσός 2014

ΕΝΤΥΠΟ ΕΓΚΡΙΣΗΣ

Διδακτορική διατριβή

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΣΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ
ΦΥΤΩΝ ΦΡΑΟΥΛΑΣ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΑΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΩΝ**

Παρουσιάστηκε από
Αναστάση Χρίστου

Επιβλέπων καθηγητής: Κώστας Κώστα, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΤΕΠΑΚ

Μέλος επιτροπής: Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής, ΓΠΑ

Μέλος επιτροπής: Ελένη – Ίσις Α. Κωνσταντινίδου, Καθηγήτρια, ΑΠΘ

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Φεβρουάριος, 2014

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Αναστάσης Χρίστου, 2014

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

ΔΗΛΩΣΗ

Τα αποτελέσματα που περιγράφονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι απόρροια πρωτότυπης ερευνητικής εργασίας που πραγματοποιήθηκε από τον συγγραφέα στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, στη Λεμεσό. Το υλικό δεν έχει υποβληθεί, όλο ή εν μέρει, για απόκτηση οποιουδήποτε άλλου πτυχίου σε αυτό, ή σε οποιοδήποτε άλλο ακαδημαϊκό ίδρυμα.

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει δημοσιευτεί, ή τελεί υπό δημοσίευση στα παρακάτω επιστημονικά περιοδικά και πρακτικά συνεδρίων:

Christou A, Manganaris GA, Papadopoulos I, Fotopoulos V (2013). Hydrogen sulphide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defense pathways. *Journal of Experimental Botany* 64, 1953-1966. (Παράρτημα)

Fotopoulos V, Christou A, Manganaris GA (2013). Hydrogen sulfide as a potent regulator of plant responses to abiotic stress factors. In: *Molecular Approaches for Plant Abiotic Stress* (Ed. Gaur RK, Sharma P). CRC Press, UK, pp. 353-373.

Christou A, Georgiadou E.C, Filippou P, Manganaris G.A, Fotopoulos V (2014). Establishment of a rapid, inexpensive protocol for extraction of high quality RNA from small amounts of strawberry plant tissues and other recalcitrant fruit crops. *Gene* 537 (1), 169-173. (Παράρτημα)

Christou A, Filippou P, Manganaris G.A, Fotopoulos V (2014) Hydrogen sulfide induces systemic thermotolerance to strawberry plants through maintenance of redox homeostasis and transcriptional regulation of heat shock proteins and aquaporin. *BMC Plant Biology* 14:42 (doi:10.1186/1471-2229-14-42). (Παράρτημα)

Christou A, Manganaris G.A, Fotopoulos V, Mitigation of salt stress by nitric oxide and hydrogen peroxide priming in strawberry plants via transcriptional regulation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *Photochemistry* (PHYTOCHEM-D-13-00673; υποβλήθηκε για δημοσίευση).

Christou A, Manganaris G.A, Papadopoulos I, Fotopoulos V (2011). The mitigating effects of nitric oxide and hydrogen peroxide pre-treatments to salt-stressed strawberry plants. *9th Plant Genomics European Meeting*, 4-7 May 2011, Istanbul, Turkey.

Christou A, Manganaris G.A, Papadopoulos I, Fotopoulos V (2011). Hydrogen sulfide confers systemic tolerance to salt and polyethylene glycol stress in strawberry plants. *10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants*, 5-8 July 2011, Budapest, Hungary.

Christou A, Manganaris G.A, Papadopoulos I, Fotopoulos V (2011). The importance of hydrogen sulfide as a systemic priming agent in strawberry plants grown under key abiotic stress factors. *Plant Abiotic Stress - from systems biology to sustainable agriculture*, 17-19 November 2011, Limassol, Cyprus.

Χρίστου Α, Μαγγανάρης Γ.Α, Παπαδόπουλος Ι, Φωτόπουλος Β (2011). Επίδραση συνθηκών αλατότητας στη φυσιολογία φυτών και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά καρπών φράουλας (*Fragaria x ananassa*). *25^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών*, Τόμος Α, 181-183, 1-4 Νοεμβρίου 2011, Λεμεσός, Κύπρος.

Χρίστου Α, Μαγγανάρης Γ.Α, Παπαδόπουλος Ι, Φωτόπουλος Β (2011). Το υδρόθειο προκαλεί διασυστηματική ρύθμιση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού αντοχής φυτών φράουλας σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης. *25^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών*, Τόμος Α, 120-123, 1-4 Νοεμβρίου 2011, Λεμεσός, Κύπρος.

Χρίστου Α, Μαγγανάρης Γ.Α, Παπαδόπουλος Ι, Φωτόπουλος Β (2011). Η προ-μεταχείριση ριζών φράουλας με NO και H₂O₂ ρυθμίζει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό φυτών φράουλας υπό συνθήκες αλατότητας. *25^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών*, Τόμος Α, 132-134, 1-4 Νοεμβρίου 2011, Λεμεσός, Κύπρος.

Χρίστου Α, Φιλίππου Π, Mlynarczyk Α, Μαγγανάρης Γ.Α, Παπαδόπουλος Ι, Φωτόπουλος Β (2011). Απομόνωση ολικού RNA υψηλής ποιότητας και/ή γενομικού DNA από ιστούς φράουλας μέσω κοινής εκχύλισης. *25^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών*, Τόμος Α, 150-152, 1-4 Νοεμβρίου 2011, Λεμεσός, Κύπρος.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Καταπονήσεων των Φυτών της Σχολής Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείρισης Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βασιλείου Φωτόπουλου.

Θέλω να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στον Αναπληρωτή Καθηγητή Κώστα Κώστα και στον Δρ. Βασίλειο Φωτόπουλο, που με εμπιστεύτηκαν αναθέτοντάς μου την έρευνα ενός πολύ σημαντικού, ενδιαφέροντος και εξαιρετικά επίκαιρου θέματος. Η καθοδήγηση και επίβλεψή τους, καθώς επίσης και το ενδιαφέρον και οι συστάσεις τους για την επίλυση προβλημάτων συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της διατριβής. Η φιλική τους στάση απέναντί μου και η επικοινωνία μας όλα αυτά τα χρόνια ήταν εξαιρετική, καθιστώντας τη συνεργασία μας πραγματικά ευχάριστη. Για την εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν επίσης καθοριστική η συμβολή του Επίκουρου Καθηγητή Γεώργιου Μαγγανάρη, ο οποίος ήταν πάντα πρόθυμος να συζητήσει οποιαδήποτε απορία ή πρόβλημα αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια της έρευνάς μου. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Βασίλειο Φωτόπουλο και τον Δρ. Γεώργιο Μαγγανάρη για την ανάγνωση και διόρθωση της παρούσας διατριβής, καθώς και των δημοσιεύσεων των αποτελεσμάτων της που υποβλήθηκαν σε διεθνή έγκριτα επιστημονικά περιοδικά.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ιωάννη Παπαδόπουλο για την εμπιστοσύνη και την καθοριστική στήριξη που μου παρείχε στα πρώτα χρόνια της διδακτορικής μου διατριβής. Ευχαριστίες θέλω να εκφράσω και σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου, καθώς και σε όλες τις φίλες και φίλους ερευνητές στο εργαστήριο. Ευχαριστίες θέλω να εκφράσω επίσης στη Δρ. Παναγιώτα Φιλίππου και στον Δρ. Λουκά Κανέτη για την αμέριστη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου διατριβής. Επίσης, θα ήταν παράλειψή μου να μην εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη διεύθυνση και τους συναδέλφους στον Κλάδο Εγγείων Βελτιώσεων του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών, όπου και εργάζομαι, για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια που μου πρόσφεραν.

Τέλος, τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην αγαπημένη μου οικογένεια, η οποία με βοήθησε και με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια, τόσο οικονομικά, όσο και ψυχικά. Σας ευχαριστώ πολύ, μπαμπά, μαμά, Παναγιώτη, Ελένη και Χρίστο. Επίσης, θερμές ευχαριστίες θέλω να δώσω στην πολυαγαπημένη μου σύζυγο Κούλα και στον υιό μου Ελευθέριο που ανέχθηκαν την απουσία μου από το σπίτι κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής και με στήριζαν με πάθος και με αμέριστη αγάπη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυτά είναι αναγκασμένα να ανταποκρίνονται στις συχνές μεταβολές του φυσικού περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται. Ως εκ τούτου, έχουν εξελίξει ένα πολύπλοκο σύστημα μηχανισμών προσαρμογής και εγκλιματισμού σε συνθήκες βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το μονοξειδίο του αζώτου (NO) και το υδρόθειο (H_2S) αποτελούν βιολογικά ενεργά μόρια, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος στα φυτά. Ως εκ τούτου, η χρήση τους για τη βιολογική διέγερση φυτών για επαγωγή της ανθεκτικότητάς τους κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εξέταση της υπόθεσης ότι η βιολογική διέγερση φυτών φράουλας (*Fragaria x ananassa* ποικ. Camarosa), ως αποτέλεσμα της προ-μεταχείρισής τους με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης H_2O_2 ή NO ή NaHS, θα μπορούσε να προσδώσει ανθεκτικότητα κατά την επικείμενη έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Μια σειρά από φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές δοκιμές έχουν επιτρέψει τη διερεύνηση των κυριότερων μηχανισμών επαγωγής της ανθεκτικότητας των φυτών, ως συνέπεια της βιολογικής τους διέγερσης με τα υπό εξέταση μόρια σήματος, κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αλατότητας (100 mmol L^{-1} NaCl), υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης [10% (β/ο) PEG-6000] και υψηλών θερμοκρασιών ($42 \text{ }^\circ\text{C}$). Οι κυριότερες συνιστώσες του μηχανισμού προσαρμογής και εγκλιματισμού που εξετάστηκαν ήταν ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, η μεταγωγή σήματος, καθώς επίσης και η γονιδιακή έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα σχετικού με την αφυδάτωση (*DREB*) και σημαντικών πρωτεϊνών καταπόνησης, όπως οι πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης (*HSPs*), οι υδατοπορίνες (*PIP*), και πρωτεΐνες του ευαίσθητου στην αλατότητα μονοπατιού μεταγωγής σήματος (*SOS*) (*SOS2-like*, *SOS3-like* και *SOS4*). Στα πλαίσια της αξιολόγησης της σχετικής έκφρασης γονιδίων-στόχων αναπτύχθηκε ένα γρήγορο και οικονομικό πρωτόκολλο για την απομόνωση υψηλής ποιότητας και ποσότητας RNA από μικρές ποσότητες φυτικού ιστού φράουλας, το οποίο είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα καρπών άλλων δύσκολων στην απομόνωση RNA καλλιεργούμενων φυτικών ειδών.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατέδειξαν ότι και τα 3 μόρια σήματος που εξετάστηκαν έχουν τη δυνατότητα, μέσω της βιολογικής διέγερσης, να επάγουν την ανθεκτικότητα των φυτών κατά την έκθεσή τους στους υπό εξέταση παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης. Τα προ-μεταχειρισμένα φυτά διατήρησαν τη σπαργή των φύλλων τους, ενώ τα συμπτώματα μάρανσης και νέκρωσης στα φύλλα παρουσιάζονταν σε ηπιότερο βαθμό, σε σύγκριση με τα φυτά που είχαν καταπονηθεί χωρίς προ-μεταχείριση (θετικοί μάρτυρες). Επιπλέον, τα προ-μεταχειρισμένα φυτά διατήρησαν σε υψηλότερα επίπεδα κρίσιμες παραμέτρους, όπως τη φωτοχημική ενεργότητα του PSII και την αγωγιμότητα των στομάτων τους, ενώ περιορίσαν τον βαθμό υπεροξειδωσής των μεμβρανικών λιπιδίων, καθώς επίσης και τη δευτερογενή οξειδωτική και νιτροδωτική καταπόνηση στα φύλλα, σε σύγκριση με τα φυτά των θετικών μαρτύρων. Η βιολογική διέγερση των φυτών φράουλας με την προ-μεταχείρισή τους είτε με H_2O_2 , είτε με NO πριν την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αλατότητας, έχει καταδείξει τον κεντρικό ρόλο των δυο αυτών ενεργών ενώσεων στη ρύθμιση του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, και κατ' επέκταση στη μέσω της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης ρύθμιση της μεταγωγής σήματος και της γονιδιακής έκφρασης σημαντικών μηχανισμών προσαρμογής και εγκλιματισμού σε συνθήκες αλατότητας. Επιπρόσθετα, καταδεικνύεται ότι πέραν της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, η διατήρηση της γονιδιακής έκφρασης των ενζύμων *SOS2-like*, *SOS3-like* και *SOS4*, καθώς και του μεταγραφικού παράγοντα *DREB*, σε επίπεδα όμοια με αυτά των φυτών του αρνητικού μάρτυρα, ως συνέπεια της προ-μεταχείρισης των φυτών με όξινο θειούχο νάτριο (NaHS), μιας πρόδρομης ένωσης του H_2S , αποτελεί σημαντική συνιστώσα της επαγωγής της ανθεκτικότητας των φυτών φράουλας έναντι της αλατότητας και της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης. Επίσης, η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικής καταπόνησης *HSP70*, *HSP80* και *HSP90*, καθώς και της υδατοπορίνης (*PIP*), ως αποτέλεσμα της προ-μεταχείρισης με NaHS, φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας για τη θερμοανθεκτικότητα που παρουσίασαν τα προ-μεταχειρισμένα φυτά φράουλας.

Τα ερευνητικά αποτελέσματα στο σύνολό τους προσθέτουν νέα γνώση όσον αφορά στη χρήση μορίων σήματος για τη βιολογική διέγερση και την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων. Ωστόσο, η χρήση ολοκληρωμένων προσεγγίσεων στην επιστήμη της φυσιολογίας καταπονήσεων φυτών, όπως οι αναλύσεις μικροσυστοιχιών και οι πρωτεομικές και μεταβολομικές αναλύσεις, καθώς επίσης και η χρήση συνθετικών χημικών αναστολέων της βιοσύνθεσης των υπό

εξέταση μορίων σήματος, αποτελούν μελλοντικές προκλήσεις με στόχο την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού της βιολογικής διέγερσης και της μεταγωγής σήματος κατά την επαγόμενη από τα υπό εξέταση μόρια σήματος ανθεκτικότητα των φυτών έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων.

ABSTRACT

Plants must be able to interpret and respond to the frequent changes in the physical environment in which they grow. Therefore, they have evolved a complex system of defense mechanisms and tolerance for both the biotic and abiotic adverse environmental stimuli. Hydrogen peroxide (H_2O_2), nitric oxide (NO) and hydrogen sulfide (H_2S) are biologically active molecules, actively participating in signal transduction. Therefore, their employment in priming approaches with the aim to improve plant's tolerance upon subsequent exposure to severe conditions of abiotic stress is very promising.

The aim of the current study was to evaluate the hypothesis that the priming of cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Camarosa) plants through their root pretreatment with low concentrations of H_2O_2 , NO and H_2S , could induce tolerance upon their subsequent exposure to severe abiotic stress conditions. The effects of root pretreatment with the priming agents employed on several key components of stress tolerance mechanisms in the leaves of strawberry plants exposed to ionic (100 mmol L^{-1} NaCl), hyper-osmotic [10% (w/v) PEG-6000] and heat stress ($42\text{ }^\circ\text{C}$) were investigated, following a combined physiological, biochemical and molecular approach. The main tolerance mechanisms evaluated were the antioxidant armory, redox state, signal transduction, as well as the relative gene expression of drought responsive element binding factor (*DREB*) and other stress proteins, such as heat shock proteins (*HSPs*), aquaporin (*PIP*) and proteins related to the salt overly sensitive pathway (SOS) (*SOS2-like*, *SOS3-like* και *SOS4*). Within the frame of specific genes relative expression analysis, a rapid and inexpensive protocol for the extraction of high quality RNA from small amounts of strawberry plant tissues and other recalcitrant fruit crops was established.

This dissertation's experimental results demonstrated that all 3 signaling molecules used displayed significant priming effects ultimately leading to the amelioration of the abiotic stress factors examined adverse effects. Pretreated primed plants sustained their turgor in a similar way to control samples, while wilting and necrotic lesions was observed to a much more limited extent, compared with non-pretreated stressed plants. In addition, root pretreatment with the priming agents employed resulted in the conservation of PSII photochemical efficiency and stomatal conductance, as well as in reduced levels of lipid peroxidation and oxidative and nitrosative secondary stress in strawberry plants,

manifested via the reduced *de novo* synthesis of NO and H₂O₂ in leaves. Priming of strawberry plants through their root pretreatment with either H₂O₂ or NO before exposure to saline conditions, revealed the central role of these two active molecules in cell redox homeostasis and redox-based signaling regulation of gene expression for the induction of plant's mechanisms towards salinity tolerance. Furthermore, results revealed that beyond the increased activity of the antioxidant mechanism and redox homeostasis, H₂S priming effects towards salinity and hyperosmotic tolerance could be also attributed to the overall conservation of gene expression of enzymes such as *SOS2-like*, *SOS3-like* and *SOS4*, as well as *DREB* transcription factor, to levels similar to control. Results also revealed that the induction of heat shock proteins (*HSP70*, *HSP80* and *HSP90*), as well as aquaporins (*PIP*) gene expression due to H₂S root pretreatment, appears to be crucial for a plant's acquired thermotolerance.

Overall, the results of this dissertation add new knowledge regarding the use of signaling molecules for priming approaches aiming at inducing plants' tolerance upon subsequent exposure to adverse environmental stimuli. However, the employment of comprehensive systems biology approaches, such as 'omics' technologies, towards the complete elucidation of H₂O₂, NO and H₂S signaling in abiotic stress, including the potential application of synthetic inhibitors of NO and H₂S biosynthesis, stands as a challenging future perspective.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|---|----------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | viii |
| ABSTRACT..... | xi |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ | xiii |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ | xvii |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ | xviii |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ..... | xx |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ | xxvi |
| ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ | xxviii |
| 1. Εισαγωγή | 1 |
| 1.1. Οι αρνητικές επιπτώσεις των διαφόρων παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης στα φυτά και οι προσπάθειες μετριασμού τους | 2 |
| 1.2. Η καλλιέργεια της φράουλας | 5 |
| 1.2.1. Συμπεριφορά των φυτών φράουλας κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας, ξηρασίας και υψηλών θερμοκρασιών | 7 |
| 1.3. Βιολογική διέγερση (Priming) για την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών κατά την έκθεσή τους σε δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα | 13 |
| 1.3.1. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη βιολογική διέγερση..... | 16 |
| 1.3.2. Βιολογική διέγερση φυτών με τη χρήση χημικών ενώσεων για επαγωγή της ανθεκτικότητάς τους σε δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα | 18 |
| 1.3.3. Βιολογική διέγερση φυτών με τη χρήση των υπό εξέταση μορίων σήματος (H ₂ O ₂ , NO, H ₂ S) για επαγωγή της ανθεκτικότητάς τους έναντι παραγόντων καταπόνησης | 21 |
| 1.4. Το H ₂ O ₂ στα φυτά | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4.1.Ο ρόλος του H ₂ O ₂ στη μεταγωγή σήματος και στη ρύθμιση σημαντικών λειτουργιών στα φυτά..... | 24 |
| 1.4.2.Ο ρόλος του H ₂ O ₂ κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων | 25 |
| 1.5. Το NO στα φυτά..... | 28 |
| 1.5.1.Ο ρόλος του NO στη μεταγωγή σήματος και στη ρύθμιση σημαντικών λειτουργιών στα φυτά..... | 29 |
| 1.5.2.Ο ρόλος του NO κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων | 31 |
| 1.6. Το H ₂ S στα φυτά | 34 |
| 1.6.1.Ο ρόλος του H ₂ S στη μεταγωγή σήματος και στη ρύθμιση σημαντικών λειτουργιών στα φυτά..... | 35 |
| 1.6.2.Ο ρόλος του H ₂ S κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων | 37 |
| 1.7. Σκοπός της εργασίας | 40 |
| 2. Υλικά και μέθοδοι | 42 |
| 2.1. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών φράουλας και μεταχειρίσεις | 42 |
| 2.2. Αγωγιμότητα των στομάτων | 43 |
| 2.3. Μέτρηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής αποτελεσματικότητας..... | 43 |
| 2.4. Υδατικό δυναμικό των φύλλων..... | 43 |
| 2.5. Μέτρηση της σχετικής περιεκτικότητας των φύλλων σε νερό | 43 |
| 2.6. Εκροή των ηλεκτρολυτών | 44 |
| 2.7. Ποσοτικός προσδιορισμός των φωτοσυνθετικών χρωστικών | 44 |
| 2.8. Υπεροξείδωση των μεμβρανικών λιπιδίων | 45 |
| 2.9. Ποσοτικός προσδιορισμός του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H ₂ O ₂)..... | 46 |
| 2.10.Ποσοτικός προσδιορισμός του μονοξειδίου του αζώτου (NO)..... | 46 |
| 2.11.Ποσοτικός προσδιορισμός του υδροθείου (H ₂ S) | 47 |
| 2.12. Ποσοτικός προσδιορισμός του ασκορβικού και δεϋδροασκορβικού οξέος και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του ασκορβικού οξέος | 47 |
| 2.13. Ποσοτικός προσδιορισμός της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού της γλουταθειόνης | 48 |
| 2.14. Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA)..... | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 2.15. Ποσοτικοποίηση ριβονουκλεϊκών οξέων | 51 |
| 2.16. Μεταχείριση του παρασκευάσματος νουκλεϊκών οξέων με το ένζυμο δεοξυριβονουκλεάση (rDNase I) | 51 |
| 2.17. Μεταχείριση του παρασκευάσματος νουκλεϊκών οξέων με το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase A) | 52 |
| 2.18. Ηλεκτροφόρηση του DNA και του RNA | 53 |
| 2.19. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) | 54 |
| 2.20. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)..... | 55 |
| 2.21. Στατιστική ανάλυση..... | 56 |
| 3. Δημιουργία ενός γρήγορου και οικονομικού πρωτοκόλλου για την απομόνωση υψηλής ποιότητας RNA από μικρές ποσότητες φυτικού ιστού φράουλας και καρπών άλλων καλλιεργούμενων ειδών..... | 58 |
| 3.1. Περίληψη..... | 58 |
| 3.2. Εισαγωγή..... | 59 |
| 3.3. Υλικά και μέθοδοι..... | 60 |
| 3.4. Αποτελέσματα και συζήτηση..... | 61 |
| 4. Η προ-μεταχείριση ριζών φράουλας με NO και H₂O₂ επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες αλατότητας..... | 69 |
| 4.1. Περίληψη..... | 69 |
| 4.2. Εισαγωγή..... | 70 |
| 4.3. Υλικά και μέθοδοι..... | 73 |
| 4.4. Αποτελέσματα..... | 75 |
| 4.5. Συζήτηση..... | 86 |
| 5. Το H₂S επάγει τη διασυστηματική ανθεκτικότητα φυτών φράουλας σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης..... | 93 |
| 5.1. Περίληψη..... | 93 |
| 5.2. Εισαγωγή..... | 94 |
| 5.3. Υλικά και μέθοδοι..... | 96 |
| 5.4. Αποτελέσματα..... | 99 |

| | |
|---|-------------|
| 5.5. Συζήτηση..... | 111 |
| 6. Το H₂S επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών φράουλας σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης..... | 122 |
| 6.1. Περίληψη..... | 122 |
| 6.2. Εισαγωγή..... | 123 |
| 6.3. Υλικά και μέθοδοι..... | 125 |
| 6.4. Αποτελέσματα..... | 127 |
| 6.5. Συζήτηση..... | 136 |
| 7. Συμπεράσματα..... | 144 |
| 8. Βιβλιογραφία..... | 148 |
| 9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... | 1483 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|---|----|
| Πίνακας 1: Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής - 1 ^ο Στάδιο..... | 54 |
| Πίνακας 2: Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής - 2 ^ο Στάδιο..... | 55 |
| Πίνακας 3: Στοιχεία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων ενδιαφέροντος..... | 57 |
| Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές PCR και RT-PCR | 62 |
| Πίνακας 5: Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της ποιότητας και της ποσότητας των απομονωθέντων νουκλεϊκών οξέων από φυτικούς ιστούς φράουλας, χρησιμοποιώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο, το πρωτόκολλο των Mazzara και James (2000), και το αντιδραστήριο Trizol [®] . Το προτεινόμενο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια και σε άλλους δύστροπους ιστούς καρπών (ελαιόκαρποι, ακτινίδια). | 64 |
| Πίνακας 6: Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του ολικού RNA και του ολικού γενομικού DNA από φυτικούς ιστούς φράουλας και ιστούς καρπών άλλων δύστροπων φυτικών ειδών, όπως απομονώθηκαν από το προτεινόμενο πρωτόκολλο μετά τη μεταχείριση των δειγμάτων με rDNase I και RNase A, αντίστοιχα. | 66 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1,5% β/ο) των νουκλεϊκών οξέων που απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol[®], το πρωτόκολλο των Mazzara και James (2000) και το προτεινόμενο πρωτόκολλο. (M): GeneRuler 1 kb DNA ladder, 1-3: καρποί (1), φύλλα (2) και ρίζες (3) φράουλας χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol[®], 4-6: καρποί (4), φύλλα (5) και ρίζες (6) φράουλας χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο των Mazzara και James (2000), 7-9: καρποί (7), φύλλα (8) και ρίζες (9) φράουλας χρησιμοποιώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο, 10-11: καρποί ακτινιδίου (10), ελαιόκαρποι (11) χρησιμοποιώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο. 65

Εικόνα 2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1,5% β/ο) των δειγμάτων καθαρού ολικού RNA (A) και καθαρού γενομικού DNA (B), όπως προέκυψε μετά από την επώαση των αρχικά απομονωθέντων δειγμάτων ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο, με rDNase I και RNase A, αντίστοιχα. A) (M): GeneRuler 1 kb DNA ladder, (1): καρποί φράουλας, (2): φύλλα φράουλας, (3): ρίζες φράουλας, (4): καρποί ακτινιδίου (5): ελαιόκαρποι. B) (M): GeneRuler 1 kb DNA ladder, (1): φύλλα φράουλας, (2): ρίζες φράουλας, (3): καρποί ακτινιδίου, (4): ελαιόκαρποι. 65

Εικόνα 3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1,5% β/ο) της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων αναφοράς, όπως ενισχύθηκαν με RT-PCR χρησιμοποιώντας ως πρότυπο cDNA (A), και PCR χρησιμοποιώντας ως πρότυπο γενομικό DNA (B), όπως προέκυψε από το τροποποιημένο προτεινόμενο πρωτόκολλο. A) (M): GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 1-3: *FaGAPDH* ενισχυμένο από καρπούς (1), φύλλα (2) και ρίζες (3) φράουλας, (4): *FaGAPDH* αρνητικός έλεγχος, (5): *AdACT* ενισχυμένο από καρπούς ακτινιδίου, (6): *AdACT* αρνητικός έλεγχος, (7): *OeUBQ2* ενισχυμένο από ελαιόκαρπους, (8): *OeUBQ2* αρνητικός έλεγχος. B) (M): GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 1-2: *FaGAPDH* ενισχυμένο από φύλλα (1) και ρίζες (2) φράουλας, (3): *FaGAPDH* αρνητικός έλεγχος, (4): *AdACT* ενισχυμένο από καρπούς ακτινιδίου, (5): *AdACT* αρνητικός έλεγχος, (6): *OeUBQ2* ενισχυμένο από ελαιόκαρπους, (7): *OeUBQ2* αρνητικός έλεγχος. 67

Εικόνα 4: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφάνιση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), στο υπέργειο μέρος των φυτών μετά από την έκθεσή τους ή όχι σε 100 mmol L⁻¹ NaCl,

για 8 ημέρες. [(A) Μάρτυρας (αρνητικός μάρτυρας), (B) NaCl (θετικός μάρτυρας), (Γ) SNP, (Δ) H_2O_2 , (E) $SNP_{(0)} \rightarrow NaCl$, (ΣΤ) $H_2O_{2(0)} \rightarrow NaCl$, (Ζ) $SNP_{(7)} \rightarrow NaCl$, (H) $H_2O_{2(7)} \rightarrow NaCl$]. 76

Εικόνα 5: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύτευση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στο υπέργειο μέρος των φυτών μετά από την έκθεσή τους ή όχι, είτε σε 100 mmol L^{-1} NaCl, είτε σε 10% (β/ο) PEG-6000, για 7 ημέρες. [(A) Μάρτυρας (αρνητικός μάρτυρας), (B) H_2S , (Γ) NaCl (θετικός μάρτυρας), (Δ) $H_2S_{(0)} \rightarrow NaCl$, (E) $H_2S_{(3)} \rightarrow NaCl$, (ΣΤ) PEG (θετικός μάρτυρας), (Ζ) $H_2S_{(0)} \rightarrow PEG$, (H) $H_2S_{(3)} \rightarrow PEG$]. 100

Εικόνα 6: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύτευση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στον φαινότυπο των φυτών (φύλλα και ρίζες) μετά από την έκθεσή τους ή όχι, είτε σε 100 mmol L^{-1} NaCl, είτε σε 10% (β/ο) PEG-6000, για 7 ημέρες. [(A) Μάρτυρας (αρνητικός μάρτυρας), (B) H_2S , (Γ) NaCl (θετικός μάρτυρας), (Δ) $H_2S_{(0)} \rightarrow NaCl$, (E) $H_2S_{(3)} \rightarrow NaCl$, (ΣΤ) PEG (θετικός μάρτυρας), (Ζ) $H_2S_{(0)} \rightarrow PEG$, (H) $H_2S_{(3)} \rightarrow PEG$]. 100

Εικόνα 7: Επιδράσεις της εμφύτευσης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στο υπέργειο μέρος των φυτών μετά από 8 h έκθεσής τους είτε σε κανονική θερμοκρασία ($23 \text{ }^\circ\text{C}$), είτε σε θερμοκρασία θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^\circ\text{C}$) [(A) Μάρτυρας (αρνητικός μάρτυρας), (B) H_2S , (Γ) Heat (θετικός μάρτυρας), (Δ) $H_2S \rightarrow \text{Heat}$]. 128

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Τα στάδια της αντίδρασης των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Πρωτογενείς παράγοντες καταπόνησης, όπως η ξηρασία, η αλατότητα, ο παγετός, οι υψηλές θερμοκρασίες και η χημική ρύπανση, συχνά αλληλοσυνδέονται και προκαλούν κυτταρική ζημιά και δευτερογενή καταπόνηση, όπως ωσμωτική και οξειδωτική καταπόνηση. Το αρχικό ερέθισμα της αβιοτικής καταπόνησης αντιλαμβάνομενο από εξειδικευμένους αισθητήρες ως διαταραχή της ιοντικής και ωσμωτικής ισορροπίας, ή ως ζημιά της δομής και λειτουργικότητας των πρωτεϊνών και μεμβρανών, μεταφέρεται κατόπιν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος (Ca^{2+} , ROS, *MAPKs*, *CDPKs*, κ.ά.), επηρεάζοντας διαμέσου μεταγραφικών παραγόντων την έκφραση γονιδίων ανθεκτικότητας. Ως αποτέλεσμα, ενεργοποιείται πληθώρα μηχανισμών ανθεκτικότητας επαναφέροντας την κυτταρική ισορροπία μέσω της αποτοξίνωσης και της επιδιόρθωσης των πρωτεϊνών και κυτταρικών μεμβρανών (Πηγή: τροποποίηση από Wang et al., 2003)..4

Διάγραμμα 2: Μηχανισμοί βιολογικής διέγερσης και επαγόμενης ανθεκτικότητας στα φυτά (Πηγή: τροποποίηση από Goellner and Conrath, 2008)..... 15

Διάγραμμα 3: Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της βιολογικής διέγερσης. Η συσσώρευση στο κύτταρο πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος ερεθισμάτων καταπόνησης προκαλεί ταχύτερη ενεργοποίηση του μηχανισμού προσαρμογής και εγκλιματισμού (Πηγή: τροποποίηση από Conrath, 2011)..... 17

Διάγραμμα 4: Μεταγωγή σήματος μέσω του NO κατά την έκθεση των φυτών σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. ABA: αμπισισικό οξύ, *cADPR*: κυκλοαδενοσινοδιφωσφοριβόζη, *cGMP*: κυκλική μονοφωσφατάση της γουανοσίνης, C_2H_4 : αιθυλένιο, *CHS*: συνθάση της χαλκόνης, JA: ιασμονικό οξύ, *MAPK*: ενεργές πρωτεϊνικές κινάσες, *PAL*: αμμωνιολυάση της φαινυλαλανίνης, ROS: ενεργές μορφές οξυγόνου, RNS: ενεργές μορφές αζώτου, SA: σαλικυλικό οξύ (Πηγή: τροποποίηση από Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007)..... 31

Διάγραμμα 5: Σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων του πειράματος..... 74

Διάγραμμα 6: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H_2O_2 (10 mmol L^{-1}), είτε SNP ($100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), στη συγκέντρωση (g L^{-1}) της χλωροφύλλης α (A), της χλωροφύλλης β (B) και

των καροτενοειδών (Γ), κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L⁻¹ NaCl. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$)...... 77

Διάγραμμα 7: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), στο υδατικό δυναμικό (Α) και τη σχετική περιεκτικότητα σε νερό (Β) των φύλλων, κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L⁻¹ NaCl. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=9). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$)...... 78

Διάγραμμα 8: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), στη μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα των φύλλων, κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L⁻¹ NaCl. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=9). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$)...... 79

Διάγραμμα 9: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), στο ποσοστό εκροής των ηλεκτρολυτών (Α) και στη συγκέντρωση MDA (Β) στα φύλλα, κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L⁻¹ NaCl. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$)...... 80

Διάγραμμα 10: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), στη φυλλική συγκέντρωση H₂O₂ (Α) και NO (Β) κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L⁻¹ NaCl. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$)...... 82

Διάγραμμα 11: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφάνιση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H_2O_2 (10 mmol L^{-1}), είτε SNP ($100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), στη φυλλική συγκέντρωση και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$. [ASC (A), DHA (B), οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος % (Γ), GSH (Δ), GSSG (E) και οξειδοαναγωγικό δυναμικό της γλουταθειόνης % (ΣΤ)]. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=3$). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$)..... 84

Διάγραμμα 12: Θερμικός χάρτης που καταδεικνύει το χρονικό πρότυπο έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με ορισμένες ενζυμικές αντιοξειδωτικές ενώσεις, τη βιοσύνθεση RNS και την οξειδοαναγωγική ομοιοστάση, στα φύλλα των φυτών φράουλας που προ-μεταχειρίστηκαν με την εμφάνιση των ριζών τους σε διάλυμα που περιείχε είτε H_2O_2 (10 mmol L^{-1}), είτε SNP ($100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), και καταπονήθηκαν ή όχι με την έκθεσή τους σε διάλυμα που περιείχε $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$, για 8 ημέρες. Η δειγματοληψία των ιστών έγινε αμέσως ή 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείριση είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, και 8 ημέρες μετά την έκθεση ή όχι των φυτών σε συνθήκες ιοντικής καταπόνησης. Η σχετική έκφραση/αφθονία του mRNA εκτιμήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (real-time RT-PCR) χρησιμοποιώντας τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης καταδεικνύεται με πράσινο χρώμα, ενώ η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης με κόκκινο χρώμα. Οι διαγώνιες διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$)..... 86

Διάγραμμα 13: Σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων του πειράματος..... 98

Διάγραμμα 14: Επιδράσεις της εμφάνισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), στη φυλλική συγκέντρωση H_2S κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 7 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 7, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε είτε $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=3$). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$)..... 101

Διάγραμμα 15: Επιδράσεις της εμφάνισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), στο υδατικό δυναμικό (A) και στη σχετική

| | |
|--|-----|
| περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό (B), μετά από 7 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L ⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=9). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (<i>P</i> < 0,05)..... | 102 |
| Διάγραμμα 16: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS (100 μmol L ⁻¹), στη μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα (A) και την αγωγιμότητα των στομάτων (B) στα φύλλα, μετά από 7 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L ⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=9). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (<i>P</i> < 0,05)..... | 103 |
| Διάγραμμα 17: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS (100 μmol L ⁻¹), στη φυλλική συγκέντρωση MDA κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 7 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 7, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L ⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (<i>P</i> < 0,05)..... | 105 |
| Διάγραμμα 18: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS (100 μmol L ⁻¹), στη φυλλική συγκέντρωση H ₂ O ₂ (A) και NO (B) κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 7 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 7, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L ⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (<i>P</i> < 0,05). .. | 106 |
| Διάγραμμα 19: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS (100 μmol L ⁻¹), στη φυλλική συγκέντρωση και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 7 ημέρες (Ημέρα 7, γκριζες στήλες) έκθεσης ή όχι των φυτών, σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L ⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. [(A) ASC, (B) DHA, (Γ) οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος %, (Δ) GSH, (E) GSSG και (ΣΤ) οξειδοαναγωγικό δυναμικό της γλουταθειόνης %]. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (<i>P</i> < 0,05)..... | 108 |

| | |
|---|-----|
| Διάγραμμα 20: Θερμικός χάρτης που καταδεικνύει το χρονικό πρότυπο έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με ορισμένες ενζυμικές αντιοξειδωτικές ενώσεις, τη βιοσύνθεση RNS, την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και το μονοπάτι μεταγωγής σήματος SOS στα φύλλα των φυτών φράουλας που προ-μεταχειρίστηκαν με την εμβάπτιση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), και καταπονήθηκαν ή όχι με την έκθεσή τους σε διάλυμα που περιείχε είτε 100mmol L^{-1} NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000, για 7 ημέρες. Η δειγματοληψία των ιστών έγινε αμέσως μετά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης (Ημέρα 0), όπως επίσης και 7 ημέρες μετά. Η σχετική έκφραση/αφθονία του mRNA εκτιμήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (real-time RT-PCR) χρησιμοποιώντας τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης καταδεικνύεται με πράσινο χρώμα, ενώ η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης με κόκκινο χρώμα. Οι διαγώνιες διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$)...... | 110 |
| Διάγραμμα 21: Σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων του πειράματος..... | 127 |
| Διάγραμμα 22: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στη φυλλική συγκέντρωση H_2S , κατά τη διάρκεια έκθεσης ή όχι των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^\circ\text{C}$). Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm το τυπικό σφάλμα ($n=3$). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$)...... | 129 |
| Διάγραμμα 23: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στη μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα των φύλλων, μετά από 8 h έκθεσης ή όχι των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^\circ\text{C}$). Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=9$). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$). | 129 |
| Διάγραμμα 24: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στη φυλλική συγκέντρωση MDA κατά τη διάρκεια έκθεσης ή όχι των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^\circ\text{C}$), σε σχέση με τη συγκέντρωση κατά την έναρξη των μεταχειρίσεων (0 h). Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=3$). Αποτελέσματα που σημαίνονται με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$)...... | 130 |

Διάγραμμα 25: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στη φυλλική συγκέντρωση H_2O_2 (Α) και NO (Β), κατά τη διάρκεια έκθεσης ή όχι των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^\circ\text{C}$), σε σχέση με τη συγκέντρωση κατά την έναρξη των μεταχειρίσεων (0 h). Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=3$). Αποτελέσματα που σημαίνονται με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$). 132

Διάγραμμα 26: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στη φυλλική συγκέντρωση και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, κατά τη διάρκεια έκθεσης ή όχι των φυτών φράουλας σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^\circ\text{C}$). [ASC (Α), DHA (Β), οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος % (Γ), GSH (Δ), GSSG (Ε) και οξειδοαναγωγικό δυναμικό της γλουταθειόνης % (ΣΤ)]. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=3$). Αποτελέσματα που σημαίνονται με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$). 133

Διάγραμμα 27: Θερμικός χάρτης που καταδεικνύει το χρονικό πρότυπο έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με ορισμένες ενζυμικές αντιοξειδωτικές ενώσεις, τη βιοσύνθεση RNS, την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, τη μεταγωγή σήματος, τη διατήρηση της δομής και σταθερότητας των πρωτεϊνών και τη ρύθμιση της μεταφοράς νερού, στα φύλλα των φυτών φράουλας που προ-μεταχειρίστηκαν με την εμβάπτιση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), και καταπονήθηκαν ή όχι με την έκθεσή τους σε θερμοκρασία θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^\circ\text{C}$), για 8 h. Η δειγματοληψία των ιστών έγινε αμέσως μετά την προ-μεταχείριση των φυτών με H_2S (0 h) και 1, 4 και 8 h μετά την προ-μεταχείρισή τους. Η σχετική έκφραση/αφθονία του mRNA εκτιμήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (real-time RT-PCR) χρησιμοποιώντας τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης καταδεικνύεται με πράσινο χρώμα, ενώ η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης με κόκκινο χρώμα. Οι διαγώνιες διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$). 135

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

| | |
|--|--|
| ABA: Abscisic acid | Αμπισισικό οξύ |
| ANOVA: Analysis of variance | Ανάλυση διακύμανσης |
| APX: Ascorbate peroxidase | Ασκορβική περοξειδάση |
| ASC: Ascorbic acid | Ασκορβικό οξύ |
| BABA: b-Aminobutyric acid | β-αμινοβουτυρικό οξύ |
| BABA-IR: BABA-induced resistance | Επαγόμενη από το β-αμινοβουτυρικό οξύ ανθεκτικότητα |
| cADPR: Cyclic adenosine diphosphate -ribose | Κυκλοαδενοσινοδιφωσφοριβόζη |
| CalUR: D-galacturonate reductase | Αναγωγή του γαλακτουρονικού οξέος |
| CaM: Calmodulin | Καλμοδουλίνη |
| CAT: Catalase | Καταλάση |
| cDNA: Complementary DNA | Συμπληρωματικό DNA |
| cGMP: Cyclic guanosine monophosphate | Κυκλική μονοφωσφατάση της γουανοσίνης |
| CHS: Chalcon synthase | Συνθάση της χαλκόνης |
| DHA: Dehydroascorbate | Δεϋδροασκορβικό οξύ |
| DHAR: Dehydroascorbate reductase | Αφυδροασκορβική αναγωγή |
| DMSO: Dimethyl sulfoxide | Διμεθυλοσουλφοξείδιο |
| DREB: Drought-responsive element binding factor | Μεταγραφικός παράγοντας σχετικός με την αφυδάτωση |
| EL: Electrolyte leakage | Εκροή των ηλεκτρολυτών |
| ET: Ethylene | Αιθυλένιο |
| GA: Gibberellic Acid | Γιββεριλλικό οξύ |
| GCS: Glutamylcysteine synthetase | Συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης |
| GDH: L-galactose dehydrogenase | Αφυδρογονάση της L-γαλακτόζης |
| GLDH: L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase | Αφυδρογονάση της L-γαλακτονο-1,4 λακτόνης |
| GR: Glutathione reductase | Αναγωγή της γλουταθειόνης |
| GSH: Reduced glutathione | Ανηγμένη γλουταθειόνη |

| | |
|---|---|
| GS: Glutathione synthetase | Συνθετάση της γλουταθειόνης |
| GSSG: Oxidized glutathione | Οξειδωμένη γλουταθειόνη |
| H ₂ O ₂ : Hydrogen peroxide | Υπεροξείδιο του υδρογόνου |
| H ₂ S: Hydrogen sulfide | Υδρόθειο |
| HR: Hypersensitive response | Αντίδραση υπερευαισθησίας |
| HSP70: Heat shock protein 70 | Πρωτεΐνη θερμικής καταπόνησης 70 |
| HSP80: Heat shock protein 80 | Πρωτεΐνη θερμικής καταπόνησης 80 |
| HSP90: Heat shock protein 90 | Πρωτεΐνη θερμικής καταπόνησης 90 |
| IAA: Indole-3-acetic acid | Ινδολυλοξικό οξύ |
| ISR: Induced systemic resistance | Διασυστηματική επαγόμενη ανθεκτικότητα |
| JA: Jasmonic acid | Ιασμονικό οξύ |
| LOS: Lipo-oligo-saccharides | Λιποολιγοσακχαρίτες |
| LPS: Lipopolysaccharide | Λιποπολυσακχαρίτες |
| LRWC: Leaf relative water content | Σχετική περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό |
| MDA: Malondialdehyde | Μαλονδιαλδεΐδη |
| MDHAR: monodehydroascorbate reductase | Μονοαφυδροασκορβική αναγωγή |
| MnSOD: Manganese superoxide dismutase | Σουπεροξειδική δισμουτάση του μαγγανίου |
| MIOX: Myo-inositol oxygenase | Οξυγενάση της μυο-ινοσιτόλης |
| NaHS: Sodium hydrosulfide | Όξινο θειούχο νάτριο |
| NR: Nitrate reductase | Νιτρική αναγωγή |
| ·OH: Hydroxide anion | Υδροξυλική ρίζα |
| O ₂ ^{·-} : Superoxide anion | Σουπεροξειδικό ανιόν |
| P5CS: Pyrroline-5-carboxylate synthetase | Δ ¹ -Πυρρόλινο-5-καρβόξυλο συνθετάση |
| PAL: Phenylalanine ammonia lyase | Αμμωνιολύση της φαινυλαλανίνης |
| PCD: Programmed cell death | Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος |
| PIP: Plasma membrane intrinsic protein, aquaporin | Υδατοπορίνη |
| SNP: sodium nitroprusside dehydrate | Νιτροπρωσσικό νάτριο |

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

| | |
|--------------------------|-----------------------------------|
| Biotrophic pathogens: | Βιοτροφικά παθογόνα |
| Calcium-binding protein: | Πρωτεΐνη που δεσμεύει το ασβέστιο |
| Melting Curve analysis: | Ανάλυση καμπύλης τήξης |
| Necrotrophic pathogens: | Νεκροτροφικά παθογόνα |
| Nitrosative stress: | Νιτροδωτική καταπόνηση |
| Osmoregulation: | Ωσμωρύθμιση |
| Priming: | Βιολογική διέγερση |
| Redox state: | Οξειδοαναγωγικό δυναμικό |
| Signaling pathway: | Μονοπάτι μεταγωγής σήματος |

1. Εισαγωγή

Η πράσινη επανάσταση, όπως χαρακτηρίστηκε η εκβιομηχάνιση της αγροτικής παραγωγής με την επακόλουθη εισαγωγή προϊόντων βιοτεχνολογίας, ανόργανων λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών προϊόντων, καθώς και βελτιωμένων συστημάτων καλλιέργειας, έχει επιτρέψει την αύξηση της παγκόσμιας αγροτικής παραγωγής με αποτέλεσμα την εν μέρει ικανοποίηση των αναγκών του παγκόσμιου πληθυσμού σε τρόφιμα και άλλες ανάγκες. Τα τελευταία 50 χρόνια έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτη αύξηση της αγροτικής παραγωγής με συνέπεια τη σημαντική μείωση του ποσοστού του πληθυσμού που έπασχε από υποσιτισμό, πάρα τον διπλασιασμό του παγκόσμιου πληθυσμού (Godfray et al., 2010). Παρόλα αυτά, η ανθρωπότητα αντιμετωπίζει νέες ενδιαφέρουσες προκλήσεις. Ο παγκόσμιος πληθυσμός θα συνεχίσει να αυξάνεται, και είναι πολύ πιθανό να φτάσει περίπου τα 9 δισεκατομμύρια ανθρώπων στα μέσα αυτού του αιώνα. Την ίδια στιγμή, οι παραγωγοί τροφίμων αντιμετωπίζουν ολοένα και μεγαλύτερο ανταγωνισμό για την εξασφάλιση γεωργικής γης, νερού και ενέργειας, ενώ παράλληλα τα συχνά ακραία καιρικά φαινόμενα, ως αποτέλεσμα των κλιματικών αλλαγών, μειώνουν δραματικά την αγροτική παραγωγή. Συνυπολογίζοντας την παγκόσμια μείωση των διαθέσιμων υδατικών πόρων και την αύξηση της υφαλμύρωσης των εδαφών και των υδάτων, οι διάφοροι παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης που ήδη αποτελούν σημαντικούς περιοριστικούς παράγοντες στην ανάπτυξη των φυτών, αναμένεται σύντομα να γίνουν ακόμα πιο σοβαροί, καθώς ο ρυθμός απερίμωσης των χερσαίων καλλιεργούμενων περιοχών αυξάνεται συνεχώς.

Η μείωση της παραγωγής ως συνέπεια διαφόρων παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης, όπως η αλατότητα, η ξηρασία, οι ακραίες θερμοκρασίες, τα βαρέα μέταλλα, η αυξημένη συγκέντρωση όζοντος και η χημική ρύπανση, θεωρείται πολύ σημαντική. Ο στόχος της παραγωγής ποσότητας τροφίμων ικανής να καλύψει τις ανάγκες του αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού τις επόμενες δεκαετίες, συσχετίζεται άμεσα με τη μείωση των επιζήμιων συνεπειών των παραπάνω παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης. Ενδεικτικό είναι το γεγονός πως περίπου το 45% της καλλιεργούμενης γης παγκοσμίως υπόκειται σε συνεχείς ή συχνές περιόδους ξηρασίας, περίπου το 6% της συνολικής έκτασης παγκοσμίως (περίπου 4 δισεκατομμύρια στρέμματα) έχει υποστεί σε κάποιο βαθμό υποβάθμιση λόγω υφαλμύρωσης, ενώ εκτιμάται ότι πάνω από το 50% της συνολικής καλλιεργούμενης

έκτασης παγκοσμίως θα αντιμετωπίσει κάποια μορφή υφαλμύρωσης μέχρι το 2050 (Ashraf, 1994), έχοντας ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση και υποβάθμιση της αγροτικής παραγωγής.

Τα φυτά ως οργανισμοί που δε διαθέτουν την ικανότητα φυγής, όπως τα ζώα, είναι αναγκασμένα να ανταποκρίνονται στις συχνές μεταβολές του φυσικού περιβάλλοντος και να αναπτύσσουν μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων. Εξάλλου, το γονιδίωμα των σημερινών φυτικών ειδών είναι αποτέλεσμα της εξέλιξης και της αλληλεπίδρασής τους με τους διαφόρους παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης (Zhu, 2002). Αντικείμενο μελέτης στην παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν η συμπεριφορά των φυτών της καλλιεργούμενης φράουλας (*Fragaria x ananassa* ποικ. Camarosa) κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης και υψηλών θερμοκρασιών. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η πιθανότητα μετριασμού των επιζήμιων συνεπειών των παραπάνω παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης στα φυτά φράουλας μέσω της βιολογικής τους διέγερσης με τη χρήση των μορίων σήματος H_2O_2 , NO και H_2S . Τα αποτελέσματα της έρευνας απορρέουν από συνδυασμό φυσιολογικών, βιοχημικών και μοριακών προσεγγίσεων.

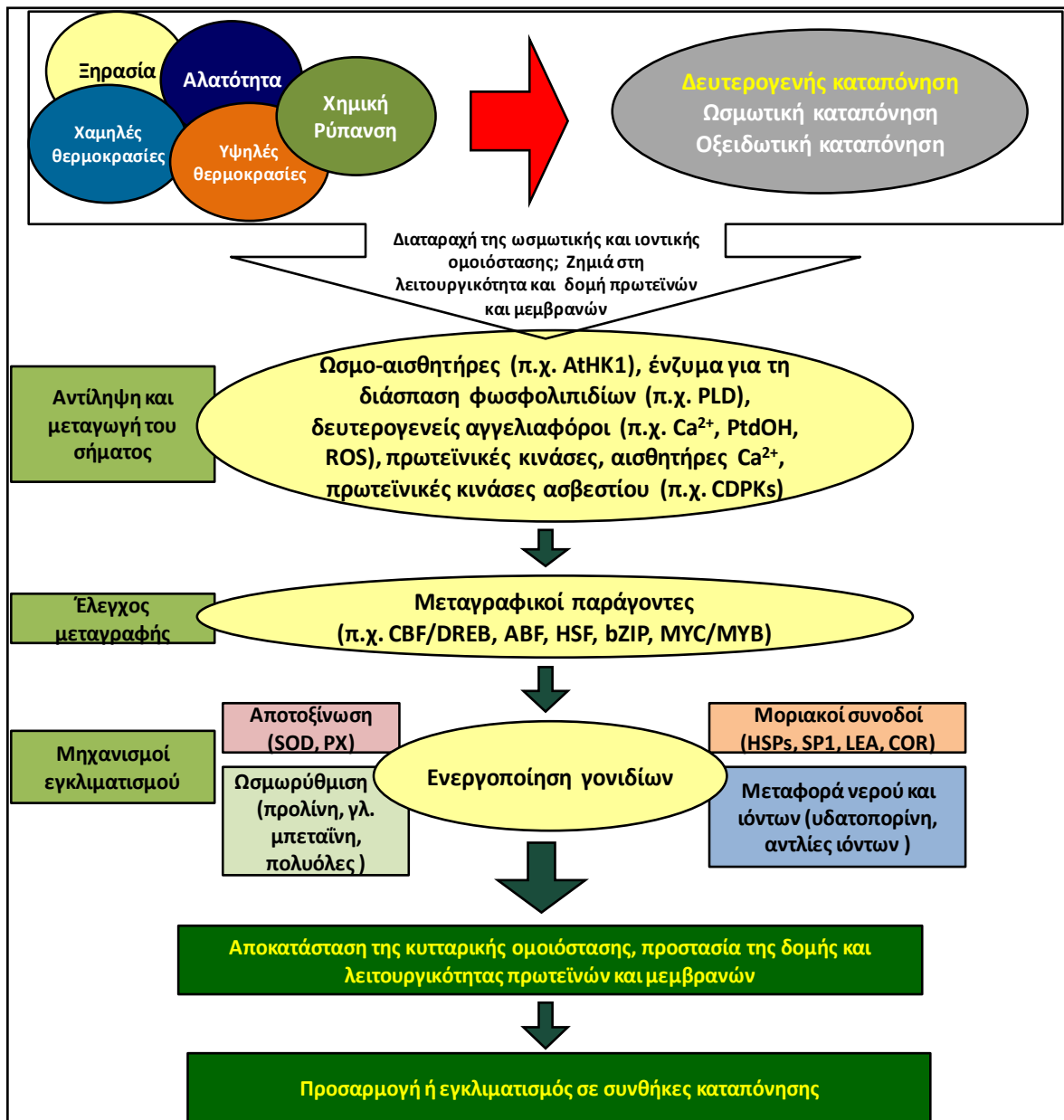
1.1. Οι αρνητικές επιπτώσεις των διαφόρων παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης στα φυτά και οι προσπάθειες μετριασμού τους

Οι αβιοτικές καταπονήσεις έχει αποδειχθεί πως μειώνουν δραματικά την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών, ιδιαίτερα σε ξηρικές και ημι-ξηρικές περιοχές, παγκοσμίως (Bray et al., 2000, Krasensky and Jonak, 2012). Η αλατότητα, η ξηρασία, η χημική ρύπανση και οι ακραίες θερμοκρασίες διαταράσσουν την ωσμωτική και ιοντική ισορροπία του κυττάρου, ενώ παράλληλα αποτελούν αιτία παραγωγής και συσσώρευσης ενεργών ριζών οξυγόνου και αζώτου (Reactive Oxygen Species / Reactive Nitrogen Species: ROS / RNS), προκαλώντας επιπλέον δευτερογενή οξειδωτική (Gill and Tuteja, 2010) και νιτροδωτική (nitrosative stress) (Valderrama et al., 2007) καταπόνηση, αντίστοιχα. Έχει πλέον αποδειχθεί ότι τα φυτά αντιλαμβάνονται τα ερεθίσματα των καταπονήσεων από ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς πρωτεϊνικής φύσης, οι οποίοι διαμέσου διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος (signaling pathways) ενεργοποιούν μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού των κυττάρων (Zhu, 2002, Mahajan and

Tuteja, 2005). Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν τη διαμέσου διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων επιλεκτική επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων ανθεκτικότητας, έχοντας ως αποτέλεσμα τροποποιήσεις στο μεταβολισμό του άνθρακα και του αζώτου, τον έλεγχο της απορρόφησης των ιόντων από τις ρίζες και της μεταφοράς/καταμερισμού τους στα φύλλα, την αδρανοποίηση τοξικών ιόντων σε υποκυτταρικά οργανίδια (χυμοτόπιο), την ωσμωρύθμιση (osmoregulation), και την αύξηση της απόδοσης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού (Wang et al., 2003, Bartel and Sunkar, 2005, Parida and Das, 2005, Mazzucotelli et al., 2008, Munns and Tester, 2008). Ανεπαρκής αντίδραση σε ένα ή περισσότερα στάδια της διαδικασίας μεταγωγής του σήματος και ενεργοποίησης των μηχανισμών προσαρμογής και εγκλιματισμού μπορεί να οδηγήσει σε ανεπανόρθωτη ζημιά στην κυτταρική ισορροπία και στη δομή και λειτουργικότητα των πρωτεϊνών και μεμβρανών, οδηγώντας αναπόφευκτα στον κυτταρικό θάνατο (Διάγραμμα 1).

Η επιστημονική κοινότητα έχει θέσει ως στόχο της τη μελέτη της συμπεριφοράς των καλλιεργούμενων ειδών κατά την έκθεσή τους στις παραπάνω συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων και προσπαθεί μέσω σύγχρονων τεχνικών και μεθόδων να μετριάσει τις επιζήμιες επιπτώσεις τους στην παγκόσμια αγροτική παραγωγή. Αρχικά, η προσπάθεια είχε επικεντρωθεί στις διάφορες καλλιεργητικές τεχνικές, στη συνέχεια στη χρήση ανόργανων και οργανικών ουσιών που δύνανται να προσδίδουν ανθεκτικότητα στα φυτά σε συνθήκες καταπόνησης, ενώ πρόσφατα γίνεται προσπάθεια δημιουργίας ανθεκτικών καλλιεργούμενων ειδών μέσω μοριακών και βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων. Η έρευνα σχετικά με τους μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού καλλιεργούμενων ειδών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων εκτείνεται τόσο σε επίπεδο ολόκληρου φυτού, όσο και σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο.

Η κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας των φυτών έναντι των διαφόρων αβιοτικών καταπονήσεων, και ειδικότερα της αλατότητας, της ξηρασίας και των υψηλών θερμοκρασιών, έχει θεμελιώδη σημασία και αποτελεί ένα από τα βασικότερα θέματα της έρευνας στον τομέα της φυσιολογίας φυτού (Bartel and Sunkar, 2005). Οι αρνητικές συνέπειες των παραπάνω αβιοτικών καταπονήσεων και οι μηχανισμοί προσαρμογής και εγκλιματισμού των φυτών έχουν μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές τα τελευταία χρόνια, με στόχο την ανάδειξη πιθανών βιοχημικών και μοριακών δεικτών ανθεκτικότητας (Schöffl et al., 1999, Ashraf and Harris, 2004, Flowers, 2004). Κατά συνέπεια, έχει αξιολογηθεί η χρήση διαφόρων ενώσεων που εφαρμόζονται εξωγενώς και προσδίδουν



Διάγραμμα 1: Τα στάδια της αντίδρασης των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Πρωτογενείς παράγοντες καταπόνησης, όπως η ξηρασία, η αλατότητα, ο παγετός, οι υψηλές θερμοκρασίες και η χημική ρύπανση, συχνά αλληλοσυνδέονται και προκαλούν κυτταρική ζημιά και δευτερογενή καταπόνηση, όπως ωσμωτική και οξειδωτική καταπόνηση. Το αρχικό ερέθισμα της αβιοτικής καταπόνησης αντιλαμβάνομενο από εξειδικευμένους αισθητήρες ως διαταραχή της ιοντικής και ωσμωτικής ισορροπίας, ή ως ζημιά της δομής και λειτουργικότητας των πρωτεϊνών και μεμβρανών, μεταφέρεται κατόπιν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος (Ca²⁺, ROS, MAPKs, CDPKs, κ.ά.), επηρεάζοντας διαμέσου μεταγραφικών παραγόντων την έκφραση γονιδίων ανθεκτικότητας. Ως αποτέλεσμα, ενεργοποιείται πληθώρα μηχανισμών ανθεκτικότητας επαναφέροντας την κυτταρική ισορροπία μέσω της αποτοξίνωσης και της επιδιόρθωσης των πρωτεϊνών και κυτταρικών μεμβρανών (Πηγή: τροποποίηση από Wang et al., 2003).

έως έναν βαθμό ανθεκτικότητα στα φυτά, όπως οι διάφοροι αζωτούχοι συμβατοί ωσμολύτες (προλίνη ή γλυκίνη-μπεταΐνη) (Wahid and Shabbir, 2005, Raza et al., 2007, Iqbal et al., 2008), αντιοξειδωτικές ενώσεις (γλουταθειόνη και ασκορβικό οξύ) ή ανόργανα στοιχεία όπως το ασβέστιο, το κάλιο και το πυρίτιο (Kaya et al., 2007, Tuna et al., 2008β, Kumar et al., 2011, Tan et al., 2011). Επιπλέον, ορισμένα μόρια, όπως ρυθμιστές της ανάπτυξης (Wang and Li, 2006, Gunes et al., 2007, Tuna et al., 2008α), μόρια σήματος και υποκινητές της μεταγραφής γονιδίων (Mazzucotelli et al., 2008, Urano et al., 2010, Medina et al., 2011), έχει αποδειχθεί ότι προσδίδουν ανθεκτικότητα στα φυτά σε συνθήκες αλατότητας, ξηρασίας και θερμικής καταπόνησης. Οι ουσίες αυτές ουσιαστικά προκαλούν σκληραγώγηση και βιολογική διεγερση (priming) των φυτών πριν την έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Ως εκ τούτου, έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, αφού ο μετριασμός των αρνητικών συνεπειών των αβιοτικών καταπονήσεων που επιφέρουν, είναι πολλές φορές αξιοσημείωτος.

1.2. Η καλλιέργεια της φράουλας

Η καλλιέργεια φυτών του γένους *Fragaria* παρουσιάζει αυξημένο ενδιαφέρον διεθνώς, διότι αφορά σε μια δυναμική καλλιέργεια με μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον. Γενικά, η φράουλα είναι φυτό των ψυχρών περιοχών, απαντάται όμως σε όλα τα γεωγραφικά μήκη και πλάτη της γης, καθότι διαθέτει πολύ μεγάλη γενετική ποικιλομορφία, που της επιτρέπει να προσαρμόζεται σε ποικίλα περιβάλλοντα. Χαρακτηριστικό είναι ότι υπάρχουν περισσότερα από είκοσι διαφορετικά είδη *Fragaria* σε όλο τον κόσμο. Κλειδί για την κατάταξη των ειδών είναι ο αριθμός των χρωμοσωμάτων στο γονιδίωμά τους, αφού τα είδη του γένους *Fragaria* παρουσιάζουν διαφορετική πολυπλοειδία. Ορισμένα είδη είναι διπλοειδή (2 σειρές από 7 χρωμοσώματα, 14 χρωμοσώματα συνολικά), ενώ άλλα είναι τετραπλοειδή (4 σειρές, 28 χρωμοσώματα συνολικά), εξαπλοειδή (έξι σειρές, 42 χρωμοσώματα συνολικά), οκταπλοειδή (οκτώ σειρές, 56 χρωμοσώματα συνολικά), ή δεκαπλοειδή (δέκα σειρές, 70 χρωμοσώματα συνολικά) (Hancock, 1999). Τα περισσότερα είδη έχουν προκύψει από το άγριο είδος φράουλας (*Fragaria vesca*), της οποίας το γονιδίωμα αποκρυπτογραφήθηκε μόλις πρόσφατα (Shulaev et al., 2011). Τα κυριότερα καλλιεργούμενα είδη φράουλας είναι το *Fragaria vesca*, το *Fragaria x ananassa*, το *Fragaria chiloensis*, το *Fragaria iturupensis*

και το *Fragaria virginiana*. Τα είδη και οι ποικιλίες φράουλας διαφέρουν σημαντικά ως προς τα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των καρπών τους, τον βαθμό γονιμότητας, την εποχή ωρίμανσης, την ανθεκτικότητά τους σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης, κ.ά. (Esau, 1977).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) κατά το 2011 η καλλιέργεια φράουλας έφτασε τα 244.283 εκτάρια, ενώ η παραγωγή ήταν 4.594.540 τόνοι, με μέση απόδοση 18.808 kg ανά εκτάριο. Η χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή φράουλας στον κόσμο είναι οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής με 1.312.960 τόνους παραγωγή για το 2011, ενώ σημαντικές παραγωγές χώρες θεωρούνται η Ισπανία, η Τουρκία, η Αίγυπτος, το Μεξικό και η Ρωσική Δημοκρατία με 514.027, 302.416, 240.284, 228.900 και 184.000 τόνους παραγωγής, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την τελευταία δεκαετία παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην παγκοσμια παραγωγή φράουλας (32,66%), η οποία κατά κύριο λόγο οφείλεται στην αύξηση της αποδοτικότητας της καλλιέργειας, αφού η μέση απόδοση ανά εκτάριο αυξήθηκε κατά 36,26%, ενώ η έκταση στην οποία καλλιεργείται η φράουλα δεν παρουσίασε σημαντική διαφοροποίηση (FAOSTAT, 2011). Η παραπάνω αναφορά φαίνεται να επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η κατανάλωση της φράουλας αυξάνεται κάθε χρόνο. Χαρακτηριστικά είναι τα στοιχεία της Υπηρεσίας Οικονομικών Ερευνών του Υπουργείου Γεωργίας των ΗΠΑ για τις προοπτικές των φρούτων και των ξηρών καρπών δένδρων, όπου σύμφωνα με τον Perez (2011) η μέση ετήσια κατανάλωση φράουλας αυξήθηκε από 0,9 kg ανά άτομο το 1980 σε 3,3 kg το 2011 (αύξηση 366%).

Για σκοπούς εμπορικής παραγωγής, τα φυτά φράουλας πολλαπλασιάζονται με στόλωνες, ενώ συνήθως διανέμονται στο εμπόριο είτε ως φυτά ψυγείου (γυμνές ρίζες) ή ως νεαρά φυτάρια. Η εμπορική καλλιέργεια της φράουλας γίνεται συνήθως σε καλυμμένα με πλαστικό σαμάρια ή σε γυμνό έδαφος, και είναι συνήθως ετήσια ή διετής. Επιπλέον, τις τελευταίες δεκαετίες η θερμοκηπιακή καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα για την εκτός εποχής παραγωγή καρπών φαίνεται να αυξάνεται συνεχώς, αφού επιτρέπει στους παραγωγούς να απολαμβάνουν υψηλότερες τιμές.

Ο καρπός της φράουλας, ο οποίος είναι σύνθετο συγκάρπιο, τυγχάνει ευρείας κατανάλωσης, αφού εκτιμάται ιδιαιτέρως για το χαρακτηριστικό του άρωμα, το λαμπερό κόκκινο χρώμα, τη χυμώδη υφή και τη γλυκύτητά του (Wang and Lin, 2003). Επιπρόσθετα, στο καρπό της φράουλας έχουν αποδοθεί αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και καρδιοτονωτικές ιδιότητες, χάρη στη μεγάλη περιεκτικότητά του σε

φαινολικές ενώσεις (με κυρίαρχες τις ανθοκυανίνες, που του προσδίδουν το κόκκινο χρώμα), βιταμίνες A και C, λουτεΐνη και ζεαξανθίνη (Aaby et al., 2005, Aaby et al., 2007, Tulipani et al., 2008, Simirgiotis and Schmeda-Hirschmann, 2010).

Η καλλιέργεια της φράουλας στην Κύπρο ξεκίνησε πριν από 50 περίπου χρόνια. Λόγω της προτίμησης του καρπού της φράουλας από τους Κύπριους καταναλωτές και της ευρείας κατανάλωσής του, η καλλιέργεια της φράουλας έχει επεκταθεί, αποτελώντας πλέον μια σημαντική καλλιέργεια, αποφέροντας σημαντικό εισόδημα στον αγροτικό κόσμο της Κύπρου. Πλέον η φράουλα καλλιεργείται σε όλες τις νότιες, παραθαλάσσιες περιοχές της Κύπρου, κυρίως σε θερμοκηπιακές μονάδες υδροπονικής καλλιέργειας, αλλά και στο έδαφος. Οι ποικιλίες του είδους *Fragaria x ananassa* που καλλιεργούνται στην Κύπρο είναι η Camarosa, η Ventana και η Festival. Η ποικιλία Camarosa είναι η περισσότερο διαδεδομένη, κατέχοντας μερίδιο αγοράς πέραν του 50%. Η ποικιλία αυτή είναι μεσοπρώιμη, ενώ οι καρποί της είναι κωνικοί, αρωματικοί, με έντονο κόκκινο χρώμα, γλυκιά γεύση και σημαντική μετασυλλεκτική αντοχή. Στην Κύπρο είναι αρκετά διαδεδομένη η υδροπονική καλλιέργεια, παρά την κακή ποιότητα του νερού άρδευσης λόγω της υπεράντλησης και της υφαλμύρωσης των υπογείων υδροφορέων. Οι παραγωγοί συνήθως ρυθμίζουν την αλατότητα του νερού άρδευσης αναμειγνύοντας το νερό από τις γεωτρήσεις με βρόχινο, ή αφαλατωμένο νερό. Η υδροπονική καλλιέργεια φράουλας οδηγεί σε υψηλή παραγωγικότητα και μεγάλες αποδόσεις. Σύμφωνα με την έκδοση των Γεωργικών Στατιστικών της Στατιστικής Υπηρεσίας της Κυπριακής Δημοκρατίας, κατά το 2010, η καλλιέργεια φράουλας στην Κύπρο ανήλθε στα 32 εκτάρια, ενώ η παραγωγή υπολογίστηκε στους 1.788 τόνους. Η μέση τιμή παραγωγού κατά το 2010 ήταν 1,85 € ανά kg, ενώ η αξία της συνολικής παραγωγής υπολογίστηκε στα 3.304.224 €.

1.2.1. Συμπεριφορά των φυτών φράουλας κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας, ξηρασίας και υψηλών θερμοκρασιών

Η μείωση στην παραγωγή φράουλας και η υποβάθμιση της ποιότητας των καρπών της, ως συνέπεια της υψηλής αλατότητας του νερού άρδευσης, της ξηρασίας και των υψηλών θερμοκρασιών, είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθιστώντας την καλλιέργεια φράουλας σε πολλές περιπτώσεις μη βιώσιμη. Τα φυτά κατατάσσονται ανάλογα με την ανθεκτικότητά τους κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας, σε ευαίσθητα, μετρίως ανθεκτικά και ανθεκτικά. Η φράουλα κατατάσσεται στα ευαίσθητα στην αλατότητα φυτά, με κατώφλι

ανθεκτικότητας στην ηλεκτρική αγωγιμότητα του νερού άρδευσης, πέραν του οποίου καταγράφεται οικονομική ζημιά, το 1 dS/m (Maas and Hoffman, 1977). Η χρήση νερού άρδευσης υποβαθμισμένης ποιότητας αποτελεί ίσως την κυριότερη αιτία μείωσης της παραγωγής και υποβάθμισης της ποιότητας των καρπών φράουλας. Συχνές αναφορές για σημαντικές ζημιές τόσο στους υπέργειους βλαστούς, όσο και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των καρπών και τη συνολική παραγωγή, όταν καλλιέργειες φράουλας αρδεύονται με νερό που περιέχει μέτριες συγκεντρώσεις αλάτων, καταδεικνύουν τη σημαντικότητα της αλατότητας ως περιοριστικού παράγοντα για την επιτυχή καλλιέργεια της φράουλας (Barroso and Alvarez, 1997, Saied et al., 2005, Keutgen and Pawelzik, 2007β, Husaini and Abdin, 2008, Keutgen and Pawelzik, 2008β, Keutgen and Pawelzik, 2009, Orsini et al., 2012). Ως εκ τούτου, έχει μελετηθεί η εξωγενής εφαρμογή διαφόρων ουσιών, όπως το νιτρικό ασβέστιο και το σαλικυλικό οξύ (SA), με σκοπό τον μετριασμό των επιπτώσεων της αλατότητας σε φυτά φράουλας (Kaya et al., 2002, Karlidag, 2009). Σε τοπικό επίπεδο, έχουν μελετηθεί οι επιδράσεις της αλατότητας στην ανάπτυξη, την παραγωγικότητα και την ποιότητα των καρπών σε καλλιέργεια σμέουρων (Neocleous, 2008β, Neocleous, 2008α, Neocleous and Minas, 2007), καθώς επίσης και η επίδραση της ποικιλίας και του υποστρώματος ανάπτυξης στην εκτός εδάφους καλλιέργεια φράουλας (Neocleous and Vasilakakis, 2012).

Ο Barroso και ο Alvarez (1997) μελέτησαν τα χαρακτηριστικά συμπτώματα και την ανθεκτικότητα δυο ποικιλιών φράουλας, όταν αυτές αρδεύονταν με αλατούχο νερό, σε ένα πείραμα γλάστρας. Οι ποικιλίες Douglas και Toro αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους κατά την άρδευσή τους με νερό που περιείχε 0, 6, 12, 18 ή 24 meq L⁻¹ είτε NaCl, είτε NaHCO₃, ενώ η ποικιλία Douglas σε ένα άλλο πείραμα αξιολογήθηκε ως προς την ανθεκτικότητά της κατά την άρδευσή της με νερό που περιείχε 0, 6, 12 ή 18 meq L⁻¹ είτε NaCl, είτε KCl, είτε Na₂SO₄. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το Na₂SO₄ και το NaHCO₃ δεν προκάλεσαν σημαντικά συμπτώματα στα φυτά, σε αντίθεση με τα χλωριούχα άλατα (NaCl και KCl), τα οποία έδειξαν άμεσα συμπτώματα τοξικότητας στα φύλλα των φυτών φράουλας. Το καρούλιασμα των φύλλων οφειλόταν κατά κύριο λόγο στην αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Cl⁻ στα φύλλα. Επίσης, τα φύλλα παρουσίασαν εκτεταμένες νεκρωτικές κηλίδες, με δοσο-εξαρτώμενο της συγκέντρωσης των ιόντων Cl⁻ τρόπο. Η ποικιλία Toro αποδείχθηκε περισσότερο ανθεκτική στην αλατότητα σε σύγκριση με τη Douglas, ενώ συμπερασματικά αναφέρεται ότι η τοξικότητα και στις δυο ποικιλίες ήταν

μηδενική, όταν η συγκέντρωση ιόντων Cl^- στα φύλλα ήταν μικρότερη από 1% και η ηλεκτρική αγωγιμότητα του νερού άρδευσης μικρότερη από 2 dS/m.

Σε παρόμοια εργασία, ο Saied και οι συνεργάτες του (2005) σε ένα διετές πείραμα αγρού αξιολόγησαν τις συνέπειες της άρδευσης με νερό αυξανόμενης ηλεκτρικής αγωγιμότητας (0,3, 2,6 και 5,1 dS/m) στην ανάπτυξη, την απόδοση και την ποιότητα των καρπών δυο ποικιλιών φράουλας (Elsanta και Korona). Η άρδευση με νερό υψηλής ηλεκτρικής αγωγιμότητας είχε ως συνέπεια τη μείωση της ανάπτυξης του φυτού κατά 44% στην ποικιλία Korona και 90% στην ποικιλία El Santa κατά το πρώτο έτος και κατά 29% και 85% κατά το δεύτερο έτος, αντίστοιχα. Η ανθεκτικότητα της ποικιλίας Korona φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητά της να μην συγκεντρώνει αυξημένες ποσότητες ιόντων Cl^- στα φύλλα. Επιπλέον, η αυξημένη αλατότητα του νερού άρδευσης είχε ως συνέπεια τη μείωση της απόδοσης και των δυο ποικιλιών (27% στην ποικιλία Korona και 64% στην ποικιλία El Santa), ενώ η αποδοχή της ποιότητας των καρπών τους, αξιολογούμενη από συμβούλιο καταναλωτών, μειώθηκε κατά 20% και 35% στις δυο ποικιλίες, αντίστοιχα.

Η Keutgen και η Pawelzik (2009) έχουν μελετήσει την ανθεκτικότητα της ευαίσθητης ποικιλίας φράουλας El Santa, όπως επίσης και της λιγότερο ευαίσθητης ποικιλίας Korona, σε συνθήκες αλατότητας. Συγκεκριμένα, φυτά των δυο ποικιλιών αρδεύτηκαν για 4 μήνες κατά τις καλλιεργητικές περιόδους του 2002 και του 2003 με νερό που περιείχε 0 (αρνητικός μάρτυρας), 40 και 80 mmol L⁻¹ NaCl. Η καταπόνηση των φυτών φράουλας με την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας είχε ως συνέπεια τη μείωση του νωπού και ξηρού βάρους ολόκληρων των φυτών, καθώς και τη μείωση της ενεργής φωτοσυνθετικής φυλλικής επιφάνειας, ιδιαίτερα στην ποικιλία El Santa. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν τυπικά συμπτώματα νέκρωσης στα φύλλα και των δυο ποικιλιών, ιδιαίτερα κατά την άρδευση των φυτών με νερό που περιείχε 80 mmol L⁻¹ NaCl. Η πρόσληψη ιόντων Na^+ ήταν όμοια και στις δυο ποικιλίες, όμως η κατανομή τους στα φυτά ήταν διαφορετική, αφού τα φυτά της ποικιλίας Korona κατάφεραν να περιορίσουν τη συγκέντρωση των ιόντων Na^+ στα φύλλα τους, διατηρώντας παράλληλα τη ζωτικότητα των φύλλων τους σε μεγαλύτερο βαθμό, σε σχέση με την ποικιλία El Santa. Τέλος, η αλατότητα είχε ως συνέπεια τη διαφοροποίηση της συγκέντρωσης των περισσότερων στοιχείων (K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , N^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}) σε διάφορους ιστούς των φυτών φράουλας, αφού επηρεάζει την πρόσληψή τους από το ριζικό σύστημα και τον καταμερισμό τους στα διάφορα μέρη του φυτού. Σε μια ανάλογη πρόσφατη εργασία, ο Orsini και οι συνεργάτες του (2012) αξιολόγησαν την

ανθεκτικότητα των ποικιλιών φράουλας Elsanta και Elsinore κατά την άρδευσή τους με νερό που περιείχε 0, 10, 20, 40 mmol L⁻¹ NaCl, και αποκάλυψαν ότι η ποικιλία Elsanta είναι πιο ανθεκτική σε σύγκριση με την ποικιλία Elsinore, η οποία παρουσίασε εκτεταμένες ζημιές κατά την άρδευσή της με νερό που περιείχε 40 mmol L⁻¹ NaCl. Η ανθεκτικότητα των φυτών της ποικιλίας Elsanta σε σύγκριση με την ποικιλία Elsinore φαίνεται να οφείλεται στη μειωμένη πυκνότητα των στομάτων (173 έναντι 234 στομάτων ανά mm⁻², αντίστοιχα) και στη συγκράτηση του ρυθμού διαπνοής (14,7 έναντι 17,7 g H₂O ανά φυτό h⁻¹, αντίστοιχα). Η συγκράτηση του ρυθμού διαπνοής στα φύλλα της ποικιλίας Elsanta φαίνεται ότι καθυστέρησε τη συσσώρευση τοξικών ιόντων στα φύλλα, διατήρησε την ενυδάτωση των φύλλων και συνεισέφερε στον καλύτερο εγκλιματισμό των φυτών στο υπερ-οσμωτικό περιβάλλον ανάπτυξής τους.

Οι δυσμενείς συνέπειες της αλατότητας στην ποιότητα του καρπού της φράουλας μελετήθηκαν εκτεταμένα κατά την τελευταία δεκαετία, ιδιαίτερα από την Keutgen και την Pawelzik, οι οποίες χρησιμοποίησαν στις μελέτες τους φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας Elsanta, όπως επίσης και της λιγότερο ευαίσθητης ποικιλίας Korona, τα οποία αρδεύονταν με νερό που περιείχε 0 (αρνητικός μάρτυρας), 40 και 80 mmol L⁻¹ NaCl. Σε μία από τις εργασίες τους, η Keutgen και η Pawelzik έδειξαν ότι η αυξημένη συγκέντρωση NaCl στο διάλυμα άρδευσης μείωσε το μέσο βάρος των καρπών, ενώ το ξηρό βάρος, η ολική συγκέντρωση υδατοδιαλυτών υδατανθράκων, καθώς και ο δείκτης γλυκύτητας, παρέμειναν σταθεροί. Επίσης, η αλατότητα αύξησε το αντιοξειδωτικό δυναμικό των καρπών και των δυο ποικιλιών, αφού οι κυριότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις (ασκορβικό οξύ, ανθοκυανίνες, σουπεροξειδική δισμουτάση) ποσοτικοποιούνταν σε υψηλότερα επίπεδα στους καρπούς των καταπονημένων φυτών, σε σχέση με αυτούς των φυτών του αρνητικού μάρτυρα. Επίσης καταγράφηκε αύξηση στη συγκέντρωση διαφόρων επιλεγμένων ανόργανων στοιχείων (Na⁺, Cl⁻, K⁺, N, P και Zn²⁺), καθώς επίσης και στο επίπεδο της υπεροξειδωσίας των μεμβρανικών λιπιδίων στα φυτά που αρδεύονταν με νερό αυξημένης συγκέντρωσης NaCl (Keutgen and Pawelzik, 2008β). Επιπλέον, η Keutgen και η Pawelzik, αναφέρουν ότι η αυξημένη συγκέντρωση NaCl στο νερό άρδευσης είχε αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα των καρπών φράουλας, ιδιαίτερα της ευαίσθητης ποικιλίας Elsanta, καθώς οι καρποί ήταν λιγότερο εύγεστοι και δεν ικανοποίησαν τις απαιτήσεις των καταναλωτών. Αναλύοντας διάφορα βιοχημικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των καρπών, κατέδειξαν ότι η συγκέντρωση των σακχάρων (σουκρόζη) στους καρπούς που συγκομίστηκαν από τα καταπονημένα φυτά ήταν μειωμένη, ενώ

αντίθετα, η συγκέντρωση των οργανικών οξέων (οξικό και κιτρικό οξύ) και των διαλυτών στερεών αυξήθηκε, σε σχέση με τους καρπούς του αρνητικού μάρτυρα (Keutgen and Pawelzik, 2007β). Σε μια παρόμοια εργασία, η Keutgen και η Pawelzik έδειξαν ότι η αυξημένη ηλεκτρική αγωγιμότητα στο νερό άρδευσης οδήγησε στην αύξηση της υπεροξειδωσής των μεμβρανικών λιπιδίων, καθώς επίσης και στην αύξηση της συγκέντρωσης της προλίνης, της ασπαριγίνης και της γλουταμίνης, στους καρπούς φράουλας. Η αύξηση των ουσιών αυτών είναι δυνατόν να οδηγεί τους καρπούς σε ωσμωτική ομοιόσταση. Τέλος, η αύξηση στη συγκέντρωση της προλίνης, της ασπαριγίνης και της γλουταμίνης στους καρπούς φράουλας ίσως να αποτελεί ένδειξη της ζημιάς στους καρπούς λόγω της ιοντικής καταπόνησης (Keutgen and Pawelzik, 2008α).

Η συσχέτιση της αυξημένης αλατότητας με το αντιοξειδωτικό δυναμικό καρπών φράουλας ήταν το αντικείμενο μελέτης μιας άλλης εργασίας της Keutgen και της Pawelzik (2007α). Συγκεκριμένα, η Keutgen και η Pawelzik κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μέτρια καταπόνηση φυτών φράουλας της λιγότερο ευαίσθητης ποικιλίας Korona ($40 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$ στο νερό άρδευσης) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού των καρπών, αφού η δραστηριότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης, καθώς και οι συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης, των φαινολών και των ανθοκυανινών, αυξήθηκαν σημαντικά. Τα αποτελέσματα της πιο πάνω έρευνας καταδεικνύουν τη δυνατότητα καταπόνησης με χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl στο νερό άρδευσης των λιγότερο ευαίσθητων ποικιλιών φράουλας, με στόχο τη βελτιστοποίηση της ποιότητας και του αντιοξειδωτικού δυναμικού των καρπών τους.

Η διαγονιδιακή τεχνολογία προσφέρει σήμερα την καλύτερη προοπτική για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων, αφού η παραδοσιακή τεχνική της επιλογής με την αναπαραγωγή, δεν έχει ιδιαίτερα καλά αποτελέσματα. Η φράουλα, λόγω της γενετικής πολυπλοειδίας που τη χαρακτηρίζει, δεν κατέστη δυνατό να βελτιωθεί μέσω της τεχνικής της επιλογής, και ως εκ τούτου η διαγονιδιακή τεχνολογία είναι η μονή εφικτή προσέγγιση για τη βελτίωση της ανθεκτικότητάς των φυτών φράουλας κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Ο Husaini και ο Abdin (2008) αναφέρουν την επιτυχή εισαγωγή γονιδίων απευθείας σε φυτά φράουλας, με συνέπεια την αύξηση της ανθεκτικότητάς τους κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου της ωσμωτίνης (osmotin gene) στα διαγονιδιακά φυτά φράουλας είχε ως συνέπεια την αύξηση των επιπέδων της προλίνης, των ολικών διαλυτών πρωτεϊνών και της χλωροφύλλης στα

φυτά αυτά, σε σχέση με τα φυτά άγριου τύπου. Το πρότυπο ανάπτυξης των διαγονιδιακών φυτών που υπερ-έκφραζαν το γονίδιο της ωσμοτίνης δεν έδειξε καμία ανωμαλία, πέραν από τον μικρότερο ρυθμό ανάπτυξής τους, σε σχέση με τα φυτά άγριου τύπου.

Όσον αφορά στην επίδραση της ξηρασίας σε είδη του γένους *Fragaria*, ο Grant και οι συνεργάτες του (2012) αξιολόγησαν τις επιπτώσεις στη φυσιολογία και τον ρυθμό ανάπτυξης των φυτών 4 ποικιλιών του καλλιεργούμενου είδους *Fragaria* × *ananassa*, όπως επίσης και 4 ποικιλιών του πρόδρομου είδους της καλλιεργούμενης φράουλας (*Fragaria Chiloensis*), κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες μειωμένης άρδευσης (65% της εξατμισοδιαπνοής). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παραγωγή νέων φύλλων, η στοματική αγωγιμότητα και ο ρυθμός φωτοσύνθεσης μειώθηκαν σημαντικά κάτω από συνθήκες ελλειμματικής άρδευσης, και ότι οι παράμετροι αυτοί διάφεραν σημαντικά μεταξύ των γενότυπων. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του γενότυπου και της άρδευσης όσον αφορά στον ρυθμό διαπνοής, στη φυλλική επιφάνεια, στην ξηρή μάζα, στην παραγωγή στόλωνων, στο υδατικό δυναμικό και στην αποδοτικότητα χρήσης νερού, καταδεικνύοντας ότι ορισμένοι γενότυποι επηρεάζονται πολύ περισσότερο από την ξηρασία, σε σχέση με άλλους. Η μεγαλύτερη αντοχή στην ξηρασία που παρουσίασαν 3 γενότυποι του πρόδρομου είδους *Fragaria Chiloensis* αποδόθηκε στον περιορισμό των απωλειών νερού και στη μειωμένη ανάπτυξη των φυτών αυτών.

Με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης των υψηλών θερμοκρασιών στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό και στην παραγωγικότητα φυτών του είδους *Fragaria* × *ananassa*, ο Kadir και οι συνεργάτες του (2006) έκθεσαν φυτά των ποικιλιών Chandler και Sweet Charlie σε 3 επίπεδα θερμοκρασιών (υψηλή, μέτρια και χαμηλή θερμοκρασία με θερμοπερίοδο 40/35, 30/25 και 20/15 °C, αντίστοιχα) και εξέτασαν τις συνέπειες στο καθαρό ποσοστό αφομοίωσης CO₂, στον μεταβλητό φθορισμό της χλωροφύλλης (F_v), στη μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα (F_v/F_m), στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης, στην ανάπτυξη των φυτών, στην απόδοση της καλλιέργειας και στην ποιότητα των παραγόμενων καρπών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υψηλή θερμοκρασία ήταν πιο επιζήμια για τη φωτοσύνθεση και την παραγωγικότητα, σε σύγκριση με τη μέτρια και τη χαμηλή θερμοκρασία. Το καθαρό ποσοστό αφομοίωσης του CO₂ ήταν σημαντικά μειωμένο στα φυτά και των δυο ποικιλιών που εκτέθηκαν σε θερμοπερίοδο 40/35 °C, όπως επίσης και η μεσοκυττάρια συγκέντρωση του CO₂ και η αποδοτικότητα χρήσης του νερού (WUE). Οι αλλαγές στην παράμετρο F_v, όπως επίσης και στο λόγο F_v/F_m, ως συνέπεια της

έκθεσης των φυτών σε θερμοπερίοδο 40/35 °C, κατέδειξαν τη μη αναστρέψιμη βλάβη του PSII κατά την έκθεση των φυτών σε αυτές τις συνθήκες. Το μειωμένο ποσοστό αφομοίωσης του CO₂ κατά την έκθεση των φυτών και των δυο ποικιλιών σε θερμοπερίοδο 40/35 °C αποδείχθηκε ότι σχετίζεται με τις αλλαγές στο λόγο F_v/F_m, παρά στη μειωμένη στοματική αγωγιμότητα. Επιπλέον, η έκθεση των φυτών σε θερμοπερίοδο 40/35 °C οδήγησε στη μείωση της συνολικής φυλλικής επιφάνειας, καθώς επίσης και της βιομάζας του βλαστού, της ρίζας, και των φύλλων. Η αποδοτικότητα της ποικιλίας Chandler ήταν υψηλότερη κατά την έκθεση των φυτών σε θερμοπερίοδο 30/25 και 40/35 °C, σε σχέση με τη ποικιλία Sweet Charlie, ενώ το χρώμα των καρπών ήταν εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία μόνο στη ποικιλία Chandler. Τέλος, αποδείχθηκε ότι η έκθεση των φυτών και των δυο ποικιλιών σε θερμοκρασία 30/25 °C για περισσότερο από δύο εβδομάδες ήταν επιζήμια για την ανάπτυξη των ανθέων, ενώ θερμοκρασίες 40/35 °C ήταν ιδιαίτερα επιζήμιες για την καρπόδεση.

1.3. Βιολογική διέγερση (Priming) για την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών κατά την έκθεσή τους σε δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα

Η μεταχείριση με έναν παράγοντα επαγωγής της ανθεκτικότητας μπορεί να ενισχύσει την ανθεκτικότητα των φυτών, ως αποτέλεσμα της ταχύτερης και/ή της ισχυρότερης αντίδρασης του μηχανισμού προσαρμογής και εγκλιματισμού κατά τη στιγμή της έκθεσης των φυτών σε παράγοντες βιοτικής ή αβιοτικής καταπόνησης. Το φαινόμενο αυτό είναι κοινώς γνωστό ως βιολογική διέγερση, ή επαγωγή, ή έναυση, ή γόμωση ή ευαισθητοποίηση (priming). Η βιολογική διέγερση επιταχύνει και αυξάνει την ικανότητα του φυτού να ενεργοποιεί τους μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού που είναι υπεύθυνοι για την αντιμετώπιση του παράγοντα καταπόνησης που αντιμετωπίζει (Conrath et al., 2006). Τα φυτά μπορούν να εισέλθουν σε κατάσταση βιολογικής διέγερσης μετά από τη μόλυνσή τους με νεκρωτικά παθογόνα, την αποίκιση του ριζικού τους συστήματος με είδη ωφέλιμων μικροοργανισμών ή τη μεταχείρισή τους με διάφορες φυσικές ή συνθετικές ενώσεις. Τα φυτά που βρίσκονται σε κατάσταση βιολογικής διέγερσης εμφανίζονται υγιέστερα έναντι μη διεγερμένων, ή αυτών που οι μηχανισμοί προσαρμογής και εγκλιματισμού ενεργοποιήθηκαν λόγω της έκθεσής τους σε παράγοντες καταπόνησης. Ως

εκ τούτου, τα οφέλη της βιολογικής διέγερσης αντισταθμίζουν το ενεργειακό της κόστος, κυρίως σε δυσμενή περιβάλλοντα (van Hulten et al., 2006). Αν και η βιολογική διέγερση αποτελεί φαινόμενο το οποίο ήταν γνωστό για δεκαετίες, μόλις τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί πρόοδος στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που κρύβονται πίσω από αυτή (Goellner and Conrath, 2008, Ton et al., 2009).

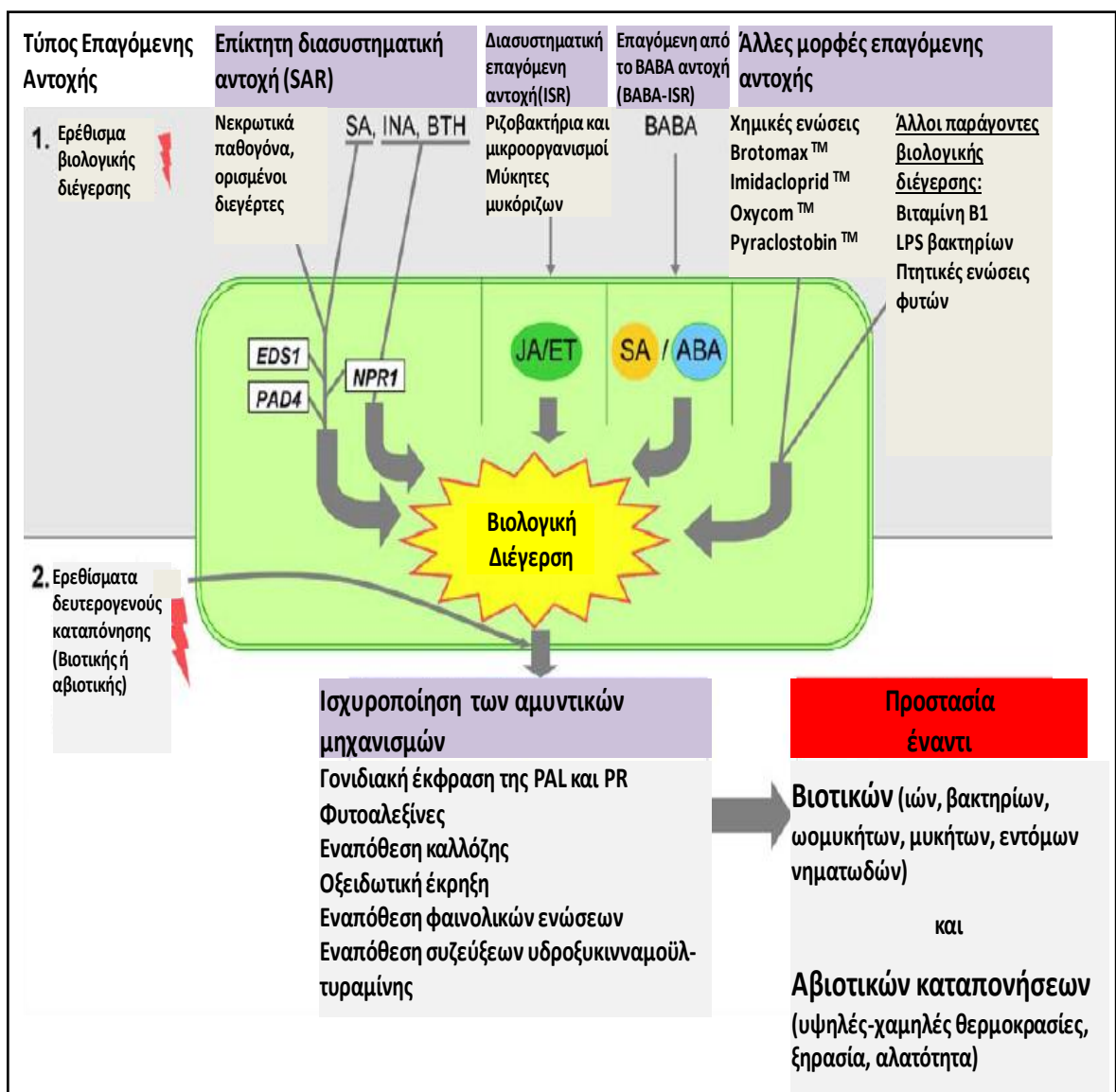
Πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα έχουν αποκαλύψει διάφορες μορφές επαγόμενης ανθεκτικότητας με βάση το είδος του ερεθίσματος, τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται, καθώς και το εύρος των καταπονήσεων στο οποίο δύνανται να επάγουν την ανθεκτικότητα (Διάγραμμα 2). Η επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα (Systemic Acquired Resistance-SAR) αποτελεί το κλασικότερο παράδειγμα. Η SAR επάγεται μετά από προσβολή των φυτών από παθογόνα και καθιστά ετοιμοπόλεμα όργανα και ιστούς που δεν έχουν υποστεί προσβολή. Επιπλέον, ενεργοποιείται μέσω του μονοπατιού μεταγωγής σήματος στο οποίο εμπλέκεται το SA και η ρυθμιστική πρωτεΐνη NPR1 (Dong, 2004), και είναι αποτελεσματική κυρίως έναντι βιοτροφικών (biotrophic) παθογόνων (Ton et al., 2002).

Ανάλογη αντίδραση εκδηλώνεται και μετά την προσέγγιση όχι μόνο παθογόνων, αλλά και συμβιωτικών μικροοργανισμών (π.χ. ριζόβια). Η αντίδραση αυτή αναφέρεται ως διασυστηματική επαγόμενη ανθεκτικότητα (Systemic Induced Resistance-ISR) (van Loon et al., 1998), δρα ανεξάρτητα του SA, αλλά απαιτεί την παρουσία της NPR1 πρωτεΐνης, του ιασμονικού οξέος (JA) και του αιθυλενίου (ET) (Pieterse et al., 1998). Η διασυστηματική επαγόμενη ανθεκτικότητα είναι αποτελεσματική εναντίον παθογόνων και εντόμων τα οποία είναι ευαίσθητα στην εξαρτώμενη από το JA και το ET ανθεκτικότητα (Ton et al., 2002).

Η επαγόμενη από το β-αμινοβουτυρικό οξύ ανθεκτικότητα (β-aminobutyric acid Induced Resistance- BABA-IR) αποτελεί ένα άλλο είδος επαγόμενης ανθεκτικότητας, στην οποία τα μονοπάτια μεταγωγής που μεσολαβούν διαφέρουν από αυτά των δυο προηγούμενων. Στην εκδήλωση της BABA-IR εμπλέκονται πέραν από το SA και την πρωτεΐνη NPR1 (Zimmerli et al., 2000), το αμπισισικό οξύ (ABA) και τα φωσφοϊνοσιτίδια (στην περίπτωση παθογόνων μυκήτων) (Ton et al., 2005). Η BABA-IR είναι αποτελεσματική τόσο εναντίον βιοτροφικών και νεκροτροφικών (necrotrophic) παθογόνων, όσο και εναντίον διαφόρων μορφών αβιοτικής καταπόνησης (Ton and Mauch-Mani, 2004, Jakab et al., 2005). Η αποτελεσματικότητα της BABA-IR έναντι παθογόνων μυκήτων και ωομυκήτων συνδέεται εκτός των άλλων με την αυξημένη εναπόθεση

καλλόζης (β-1,3 πολυμερές της γλυκόζης, callose) στις θέσεις διείσδυσης των μυκηλιακών υφών στα φυτικά κύτταρα (Ton et al., 2009).

Η επαγόμενη μέσω των πτητικών οργανικών ενώσεων ανθεκτικότητα (Volatile Organic Compounds Induced Resistance - VOC-IR) αφορά στην έκκριση οργανικών πτητικών ενώσεων από τα φυτά ως συνέπεια της προσβολής τους από έντομα. Οι οργανικές αυτές πτητικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να καθιστούν τα γειτονικά φυτά ανθεκτικά σε μελλοντικές προσβολές από παθογόνα και έντομα. Στη VOC-IR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του JA (Kishimoto et al., 2005), και πιθανώς του ET (van Loon et al., 2006).



Διάγραμμα 2: Μηχανισμοί βιολογικής διέγερσης και επαγόμενης ανθεκτικότητας στα φυτά (Πηγή: τροποποίηση από Goellner and Conrath, 2008).

1.3.1. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη βιολογική διέγερση

Οι μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται για τη βιολογική διέγερση δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως, ωστόσο έχουν διατυπωθεί ορισμένες υποθέσεις. Η επικρατούσα άποψη θεωρεί ότι η βιολογική διέγερση σχετίζεται με 4 κυρίως παράγοντες:

A. Στη συσσώρευση μιτωτικών κινασών σε λανθάνουσα κατάσταση, ώστε η μεταγωγή σήματος σε περίπτωση νέας έκθεσης σε παράγοντα καταπόνησης να είναι ταχύτερη (Conrath et al., 2006, Bruce et al., 2007, Beckers et al., 2009).

B. Στη συσσώρευση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων (TF), οι οποίοι ενεργοποιούνται κατά την έκθεση των φυτών σε κάποιο παράγοντα καταπόνησης οδηγώντας σε ταχύτερη και ισχυρότερη μεταγραφή των γονιδίων ανθεκτικότητας.

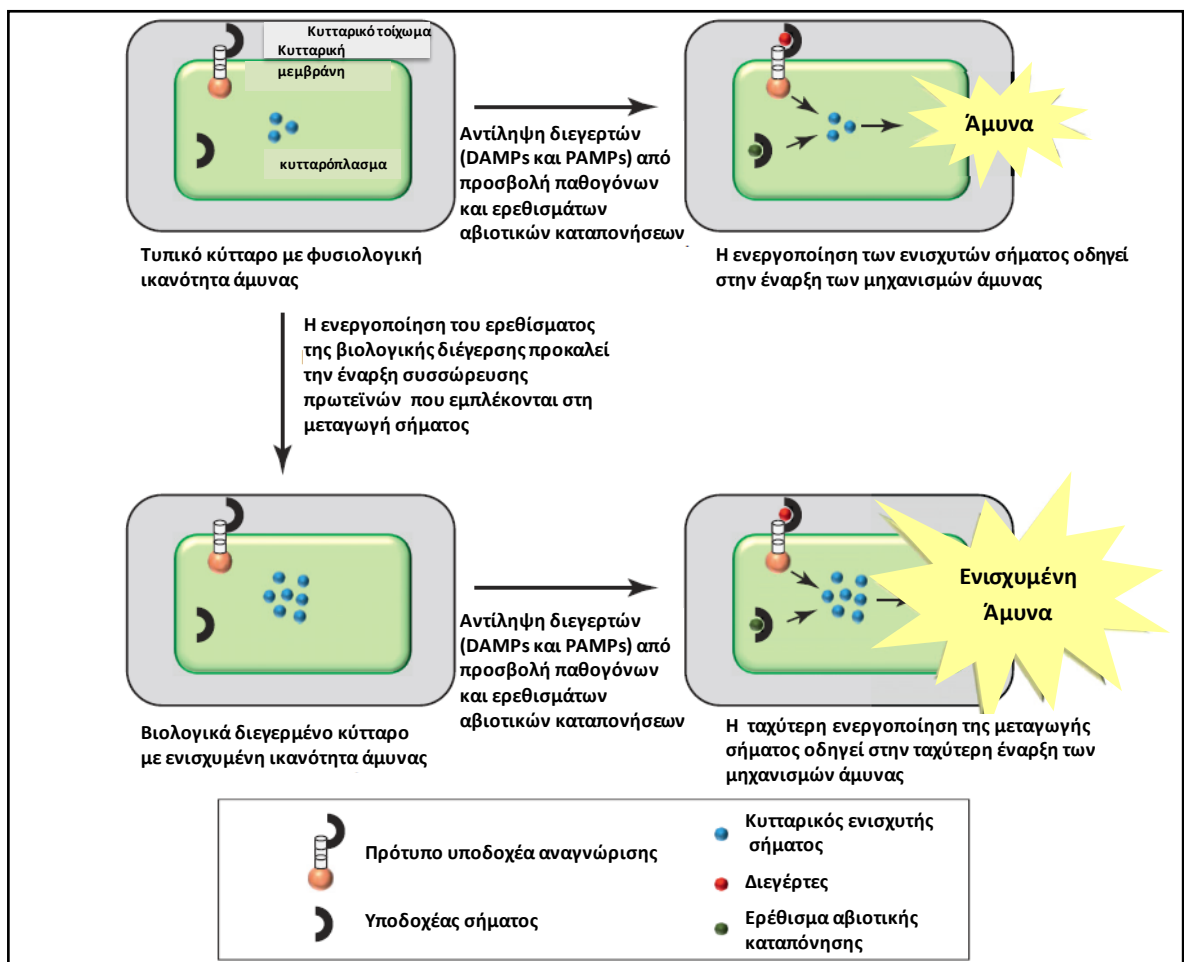
Γ. Σε τροποποιήσεις της δομής της χρωματίνης οι οποίες συμβάλλουν στην ταχύτερη μεταγραφή γονιδίων ανθεκτικότητας. Οι τροποποιήσεις αυτές αφορούν στην αλληλεπίδραση ιστονών-DNA έτσι ώστε τα γονίδια που πρόκειται να μεταγραφούν να βρίσκονται σε περισσότερο ενεργή κατάσταση (Bruce et al., 2007).

Δ. Σε τροποποιήσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού ώστε να υπάρχουν συνεχώς διαθέσιμα αποθέματα ενέργειας με τη μορφή ATP (Sumbele et al., 2012).

Αναλυτικότερα, η βιολογική διέγερση σχετίζεται με τη σύνθεση και βιο-συσσώρευση ανενεργών πρωτεϊνών καθώς και τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση διαφόρων πρωτεϊνών, με σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή ή/και την ενίσχυση της μεταγραφής του σήματος των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (Conrath et al., 2006, Bruce et al., 2007). Κατ' επέκταση, η μετέπειτα έκθεση των φυτών σε σήματα βιοτικής ή αβιοτικής καταπόνησης είναι δυνατόν να ενεργοποιεί τις συσσωρευμένες ανενεργές πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα μη βιολογικά διεγερμένα φυτά, με συνέπεια την ενίσχυση του σήματος που οδηγεί σε γρηγορότερη και εντονότερη ενεργοποίηση του μηχανισμού προσαρμογής και εγκλιματισμού, στην ανοσία και στην ανθεκτικότητα. Ο προτεινόμενος μηχανισμός αντιμετώπισης του παράγοντα καταπόνησης ενεργοποιείται τελικώς από διεγέρτες παθογόνων (τελεστές, DAMPs, PAMPs), καθώς και ερεθίσματα αβιοτικών καταπονήσεων, όπως η ζημιά στη δομή και λειτουργία των μεμβρανών και των πρωτεϊνών (Διάγραμμα 3).

Η βιολογική διέγερση προκαλεί την αυξημένη μεταγραφή γονιδίων που άμεσα σχετίζονται με την προσαρμογή και τον εγκλιματισμό του φυτού (van Wees et al., 1999, Zimmerli et al., 2000, Kohler et al., 2002). Κατά συνέπεια, έχει εξεταστεί και έχει δειχθεί

ότι οι TF διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση και επαγωγή της κατάστασης βιολογικής διέγερσης στα φυτά. Κατά τη βιολογική διέγερση συσσωρεύονται διάφοροι TF, οι οποίοι ενεργοποιούνται κατά την έκθεση των φυτών σε κάποιο παράγοντα καταπόνησης. Η αυξημένη παρουσία TF στα διεγερμένα φυτά επιτρέπει την ταχύτερη και εντονότερη μεταγραφή της ομάδας γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών στον κάθε επιμέρους παράγοντα καταπόνησης. Για τη διερεύνηση του ρόλου των TF στη βιολογική διέγερση κατά τη BABA- και με το WCS417r βακτήριο-ISR επαγόμενη ανθεκτικότητα σε φυτά *Arabidopsis*, ο van der Ent και οι συνεργάτες του (2009) εξέτασαν το μεταγραφικό προφίλ περίπου 2200 γονιδίων TF με τη χρήση qPCR και έδειξαν ότι η έκφραση τουλάχιστον 250 TF είχε αυξηθεί, αποδεικνύοντας την εμπλοκή τους στη λειτουργία της βιολογικής διέγερσης.



Διάγραμμα 3: Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της βιολογικής διέγερσης. Η συσσώρευση στο κύτταρο πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος ερεθισμάτων καταπόνησης προκαλεί ταχύτερη ενεργοποίηση του μηχανισμού προσαρμογής και εγκλιματισμού (Πηγή: τροποποίηση από Conrath, 2011).

Πρόσφατα έχει αποκαλυφθεί ο πιθανός ρόλος των ενεργών μιτωτικών πρωτεϊνικών κινάσεων (MAPKs) στη βιολογική διέγερση των φυτών, καθώς έχει παρατηρηθεί συσσώρευση ανενεργών MAPKs σε φυτά *Arabidopsis* που βρίσκονταν σε κατάσταση βιολογικής διέγερσης (Beckers et al., 2009). Σε αυτή την εργασία, η βιολογική διέγερση φυτών *Arabidopsis* με τον εστέρα benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl, ένα συνθετικό ανάλογο της φυτικής ορμόνης SA, είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη συσσώρευση mRNA των ενεργών πρωτεϊνικών κινάσεων MAPK3 και MAPK6.

Τέλος, ουσιαστικό ρόλο στη βιολογική διέγερση των φυτών φαίνεται να διαδραματίζει και η τροποποίηση της δομής της χρωματίνης, η οποία ως βασικό συστατικό των χρωμοσωμάτων είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, επιτρέποντας την ταχύτερη και πιο εύρωστη μεταγραφή των γονιδίων ανθεκτικότητας (Bruce et al., 2007). Η χρήση ουσιών που επάγουν τη βιολογική διέγερση είναι δυνατόν να προκαλεί ομοιοπολικές τροποποιήσεις στη δομή των ιστονών, όπως μεθυλίωση, ακετυλίωση ή ουβικιτίνωση, οι οποίες μειώνουν την ιοντική αλληλεπίδρασή τους με το DNA, έχοντας ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της δομής της χρωματίνης. Η τροποποίηση αυτή στη δομή της χρωματίνης διευκολύνει την προσέλκυση ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων και άλλων δραστικών πρωτεϊνών, όπως και της RNA πολυμεράσης, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μεταγραφής των γονιδίων ανθεκτικότητας και την προσαρμογή και τον εγκλιματισμό των φυτών σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (van den Burg and Takken, 2009, Jaskiewicz et al., 2011)

1.3.2. Βιολογική διέγερση φυτών με τη χρήση χημικών ενώσεων για επαγωγή της ανθεκτικότητάς τους σε δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα

Έχει ήδη αναφερθεί ότι το μη πρωτεϊνικό αμινοξύ β-αμινοβουτυρικό οξύ (BABA) είναι δυνατόν να επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών έναντι διαφόρων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Το BABA επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών καπνού έναντι του ιού του μωσαϊκού του καπνού, κυρίως μέσω της διέγερσης του μονοπατιού μεταγωγής σήματος του SA (Siegrist et al., 2000). Επιπλέον, ο Oka και οι συνεργάτες του (1999) έδειξαν ότι ο ψεκασμός της φυλλικής επιφανείας τομάτας ή η διαβροχή του εδάφους της καλλιέργειας με το BABA, μείωσε τους κόμβους στις ρίζες ως συνέπεια της προσβολής από ριζόκομβους νηματώδεις σε 7 ημέρες, ενώ παρατηρήθηκε μείωση των αυγών του νηματώδη μετά από 30 ημέρες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι μικρότερος αριθμός

νηματώδων δευτέρου σταδίου μπορούσαν να προσβάλλουν τις ρίζες που έτυχαν μεταχείρισης με BABA, ενώ η ανάπτυξή τους ήταν περιορισμένη. Εκτός από την ανθεκτικότητα στη προσβολή από τους νηματώδεις, η μεταχείριση διαφόρων ειδών της οικογένειας Brassicaceae με το BABA φαίνεται να έχει ευεργετικές συνέπειες ως προς την ανθεκτικότητα των φυτών έναντι δυο ειδών αφίδων (*Myzus persicae* και *Brevicoryne brassicae*), όπως επίσης και έναντι των προνυμφών δυο ειδών λεπιδοπτέρων εντόμων (*Trichoplusia ni* και *Plutella xylostella*) (Hodge et al., 2006).

Κατά την τελευταία δεκαετία, έχει επίσης αποδειχθεί ότι η βιολογική διέγερση διαφόρων φυτικών ειδών με BABA έχει ως συνέπεια την αύξηση της ανθεκτικότητάς τους έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων. Συγκεκριμένα, ο Jakab και οι συνεργάτες του (2005) έδειξαν ότι η μεταχείριση φυτών *Arabidopsis thaliana* με BABA είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του ABA, η οποία με τη σειρά της οδήγησε σε αυξημένη έκφραση των SA εξαρτώμενων γονιδίων *PR-1* και *PR-5* και των ABA εξαρτώμενων γονιδίων ανθεκτικότητας *RAB-18* και *RD-29A*, καθώς επίσης και στο κλείσιμο των στομάτων, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στα φυτά σε συνθήκες αλατότητας και ξηρασίας. Σε μια παρόμοια έρευνα, ο Macarism και οι συνεργάτες του (2009) έδειξαν ότι η εξωγενής εφαρμογή BABA είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανθεκτικότητας σποροφύτων αγριομηλιάς σε συνθήκες ξηρασίας. Η ανθεκτικότητα αυτή οφειλόταν στη μείωση της σύνθεσης της λιγνίνης και στην αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου μεθυλεστεράση της πηκτίνης, που είχαν ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της συγκέντρωσης διαφόρων πρωτεϊνών των κυτταρικών μεμβρανών που οδηγούν στη μείωση της διαπνοής των φυτών σε συνθήκες ξηρασίας.

Ο Stichert και οι συνεργάτες του (1997) σε άρθρο ανασκόπησης αναφέρονται σε ορισμένες χημικές ενώσεις που επάγουν την ανθεκτικότητα στα φυτά κατά την έκθεσή τους σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Η βιοσύνθεση της φυτοαλεξίνης σκαπαρόνης (6,7-dimethoxycoumarin) έχει συσχετισθεί με τη μετασυλλεκτική αντοχή καρπών εσπεριδοειδών έναντι του παθογόνου *Phytophthora parasitica*. Συγκεκριμένα, το Brotomax, ένα εμπορικό σκεύασμα το οποίο δρα ως βιοδιεγερτικό της ανάπτυξης και της ενίσχυσης της άμυνας των φυτών και περιέχει τον χηλικό παράγοντα aluminium lignosulphonate, αποδείχθηκε πως προάγει την αντοχή καρπών εσπεριδοειδών έναντι του παθογόνου *Phytophthora parasitica*, μέσω της βιολογικής διέγερσης ως συνέπεια της αυξημένης βιοσύνθεσης της φυτοαλεξίνης σκαπαρόνης (Ortuno et al., 1997). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η εφαρμογή του μυκητοκτόνου Pyraclostrobin επάγει την

ανθεκτικότητα φυτών καπνού της ποικιλίας Xanthi nc. έναντι προσβολών από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV) και το παθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. tabaki (Herms et al., 2002). Τα αποτελέσματα του Herms και των συνεργατών του υποδηλώνουν ότι το μυκητοκτόνο Pyraclostrobin πέραν της άμεσης αντιμυκητιακής του δράσης, προστατεύει τα φυτά μέσω της βιολογικής διέγερσης και της ενίσχυσης της αμυντικής τους αντίδρασης, σε μελλοντικές προσβολές από τα παραπάνω παθογόνα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει και η βιολογική διέγερση με τη μεταχείριση των φυτών με λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και λιποολιγοσακχαρίτες (LOS) που προέρχονται από παθογόνους και μη μικροοργανισμούς, καθώς φαίνεται πως οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων ανθεκτικότητας και τη συσσώρευση συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων. Οι ενώσεις αυτές συμπεριφέρονται ως διεγέρτες (Διάγραμμα 2). Συγκεκριμένα, φυτά πιπεριάς που έτυχαν μεταχείρισης με LPS και έπειτα «προσβλήθηκαν» με τα παθογόνα *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (ασύμβατο) και *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (συμβατό), παρουσίασαν ανθεκτικότητα, ως συνέπεια της αυξημένης έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες ανθεκτικότητας P6, BGL (όξινη) και BGL (βασική) (Newman et al., 2000, Newman et al., 2001). Σε μια άλλη ερευνητική εργασία, ο Newman και οι συνεργάτες του (2002) ανέφεραν ότι η προ-μεταχείριση φύλλων του φυτού *Arabidopsis* με καθαρό διάλυμα LOS από το βακτήριο *X. campestris* pv. *campestris* είχε ως αποτέλεσμα τη βιολογική διέγερση του αμυντικού μηχανισμού των φυτών, και κατά συνέπεια την παρεμπόδιση της αντίδρασης της υπερευαισθησίας (HR) σε μελλοντική προσβολή του φυτού από το παθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

Μια άλλη κατηγορία χημικών ενώσεων που φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βιολογική διέγερση και την επαγόμενη ανθεκτικότητα, είναι οι πολυαμίνες. Η προ-μεταχείριση φυτών κρεμμυδιού (*Allium fistulosum* L.) με τις πολυαμίνες σπερμιδίνη και σπερμίνη διατήρησε το υδατικό ισοζύγιο και αύξησε την ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες ανοξίας, ως συνέπεια της υπερ-άρδευσης. Η ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες υπερ-άρδευσης φαίνεται να οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αύξηση της απόδοσης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, μέσω της αυξημένης δραστηριότητας των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων (Yiu et al., 2009). Η αύξηση στην απόδοση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού ως αποτέλεσμα της προ-μεταχείρισης με τις πολυαμίνες πουτρεσκίνη και σπερμιδίνη, φαίνεται να είναι η κυριότερη αιτία της ανθεκτικότητας που παρατηρήθηκε σε φυτά αγγουριάς που καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε χαμηλές

θερμοκρασίες (Zhang et al., 2009γ). Επιπρόσθετα, η επαγόμενη ανθεκτικότητα σε συνθήκες ξηρασίας σε φυτά αγγουριάς με την εξωγενή εφαρμογή σπερμιδίνης (Jan, 2008), και σε συνθήκες αλατότητας σε φυτά σιναπιού με την εξωγενή εφαρμογή πουτρεσκίνης (Verma and Mishra, 2005), φαίνεται να οφείλεται κυρίως στη μείωση της οξειδωτικής καταπόνησης, ως συνέπεια της επαγωγής του αντιοξειδωτικού μηχανισμού.

1.3.3. Βιολογική διέγερση φυτών με τη χρήση των υπό εξέταση μορίων σήματος (H_2O_2 , NO, H_2S) για επαγωγή της ανθεκτικότητάς τους έναντι παραγόντων καταπόνησης

Η μεταχείριση με διάφορα μόρια σήματος έχει αποδειχθεί πως επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες καταπόνησης. Η εμπλοκή των υπό εξέταση μορίων σήματος (H_2O_2 , NO, H_2S) στην επαγωγή της ανθεκτικότητας καλλιεργούμενων φυτικών ειδών σε συνθήκες βιοτικών ή αβιοτικών καταπονήσεων έχει αξιολογηθεί εκτενώς, τόσο σε συνθήκες εργαστηρίου, όσο και σε συνθήκες αγρού, παρουσιάζοντας ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Το H_2O_2 φαίνεται πως διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού και κατ' επέκταση στη μεταγωγή του σήματος κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (Foyer and Noctor, 2009, De Tullio, 2010, Jubany-Mari et al., 2010). Ως εκ τούτου, η χρήση του H_2O_2 με σκοπό τη βιολογική διέγερση φυτών για επαγωγή της ανθεκτικότητάς τους κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες καταπόνησης, έχει εκτενώς μελετηθεί και τεκμηριωθεί. Η προ-μεταχείριση σπερμάτων σιταριού με H_2O_2 είχε ως συνέπεια την αύξηση της ανθεκτικότητας των σποροφύτων σιταριού κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (Wahid et al., 2007β), ενώ η προ-μεταχείριση φυτών σόγιας (Ishibashi et al., 2011) και αγγουριάς (Gao et al., 2010) με H_2O_2 αύξησε την ανθεκτικότητά τους σε συνθήκες ωσμωτικής και θερμικής καταπόνησης, αντίστοιχα. Η επαγόμενη ανθεκτικότητα λόγω της προ-μεταχείρισης με H_2O_2 στις περιπτώσεις αυτές φαίνεται να οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αύξηση της δραστηριότητας διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων και στην προστασία των μεμβρανικών λιπιδίων.

Το NO έχει αναγνωριστεί ως ένα σημαντικό αέριο μόριο σήματος, με σημαντικό βιολογικό ρόλο, τόσο στη φυσιολογία του φυτού, όσο και στην απόκρισή του κατά την έκθεσή του σε παράγοντες βιοτικής ή αβιοτικής καταπόνησης (Arasimowicz and

Floryszak-Wieczorek, 2007, Wilson et al., 2008). Ερευνητικά αποτελέσματα έχουν πρόσφατα καταδείξει τη σημασία της προ-μεταχείρισης φυτών τομάτας και σιταριού με NO στον μετριασμό της δευτερογενούς οξειδωτικής καταπόνησης κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες ξηρασίας (García-Mata and Lamattina, 2001, Nasibi and Kalantari, 2009). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η προ-μεταχείριση σποροφύτων τομάτας και αγγουριάς με NO είχε ως αποτέλεσμα τον μετριασμό των αρνητικών συνεπειών της αλατότητας (Zhang et al., 2006, Fan et al., 2007). Σε μια παρόμοια εργασία, η Tanou και οι συνεργάτες της (2009β) έδειξαν ότι η προ-μεταχείριση φυτών νεραντζιάς τόσο με NO, όσο και με H₂O₂, είχε ως αποτέλεσμα τη βιολογική διέγερση και την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας. Τέλος, ο Manjunatha και οι συνεργάτες του (2008) αναφέρουν ότι η προ-μεταχείριση σπερμάτων κεχριού με NO είχε ως συνέπεια την αύξηση της ανθεκτικότητας των φυτών κατά τη μετέπειτα προσβολή τους από περονόσπορο (*Sclerospora graminicola*), αφού διάφορες αμυντικές αντιδράσεις, όπως η αντίδραση της υπερ-ευαισθησίας, η εναπόθεση λιγνίνης και η έκφραση του γονιδίου αμμωνιολυάση της φαινυλαλανίνης (PAL), είχαν αυξηθεί σημαντικά.

Η πρώτη αναφορά στο γεγονός ότι τα φυτά συνθέτουν και απελευθερώνουν H₂S καταγράφεται πριν από περίπου τρεις δεκαετίες (Wilson et al., 1978). Πρόσφατα πειραματικά αποτελέσματα επιβεβαίωσαν το βιολογικό ρόλο του H₂S και το καθιέρωσαν ως το τρίτο αέριο μόριο σήματος στα φυτά, πέραν των NO και CO (Bloem et al., 2005, Rausch and Wachter, 2005). Ο ρόλος του H₂S στην απόκριση των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες καταπόνησης αποτελεί πλέον πεδίο έρευνας πολλών επιστημόνων. Σε πρόσφατες εργασίες τους, ο Zhang και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι η προ-μεταχείριση σπερμάτων σιταριού με H₂S είχε ως αποτέλεσμα τον μετριασμό της οξειδωτικής καταπόνησης ως συνέπεια της μετέπειτα έκθεσης των σπερμάτων σε υψηλές συγκεντρώσεις Cu²⁺, Al³⁺ και Cr⁶⁺ (Zhang et al., 2008, Zhang et al., 2010α, Zhang et al., 2010γ). Η ίδια ερευνητική ομάδα αναφέρει τον μετριασμό των αρνητικών επιπτώσεων της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης και της ξηρασίας σε φυτά γλυκοπατάτας (Zhang et al., 2009β) και σόγιας (Zhang et al., 2010β), αντίστοιχα, ως αποτέλεσμα την προ-μεταχείρισης των φυτών με H₂S. Η επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών φαίνεται πως οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αντιμετώπιση της οξειδωτικής καταπόνησης μέσω της αυξημένης δραστηριότητας των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων.

1.4. Το H₂O₂ στα φυτά

Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί είναι αναγκασμένοι να προσαρμόζονται στις δυσμενείς συνέπειες της πλούσιας σε οξυγόνο ατμόσφαιρας (Halliwell, 2006). Κατά τη διάρκεια του κανονικού μεταβολισμού των κυττάρων παράγονται συνεχώς διάφορες ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), ως αποτέλεσμα της μερικής αναγωγής του μοριακού οξυγόνου (De Gara et al., 2010). Έχει υπολογιστεί ότι το 1-2% της κατανάλωσης O₂ από τα κύτταρα οδηγεί στον σχηματισμό των ROS, κυρίως σε οργανίδια με υψηλή μεταβολική δραστηριότητα ή έντονο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπως οι χλωροπλάστες, τα μιτοχόνδρια και τα περοξεισώματα (Vranova et al., 2002, Gill and Tuteja, 2010). Οι κυριότερες μορφές ROS είναι το σουπεροξειδικό ανιόν (O₂⁻), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) και η υδροξυλική ρίζα (·OH), οι οποίες φαίνεται ότι υπερ-παράγονται κατά τη διάρκεια της έκθεσης των φυτών σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης, προκαλώντας τοξικότητα στο κύτταρο διάμεσου της ζημιάς στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στο DNA (Mittler, 2002, Apel and Hirt, 2004). Ο όρος «οξειδωτική καταπόνηση» συνοψίζει τη ζημιά στο κύτταρο λόγω της υπερ-παραγωγής των ROS και της αδυναμίας του αντιοξειδωτικού μηχανισμού να τις εξουδετερώσει.

Τα φυτά έχουν αναπτύξει έναν πολύπλοκο μηχανισμό προστασίας έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης. Ο μηχανισμός αυτός απαρτίζεται από μια πληθώρα τόσο ενζυμικών, όσο και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ενώσεων. Ένζυμα, όπως η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η ασκορβική περοξειδάση (APX), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), και μη ενζυμικές ενώσεις όπως η τοκοφερόλη, το ασκορβικό οξύ (ASC) και η γλουταθειόνη (GSH) αλληλεπιδρούν για την αποτοξίνωση των ROS. Η πληθώρα των αλληλεπιδράσεων αυτών, σε συνάρτηση με τις επιδράσεις ορισμένων περιβαλλοντικών παραμέτρων, έχουν ως αποτέλεσμα τη διαμόρφωση του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού (redox state). Η παράμετρος αυτή φαίνεται να διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στη μεταγωγή του σήματος, στην έκφραση των γονιδίων, και κατ' επέκταση στην αντίδραση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης (Foyer and Noctor, 2009, Potters et al., 2010).

Το H₂O₂ φαίνεται να έχει έναν πολύπλευρο και σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του φυτού, αφού διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στη διαμόρφωση του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις φαίνεται να εμπλέκεται στη μεταγωγή του σήματος και να διεγείρει τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών

και αβιοτικών καταπονήσεων (Mittler et al., 2004), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις φαίνεται να ενορχηστρώνει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD) (Gechev et al., 2006, Gadjev et al., 2008). Είναι πλέον αποδεκτό ότι ανάμεσα στις άλλες μορφές ROS, το H₂O₂ είναι ίσως το μοναδικό μόριο που έχει τη δυνατότητα να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος στα φυτά, αφού διακρίνεται από σχετικά μεγάλη σταθερότητα (χρόνος ημιζωής ~ 1ms) και κινητικότητα (1μm) (Gechev et al., 2006, Moller et al., 2007). Ως αποτέλεσμα, το H₂O₂ έχει τη δυνατότητα να μεταναστεύει από τις περιοχές σύνθεσής του σε άλλες γειτονικές υποκυτταρικές περιοχές, ακόμα και σε γειτονικά κύτταρα (Bienert et al., 2006), διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο σε μια πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών του φυτού (Neill et al., 2002α, Tian et al., 2003, Li et al., 2009).

1.4.1. Ο ρόλος του H₂O₂ στη μεταγωγή σήματος και στη ρύθμιση σημαντικών λειτουργιών στα φυτά

Πρόσφατες βιοχημικές και γενετικές μελέτες επιβεβαιώνουν την εμπλοκή του H₂O₂ στη ρύθμιση σημαντικών φυσιολογικών λειτουργιών στα φυτά. Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες του κυττάρου στην οποία εμπλέκεται το H₂O₂ είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death, PCD). Η πρόκληση του PCD διεγείρεται από μια σειρά ερεθισμάτων και ολοκληρώνεται με την εμπλοκή διαφόρων σημάτων, συμπεριλαμβανομένων του H₂O₂ και του NO (Beers and McDowell, 2001). Οι κυριότερες συνιστώσες με τις οποίες το H₂O₂ και αλλά ROS δρουν κατάντη για τη μεταγωγή του σήματος που έχει ως αποτέλεσμα τον PCD, αφορούν στην ενεργοποίηση διαφόρων πρωτεϊνικών κινάσεων, πρωτεϊνικών φωσφατασών και παραγόντων μεταγραφής (Gechev et al., 2006, Gadjev et al., 2008).

Ερευνητικά αποτελέσματα τεκμηριώνουν τον ρόλο του H₂O₂ και του ABA στη μεταγωγή του σήματος για το κλείσιμο των στομάτων. Συγκεκριμένα, το ABA φαίνεται πως διεγείρει τη σύνθεση του H₂O₂ στα καταφρακτικά κύτταρα, κυρίως μέσω της NADPH οξειδάσης, το οποίο με τη σειρά του ελέγχει τη συγκέντρωση Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα των καταφρακτικών κυττάρων. Ο έλεγχος αυτός γίνεται με τη ρύθμιση της εισροής ιόντων Ca²⁺ διάμεσου της κυτταρικής μεμβράνης μέσω των αντλιών ασβεστίου (Pei et al., 2000).

Ο Joo και οι συνεργάτες του (2001) κατέδειξαν την εμπλοκή του H₂O₂ στον ελεγχόμενο από την ορμόνη αυξίνη βαροτροπισμό των ριζών καλαμποκιού, αφού

απέδειξαν ότι το H₂O₂ είναι δυνατόν να δρα κατάντη του ελεγχόμενου από την αυξίνη σήματος μεταγωγής. Η παροδική αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του H₂O₂ στα κύτταρα της ενδοδερμίδας διεγείρει τον βαροτροπισμό, ενώ η αύξηση της απόδοσης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού φαίνεται να δρα ανασταλτικά στο φαινόμενο αυτό.

Η διάχυση του H₂O₂ εντός του κυττάρου αποτελεί συνάρτηση της σύνθεσής του, της μεταφοράς του από τους μεσοκυττάριους χώρους, καθώς επίσης και από τη δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Η ρύθμιση της συγκέντρωσης του H₂O₂ εντός του κυττάρου ελέγχεται από ένα πολύπλοκο σύστημα που περιλαμβάνει πλειάδα ενζυμικών και μη ενώσεων. Εντός του κυττάρου το H₂O₂ διαδραματίζει ουσιώδη ρόλο στη μεταγωγή σήματος και τη γονιδιακή έκφραση, αφού έχει την ικανότητα να οξειδώνει και να διεγείρει πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος, όπως οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες (PPs) και οι πρωτεϊνικές κινάσες (PKs), καθώς επίσης και μεταγραφικούς παράγοντες και αντλίες ασβεστίου της κυτταρικής μεμβράνης (Desikan et al., 1999, Desikan et al., 2001). Ως αποτέλεσμα, η αυξημένη συγκέντρωση Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιεί πρωτεΐνες που δεσμεύουν το ασβέστιο [calcium-binding proteins], όπως η καλμοδουλίνη (CaM), καθώς επίσης και τις PPs και PKs. Επιπρόσθετα, η αντιστρέψιμη πρωτεϊνική φωσφορυλίωση είναι δυνατόν να ενεργοποιεί την περαιτέρω μεταγωγή σήματος στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, επηρεάζοντας ορισμένους μεταγραφικούς παράγοντες και κατ' επέκταση τη γονιδιακή έκφραση (Neill et al., 2002a). Ο Delaunay και οι συνεργάτες του (2000) χρησιμοποιώντας την ανάλυση μικροσυστοιχιών, έδειξαν ότι το H₂O₂ επηρέασε την έκφραση του 2% των γονιδίων της *Arabidopsis*. Όπως αναμενόταν, καταγράφηκε αύξηση στην έκφραση ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως και ενζύμων που εμπλέκονται στον PCD και τη μεταγωγή σήματος (CaM, TFs, PKs).

1.4.2. Ο ρόλος του H₂O₂ κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων

Μεγάλος όγκος πειραματικών δεδομένων κατά τα τελευταία χρόνια αποδεικνύουν ότι το H₂O₂, ως μόριο σήματος, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μηχανισμών προσαρμογής και εγκλιματισμού των φυτών έναντι παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης (Neil et al. 2002a, Mittler et al., 2004). Η μεταχείριση καλλιεργούμενων ειδών με χαμηλές συγκεντρώσεις H₂O₂ είναι δυνατόν να διεγείρει τους μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού των φυτών, όχι μόνο τοπικά, αλλά και σε

διασυστηματικό επίπεδο. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μια παροδική ήπια αύξηση στη συγκέντρωση των ROS στους φυτικούς ιστούς είχε ως αποτέλεσμα την προστασία των φυτών κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες εντονότερης αβιοτικής καταπόνησης. Η παρατηρούμενη ανθεκτικότητα είναι δυνατόν να επάγεται είτε με την απευθείας μεταχείριση των φυτών με ROS ή με παράγοντες που απελευθερώνουν ROS (ειδικότερα H_2O_2), είτε με την προ-μεταχείριση των φυτών με ήπιας μορφής, μη-καταστρεπτικό παράγοντα καταπόνησης, ο οποίος επάγει την παροδική συσσώρευση των ROS στα φυτά (Gechev et al., 2006).

Η προ-μεταχείριση σποροφύτων ρυζιού με χαμηλές συγκεντρώσεις ($<10 \mu\text{mol L}^{-1}$) είτε H_2O_2 , είτε NO, αύξησε την ανθεκτικότητα των φυτών κατά τη μετέπειτα καταπόνησή τους με την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας ή υψηλών θερμοκρασιών, επιτρέποντάς τους να διατηρήσουν περισσότερους ζωντανούς ιστούς και υψηλότερη κβαντική απόδοση του PS II, σε σχέση με σπορόφυτα που είχαν εκτεθεί σε συνθήκες καταπόνησης χωρίς προ-μεταχείριση (Uchida et al., 2002). Η προ-μεταχείριση των σποροφύτων είτε με H_2O_2 , είτε με NO, αύξησε τη δραστηριότητα των περισσότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων, καθώς επίσης και τη γονιδιακή έκφραση πρωτεϊνών καταπόνησης, όπως της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης, της Δ^1 -Πυρρόλινο-5-καρβόξυλο συνθετάσης (P5CS) και της πρωτεΐνης θερμικής καταπόνησης 26 (HSP26). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του Uchida και των συνεργατών του (2002) είναι και αυτά της Τανου και των συνεργατών της (2009β), τα οποία καταδεικνύουν ότι η προ-μεταχείριση με χαμηλές συγκεντρώσεις είτε H_2O_2 , είτε NO, απαλύνουν τις επιπτώσεις της οξειδωτικής καταπόνησης φυτών νεραντζιάς, λόγω της έκθεσής τους σε υψηλή συγκέντρωση NaCl. Επιπρόσθετα, η Τανου και οι συνεργάτες της (2009α) αναφέρουν ότι η προ-μεταχείριση φυτών νεραντζιάς με χαμηλές συγκεντρώσεις είτε H_2O_2 , είτε NO, είχε ως συνέπεια τον μετριασμό του ποσοστού των καρβονυλιομένων πρωτεϊνών στα φυτά που μετέπειτα καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης NaCl, ενώ ταυτόχρονα διατήρησαν τις νιτροσυλιωμένες πρωτεΐνες σε επίπεδα όμοια με αυτά των φυτών που δεν είχαν υποστεί καταπόνηση. Στην ίδια εργασία, δείχθηκε ότι υπάρχει ισχυρή αλληλεπικάλυψη ανάμεσα στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος του H_2O_2 και του NO κατά τον εγκλιματισμό των φυτών σε συνθήκες αλατότητας, και ότι ο βαθμός οξείδωσης και νιτροσυλίωσης των πρωτεϊνών στα φύλλα αποτελεί ισχυρό μοριακό δείκτη της ανθεκτικότητας των οπωροφόρων δένδρων κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (Tanou et al., 2009α).

Επιπλέον, ο de Azevedo Neto και οι συνεργάτες του (2005) κατάφεραν να αυξήσουν την ανθεκτικότητα των φυτών καλαμποκιού έναντι της υψηλής συγκέντρωσης NaCl, προ-μεταχειρίζοντάς τα με χαμηλή συγκέντρωση H₂O₂. Η προ-μεταχείριση αφορούσε την εμφύτευση των ριζών των φυτών σε υδροπονικό διάλυμα που περιείχε 1 μmol L⁻¹ H₂O₂ για 2 ημέρες. Τόσο στα φύλλα, όσο και στις ρίζες των φυτών που έτυχαν προ-μεταχείρισης με H₂O₂, παρατηρήθηκε μείωση της υπεροξειδωσής των μεμβρανικών λιπιδίων και αύξηση της συγκέντρωσης των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, APX, GR, CAT), σε σύγκριση με τα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς προ-μεταχείριση. Επιπρόσθετα, η μεταχείριση σπερμάτων σιταριού με H₂O₂ είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού βλαστικότητας και την επαγωγή της ανθεκτικότητας των σποροφύτων σιταριού σε διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης NaCl (150 mmol L⁻¹) (Wahid et al., 2007β). Τα σπορόφυτα που έτυχαν προ-μεταχείρισης με H₂O₂ και αφέθηκαν να βλαστήσουν σε διάλυμα αυξημένης αλατότητας είχαν χαμηλότερη συγκέντρωση H₂O₂ στους ιστούς τους, ενώ παρουσίασαν αυξημένη φωτοσυνθετική ικανότητα και υψηλότερη αγωγιμότητα στομάτων, σε σύγκριση με τα φυτά που δεν έτυχαν προ-μεταχείρισης.

Πέραν της αλατότητας, το H₂O₂ φαίνεται να επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών και σε συνθήκες ξηρασίας. Συγκεκριμένα, σε μια πρόσφατη ερευνητική τους εργασία, ο Ishibashi και οι συνεργάτες του (2011) έδειξαν ότι ο ψεκασμός φυτών σόγιας με διάλυμα 1 mmol L⁻¹ H₂O₂ είχε ως συνέπεια την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες ξηρασίας. Τα φυτά που ψεκάστηκαν με H₂O₂ παρουσίασαν λιγότερα συμπτώματα μαρανσης, ενώ ταυτόχρονα διατήρησαν σε υψηλότερα επίπεδα τη σχετική περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό και τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα, σε σχέση με τα φυτά που είχαν καταπονηθεί χωρίς να ψεκαστούν (θετικός μάρτυρας). Επίσης τα αντίγραφα mRNAs για τη βιοσύνθεση ορισμένων ολιγοσακχαριτών ανιχνεύτηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στα προ-μεταχειρισμένα φυτά, σε σχέση με αυτά στον θετικό μάρτυρα.

Η ψεκασμός φύλλων φυτών αγγουριάς με διάλυμα 1,5 mmol L⁻¹ H₂O₂ είχε ως συνέπεια την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών κατά τη μετέπειτα θερμική καταπόνησή τους (38-42 °C για 3 ημέρες). Η ανθεκτικότητα των φυτών που είχαν προ-μεταχειρισθεί με H₂O₂ φαίνεται να οφείλεται στη διατήρηση της λειτουργικότητας των χλωροπλαστών και στην αύξηση της απόδοσης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Συγκεκριμένα, οι παραμορφωμένοι χλωροπλάστες των φυτών που έτυχαν προ-μεταχείρισης με H₂O₂ έφτασαν μόλις το 33%, σε αντίθεση με αυτούς των φυτών που

εκτέθηκαν απευθείας σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (71,4%). Επιπλέον, σε φύλλα φυτών που έτυχαν προ-μεταχείρισης με H₂O₂ καταγράφηκε χαμηλότερη συγκέντρωση μαλονδιαλδεύδης (MDA) και υψηλότερη δραστηριότητα των κυριοτέρων αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, APX, MDHAR, DHAR, GR και GSH), σε σχέση με τα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς προ-μεταχείριση (Gao et al., 2010).

1.5. Το NO στα φυτά

Το NO αποτελεί ένα ενεργό μόριο σήματος, του οποίου ο βιολογικός ρόλος αποκαλύφθηκε αρχικά σε ζωικά κύτταρα πριν από περίπου 25 χρόνια. Μόλις το 1990 προσδιορίστηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά ένα βιοσυνθετικό του ένζυμο (Bredt and Snyder, 1990), ενώ λίγα χρόνια αργότερα έγινε γνωστή η εμπλοκή του σε μια πλειάδα φυσιολογικών λειτουργιών των θηλαστικών, όπως η χαλάρωση των λείων μυών, η νευρική επικοινωνία, η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, η απόπτωση κ.ά. (Schmidt and Walter, 1994). Η πρώτη αναφορά σχετικά με τη δράση του NO σε φυτά αφορούσε την τοξικότητα των οξειδίων του αζώτου (NO₂, N₂O₃, NO₂⁻, NO₃⁻), στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό και τα επίπεδα της χλωροφύλλης, σε επιλεγμένα δασικά δένδρα, φυτά πάρκων και φυτά βιομηχανικών ζωνών (Clyde Hill and Bennett, 1970). Μόλις το 1998, ο Delledonne και οι συνεργάτες του (1998) κατάφεραν να αποκαλύψουν τον σπουδαίο ρόλο που διαδραματίζει το NO στη διακυτταρική επικοινωνία και τη μεταγωγή σήματος στα φυτά.

Το NO συμμετέχει σε ζωτικές φυσιολογικές λειτουργίες του φυτικού κυττάρου, όπως η βλάστηση των σπερμάτων (Simontacchi et al., 2004, Sirova et al., 2011), η ανάπτυξη του φυτού και των καρπών (Beligni and Lamattina, 2000, Zhang et al., 2011β), η διαδικασία της διαφοροποίησης των κυττάρων (Ferrer and Ros Barceló, 1999), το κλείσιμο των στομάτων (García-Mata and Lamattina, 2001) και η βιοσύνθεση φυτοαλεξινών (Noritake et al., 1996). Επιπλέον, το NO εμπλέκεται στην άνθιση, στην ωρίμανση και στον γηρασμό των οργάνων (Leshem et al., 1998, Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007, Jasid et al., 2009, Prochazkova and Wilhelmova, 2011), καθώς επίσης και στη διαδικασία διακοπής του λήθαργου των σπερμάτων (Bethke et al., 2006, Liu et al., 2009). Σημαντική είναι τέλος η επίδραση του NO στην απόκριση των φυτών κατά την έκθεσή τους σε δυσμενή

περιβαλλοντικά ερεθίσματα (De Stefano et al., 2005, Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007, Corpas et al., 2007a, Hong et al., 2008, Hao and Zhang, 2009).

1.5.1. Ο ρόλος του NO στη μεταγωγή σήματος και στη ρύθμιση σημαντικών λειτουργιών στα φυτά

Το NO είναι ένα από τα μικρότερου μοριακού βάρους (M.B.) διατομικά μόρια σε αέρια μορφή, με κύρια χαρακτηριστικά την υψηλή ενέργεια, τον σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής σε βιολογικά συστήματα (3-5 s) και τον υψηλό συντελεστή διάχυσης ($4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ στο νερό). Ως μόριο, το NO παρουσιάζει τόσο υδρόφιλες, όσο και λιπόφιλες ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές του επιτρέπουν να διαχέεται τόσο διάμεσου υδρόφιλων περιοχών του κυττάρου, όπως είναι το κυτταρόπλασμα, όσο και διάμεσου των λιπόφιλων περιοχών της μεμβράνης (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007). Κατά συνέπεια, το NO έχει τη δυνατότητα ταχείας διάχυσης από τα κύτταρα στα οποία παράγεται προς τα γειτονικά κύτταρα, δρώντας είτε ως ενδοκυτταρικός, είτε ως διακυτταρικός αγγελιαφόρος.

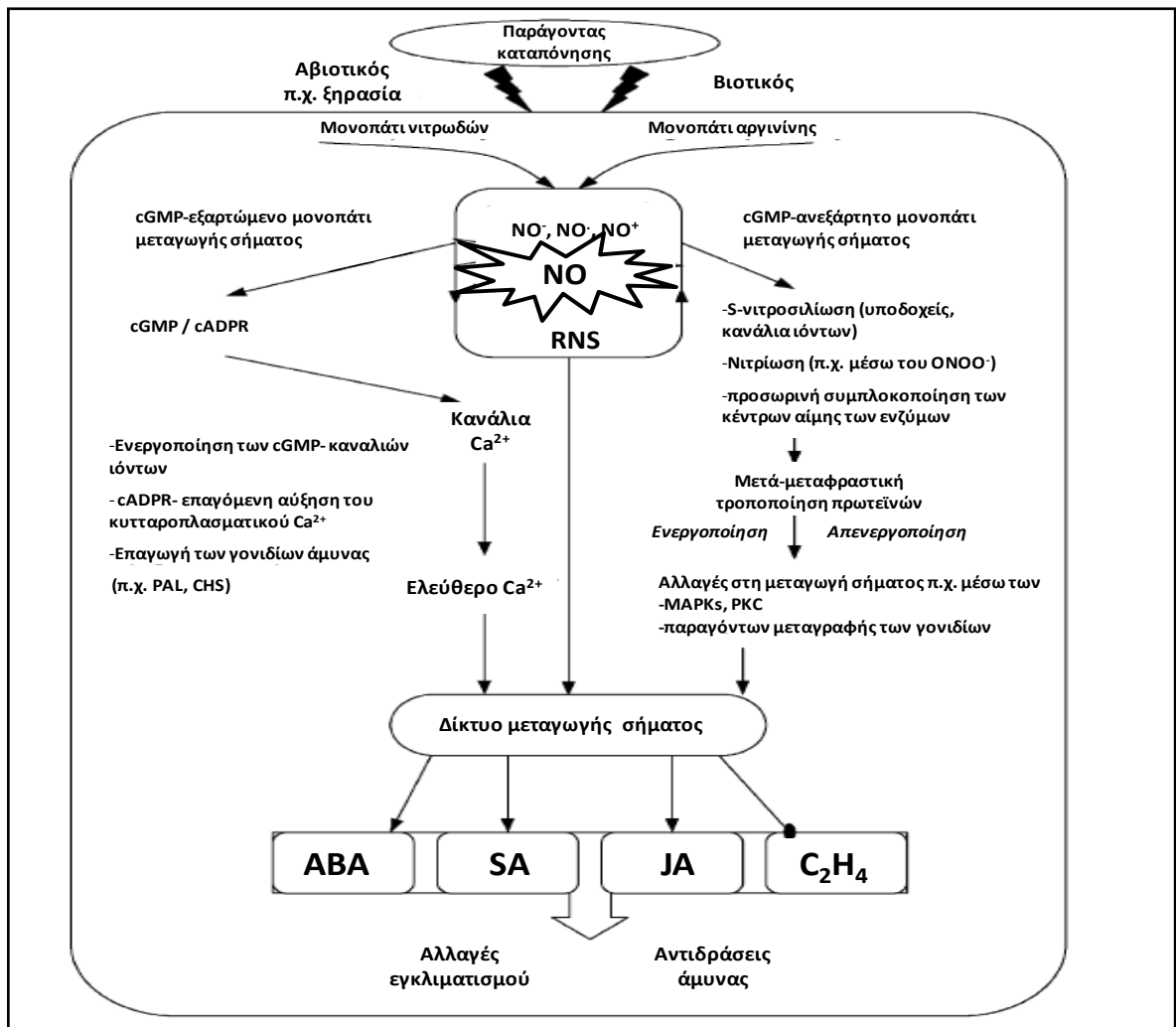
Η αναγνώριση του σήματος ενός εξωτερικού ερεθίσματος από τους μεμβρανικούς υποδοχείς έχει ως συνέπεια τη συσσώρευση μορίων σήματος, τα οποία με τη σειρά τους διαφοροποιούν τη συγκέντρωση και τη διαμόρφωση των λεγόμενων δευτερογενών αγγελιαφόρων, με αποτέλεσμα τη διέγερση μηχανισμών προσαρμογής και εγκλιματισμού (Wang et al., 2003). Κατά τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονη ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με την εμπλοκή του NO στην αναγνώριση και μεταγωγή του σήματος περιβαλλοντικών ερεθισμάτων στα φυτά. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το NO εμπλέκεται στο cGMP-εξαρτώμενο και στο cGMP-ανεξάρτητο μονοπάτι μεταγωγής σήματος, όπως και στα ζωικά κύτταρα (Διάγραμμα 4) (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007).

Ο Durner και οι συνεργάτες του (1998) ήταν οι πρώτοι που κατέγραψαν τον πιθανό ρόλο του NO στη ρύθμιση της συγκέντρωσης της κυκλικής μονοφωσφατάσης της γουανωσίνης (cGMP) σε εναιώρημα κυττάρων καπνού (Durner et al., 1998). Επιπλέον, έχει τεκμηριωθεί ο ρόλος του NO στη ρύθμιση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος της κυκλοαδενοσινωδιφωσφοριβόζης (cADPR) και στην κινητοποίηση Ca^{2+} για την αύξηση της έκφρασης της αμμωνιολυάσης της φαινυλαλανίνης (PAL) και της PR-1 πρωτεΐνης (Durner et al., 1998, Klessig et al., 2000). Επιπλέον, το NO φαίνεται ότι δρα μέσω των cGMP και cADPR για τη ρύθμιση των ενδοκυττάρων καναλιών Ca^{2+} , με στόχο την

αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, αφού φαίνεται ότι τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος Ca^{2+} δρουν κατάντη του NO (Neill et al., 2002β, Gould et al., 2003, Lamotte et al., 2006, Vandelle et al., 2006, Courtois et al., 2008).

Ένας επιπλέον ενδοκυττάριος στόχος του NO είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs). Ο Clarke και οι συνεργάτες του (2000) έδειξαν ότι η μεταχείριση φυτών *Arabidopsis* με NO έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση των MAPKs, μέσω ενός μονοπατιού μεταγωγής σήματος ανεξάρτητου του cGMP. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού μεταγωγής των MAPKs κατά την αντίδραση υπερευαισθησίας και την επαγωγή του PCD σε φυτά *Arabidopsis* προϋποθέτει την παρουσία NO. Η ενεργοποίηση των MAPKs μέσω φωσφορυλίωσης διευκολύνει την είσοδό τους στον πυρήνα, όπου μπορούν να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμίζοντας στη συνέχεια τη γονιδιακή έκφραση. Το γεγονός ότι οι MAPKs αποτελούν στόχο του NO για τη μεταγωγή του σήματος κατά την ανάπτυξη και την οργανογένεση των ριζών σε φυτά αγγουριάς (Pagnussat et al., 2004), ενισχύει το γεγονός ότι οι MAPKs δρουν κατάντη του NO για τη μεταγωγή του σήματος και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε ορισμένες λειτουργίες του φυτού (Διάγραμμα 4).

Άλλοι τρόποι με τους οποίους το NO εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος στα φυτικά κύτταρα είναι η S-νιτροσυλίωση (S-nitrosylation) πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών με την ομοιοπολική πρόσδεση του NO στις σουλφυδρλικές ομάδες της κυστεΐνης, καθώς επίσης και η νιτρίωση (nitration) κατάλοιπων της L-τυροσίνης. Οι αντιδράσεις αυτές προκαλούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στη δραστηριότητα των πολυπεπτιδίων και των πρωτεϊνών, οδηγώντας στη διαφοροποίηση της έκφρασης γονιδίων-στόχων και την ενεργοποίηση στοχευμένων λειτουργιών (Radi, 2004, Lindermayr et al., 2005) (Διάγραμμα 4). Χαρακτηριστικά είναι τα ευρήματα του Besson-Bard και των συνεργατών του (2008), οι οποίοι ταυτοποίησαν πέραν των 100 πρωτεϊνών στις οποίες το NO μπορεί να επιδράσει αλλάζοντας τη δραστηριότητά τους, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι η λιποξυγενάση, η CAT, η APX, η μιτοχονδριακή ακοτινάση κ.ά. (Wendehenne et al., 2001). Επιπλέον, το NO φαίνεται να επηρεάζει τη βιοσύνθεση και να αλληλεπιδρά με ορμόνες και μόρια σήματος, όπως το JA, το ABA, το SA και το ET (Huang et al., 2004, Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007).



Διάγραμμα 4: Μεταγωγή σήματος μέσω του NO κατά την έκθεση των φυτών σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. ABA: αμπισισικό οξύ, cADPR: κυκλοαδενοσινοδιφωσφοροριβόζη, cGMP: κυκλική μονοφωσφατάση της γουανοσίνης, C₂H₄: αιθυλένιο, CHS: συνθάση της χαλκόνης, JA: ιασμονικό οξύ, MAPK: ενεργές πρωτεϊνικές κινάσες, PAL: αμμωνιολύαση της φαινυλαλανίνης, ROS: ενεργές μορφές οξυγόνου, RNS: ενεργές μορφές αζώτου, SA: σαλικυλικό οξύ (Πηγή: τροποποίηση από Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007).

1.5.2. Ο ρόλος του NO κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων

Πολυάριθμες ερευνητικές εργασίες κατά τα τελευταία χρόνια αναφέρονται στις ευεργετικές συνέπειες της προ-μεταχείρισης φυτών με NO πριν την έκθεσή τους σε διάφορους παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των εργασιών αυτών, το NO επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες αλατότητας, υπερ-οσμωτικής καταπόνησης, αυξημένων συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων και

υψηλών θερμοκρασιών, ρυθμίζοντας τη μεταγωγή σήματος και την επαγωγή των μηχανισμών προσαρμογής και εγκλιματισμού. Πέραν της δράσης του στη μεταγωγή σήματος, το NO φαίνεται να δρα και ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, περιορίζοντας τις παραγόμενες ποσότητες των ROS (αντίδραση του NO με O_2^- και H_2O_2) (Beligni and Lamattina, 2001). Η ικανότητα του NO να αντιδρά με τα σχηματιζόμενα υπεροξειδία και να παρεμποδίζει την υπεροξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων είναι μια ακόμα λειτουργία του που ενδυναμώνει τον αντιοξειδωτικό του ρόλο (Boveris et al., 2000). Στις περισσότερες εργασίες, το NO χορηγείται μέσω του νιτροπρωσσικού νατρίου (SNP), μιας ένωσης η οποία όταν διαλυθεί στο νερό ελευθερώνει ταχέως NO.

Ο Sang και οι συνεργάτες του (2008) έδειξαν ότι σε συνθήκες ξηρασίας επάγεται η σύνθεση του NO στα κύτταρα του μεσοφύλλου φυτών καλαμποκιού, μέσω της ενεργοποίησης μιας NOS-like συνθετάσης στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση της παραγωγής του NO ως αποτέλεσμα της υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης παρεμποδίστηκε με τη μεταχείριση των φυτών με αναστολείς της NOS-like συνθετάσης και της νιτρικής αναγωγής (NR), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα δύο αυτά ένζυμα εμπλέκονται στη σύνθεση του NO στα φύλλα των φυτών καλαμποκιού που εκτίθενται σε συνθήκες ξηρασίας. Επιπρόσθετα, η υπερ-ωσμωτική καταπόνηση προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων του κυτταροπλάσματος και των χλωροπλαστών, όπως η SOD, η APX και η GR, ενώ η προ-μεταχείριση με αναστολείς της NOS και NR μείωσε τη δραστηριότητα των παραπάνω ενζύμων. Η εξωγενής εφαρμογή NO φαίνεται να επάγει τη δραστηριότητα των υπό εξέταση αντιοξειδωτικών ενζύμων και να μειώνει τη συσσώρευση H_2O_2 . Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και από τους Leshem και Haramaty (1996), οι οποίοι έδειξαν ότι ο μαρασμός των φύλλων του μπιζελιού επιφέρει αύξηση της συγκέντρωσης του NO.

Η επίδραση της ξηρασίας στην παραγωγή NO αξιολογήθηκε σε ρίζες σποροφύτων αγγουριάς, στις οποίες η μέτρια υδατική καταπόνηση προκάλεσε ελαφρά αύξηση της παραγωγής NO στα ακρορρίζια και στη ζώνη επιμήκυνσης, ενώ η έντονη υδατική καταπόνηση οδήγησε σε εντατική παραγωγή NO (Arasimowicz-Jelonek et al., 2009). Η δυνατότητα του NO να μετριάζει τις αρνητικές συνέπειες της ξηρασίας στα σπορόφυτα αγγουριάς αξιολογήθηκε με τη χορήγηση, είτε του SNP, είτε του GSNO. Οι ερευνητές αναφέρουν μια θετική συσχέτιση μεταξύ της προ-μεταχείρισης με τις παραπάνω πρόδρομες ενώσεις του NO, και της ανθεκτικότητας των φυτών σε συνθήκες υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης. Συγκεκριμένα, τα φυτά που έτυχαν προ-μεταχείρισης είτε με

SNP, είτε με GSNO, διατήρησαν τη σχετική περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό (LRWC), μείωσαν το επίπεδο υπεροξειδωσής των μεμβρανικών λιπιδίων, ενώ παράλληλα αύξησαν τη συγκέντρωση της προλίνης στο κυτταρόπλασμα, σε σχέση με τα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς να υποστούν προ-μεταχείριση. Ο ανασχετικός ρόλος του NO στις επιζήμιες συνέπειες της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης αναφέρθηκε και από τους García-Mata και Lamattina (2001), οι οποίοι έδειξαν ότι η εφαρμογή του SNP σε σπορόφυτα σιταριού μείωσε το άνοιγμα των στομάτων, με αποτέλεσμα να μειωθεί και ο ρυθμός διαπνοής, καθιστώντας τα φυτά αυτά πιο ανθεκτικά σε συνθήκες υπερ-οσμωτικής καταπόνησης. Επιπρόσθετα, η προ-μεταχείριση σποροφύτων τομάτας με SNP οδήγησε στην αύξηση της απόδοσης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, λόγω της αύξησης της δραστηριότητας των ενζύμων APX, GPX και CAT, με αποτέλεσμα την επαγωγή της ανθεκτικότητας των σποροφύτων όταν καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε συνθήκες ξηρασίας (Nasibi and Kalantari, 2009).

Η εξωγενής εφαρμογή του SNP αποδεικνύεται ότι αυξάνει την ανθεκτικότητα των φυτών και σε συνθήκες αλατότητας. Συγκεκριμένα, η Fan και οι συνεργάτες της (2007) αναφέρουν ότι η εξωγενής εφαρμογή $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP σε υδροπονικό διάλυμα με αυξημένη συγκέντρωση NaCl (100 mmol L^{-1}) είχε ως αποτέλεσμα τον μετριασμό των αρνητικών συνεπειών της αλατότητας σε φυτά αγγουριάς, αφού σημειώθηκε αξιόλογη αύξηση στην απόδοση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, στον ρυθμό φωτοσύνθεσης, στην αγωγιμότητα των στομάτων και στον ρυθμό διαπνοής, σε σχέση με τα φυτά που εκτέθηκαν απευθείας σε συνθήκες αλατότητας. Η ίδια ερευνητική ομάδα, έχει πρόσφατα αποκαλύψει ότι η αύξηση της ανθεκτικότητας σποροφύτων αγγουριάς σε συνθήκες αλατότητας, ως συνέπεια της προ-μεταχείρισης με $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP, ενδεχομένως οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης της σπερμίνης, τη μείωση της συγκέντρωσης της πουτρεσκίνης και της σπερμιτιδίνης, καθώς και του ενζύμου οξειδάση των πολυαμινών (PAO) (Fan et al., 2013). Η αύξηση της απόδοσης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, και κατά συνέπεια ο μετριασμός της οξειδωτικής καταπόνησης φυτών νεραντζιάς και ρυζιού, ως συνέπεια της προ-μεταχείρισης των φυτών με SNP πριν την καταπόνησή τους σε συνθήκες αλατότητας, αναφέρεται επίσης από την Tanou και τους συνεργάτες της (2009β) και τον Uchida και τους συνεργάτες του (2002), αντίστοιχα. Επιπλέον, η αύξηση της δραστηριότητας των αντλιών πρωτονίων και Na^+/H^+ στους τονοπλάστες των κυττάρων φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση της ανθεκτικότητας σποροφύτων

καλαμποκιού σε συνθήκες αλατότητας, ως συνέπεια της προ-μεταχείρισης των σποροφύτων με SNP (Zhang et al., 2006).

Μόλις πρόσφατα, έχει επίσης αναφερθεί η συμμετοχή του NO στους μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού των φυτών κατά την έκθεσή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Η προσθήκη SNP σε υδροπονικό διάλυμα αυξημένης συγκέντρωσης αργιλίου οδήγησε στη συγκράτηση του ρυθμού μείωσης της επιμήκυνσης των ριζών και στην ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του γιββερυλικού οξέος (GA), όπως επίσης και στη μείωση του λόγου ινδολυλοξικού οξέος (IAA)/ GA (He et al., 2012). Επιπλέον, το NO φαίνεται να επάγει τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό κατά την έκθεση φυτών κοινού φασολιού (*Phaseolus vulgaris*) σε διάλυμα αυξημένης συγκέντρωσης αργιλίου, προσδίδοντας στα φυτά ανθεκτικότητα (Wang et al., 2010β). Τέλος, η μεταχείριση είτε με SNP, είτε με S-νιτρωδο-N-ακετυλοπενικιλοαμίνη (S-nitroso-N-acetylpenicillamine – SNAP, πρόδρομη ένωση του NO) καλλιέργειας κάλλου δυο οικότυπων καλαμιού με διαφορετική ανθεκτικότητα στη θερμική καταπόνηση, είχε ως αποτέλεσμα τον μετριασμό των επιζήμιων συνεπειών της θερμικής καταπόνησης (Song et al., 2008). Συγκεκριμένα, οι καλλιέργειες κάλλου που μεταχειρίστηκαν είτε με SNP, είτε με SNAP, διατήρησαν το ρυθμό ανάπτυξης και τη ζωτικότητα τους, ενώ ταυτόχρονα συγκράτησαν την εκροή των ηλεκτρολυτών. Επιπλέον, μειώθηκε η συγκέντρωση του H₂O₂ και του MDA, ενώ αυξήθηκε η δραστηριότητα των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, CAT, APX και POD).

1.6. Το H₂S στα φυτά

Το υδρόθειο (H₂S) είναι μια χαμηλού M.B., άχρωμη, ευδιάλυτη και εύφλεκτη αέρια ένωση με χαρακτηριστική οσμή σάπιου αυγού, η οποία είναι γνωστή εδώ και εκατοντάδες χρόνια, κυρίως λόγω της δηλητηριώδους δράσης της. Η ένωση αυτή εμφανίζεται φυσικά στο ακάθαρτο πετρέλαιο, στο φυσικό αέριο και στις θερμές πηγές. Επίσης, είναι δυνατό να παραχθεί κατά τη μικροβιακή αποικοδόμηση οργανικών υλικών, καθώς επίσης και ανθρώπινων και ζωικών αποβλήτων. Συσσωρευμένα ερευνητικά αποτελέσματα κατά τα τελευταία χρόνια έχουν αποκαλύψει ότι πέραν της κοινής εικόνας του ως θανατηφόρο αέριο, το H₂S παράγεται συστηματικά σε διάφορες ομάδες κυττάρων στα θηλαστικά, εκδηλώνοντας βιολογικά ενεργό ρόλο σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Στα θηλαστικά

παράγεται ενδογενώς κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού της L-κυστεΐνης από τα ένζυμα β-συνθετάση της κυστοθειονίνης και γ-λυάση της κυστοθειονίνης (Hughes et al., 2009, Mancardi et al., 2009). Μόλις πρόσφατα έχει τεκμηριωθεί ο κεντρικός ρόλος του H₂S ως διεγερτικού ή ανασταλτικού παράγοντα στο αντιφλεγμονώδες, το νευρικό, το καρδιαγγειακό, το ουροποιογεννητικό, το γαστρεντερικό και το ενδοκρινικό σύστημα (Mancardi et al., 2009, Nicholson and Calvert, 2010, Perna et al., 2010). Η δράση του H₂S σε αυτά τα συστήματα των θηλαστικών εκδηλώνεται κυρίως μέσω της ρύθμισης των ενδοκυττάρων μορίων σήματος, ενεργοποιώντας τα K_{ATP} κανάλια και την ενδοθηλιακή συγκέντρωση Ca²⁺ (Bauer et al., 2010). Συνεπώς, βρίσκονται υπό δοκιμή ουσίες οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να απελευθερώνουν H₂S, προκειμένου να αξιολογηθούν οι φαρμακολογικές τους ιδιότητες (Wallace et al., 2007, Sparatore et al., 2009). Δικαιολογημένα, το H₂S έχει χαρακτηριστεί ως το τρίτο αέριο μόριο σήματος στα θηλαστικά, μετά το NO και το CO (Wang, 2002, Olson, 2009, Tan et al., 2010).

Πάρα το γεγονός ότι η πρώτη αναφορά πως τα φυτά συνθέτουν και απελευθερώνουν H₂S έγινε αρκετά χρόνια πριν (Wilson et al., 1978), δεν υπήρξε αξιόλογη ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τη βιολογία του H₂S στα φυτά, παρά μόνο πρόσφατα. Ο μοριακός και λειτουργικός χαρακτηρισμός ορισμένων τύπων δισουλφοδρασών της κυστεΐνης, ενζύμων τα οποία καταλύουν την ενδογενή παραγωγή H₂S στα φυτά, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας προκειμένου να διευκρινιστεί η δράση του H₂S στα φυτά (Bloem et al., 2005, Riemenschneider et al., 2005, Alvarez et al., 2010). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν την εμπλοκή του H₂S στην επαγόμενη ανθεκτικότητα διαφορετικών φυτικών ειδών έναντι παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης (Zhang et al., 2008, Zhang et al., 2009β, Zhang et al., 2010α, Zhang et al., 2010β, Zhang et al., 2010γ).

1.6.1. Ο ρόλος του H₂S στη μεταγωγή σήματος και στη ρύθμιση σημαντικών λειτουργιών στα φυτά

Το H₂S ικανοποιεί όλες τις φυσικοχημικές και βιολογικές αναγκαίες προϋποθέσεις προκειμένου ένα μόριο να χαρακτηριστεί ως μόριο σήματος. Συγκεκριμένα, το H₂S είναι αέριο, M.B. μόριο με απλή χημική δομή, όμοια με αυτή του νερού. Ωστόσο, το H₂S είναι λιγότερο πολικό από το νερό, αφού το θείο έχει μικρότερο ηλεκτροαρνητικό φορτίο από το οξυγόνο. Επιπλέον, το H₂S δύναται να διαπερνά ελεύθερα τις κυτταρικές μεμβράνες,

αφού η διαλυτότητα του σε λιπόφιλους διαλύτες είναι 5 φορές μεγαλύτερη από αυτή στο νερό, ενώ φαίνεται να παρουσιάζει βιολογική δράση σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Η σύνθεση του H₂S με κύριο υπόστρωμα την L-κυστεΐνη στα φυτά είναι ενζυμικά ελεγχόμενη, σε ένα ανατροφοδοτούμενο κύκλο με τη συμμετοχή του ενζύμου D-cysteine desulphhydrase (D-CDes), ενώ παρουσιάζει στοχευμένη βιολογική δράση κυρίως μέσω της ρύθμισης των KATP διαύλων και του κυκλικού αδενοσινομονοφωσφορικού οξέος (cAMP) (Wang, 2002).

Μια φυσιολογική λειτουργία του φυτού στην οποία το H₂S φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο στη μεταγωγή του σήματος είναι η κίνηση των καταφρακτικών κυττάρων. Ο Lisjak και οι συνεργάτες του (2010) διαπίστωσαν ότι η χρήση τόσο του όξινου θειούχο νατρίου (NaHS), όσο και του GYY4137, δυο πρόδρομων ενώσεων του H₂S, είχε ως αποτέλεσμα το άνοιγμα των στομάτων του φυτού *Arabidopsis thaliana* στο φως και την παρεμπόδιση του κλεισίματός τους στο σκοτάδι. Και οι δυο ενώσεις (NaHS, GYY4137) μείωσαν τη συγκέντρωση του NO στα καταφρακτικά κύτταρα, γεγονός που ενδεχομένως υποδηλώνει ότι το H₂S αλληλεπιδρά με το ABA, το NO και το H₂O₂ για τη μεταγωγή σήματος για την κίνηση των καταφρακτικών κυττάρων. Ο García-Mata και ο Lamattina (2010) αξιολόγησαν τη συμμετοχή του H₂S τόσο στη ρύθμιση της κίνησης των καταφρακτικών κυττάρων, όσο και στην ABA-εξαρτώμενη επαγωγή του κλεισίματος των στομάτων σε απομονωμένες επιδερμίδες φύλλων τριών φυτικών ειδών (*Vicia faba*, *Arabidopsis thaliana* και *Impatiens walleriana*), και έδειξαν ότι η εξωγενής χορήγηση H₂S επάγει το κλείσιμο των στομάτων. Η δράση αυτή του H₂S εν μέρει αναστελλόταν με τη χρήση της γλιβενκλαμίδης, η οποία δρα ως αναστολέας του ATP ανάστροφου μεμβρανικού μεταφορέα (ABC). Επιπρόσθετα, η μείωση της συγκέντρωσης του H₂S με τον περιορισμό της δράσης του ενζύμου D-cysteine desulphhydrase εμπόδιζε εν μέρει το κλείσιμο των στομάτων, καταδεικνύοντας τον ρόλο του H₂S στο κλείσιμο των στομάτων μέσω του ABA-εξαρτώμενου μονοπατιού μεταγωγής σήματος και της ρύθμισης των ανάστροφων μεμβρανικών μεταφορέων (ABC) στα καταφρακτικά κύτταρα.

Ο Zhang και η ερευνητική του ομάδα (2011α) αξιολόγησαν την επίδραση του NaHS στη γήρανση κομμένων ανθέων διαφόρων φυτικών ειδών (*Erigeron annuus* (L.), *Euonymus maackii* Rupr., *Hibiscus syriacus* L., *Liriope spicata* (Thunb.), *Loropetalum chinense* (R. Br.), *Punica granatum* L., *Rosa chinensis* Jacq., και *Salix matsudana* Koidz) και έδειξαν ότι η προσθήκη της ένωσης αυτής στο βάζο είχε ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση της ζωής των ανθέων, με δοσο-εξαρτώμενο του NaHS τρόπο. Η συγκέντρωση

του MDA ήταν αντιστρόφως ανάλογη αυτής του NaHS, ενώ ενδιαφέρον είναι και το γεγονός πως η προσθήκη NaHS στο βάζο προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT, SOD, APX, POD, ενώ ταυτόχρονα μείωσε τη συγκέντρωση του H₂O₂ και του O₂⁻ στα κομμένα άνθη. Σε μια παρόμοια εργασία, αναφέρεται ο ρόλος του H₂S στην πρόωρη γήρανση των φύλλων σε φυτά *Arabidopsis thaliana*, αφού το H₂S είχε προκαλέσει την αυξημένη έκφραση των σχετικών με τη γήρανση γονιδίων (Alvarez et al., 2010). Τέλος σε μια άλλη εργασία της, η ερευνητική ομάδα του Zhang (Zhang et al., 2009α) αποκάλυψε ότι η εξωγενής χορήγηση H₂S, μέσω του NaHS, προκάλεσε τον τυχαίο σχηματισμό ριζών στα φυτικά είδη *Ipomoea batatas*, *Salix mutsudana* και *Clycine max*, και ότι στο φαινόμενο αυτό επλέκονται επίσης το ινδολυλοξικό οξύ (IAA) και το NO.

Τα παραπάνω στοιχεία ενισχύουν την άποψη ότι το H₂S αποτελεί το τρίτο ενδογενές αέριο μόριο σήματος στα φυτά, αφού φαίνεται να εμπλέκεται σε ένα μεγάλο εύρος φυσιολογικών διεργασιών. Ωστόσο, παραμένουν άγνωστα τόσο ο μοριακός μηχανισμός δράσης του, όσο και η αλληλεπίδρασή του με άλλα μόρια σήματος και δευτερογενείς μεταβολίτες. Ως εκ τούτου, επιπλέον μελέτες με τη χρήση προηγμένων τεχνολογιών, όπως οι αναλύσεις μικροσυστοιχιών και οι πρωτεομικές και μεταβολομικές αναλύσεις, πρέπει να πραγματοποιηθούν με στόχο την πλήρη κατανόηση της δράσης του H₂S στη μεταγωγή σήματος στα φυτά.

1.6.2. Ο ρόλος του H₂S κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με την εμπλοκή του H₂S στην επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών έναντι παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης. Κατά συνέπεια, υπάρχουν αρκετά παραδείγματα στα οποία αποδεικνύεται ότι η εξωγενής εφαρμογή πρόδρομων ενώσεων του H₂S, ειδικότερα του NaHS, επάγει τη διασυστηματική ανθεκτικότητα των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (Zhang et al., 2008, Zhang et al., 2009β, Zhang et al., 2010β, Jin et al., 2011, Shan et al., 2011, Li et al., 2012β).

Η έλλειψη νερού είναι η κυριότερη αιτία μείωσης της ανάπτυξης και της παραγωγικότητας των καλλιεργούμενων ειδών, κυρίως σε ξηρικές και ημι-ξηρικές περιοχές. Η μεταχείριση φυτών με NaHS, έχει δείχθει ότι μειώνει τις επιζήμιες συνέπειες

της έκθεσης των φυτών σε συνθήκες έλλειψης νερού ή υπερ-οσμωτικής καταπόνησης. Ο Zhang και οι συνεργάτες του (2009β, 2010β) έδειξαν ότι ο ψεκασμός φυτών σόγιας και γλυκοπατάτας με διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS είχε ως αποτέλεσμα τον μετριασμό των επιζήμιων συνεπειών της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης. Στην πρώτη περίπτωση, ο ψεκασμός της φυλλικής επιφανείας φυτών σόγιας με 0,1 mmol L⁻¹ NaHS κάθε 7 ημέρες, είχε ως συνέπεια την επιβίωση των φυτών 21 ημέρες μετά τη διακοπή του ποτίσματος, σε αντίθεση με τα φυτά που είχαν καταπονηθεί χωρίς να ψεκάστούν με NaHS (θετικός μάρτυρας). Τα φυτά που ψεκαστήκαν με NaHS συγκράτησαν τα επίπεδα υπεροξειδωσής των μεμβρανικών τους λιπιδίων περιορίζοντας τη δραστηριότητα της λιποξυγενάσης (LOX) σε χαμηλότερα επίπεδα, ενώ αύξησαν την απόδοση του αντιοξειδωτικού τους μηχανισμού, αφού η δραστηριότητα της SOD και της CAT παρουσιάστηκε αυξημένη, σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (Zhang et al., 2010β). Στη δεύτερη σχετική μελέτη, φυτά γλυκοπατάτας που αναπτύχθηκαν σε υδροπονικό διάλυμα που περιείχε 15% (β/ο) PEG-6000 και ψεκάζονταν με 0,05 mmol L⁻¹ NaHS καθημερινά, παρουσίασαν ηπιότερα συμπτώματα υπερ-οσμωτικής καταπόνησης σε σύγκριση με τα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς να ψεκάστούν (θετικός μάρτυρας). Τα φυτά που μεταχειρίστηκαν με NaHS κατάφεραν να αυξήσουν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, αφού η δραστηριότητα της SOD, της CAT και της APX ήταν υψηλότερη σε σχέση με αυτή στα φυτά του θετικού μάρτυρα. Επιπρόσθετα, η δραστηριότητα της LOX, όπως επίσης και οι συγκεντρώσεις της MDA και του H₂O₂, διατηρήθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα στα μεταχειρισμένα με NaHS φυτά γλυκοπατάτας, σε σχέση με τα φυτά του θετικού μάρτυρα (Zhang et al., 2009β).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η L-cysteine desulfhydrase και η D-cysteine desulfhydrase (CDes) αποτελούν τα δυο κυριότερα ένζυμα με τα οποία πραγματοποιείται η αποδόμηση της κυστεΐνης, προκειμένου να παραχθεί H₂S στα φυτά. Ο Jin και οι συνεργάτες του (2011) έχουν μελετήσει τη γονιδιακή έκφραση αυτών των ενζύμων σε φυτά *Arabidopsis thaliana*, τόσο σε κανονικές, όσο και σε συνθήκες έλλειψης νερού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γονιδιακή έκφραση των CDes αυξάνεται σταδιακά, με ηλικιακά εξαρτώμενο τρόπο. Επίσης, η μελέτη κατέδειξε ότι η έκφραση των CDes ήταν σημαντικά υψηλότερη στα φύλλα των στελεχών (cauline leaves) σε σχέση με τις ρίζες, τα φύλλα του ρόδακα (rosette leaves) και τα άνθη, σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης. Επιπλέον, η γονιδιακή έκφραση των CDes ήταν παρόμοια με αυτή των σχετικών με την ξηρασία γονιδίων (*DREB2A*, *DREB2B*, *CBF4*, *RD29A*), όταν τα φυτά καταπονήθηκαν με έλλειψη νερού,

ενώ η μεταχείριση με το NaHS είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των σχετικών με την ξηρασία γονιδίων. Η ξηρασία προκάλεσε την αυξημένη παραγωγή H_2S , η οποία μειώθηκε με το πότισμα. Τέλος τα φυτά που μεταχειρίστηκαν με NaHS είχαν μικρότερο άνοιγμα στομάτων, αυξημένη ανθεκτικότητα και μεγαλύτερο βαθμό επιβίωσης σε συνθήκες έλλειψης νερού.

Σε μια άλλη σχετική εργασία, ο Shan και οι συνεργάτες του (2011) έδειξαν ότι ο μετριασμός των επιζήμιων συνεπειών της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης σε σποριόφυτα σιταριού κατά την έκθεσή τους σε διάλυμα 15% (β/ο) PEG-6000, ως συνέπεια της προ-μεταχείρισής τους με NaHS, οφειλόταν κυρίως στον περιορισμό της δευτερογενούς οξειδωτικής καταπόνησης. Στα φυτά τα οποία έτυχαν προ-μεταχείρισης με NaHS, τόσο η δεξαμενή του ασκορβικού οξέος, όσο και η δεξαμενή της γλουταθειόνης, είχαν αυξημένη αναγωγική ικανότητα, αφού η ανηγμένη μορφή τόσο του ασκορβικού οξέος (ASC), όσο και της γλουταθειόνης (GSH) ανιχνεύθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από τις αντίστοιχες οξειδωμένες μορφές τους (DHA και GSSG). Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν και από την αυξημένη δραστηριότητα των ενζύμων APX, GR, αφυδροασκορβική αναγωγή (DHAR) και συνθάση της γ -γλουταμιλοκυστεΐνης (γ -ECS).

Πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα έχουν καταδείξει την προστατευτική δράση της προ-μεταχείρισης με NaHS έναντι των επιζήμιων επιπτώσεων των βαρέων μετάλλων κατά τη βλάστηση σπερμάτων σιταριού. Συγκεκριμένα, σπέρματα σιταριού που προ-μεταχειρίστηκαν με χαμηλές συγκεντρώσεις NaHS και αφέθηκαν να βλαστήσουν σε υποστρώματα με αυξημένη συγκέντρωση ιόντων Al^{3+} (Zhang et al., 2010γ), Cr^{6+} (Zhang et al., 2010α) και Cu^{2+} (Zhang et al., 2008), παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό βλαστικότητας και ανάπτυξης, σε σχέση με τα σπέρματα που αφέθηκαν να βλαστήσουν στις ίδιες συνθήκες, χωρίς προ-μεταχείριση (θετικός μάρτυρας). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προ-μεταχείριση με NaHS είχε ως συνέπεια τον μετριασμό της οξειδωτικής καταπόνησης από τις υψηλές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων, αφού η δραστηριότητα των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, CAT, APX, περοξειδάση της γουαϊακόλλης), όπως και αυτή της αμυλάσης και της εστεράσης, αυξήθηκαν. Επιπλέον, μειώθηκε η δραστηριότητα της λιποξυγενάσης, καθώς επίσης και οι συγκεντρώσεις της MDA και του H_2O_2 στα σπέρματα που έτυχαν προ-μεταχείρισης, σε σχέση με αυτά του θετικού μάρτυρα.

Τέλος, η προ-μεταχείριση καλλιέργειας εναιωρήματος κυττάρων καπνού με NaHS αύξησε σημαντικά το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων κατά τη θερμική καταπόνηση της καλλιέργειας, καθώς επίσης και την ικανότητα αναγέννησης και ανάπτυξης της

καλλιέργειας μετά το τέλος της θερμικής καταπόνησης. Επιπλέον, η προ-μεταχείριση με NaHS μετρίασε τη μείωση της ζωτικότητας των κυττάρων, την αύξηση της εκροής των ηλεκτρολυτών και τη συσσώρευση MDA. Η εξωγενής προσθήκη ιόντων Ca^{2+} στην καλλιέργεια βελτίωσε ακόμα περισσότερο την NaHS-επαγόμενη ανθεκτικότητα στις υψηλές θερμοκρασίες, φανερώνοντας ότι η επαγόμενη ανθεκτικότητα απαιτεί την είσοδο στο κύτταρο ιόντων Ca^{2+} διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς επίσης και τη μεσολάβηση της ενδοκυττάριας καλμοδουλίνης (CaM) (Li et al., 2012β).

1.7. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν να εξετάσει την υπόθεση πως ορισμένα μόρια σήματος δύνανται να προσδίδουν ανθεκτικότητα σε φυτά φράουλας (*Fragaria x ananassa* ποικ. Camarosa) κατά την έκθεσή τους σε διάφορους παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης. Ως εκ τούτου, αξιολογήθηκαν οι επιπτώσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας, ως συνέπεια της παροδικής εμβάπτισης του ριζικού τους συστήματος σε διαλύματα χαμηλής συγκέντρωσης συγκεκριμένων μορίων σήματος (NO ή H_2O_2 ή H_2S), στη συμπεριφορά και την αντίδραση των φυτών κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας, υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης και υψηλών θερμοκρασιών. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, τα φυτά φράουλας είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα, με αποτέλεσμα η ανάπτυξη, η παραγωγικότητα και η ποιότητα των καρπών τους να επηρεάζονται δυσμενώς κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας, ξηρασίας και υψηλών θερμοκρασιών. Κατά συνέπεια, η μελέτη της βιολογικής διέγερσης για την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών φράουλας έναντι των υπό εξέταση παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική. Επιπλέον, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να πρωτοτυπήσει, εισάγοντας νέα γνώση όσον αφορά στη χρήση του H_2S στη βιολογική διέγερση των φυτών φράουλας. Στα πλαίσια αυτά εντάσσεται και η μελέτη συγκεκριμένων μηχανισμών της επαγόμενης ανθεκτικότητας, όπως η μεταγωγή σήματος, ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός, το κυτταρικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό και η γονιδιακή έκφραση.

Η δοκιμασία της υπόθεσης αυτής προϋποθέτει τη μελέτη των μηχανισμών προσαρμογής και εγκλιματισμού σε φυσιολογικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο. Στα πλαίσια της μελέτης της αντίδρασης των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης σε φυσιολογικό

επίπεδο, προσδιορίστηκαν σε φύλλα η σχετική περιεκτικότητα σε νερό (leaf relative water content, LRWC), η εκροή των ηλεκτρολυτών (electrolyte leakage, EL) ως ένδειξη της ζημιάς των κυτταρικών μεμβρανών, η συγκέντρωση φωτοσυνθετικών χρωστικών (chl_a, chl_b, carotenoids), η μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα (F_v/F_m), καθώς επίσης και η υπεροξείδωση των μεμβρανικών λιπιδίων (lipid peroxidation). Σε βιοχημικό επίπεδο προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του ανηγμένου ασκορβικού (ASC) και του δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA), και της ανηγμένης (GSH) και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), καθώς επίσης και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης (redox state). Σε βιοχημικό επίπεδο προσδιορίστηκαν επίσης η συγκέντρωση του H₂O₂, του NO και του H₂S. Τέλος, σε μοριακό επίπεδο αξιολογήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα, τον μεταγραφικό παράγοντα DREB, πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης (HSPs), την υδατοπορίνη (PIP), καθώς επίσης και βιοσυνθετικά ένζυμα του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης. Οι τεχνικές αυτές επιλέχθηκαν με σκοπό την ολιστική προσέγγιση των μηχανισμών με τους οποίους τα υπό εξέταση μόρια σήματος επάγουν, μέσω της βιολογικής διέγερσης, την ανθεκτικότητα των φυτών φράουλας (ποικ. Camarosa) κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας, υπερ-οσμωτικής καταπόνησης και υψηλών θερμοκρασιών.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών φράουλας και μεταχειρίσεις

Φυτά φράουλας (*Fragaria x ananassa* ποικ. Camarosa) που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (3:1) σε θερμοκήπιο για 6 μήνες, μεταφέρθηκαν και καλλιεργήθηκαν υδροπονικά σε απιονισμένο νερό σε γλάστρες 15 L σε θάλαμο ανάπτυξης, με συνεχόμενη παροχή αέρα, για 7 ημέρες. Οι συνθήκες στον θάλαμο ανάπτυξης ήταν οι εξής: φωτοπερίοδος 16/8 h, θερμοπερίοδος 23/20 °C, φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και σχετική υγρασία 65%. Στη συνέχεια, τα φυτά καλλιεργήθηκαν υδροπονικά σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης για επιπλέον 7 ημέρες, μέχρι την έναρξη των μεταχειρίσεων.

Η εφαρμογή των παραγόντων βιολογικής διέγερσης στα φυτά φράουλας πραγματοποιήθηκε με την εμβάπτιση των ριζών των φυτών σε απιονισμένο νερό που περιείχε γνωστές συγκεντρώσεις είτε των υπό εξέταση μορίων σήματος, είτε προδρόμων ενώσεών τους. Συγκεκριμένα, το H_2O_2 χορηγήθηκε με την εμβάπτιση των ριζών των φυτών σε διάλυμα 10 $\text{mmol L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ για 8 h, ενώ το NO με την εμβάπτιση των ριζών των φυτών σε απιονισμένο νερό που περιείχε 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ νιτροπρωσσικό νάτριο (sodium nitroprusside dehydrate, SNP, πρόδρομη ένωση του NO) για 48 h. Το διάλυμα εμβάπτισης των ριζών σε SNP ανανεωνόταν κάθε 12 h, έτσι ώστε η συγκέντρωση του SNP στο διάλυμα να παραμένει σταθερή. Η εφαρμογή του H_2S πραγματοποιήθηκε με τρόπο ανάλογο του NO, αφού οι ρίζες φυτών φράουλας εμβαπτίστηκαν για 48 h σε διάλυμα που περιείχε 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ όξινο θειούχο νάτριο (NaHS , πρόδρομη ένωση του H_2S), ενώ το διάλυμα εμβάπτισης ανανεωνόταν κάθε 12 h.

Με το πέρας της εμβάπτισης, τα φυτά μεταφέρθηκαν είτε σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης για προ-καθορισμένο χρονικό διάστημα προκειμένου να εγκλιματιστούν (περίοδος εγκλιματισμού), είτε απευθείας στις υπό εξέταση συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων [διάλυμα 100 $\text{mmol L}^{-1} \text{NaCl}$, διάλυμα 10% (β/α) PEG-6000, 42°C], με τρόπο ώστε όλες οι μεταχειρίσεις του κάθε πειράματος να ξεκινούν ταυτόχρονα (Ημέρα 0 ή Ωρα 0). Κάθε μεταχείριση επαναλήφθηκε τρεις φορές. Δείγματα πλήρως εκπτυγμένων φύλλων λήφθηκαν αμέσως μετά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης (Ημέρα 0 ή Ωρα 0) και μετά από προκαθορισμένες χρονικές περιόδους. Τα

δείγματα ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

2.2. Αγωγιμότητα των στομάτων

Για τη μέτρηση της αγωγιμότητας των στομάτων χρησιμοποιήθηκε το πορόμετρο της εταιρείας Delta-T Devices Ltd (ΔT-Porometer AP4). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τυχαία επιλεγμένο δείγμα 9 πλήρως εκπτυγμένων φύλλων στα φυτά, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.3. Μέτρηση της μεγίστης φωτοσυνθετικής αποτελεσματικότητας

Η παράμετρος φθορισμού της χλωροφύλλης F_v/F_m , ως ένδειξη της μεγίστης κβαντικής και φωτοχημικής απόδοσης του PSII, μετρήθηκε σε πλήρως εκπτυγμένα φύλλα στα φυτά, με τη χρήση του φορητού φθορισμομέτρου OS-30p (Opti-Sciences, Inc, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα φύλλα επωάζονταν στο σκοτάδι για 1 h, πριν από τη μέτρηση.

2.4. Υδατικό δυναμικό των φύλλων

Η μέτρηση του υδατικού δυναμικού των φύλλων (MPa) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του οργάνου WP4-T Dewpoint Potential Meter (Decagon Devices, Inc, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, δισκία φυτικού ιστού διαμέτρου 4 cm που αφερέθηκαν από τα φυτά εξισορροπήθηκαν σε θερμοκρασία 25 °C στους εξωτερικούς κύκλους του οργάνου και έπειτα τοποθετήθηκαν στον θάλαμο του οργάνου για την πραγματοποίηση των μετρήσεων.

2.5. Μέτρηση της σχετικής περιεκτικότητας των φύλλων σε νερό

Η σχετική περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό (LRWC) υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Yamasaki και Dillemburg (1999). Πλήρως εκπτυγμένα φύλλα αφαιρέθηκαν από το στέλεχος και ζυγίστηκαν για τον προσδιορισμό του νωπού τους βάρους (FW). Για τον

προσδιορισμό του κορεσμένου βάρους των φύλλων (TM), αυτά αφέθηκαν να επιπλέουν σε απιονισμένο νερό για 3 h, μέσα σε κλειστό τρυβλίο Petri. Στο τέλος της περιόδου επώασης στο τρυβλίο, τα φύλλα σκουπίστηκαν για απομάκρυνση του επιφανειακού νερού και ζυγίστηκαν (TM). Στη συνέχεια τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε προθερμασμένο φούρνο στους 80 °C για 48 h και όταν σταθεροποιήθηκε το βάρος τους, υπολογίστηκε η ξηρή τους μάζα (DM). Η σχετική περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό (LRWC) υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη εξίσωση: $LRWC = \frac{FM-DM}{TM-DM} \times 100$. Για τη μέτρηση του βάρους των φύλλων χρησιμοποιήθηκε ζυγαριά ακριβείας (0,0001 g).

2.6. Εκροή των ηλεκτρολυτών

Η εκροή των ηλεκτρολυτών (EL) προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον Dionisio-Sese (1998). Εν συντομία, νωπά φύλλα φράουλας (~200 mg) τεμαχίστηκαν (5 mm μήκος) και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες Falcon που περιείχαν 10 mL απιονισμένου νερού. Οι σωλήνες επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 32 °C επί 2 h και υπολογίστηκε η αρχική ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC₁). Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 121 °C για 20 min με σκοπό την απελευθέρωση όλων των ηλεκτρολυτών. Ακολούθως τα δείγματα ψύχθηκαν και μετρήθηκε η τελική ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC₂). Η εκροή των ηλεκτρολυτών υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση: $EL = \frac{EC1}{EC2} \times 100$.

2.7. Ποσοτικός προσδιορισμός των φωτοσυνθετικών χρωστικών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της χλωροφύλλης α (chl_a), της χλωροφύλλης β (chl_b), των καροτενοειδών (carotenoids) και των ανθοκυανινών (Anthocyanins) πραγματοποιήθηκε μετά από εκχύλιση του φυτικού ιστού με τη χρήση του διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), σύμφωνα με τον Richardson και τους συνεργάτες του (2002). Αναλυτικά, 5 δισκία φυτικού ιστού διαμέτρου 1 cm τοποθετήθηκαν σε 5 mL DMSO και παρέμειναν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60 °C για 30 min.

Μετά το τέλος της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομέτρηση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος εκχύλισης σε φασματοφωτόμετρο JENWAY 640 UV/VIS στα εξής μήκη κύματος: 661 nm, 643 nm, 470 nm και 534 nm. Για μηδενισμό του

φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης DMSO. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των φωτοσυνθετικών χρωστικών (g L^{-1}), πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των ακόλουθων εξισώσεων, σύμφωνα με τους Sims και Gamon (2002):

$$\text{Ανθοκυανίνες} = (0,0821 * \mathbf{A534}) - (0,00687 * \mathbf{A643}) - (0,002423 * \mathbf{A661})$$

$$\mathbf{Chlb} = (0,02255 * \mathbf{A643}) - (0,00439 * \mathbf{A534}) - (0,004488 * \mathbf{A661})$$

$$\mathbf{Chla} = (0,01261 * \mathbf{A661}) - (0,001023 * \mathbf{A534}) - (0,0022 * \mathbf{A643})$$

$$\mathbf{Καροτενοειδή} = \{ \mathbf{A470} - 17,1 * (\mathbf{Chla} + \mathbf{Chlb}) - (9,449 * \mathbf{Ανθοκυανίνη}) \} / 119,26$$

2.8. Υπεροξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων

Το επίπεδο της υπεροξειδωσης των μεμβρανικών λιπιδίων μετρήθηκε έμμεσα με βάση τη συγκέντρωση της μαλονδιαλδεύδης (MDA), τελικού προϊόντος της οξειδωτικής διάσπασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που προτείνουν οι Heath και Packer (1968). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός έγχρωμου συμπλόκου που σχηματίζεται μεταξύ της MDA και του TBA (2-θειοβαρβιτουρικό οξύ) με θέρμανση σε όξινες συνθήκες, που απορροφά στα 532 nm. Δείγματα φύλλων ομογενοποιήθηκαν σε ψυχόμενο ιγδίο πορσελάνης και στη συνέχεια εκχυλίστηκαν με την προσθήκη 0,1% (β/ο) TCA (τριγλωροξικό οξύ) σε αναλογία βάρους ιστού: όγκου TCA (1:3). Τα ομογενοποιημένα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min (15.000 g, 4 °C) και το υπερκείμενο (0,5 mL) συλλέχθηκε και αναμείχθηκε με 1,5 mL διαλύματος 0,5% (β/ο) TBA διαλυμένου σε 20% (β/ο) TCA. Τα μίγματα θερμάνθηκαν στους 95 °C για 30 min και η αντίδραση τερματίστηκε τοποθετώντας τα διαλύματα σε πάγο. Σε περίπτωση που τα διαλύματα ήταν θολά, φυγοκεντρήθηκαν για 5 min (10.000 g, 4 °C) και στη συνέχεια μετρήθηκε η οπτική πυκνότητά τους στα 532 nm και στα 600 nm σε φασματοφωτόμετρο JENWAY 640 UV/VIS. Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm αφαιρέθηκαν από τις τιμές στα 532 nm και η συγκέντρωση της MDA υπολογίστηκε με βάση τον τύπο του Lambert-Beer, με συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA ίσο με $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως nmol MDA g^{-1} νωπού βάρους (FW).

2.9. Ποσοτικός προσδιορισμός του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

Η συγκέντρωση του H_2O_2 στα φύλλα προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά, σύμφωνα με τους Loreto και Velikova (2001). Η μέθοδος στηρίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του H_2O_2 και του ιωδιούχου καλίου (KI). Εν συντομία, δείγματα φύλλων ομογενοποιήθηκαν σε ψυχόμενο ιγδίο πορσελάνης και $\sim 0,1$ g δείγματος εκχυλίστηκε με την προσθήκη 0,1% (β/ο) TCA σε πάγο. Τα εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 min (15.000 g, 4 °C) και 0,5 mL του υπερκείμενου μεταφέρθηκαν σε καθαρό σωλήνα. Η χρωματική αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη διαδοχική προσθήκη 0,5 mL 10 mmol L⁻¹ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,0), 0,5 mL υπερκείμενου και 1 mL 1 mol L⁻¹ KI. Με την προσθήκη του KI ξεκίνησε η αντίδραση, η οπτική απορρόφηση της οποίας στα 390 nm καταγραφόταν διαρκώς για 1 min. Η συγκέντρωση του H_2O_2 υπολογίστηκε με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς, που κατασκευάστηκε με γνωστές συγκεντρώσεις H_2O_2 . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως nmol H_2O_2 g⁻¹FW.

2.10. Ποσοτικός προσδιορισμός του μονοξειδίου του αζώτου (NO)

Η συγκέντρωση του NO στα φύλλα προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφουν η Zhou και οι συνεργάτες της (2005), το οποίο στηρίζεται στην αντίδραση διαζώτωσης με τη χρήση του αντιδραστήριου Griess. Το αντιδραστήριο Griess αποτελείται από τις χημικές ενώσεις σουλφανιλαμίδιο (sulfanilamide) και N-1-ναφθυλαιθυλενοδιαμίνη (N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride – NED) υπό όξινες συνθήκες. Για την παρασκευή του αντιδραστήριου Griess χρησιμοποιήθηκαν 0,2% (β/ο) N-1-ναφθυλαιθυλενοδιαμίνη και 2% (β/ο) σουλφανιλαμίδιο, διαλυμένο σε 5% (β/ο) φωσφορικό οξύ.

Εν συντομία, δείγματα φύλλων ομογενοποιήθηκαν σε ψυχόμενο ιγδίο πορσελάνης και $\sim 0,1$ g δείγματος εκχυλίστηκε με 1 mL 50 mmol L⁻¹ δροσερό οξικό οξύ (pH 3,6) το οποίο περιείχε 4% οξικό ψευδάργυρο. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε για 15 min (10.000 g, 4 °C) και το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε καθαρό σωλήνα. Το ίζημα που παρέμεινε στη βάση του αρχικού σωλήνα επανα-εκχυλίστηκε με 0,5 mL ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης και φυγοκεντρήθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα δυο υπερκείμενα αναμείχθηκαν και προστέθηκε $\sim 0,1$ g ενεργού άνθρακα, με στόχο την πλήρη απομάκρυνση των

χλωροφυλλών από το υπερκείμενο. Ο αποχρωματισμός του υπερκειμένου είναι απαραίτητος γιατί η οπτική πυκνότητα του δείγματος επηρεάζεται από αυτή της χλωροφύλλης, αφού και οι δυο ενώσεις απορροφούν σε παρόμοια μήκη κύματος. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση του δείγματος για τον πλήρη αποχρωματισμό του (15.000 g, 15 min, 4 °C). Κατόπιν, σε 1 mL διαυγούς υπερκειμένου προστέθηκαν 1 mL του αντιδραστηρίου Griess και το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Ακολούθησε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του μίγματος στα 540 nm. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε 1 mL του αντιδραστηρίου Griess σε 1 mL του διαλύματος εκχύλισης. Η περιεκτικότητα του NO στα άγνωστα δείγματα υπολογίστηκε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς με εύρος γνωστών συγκεντρώσεων NaNO_2 . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως $\text{nmol NO g}^{-1}\text{FW}$.

2.11. Ποσοτικός προσδιορισμός του υδροθείου (H_2S)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του H_2S πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφουν ο Nashef και οι συνεργάτες του (1977). Εν συντομία, δείγματα φύλλων ομογενοποιήθηκαν σε ψυχόμενο ιγδίο πορσελάνης με υγρό άζωτο, και ~0,3 g παγωμένου ιστού εκχυλίστηκε με 1 mL 100 mmol L^{-1} ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7) που περιείχε 10 mmol L^{-1} EDTA. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε για 15 min (15.000 g, 4 °C) και 100 μL από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του H_2S , σε διάλυμα αντίδρασης που περιείχε επίσης 1.880 μL διαλύματος εκχύλισης και 20 μL 20 mmol L^{-1} 5,5-διθειο-δισ-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB), σε συνολικό όγκο 2.000 μL . Το διάλυμα αντίδρασης επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min και στη συνέχεια καταγράφηκε η απορρόφησή του στα 412 nm. Η περιεκτικότητα του H_2S στα άγνωστα δείγματα υπολογίστηκε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς με εύρος γνωστών συγκεντρώσεων NaHS . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως $\text{nmol H}_2\text{S g}^{-1}\text{FW}$.

2.12. Ποσοτικός προσδιορισμός του ασκορβικού και δεϋδροασκορβικού οξέος και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του ασκορβικού οξέος

Η περιεκτικότητα των φύλλων σε ανηγμένο ασκορβικό (ASC) και σε δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA) προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που προτείνουν η

Foyer και οι συνεργάτες της (1983), με ελαφρές τροποποιήσεις. Εν συντομία, αμέσως μετά τη συλλογή των φύλλων ακολούθησε ομογενοποίησή τους σε πορσελάνινο ιγδίο με υγρό άζωτο και εκχύλιση με παγωμένο $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$ (υπερχλωρικό οξύ) σε αναλογία μάζας ιστού: όγκου διαλύματος εκχύλισης 1:3. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 min (14.000 g, 4 °C) και παραλαβή του υπερκείμενου στο οποίο προστέθηκε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ρυθμιστικό διάλυμα HEPES-KOH (pH 7) σε αναλογία όγκου ρυθμιστικού διαλύματος: όγκου εκχυλίσματος 1:4. Η περίσσεια υπερχλωρικού οξέος εξουδετερώθηκε με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας $1,7 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{CO}_3$ μέχρι την τιμή pH 5,6. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 15 min (14.000 g, 4 °C) και 50 μL από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ASC.

Το διάλυμα αντίδρασης συνολικού όγκου 1 mL περιείχε 60 mmol L^{-1} ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 6,3), 50 μL υπερκείμενου και 1 U APX (Ασκορβική περοξειδάση από *Cucurbita* sp.) (Sigma-Aldrich, EC 1.10.3.3). Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη της APX και η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας στα 265 nm καταγραφόταν για 2 min, σε σύγκριση με τον μάρτυρα που δεν περιείχε APX. Η συγκέντρωση του ανηγμένου ασκορβικού οξέος υπολογίστηκε με βάση τον τύπο του Lambert-Beer, χρησιμοποιώντας ως συντελεστή μοριακής απόσβεσης την τιμή $\epsilon_{265 \text{ nm}}^M = 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Η ποσοτικοποίηση του ολικού ασκορβικού οξέος στα εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε με την ίδια δοκιμή, αφού προηγουμένως στα εκχυλίσματα προστέθηκε 100 mmol L^{-1} DL-διθειοθρεϊτόλης (DTT) (10 μL 100 mmol L^{-1} DTT σε 100 μL υπερκείμενου, 10 min), με στόχο την πλήρη αναγωγή του ασκορβικού οξέος. Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε δεϋδροασκορβικό οξύ υπολογίστηκε ως η διαφορά μεταξύ των δυο τιμών. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν ως nmol ASC ή DHA g^{-1}FW . Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (%) του ασκορβικού οξέος εκφράστηκε ως το ποσοστό του ανηγμένου ασκορβικού (ASC) ως προς το ολικό ασκορβικό οξύ $[\text{ASC}/(\text{ASC}+\text{DHA})] \times 100$.

2.13. Ποσοτικός προσδιορισμός της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού της γλουταθειόνης

Η συγκέντρωση των φύλλων σε ολική, ανηγμένη (GSH) και οξειδωμένη (GSSG) γλουταθειόνη, προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Griffith (1980), γνωστή ως

αντίδρασης GR-DTNB, με ελάχιστες τροποποιήσεις. Η δοκιμή στηρίζεται στη γραμμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της ολικής γλουταθειόνης και της ταχύτητας σχηματισμού ανηγμένου έγχρωμου προϊόντος του DTNB από τη γλουταθειόνη, που ανάγεται συνεχώς από το ένζυμο GR με δότη ηλεκτρονίων το $\text{NADPH}+\text{H}^+$. Με την ίδια δοκιμή και με την προσθήκη της 2-βινυλοπυριδίνης που αδρανοποιεί την ανηγμένη γλουταθειόνη στο διάλυμα αντίδρασης προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης. Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης υπολογίστηκε ως η διάφορα των δυο τιμών (ολική γλουταθειόνη μείον την οξειδωμένη γλουταθειόνη).

Δείγματα φύλλων ομογενοποιήθηκαν σε παγωμένο ιγδίο πορσελάνης με υγρό άζωτο και ~0,1 g δείγματος εκχυλίσθηκε σε 0,5 mL 2% (β/ο) σουλφοσαλικυλικό οξύ που περιείχε 1 mmol L⁻¹ EDTA και 2% (β/ο) πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVPP). Η παρουσία σουλφοσαλικυλικού οξέος κατά την εκχύλιση είχε ως αποτέλεσμα την απουσία πρωτεϊνών από τα εκχυλίσματα, γεγονός πολύ σημαντικό για τον μετέπειτα προσδιορισμό της γλουταθειόνης. Τα εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 min (15.000 g, 4 °C) και η γλουταθειόνη προσδιορίστηκε στο υπερκείμενο. Το διάλυμα αντίδρασης συνολικού όγκου 750 μL περιείχε 100 mmol L⁻¹ ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7,0), 4,4 mmol L⁻¹ EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ), 0,3 mmol L⁻¹ DTNB [5,5-διθειο-δισ-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ)] και 0,5 μονάδες/mL GR (Sigma-Aldrich, EC 1.6.4.2). Στο διάλυμα αντίδρασης προστέθηκαν 50 μL εκχυλίσματος και το μίγμα επώαστηκε για 5 min. Η έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 50 μL $\text{NADPH}+\text{H}^+$ (0,48 mg $\text{NADPH}+\text{H}^+$ /mL, Sigma-Aldrich) στο διάλυμα αντίδρασης και η οπτική πυκνότητα του μίγματος στα 412 nm καταγραφόταν για 10 min, σε σύγκριση με μίγμα που δεν περιείχε φυτικό εκχύλισμα. Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης πραγματοποιήθηκε με την ίδια δοκιμή, μετά την προσθήκη 2-βινυλοπυριδίνης στο εκχύλισμα για την πλήρη αδρανοποίηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (2 μL 2-βινυλοπυριδίνης σε 100 μL εκχυλίσματος, 1 h στους 25 °C). Οι τιμές της ταχύτητας αναγωγής του DTNB παρουσία των εκχυλισμάτων συγκρίθηκαν με πρότυπη καμπύλη ταχυτήτων αναγωγής του DTNB για εύρος γνωστών συγκεντρώσεων γλουταθειόνης από 0,125 έως 4 μmol L⁻¹ και οι τιμές εκφράστηκαν ως nmol GSH ή GSSG g⁻¹FW. Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (%) της γλουταθειόνης εκφράστηκε ως το ποσοστό της ανηγμένης γλουταθειόνης ως προς την ολική γλουταθειόνη $[\text{GSH}/(\text{GSH}+\text{GSSG})]\times 100$.

2.14. Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA)

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τους ιστούς φύλλων, ριζών και καρπών φράουλας αναπτύξαμε ένα νέο, γρήγορο και οικονομικό πρωτόκολλο. Το πρωτόκολλο αυτό παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω:

1. Περίπου 100 mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού (φύλλα, ρίζες ή καρποί) αναμείχθηκε με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης [$0,5 \text{ mol L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 9), 1% (β/ο) SDS] και έπειτα από έντονη ανάδευση προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 1-2 min και φυγοκέντρηση για 5 min (14.000 g, 4 °C).
2. Η υπερκείμενη φάση (600-700 μL) μεταφέρθηκε σε νέο παγωμένο σωλήνα και προστέθηκε ίση ποσότητα φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Ακολούθησε έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 7 min (14.000 g, 4 °C).
3. Η προηγούμενη διαδικασία επαναλήφθηκε.
4. Μετά τη φυγοκέντρηση, η υπερκείμενη υγρή φάση (300-400 μL) μεταφέρθηκε προσεκτικά, ώστε να μην μεταφερθεί η λευκή ενδιάμεση φάση, σε νέο σωλήνα και φυγοκεντρήθηκε για 7 min (16.000 g, 4 °C).
5. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο σωλήνα και αναμείχθηκε με 1/10 όγκου 3 mol L^{-1} NaOAc (οξικό νάτριο) (pH 5,6) και 1 όγκο καθαρής αιθανόλης. Ακολούθησε ανάμιξη με αναστροφή και διατήρηση του δείγματος στους $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ για 20 min, με στόχο την καθίζηση του RNA.
6. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 8 min (16.000 g, 4 °C), απόχυση του υπερκείμενου και διαλυτοποίηση/ξέπλυμα του ιζήματος σε 1 mL 70% (ο/ο) αιθανόλη. Ακολούθησε ανάδευση και φυγοκέντρηση για 3 min (16.000 g, 4 °C)].
7. Απόχυση του υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος στους $50 \text{ }^\circ\text{C}$ για 2-3 min.
8. Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 20-30 μL dd H_2O . Διατήρηση των δειγμάτων στους $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Το παραπάνω πρωτόκολλο αποδείχθηκε ικανό να απομονώσει λειτουργικό RNA, το οποίο να καθιστά δυνατή τη σύνθεση cDNA και την ποσοτική ανάλυση qRT-PCR.

2.15. Ποσοτικοποίηση ριβονουκλεϊκών οξέων

Η συγκέντρωση του RNA (ng/ μ L) και ο έλεγχος της καθαρότητάς του (ποσοτική και ποιοτική ανάλυση) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Nanodrop ND-1000, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, και με ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή αγαρόζης 1,5% (β /o).

2.16. Μεταχείριση του παρασκευάσματος νουκλεϊκών οξέων με το ένζυμο δεοξυριβονουκλεάση (rDNase I)

Η δεοξυριβονουκλεάση (rDNase I) είναι ένα πολυδύναμο ένζυμο που καταλύει την υδρολυτική διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στην αλυσίδα του DNA για την απελευθέρωση 5'-φωσφορυλιωμένων δι-, τρι-, και ολιγο-νουκλεοτιδικών προϊόντων. Η rDNase I είναι ένα είδος νουκλεάσης και αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο έρευνας για τον χειρισμό του DNA σε μια σειρά εφαρμογών της μοριακής βιολογίας. Μερικές από τις χρήσεις του περιλαμβάνουν:

1. Την πέψη και απομάκρυνση ποσοτήτων μολυσματικού DNA μετά την απομόνωση του RNA
2. Τον καθαρισμό του RNA πριν από την αντίδραση RT-PCR και την ποσοτική ανάλυση qPCR
3. Την αναγνώριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών στο DNA (rDNase I footprint)

Η πέψη και απομάκρυνση των ποσοτήτων γενομικού DNA με τη μεταχείριση του απομονωθέντος γενομικού υλικού με rDNase I είναι αναγκαία, καθώς ακόμα και ελάχιστες ποσότητες DNA που ίσως παραμείνουν στο δείγμα (μέχρι 10 μ g/ mL), είναι ικανές να προκαλέσουν ψευδή θετικά σήματα σε επόμενες αντιδράσεις qPCR.

Για την πέψη του γενομικού DNA με σκοπό τον καθαρισμό του RNA χρησιμοποιήθηκε το rDNase set της γερμανικής εταιρείας MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως περιγράφεται παρακάτω:

1. Αρχικά ετοιμάστηκε το μίγμα του ενζύμου rDNase I (από Bovine pancreas παραγόμενο σε *Pichia pastoris*) με το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (reaction buffer for rDNase I) προσθέτοντας 1 μ L διαλυτοποιημένου ενζύμου rDNase I σε 10 μ L ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (Μίγμα 1).

2. Στο αρχικά απομονωθέν δείγμα γενομικού υλικού (DNA και RNA) προστέθηκε 1/10 όγκου του μίγματος 1 (π.χ. σε 50 μL διαλύματος RNA προστέθηκαν 5 μL του μίγματος 1).
3. Ακολούθησε επώαση του δείγματος στους 37 °C για 30 min.
4. Καθαρισμός του RNA.

Για τον καθαρισμό του δείγματος RNA μετά τη μεταχείριση με rDNase I, αυξήθηκε ο όγκος του στα 150 μL με την προσθήκη dd H₂O και σε αυτό προστέθηκαν 2,5 όγκοι (400 μL) καθαρής αιθανόλης και 1/10 όγκου (15 μL) 3 mol L⁻¹ NaOAc (pH 5,6). Το μίγμα αναδεύτηκε έντονα και επώαστηκε στους -20 °C για 1-2 h. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος για 15 min (16.000 g, 4 °C), απόχυση του υπερκείμενου και ξήρανση του ίζηματος στους 50 °C για 2-3 min. Τέλος, το ίζημα (καθαρό RNA) διαλυτοποιήθηκε σε 20-30 μL dd H₂O. Η συγκέντρωση του RNA (ng/ μL) και ο έλεγχος της καθαρότητάς του (ποσοτική και ποιοτική ανάλυση) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Nanodrop ND-1000. Το δείγμα διατηρήθηκε στους -80 °C μέχρι την ανάλυσή του.

2.17. Μεταχείριση του παρασκευάσματος νουκλεϊκών οξέων με το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase A)

Η ριβονουκλεάση (RNase A) είναι ένα είδος νουκλεάσης που καταλύει την πέψη της αλυσίδας του RNA σε μικρότερα κομμάτια, κυρίως δι-, τρι-, και ολιγο-νουκλεοτίδια. Η χρήση της RNase A με σκοπό την απομόνωση καθαρού DNA αποτελεί προϋπόθεση σε διάφορες εφαρμογές της μοριακής βιολογίας, όπως είναι η κλωνοποίηση, η αλληλούχηση του DNA, η PCR και η ανάλυση περιορισμού (restriction analysis).

Για την πέψη του RNA στο πρότυπο απομονωθέν γενομικό υλικό χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο RNase A της γερμανικής εταιρείας MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, όπως περιγράφεται παρακάτω:

1. Στα πρότυπα απομονωθέντα δείγματα γενομικού υλικού (DNA και RNA) προστέθηκε dd H₂O μέχρι τελικού όγκου 50 μL .
2. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1/10 όγκου εναιωρήματος RNase A σε νερό (1 μg RNase A μL^{-1}) (Μίγμα 1) (π.χ. σε 50 μL διαλύματος γενομικού υλικού προστέθηκε 5 μL του μίγματος 1).

3. Ακολούθησε επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
4. Καθαρισμός και παραλαβή του DNA.

Για τον καθαρισμό του δείγματος DNA μετά τη μεταχείριση με RNase, αυξήθηκε ο όγκος του στα 150 μL με την προσθήκη dd H₂O και σε αυτό προστέθηκαν 2,5 όγκοι (400 μL) καθαρής αιθανόλης και 1/10 όγκου (15 μL) 3 mol L⁻¹ NaOAc (pH 5,6). Το μίγμα αναδεύτηκε έντονα και επώαστηκε στους -20 °C για 1-2 h. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος για 15 min (16.000 g, 4 °C), απόχυση του υπερκειμένου και ξήρανση του ιζήματος στους 50 °C για 2-3 min. Τέλος, το ίζημα (καθαρό DNA) διαλυτοποιήθηκε σε 20-30 μL dd H₂O. Η συγκέντρωση του DNA (ng/ μL) και ο έλεγχος της καθαρότητάς του (ποσοτική και ποιοτική ανάλυση) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Nanodrop ND-1000. Το δείγμα διατηρήθηκε στους -80 °C μέχρι την ανάλυσή του.

2.18. Ηλεκτροφόρηση του DNA και του RNA

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού τμημάτων τόσο DNA, όσο και RNA. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και βασίζεται στο γεγονός ότι το γενομικό υλικό έχει αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να κινείται προς τον θετικό πόλο, όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο. Η μετακίνηση του γενομικού υλικού μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο επηρεάζεται από το μέγεθός του, τη συγκέντρωση της αгарόζης στην πηκτή, την τάση του πεδίου και τη διαμόρφωση του γενομικού υλικού.

Η μεθοδολογία της ηλεκτροφόρησης περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

1. Για την κατασκευή της πηκτής αгарόζης, προστέθηκε 1,5 g αгарόζης σε 100 mL διαλύματος Tris-acetate-EDTA (TAE) σε κωνική φιάλη των 250 mL. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί τελείως η αгарόζη.
2. Ακολούθως το διάλυμα TAE-αгарόζης αφέθηκε να κρυώσει στους 50 °C και σε αυτό προστέθηκε 4 μL χρωστικής ουσίας GelRedTM. Έπειτα, το διάλυμα μεταφέρθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε να πήξει, οπότε και αφαιρέθηκε το κτένι για τη δημιουργία φρεατίων.
3. Στα δείγματα DNA και RNA που ηλεκτροφορήθηκαν προστέθηκε 1/10 όγκου διαλύματος φόρτωσης με στόχο την κατακράτηση του μίγματος στον πυθμένα του

φρεατίου και την αποτροπή διάχυσής του, καθώς επίσης και τον έλεγχο της κίνησης του γενομικού υλικού στην πηκτική αгарόζης.

4. Ακολούθησε φόρτωση των μιγμάτων στα φρεάτια της πηκτικής αгарόζης και στη συνέχεια εφαρμόστηκε τάση 1-4 volts/cm. Η ηλεκτροφόρηση λάμβανε χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ως πρότυπο μοριακό βάρος χρησιμοποιήθηκε DNA του φάγου λ.
5. Για την οπτικοποίηση της πηκτικής αгарόζης και την ανίχνευση των ζωνών του DNA και του RNA έγινε έκθεση της πηκτικής σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm) σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.19. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε το Primescript 1st Strand Synthesis kit της εταιρείας Takara (Takara Bio Inc., Japan). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια. Ως εκ τούτου, κατά το πρώτο στάδιο 1 μg ολικού RNA (μL RNA στα οποία περιέχεται 1 μg RNA σύμφωνα με την ποσοτική ανάλυση) με 1 μL 50 μmol L⁻¹ εκκινητή oligo (dT) και 1 μL 10 mmol L⁻¹ dNTPs σε τελικό όγκο 10 μL τοποθετήθηκαν στους 65 °C για 5 min. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε η αποδιάταξη των δευτερογενών δομών του RNA καθώς και των εκκινητών. Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων του πρώτου σταδίου αναφέρονται στον Πίνακα 1. Με το πέρας της αντίδρασης, όλα τα διαλύματα αντίδρασης τοποθετήθηκαν στον πάγο.

Πίνακας 1: Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής - 1^ο Στάδιο

| Συστατικά αντίδρασης | Όγκος |
|---|--------------|
| Ολικό RNA (1 μg) | x μL |
| Εκκινητής oligo (dT) (50 μmol L ⁻¹) | 1 μL |
| dNTPs (10 mmol L ⁻¹) | 1 μL |
| H ₂ O (RNase-free) | Έως τα 10 μL |

Κατά το δεύτερο στάδιο προσθέθηκαν τα υπόλοιπα αντιδραστήρια (ρυθμιστικό διάλυμα, παρεμποδιστής ριβονουκλεασών και ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης), όπως φαίνονται στον Πίνακα 2. Ακολούθως, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμικό

κυκλοποιητή και το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την αντίδραση της σύνθεσης cDNA είναι το εξής:

1. 30 °C για 10 min
2. 42 °C για 60 min
3. 90 °C για 5 min
4. 4 °C ∞

Πίνακας 2: Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής - 2^ο Στάδιο

| Συστατικά αντίδρασης | Όγκος |
|--|----------------|
| Μίγμα εκμαγείου RNA/ εκκινητών | 10 μ L |
| Ρυθμιστικό διάλυμα αντιστροφής μεταγραφής (5x) | 4 μ L |
| Παρεμποδιστής ριβονουκλεασών (40 units/ μ L) | 0,5 μ L |
| Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης (100 units/ μ L) | 1 μ L |
| H ₂ O (RNase-free) | Έως 20 μ L |

2.20. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)

Οι αντιδράσεις qRT-PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή Biorad IQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA). Κάθε αντίδραση περιείχε 4 μ L cDNA (αραιωμένο 1:10 σε dd H₂O), 5 μ L 2x μίγματος αντίδρασης (KAPA SYBR® FAST Universal 2X qPCR Master Mix, Kapa Biosystems, Inc., USA) και 0,5 μ L από κάθε εκκινητή (ανοδικός και καθοδικός τελικής συγκέντρωσης 10 pmol L⁻¹ ο καθένας). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10 μ L. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το ριβοσωμικό δομικό γονίδιο *18S*. Το πρόγραμμα θερμοκρασιών για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων qRT-PCR περιελάμβανε τρεις κύκλους, όπως φαίνονται αναλυτικά παρακάτω:

1. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη της διπλής έλικας στους 95 °C για 3 min.
2. Ακολούθησε η αποδιάταξη της έλικας στους 95 °C για 30 s, ο υβριδισμός των εκκινητών για 45 s σε θερμοκρασία η οποία ποικίλλει ανάλογα με τον εκκινητή, και η δράση της DNA πολυμεράσης για επιμήκυνση της αλυσίδας στους 72 °C για 45 s. Ο δεύτερος κύκλος επαναλήφθηκε 40 φορές. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία και η

θερμοκρασία υβριδισμού του καθενός από τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 3.

3. Ο τελευταίος κύκλος αφορούσε στην ανάλυση καμπύλης τήξης (Melting Curve analysis) κατά την οποία γίνεται ο διαχωρισμός του κύριου προϊόντος από πιθανά διμερή εκκινητών ή παραπροϊόντα της αντίδρασης, με σκοπό την ανίχνευση μη επιθυμητών παραπροϊόντων λόγω επιμολύνσεων ή μη συγκεκριμένης δραστηριότητας των εκκινητών. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας κατά 0,5 °C από τους 65 °C στους 95 °C ανά 30 s, σε συνολικά 61 κύκλους.

2.21. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των φυσιολογικών και βιοχημικών δοκιμών πραγματοποιήθηκε με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (στατιστικό πακέτο SPSS, IBM Inc., USA). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους \pm τις τιμές του τυπικού σφάλματος. Σε όλες τις περιπτώσεις ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των μέσων ορών έγινε με δίπλευρο έλεγχο με επίπεδο σημαντικότητας 5%. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος ανάλυσης σχετικής γονιδιακής έκφρασης (REST) σύμφωνα με τον Pfaffl και τους συνεργάτες του (2002).

Πίνακας 3: Στοιχεία των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων ενδιαφέροντος

| Γονίδιο | Εκκινήτης | Νουκλεοτιδική αλληλουχία | Παραπομπή | Tm (°C) |
|------------------|-----------|-----------------------------------|--------------------------|---------|
| <i>18S</i> | For | 5'-ACC GTA GTA ATT CTA GAG CT-3' | Bustamante et al. (2006) | 46 |
| | Rev | 5'-CCA CTA TCC TAC CAT CGA AA-3' | | |
| <i>GaIUR</i> | For | 5'-CTG TAA TCG GCA TGG GAA CT-3' | Cruz-Rus et al. (2011) | 56 |
| | Rev | 5'-TGA TGA GTT GGA GAC GGA GA-3' | | |
| <i>GLDH</i> | For | 5'-CAC ATG GTA CTG GTG CAA GG-3' | Cruz-Rus et al. (2011) | 56 |
| | Rev | 5'-AGG CCA CAG CGA GCT AAA TA-3' | | |
| <i>MIOX</i> | For | 5'-CCC CAA ATT GAG CAC TTG TT-3' | Cruz-Rus et al. (2011) | 56 |
| | Rev | 5'-GGC CTC CAA AGC TAG GAA GT-3' | | |
| <i>MDHAR</i> | For | 5'-TTG GCA ATA GCC TGG TTT TC-3' | Cruz-Rus et al. (2011) | 56 |
| | Rev | 5'-CGT GCT CTT TGG AGA CAA CA-3' | | |
| <i>DHAR</i> | For | 5'-GGT TTA GCC ACC CAG TTT GA-3' | Cruz-Rus et al. (2011) | 56 |
| | Rev | 5'-GGA ATC TTT TGC CAA GAC CA-3' | | |
| <i>GS</i> | For | 5'-GGG ACG AAA AAG GTT CAA CA-3' | DY668932* | 56 |
| | Rev | 5'-GCA TCA GGA TGT AAG CAG CA-3' | | |
| <i>GCS</i> | For | 5'-ACA GGC TCG TCC TAC TGC AT-3' | DY672795* | 56 |
| | Rev | 5'-TCC TAC ACC TGC ATT GTC CA-3' | | |
| <i>GDH</i> | For | 5'-CAA GGT CGA GCT TCG AGA AC-3' | TA10972_57918* | 56 |
| | Rev | 5'-CAA GCA CCT TCT CCG ACA AT-3' | | |
| <i>GR</i> | For | 5'-AGC ATG ACT GGA GCA CAT TG-3' | TA2829_57918* | 56 |
| | Rev | 5'-AGG CAA ATC AAG AGC AGC AT-3' | | |
| <i>CAT</i> | For | 5'-CAC CTG TCA TTG TGC GTT TC-3' | TA2053_57918* | 56 |
| | Rev | 5'-CTT TCT GGA TGG TGG GAA AA-3' | | |
| <i>cAPX</i> | For | 5'-CAC AAG GAA CGG TCT GGA TT-3' | TA478_3747* | 56 |
| | Rev | 5'-CGC AGC GTA TTT CTC AAC AA-3' | | |
| <i>MnSOD</i> | For | 5'-TGT GGC TGG CTT TAG ACA AA-3' | CO381280* | 56 |
| | Rev | 5'-CTT CCA ATT GAT GAC CTT CCA-3' | | |
| <i>NR</i> | For | 5'-AGG GAA ACA CCC CTT CAA CT-3' | TA2111_57918* | 56 |
| | Rev | 5'-TGC TTC ACC ATG TTC TGC TC-3' | | |
| <i>HSP70</i> | For | 5'-CAC CAC TGT CAC TGG GTT TG-3' | TA2408_57918* | 56 |
| | Rev | 5'-TCT CCC CTT GGC GAA CAT TG-3' | | |
| <i>HSP80</i> | For | 5'-CCA GGC TTT GAG GGA TAA CA-3' | CO817794* | 56 |
| | Rev | 5'-GAT CCT GTT GCC AAA GGT GT-3' | | |
| <i>HSP90</i> | For | 5'-TTG GGT GAT CGT GTT GAC AA-3' | TA3063_57918* | 56 |
| | Rev | 5'-GTC TGC ATC AGC CCT CTT TC-3' | | |
| <i>DREB</i> | For | 5'-CGG AGT TGG TTT TCC AAG AA-3' | TA10928_57918* | 56 |
| | Rev | 5'-TCC GGG TAC TCG TTC AAA TC-3' | | |
| <i>SOS2-like</i> | For | 5'-CCG TGC AAG AAG AAG AGG TC-3' | DY669538* | 56 |
| | Rev | 5'-ATT TGA CCT TGG CGA AAT TG-3' | | |
| <i>SOS3-like</i> | For | 5'-TTC CCA ACC CAT TAA ACC AA-3' | DY670450* | 56 |
| | Rev | 5'-GTT TGT GAA GAG AGG GAG AC-3' | | |
| <i>SOS4</i> | For | 5'-TGG AGA ACA GCT TTG GGA AT-3' | DY672501* | 56 |
| | Rev | 5'-GCT CTG GAG GGA CAT ACA GC-3' | | |
| <i>PIP</i> | For | 5'-GCT GTT CTT GGC TCG TAA GG-3' | CX661168* | 56 |
| | Rev | 5'-ACA CAG CAA ACC CAA TAG GC-3' | | |

**Fragaria* EST sequence Accession no.

3. Δημιουργία ενός γρήγορου και οικονομικού πρωτοκόλλου για την απομόνωση υψηλής ποιότητας RNA από μικρές ποσότητες φυτικού ιστού φράουλας και καρπών άλλων καλλιεργούμενων ειδών

3.1. Περίληψη

Η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από φυτικούς ιστούς φράουλας, και ειδικότερα από ιστούς καρπών, είναι μια ιδιαίτερα επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία, καθώς οι ιστοί αυτοί είναι πλούσιοι σε πολυσακχαρίτες και πολυφαινολικές ενώσεις. Η εργασία αυτή περιγράφει την επιτυχή τροποποίηση ενός πρωτοκόλλου εκχύλισης ολικού RNA, η οποία επιτρέπει την απομόνωση ολικού RNA ικανοποιητικής ποσότητας και υψηλής ποιότητας από μικρές ποσότητες ιστών φύλλων, ριζών και καρπών φράουλας. Η ενίσχυση της αλληλουχίας του δομικού γονιδίου αναφοράς *GAPDH* από απομονωμένο RNA, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) υποστηρίζει περαιτέρω την απόδοση του προτεινόμενου πρωτοκόλλου και τη χρήση του για μετέπειτα μοριακές εφαρμογές. Η προτεινόμενη πρωτότυπη νέα διαδικασία έχει επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την απομόνωση ολικού RNA από άλλους ιστούς καρπών, όπως οι ελαιόκαρποι και τα ακτινίδια. Επιπλέον, έχει διαφανεί ότι η προαιρετική επεξεργασία του απομονωθέντος γενομικού υλικού με το ένζυμο RNase A παρέχει τη δυνατότητα απομόνωσης επαρκούς ποσότητας και ικανοποιητικής ποιότητας γενομικού DNA για την επακόλουθη διεξαγωγή αναλύσεων PCR, όπως αποδεικνύεται από την ενίσχυση της αλληλουχίας των γονιδίων αναφοράς με τη χρήση PCR χρησιμοποιώντας ως πρότυπο γενομικό DNA. Το βελτιστοποιημένο αυτό πρωτόκολλο επιτρέπει την εύκολη, γρήγορη και οικονομική απομόνωση RNA υψηλής ποιότητας από μικρές ποσότητες ιστών ενός σημαντικού φυτού, όπως η φράουλα, με δυνατότητα εκτεταμένης εφαρμογής σε δύστροπους ιστούς καρπών άλλων καλλιεργούμενων ειδών.

Λέξεις-κλειδιά: απομόνωση γενομικού DNA, εκχύλιση ολικού RNA, καρπός φράουλας, πολυφαινολικές ενώσεις, πολυσακχαρίτες, πρωτόκολλο, σύνθεση cDNA, *Fragaria x ananassa*

3.2. Εισαγωγή

Η απομόνωση ικανοποιητικής ποσότητας και υψηλής ποιότητας RNA αποτελεί προϋπόθεση για τη διεξαγωγή αναλυτικών μελετών σε θέματα γενετικής, μοριακής βιολογίας και άλλων συναφών φυσιολογικών ερευνών, στα φυτά (Hu et al., 2002). Η ποσοτική ανάλυση qRT-PCR, οι τεχνικές υβριδισμού και οι αναλύσεις μικροσυστοιχιών αποτελούν δυναμικά εργαλεία για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων στα φυτά. Για τη διεξαγωγή των αναλύσεων αυτών απαιτείται υψηλής ποιότητας και λειτουργικότητας RNA (Berendzen et al., 2005). Ωστόσο, η απομόνωση RNA από δύστροπους φυτικούς ιστούς, όπως αυτοί που περιέχουν σημαντικές ποσότητες πολυσακχαριτών, πολυφαινολικών ενώσεων και πρωτεϊνών, αποτελεί μια χρονοβόρα και επίπονη εργασία. Είναι γνωστό ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις εύκολα οξειδώνονται, για να σχηματίσουν κινόνες, οι οποίες με τη σειρά τους μπορεί να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, για να σχηματίσουν σύμπλοκα υψηλού M.B. που παρεμποδίζουν την απομόνωση καλής ποιότητας RNA (Japelaghi et al., 2011). Με τη σειρά τους, οι πολυσακχαρίτες τείνουν να καθιζάνουν μαζί με τα νουκλεϊκά οξέα σχηματίζοντας ιζήματα, ιδιαίτερα σε ρυθμιστικά διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος (Wang and Stegemann, 2010). Επιπλέον, οι συμπλοκοποιημένες αυτές ενώσεις περιορίζουν σοβαρά τη λειτουργικότητα των ενζύμων της RNA αντίστροφης μεταγραφάσης και της DNA πολυμεράσης, καθώς επίσης και τη δραστηριότητα της DNA ενδονουκλεάσης περιορισμού και των φασματοφωτομετρικών δοκιμών ποσοτικοποίησης (Moser et al., 2004). Επίσης, η έκθεση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης είναι δυνατόν να δυσχεραίνει περαιτέρω την απομόνωση υψηλής ποιότητας RNA, δεδομένου ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις και οι πολυσακχαρίτες βιοσυσσωρεύονται στους φυτικούς ιστούς, όταν αυτοί εκτίθενται σε δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Chang et al., 1993). Ως εκ τούτου, έχουν δημοσιευθεί πολυάριθμα πρωτόκολλα, συνοδευόμενα από τροποποιήσεις, για την απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από δύστροπους φυτικούς ιστούς, κατά τα τελευταία χρόνια (Hu et al., 2002, Sharma et al., 2003, Berendzen et al., 2005, Smart and Roden, 2010, Wang and Stegemann, 2010, Samanta et al., 2011, Henderson and Hammond, 2013). Ωστόσο, η πλειονότητα των πρωτοκόλλων αυτών θέτει ορισμένους περιορισμούς, καθώς οι προτεινόμενες μεθοδολογίες είναι χρονοβόρες (Moser et al., 2004), απευθύνονται σε συγκεκριμένους ιστούς (Asif et al., 2000), ή είναι τεχνικά πολύπλοκες (Wang and Stegemann, 2010).

Τα τελευταία χρόνια, η φράουλα έχει προσελκύσει την προσοχή της ερευνητικής κοινότητας, κυρίως λόγω της διατροφικής αξίας των καρπών της και της οικονομικής σημασίας της καλλιέργειάς της (Tulipani et al., 2008). Οι ιστοί της φράουλας είναι πλούσιοι σε πολυφαινολικές ενώσεις και πολυσακχαρίτες (Asami et al., 2003), καθιστώντας δύσκολη την απομόνωση ικανοποιητικής ποσότητας και υψηλής ποιότητας νουκλεϊκών οξέων από αυτούς. Αρκετά πρωτόκολλα έχουν προταθεί για την απομόνωση RNA από ιστούς φράουλας, χρησιμοποιώντας φαινόλη (Mazzara and James, 2000), ζεστό βόρακα (Martínez and Civello, 2008), ή βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο (CTAB) (Palomer et al., 2006) στη διαδικασία απομόνωσης. Η παρούσα μελέτη παρουσιάζει ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο για την απομόνωση υψηλής ποιότητας ολικού RNA από μικρές ποσότητες ιστού φύλλων, ριζών και καρπών φράουλας, κατάλληλο για τη μετέπειτα διεξαγωγή μοριακών τεχνικών. Η διαδικασία αυτή αντιπροσωπεύει μία σημαντική βελτίωση όσον αφορά στο χρόνο και στην ποσότητα του ιστού που απαιτείται σε σύγκριση με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα εκχύλισης, απαιτώντας περίπου 3 h (συμπεριλαμβανομένης της μεταχείρισης με τη νουκλεάση) και 100 mg ιστού για την επιτυχή ολοκλήρωσή της.

3.3. Υλικά και μέθοδοι

Το προτεινόμενο πρωτόκολλο βασίζεται σε μια τροποποιημένη έκδοση της μεθόδου του Mortaji και των συνεργατών του (2008) για την απομόνωση RNA από σπέρματα σιταριού. Για συγκριτικούς σκοπούς δοκιμάστηκαν ένα καθιερωμένο πρωτόκολλο για την εκχύλιση RNA από φύλλα και μίσχους φράουλας χρησιμοποιώντας LiCl και δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) στο ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (Mazzara and James, 2000), καθώς επίσης και ένα εμπορικά διαθέσιμο, έτοιμο προς χρήση αντιδραστήριο (Trizol[®] Reagen, Invitrogen) το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων. Το προτεινόμενο πρωτόκολλο (όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.12) χρησιμοποιήθηκε μετέπειτα για την εξαγωγή RNA από άλλους καρπούς, όπως ελαιόκαρπους και ακτινίδια. Μετά την απομόνωση του RNA από τους φυτικούς ιστούς φράουλας και από καρπούς ελιάς και ακτινιδίου, έγινε ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του RNA (συγκέντρωση και προσδιορισμός καθαρότητας) με τη χρήση της συσκευής Nanodrop ND-1000 (Πίνακας 5), και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης

1,5% (β/ο) (η οποία χρωματίστηκε με χρωστική GelRed) (Εικ. 1). Τα απομονωθέντα δείγματα από το προτεινόμενο πρωτόκολλο μεταχειρίστηκαν με rDNase I και RNase A για την παραλαβή καθαρού RNA και γενομικού DNA (Εικ. 2), αντίστοιχα. Ακολούθως, το απομονωθέν καθαρό RNA από το προτεινόμενο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA) με το Primescript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio Inc., Japan), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μας, έγινε ενίσχυση της αλληλουχίας *FaGAPDH* (Miyawaki et al., 2012) από ιστούς φράουλας, καθώς επίσης και της αλληλουχίας *AdACT* (Yin et al., 2010) και *OeUBQ2* (Hernández et al., 2009) από ιστούς καρπών ακτινιδίου και ελιάς, αντίστοιχα, με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ως πρότυπο τόσο γενομικό DNA, όσο και cDNA. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν το ακόλουθο: 95 °C για 3 min, 40 κύκλοι των 30 s στους 95 °C, 45 s στους 46 °C και 45 s στους 72 °C, ακολουθούμενοι από 10 min στους 72 °C. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στον Πίνακα 4. Τέλος, τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5% (β/ο) (Εικ. 3).

3.4. Αποτελέσματα και συζήτηση

Υπάρχουν αρκετά πρωτόκολλα εκχύλισης ολικού RNA που μπορούν να εφαρμοστούν σε ιστούς φράουλας, ωστόσο με σημαντικούς περιορισμούς. Συγκεκριμένα, πολλά πρωτόκολλα χρησιμοποιούν ακριβά εμπορικά σκευάσματα εκχύλισης που περιέχουν στήλες καθαρισμού των νουκλεϊκών οξέων (Chai et al., 2013, Lin et al., 2013), ενώ άλλα ακολουθούν χρονοβόρες διαδικασίες (έως και 3 ημέρες), ή απαιτούν σημαντικές ποσότητες φυτικού ιστού για την αρχική εκχύλιση (Chen et al., 2011a, Pombo et al., 2011). Επιπλέον, άλλα πρωτόκολλα για χρήση σε ιστούς φράουλας έχουν βελτιστοποιηθεί για συγκεκριμένους ιστούς, όπως φύλλα και μίσχους (Mazzara and James, 2000). Η παρούσα εργασία περιγράφει ένα γρήγορο, αποτελεσματικό και αξιόπιστο πρωτόκολλο που επιτρέπει την εξαγωγή υψηλής ποιότητας ολικού RNA από φυτικούς ιστούς φράουλας, καθώς επίσης και από ιστούς καρπών άλλων καλλιεργούμενων ειδών πλούσιων σε πολυσακχαρίτες και πολυφαινολικές ενώσεις. Σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους που δοκιμάστηκαν, οι ποσότητες RNA που απομονώθηκαν με το πρωτόκολλο αυτό ήταν

υψηλής ποιότητας και ικανοποιητικής ποσότητας, δίνοντας τη δυνατότητα επιτυχούς χρήσης τους σε κατάντη εφαρμογές, όπως RT-PCR και qRT-PCR.

Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές PCR και RT-PCR

| Γονίδιο | Εκκινητής | Αλληλουχία εκκινητή | Βιβλιογραφική αναφορά |
|----------------|-----------|---------------------------------|-------------------------|
| <i>FaGAPDH</i> | For | 5'-TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3' | Miyawaki et al. (2012) |
| | Rev | 5'-AGCAGGCAGAACCTTTCCGACAG-3' | |
| <i>AdACT</i> | For | 5'-TGCATGAGCGATCAAGTTTCAAG-3' | Yin et al. (2010) |
| | Rev | 5'-TGTCCCATGTCTGGTTGATGACT-3' | |
| <i>OeUBQ2</i> | For | 5'-AATGAAGTCTGTCTCTCCTTTGG-3' | Hernandez et al. (2009) |
| | Rev | 5'-AAGGGAAATCCCATCAACG-3' | |

Το προτεινόμενο πρωτόκολλο επιτρέπει τη σημαντική μείωση της αρχικής ποσότητας φυτικού ιστού που απαιτείται για την εκχύλιση, αφού απαιτούνται μόλις 100 mg ομογενοποιημένου ιστού για την επιτυχή ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου, σε αντίθεση με τα 300 mg που απαιτούνται στο πρωτόκολλο του Mortaji και των συνεργατών του (Mortaji et al., 2008) ή τα 1-3 g που απαιτούνται από το πρωτόκολλο των Mazzara και James (2000). Επιπλέον, το πρωτόκολλο αυτό μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε περίπου 3 h, σε σύγκριση με τις περίπου 6 h που απαιτούνται για το πρωτόκολλο του Mortaji και των συνεργατών του (2008), ή την ολονύκτια επώαση που απαιτείται στη διαδικασία που προτείνουν οι Mazzara και James (2000). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ευρέως διαδεδομένη μέθοδος του ζεστού βόρακα που έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε μελέτες που αφορούσαν ιστούς φράουλας μπορεί να διαρκέσει έως και 3 ημέρες (Wan and Wilkins, 1994). Επιπλέον, οι μικρότερες ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται σε όλη τη διαδικασία συμβάλλουν στην περαιτέρω μείωση του κόστους του προτεινόμενου πρωτοκόλλου.

Τα νουκλεϊκά οξέα που απομονώθηκαν από τους ιστούς φράουλας ακολουθώντας το τροποποιημένο προτεινόμενο πρωτόκολλο συγκρίθηκαν, όσον αφορά στην ποσότητα και στην ποιότητά τους, με τα αντίστοιχα απομονωθέντα νουκλεϊκά οξέα από το πρωτόκολλο που προτείνεται από τους Mazzara και James (2000) και το έτοιμο προς χρήση αντιδραστήριο Trizol[®] (Invitrogen). Η συνολική ποσότητα των νουκλεϊκών οξέων, σύμφωνα με τη φασματοφωτομετρική ποσοτικοποίησή τους, ήταν υψηλότερη

χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol[®] (Πίνακας 5). Οι ποσότητες των νουκλεϊκών οξέων που απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο και το πρωτόκολλο των Mazzara και James (2000) ήταν χαμηλότερες, αλλά παρόμοιου εύρους. Ωστόσο, η καθαρότητα των απομονωθέντων νουκλεϊκών οξέων, όπως υποδεικνύεται από τον λόγο απορρόφησης A_{260}/A_{280} , ήταν κάτω από 1,26 και 1,16 για το πρωτόκολλο Trizol[®] και το βασιζόμενο στο LiCl πρωτόκολλο, αντίστοιχα, ενδεικτικό της μόλυνσης των απομονωθέντων νουκλεϊκών οξέων με πρωτεΐνες (Sambrook and Russell, 2001). Επιπλέον, τα ιζήματα των νουκλεϊκών οξέων σε αυτές τις περιπτώσεις ήταν πυκνότερα, με κίτρινο έως καστανό χρώμα και αδιάλυτα στο νερό. Αντίθετα, τα εκχυλίσματα που προέκυψαν ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο είχαν αναλογίες απορρόφησης A_{260}/A_{280} που κυμάνθηκαν μεταξύ 1,97–1,67. Κατά παρόμοιο τρόπο, οι αναλογίες απορρόφησης A_{260}/A_{230} , ενδεικτικές της μόλυνσης των απομονωθέντων νουκλεϊκών οξέων με πολυφαινολικές ενώσεις και πολυσακχαρίτες, ήταν υψηλότερες (κυμαίνονταν μεταξύ 2,13 έως 0,86) μετά από εκχύλιση με το προτεινόμενο πρωτόκολλο, γεγονός που υποδηλώνει χαμηλότερα επίπεδα μόλυνσης σε σύγκριση με τα άλλα πρωτόκολλα που αξιολογήθηκαν. Όπως αναμενόταν, οι ιστοί καρπών εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα καθαρότητας, τα οποία οφείλονταν στις υψηλές συγκεντρώσεις των πολυσακχαριτών και των πολυφαινολικών ενώσεων, καθώς και στις χαμηλές συγκεντρώσεις των μορίων RNA (Davis et al., 2006).

Η ακεραιότητα των απομονωθέντων νουκλεϊκών οξέων, όπως προέκυψαν από τα τρία πρωτόκολλα που δοκιμάστηκαν, οπτικοποιήθηκε στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1,5% β/ο). Τα νουκλεϊκά οξέα που εκχυλίστηκαν με το πρωτόκολλο του αντιδραστήριου Trizol[®] ήταν πλήρως αποδομημένα (Εικ. 1), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι υψηλές αποδόσεις που εμφανίζονταν φασματοφωτομετρικά ήταν πιθανόν το αποτέλεσμα εσφαλμένης μέτρησης των προσμίξεων, όπως οι πολυσακχαρίτες και οι πολυφαινολικές ενώσεις που συχνά απομονώνονται από κοινού με τα νουκλεϊκά οξέα κατά τη διάρκεια της εκχύλισης και μολύνουν το εκχύλισμα (Asif et al., 2000).

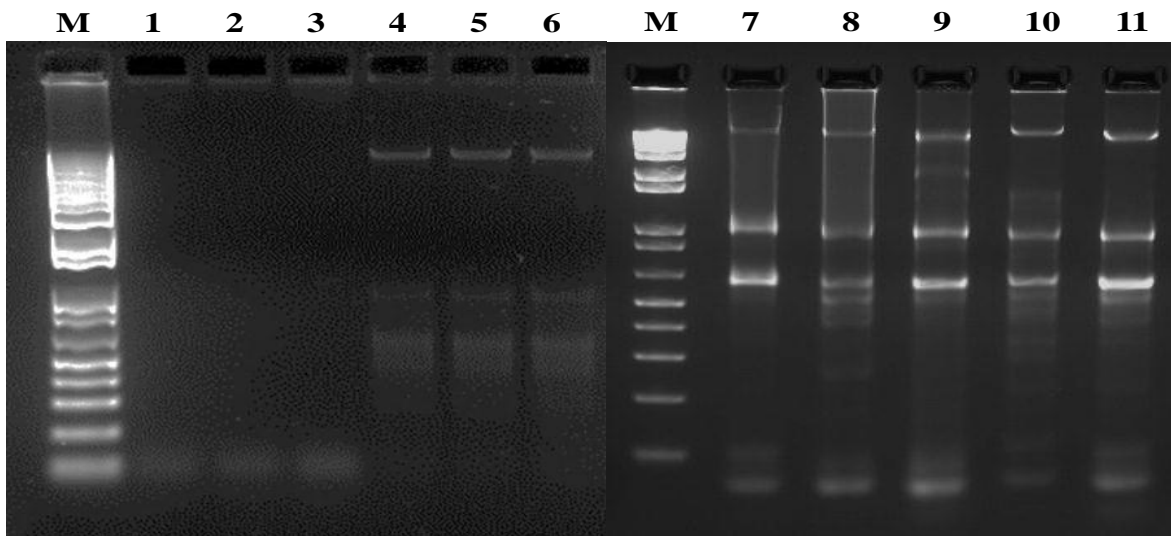
Η ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων που προέρχονταν από ιστούς φράουλας και απομονώθηκαν με το πρωτόκολλο των Mazzara και James (2000), καθώς και αυτών που απομονώθηκαν με το προτεινόμενο πρωτόκολλο, αποκάλυψε την ταυτόχρονη παρουσία ακέραιων ζωνών τόσο ριβοσωμικού RNA, όσο και γενομικού DNA. Ωστόσο, το RNA που εκχυλίστηκε είτε με το πρωτόκολλο του αντιδραστήριου Trizol[®], είτε με το πρωτόκολλο

Πίνακας 5: Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της ποιότητας και της ποσότητας των απομονωθέντων νουκλεϊκών οξέων από φυτικούς ιστούς φράουλας, χρησιμοποιώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο, το πρωτόκολλο των Mazzara και James (2000), και το αντιδραστήριο Trizol[®]. Το προτεινόμενο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια και σε άλλους δύστροπους ιστούς καρπών (ελαιόκαρποι, ακτινίδια).

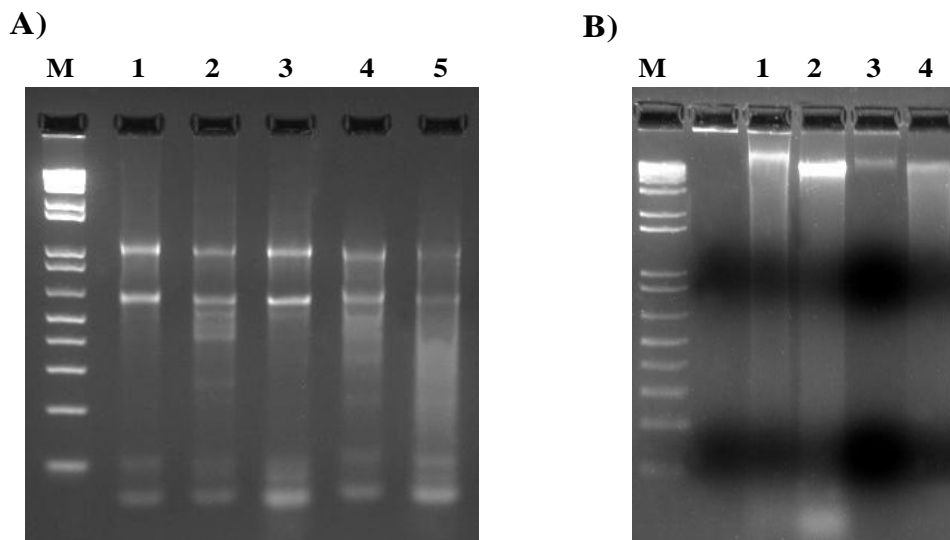
| Χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο | Φυτικός ιστός | Ποσότητα | | |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------------------|--|--|
| | | νουκλεϊκών οξέων (μg/100 mg FW) | Λόγος A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | Λόγος A ₂₆₀ /A ₂₃₀ |
| Αντιδραστήριο Trizol [®] | Φύλλα φράουλας | 25,8 | 1,26 | 0,59 |
| Αντιδραστήριο Trizol [®] | Ρίζα φράουλας | 97,1 | 1,12 | 1,13 |
| Αντιδραστήριο Trizol [®] | Καρποί φράουλας | 37,9 | 1,26 | 0,58 |
| Mazzara and James (2000) | Φύλλα φράουλας | 11,1 | 1,12 | 0,91 |
| Mazzara and James (2000) | Ρίζα φράουλας | 6,1 | 1,16 | 0,59 |
| Mazzara and James (2000) | Καρποί φράουλας | 4,8 | 1,13 | 0,52 |
| Προτεινόμενο πρωτόκολλο | Φύλλα φράουλας | 7,9 | 1,93 | 1,47 |
| Προτεινόμενο πρωτόκολλο | Ρίζα φράουλας | 7,8 | 1,87 | 1,34 |
| Προτεινόμενο πρωτόκολλο | Καρποί φράουλας | 9,7 | 1,69 | 0,86 |
| Προτεινόμενο πρωτόκολλο | Καρποί ακτινιδίου | 14,7 | 1,80 | 1,34 |
| Προτεινόμενο πρωτόκολλο | Ελαιόκαρποι | 9,4 | 2,00 | 2,13 |

των Mazzara και James (2000), δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε κατάντη εφαρμογές, καθώς η ενίσχυση της αλληλουχίας *FaGAPDH* από τα δείγματα αυτά απέτυχε (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται), πιθανώς λόγω των υψηλών ποσοτήτων πολυσακχαριτών (Demeke and Adams, 1992) και/ή των πολυφαινολικών ενώσεων (Moreira, 1998) που δρουν ανασταλτικά, τόσο στη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, όσο και της DNA πολυμεράσης.

Η μεταχείριση με rDNase 1 είχε ως αποτέλεσμα την επιτυχή απομάκρυνση του μολυσματικού γενομικού DNA από όλα τα απομονωθέντα δείγματα που προέκυψαν ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο, όπως αποδεικνύεται από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του καθαρού RNA (Εικ. 2Α). Η πλήρης πέψη του γενομικού DNA μετά από τη μεταχείριση με rDNase 1 επιβεβαιώθηκε με τη διεξαγωγή PCR χρησιμοποιώντας ως πρότυπο το καθαρισμένο δείγμα, αφού η ανάλυση PCR δεν έδωσε προϊόντα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Επιπλέον, η ποσότητα και η ποιότητα του συνολικού RNA ήταν ικανοποιητική, αποδίδοντας 2,21-4,10 μg/100 mg FW, ενώ οι λόγοι A₂₆₀/A₂₈₀ και A₂₆₀/A₂₃₀ κυμαίνονταν από 1,98 έως 1,78 και 2,29 έως 1,40, αντίστοιχα



Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1,5% β/ο) των νουκλεϊκών οξέων που απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol[®], το πρωτόκολλο των Mazzara και James (2000) και το προτεινόμενο πρωτόκολλο. (M): GeneRuler 1 kb DNA ladder, 1-3: καρποί (1), φύλλα (2) και ρίζες (3) φράουλας χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol[®], 4-6: καρποί (4), φύλλα (5) και ρίζες (6) φράουλας χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο των Mazzara και James (2000), 7-9: καρποί (7), φύλλα (8) και ρίζες (9) φράουλας χρησιμοποιώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο, 10-11: καρποί ακτινιδίου (10), ελαιόκαρποι (11) χρησιμοποιώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο.



Εικόνα 2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1,5% β/ο) των δειγμάτων καθαρού ολικού RNA (A) και καθαρού γενομικού DNA (B), όπως προέκυψε μετά από την επώαση των αρχικά απομονωθέντων δειγμάτων ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο, με rDNase I και RNase A, αντίστοιχα. A) (M): GeneRuler 1 kb DNA ladder, (1): καρποί φράουλας, (2): φύλλα φράουλας, (3): ρίζες φράουλας, (4): καρποί ακτινιδίου (5): ελαιόκαρποι. B) (M): GeneRuler 1 kb DNA ladder, (1): φύλλα φράουλας, (2): ρίζες φράουλας, (3): καρποί ακτινιδίου, (4): ελαιόκαρποι.

Πίνακας 6: Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του ολικού RNA και του ολικού γενομικού DNA από φυτικούς ιστούς φράουλας και ιστούς καρπών άλλων δύστροπων φυτικών ειδών, όπως απομονώθηκαν από το προτεινόμενο πρωτόκολλο μετά τη μεταχείριση των δειγμάτων με rDNase I και RNase A, αντίστοιχα.

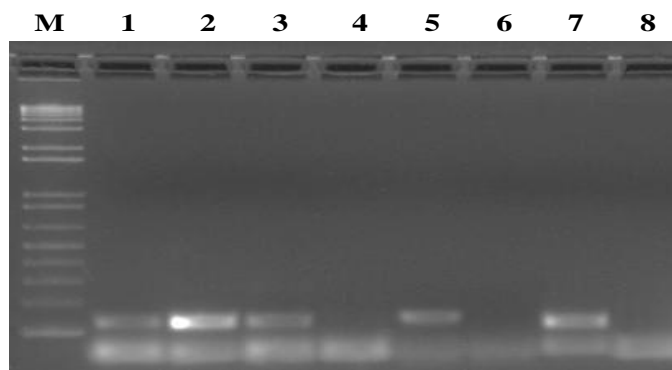
| Φυτικός ιστός | Ποσότητα RNA ($\mu\text{g}/100 \text{ mg FW}$) | Ποσότητα DNA ($\mu\text{g}/100 \text{ mg FW}$) | Λόγος A_{260}/A_{280} | Λόγος A_{260}/A_{230} |
|-------------------|---|---|----------------------------|----------------------------|
| Φύλλα φράουλας | 2,21 | - | 1,98 | 1,81 |
| Ρίζες φράουλας | 3,49 | - | 1,80 | 1,66 |
| Καρποί φράουλας | 2,37 | - | 1,78 | 1,04 |
| Καρποί ακτινιδίου | 3,71 | - | 1,89 | 1,25 |
| Ελαιόκαρποι | 4,01 | - | 1,83 | 2,29 |
| Φύλλα φράουλας | - | 6,93 | 1,53 | 0,75 |
| Ρίζες φράουλας | - | 9,42 | 1,32 | 0,65 |
| Καρποί φράουλας | - | 4,54 | 1,18 | 0,38 |
| Καρπός ακτινιδίου | - | 2,71 | 1,42 | 0,43 |
| Ελαιόκαρποι | - | 3,44 | 1,70 | 1,02 |

(Πίνακας 6). Επιπλέον, η αντίστροφη μεταγραφή του μεταχειρισμένου με rDNase 1-απομονωθέντος με το προτεινόμενο πρωτόκολλο RNA και η επακόλουθη RT-PCR χρησιμοποιώντας ως πρότυπο το δημιουργημένο cDNA, αποκάλυψαν ότι το απομονωμένο RNA ήταν υψηλής ποιότητας, αφού τα *FaGAPDH* γονιδιακά θραύσματα ενισχύονταν επιτυχώς (Εικ. 3Α).

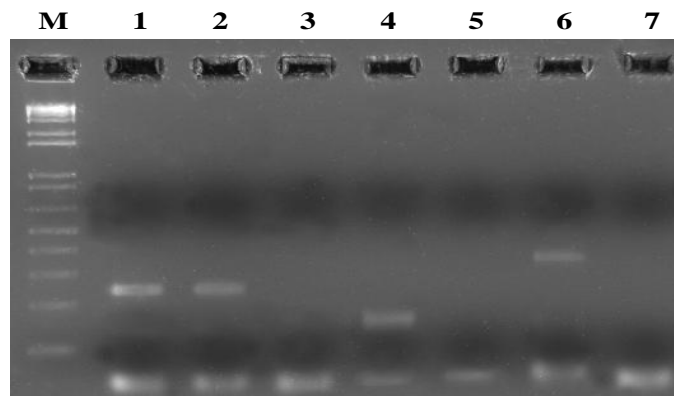
Είναι γνωστό ότι η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από ιστούς καρπών αποτελεί δύσκολη και επίπονη διαδικασία, αφού οι ιστοί αυτοί έχουν υψηλές συγκεντρώσεις μολυσματικών ενώσεων και χαμηλές συγκεντρώσεις μορίων RNA (Davis et al., 2006). Το τροποποιημένο πρωτόκολλο μπορεί επίσης να εφαρμοστεί με επιτυχία για την απομόνωση RNA από άλλους δύστροπους ιστούς καρπών, όπως οι ελαιόκαρποι και τα ακτινίδια, παρέχοντας έτσι ένα χρήσιμο εργαλείο για μοριακές μελέτες που αφορούν καλλιέργειες φρούτων. Το πρωτόκολλο έχει επίσης υιοθετηθεί με επιτυχία χρησιμοποιώντας ως αρχικό υλικό καρπό σταφυλιού (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται), έχοντας επομένως δυνητικά ένα πολύ ευρύ φάσμα εφαρμογής. Η φασματοφωτομετρική ποσοτικοποίηση της συνολικής απόδοσης του απομονωθέντος από καρπούς ακτινιδίου και ελαιοκάρπους RNA, μετά τη μεταχείριση των απομονωθέντων νουκλεϊκών οξέων με rDNase 1, αποκάλυψε την ακόμη υψηλότερη απόδοση σε σύγκριση με τις αποδόσεις από ιστούς φράουλας, αφού οι

ποσότητες καθαρού RNA ήταν 3,71 και 4,01 $\mu\text{g}/100 \text{ mg FW}$ για τους καρπούς ακτινιδίου και τους ελαιοκάρπους, αντίστοιχα (Πίνακας 6). Η ακεραιότητα του απομονωθέντος RNA οπτικοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% (β/α), αποκαλύπτοντας την παρουσία ανέπαφων ζωνών ριβοσωμικού RNA (Εικ. 2Α). Ομοίως, η καθαρότητα του RNA υποδεικνυόταν από τους λόγους οπτικής απορρόφησης A_{260}/A_{280} που ήταν 1,89 και 1,83 για τα ακτινίδια και τις ελιές αντίστοιχα, ενώ οι λόγοι A_{260}/A_{230} ήταν 1,25 και 2,29, αντίστοιχα (Πίνακας 6). Επιπλέον, το RNA που απομονώθηκε ακολουθώντας το

Α) Δοκιμή RT-PCR



Β) Δοκιμή gPCR



Εικόνα 3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1,5% β/α) της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων αναφοράς, όπως ενισχύθηκαν με RT-PCR χρησιμοποιώντας ως πρότυπο cDNA (Α), και PCR χρησιμοποιώντας ως πρότυπο γενομικό DNA (Β), όπως πρόέκυψε από το τροποποιημένο προτεινόμενο πρωτόκολλο. Α) (Μ): GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 1-3: *FaGAPDH* ενισχυμένο από καρπούς (1), φύλλα (2) και ρίζες (3) φράουλας, (4): *FaGAPDH* αρνητικός έλεγχος, (5): *AdACT* ενισχυμένο από καρπούς ακτινιδίου, (6): *AdACT* αρνητικός έλεγχος, (7): *OeUBQ2* ενισχυμένο από ελαιοκάρπους, (8): *OeUBQ2* αρνητικός έλεγχος. Β) (Μ): GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 1-2: *FaGAPDH* ενισχυμένο από φύλλα (1) και ρίζες (2) φράουλας, (3): *FaGAPDH* αρνητικός έλεγχος, (4): *AdACT* ενισχυμένο από καρπούς ακτινιδίου, (5): *AdACT* αρνητικός έλεγχος, (6): *OeUBQ2* ενισχυμένο από ελαιοκάρπους, (7): *OeUBQ2* αρνητικός έλεγχος.

τροποποιημένο πρωτόκολλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για εφαρμογές RT-PCR, όπως αποκαλύφθηκε από την ενίσχυση των γονιδίων αναφοράς (*AdACT* για τα ακτινίδια και *OeUBQ2* για τους ελαιόκαρπους) (Εικ. 3A), ενώ το απομονωθέν υλικό έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στις ευαίσθητες δοκιμές γονιδιακής έκφρασης qRT-PCR, χρησιμοποιώντας υλικό από τις δυο καλλιέργειες φρούτων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Το προτεινόμενο πρωτόκολλο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση γενομικού DNA, μετά από τη μεταχείριση των αρχικά εκχυλιζόμενων νουκλεϊκών οξέων με RNase A. Η ποσότητα του γενομικού DNA που απομονώθηκε από τους διάφορους ιστούς φράουλας και από καρπούς ακτινιδίου και ελαιοκάρπους, μετά τη μεταχείριση των δειγμάτων με RNase A, κυμάνθηκε από 9,42 έως 2,71 $\mu\text{g}/100 \text{ mg FW}$, ενώ οι λόγοι οπτικής απορρόφησης A_{260}/A_{280} και A_{260}/A_{230} κυμάνθηκαν μεταξύ 1,70 έως 1,18 και 1,02 έως 0,38 (Πίνακας 6), αντίστοιχα, καταδεικνύοντας τη μόλυνση του απομονωθέντος γενομικού DNA με πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και πολυφαινολικές ενώσεις. Ωστόσο, η ηλεκτροφόρηση του απομονωθέντος γενομικού DNA σε πηκτή αγαρόζης (1,5% β/ο) αποκάλυψε την παρουσία άθικτων ζωνών υψηλού M.B. (Εικ. 2B), ενώ τα *FaGAPDH* γονιδιακά θραύσματα ενισχύθηκαν επιτυχώς από καθαρό γενομικό DNA, καθιστώντας εμφανές ότι το απομονωθέν γενομικό DNA είναι ικανοποιητικής ποιότητας και λειτουργικότητας για χρήση σε κατάντη εφαρμογές, όπως PCR (Εικ. 3B). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το προτεινόμενο πρωτόκολλο δυνητικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί (μετά από ελαφρές τροποποιήσεις) και για την ταχεία απομόνωση γενομικού DNA, το οποίο είναι επαρκούς ποσότητας και ποιότητας για αναλύσεις PCR.

Εν κατακλείδι, το προτεινόμενο πρωτόκολλο προσφέρει μια αποτελεσματική, οικονομική και ταχεία (μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε περίπου 3 h) διαδικασία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από εργαστήρια μοριακής βιολογίας για την αξιόπιστη απομόνωση RNA από τους ιστούς φυτών φράουλας, κατάλληλο για μια σειρά από κατάντη εφαρμογές. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, αυτή είναι η πρώτη αναφορά σχετικά με την επιτυχή απομόνωση RNA από ιστούς ρίζας φυτών φράουλας. Επιπλέον, το προτεινόμενο τροποποιημένο πρωτόκολλο μπορεί να εφαρμοστεί σε ιστούς άλλων δύστροπων φυτικών ειδών που περιέχουν στους ιστούς τους υψηλά ποσοστά δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ μπορεί επίσης να τροποποιηθεί για την επιτυχή απομόνωση γενομικού DNA για τη διεξαγωγή αναλύσεων PCR, μετά την επώαση των αρχικών εκχυλιζόμενων νουκλεϊκών οξέων με RNase A.

4. Η προ-μεταχείριση ριζών φράουλας με NO και H₂O₂ επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες αλατότητας

4.1. Περίληψη

Το NO και το H₂O₂ διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην αντίδραση των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες καταπόνησης, καθιστώντας τα ως βασικά μόρια σε μελέτες βιολογικής διέγερσης με στόχο την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών. Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας (*Fragaria x ananassa* ποικ. Camarosa) με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα που περιείχε είτε νιτροπρωσσικό νάτριο (SNP, πρόδρομη ένωση του NO, 100 μmol L⁻¹), είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), στα βασικά χαρακτηριστικά της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης και της μεταγωγής σήματος στα φύλλα φυτών που εκτέθηκαν (αμέσως ή 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους) σε συνθήκες αλατότητας (100 mmol L⁻¹ NaCl) για 8 ημέρες. Τα φυτά που καταπονήθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους με SNP ή H₂O₂ παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα μέγιστης φωτοσυνθετικής αποτελεσματικότητας, περιεκτικότητας σε φωτοσυνθετικές χρωστικές, σχετικής περιεκτικότητας των φύλλων σε νερό, καθώς επίσης και χαμηλότερα επίπεδα υπεροξειδωσής των μεμβρανικών λιπιδίων και εκροής ηλεκτρολυτών, σε σύγκριση με τα φυτά υποβλήθηκαν σε συνθήκες αλατότητας χωρίς προ-μεταχείριση (θετικός μάρτυρας) ή προ-μεταχειρισμένα φυτά που καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την επίδραση της προ-μεταχείρισης των φυτών είτε με SNP, είτε με H₂O₂, στη διασυστηματική απόβλωση των επιζήμιων συνεπειών της αλατότητας σε κυτταρικό επίπεδο. Επιπλέον, τα φυτά που εκτέθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους σε συνθήκες αλατότητας κατάφεραν να μετριάσουν την οξειδωτική και νιτροδωτική δευτερογενή καταπόνηση, καθώς επίσης και τις διαταραχές στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, αφού οι συγκεντρώσεις του H₂O₂ και του NO παρέμειναν σε χαμηλότερα επίπεδα, ενώ το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης στα φύλλα διατηρήθηκε σε υψηλότερα επίπεδα, σε σύγκριση με τα φυτά του θετικού μάρτυρα και τα προ-μεταχειρισμένα φυτά που καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης έδειξε ότι η προ-μεταχείριση των φυτών είτε με SNP, είτε με H₂O₂, αύξησε τα επίπεδα μεταγραφής των

αντιοξειδωτικών ενζύμων (cAPX, CAT, GR, MnSOD, MDHAR και DHAR), καθώς επίσης και των βιοσυνθετικών ενζύμων του ασκορβικού οξέος (GalUR, GLDH, GDH, MIOX) και της γλουταθειόνης (GCS, GS) στα φύλλα, σε αντίθεση με τη γενική μεταγραφική καταστολή που παρατηρήθηκε στα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς προ-μεταχείριση, ή σε αυτά που καταπονήθηκαν 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους. Συνοψίζοντας, τα προ-μεταχειρισμένα φυτά ενεργοποίησαν μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού που ρυθμίζονταν μέσω της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, με αποτέλεσμα την επαγωγή της διασυστηματικής ανθεκτικότητας των φυτών κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας.

Λέξεις-κλειδιά: αντιοξειδωτικά ένζυμα, ασκορβικό οξύ, βιολογική διέγερση, γλουταθειόνη, νιτροδωτική καταπόνηση, οξειδοαναγωγικό δυναμικό, οξειδωτική καταπόνηση

4.2. Εισαγωγή

Από την εξέλιξη της λειτουργίας της φωτοσύνθεσης από τα κυανοβακτήρια 2,7 εκατομμύρια χρόνια πριν, οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί είναι αναγκασμένοι να ζουν αντιμετωπίζοντας τις δυσμενείς συνέπειες της πλούσιας σε οξυγόνο ατμόσφαιρας (Halliwell, 2006). Η μερική αναγωγή του μοριακού οξυγόνου κατά τη διάρκεια του κανονικού μεταβολισμού των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) (De Gara et al., 2010). Οι ROS θεωρούνται ιδιαίτερα δραστικά και κυτταροτοξικά είδη, καθώς προκαλούν ζημιά μέσω της οξείδωσης των μεμβρανικών λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA. Οι ρίζες αυτές υπερ-παράγονται κατά τη διάρκεια της έκθεσης των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, φαινόμενο που περιγράφεται με τον όρο «οξειδωτική καταπόνηση» (Mittler, 2002, Apel and Hirt, 2004). Πέραν των ROS, κατά την έκθεση των φυτών σε δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα παράγονται επίσης και ενεργές ρίζες αζώτου (RNS), προκαλώντας αναπόφευκτες δυσλειτουργίες και τοξικότητα (Halliwell et al., 1999, Capone et al., 2004, Corpas et al., 2007α, Corpas et al., 2007β, Valderrama et al., 2007, Hao and Zhang, 2009,). Ως αποτέλεσμα, τα φυτά έχουν αναπτύξει έναν καλά οργανωμένο και περίπλοκο μηχανισμό προστασίας, που αποτελείται από μια πληθώρα τόσο ενζυμικών, όσο και μη ενζυμικών

ενώσεων, με σκοπό τον έλεγχο της παραγωγής και συσσώρευσης των ROS και RNS στο κύτταρο.

Σε αντίθεση με τις παλαιότερες απόψεις περί συνεχούς μάχης των ευεργετικών αντιοξειδωτικών ενώσεων κατά των επιζήμιων οξειδωτικών, συσσωρευμένα ερευνητικά αποτελέσματα κατά την τελευταία δεκαετία έχουν δείξει ότι πέραν του κινδύνου πρόκλησης κυτταρικών βλαβών, η συσσώρευση των ROS θα μπορούσε να αποτελεί απαραίτητο σήμα για τον έλεγχο και τη ρύθμιση ζωτικών λειτουργιών, όπως η ανάπτυξη, η απόκριση των κυττάρων σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Η αντίδραση των φυτών σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα φαίνεται να είναι μια αυστηρώς ρυθμιζόμενη διαδικασία, πάρα μια αναπόφευκτη διαδικασία οξειδωτικής καταπόνησης που τελικά οδηγεί στην κατάρρευση του κυττάρου. Η θεωρία της ρύθμισης της μεταγωγής σήματος και της γονιδιακής έκφρασης μέσω του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού έχει ουσιαστικά συμβάλει στην κατανόηση της μεταγωγής του σήματος και της αντίδρασης των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (Foyer and Noctor, 2005, Gechev et al., 2006, Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007, Ahmad et al., 2008, Wilson et al., 2008, Foyer and Noctor, 2009, Blokhina and Fagerstedt, 2010, Jaspers and Kangasjärvi, 2010, Potters et al., 2010).

Η έννοια του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού περιλαμβάνει την πληθώρα των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις ενεργές οξειδοαναγωγικές ενώσεις και τις επιδράσεις διαφόρων περιβαλλοντικών παραμέτρων σε αυτές. Το άθροισμα των οξειδοαναγωγικών δυναμικών επιμέρους οργανιδίων, όπως το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των μιτοχονδρίων (Norman et al., 2004, Wilson et al., 2006, Giraud et al., 2008), των χλωροπλαστών (Pfannschmidt, 2003, Tseng et al., 2007) και των περοξεισωμάτων (Kamada-Nobusada et al., 2008), αποτελούν στο σύνολό τους το κυτταρικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Περίπλοκοι κλειστοί κύκλοι ανατροφοδότησης μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και τη μεταγωγή σήματος στα παραπάνω οργανίδια (Gadjev et al., 2006). Στα πλαίσια του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, διάφορες ενεργές οξειδοαναγωγικές ενώσεις, όπως το ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη, το NAD(P)H, η τοκοφερόλη και διάφορες πρωτεΐνες της υπερ-οικογένειας των θειορετοξινών, δρουν όχι μόνο για την αναγωγή και την αποτοξίνωση των ROS, αλλά συμβάλλουν ενεργά στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στο φυτικό κύτταρο (Shao et al., 2008, Fotopoulos et al., 2010). Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για την ποσοτικοποίηση του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού

δυναμικού. Διάφορες αντιλήψεις προς αυτή την κατεύθυνση αφορούν στην εκτίμηση της διαφοράς δυναμικού (-mV) στο κύτταρο ή στην εκτίμηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού οργανιδίων, ως ένδειξη του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Ο Potters και οι συνεργάτες του (2010) προτείνουν τη χρήση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης ως ένδειξης του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, αφού οι δυο αυτές μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ενώσεις μετέχουν στον καθορισμό του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, ενώ παράλληλα απαντώνται στο κύτταρο σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις.

Σύμφωνα με τον Mittler και τους συνεργάτες του (2004), ένα ιδιαίτερα δυναμικό και υπερ-άριθμο δίκτυο αποτελούμενο από τουλάχιστον 152 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που καταλύουν ή παράγουν ROS, εμπλέκεται στον έλεγχο της συγκέντρωσης των ROS στο φυτό *Arabidopsis*. Επιπρόσθετα, ο Gadjev και οι συνεργάτες του (2006) αποκάλυψαν ότι 8.056, 5.312 και 3.925 αντίγραφα στο φυτό *Arabidopsis* παρουσίασαν τουλάχιστον 3, 4 ή 5 φορές αλλαγή στην έκφρασή τους, αντίστοιχα, ανταποκρινόμενα σε διάφορα ROS. Αρκετά ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι η ρύθμιση της μεταγωγής σήματος και της γονιδιακής έκφρασης μέσω του οξειδοαναγωγικού δυναμικού γίνεται διαμέσου του ελέγχου της εισροής ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, της ενεργοποίησης ορισμένων ορμονών, καθώς και της ρύθμισης της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών από συγκεκριμένες πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs) και φωσφατάσες της τυροσίνης, που τελικά οδηγούν στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων (Foyer and Noctor, 2005, Gadjev et al., 2008, Foyer and Noctor, 2009).

Η εμπλοκή του H_2O_2 , (Neill et al., 2002α, Tian et al., 2003, Li et al., 2009), όπως και του μονοξειδίου του αζώτου (NO) (Delledonne et al., 2001, Wendehenne et al., 2004, Delledonne, 2005, Zago et al., 2006, Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007, Besson-Bard et al., 2008, Wilson et al., 2008), στη ρύθμιση διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών των φυτών, έχει τεκμηριωθεί κατά την τελευταία δεκαετία. Ερευνητικά αποτελέσματα έχουν πλέον καταδείξει τον ρόλο τόσο του H_2O_2 , όσο και του NO στη μεταγωγή σήματος για την επαγωγή της διασυστηματικής ανθεκτικότητας καλλιεργούμενων φυτικών ειδών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (García-Mata and Lamattina, 2001, Uchida et al., 2002, de Azevedo Neto et al., 2005, Zhang et al., 2006, Fan et al., 2007, Wahid et al., 2007β, Nasibi and Kalantari, 2009, Tanou et al., 2009β, Gao et al., 2010, Ishibashi et al., 2011). Χαρακτηριστική αντίδραση όλων των φυτών που έτυχαν προ-μεταχείρισης είτε με H_2O_2 , είτε με NO πριν

την καταπόνησή τους, ήταν ο μετριασμός της υπεροξειδωσής των μεμβρανικών λιπιδίων και η αύξηση της δραστηριότητας των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Επιπλέον, πρόσφατα ευρήματα, βασισμένα σε προηγμένες τεχνολογίες, όπως είναι η ανάλυση μικροσυστοιχιών, καθώς και ο χρωματογραφικός διαχωρισμός και η ταυτοποίηση πρωτεϊνών και μεταβολιτών, αποκάλυψαν μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των H_2O_2 - και NO - εξαρτώμενων μονοπατιών μεταγωγής σήματος κατά την έκθεση ή μη των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (Bright et al., 2006, Lu et al., 2009, Rodriguez-Serrano et al., 2009, Tanou et al., 2010, Filippou et al., 2011, Tanou et al., 2012α).

Για την πλήρη κατανόηση της συμμετοχής του H_2O_2 και του NO στη μεταγωγή σήματος, καθώς και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω του οξειδοαναγωγικού δυναμικού στα φυτά, είναι απαραίτητη η πλήρης διαλεύκανση των ενεργών μονοπατιών μεταγωγής σήματος κατά την προ-μεταχείριση φυτών είτε με H_2O_2 , είτε με NO , και τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να ρίξει φως στη ROS- και RNS- εξαρτώμενη ρύθμιση και ομοιόσταση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του φυτού, η οποία με τη σειρά της είναι δυνατόν να προσδίδει ανθεκτικότητα κατά την επακόλουθη έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Ως εκ τούτου, ερευνήθηκαν οι συνέπειες της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφάνιση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H_2O_2 , είτε νιτροπρωσσικού νατρίου (SNP), στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, καθώς και σε συγκεκριμένες αντιοξειδωτικές ενώσεις στα φύλλα φυτών φράουλας που καλλιεργήθηκαν υδροπονικά με την παρουσία ή όχι $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$.

4.3. Υλικά και μέθοδοι

Για τους σκοπούς του πειράματος, 72 φυτά φράουλας (ποικ. Camarosa) ηλικίας 6 μηνών, μεταφέρθηκαν και καλλιεργήθηκαν υδροπονικά σε γλάστρες 15 L που περιείχαν απιονισμένο νερό, σε θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16/8 h ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) και θερμοπερίοδο 23/20 °C, για 7 ημέρες. Έπειτα, τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης για επιπλέον 7 ημέρες, μέχρι την έναρξη του πειράματος. Αρχικά οι ρίζες 18 φυτών εμφάνιστηκαν σε απιονισμένο νερό που περιείχε είτε $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ (8 h), είτε $100 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ SNP}$ (πρόδρομη ένωση του NO) (48 h,

αλλαγή διαλύματος κάθε 12 h), και κατόπιν μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης για 7 ημέρες (περίοδος εγκλιματισμού). Πέντε ημέρες μετά το τέλος της εμβάπτισης, οι ρίζες 36 φυτών εμβάπτιστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω χωρίς περίοδο εγκλιματισμού, ούτως ώστε όλα τα φυτά να μεταφερθούν ταυτόχρονα σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης που περιείχε ή όχι 100 mmol L^{-1} NaCl, για 8 ημέρες. Συνολικά το πείραμα περιελάμβανε 8 μεταχειρίσεις, ως εξής: **Μάρτυρας**: προ-μεταχείριση με H_2O → 0 ημέρες περίοδος εγκλιματισμού → θρεπτικό διάλυμα (αρνητικός μάρτυρας), **NaCl**: προ-μεταχείριση με H_2O → 0 ημέρες περίοδος εγκλιματισμού → 100 mmol L^{-1} NaCl (θετικός μάρτυρας), **SNP**: προ-μεταχείριση με $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP → 0 ημέρες περίοδος εγκλιματισμού → θρεπτικό διάλυμα, **H_2O_2** : προ-μεταχείριση με 10 mmol L^{-1} H_2O_2 → 0 ημέρες περίοδος εγκλιματισμού → θρεπτικό διάλυμα, **SNP₍₀₎→NaCl**: προ-μεταχείριση με $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP → 0 ημέρες περίοδος εγκλιματισμού → 100 mmol L^{-1} NaCl, **H_2O_2 ₍₀₎→NaCl**: προ-μεταχείριση με 10 mmol L^{-1} H_2O_2 → 0 ημέρες περίοδος εγκλιματισμού → 100 mmol L^{-1} NaCl, **SNP₍₇₎→NaCl**: προ-μεταχείριση με $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP → 7 ημέρες περίοδος εγκλιματισμού → 100 mmol L^{-1} NaCl, **H_2O_2 ₍₇₎→NaCl**: προ-μεταχείριση με 10 mmol L^{-1} H_2O_2 → 7 ημέρες περίοδος εγκλιματισμού → 100 mmol L^{-1} NaCl. Η απεικόνιση των μεταχειρίσεων του παραπάνω πειράματος φαίνεται στο Διάγραμμα 5.



Διάγραμμα 5: Σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων του πειράματος

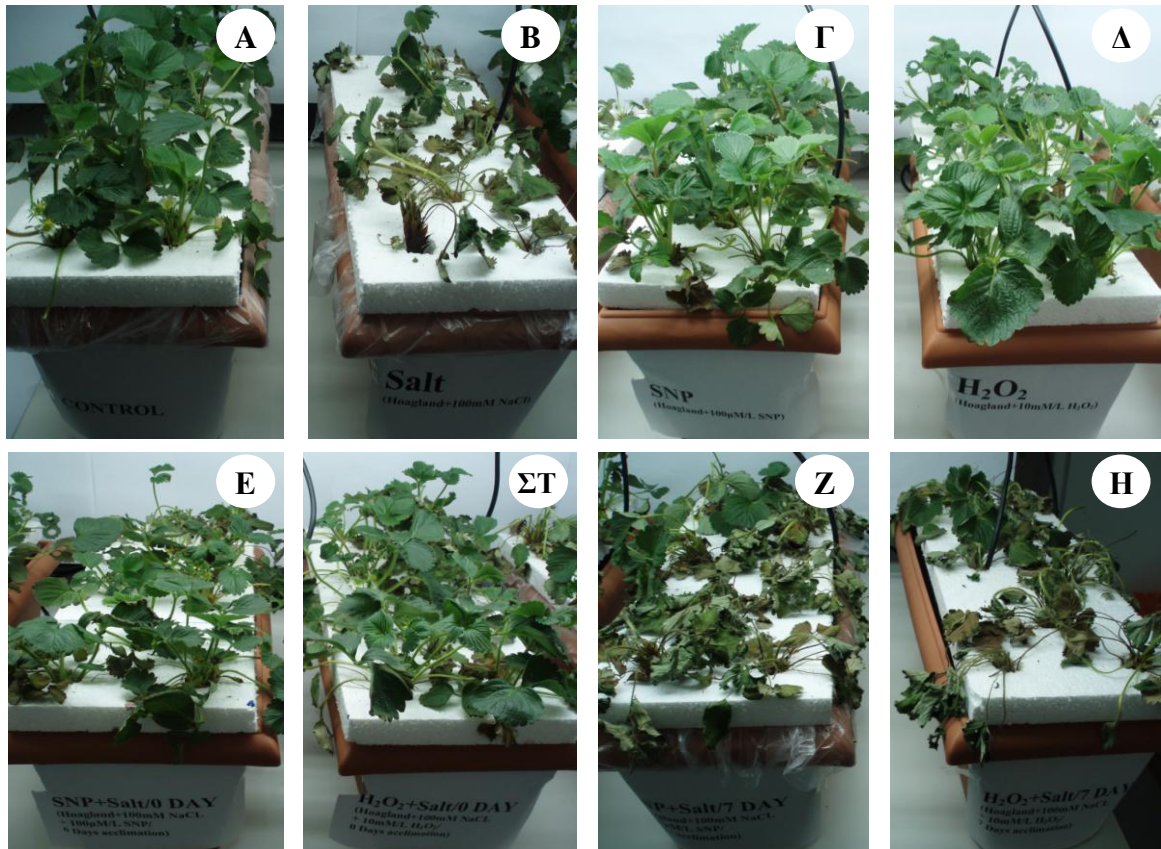
Δείγματα πλήρως εκπτυγμένων φύλλων λήφθηκαν αμέσως μετά την έκθεση ή όχι των φυτών φράουλας σε $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$ (Ημέρα 0), όπως επίσης και 8 ημέρες μετά (Ημέρα 8). Σε αυτά προσδιορίστηκε η σχετική περιεκτικότητά τους σε νερό, η εκροή των ηλεκτρολυτών, η συγκέντρωση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, η μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα (F_v/F_m), η αγωγιμότητα των στομάτων, ο βαθμός υπεροξειδωσης των μεμβρανικών λιπιδίων (συγκέντρωση MDA) και η συγκέντρωση του H_2O_2 και του NO. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση σε ασκορβικό (ASC) και δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA) και σε ανηγμένη (GSH) και οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), καθώς επίσης και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης. Οι παραπάνω μετρήσεις και δοκιμές έγιναν σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

Τέλος, με τη χρήση της τεχνικής της qRT-PCR, έγινε ανάλυση της έκφρασης γονιδίων-στόχων, που άμεσα εμπλέκονται στην παραγωγή και τον έλεγχο της συγκέντρωσης του H_2O_2 και του NO, καθώς επίσης και στην αναγωγή και βιοσύνθεση του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, και κατ' επέκταση του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν την αναγωγή του γαλακτουρονικού οξέος (CaUR), την αφυδρογονάση της L-γαλακτονο-1,4 λακτόνης (GLDH), την οξυγενάση της μυοινοσιτόλης (MIOX), τη μονοαφυδροασκορβική αναγωγή (MDHAR), την αφυδροασκορβική αναγωγή (DHAR), τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GS), τη συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), την αφυδρογονάση της L-γαλακτόζης (GDH), την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), την καταλάση (CAT), την ασκορβική περοξειδάση (APX), τη σουπεροξειδική δισμουτάση του μαγγανίου (MnSOD) και τη νιτρική αναγωγή (NR). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το δομικό γονίδιο *18S* (Bustamante et al., 2006).

4.4. Αποτελέσματα

Φυτά των οποίων το ριζικό σύστημα είχε εμβαπτιστεί σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H_2O_2 , είτε SNP, και αμέσως μετά μεταφέρθηκαν σε διάλυμα αυξημένης ηλεκτρικής αγωγιμότητας (Εικ. 4E, ΣΤ) παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα και ήπια συμπτώματα, σε αντίθεση με τα φυτά των οποίων το ριζικό σύστημα είχε εμβαπτιστεί σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H_2O_2 , είτε SNP, και καταπονήθηκαν

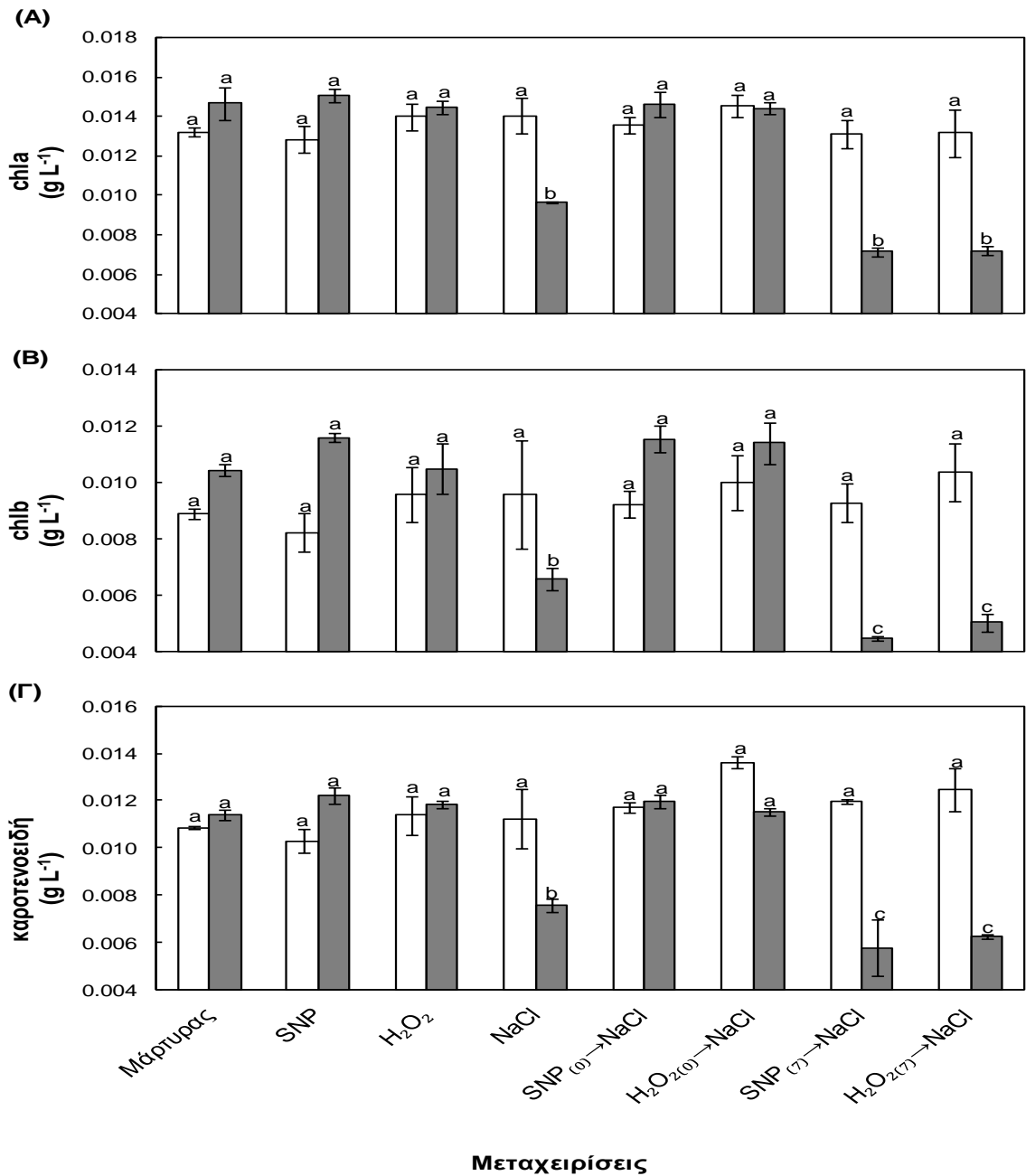
έπε ιτα από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών (Εικ. 4Z, H), ή με αυτά που είχαν καταπονηθεί χωρίς προηγούμενη προ-μεταχείριση (Εικ. 4B). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι τόσο το SNP, όσο και το H₂O₂ δεν παρουσίασαν εμφανή συμπτώματα τοξικότητας στα φυτά φράουλας, στις δόσεις που εφαρμόστηκαν (Εικ. 4Γ, Δ).



Εικόνα 4: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμβάπτιση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), στο υπέργειο μέρος των φυτών μετά από την έκθεσή τους ή όχι σε 100 mmol L⁻¹ NaCl, για 8 ημέρες. [(A) Μάρτυρας (αρνητικός μάρτυρας), (B) NaCl (θετικός μάρτυρας), (Γ) SNP, (Δ) H₂O₂, (E) SNP₍₀₎→NaCl, (ΣΤ) H₂O₂₍₀₎→NaCl, (Z) SNP₍₇₎→NaCl, (H) H₂O₂₍₇₎→NaCl].

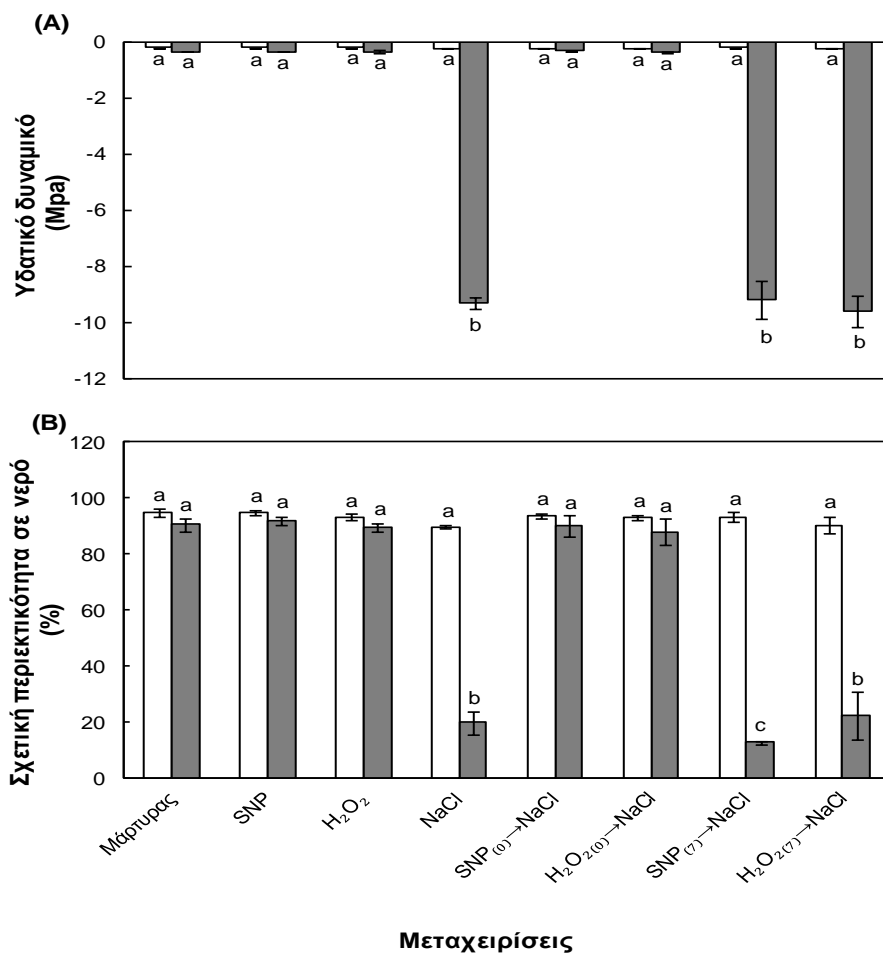
Σε φυσιολογικό επίπεδο παρατηρήθηκε ότι η εφαρμοζόμενη συγκέντρωση NaCl (100 mmol L⁻¹) στο θρεπτικό διάλυμα μείωσε σημαντικά τις συγκεντρώσεις όλων των φωτοσυνθετικών χρωστικών που προσδιορίστηκαν. Αντίθετα, η προ-μεταχείριση των φυτών είτε με H₂O₂, είτε με SNP, και η άμεση έκθεσή τους σε συνθήκες υψηλής αλατότητας έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης α και β και των καροτενοειδών σε επίπεδα όμοια με του αρνητικού μάρτυρα (Μάρτυρας), σε

αντίθεση με τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν και καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών (Διάγραμμα 6).



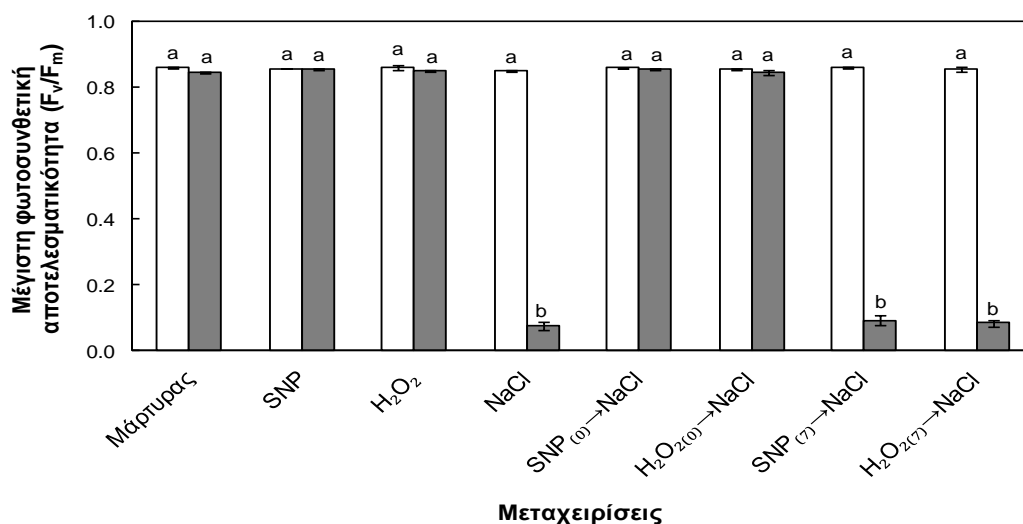
Διάγραμμα 6: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), στη συγκέντρωση (g L⁻¹) της χλωροφύλλης α (A), της χλωροφύλλης β (B) και των καροτενοειδών (C), κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζές στήλες) σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L⁻¹ NaCl. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

Η δευτερογενής ωσμωτική καταπόνηση στα φυτά του θετικού μάρτυρα, ως συνέπεια της έκθεσής τους σε συνθήκες υψηλής αλατότητας για 8 ημέρες, οδήγησε στη σημαντική μείωση της σχετικής περιεκτικότητας των φύλλων σε νερό, όπως επίσης και του υδατικού δυναμικού. Ωστόσο, η προ-μεταχείριση των φυτών είτε με H₂O₂, είτε με SNP, και η μετέπειτα άμεση έκθεσή τους σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, οδήγησε στη διατήρηση των επιπέδων της LRWC και του υδατικού δυναμικού των φύλλων, σε επίπεδα όμοια με αυτά του αρνητικού μάρτυρα. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η LRWC και το υδατικό δυναμικό των φύλλων στα φυτά που έτυχαν προ-μεταχείρισης με τα δυο μόρια σήματος και καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών, διατηρήθηκαν σε χαμηλά επίπεδα, όμοια με αυτά του θετικού μάρτυρα (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), στο υδατικό δυναμικό (A) και τη σχετική περιεκτικότητα σε νερό (B) των φύλλων, κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζές στήλες) σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L⁻¹ NaCl. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=9). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (*P* < 0,05).

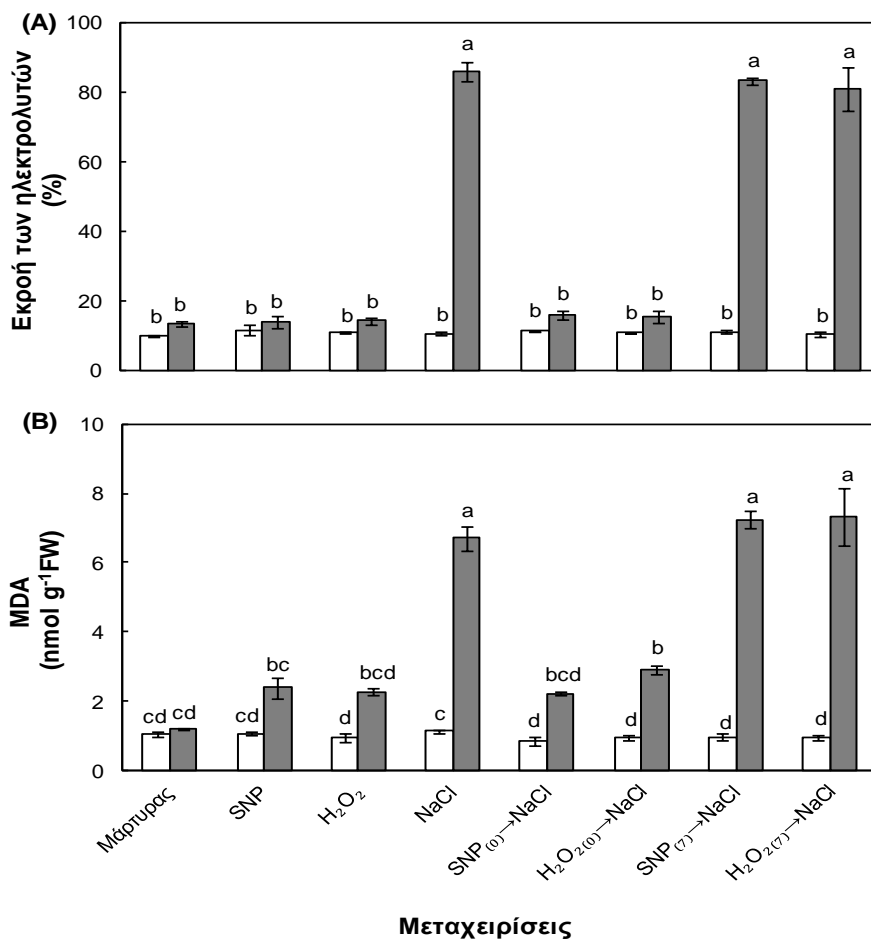
Τα αποτελέσματα όσον αφορά στη μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα είχαν την ίδια τάση με αυτά της σχετικής περιεκτικότητας των φύλλων σε νερό. Η μεταφορά των φυτών φράουλας σε συνθήκες αλατότητας αμέσως μετά την εμφύτευσή του ριζικού τους συστήματος σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H_2O_2 , είτε SNP, είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης του PSII σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του αρνητικού μάρτυρα. Αντίθετα, τα φυτά του θετικού μάρτυρα, όπως επίσης και τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, και καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών, παρουσίασαν χαμηλότερα ποσοστά αφομοίωσης του CO_2 στο PSII (Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 8: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύτευση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H_2O_2 (10 mmol L^{-1}), είτε SNP ($100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), στη μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα των φύλλων, κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L^{-1} NaCl. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=9$). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

Επιπλέον, η προστατευτική δράση της προ-μεταχείρισης είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, στις συνήθεις ζιμιές στις κυτταρικές μεμβράνες λόγω της υψηλής αλατότητας, αποδεικνύεται από τα χαμηλότερα επίπεδα εκροής ηλεκτρολυτών (Διάγραμμα 9A) και από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις MDA (Διάγραμμα 9B) στα φύλλα των φυτών που καταπονήθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους, σε σύγκριση με αυτά που προ-μεταχειρίστηκαν και καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών ή τα φυτά του θετικού μάρτυρα. Όσον αφορά στα επίπεδα εκροής των ηλεκτρολυτών, αυτά διατηρήθηκαν σε επίπεδα όμοια με αυτά του αρνητικού μάρτυρα στα φυτά που

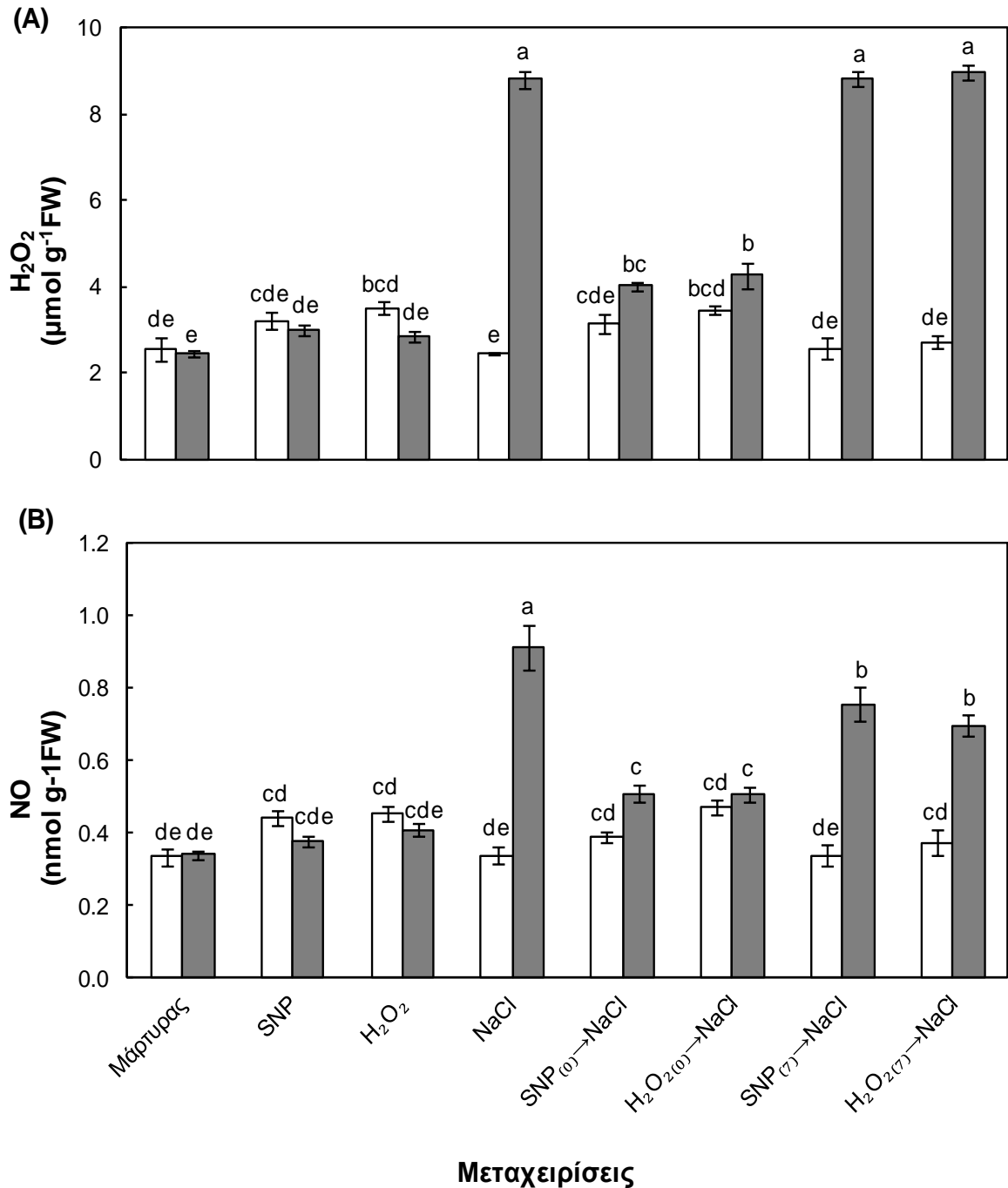
καταπονήθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα στα φυτά που καταπονήθηκαν 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους, όπως και στα φυτά του θετικού μάρτυρα, παρουσίασαν αύξηση κατά περίπου 6 φορές. Επιπρόσθετα, η αυξημένη αλατότητα οδήγησε στην αύξηση της περιεκτικότητας των φύλλων σε MDA (x5,6 φορές αύξηση κατά την 8^η ημέρα), ενώ η προ-μεταχείριση είτε με H₂O₂, είτε με SNP, πριν την καταπόνηση των φυτών, κατάφερε να συγκρατήσει την αυξητική τάση της περιεκτικότητας MDA στα φύλλα (x2,4 και x1,9 φορές αύξηση την 8^η ημέρα, αντίστοιχα). Αντίθετα, τα επίπεδα MDA στα φύλλα των φυτών που καταπονήθηκαν 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους είτε με H₂O₂, είτε με SNP, διατηρήθηκαν σε επίπεδα όμοια με του θετικού μάρτυρα (Διάγραμμα 9B).



Διάγραμμα 9: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), στο ποσοστό εκροής των ηλεκτρολυτών (A) και στη συγκέντρωση MDA (B) στα φύλλα, κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L⁻¹ NaCl. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (*P* < 0,05).

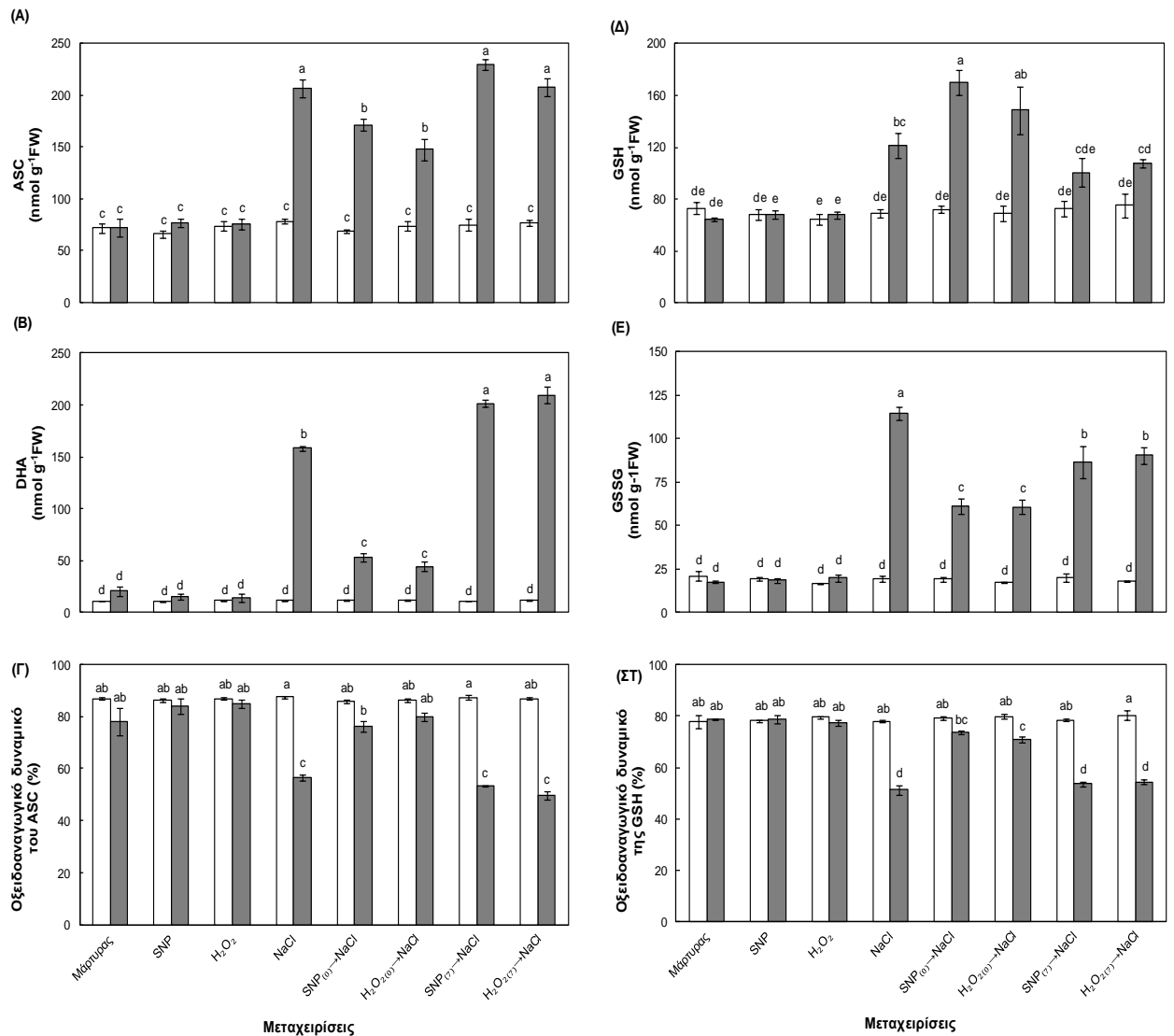
Όπως αναμενόταν, παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση στη συγκέντρωση τόσο του H_2O_2 , όσο και του NO στα φύλλα των φυτών που υπέστησαν τις δυσάρεστες συνέπειες της αλατότητας. Η παρατηρούμενη αύξηση επιβεβαιώνει τη θεωρία της δευτερογενούς οξειδωτικής και νιτροδωτικής καταπόνησης κατά την έκθεση των φυτών σε διάφορα δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, φυτά που εκτέθηκαν στην αλατότητα χωρίς προ-μεταχείριση (NaCl, θετικός μάρτυρας), ή φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, και καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών, παρουσίασαν σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση του H_2O_2 στα φύλλα (3,7-, 3,6- και 3,6-φορές αύξηση, αντίστοιχα). Αντιθέτως, η άμεση έκθεση των φυτών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας μετά την προ-μεταχείρισή τους είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της συγκέντρωσης H_2O_2 στα φύλλα σε χαμηλότερα επίπεδα (1,7- και 1,6-φορές αύξηση, αντίστοιχα, Διάγραμμα 10A). Επιπλέον, η έκθεση των φυτών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας είχε ως συνέπεια τη σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του NO στα φύλλα (αύξηση κατά 2,7 φορές μετά από 8 ημέρες έκθεσης των φυτών σε διάλυμα 100 mmol L^{-1} NaCl). Ωστόσο, τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, και αμέσως μετά εκτέθηκαν σε διάλυμα 100 mmol L^{-1} NaCl, διατήρησαν τη συγκέντρωση NO στα φύλλα σε χαμηλότερα επίπεδα (~1,5 φορές αύξηση), σε σύγκριση με τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, και εκτέθηκαν σε διάλυμα 100 mmol L^{-1} NaCl μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών (2,1- και 2,2-φορές αύξηση, αντίστοιχα, Διάγραμμα 10B). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι η προ-μεταχείριση των φυτών είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, είχε ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη πρόωμη αύξηση της συγκέντρωσης και των δυο ενεργών μορίων (H_2O_2 , NO) στα φύλλα των φυτών φράουλας (~35% αύξηση), η οποία ελαχιστοποιούταν με την πάροδο 7 ημερών από τη λήξη της εμβάπτισης των ριζών στα διαλύματα χαμηλής συγκέντρωσης και των δυο ενεργών ενώσεων.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη αποτελούν τις κυριότερες μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ενώσεις στα φυτικά κύτταρα και ότι παίζουν κεντρικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος και την ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, ελέγξαμε εάν η φαινοτυπική ανθεκτικότητα στην αλατότητα των φυτών που έτυχαν προ-μεταχείρισης θα μπορούσε να οφείλεται στις διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων των δυο αυτών ενώσεων, καθώς και στο οξειδοαναγωγικό τους δυναμικό. Με ενδιαφέρον διαπιστώσαμε ότι η προ-μεταχείριση των φυτών φράουλας είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, πριν την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας, είχε ως συνέπεια τον



Διάγραμμα 10: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), στη φυλλική συγκέντρωση H₂O₂ (A) και NO (B) κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L⁻¹ NaCl. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (*P* < 0,05).

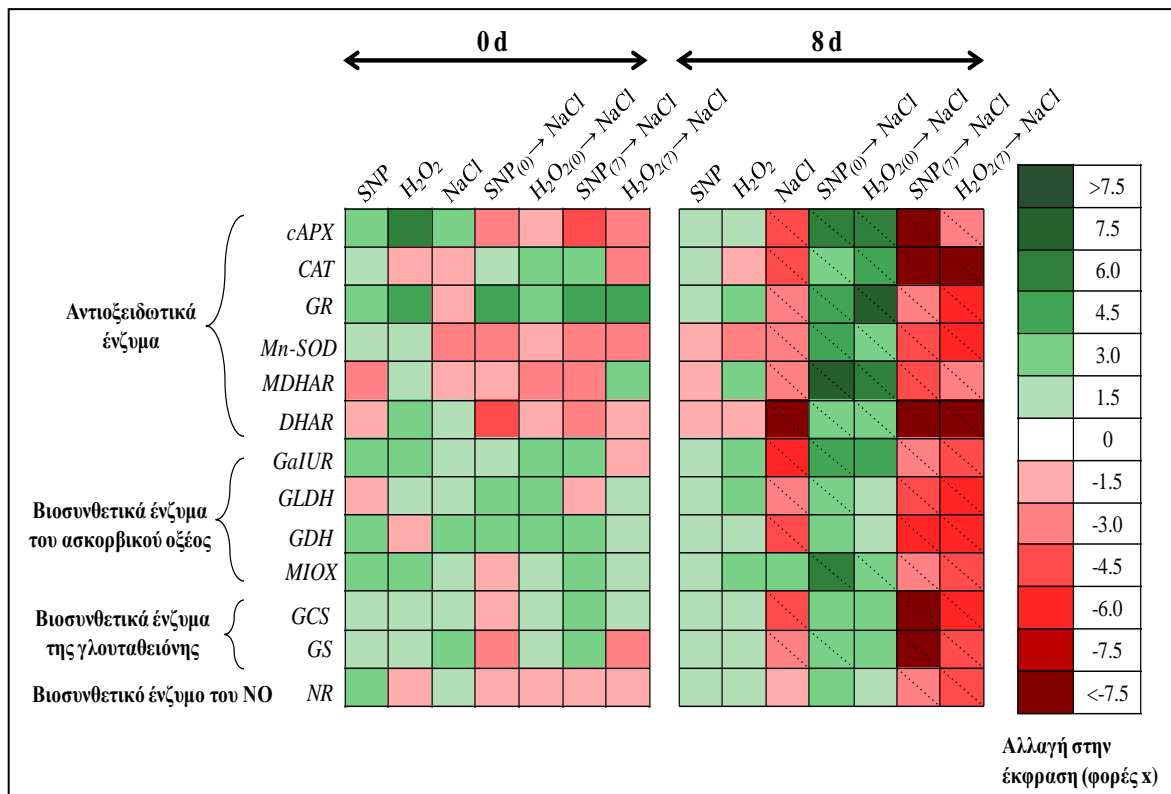
περιορισμό των διαταραχών στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό τόσο του ασκορβικού οξέος, όσο και της γλουταθειόνης. Η διατήρηση του αξειδοαναγωγικού δυναμικού των δυο αυτών μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ενώσεων σε επίπεδα όμοια με του αρνητικού μάρτυρα οφειλόταν κυρίως στην αυξημένη παράγωγή ASC και GSH, και στην ταχεία αναγωγή των δυο ενώσεων, με συνέπεια τον περιορισμό των οξειδωμένων τους μορφών (DHA και GSSG, αντίστοιχα). Συγκεκριμένα, τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με H₂O₂, είτε με SNP, και καταπονήθηκαν αμέσως μετά με την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας για 8 ημέρες, παρουσίασαν σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης ASC (2,1- και 2,4-φορές αύξηση, αντίστοιχα) και GSH (2,9- και 3,2-φορές αύξηση, αντίστοιχα) στα φύλλα. Επιπλέον, στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με H₂O₂, είτε με SNP, και καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών, παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση στη συγκέντρωση του ASC (2,9- και 3,2-φορές αύξηση, αντίστοιχα), ενώ η συγκέντρωση του GSH παρουσίασε μείωση (1,7- και 1,6-φορές αύξηση, αντίστοιχα), σε σύγκριση με τα φυτά που είχαν καταπονηθεί αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους. Οι ανηγμένες μορφές τόσο του ασκορβικού οξέος (ASC), όσο και της γλουταθειόνης (GSH) παρουσιάζονταν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και στα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς προ-μεταχείριση, σε σύγκριση με τα φυτά του αρνητικού μάρτυρα (2,9- και 1,9-φορές αύξηση, αντίστοιχα, Διάγραμμα 11A, Δ). Επιπλέον, η ιοντική καταπόνηση με την έκθεση των φυτών σε διάλυμα 100 mmol L⁻¹ NaCl για 8 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα τη βιοσυσσώρευση του DHA και του GSSG (7,8- και 6,6-φορές αύξηση, αντίστοιχα). Η καταπόνηση των φυτών αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους είτε με H₂O₂, είτε με SNP, είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της συγκέντρωσης DHA (2,2- και 2,6-φορές αύξηση, αντίστοιχα) και GSSG (3,4- και 3,5-φορές αύξηση, αντίστοιχα) σε χαμηλότερα επίπεδα, σε αντίθεση με τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με H₂O₂, είτε με SNP και καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών (~10 φορές αύξηση στη συγκέντρωση DHA και ~5 φορές αύξηση στη συγκέντρωση GSSG, αντίστοιχα, Διάγραμμα 11B, E). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός πως τα προ-μεταχειρισμένα φυτά που καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών, όπως και τα φυτά του θετικού μάρτυρα, δεν κατάφεραν να διατηρήσουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης σε υψηλά επίπεδα και σε μια πιο ανηγμένη κατάσταση, σε αντίθεση με τα προ-μεταχειρισμένα φυτά που καταπονήθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους (Διάγραμμα 11Γ, ΣΤ).



Διάγραμμα 11: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φρούλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), στη φυλλική συγκέντρωση και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 8 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 8, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L⁻¹ NaCl. [ASC (A), DHA (B), οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος % (Γ), GSH (Δ), GSSG (E) και οξειδοαναγωγικό δυναμικό της γλουταθειόνης % (ΣΤ)]. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (*P* < 0,05).

Το Διάγραμμα 12 παρουσιάζει τους δείκτες σχετικής γονιδιακής έκφρασης ενζύμων που εμπλέκονται είτε στην αποτοξίνωση των ROS, είτε στη βιοσύνθεση του NO, είτε στη

ρύθμιση του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, όπως προέκυψαν από την ανάλυση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Όπως αποδεικνύεται από τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, η αλατότητα είχε δυσμενή επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του mRNA της πλειοψηφίας των γονιδίων που εξετάστηκαν, ενώ η προ-μεταχείριση των φυτών είτε με H₂O₂, είτε με SNP, είχε ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της συνολικής μεταγραφικής επιβράδυνσης, ανάλογα με τον χρόνο της έκθεσης των φυτών σε συνθήκες αλατότητας μετά την προ-μεταχείρισή τους (αμέσως ή 7 ημέρες μετά), υποδηλώνοντας ότι και τα δυο ενεργά μόρια διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη συντονισμένη ρύθμιση του μηχανισμού προσαρμογής και εγκλιματισμού και την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες ιοντικής καταπόνησης. Οι κυριότερες τάσεις που παρατηρήθηκαν ήταν τα γενικά χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ρύθμισης (έως 2 φορές επαγωγή ή καταστολή) των περισσότερων γονιδίων σε όλες τις μεταχειρίσεις κατά την έναρξη του πειράματος (όταν ξεκίνησε η καταπόνηση των φυτών), σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου, αφού όλες οι τιμές μεταγραφικής ρύθμισης δεν έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές που καταγράφονταν στον αρνητικό μάρτυρα (Διάγραμμα 12). Ωστόσο, η εξέταση της γονιδιακής έκφρασης 8 ημέρες μετά από την έκθεση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης αποκάλυψε τη σημαντική μεταγραφική καταστολή όλων των γονιδίων-στόχων (με μοναδική εξαίρεση τη γονιδιακή έκφραση της NR και της MIOX). Επιπλέον, η καταπόνηση των φυτών 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους είτε με H₂O₂, είτε με SNP, επιδείνωσε τη μεταγραφική καταστολή όλων των εξεταζόμενων γονιδίων, σε σύγκριση με τα φυτά του θετικού μάρτυρα, με εξαίρεση τη γονιδιακή έκφραση της GaIUR, η οποία παρέμεινε στα ίδια χαμηλά επίπεδα έκφρασης με αυτά του θετικού μάρτυρα. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA όλων των γονιδίων που εξετάστηκαν στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με H₂O₂, είτε με SNP και καταπονήθηκαν αμέσως μετά, παρουσίασαν επαγωγή (είτε σημαντική, είτε όχι), σε σύγκριση με τη γονιδιακή έκφραση στα αντίστοιχα δείγματα του αρνητικού μάρτυρα. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι σχεδόν το σύνολο των γονιδίων στα δείγματα των φυτών που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με H₂O₂, είτε με SNP και μετέπειτα δεν καταπονήθηκαν (H₂O₂, SNP), παρουσίασαν αύξηση στα επίπεδα έκφρασής τους, υποστηρίζοντας την προστατευτική, μη τοξική δράση της εφαρμοζόμενης συγκέντρωσης H₂O₂ και SNP (Διάγραμμα 12).



Διάγραμμα 12: Θερμικός χάρτης που καταδεικνύει το χρονικό πρότυπο έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με ορισμένες ενζυμικές αντιοξειδωτικές ενώσεις, τη βιοσύνθεση RNS και την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, στα φύλλα των φυτών φράουλας που προ-μεταχειρίστηκαν με την εμβάπτιση των ριζών τους σε διάλυμα που περιείχε είτε H₂O₂ (10 mmol L⁻¹), είτε SNP (100 μmol L⁻¹), και καταπονήθηκαν ή όχι με την έκθεσή τους σε διάλυμα που περιείχε 100 mmol L⁻¹ NaCl, για 8 ημέρες. Η δειγματοληψία των ιστών έγινε αμέσως ή 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείριση είτε με H₂O₂, είτε με SNP, και 8 ημέρες μετά την έκθεση ή όχι των φυτών σε συνθήκες ιοντικής καταπόνησης. Η σχετική έκφραση/αφθονία του mRNA εκτιμήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (real-time RT-PCR) χρησιμοποιώντας τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης καταδεικνύεται με πράσινο χρώμα, ενώ η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης με κόκκινο χρώμα. Οι διαγώνιες διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

4.5. Συζήτηση

Ο κομβικός βιολογικός ρόλος του H₂O₂ και του NO στα φυτικά κύτταρα, κυρίως μέσω της δράσης τους ως ενδογενών μορίων σήματος, έχει πλέον τεκμηριωθεί και αναγνωριστεί (Neill et al., 2002a, Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007, Molassiotis and Fotopoulos, 2011). Επιπλέον, πειραματικά αποτελέσματα κατά την τελευταία δεκαετία

φανερώνουν ότι οι μηχανισμοί μεταγωγής σήματος στα φυτά δεν λειτουργούν απομονωμένα, αλλά αντιθέτως αλληλοσυνδέονται και αλληλεπηρεάζονται εκτενώς, με έναν καλά εννορηστρομένο τρόπο (Knight and Knight, 2001). Η Zago και οι συνεργάτες της (2006) αναφέρουν ότι από τα 214 επιτυχώς αλληλουχηθέντα μετάγραφα στον καπνό, τα 152 επάγονταν ανεξάρτητα είτε από το H_2O_2 , είτε από το NO. Η παραπάνω αναφορά αποδεικνύει την ισχυρή αλληλοσυσχέτιση ανάμεσα στα H_2O_2 - και NO-επαγόμενα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, ενώ παράλληλα παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη συμμετοχή πολλών H_2O_2 - και NO-επαγόμενων τμηματικών αλληλουχιών κατά την αντίδραση των φυτών, όταν αυτά εκτίθενται σε δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα, πιστοποιώντας την ήδη αναφερόμενη επαγωγή μετάγραφων από το H_2O_2 και το NO σε φυτά *Arabidopsis* (Desikan et al., 2001, Parani et al., 2004, Vanderauwera et al., 2005, Palmieri et al., 2008). Οι πλείστες αναφορές σχετικά με τη ROS- και RNS-επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων αφορούν κυρίως στη διασυστηματική επαγωγή του αντιοξειδωτικού μηχανισμού (Uchida et al., 2002, Tanou et al., 2009β) και στη στοχευμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση βασικών ενεργών Cys αμινοξέων των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων της S-νιτροσυλίωσης (S-nitrosylation) και της S-γλουταθειονυλίωσης (S-glutathionylation) (Tanou et al., 2009α, Molassiotis and Fotopoulos, 2011). Παρόλα ταύτα, οι πληροφορίες σχετικά με την επίδραση του H_2O_2 και του NO στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό και την ενεργοποίηση συγκεκριμένων μηχανισμών προσαρμογής και εγκλιματισμού σε φυτά φράουλας κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας, είναι μάλλον περιορισμένες.

Στην παρούσα μελέτη, τα φυτά φράουλας που προ-μεταχειρίστηκαν με τα δυο δραστικά μόρια και καταπονήθηκαν αμέσως μετά, κατάφεραν να αντεπεξέλθουν επιτυχώς τις δυσμενείς συνέπειες της μακροχρόνιας έκθεσής τους (8 ημέρες) σε διάλυμα αυξημένης αλατότητας ($100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$), όπως αποδεικνύεται τόσο από τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις, όσο και από τις φυσιολογικές και βιοχημικές μετρήσεις. Συγκεκριμένα, τα φυτά που καταπονήθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, κατάφεραν να διατηρήσουν τη σπαργή των φύλλων (Διάγραμμα 7), τη μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα (Διάγραμμα 8), καθώς επίσης και την ακεραιότητα των μεμβρανών τους, όπως προκύπτει από τα χαμηλότερα επίπεδα εκροής των ηλεκτρολυτών και συγκέντρωσης MDA (Διάγραμμα 9), σε αντίθεση με τον θετικό μάρτυρα και τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν και καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών. Ανάλογα αποτελέσματα, τα οποία καταδεικνύουν την

προστατευτική δράση της προ-μεταχείρισης φυτών με H_2O_2 ή NO στον βαθμό υπεροξειδωσής των μεμβρανικών τους λιπιδίων κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, έχουν επίσης δημοσιευτεί (de Azevedo Neto et al., 2005, Fan et al., 2007).

Προκειμένου να μελετηθεί η διασύνδεση μεταξύ της εξωγενούς εφαρμογής H_2O_2 και NO και της παρατηρούμενης ανθεκτικότητας των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας, ποσοτικοποιήσαμε τη φυλλική συγκέντρωση τόσο του H_2O_2 , όσο και του NO . Η πρώιμη διασυστηματική βιοσυσσώρευση και των δυο ενεργών μορίων στα φύλλα αμέσως μετά το τέλος της εμβάπτισης των ριζών των φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε H_2O_2 , είτε NO , αποκλιμακώθηκε 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείριση των ριζών, όπως καταδεικνυόταν από τη μη σημαντική διαφοροποίηση της συγκέντρωσης και των δυο ενεργών μορίων στα φυτά 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα φυτά του αρνητικού μάρτυρα. Η προ-μεταχείριση των φυτών είτε με H_2O_2 , είτε με NO , οδήγησε στην ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης και των δυο δραστικών μορίων στα φύλλα των φυτών. Η πρώιμη παραγωγή και βιοσυσσώρευση των δυο βιολογικά ενεργών μορίων στα φυτά που καταπονήθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους, ίσως να είναι ικανή για την επαρκή μεταγωγή σήματος και την ενεργοποίηση των μηχανισμών προσαρμογής και εγκλιματισμού του φυτού, που τελικά οδήγησε στην ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες αλατότητας. Αντίθετα, η RNS- και ROS-επαγόμενη μεταγωγή σήματος φαίνεται να είναι ανεπαρκής για την προώθηση της ανθεκτικότητας σε συνθήκες αλατότητας στα φυτά που καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εμβάπτιση των ριζών σε διάλυμα $10 \text{ mmol L}^{-1} H_2O_2$ αύξησε την ενδογενή παραγωγή NO στους ιστούς των φύλλων, ενώ η εμβάπτιση των ριζών σε διάλυμα $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ SNP}$ ενίσχυσε την ενδογενή παραγωγή H_2O_2 . Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά της Τανου και των συνεργατών της (2012α), οι οποίοι επίσης αναφέρουν την παραγωγή και βιοσυσσώρευση και των δυο βιοδραστικών μορίων μετά την εμβάπτιση των ριζών φυτών νεραντζιάς σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης είτε SNP , είτε H_2O_2 . Επιπρόσθετα, αποδεικνύεται ότι η παρατεταμένη καταπόνηση των φυτών με την έκθεσή τους σε διάλυμα αυξημένης συγκέντρωσης $NaCl$ (8 ημέρες), οδήγησε στη σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης τόσο του H_2O_2 , όσο και του NO στα φύλλα, επικυρώνοντας τη δευτερογενή οξειδωτική και νιτροδωτική καταπόνηση των φυτών, η οποία οδηγεί σε σοβαρά φαινοτυπικά και

φυσιολογικά συμπτώματα καταπόνησης και τελικά στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD) (Gadjev et al., 2006, Gechev et al., 2006, Zago et al., 2006). Αντίθετα, αμφότερα τα επίπεδα του H_2O_2 και του NO διατηρήθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα στα φυτά που καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε ακραίες συνθήκες αλατότητας αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους, σε σύγκριση με τα φυτά που καταπονήθηκαν 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους και τα φυτά του θετικού μάρτυρα.

Ο συνεχής έλεγχος της παραγωγής και του μεταβολισμού των ROS μέσω ενός πολύπλοκου δικτύου ενζυμικών και μη αντιοξειδωτικών ενώσεων, αποτελεί προϋπόθεση για την επιβίωση των φυτών κατά την έκθεσή τους τόσο σε συνθήκες αβιοτικών, όσο και βιοτικών καταπονήσεων, δεδομένου ότι οι αυξημένες ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις των ROS, ως αποτέλεσμα των συνθηκών καταπόνησης, μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραχή της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης και στη σοβαρή οξείδωση των κυτταρικών δομών (Ashraf, 2009, Jubany-Mari et al., 2010, Filippou et al., 2011). Η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων που εξετάστηκαν (cAPX, CAT, GR, Mn-SOD, MDHAR, DHAR) στα φυτά που καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε διάλυμα 100 mmol L^{-1} NaCl για 8 ημέρες, καθώς και στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με H_2O_2 , είτε με NO και καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών, δικαιολογεί τα αυξημένα επίπεδα MDA και H_2O_2 που ποσοτικοποιήθηκαν στους ιστούς των φύλλων και τα σοβαρά συμπτώματα καταπόνησης που παρατηρήθηκαν σε αυτά τα φυτά. Αντίθετα, τα φυτά που καταπονήθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους είτε με H_2O_2 , είτε με NO, κατάφεραν να μετριάσουν τις επιπτώσεις της οξειδωτικής καταπόνησης, όπως αποδεικνυόταν από τη χαμηλότερη συγκέντρωση MDA και H_2O_2 στα φύλλα τους. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί, εν μέρει ή όχι, στην επαγόμενη συσσώρευση των mRNAs μετάγραφων όλων των αντιοξειδωτικών ενζύμων που εξετάστηκαν (cAPX, CAT, GR, Mn-SOD, MDHAR, DHAR) στα φυτά αυτά. Τα ευρήματα είναι σε συμφωνία με αυτά προηγούμενων ερευνών που τεκμηριώνουν ότι η αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα ή η επαγόμενη έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, ως συνέπεια της προ-μεταχείρισης των φυτών είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, αποτελούν σημαντικά στοιχεία της επαγόμενης ανθεκτικότητας των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας (Uchida et al., 2002, Tanou et al., 2009β, Khan et al., 2012, Lin et al., 2012). Επιπλέον, πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι μεταλλαγμένα φυτά που υπερ-έκφραζαν είτε το γονίδιο της *DHAR*, είτε της *MDHAR*, ήταν ανθεκτικά σε

συνθήκες αλατότητας (Ushimaru et al., 2006, Kavitha et al., 2010, Eltelib et al., 2011, Eltelib et al., 2012, Sultana et al., 2012), επιβεβαιώνοντας τα ευρήματά μας.

Πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα καταδεικνύουν τον κρίσιμο ρόλο του συμπλέγματος NAD(P)H-γλουταθειόνης-ασκορβικού οξέος στη ρύθμιση και την ομοιοστάση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των φυτών, τόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, όσο και σε συνθήκες βιοτικών ή αβιοτικών καταπονήσεων. Τα οξειδοαναγωγικά ζεύγη του ασκορβικού οξέος (ASC/DHA) και της γλουταθειόνης (GSH/GSSG) είναι δυνατόν να δρουν από κοινού για τη ρύθμιση του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού ή ανεξάρτητα για τη διαβίβαση συγκεκριμένων πληροφοριών για τη ρύθμιση διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος (Noctor, 2006). Οι υψηλοί λόγοι στις σχέσεις ASC/DHA και GSH/GSSG έχουν αποδειχθεί απαραίτητοι για τον κανονικό μεταβολισμό των φυτών και την ανθεκτικότητά τους κατά την έκθεσή τους σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Cuypers et al., 2011, Srivastava et al., 2011). Ο Φωτόπουλος και οι συνεργάτες του (2010) έχουν πρόσφατα αξιολογήσει τη δραστηριότητα και τη γονιδιακή έκφραση ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση και την οξειδοαναγωγική ομοιοστάση του ASC και της GSH στα φυτά σε συνθήκες αλατότητας. Στο δικό μας πείραμα, η προ-μεταχείριση των φυτών φράουλας είτε με H₂O₂, είτε με SNP, έχει επιτρέψει στα φυτά να διατηρήσουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης (ASC/DHA και GSH/GSSG) σε υψηλότερα επίπεδα, όταν είχαν καταπονηθεί με την έκθεσή τους σε συνθήκες υψηλής αλατότητας αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους. Κατά συνέπεια, τα φυτά διατήρησαν την αναγωγική ικανότητα, όπως επίσης και τη δυνατότητα μεταγωγής σήματος και των δυο οξειδοαναγωγικών ζευγών, κυρίως μέσω της αυξημένης βιοσύνθεσης τόσο του ASC, όσο και της GSH, και της άμεσης αναγωγής των οξειδωμένων μορφών τους. Αντίθετα, τα φυτά που έτυχαν προ-μεταχείρισης είτε με H₂O₂, είτε με SNP, και μεταφέρθηκαν σε διάλυμα 100 mmol L⁻¹ NaCl μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών, ή τα φυτά του θετικού μάρτυρα, δεν κατάφεραν να διατηρήσουν υψηλούς λόγους στις σχέσεις ASC/DHA και GSH/GSSG, αφού οι οξειδωμένες μορφές του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης ποσοτικοποιούνταν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Το γεγονός ότι τα ένζυμα που ανάγουν το μονοαφυδροασκορβικό (MDHA) και δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA) σε ASC (MDHAR και DHAR, αντίστοιχα), όπως και η GR, η οποία ανάγει τη GSSG σε GSH, παρουσίασαν επαγωγή στη γονιδιακή τους έκφραση στα φυτά που καταπονήθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους, σε αντίθεση με τα προ-μεταχειρισμένα φυτά που

καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών και τα φυτά του θετικού μάρτυρα, τα οποία παρουσίασαν σημαντική καταστολή στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων, ενισχύει τα παραπάνω ευρήματά μας. Η αναγέννηση της γλουταθειόνης από το ένζυμο GR, χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων το $\text{NADPH}+\text{H}^+$, αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για τη διατήρηση του κύκλου της γλουταθειόνης και του ασκορβικού οξέος σε ενεργή λειτουργική κατάσταση. Η αυξημένη δραστηριότητα της GR, ως συνέπεια της προ-μεταχείρισης φυτών ρυζιού και νεραντζιάς, τόσο με SNP, όσο και με H_2O_2 , κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αλατότητας, έχει πρόσφατα αναφερθεί (Uchida et al., 2002, Tanou et al., 2009β). Στην παρούσα ερευνητική εργασία, η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης της GR πιθανόν να αντιπροσωπεύει ένα βασικό συστατικό του επαγόμενου μηχανισμού ανθεκτικότητας στα φυτά φράουλας που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με SNP, είτε με H_2O_2 , και καταπονήθηκαν αμέσως μετά με την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνονται και από τα αποτελέσματα των δοκιμών της qRT-PCR, όπου καταγραφόταν μια προφανής συντήρηση ή και επαγωγή στη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, στα φυτά που εκτέθηκαν σε συνθήκες αλατότητας αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους. Για παράδειγμα, αποδεικνύεται ότι τα ένζυμα *GaIUR*, *MYOX* και *GLDH*, που άμεσα εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του ασκορβικού οξέος, παρουσίασαν επαγωγή στη γονιδιακή τους έκφραση, ενώ η γονιδιακή έκφραση του ενζύμου *GDH*, που επίσης εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του ασκορβικού οξέος, διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα με αυτά του αρνητικού μάρτυρα, στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με SNP, είτε με H_2O_2 , και μεταφέρθηκαν σε διάλυμα $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$ αμέσως μετά. Αντίθετα, παρατηρήθηκε καταστολή στην έκφραση των γονιδίων αυτών στα φυτά του θετικού μάρτυρα, όπως επίσης και στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, και καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών. Σχετικά, ο Hemavanthi και οι συνεργάτες του (2009) έδειξαν ότι η υπερ-έκφραση του γονιδίου *GaIUR* από φυτά φράουλας στην πατάτα οδήγησε στη συσσώρευση του ασκορβικού οξέος και κατά συνέπεια στην ανθεκτικότητα των φυτών πατάτας κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, όπως η αυξημένη συγκέντρωση μεθυλικού βιολογόνου (ζιζανιοκτόνο Paraquat), NaCl ή μαννιτόλης. Ο Kumar και οι συνεργάτες του (2000), όπως επίσης και ο Wang και οι συνεργάτες του (2007), τονίζουν τη σημασία της υψηλής δραστηριότητας του ενζύμου *GLDH* στην ανθεκτικότητα σποροφύτων ρυζιού και σιταριού

κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας, αντίστοιχα. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εμβάπτιση των ριζών σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης H_2O_2 (10 mmol L^{-1}), ή SNP (100 mmol L^{-1}) και η έκθεση των φυτών αμέσως μετά σε συνθήκες αλατότητας, είχε ως συνέπεια τη διατήρηση της γονιδιακής έκφρασης των βιοσυνθετικών της γλουταθειόνης ενζύμων που εξετάστηκαν (GCS and GS). Αντίθετα, η γονιδιακή έκφραση της GCS και της GS παρουσίασε σημαντική καταστολή στα φυτά του θετικού μάρτυρα, όπως επίσης και στα φυτά που καταπονήθηκαν 7 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφει και η ερευνητική ομάδα της Mittova (2003), η οποία αποκάλυψε ότι η αυξημένη ανθεκτικότητα φυτών τομάτας σε συνθήκες αλατότητας συνδέεται άμεσα με την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης της GCS, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε υψηλότερο λόγο στη σχέση GSH/GSSG.

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης καταδεικνύει ότι η προ-μεταχείριση των φυτών είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, προσφέρει έναν τρόπο μετριασμού της παρατηρούμενης καταστολής στη μεταγραφή όλων των γονιδίων που εξετάστηκαν και τα οποία εμπλέκονται στην ομοιοστάση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του ASC και της GSH και της μεταγωγής σήματος μέσω αυτής, ως συνέπεια της αλατότητας. Αντίθετα, η αδυναμία διατήρησης ή/και επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης που παρατηρήθηκε στα προ-μεταχειρισμένα φυτά που καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 7 ημερών, δικαιολογεί εν μέρει, τις εμφανείς αρνητικές συνέπειες της αλατότητας στα φυτά αυτά. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η προ-μεταχείριση είτε με SNP, είτε με H_2O_2 , δεν προσδίδει στα φυτά κάποιο είδος «μνήμης», η οποία θα μπορούσε να επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών, όταν αυτά καταπονούνται μερικές μέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους. Το σύνολο των αποτελεσμάτων μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τόσο το H_2O_2 , όσο και το NO, δύνανται να επάγουν διασυστηματικά την ανθεκτικότητα των φυτών κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας, αφού τα φυτά έδειξαν ταχύτερη και/ή ισχυρότερη ενεργοποίηση των μηχανισμών ανθεκτικότητάς τους σε σύγκριση με τα φυτά του θετικού μάρτυρα. Η ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας για την επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών, αφού φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος και τη γονιδιακή έκφραση για την αύξηση της ανθεκτικότητας των φυτών.

5. Το H₂S επάγει τη διασυστηματική ανθεκτικότητα φυτών φράουλας σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και υπερ-οσμωτικής καταπόνησης

5.1. Περίληψη

Μόλις πρόσφατα έχει αποκαλυφθεί η εμπλοκή του H₂S στην επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών μέσω της βιολογικής διέγερσης. Η παρούσα μελέτη διερεύνησε την υπόθεση ότι η προ-μεταχείριση φυτών φράουλας (ποικ. Camarosa) με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης όξινου θειούχου νατρίου (NaHS, πρόδρομη ένωση του H₂S, 100 μmol L⁻¹ για 48 h) είναι δυνατόν να επάγει τη βιολογική διέγερση και κατά συνέπεια την ανθεκτικότητα των φυτών κατά τη μετέπειτα μακροχρόνια έκθεσή τους (7 ημέρες) σε διάλυμα αυξημένης συγκέντρωσης NaCl (100 mM) ή PEG-6000 (10% β/ο). Η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα μέγιστης φωτοσυνθετικής αποτελεσματικότητας, στοματικής αγωγιμότητας και σχετικής περιεκτικότητας των φύλλων σε νερό, καθώς επίσης και σε χαμηλότερα επίπεδα υπεροξειδωσής των λιπιδίων, σε σύγκριση με τα επίπεδα που καταγράφηκαν στα φυτά που εκτέθηκαν σε ιονική και μη-ιονική οσμωτική καταπόνηση χωρίς προ-μεταχείριση (θετικοί μάρτυρες). Επιπλέον, η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS είχε ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση της δευτερογενούς οξειδωτικής και νιτροδωτικής καταπόνησης στα φύλλα των φυτών αυτών, όπως αποδεικνυόταν από τα χαμηλότερα επίπεδα σύνθεσης NO και H₂O₂ στα φύλλα και τη διατήρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης σε υψηλότερα επίπεδα, μετά την επακόλουθη έκθεση των φυτών σε συνθήκες αλατότητας και υπερ-οσμωτικής καταπόνησης. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των βασικών αντιοξειδωτικών ενζύμων (cAPX, CAT, MnSOD, GR), των βιοσυνθετικών ενζύμων του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης (GCS, GDH, GS), του μεταγραφικού παράγοντα DREB, καθώς επίσης και των ενζύμων του υπερβολικά ευαίσθητου στην αλατότητα μονοπατιού μεταγωγής σήματος (SOS) (SOS2-like, SOS3-like, SOS4), απόδειξε τον κεντρικό ρόλο που διαδραματίζει το H₂S στη συντονισμένη ρύθμιση πολλαπλών μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της προ-μεταχείρισης με NaHS ήταν περισσότερο έντονα στα φυτά φράουλας που υποβλήθηκαν σε αμφοτέρως τις καταπονήσεις αμέσως μετά το τέλος της περιόδου

εμβάπτισης των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS, παρά στα προ-μεταχειρισμένα φυτά που καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών. Συνολικά, τα προ-μεταχειρισμένα με H₂S φυτά κατάφεραν να μετριάσουν τις αρνητικές επιπτώσεις της αλατότητας και της υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης ελέγχοντας τη δευτερογενή οξειδωτική και νιτροδωτική κυτταρική βλάβη μέσω της αυξημένης απόδοσης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και τη συντονισμένη ρύθμιση του μονοπατιού SOS, προτείνοντας έτσι έναν νέο ρόλο για το H₂S στη βιολογική διέγερση των φυτών για την επαγωγή της ανθεκτικότητάς τους σε συνθήκες καταπόνησης.

Λέξεις-κλειδιά: αλατότητα, ασκορβικό οξύ, βιολογική διέγερση, γλουταθειόνη, νιτροδωτική καταπόνηση, οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, οξειδωτική καταπόνηση, όξινο θειούχο νάτριο, υδρόθειο, υπερβολικά ευαίσθητο στην αλατότητα μονοπάτι μεταγωγής σήματος

5.2. Εισαγωγή

Αποδεδειγμένα, τόσο η αλατότητα, όσο και η υπερ-ωσμωτική καταπόνηση (ξηρασία), αποτελούν τις κυριότερες αιτίες μείωσης της αγροτικής παραγωγής παγκοσμίως (Krasensky and Jonak, 2012). Οι πρωτογενείς αυτοί παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης συχνά αλληλοσυνδέονται προκαλώντας ζημιά στη δομή και λειτουργικότητα του κυττάρου, κυρίως μέσω της διατάραξης της ιοντικής και ωσμωτικής ομοιόστασής του. Επιπρόσθετα, η παραγωγή και βιοσυσσώρευση των ROS και RNS στο κύτταρο προκαλεί επιπλέον δευτερογενή οξειδωτική και νιτροδωτική καταπόνηση, αντίστοιχα (Molassiotis and Fotopoulos, 2011). Ως εκ τούτου, τα φυτά έχουν αναπτύξει έναν καλά οργανωμένο μηχανισμό προσαρμογής και εγκλιματισμού για την επιβίωσή τους, όταν εκτίθενται σε αυτές τις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (Wang et al., 2003, Ashraf and Harris, 2004, Mahajan and Tuteja, 2005, Tuteja, 2007, Mazzucotelli et al., 2008).

Ο ρόλος των διαφόρων μορίων σήματος κατά τη λειτουργία των κυττάρων τόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, όσο και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, είναι θεμελιώδους σημασίας. Ο ρόλος του H₂S στη μεταγωγή σήματος στα ζωικά κύτταρα έχει πρόσφατα τεκμηριωθεί. Η κοινή εικόνα του H₂S ως ενός επικίνδунου και θανατηφόρου αερίου με οσμή σάπιου αυγού έχει πλέον δώσει τη θέση της σε αυτή του βιολογικά ενεργού μορίου σήματος. Ωστόσο, πάρα το γεγονός ότι η πρώτη αναφορά πως

τα φυτά συνθέτουν και απελευθερώνουν H_2S έγινε αρκετά χρόνια πριν (Wilson et al., 1978), δεν υπήρξε αξιολογη ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τη βιολογία του στα φυτά, πάρα μόνο τα τελευταία χρόνια. Η ταυτοποίηση και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός ορισμένων τύπων ενζύμων που καταλύουν την ενδογενή παραγωγή H_2S στα φυτά, έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τη μελέτη της πιθανής εμπλοκής του στη φυσιολογία του φυτού. Συγκεκριμένα, ο Bloem και οι συνεργάτες του (2004) αναφέρουν την ύπαρξη της L-cysteine desulphhydrase (LCD) η οποία απελευθερώνει H_2S κατά την αποδόμηση της L-κυστεΐνης, καθώς επίσης και της O-acetyl-L-serine(thiol)lyase (OASTL) η οποία καταναλώνει H_2S κατά τη σύνθεση της κυστεΐνης, σε φυτά ελαιοκράμβης (*Brassica napus* L.). Έναν χρόνο αργότερα, ο Riemenschneider και οι συνεργάτες του (2005) αναφέρουν την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό του ενζύμου D-cysteine desulphhydrase (D-CDes) το οποίο καταλύει τη μετατροπή της D-κυστεΐνης σε πυροσταφυλικό οξύ (Pyruvate), H_2S και αμμωνία, σε φυτά *Arabidopsis thaliana*. Πρόσφατα, ο Alvares και οι συνεργάτες του (2010) έδειξαν ότι μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis thaliana* που υπερέκφραζαν το γονίδιο της L-cysteine desulphhydrase παρουσίασαν ανθεκτικότητα έναντι των υψηλών συγκεντρώσεων ιόντων Cd^{2+} και H_2O_2 , σε σχέση με τα φυτά άγριου τύπου.

Με αφορμή τις αναφορές αυτές, πολλοί ερευνητές έχουν αξιολογήσει την εμπλοκή του H_2S σε σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το H_2S με την ταυτόχρονη μεσολάβηση του ινδολυλοξικού οξέος (IAA) και του NO, είναι δυνατόν να προάγει την τυχαία οργανογένεση ριζών (Zhang et al., 2009α). Επιπλέον το H_2S φαίνεται να διαδραματίζει ενεργό ρόλο στη ρύθμιση της κίνησης των καταφρακτικών κυττάρων (García-Mata and Lamattina, 2010, Lisjak et al., 2010). Τέλος, ο Zhang και η ερευνητική του ομάδα (2011α) έδειξαν ότι η προσθήκη NaHS στο βάζο επιμήκυνε την περίοδο ζωής κομμένων ανθέων 8 καλλωπιστικών ειδών, αφού είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Πέραν της εμπλοκής του στις προαναφερθείσες φυσιολογικές λειτουργίες, το H_2S διαδραματίζει ενεργό ρόλο στην επαγόμενη ανθεκτικότητα διαφόρων φυτικών ειδών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Ο Zhang και οι συνεργάτες του (2009β, 2010β) έδειξαν ότι ο ψεκασμός φυτών σόγιας και γλυκοπατάτας με διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και κατ' επέκταση τον μετριασμό των επιζήμιων συνεπειών της ξηρασίας και της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης, αντίστοιχα. Ο μετριασμός της

δευτερογενούς οξειδωτικής καταπόνησης, ως συνέπεια της προ-μεταχείρισης με NaHS, φαίνεται να είναι η κυριότερη αιτία και για τον μετριασμό των επιζήμιων συνεπειών της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης σε σπορόφυτα σιταριού κατά την έκθεσή τους σε διάλυμα 15% (β/ο) PEG-6000 (Shan et al., 2011). Επίσης, ο Jin και οι συνεργάτες του (2011) αναφέρουν ότι η προ-μεταχείριση φυτών *Arabidopsis thaliana* με NaHS είχε ως αποτέλεσμα μικρότερο άνοιγμα στομάτων, αυξημένη ανθεκτικότητα και μεγαλύτερο βαθμό επιβίωσης των φυτών, όταν αυτά είχαν καταπονηθεί με ελλειματική άρδευση. Επιπλέον, το H₂S αύξησε το ποσοστό βλάστησης σπερμάτων σιταριού, όταν αυτά αφήνονταν να βλαστήσουν σε διάλυμα αυξημένης συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων (Al³⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺), ενώ ταυτόχρονα αύξησε και την ανθεκτικότητα των σποροφύτων στα διαλύματα αυξημένης συγκέντρωσης των παραπάνω βαρέων μετάλλων (Zhang et al., 2008, Zhang et al., 2010α, Zhang et al., 2010γ). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προ-μεταχείριση με NaHS είχε ως συνέπεια τον μετριασμό της οξειδωτικής καταπόνησης από τις υψηλές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων, αφού η δραστηριότητα των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, CAT, APX, περοξειδάση της γουαϊακόλλης), όπως και αυτή της αμυλάσης και της εστεράσης, αυξήθηκαν σημαντικά.

Στην παρούσα εργασία, υποθέσαμε ότι η παροδική έκθεση των ριζών φυτών φράουλας σε H₂S, θα μπορούσε να επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών κατά την επικείμενη έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Ως εκ τούτου, εξετάσαμε τις συνέπειες της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμβάπτιση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης όξινου θειούχο νατρίου (NaHS, πρόδρομη ένωση του H₂S, 100 μmol L⁻¹), στις βασικές συνιστώσες του μηχανισμού προσαρμογής και εγκλιματισμού των φυτών κατά την επικείμενη έκθεσή τους, είτε άμεσα μετά την προ-μεταχείρισή τους, είτε 3 ημέρες μετά, σε συνθήκες αλατότητας (100 mmol L⁻¹ NaCl) ή υπερ-οσμωτικής καταπόνησης [10% (β/ο) PEG-6000].

5.3. Υλικά και μέθοδοι

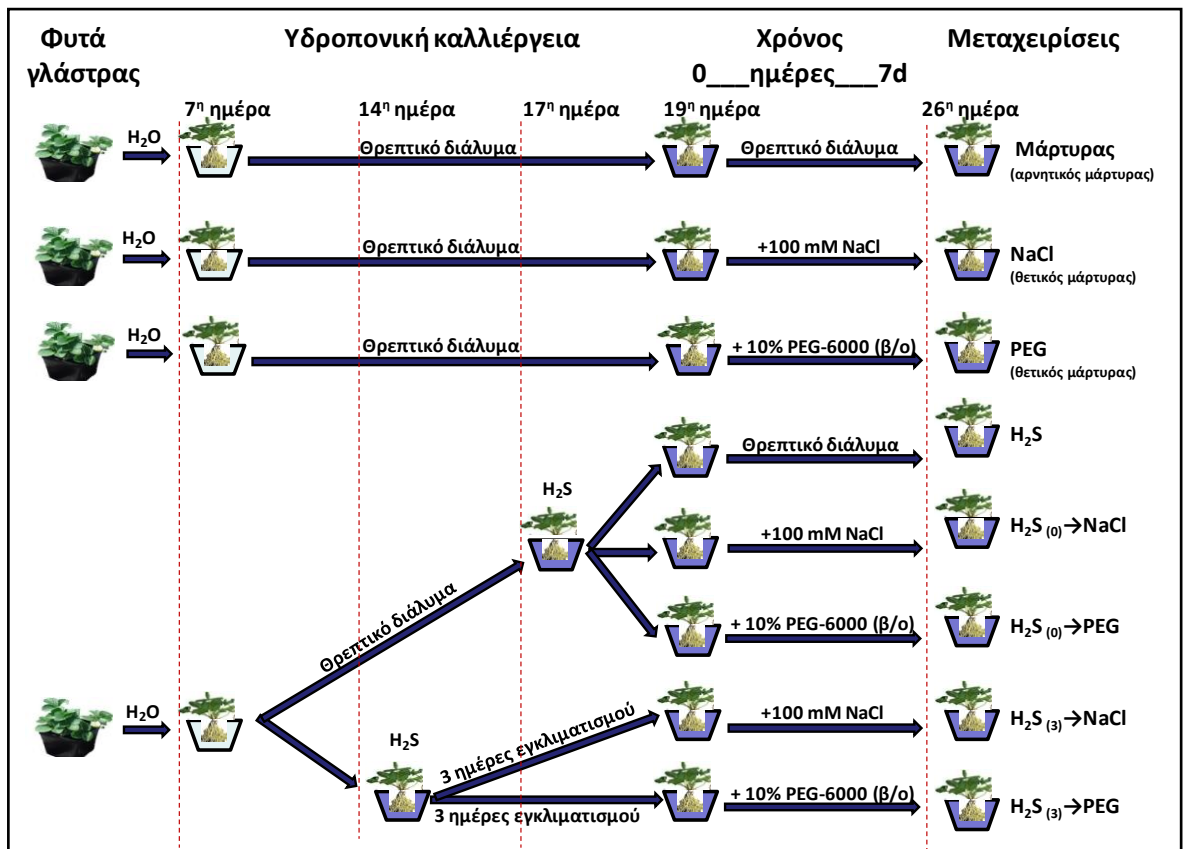
Για τη δοκιμασία της παραπάνω υπόθεσης πραγματοποιήθηκε υδροπονικό πείραμα γλάστρας με τη χρήση 72 φυτών φράουλας (ποικ. Camarosa). Αρχικά, φυτά ηλικίας 6 μηνών τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα τύρφης:περλίτη (3:1) στο θερμοκήπιο, μεταφέρθηκαν και καλλιεργήθηκαν υδροπονικά σε γλάστρες 15 L που περιείχαν

απιονισμένο νερό, σε θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16/8 ωρών ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) και θερμοπερίοδο 23/20 °C, για 7 ημέρες. Έπειτα τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης για επιπλέον 7 ημέρες μέχρι την έναρξη του πειράματος. Αρχικά, οι ρίζες 18 φυτών εμβαπτίστηκαν σε απιονισμένο νερό που περιείχε $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ όξινο θειούχο νάτριο (NaHS – πρόδρομη ένωση του H_2S) (48 h, αλλαγή διαλύματος κάθε 12 h) και κατόπιν μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης για 3 ημέρες (περίοδος εγκλιματισμού). Μια μέρα μετά το τέλος της εμβάπτισης, οι ρίζες 27 φυτών εμβαπτίστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω χωρίς περίοδο εγκλιματισμού, ούτως ώστε όλα τα φυτά να μεταφερθούν ταυτόχρονα (Ημέρα 0) σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης που περιείχε ή όχι, είτε 100mmol L^{-1} NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000, για 7 ημέρες. Συνολικά το πείραμα περιελάμβανε 8 μεταχειρίσεις, ως εξής: **Μάρτυρας:** προ-μεταχείριση με $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0$ ημέρες περίοδος εγκλιματισμού \rightarrow θρεπτικό διάλυμα (αρνητικός μάρτυρας), **NaCl:** προ-μεταχείριση με $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0$ ημέρες περίοδος εγκλιματισμού $\rightarrow 100 \text{mmol L}^{-1}$ NaCl (θετικός μάρτυρας), **PEG:** προ-μεταχείριση με $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0$ ημέρες περίοδος εγκλιματισμού $\rightarrow 10\%$ (β/ο) PEG-6000 (θετικός μάρτυρας), **H_2S :** προ-μεταχείριση με $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NaHS $\rightarrow 0$ ημέρες περίοδος εγκλιματισμού \rightarrow θρεπτικό διάλυμα, **$\text{H}_2\text{S}_{(0)} \rightarrow \text{NaCl}$:** προ-μεταχείριση με $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NaHS $\rightarrow 0$ ημέρες περίοδος εγκλιματισμού $\rightarrow 100 \text{mmol L}^{-1}$ NaCl, **$\text{H}_2\text{S}_{(0)} \rightarrow \text{PEG}$:** προ-μεταχείριση με $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NaHS $\rightarrow 0$ ημέρες περίοδος εγκλιματισμού $\rightarrow 10\%$ (β/ο) PEG-6000, **$\text{H}_2\text{S}_{(3)} \rightarrow \text{NaCl}$:** προ-μεταχείριση με $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NaHS $\rightarrow 3$ ημέρες περίοδος εγκλιματισμού $\rightarrow 100 \text{mmol L}^{-1}$ NaCl, **$\text{H}_2\text{S}_{(3)} \rightarrow \text{PEG}$:** προ-μεταχείριση με $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NaHS $\rightarrow 3$ ημέρες περίοδος εγκλιματισμού $\rightarrow 10\%$ (β/ο) PEG-6000. Κάθε μεταχείριση επαναλήφθηκε 3 φορές και περιελάμβανε 3 φυτά. Η σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων του παραπάνω πειράματος φαίνεται στο Διάγραμμα 13.

Δείγματα πλήρως εκπτυγμένων φύλλων λήφθηκαν αμέσως μετά την έκθεση ή όχι των φυτών φράουλας σε συνθήκες καταπόνησης (Ημέρα 0), όπως επίσης και 7 ημέρες μετά (Ημέρα 7). Σε αυτά προσδιορίστηκε η σχετική περιεκτικότητα σε νερό, το υδατικό δυναμικό των φύλλων, η μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα (F_v/F_m), η αγωγιμότητα των στομάτων και ο βαθμός υπεροξειδωσης των μεμβρανικών λιπιδίων (Heath and Packer, 1968). Οι βιοχημικές μετρήσεις αφορούσαν στη φυλλική συγκέντρωση του H_2O_2 (Loreto and Velikova, 2001), του NO (Zhou et al., 2005) και του H_2S (Nashef et al., 1977). Επιπλέον προσδιορίστηκε η φυλλική συγκέντρωση σε ασκορβικό (ASC) και

δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA) (Foyer et al., 1983), και σε ανηγμένη (GSH) και οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) (Griffith, 1980), καθώς επίσης και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης. Οι παραπάνω δοκιμές έγιναν σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

Τέλος, με τη χρήση της τεχνικής της qRT-PCR, έγινε ανάλυση της έκφρασης γονιδίων-στόχων στα φύλλα που άμεσα εμπλέκονται στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό, στη μεταγωγή σήματος και στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GS), τη συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), την αφυδρογονάση της L-γαλακτόζης (GDH), την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), την καταλάση (CAT), την ασκορβική περοξειδάση (APX), τη σουπεροξειδική δισμουτάση του μαγγανίου (MnSOD), τη νιτρική αναγωγή (NR), τον μεταγραφικό παράγοντα σχετικό με την αφυδάτωση (DREB), καθώς και τα γονίδια SOS2-like, SOS3-like και SOS4 του υπερβολικά ευαίσθητου στην αλατότητα μονοπατιού μεταγωγής σήματος (salt overly sensitive pathway, SOS). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το δομικό γονίδιο *18S* (Bustamante et al., 2006).

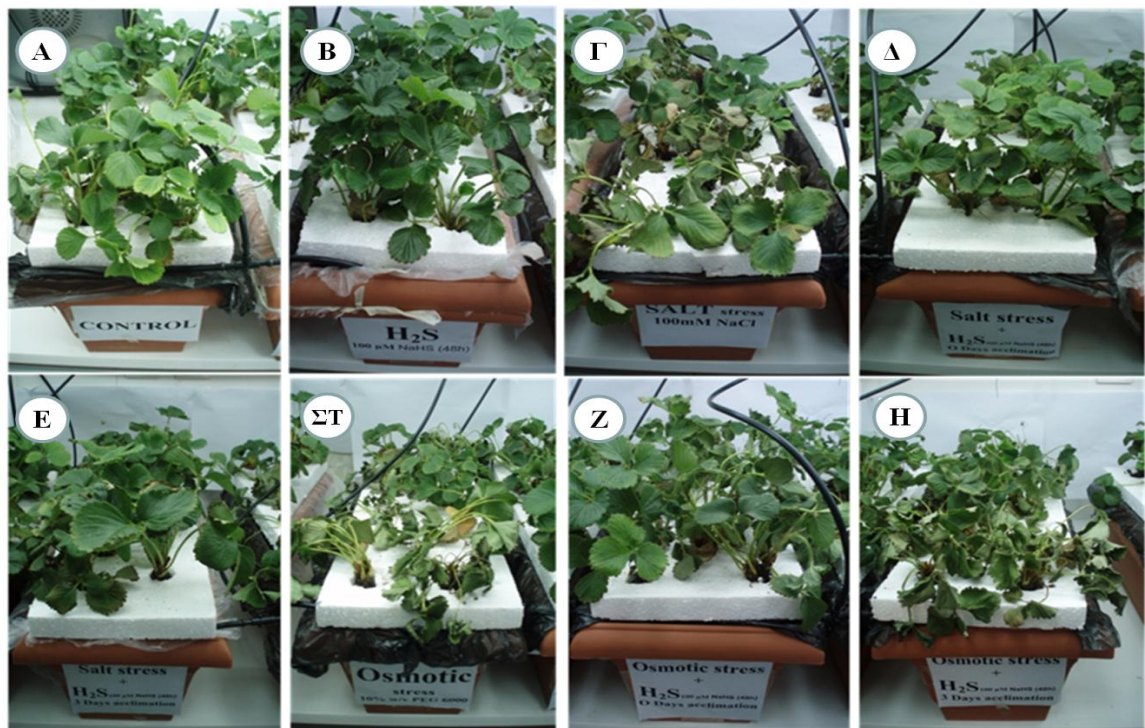


Διάγραμμα 13: Σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων του πειράματος

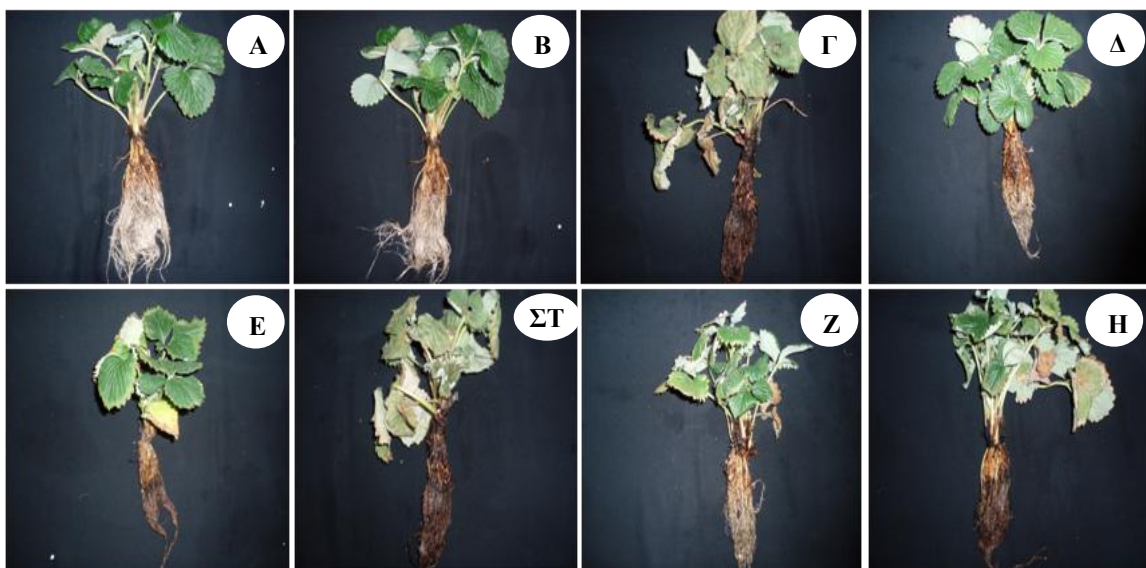
5.4. Αποτελέσματα

Η Εικόνα 5 παρουσιάζει τα συμπτώματα στον φαινότυπο των φυτών φράουλας, ως συνέπεια της προ-μεταχείρισής τους με την εμβάπτιση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS, τόσο στην ιοντική, όσο και στην υπερ-οσμωτική ανθεκτικότητά τους κατά την έκθεσή τους ή όχι, σε θρεπτικό διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L^{-1} NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000, για 7 ημέρες. Τα φυτά φράουλας και στους δυο θετικούς μάρτυρες [100 mmol L^{-1} NaCl και 10% (β/ο) PEG-6000] παρουσίασαν έντονα συμπτώματα καταπόνησης, όπως καταδεικνύεται κυρίως από τον έντονο μαρασμό, την αφυδάτωση και τις πολυάριθμες νεκρωτικές κηλίδες στην περιφέρεια των φύλλων τους (Εικ. 5Γ, ΣΤ). Αντίθετα, η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS είχε ως αποτέλεσμα τον εμφανή μετριασμό των αρνητικών συνεπειών της αλατότητας και της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης. Συγκεκριμένα, τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και είτε καταπονήθηκαν άμεσα, είτε μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών, διατήρησαν τη σπαργή των φύλλων τους σε ποσοστό παρόμοιο με εκείνο του αρνητικού μάρτυρα (Μάρτυρας), ενώ τα συμπτώματα μάρανσης και οι νεκρωτικές κηλίδες παρουσιάζονταν σε ηπιότερο βαθμό (Εικ. 5Δ, Ε, Ζ). Τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε διάλυμα 10% (β/ο) PEG-6000 μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών, παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, αλλά σε χαμηλότερο ποσοστό σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά που υπέστησαν μεταχείριση με NaHS και κατόπιν καταπονήθηκαν (Εικ. 5Η).

Μια σημαντική παρατήρηση όσον αφορά στον φαινότυπο των φυτών που έτυχαν προ-μεταχείρισης με NaHS πριν την έκθεσή τους για 7 ημέρες σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L^{-1} NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000, είναι ότι αυτά διατήρησαν σε μεγάλο βαθμό τη ζωτικότητα του ριζικού τους συστήματος, όπως προκύπτει από τη διατήρηση του λευκού χρώματος των ριζών τους (Εικ. 6Δ, Ε, Ζ, Η). Σε αντίθεση με τα φυτά που έτυχαν προ-μεταχείρισης με NaHS, οι ρίζες των φυτών των θετικών μαρτύρων υπέστησαν εκτεταμένες ζημιές, καθώς είχαν έντονο σκούρο χρώμα, εκτεταμένες νεκρωτικές κηλίδες και άσχημη οσμή (Εικ. 6Γ, ΣΤ). Ο φαινότυπος των ριζών των θετικών μαρτύρων δικαιολογεί τις εκτεταμένες ζημιές στο υπέργειο μέρος των φυτών, αφού η πρόσληψη νερού από το ριζικό σύστημα των φυτών αυτών, ήταν αδύνατη.

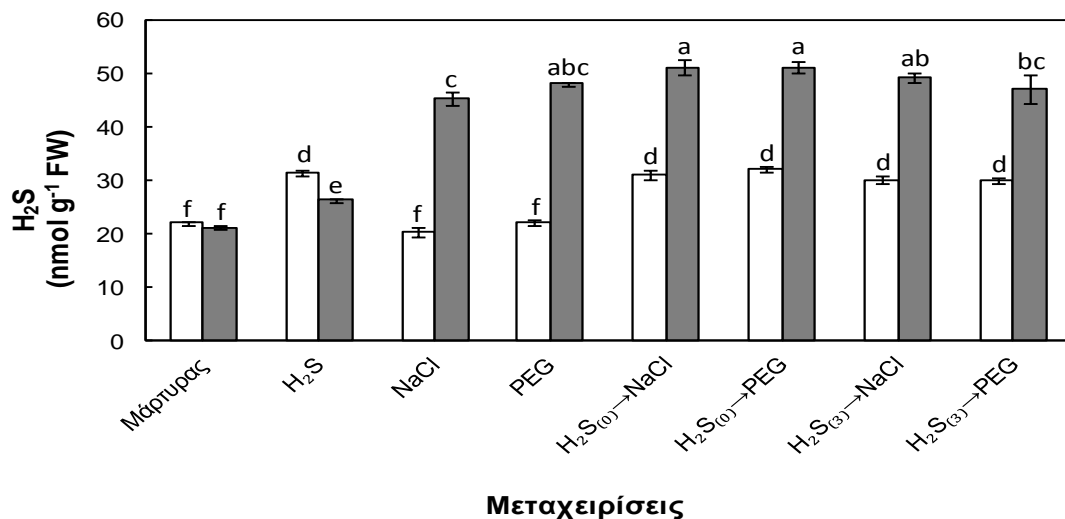


Εικόνα 5: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στο υπέργειο μέρος των φυτών μετά από την έκθεσή τους ή όχι, είτε σε 100 mmol L^{-1} NaCl, είτε σε 10% (β/ο) PEG-6000, για 7 ημέρες. [(A) Μάρτυρας (αρνητικός μάρτυρας), (B) H_2S , (Γ) NaCl (θετικός μάρτυρας), (Δ) $\text{H}_2\text{S}_{(0)} \rightarrow \text{NaCl}$, (E) $\text{H}_2\text{S}_{(3)} \rightarrow \text{NaCl}$, (ΣΤ) PEG (θετικός μάρτυρας), (Z) $\text{H}_2\text{S}_{(0)} \rightarrow \text{PEG}$, (H) $\text{H}_2\text{S}_{(3)} \rightarrow \text{PEG}$].



Εικόνα 6: Επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στον φαινότυπο των φυτών (φύλλα και ρίζες) μετά από την έκθεσή τους ή όχι, είτε σε 100 mmol L^{-1} NaCl, είτε σε 10% (β/ο) PEG-6000, για 7 ημέρες. [(A) Μάρτυρας (αρνητικός μάρτυρας), (B) H_2S , (Γ) NaCl (θετικός μάρτυρας), (Δ) $\text{H}_2\text{S}_{(0)} \rightarrow \text{NaCl}$, (E) $\text{H}_2\text{S}_{(3)} \rightarrow \text{NaCl}$, (ΣΤ) PEG (θετικός μάρτυρας), (Z) $\text{H}_2\text{S}_{(0)} \rightarrow \text{PEG}$, (H) $\text{H}_2\text{S}_{(3)} \rightarrow \text{PEG}$].

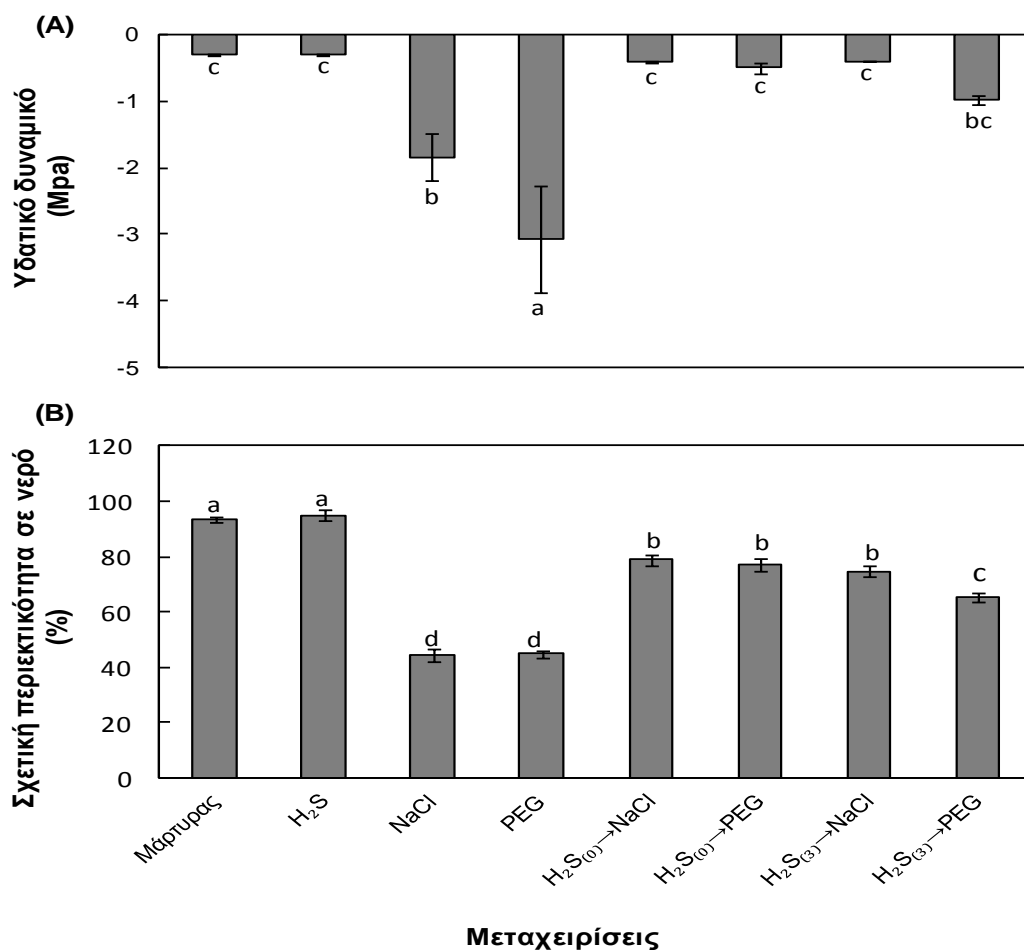
Για την επιβεβαίωση της δράσης του NaHS ως πρόδρομης ένωσης του H₂S, προσδιορίστηκε η φυλλική συγκέντρωση H₂S, τόσο κατά τη στιγμή της έκθεσης των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης (Ημέρα 0), όσο και 7 ημέρες μετά. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 14, η εμφάνιση των ριζών σε διάλυμα 100 μmol L⁻¹ NaHS προκάλεσε την αύξηση της συγκέντρωσης H₂S στα φύλλα (~41%), τόσο μετά το πέρας της εμφάνισης, όσο και 3 ημέρες μετά (περίοδος εγκλιματισμού). Επιπλέον, τα επίπεδα του H₂S στα φύλλα παρέμειναν υψηλά ακόμα και 7 ημέρες μετά την εμφάνιση των ριζών σε διάλυμα 100 μmol L⁻¹ NaHS (24% αύξηση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι η καταπόνηση των φυτών με την έκθεσή τους σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000, για 7 ημέρες, αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση του H₂S στα φύλλα (113 και 126%, αντίστοιχα). Η εμφάνιση των ριζών των φυτών σε διάλυμα 100 μmol L⁻¹ NaHS πριν την καταπόνησή τους είχε ως συνέπεια την περαιτέρω αύξηση της φυλλικής συγκέντρωσης H₂S, 7 ημέρες μετά την έναρξη της καταπόνησης (~140% στις μεταχειρίσεις H₂S₍₀₎→NaCl, H₂S₍₃₎→NaCl και H₂S₍₀₎→PEG και ~122% στη μεταχείριση H₂S₍₃₎→PEG, Διάγραμμα 14).



Διάγραμμα 14: Επιδράσεις της εμφάνισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS (100 μmol L⁻¹), στη φυλλική συγκέντρωση H₂S κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 7 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 7, γκρίζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

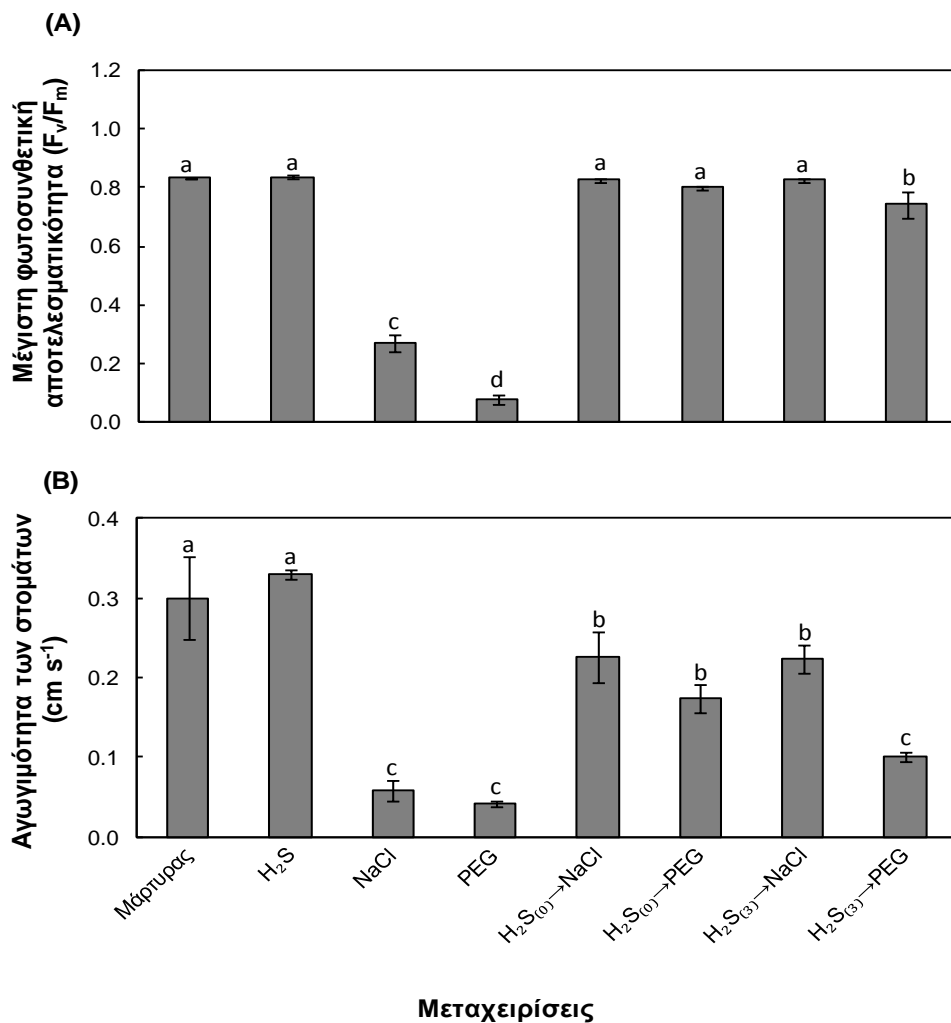
Προκειμένου να αξιολογηθεί το ποσοστό ενυδάτωσης των φύλλων, προσδιορίστηκε η σχετική περιεκτικότητά τους σε νερό (LRWC) και το υδατικό τους δυναμικό. Όπως

φαίνεται στο Διάγραμμα 15B, τόσο η αλατότητα, όσο και η υπερ-ωσμωτική καταπόνηση (PEG) προκάλεσαν σημαντική μείωση της LRWC (~50%), ενώ η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS πριν την καταπόνησή τους, είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της LRWC σε πολύ υψηλότερα επίπεδα. Όπως ήταν αναμενόμενο, η προοδευτική μείωση της περιεκτικότητας των φύλλων σε νερό, λόγω της έκθεσης των φυτών σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης, προκάλεσε τη δραματική μείωση του υδατικού δυναμικού των φύλλων (περισσότερο από δέκα φορές). Αντίθετα, τα φυτά που έτυχαν προ-μεταχείρισης με NaHS πριν από την καταπόνησή τους, κατάφεραν να διατηρήσουν τη σπαργή των φύλλων τους, όπως φαίνεται από τη μικρή διαφοροποίηση του υδατικού δυναμικού των φύλλων σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (Διάγραμμα 15A).



Διάγραμμα 15: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), στο υδατικό δυναμικό (A) και στη σχετική περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό (B), μετά από 7 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L^{-1} NaCl, είτε 10% (β/α) PEG-6000. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=9$). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

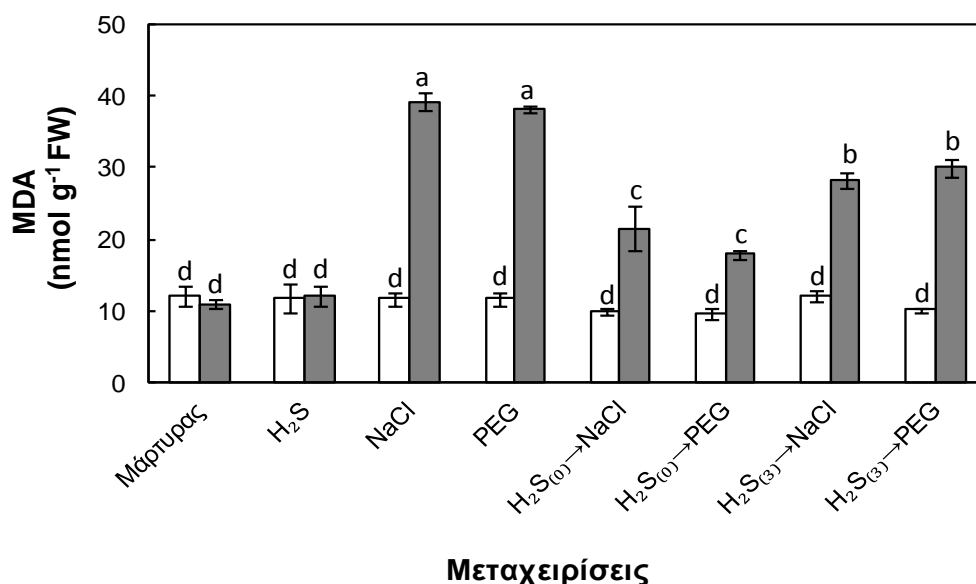
Η μέγιστη κβαντική απόδοση του PSII εκτιμήθηκε με βάση τον λόγο του μεγίστου (F_m) προς τον μεταβλητό φθορισμό (F_v) του PSII. Τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και είτε καταπονήθηκαν αμέσως μετά ($H_2S_{(0)} \rightarrow NaCl$, $H_2S_{(0)} \rightarrow PEG$), είτε καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημέρων ($H_2S_{(3)} \rightarrow NaCl$, $H_2S_{(3)} \rightarrow PEG$), κατάφεραν να διατηρήσουν τη μέγιστη κβαντική απόδοση του PSII σε επίπεδα όμοια με αυτά του αρνητικού μάρτυρα (Διάγραμμα 16Α). Οι αρνητικές επιπτώσεις της αλατότητας και της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης στην απόδοση του PSII γίνονται σαφής μέσα από τη σημαντικότερη μείωση που καταγράφηκε στο λόγο F_v/F_m , η οποία έφτασε το 68 και 91% , αντίστοιχα.



Διάγραμμα 16: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100\ \mu mol\ L^{-1}$), στη μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα (A) και την αγωγιμότητα των στομάτων (B) στα φύλλα, μετά από 7 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών σε διάλυμα που περιείχε είτε $100\ mmol\ L^{-1}$ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=9$). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

Ένας επιπλέον σημαντικός φυσιολογικός δείκτης της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων που φαίνεται να επηρεάστηκε από τη μεταχείριση των φυτών με NaHS και τη μετέπειτα καταπόνησή τους είναι η αγωγιμότητα των στομάτων. Συγκεκριμένα, η στοματική αγωγιμότητα μειώθηκε σημαντικά (πάνω από 80%) μετά από 7 ημέρες έκθεσης των φυτών σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. Η μείωση της στοματικής αγωγιμότητας ήταν εμφανής και στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS πριν την καταπόνησή τους, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό (Διάγραμμα 16B). Αναλυτικότερα, η στοματική αγωγιμότητα των φυτών που έτυχαν προ-μεταχείρισης με NaHS και καταπονήθηκαν με αλατότητα είτε αμέσως μετά, είτε μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών, μειώθηκε κατά 27%, ενώ η σχετική μείωση ήταν εντονότερη στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και εκτέθηκαν σε υπερ-ωσμωτική καταπόνηση μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών (H₂S₍₃₎→PEG, 66% μείωση), πάρα σε αυτά που καταπονήθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους (H₂S₍₀₎→PEG, 42% μείωση).

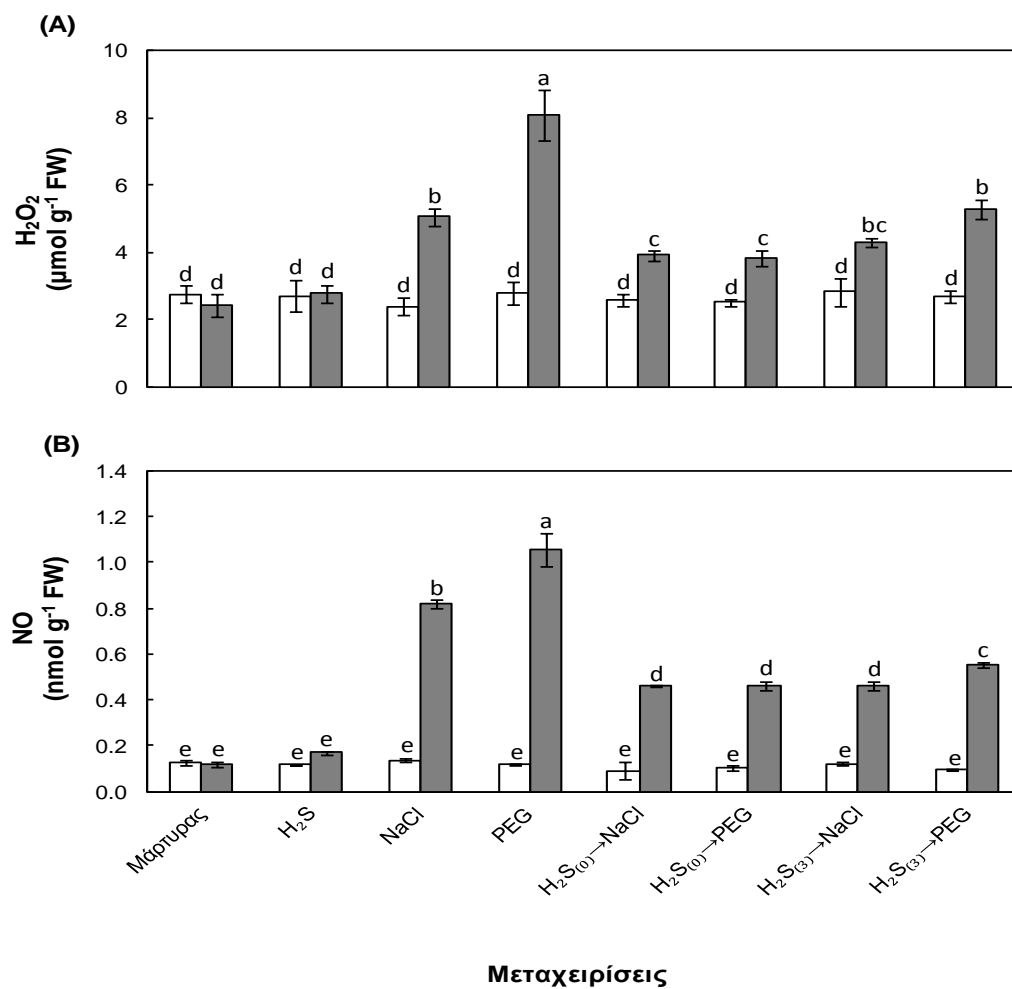
Προκειμένου να ποσοτικοποιήσουμε τη ζημιά στις κυτταρικές μεμβράνες των φύλλων, ως συνέπεια της έκθεσης των φυτών στις υπό εξέταση συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, εκτιμήσαμε τον βαθμό υπεροξειδωσίας των μεμβρανικών λιπιδίων με βάση το περιεχόμενο της μαλονδιαλδεύδης (MDA). Φυτά φράουλας που καλλιεργήθηκαν στην παρουσία είτε 100 mmol L⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000 για 7 ημέρες, εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερο επίπεδο (περίπου τετραπλάσιο) υπεροξειδωσίας των μεμβρανικών τους λιπιδίων, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Αντίθετα, τα φυτά που καταπονήθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους (H₂S₍₀₎→NaCl, H₂S₍₀₎→PEG) κατάφεραν να διατηρήσουν την ακεραιότητα των μεμβρανών τους, όπως αποδεικνύεται από τη χαμηλότερη περιεκτικότητα των φύλλων σε MDA (λιγότερο από το διπλάσιο σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα). Ο μετριασμός της υπεροξειδωσίας των μεμβρανικών λιπιδίων δεν ήταν ανάλογα τόσο εμφανής στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών, αφού η συγκέντρωση MDA παρουσίασε αύξηση κατά 2,6 και 2,8 φορές στα φυτά που εκτέθηκαν σε 100 mmol L⁻¹ NaCl και 10% (β/ο) PEG-6000, αντίστοιχα, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (Διάγραμμα 17). Σημαντική παρατήρηση αποτελεί και το γεγονός πως η προ-μεταχείριση με NaHS δεν προκάλεσε σημαντική διαφοροποίηση στο περιεχόμενο της MDA στα φύλλα των φυτών, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα.



Διάγραμμα 17: Επιδράσεις της εμφύπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στη φυλλική συγκέντρωση MDA κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 7 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 7, γκριζες στήλες) σε διάλυμα που περιείχε είτε 100mmol L^{-1} NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=3$). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

Επιπλέον, για την εκτίμηση της δευτερογενούς οξειδωτικής και νιτροδοτικής καταπόνησης, εκτιμήθηκε η συγκέντρωση του H_2O_2 , ενός τυπικού ROS, και του NO, ενός τυπικού RNS, στα φύλλα. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 18, η αλατότητα και η υπερ-ωσμωτική καταπόνηση προκάλεσαν την αύξηση της συγκέντρωσης τόσο του H_2O_2 (2,1 και 3,3 φορές, αντίστοιχα), όσο και του NO (6,9 και 8,8 φορές, αντίστοιχα), στα φύλλα. Αντίθετα, η προ-μεταχείριση των φυτών με την εμφύπτιση των ριζών τους σε διάλυμα $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NaHS πριν από την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας ή υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης, είχε ως συνέπεια τη διατήρηση της συγκέντρωσης και των δυο βιολογικά ενεργών ενώσεων σε χαμηλότερα επίπεδα, σε σχέση με τους θετικούς μάρτυρες. Συγκεκριμένα, η αλατότητα και η υπερ-ωσμωτική καταπόνηση προκάλεσαν την αύξηση της φυλλικής συγκέντρωσης του H_2O_2 κατά 60 και 57%, αντίστοιχα, στα φυτά που καταπονήθηκαν αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους, και 76 και 115%, αντίστοιχα, στα φυτά που καταπονήθηκαν 3 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους με NaHS. Αντίστοιχα, η φυλλική συγκέντρωση του NO αυξήθηκε κατά ~3,8 φορές σε όλα τα φυτά που

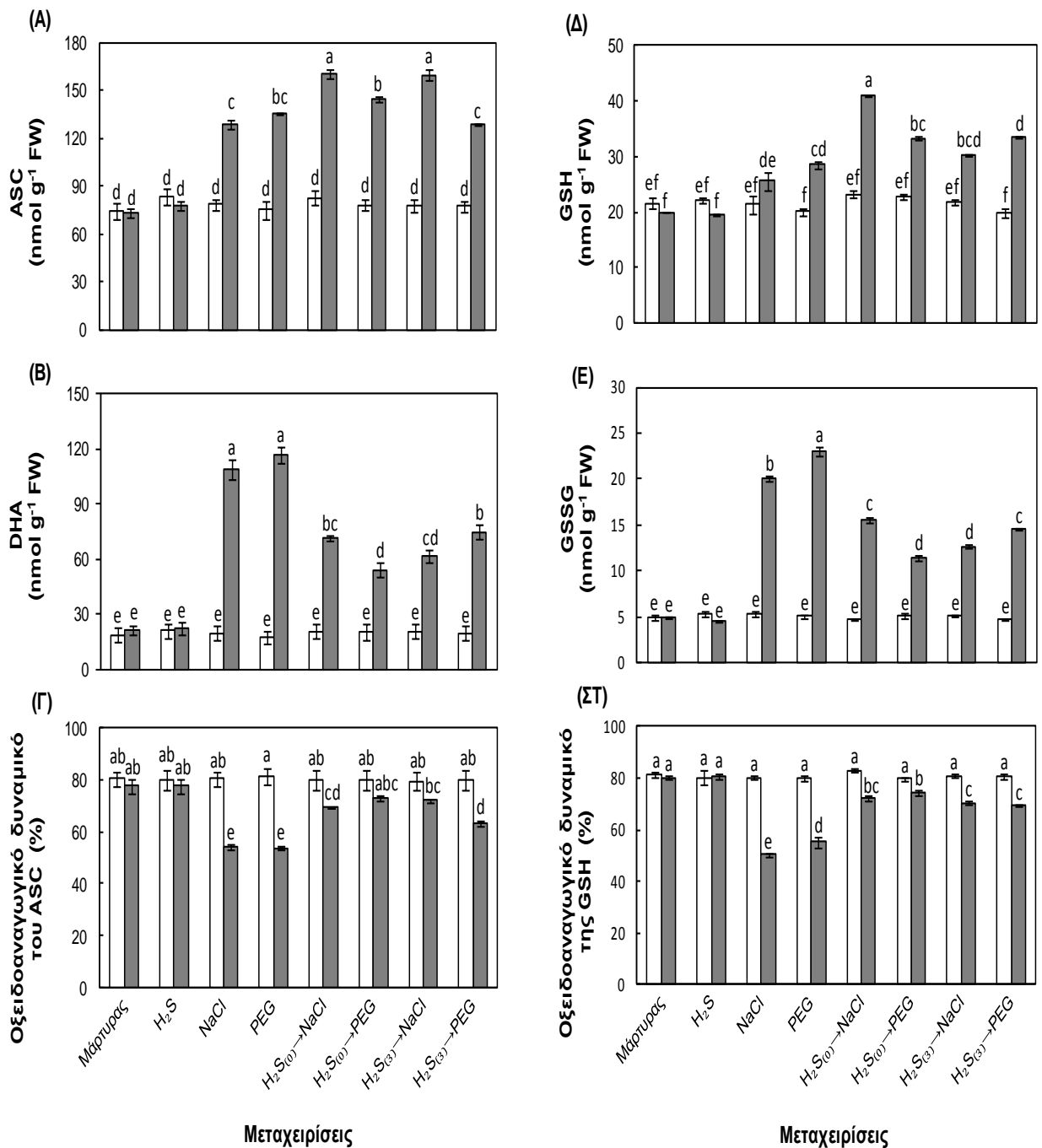
καταπονήθηκαν μετά την προ-μεταχείρισή τους, με εξαίρεση τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε διάλυμα 10% (β/ο) PEG-6000 μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών (αύξηση κατά 4,6 φορές). Το γεγονός ότι η συγκέντρωση του H₂O₂ και του NO στα φύλλα κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0) ήταν παρόμοια σε όλες τις μεταχειρίσεις, αποκαλύπτει ότι η προ-μεταχείριση των φυτών φράουλας με NaHS δεν προκάλεσε οποιαδήποτε οξειδωτική ή νιτροδωτική καταπόνηση στα φυτά, στη δόση που εφαρμόστηκε.



Διάγραμμα 18: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS (100 μmol L⁻¹), στη φυλλική συγκέντρωση H₂O₂ (A) και NO (B) κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 7 ημέρες έκθεσης ή όχι των φυτών (Ημέρα 7, γκριζές στήλες) σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (*P* < 0,05).

Το Διάγραμμα 19 παρουσιάζει με λεπτομέρεια τις επιδράσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με NaHS και της μετέπειτα καταπόνησής τους με την έκθεσή τους σε διάλυμα 100 mmol L^{-1} NaCl ή 10% (β/ο) PEG-6000, στο αντιοξειδωτικό δυναμικό τόσο του ασκορβικού οξέος, όσο και της γλουταθειόνης. Τα φυτά που καλλιεργηθήκαν σε διάλυμα 100 mmol L^{-1} NaCl ή 10% (β/ο) PEG-6000 για 7 ημέρες, παρουσίασαν σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση του ολικού ασκορβικού οξέος, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (Διάγραμμα 19 A, B). Η συμβολή του ανηγμένου ασκορβικού οξέος στο συνολικό ασκορβικό οξύ, όταν τα φυτά καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους στους υπό εξέταση παράγοντες καταπόνησης έφτασε το 54%. Πιο αναλυτικά, το ανηγμένο ασκορβικό οξύ αυξήθηκε κατά ~1,8 φορές, ενώ το δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA) κατά ~5,3 φορές στα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς προ-μεταχείριση (NaCl, PEG), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS πριν από την καταπόνησή τους οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερη αύξηση της περιεκτικότητας του ανηγμένου ασκορβικού οξέος (ASC), ενώ η περιεκτικότητα του DHA παρουσίασε σημαντική μείωση σε σύγκριση με τα φυτά των θετικών μαρτύρων (Διάγραμμα 19A,B). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως το ASC φαίνεται να συμβάλλει σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό στη συνολική συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (υψηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό %, Διάγραμμα 19Γ) στα φυτά που έτυχαν προ-μεταχείρισης με NaHS πριν από την καταπόνησή τους, σε σύγκριση με τα φυτά των θετικών μαρτύρων (NaCl, PEG), και σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα ή με τα φυτά που μεταχειρίστηκαν με NaHS και δεν καταπονήθηκαν.

Η συγκέντρωση της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης, καθώς επίσης και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό της γλουταθειόνης, παρουσίασαν παρόμοια με το ασκορβικό οξύ τάση. Συγκεκριμένα, η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS πριν από την έκθεσή τους στις υπό εξέταση συνθήκες καταπόνησης (είτε άμεσα, είτε μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών), οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και σε μείωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), σε σύγκριση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα φυτά των θετικών μαρτύρων (NaCl και PEG, Διάγραμμα 19Δ, E). Επιπλέον, οι διαταραχές στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό της γλουταθειόνης ήταν μικρότερες στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS πριν την καταπόνησή τους, σε σύγκριση με τα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς προ-μεταχείριση (Διάγραμμα 19ΣΤ).

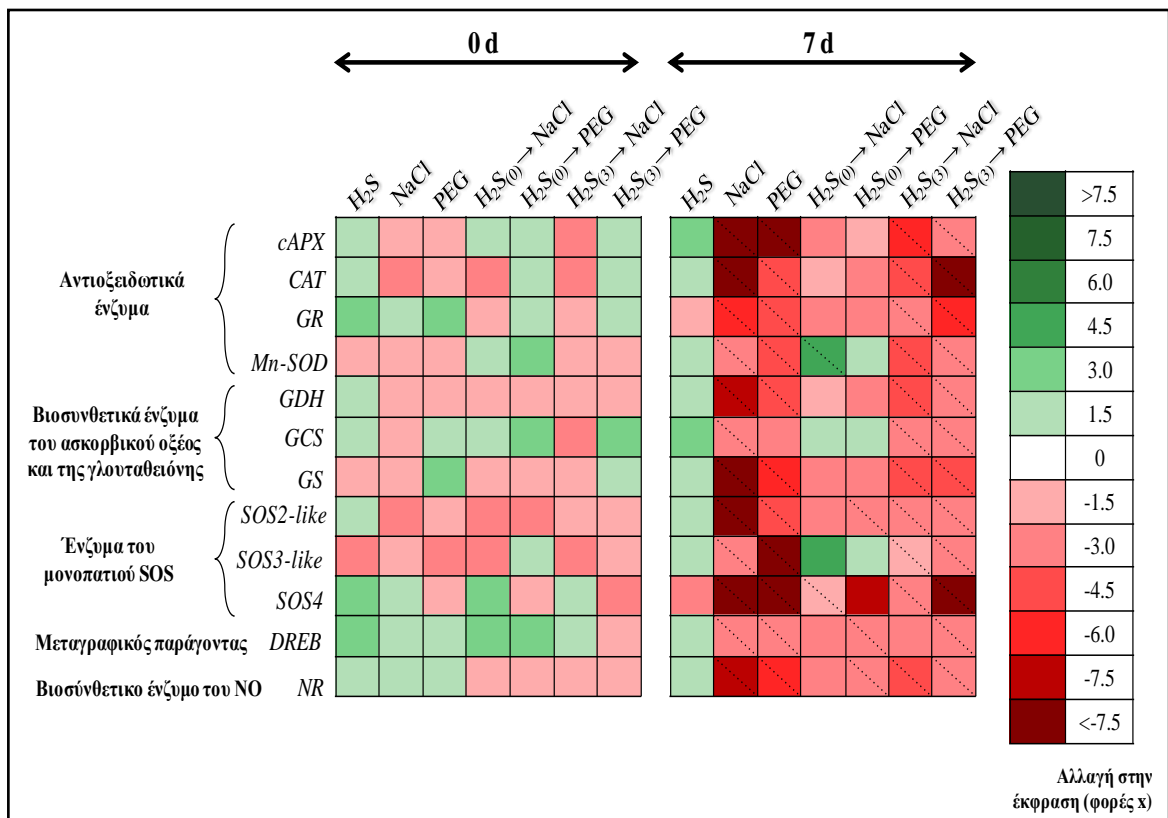


Διάγραμμα 19: Επιδράσεις της εμφύπισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS (100 μmol L⁻¹), στη φυλλική συγκέντρωση και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, λευκές στήλες) και μετά από 7 ημέρες (Ημέρα 7, γκριζες στήλες) έκθεσης ή όχι των φυτών, σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000. [(A) ASC, (B) DHA, (Γ) οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος %, (Δ) GSH, (Ε) GSSG και (ΣΤ) οξειδοαναγωγικό δυναμικό της γλουταθειόνης %]. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

Επιπλέον, η ποσοτικοποίηση των ανηγμένων και οξειδωμένων μορφών, καθώς και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης επαλήθευσε το γεγονός ότι το NaHS δεν προκαλεί οξειδωτική καταπόνηση στη δόση που εφαρμόστηκε. Το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις της ανηγμένης και οξειδωμένης μορφής τόσο του ασκορβικού οξέος, όσο και της γλουταθειόνης στα προ-μεταχειρισμένα φυτά, διατηρήθηκαν στα ίδια επίπεδα με τον αρνητικό μάρτυρα, επαληθεύει την παραπάνω παρατήρηση. Επιπλέον, η έκθεση των φυτών στις υπό εξέταση συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, είτε αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους, είτε μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών, φαίνεται να έχει τις ίδιες συνέπειες στο αντιοξειδωτικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης. Εξαιρεση φαίνεται να αποτελούν τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν και καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε διάλυμα 10% (β/ο) PEG-6000 μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών, καθώς φαίνεται να είναι σε περισσότερο οξειδωμένη κατάσταση (Διάγραμμα 19Γ,ΣΤ).

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με την τεχνική της qRT-PCR αποκάλυψε ότι η προ-μεταχείριση των φυτών φράουλας και η μετέπειτα καταπόνησή τους με την έκθεσή τους σε διάλυμα 100 mmol L^{-1} NaCl ή 10% (β/ο) PEG-6000, προκάλεσε τη διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης του συνόλου των ενζύμων που εξετάστηκαν, σε σύγκριση με τα φυτά του θετικού μάρτυρα (Διάγραμμα 20). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το H_2S διαδραματίζει βασικό ρόλο στη συντονισμένη μεταγραφική ρύθμιση διαφόρων μηχανισμών ανθεκτικότητας, όπως ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός [αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), καταλάση (CAT), ασκορβική περοξειδάση (APX)], σουπεροξειδική δισμουτάση του μαγγανίου (MnSOD)], το μονοπάτι βιοσύνθεσης του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης [συνθετάση της γλουταθειόνης (GS), συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), αφυδρογονάση της L-γαλακτόζης (GDH)], η βιοσύνθεση NO [νιτρική αναγωγή, (NR)], η μεταγραφική ρύθμιση [μεταγραφικός παράγοντας σχετικός με την αφυδάτωση, (DREB)] και το υπερβολικά ευαίσθητο στην αλατότητα μονοπάτι μεταγωγής σήματος (salt overly sensitive pathway, SOS) (SOS2-like, SOS3-like και SOS4).

Οι κύριες τάσεις που παρατηρήθηκαν ήταν τα γενικά χαμηλά επίπεδα μεταγραφικής ρύθμισης (έως και 1,5 φορές επαγωγή ή καταστολή της ρύθμισης) των περισσότερων γονιδίων σε όλες τις μεταχειρίσεις κατά την έναρξη του πειράματος (όταν ξεκίνησε η καταπόνηση των φυτών), αφού το πρότυπο έκφρασης όλων των γονιδίων-στόχων δεν παρουσίασε σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με αυτό του αρνητικού μάρτυρα



Διάγραμμα 20: Θερμικός χάρτης που καταδεικνύει το χρονικό πρότυπο έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με ορισμένες ενζυμικές αντιοξειδωτικές ενώσεις, τη βιοσύνθεση RNS, την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και το μονοπάτι μεταγωγής σήματος SOS στα φύλλα των φυτών φράουλας που προ-μεταχειρίστηκαν με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), και καταπονήθηκαν ή όχι με την έκθεσή τους σε διάλυμα που περιείχε είτε 100mmol L^{-1} NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000, για 7 ημέρες. Η δειγματοληψία των ιστών έγινε αμέσως μετά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης (Ημέρα 0), όπως επίσης και 7 ημέρες μετά. Η σχετική έκφραση/αφθονία του mRNA εκτιμήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (real-time RT-PCR) χρησιμοποιώντας τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης καταδεικνύεται με πράσινο χρώμα, ενώ η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης με κόκκινο χρώμα. Οι διαγώνιες διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

(Διάγραμμα 20). Ωστόσο, η εξέταση των αποτελεσμάτων 7 ημέρες μετά την έναρξη της καταπόνησης αποκάλυψε τη σημαντική καταστολή της έκφρασης όλων των γονιδίων που εξετάστηκαν στα φυτά των θετικών μαρτύρων (NaCl, PEG-6000), με μοναδική εξαίρεση την έκφραση της GCS στα δείγματα φυτών που υπέστησαν υπερ-ωσμωτική καταπόνηση. Η παραπάνω σημαντική καταστολή φαίνεται να βελτιώνεται κατά πολύ στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και καταπονήθηκαν αμέσως μετά (χωρίς περίοδο

εγκλιματισμού), αφού η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης μειωνόταν σημαντικά, παρουσιάζοντας ουσιαστικά μη σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση στα δείγματα του αρνητικού μάρτυρα (Διάγραμμα 20). Επιπλέον, η προστατευτική επίδραση της εμφάνισης των ριζών σε διάλυμα $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NaHS 3 ημέρες πριν την καταπόνηση των φυτών με την έκθεσή τους σε διάλυμα αυξημένης συγκέντρωσης είτε NaCl, είτε PEG-6000, δεν ήταν τόσο έντονη, καθώς τα περισσότερα γονίδια διατηρήθηκαν σε σημαντικά χαμηλά επίπεδα έκφρασης, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης στα φυτά του αρνητικού μάρτυρα. Παρόλα αυτά, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν 3 ημέρες πριν την καταπόνησή τους με NaCl ή PEG-6000 παρέμειναν σε υψηλότερα επίπεδα (έδειξαν μικρότερη καταστολή), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των φυτών των θετικών μαρτύρων (NaCl, PEG-6000). Σημαντικό είναι και το γεγονός ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στο μεταγραφικό μονοπάτι SOS δεν παρουσίασαν σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασής τους σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν και καταπονήθηκαν σε συνθήκες αλατότητας ($\text{H}_2\text{S}_{(0)} \rightarrow \text{NaCl}$) αμέσως μετά, αποδεικνύοντας τη σημασία του μονοπατιού μεταγωγής σήματος SOS έναντι της αλατότητας και τη δυνητική σημασία της ρύθμισης αυτού του μονοπατιού από το H_2S . Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι σχεδόν το σύνολο των γονιδίων στα δείγματα φυτών που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και μετέπειτα δεν καταπονήθηκαν (H_2S), παρουσίασαν αύξηση στα επίπεδα έκφρασής τους (Διάγραμμα 20), υποστηρίζοντας την προστατευτική, μη-τοξική δράση της εφαρμοζόμενης συγκέντρωσης NaHS.

5.5. Συζήτηση

Η αλατότητα και η ξηρασία αποτελούν ίσως τα πλέον σημαντικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα που έχουν διαμορφώσει, και συνεχίζουν να διαμορφώνουν την εξέλιξη των φυτικών ειδών. Χαρακτηριστικές είναι οι αναφορές που κάνουν λόγο για τεράστιες αρδευόμενες και μη καλλιεργούμενες εκτάσεις που καθίστανται ακατάλληλες για την καλλιέργεια φυτικών ειδών κάθε χρόνο, είτε λόγω υφαλμύρωσης των εδαφών, είτε λόγω παρατεταμένων περιόδων ξηρασίας (Ashraf, 1994). Τρανταχτό παράδειγμα αποτελούν οι ΗΠΑ, οι οποίες κατά το έτος 2012 υπέφεραν από τη μεγαλύτερη ξηρασία από το 1956, σύμφωνα με στοιχεία που δημοσιεύθηκαν από την Εθνική Υπηρεσία Ωκεανών και Ατμόσφαιρας (NOAA). Η NOAA πρόσφατα ανέφερε ότι το 55% της ενδοχώρας των ΗΠΑ

βρισκόταν κατά το 2012 σε μια μέτρια έως ακραία κατάσταση ξηρασίας, και πως το 80% των ΗΠΑ ήταν ασυνήθιστα ξηρό. Εκτιμάται ότι το 50% των καλλιεργειών καλαμποκιού ήταν σε κακή ή πολύ κακή κατάσταση, ενώ άλλες καλλιέργειες, λιβάδια και βοσκότοποι είχαν υποβαθμιστεί σε ποσοστό σπάνιο για τα τελευταία 18 χρόνια, λόγω της ξηρασίας (<http://www.drought.noaa.gov>). Ως εκ τούτου, ενώσεις που μπορεί να οδηγήσουν στον μετριασμό των αρνητικών επιπτώσεων της αλατότητας και της ξηρασίας, θα πρέπει να θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικές, τόσο από θεωρητικής άποψης, όσο και από άποψης εφαρμογών (Uchida et al., 2002).

Ήδη έχει αποδειχθεί ότι διάφορες βιολογικά ενεργές ενώσεις, όπως το H_2O_2 , το NO, το ABA, το Ca^{2+} και οι πολυαμίνες, είναι δυνατόν να επάγουν την ανθεκτικότητα σε διάφορα καλλιεργούμενα φυτικά είδη κατά την έκθεσή τους σε παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης (Bowler and Fluhr, 2000, Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007, Wahid et al., 2007β, Li et al., 2010, Filippou et al., 2012, Tanou et al., 2012α, Tanou et al., 2012β). Η παρούσα μελέτη παρέχει πρωτότυπες αποδείξεις ότι η προ-μεταχείριση των φυτών φράουλας με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS, μιας πρόδρομης ένωσης του H_2S , είναι δυνατόν να επάγει διασυστηματικά την ανθεκτικότητα των φυτών κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας ή υπερ-οσμωτικής καταπόνησης. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ενισχύουν την υπόθεση ότι ο μετριασμός των αρνητικών συνεπειών της αλατότητας και της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης, ως συνέπεια της προ-μεταχείρισης των φυτών με NaHS, θα πρέπει να αποδίδεται στο H_2S , δεδομένου ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του H_2S στα φύλλα αυξήθηκε σημαντικά μετά την προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS και τη μετέπειτα καταπόνησή τους. Σε παρόμοιες μελέτες, ο Zhang και οι συνεργάτες του (2009α, 2009β) έχουν συστηματικά αποδείξει ότι ανάμεσα στις Na^+ ή στις θειούχες ενώσεις που είναι δυνατόν να απελευθερώνονται από το NaHS, μόνο το H_2S έχει προστατευτικό ρόλο κατά την καταπόνηση των φυτών.

Στην παρούσα εργασία, η εμφύσηση των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$, 48 h) είχε ως συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης του H_2S στα φύλλα. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η συγκέντρωση του H_2S στα φύλλα παρέμενε σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα φυτά που δεν προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS, ακόμα και 7 ημέρες μετά τη μεταχείρισή τους με NaHS. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι τόσο η αλατότητα, όσο και η υπερ-οσμωτική καταπόνηση, προκάλεσαν μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του H_2S στα φύλλα, ενώ η προ-

μεταχείριση των φυτών με NaHS και η μετέπειτα καταπόνησή τους είχε ως συνέπεια την περαιτέρω αύξηση της φυλλικής συγκέντρωσης σε H₂S. Η περαιτέρω αύξηση της φυλλικής συγκέντρωσης σε H₂S στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και καταπονήθηκαν με τους υπό εξέταση παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης, πιθανότατα καταδεικνύει τον κεντρικό ρόλο του H₂S στην επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών, είτε δρώντας ως μόριο σήματος, είτε ρυθμίζοντας άλλες φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού.

Η προ-μεταχείριση φυτών φράουλας με NaHS πριν την έκθεσή τους σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000, είχε ευεργετική επίδραση στην ανθεκτικότητα των φυτών, αφού μείωσε τις αρνητικές συνέπειες της αλατότητας και της υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης, ενώ ταυτόχρονα δεν προκάλεσε εμφανή συμπτώματα στα φυτά από μόνη της. Η αξιολόγηση ορισμένων φυσιολογικών δεικτών έδειξε ότι τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS πριν από την καταπόνησή τους διατήρησαν τη σπαργή των φύλλων και την ακεραιότητα και λειτουργικότητα των μεμβρανών τους, σε σύγκριση με τα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς προ-μεταχείριση. Αυτή η παρατήρηση υποστηρίζεται από τα υψηλότερα επίπεδα της σχετικής περιεκτικότητας σε νερό και του υδατικού δυναμικού των φύλλων στα καταπονημένα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των θετικών μαρτύρων. Επιπλέον, η διατήρηση της φωτοχημικής απόδοσης του PSII στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS πριν την καταπόνησή τους, περαιτέρω ενισχύει τον ρόλο του H₂S στην επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών έναντι της αλατότητας και της υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης. Επιπλέον, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα προ-μεταχειρισμένα με NaHS φυτά που καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000, κατάφεραν να διατηρήσουν τη στοματική αγωγιμότητα των φύλλων τους σε πολύ υψηλότερα επίπεδα, σε σύγκριση με τα φυτά των θετικών μαρτύρων. Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με αυτά των García-Mata και Lamattina (2010), καθώς επίσης και του Lisjal και των συνεργατών του (2010), οι οποίοι αναφέρουν ότι το H₂S εμπλέκεται ενεργά στη ρύθμιση της κίνησης των καταφρακτικών κυττάρων, κυρίως μέσω του ABA-εξαρτώμενου μονοπατιού μεταγωγής σήματος. Ο Zhang και οι συνεργάτες του (2010β, 2009β) έδειξαν ότι η προ-μεταχείριση φυτών γλυκοπατάτας και σόγιας με NaHS πριν την έκθεσή τους σε συνθήκες υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης, είχε ως αποτέλεσμα τη συγκράτηση της υπεροξειδωσής των μεμβρανικών λιπιδίων, όπως αποδεικνυόταν από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις MDA. Στην παρούσα εργασία φαίνεται ότι η προ-μεταχείριση των φυτών φράουλας με NaHS συγκράτησε τις επιζήμιες

συνέπειες της αλατότητας και της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης στην ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών, όπως αποδεικνύεται από τη χαμηλότερη περιεκτικότητα των φύλλων σε MDA.

Η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των ROS κατά την έκθεση των φυτών σε διάφορους παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης μπορεί να προκαλέσει μερική ή εκτεταμένη οξειδωτική καταπόνηση των δόμων του κυττάρου, προκαλώντας συνάμα αλλαγές στο οξειδοαναγωγικό του δυναμικό. Κατά συνέπεια, ο συνεχής έλεγχος της συγκέντρωσης των ROS και κατ' επέκταση του μεταβολισμού τους, είναι καθοριστικής σημασίας για την ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης (Jubany-Mari et al., 2010). Πέραν της βιοσυσσώρευσης των ROS, η έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων οδηγεί στην υπερ-παραγωγή και βιοσυσσώρευση NO και άλλων ενεργών μορφών αζώτου. Η αύξηση των αζωτούχων ενεργών ενώσεων στα καταπονημένα φυτά καταδεικνύει τη σημαντικότητα της νιτροδωτικής καταπόνησης ως μιας επιπλέον σημαντικής συνιστώσας δευτερογενούς καταπόνησης κατά την έκθεση των φυτών σε διάφορα δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Corpas et al., 2007α, Corpas et al., 2007β, Valderrama et al., 2007). Τόσο οι ROS, όσο και οι RNS δεν αποτελούν μόνο τοξικά βιοενεργά μόρια, αλλά λειτουργούν επίσης και ως μόρια σήματος, ρυθμίζοντας σημαντικές βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης και της απόκρισης των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (Neill et al., 2002α, Capone et al., 2004, Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007, Gadjev et al., 2008, Nasibi and Kalantari, 2009, Xu et al., 2010, Molassiotis and Fotopoulos, 2011).

Προκειμένου να διαπιστωθεί ο ρόλος του H₂S στον μετριασμό των αρνητικών συνεπειών της δευτερογενούς οξειδωτικής και νιτροδωτικής καταπόνησης, ως συνέπεια της έκθεσης των φυτών σε διαλύματα αυξημένης συγκέντρωσης NaCl ή PEG-6000, προσδιορίστηκε η φυλλική συγκέντρωση του H₂O₂ και του NO. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS κατάφεραν να διατηρήσουν τη συγκέντρωση και των δυο ενεργών μορίων σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα, σε σχέση με τα φυτά των θετικών μαρτύρων. Το H₂S φαίνεται να ρυθμίζει με συντονισμένο τρόπο την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ROS και RNS, όντας σε συμφωνία με διάφορες αναφορές που καταδεικνύουν μια ισχυρή αλληλοσυσχέτιση ανάμεσα στις δυο αυτές ομάδες ενεργών μορίων (Filippou et al., 2011, Molassiotis and Fotopoulos, 2011, Tanou et al., 2012α). Τα αποτελέσματα όσον αφορά στη συγκέντρωση του H₂O₂ βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά του Zhang και των συνεργατών του (2010β, 2010γ), που επίσης έδειξαν ότι τα φυτά που

προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και μετέπειτα καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε συνθήκες ξηρασίας ή αυξημένης συγκέντρωσης αργιλίου, διατήρησαν τη συγκέντρωση του H_2O_2 σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους θετικούς μάρτυρες, ενώ ο Lisjak και οι συνεργάτες του (2010) ανέφεραν ότι η μεταχείριση φυτών *Arabidopsis* με NaHS είχε ως συνέπεια τη μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης NO. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι η συγκέντρωση τόσο του H_2O_2 , όσο και του NO παραμένει η ίδια σε όλες τις μεταχειρίσεις κατά την έναρξη της καταπόνησης των φυτών (Ημέρα 0), πράγμα που καταδεικνύει ότι η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS, δεν είχε προκαλέσει ούτε οξειδωτική, ούτε νιτροδωτική καταπόνηση στα φυτά, στη δόση που εφαρμόστηκε. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε NO που παρατηρήθηκε στα φύλλα των φυτών που καταπονήθηκαν με NaCl και PEG-6000 σχετίζεται με τα χαμηλότερα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης της NR, με τη νιτρική αναγωγή να αναγνωρίζεται ως το ένζυμο-κλειδί για τη βιοσύνθεση του NO στα φυτά (Yamasaki and Sakihama, 2000). Αυτή η αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση του NO και τη γονιδιακή έκφραση της NR μπορεί να αποδοθεί στην αναδραστική μεταγραφική αναστολή της NR, σύμφωνα με τα ευρήματα της Rosales και των συνεργατών της (2011), ενδεχομένως λόγω της τοξικότητας του NO (Shapiro, 2005).

Η καταλάση (CAT), η σουπεροξειδική δισμουτάση του μαγγανίου (MnSOD) και η ασκορβική περοξειδάση (cAPX) αποτελούν τα κυριότερα ενεργά ένζυμα που βρίσκονται στην πρώτη γραμμή του αντιοξειδωτικού μηχανισμού άμυνας, και ως εκ τούτου έχουν μελετηθεί επαρκώς σε πολλά φυτά (Martinez et al., 2001, Jebara et al., 2005, Wang et al., 2005, Gill and Tuteja, 2010, Singh et al., 2010 Wu et al., 2011). Η SOD καταλύει την αναγωγή του σουπεροξειδικού ανιόντος (O_2^-) σε H_2O_2 και O_2 , και εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, στους χλωροπλάστες, στα μιτοχόνδρια και στα περοξεισώματα, ενώ η CAT και η cAPX επιταχύνουν την αναγωγή του H_2O_2 σε νερό και μοριακό οξυγόνο και εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και στα περοξεισώματα (Kuk et al., 2003). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις MDA και H_2O_2 που παρατηρήθηκαν στα καταπονημένα φυτά των θετικών μαρτύρων, θα μπορούσε να αποδοθούν, άμεσα ή έμμεσα, στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης της CAT και της cAPX. Αναλόγως, η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης της MnSOD και η διατήρηση της γονιδιακής έκφρασης της CAT και της cAPX σε επίπεδα όμοια με του αρνητικού μάρτυρα στα φυτά που είχαν καταπονηθεί αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους με NaHS, θα μπορούσε να δικαιολογήσει τις μικρότερες συγκεντρώσεις MDA και H_2O_2 στα φύλλα των φυτών αυτών. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης που

παρατηρήθηκαν βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα όσον αφορά στην ενζυμική δραστηριότητα των παραπάνω αντιοξειδωτικών ενώσεων, αφού τα προ-μεταχειρισμένα με NaHS φυτά διατήρησαν την ενζυμική δραστηριότητα της MnSOD, της CAT και της cAPX σε υψηλότερα επίπεδα, σε σύγκριση με φυτά που δεν προ-μεταχειρίστηκαν και καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου (Cd) (Li et al., 2012α), σε συνθήκες ξηρασίας (Zhang et al., 2010β), καθώς επίσης και σπερμάτων που αφέθηκαν να βλαστήσουν σε συνθήκες αλατότητας (Wang et al., 2012). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η έκφραση όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν παρουσίασε καταστολή στα φυτά που καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας και υπερ-οσμωτικής καταπόνησης. Αυτό θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα της γενικότερης κατάρρευσης των μονοπατιών άμυνας και του μηχανισμού προσαρμογής και εγκλιματισμού γενικότερα, μετά από την παρατεταμένη έκθεση (7 ημέρες) σε συνθήκες αλατότητας και υπερ-οσμωτικής καταπόνησης των ευαίσθητων στην οσμωτική καταπόνηση φυτών φράουλας. Παρόμοια ευρήματα αναφέρονται και από την Τανου και τους συνεργάτες της (2012α), οι οποίοι απόδειξαν τη γενική μεταγραφική καταστολή των σχετικών με την προσαρμογή και τον εγκλιματισμό γονιδίων στις ρίζες φυτών νεραντζιάς που καλλιεργήθηκαν υδροπονικά σε διάλυμα αυξημένης αλατότητας, για 8 ημέρες.

Το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη δικαιολογημένα θεωρούνται ως οι κυριότερες μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ενώσεις στα φυτά, αφού η συμβολή τους στο αντιοξειδωτικό δυναμικό των φυτών και κατ' επέκταση στην ανθεκτικότητά τους κατά την έκθεσή τους σε διάφορα δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα, είναι ιδιαίτερα σημαντική (Drazkiewicz et al., 2003, Gill and Tuteja, 2010, Potters et al., 2010). Στην παρούσα μελέτη, η αυξημένη ανθεκτικότητα των φυτών που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και καταπονήθηκαν αμέσως, ή 3 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους, με την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας και υπερ-οσμωτικής καταπόνησης, φαίνεται να συνδέεται άμεσα με την ικανότητά τους να υπερ-παράγουν ασκορβικό οξύ και γλουταθειόνη και να ανάγουν άμεσα τις οξειδωμένες τους μορφές (DHA και GSSG, αντίστοιχα). Ως εκ τούτου, οι λόγοι ASC/DHA και GSH/GSSG διατηρήθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους λόγους στα φυτά των θετικών μαρτύρων. Επιπλέον, η προ-μεταχείριση με NaHS, επέτρεψε στα φυτά που καταπονήθηκαν είτε άμεσα, είτε μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών, να ελαχιστοποιήσουν της διαταραχές στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης. Κατά συνέπεια, τα φυτά αυτά

διατήρησαν τις ενεργές ανηγμένες μορφές του ασκορβικού οξέος (ASC) και της γλουταθειόνης (GSH) σε υψηλά επίπεδα, διατηρώντας παράλληλα το αντιοξειδωτικό δυναμικό και την αναγωγική ικανότητα των δυο αυτών αντιοξειδωτικών ενώσεων σε υψηλότερα επίπεδα, σε σχέση με τους θετικούς μάρτυρες. Κατά συνέπεια, οι ανατροφοδοτούμενοι κύκλοι τόσο του ασκορβικού οξέος, όσο και της γλουταθειόνης, διατήρησαν την ικανότητά τους για συνεχή αποτοξίνωση των ROS, συμβάλλοντας ενεργά στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των φυτών και στη διατήρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε κατάσταση τέτοια που να επιτρέπει τη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος και την ελεγχόμενη αντίδραση των προ-μεταχειρισμένων με NaHS φυτών στην αλατότητα και την υπερ-οσμωτική καταπόνηση. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται από τον Shan και τους συνεργάτες του (2012, 2011), οι οποίοι επίσης κατέγραψαν αύξηση της συγκέντρωσης της ανηγμένης μορφής του ασκορβικού οξέος (ASC) και της γλουταθειόνης (GSH) σε προ-μεταχειρισμένα με NaHS φυτά σιταριού που εκτέθηκαν σε συνθήκες υπερ-οσμωτικής καταπόνησης και υψηλής συγκέντρωσης χαλκού, σε σχέση με τα φυτά των θετικών μαρτύρων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα καταπονημένα φυτά που έτυχαν προ-μεταχείρισης με NaHS διατήρησαν σε χαμηλότερα επίπεδα τη φυλλική συγκέντρωση σε GSSG, πιθανώς μέσω της επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης της GR, όπως επίσης αναφέρεται από τον Shan και τους συνεργάτες του (2011) σε φυτά σιταριού που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και εκτέθηκαν σε συνθήκες υπερ-οσμωτικής καταπόνησης, αφού η GR εμπλέκεται άμεσα στην αναγωγή του GSSG και την αναγέννηση του GSH (Gill and Tuteja, 2010).

Περαιτέρω ενδείξεις για τον ρυθμιστικό ρόλο του H₂S στην κυτταρική οξειδοαναγωγική ομοίωση του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης μπορούν να εξαχθούν και από τη γονιδιακή έκφραση των κυριότερων βιοσυνθετικών ενζύμων του ASC και της GSH. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης της GDH (βιοσύνθεση ASC), καθώς και της GS και της GCS (βιοσύνθεση GSH) στα προ-μεταχειρισμένα με NaHS φυτά που ακολούθως καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L⁻¹ NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000, υποστηρίζουν τα αυξημένα επίπεδα φυλλικής συγκέντρωσης σε ASC και σε GSH, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα στα φυτά του θετικού μάρτυρα. Παρόμοια αποτελέσματα, στα οποία αναφέρεται ανάλογη αύξηση στην ενζυμική δραστηριότητα της GCS σε προ-μεταχειρισμένα με NaHS φυτά σιταριού που μετέπειτα καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε συνθήκες υπερ-οσμωτικής καταπόνησης (Shan et al., 2011), καθώς και αύξηση στη δραστηριότητα της 1-γαλακτονο-1,4-λακτόνη

αφυδρογονάσης (I-galactono-1,4-lactone dehydrogenase) σε προ-μεταχειρισμένα με NaHS φυτά σιταριού που μετέπειτα καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης χαλκού (Shan et al., 2012), βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Ειδικότερα, η τροποποίηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των θειολών είναι μεγάλης σημασίας και αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό στοιχείο του τρόπου λειτουργίας του H₂S ως παράγοντα βιολογικής διέγερσης για την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών, αφού η κυστεΐνη αποτελεί την κυριότερη πηγή για την απελευθέρωση H₂S στα φυτά (Riemenschneider et al., 2005), καθώς επίσης και για τη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης (Gill and Tuteja, 2010).

Η ρύθμιση της συγκέντρωσης των ιόντων στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων από τις αντλίες τόσο της κυτταρικής μεμβράνης, όσο και των μεμβρανών των οργανιδίων του κυτταροπλάσματος, αποτελεί απαραίτητη συνιστώσα της ανάπτυξης και του εγκλιματισμού των φυτών στα διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Cheng et al., 2004). Διάφορες γενετικές δοκιμές μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis* επιβεβαίωσαν τον κεντρικό ρόλο του SOS μονοπατιού μεταγωγής σήματος στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Na⁺ και Ca²⁺, και κατ' επέκταση στην ιοντική ομοιόσταση και την ανθεκτικότητα των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας (Zhu, 2002, Mahajan and Tuteja, 2005). Το *SOS3* μετάγραφο κωδικοποιεί μια Ca²⁺-δεσμευτική πρωτεΐνη, η οποία ενεργοποιεί τη *SOS2* σερίνη/θρεονίνη πρωτεϊνική κινάση, με εξαρτώμενο της συγκέντρωσης Ca²⁺ τρόπο (Liu and Zhu, 1998, Halfter et al., 2000, Liu et al., 2000, Zhu, 2000). Αυτό το *SOS3-SOS2* σύμπλοκο πρωτεϊνικής κινάσης φωσφορυλιώνει απευθείας την πρωτεΐνη *SOS1*, η οποία αποτελεί μια αντλία Na⁺/H⁺, με αποτέλεσμα την εκροή της περίσσειας ιόντων Na⁺ εκτός του κυττάρου, ή τη συγκέντρωσή τους εντός του χυμοτοπίου, οδηγώντας έτσι στην ιοντική ομοιόσταση και στην ανθεκτικότητα έναντι της αλατότητας (Qiu et al., 2002, Mahajan and Tuteja, 2005). Επιπλέον, ο Shi και οι συνεργάτες του (2002) προσδιόρισαν ένα πρόσθετο στοιχείο του μονοπατιού SOS, το οποίο σημαίνεται ως *SOS4* και αντιπροσωπεύει μια πυριδοξαλική κινάση η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της 5-φωσφορικής πυριδοξάλης, μιας δραστικής μορφής της βιταμίνης B6. Επιπρόσθετα, αρκετές αναφορές έχουν καταδείξει την ύπαρξη δυο άλλων οικογενειών αισθητήρων ασβεστίου (calcineurin B-like proteins) και πρωτεϊνικών κινασών (CBL-interacting protein kinases), οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοια δράση με τα ένζυμα *SOS3* και *SOS2*, αντίστοιχα, και οι οποίες αναφέρονται συχνά ως *SOS-like* (Gong et al., 2004, Du et al., 2011). Στην παρούσα εργασία

παρουσιάζουμε πρωτότυπα στοιχεία που καταδεικνύουν ότι η προ-μεταχείριση των φυτών φράουλας με NaHS επάγει την ανθεκτικότητά τους έναντι της αλατότητας και της υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης μέσω της ρύθμισης του SOS μονοπατιού μεταγωγής σήματος. Συγκεκριμένα, η γονιδιακή έκφραση των *SOS2-like* και *SOS3-like* ενζύμων, καθώς επίσης και του *SOS4* ενζύμου, διατηρήθηκε σε επίπεδα όμοια με αυτά του αρνητικού μάρτυρα στα φυτά που εκτέθηκαν σε διάλυμα που περιείχε είτε 100 mmol L^{-1} NaCl, είτε 10% (β/ο) PEG-6000, αμέσως μετά την προ-μεταχείρισή τους με NaHS. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι τα προ-μεταχειρισμένα φυτά που καταπονήθηκαν μετά από περίοδο εγκλιματισμού 3 ημερών, παρουσίασαν καταστολή στη γονιδιακή έκφραση του SOS μονοπατιού μεταγωγής σήματος, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με τα φυτά των θετικών μαρτύρων [100 mmol L^{-1} NaCl, 10% (β/ο) PEG-6000]. Η επαγωγή της σχετικής γονιδιακής έκφρασης που παρατηρήθηκε στα στοιχεία του μονοπατιού μεταγωγής σήματος SOS, ως αποτέλεσμα της μεταχείρισης των φυτών με NaHS πριν την καταπόνησή τους, υπογραμμίζει τη δυνητική σημασία του H_2S στη ρύθμιση της δέσμευσης και πρόσληψης ιόντων K^+ από τα φυτά, αφού τα φυτά που περιέχουν στο γονιδίωμά τους μεταλλάξεις του ενζύμου *SOS4* είναι γνωστό ότι συγκεντρώνουν λιγότερες ποσότητες ιόντων K^+ σε συνθήκες αλατότητας, σε σύγκριση με τα φυτά άγριου τύπου (Shi et al., 2002), ενώ η πρωτεϊνική κινάση CIPK23 και ο αισθητήρας ασβεστίου CBL1 προσδιορίζονται ως οι βασικοί ρυθμιστές της πρόσληψης ιόντων K^+ στα φυτά *Arabidopsis*, λειτουργώντας παράλληλα και σε συνθήκες καταπόνησης από τροφопενία K^+ (Xu et al., 2006). Τα *SOS2-like* και *SOS3-like* ομόλογα που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη δείχνουν μεγαλύτερη ομοιότητα ακολουθίας με τα στοιχεία *AtCIPK23* και *AtCBL1*, αντιστοίχως (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Ο σχετικός με την αφυδάτωση μεταγραφικός παράγοντας (DREB) αποτελεί ένα επιπλέον σημαντικό στοιχείο του αμυντικού μηχανισμού των φυτών, αφού έχει ενεργό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός παράγοντας DREB έχει διαπιστωθεί ότι συνδέεται με τα ανταποκρινόμενα στην ξηρασία *cis*-ενεργά στοιχεία (drought responsive *cis*-acting elements), ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την προσαρμογή και τον εγκλιματισμό των φυτών, έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων (Agarwal et al., 2006). Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης των DREBs σε διαγονιδιακά φυτά μπορεί να επάγει την ανθεκτικότητά τους κατά την έκθεσή τους σε διάφορα δυσμενή περιβαλλοντικά

ερεθίσματα (Ban et al., 2011, Cui et al., 2011, Tang et al., 2011). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων qRT-PCR στη δική μας εργασία αποκάλυψαν ότι ένας επιπλέον πιθανός τρόπος με τον οποίο η προ-μεταχείριση με NaHS μπορεί να επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών φράουλας κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας και υπερ-οσμωτικής καταπόνησης, είναι ο μετριασμός της παρατηρούμενης καταστολής στη γονιδιακή έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα DREB. Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνουν πρόσφατα αποτελέσματα που καταδεικνύουν ότι η γονιδιακή έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων σχετικών με την αφυδάτωση DREB2A και DREB2B παρουσίασε επαγωγή σε φυτά που έτυχαν υποκαπνισμού με NaHS και έπειτα καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε συνθήκες ξηρασίας (Jin et al., 2011).

Η συμβολή των θειούχων ενώσεων και της θειούχου λίπανσης στην προστασία των φυτών από διάφορους εχθρούς και ασθένειες έχει ενισχύσει την υπόθεση της επαγόμενης από το θείο ανθεκτικότητας των φυτών έναντι διαφόρων παραγόντων βιοτικής καταπόνησης (Bloem et al., 2004, Bloem et al., 2005, Dubuis et al., 2005, Klikocka et al., 2005). Διάφορες ενώσεις που εμπλέκονται στους μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού των φυτών και περιέχουν στο μόριό τους θείο (Sulfur containing defense compounds, SDCs), όπως το στοιχειακό θείο (S^0), το H_2S , η γλουταθειόνη, οι φυτοχηλατίνες (phytochelatins), οι διάφοροι δευτερογενείς μεταβολίτες και οι πλούσιες σε θείο πρωτεΐνες, είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των φυτών κατά την έκθεσή τους σε διάφορους παράγοντες βιοτικής και αβιοτικής καταπόνησης (Rausch and Wachter, 2005). Στην παρούσα εργασία, το H_2S φαίνεται να επάγει την ισχυρή, διασυστηματική και μακροχρόνια ανθεκτικότητα των φυτών φράουλας, τόσο έναντι της ιοντικής καταπόνησης, ως αποτέλεσμα της αυξημένης συγκέντρωσης $NaCl$, όσο και έναντι της υπερ-οσμωτικής καταπόνησης, ως συνέπεια της αυξημένης συγκέντρωσης PEG-6000, στο θρεπτικό διάλυμα της καλλιέργειας. Η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS (48 h) και καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους στις υπό εξέταση συνθήκες καταπόνησης 3 ημέρες μετά την προ-μεταχείρισή τους, αν και μειωμένη σε σχέση με τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν και αμέσως καταπονήθηκαν, καταδεικνύει ότι το H_2S προκαλεί διασυστηματική επαγόμενη ανθεκτικότητα, και ότι είναι δυνατόν να εμπλέκεται ενεργά ως μόριο σήματος σε διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών έναντι των υπό εξέταση παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης. Αυτή η ενεργοβόρα συντονισμένη ενορχήστρωση πολλών ανεξάρτητων μονοπατιών άμυνας είναι πιθανόν εφικτή μέσω της αύξησης της

φωτοσυνθετικής ικανότητας στα μεταχειρισμένα με NaHS φυτά, όπως αναφέρεται σε πρόσφατη μελέτη από τον Chen και τους συνεργάτες του (2011β). Επιπλέον, πρόσφατα στοιχεία από τον Hou και τους συνεργάτες του (2013), καθώς επίσης και από την Liu και τους συνεργάτες της (2012), περαιτέρω καταδεικνύουν την πιθανή αλληλοσυσχέτιση μεταξύ του H₂S και άλλων μορίων σήματος, όπως το ET και το NO, παρέχοντας επιπλέον στήριξη στη συσχέτιση του H₂S και της βιοσύνθεσης του NO και του H₂O₂ που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Η εργασία αυτή προσθέτει νέα γνώση όσον αφορά στους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των φυτών που είναι δυνατόν να επάγονται από το H₂S, ενώ παράλληλα ενισχύει την άποψη ότι το H₂S αποτελεί το τρίτο αέριο μόριο σήματος στα φυτά, πέραν του NO και του CO, όπως και στα θηλαστικά. Παρόλα αυτά, για την πλήρη κατανόηση της δράσης του H₂S ως μορίου σήματος και της συμμετοχής του στη διασυστηματική επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών έναντι διαφόρων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες, συμπεριλαμβανομένων και μελετών γονιδιακής έκφρασης μέσω αναλύσεων μικροσυστοιχιών (microarrays) και μελετών πρωτεομικής (proteomics) και μεταβολομικής (metabolomics) ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής εφαρμογής συνθετικών αναστολέων της βιοσύνθεσης του H₂S.

6. Το H₂S επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών φράουλας σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης

6.1. Περίληψη

Οι ακραίες θερμοκρασίες αντιπροσωπεύουν έναν σημαντικό περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των καλλιεργούμενων φυτών. Η παρούσα μελέτη αξιολόγησε την επίδραση της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας (ποικ. Camarosa) με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης όξινου θειούχου νατρίου (NaHS, πρόδρομη ένωση του H₂S, 100 μmol L⁻¹ για 48 h), στην ανταπόκριση των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (42 °C, για 8 h). Οι εμφανείς βλάβες στον φαινότυπο των φυτών που εκτέθηκαν σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (θετικός μάρτυρας) μετριάστηκαν στα φυτά που έτυχαν προ-μεταχείρισης με NaHS. Επιπλέον, η μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PSII διατηρήθηκε σε υψηλότερα επίπεδα στα προ-μεταχειρισμένα φυτά, σε σύγκριση με τα φυτά του θετικού μάρτυρα. Τα προ-μεταχειρισμένα με NaHS φυτά κατάφεραν επίσης να μετριάσουν τα επίπεδα της δευτερογενούς οξειδωτικής και νιτροδωτικής καταπόνησης, καθώς η μαλονδιαλδεΐδη (MDA), το H₂O₂ και το NO διατηρήθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα στα φυτά αυτά, σε σύγκριση με τα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς προ-μεταχείριση. Επιπλέον, η προ-μεταχείριση με NaHS συνέβαλε στη διατήρηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, όπως αποδείχτηκε από τα υψηλότερα επίπεδα οξειδοαναγωγικού δυναμικού του ASC και της GSH, καθώς επίσης και από τη μεταγραφική ρύθμιση των βιοσυνθετικών ενζύμων του ASC (GDH) και της GSH (GS, GCS). Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με την τεχνική της qRT-PCR αποκάλυψε τον κεντρικό ρόλο των πρωτεϊνών θερμικής καταπόνησης (HSPs) και των υδατοπορινών στην ανθεκτικότητα των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS προκάλεσε τη μακροχρόνια μεταγραφική ρύθμιση, η οποία με τη σειρά της επέτρεψε την επαρκή έκφραση ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ενώσεων, HSPs και υδατοπορινών, για την προστασία των φυτών κατά τη θερμική καταπόνησή τους. Συνολικά, προτείνουμε ότι η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS αυξάνει την απόκριση των φυτών σε μεταγραφικό επίπεδο, με αποτέλεσμα την προστασία των φυτών φράουλας από τις επιζήμιες συνέπειες της θερμικής καταπόνησης.

Λέξεις-κλειδιά: ασκορβικό οξύ, βιολογική διέγερση, θερμοανθεκτικότητα, νιτροδωτική καταπόνηση, οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, όξινο θειούχο νάτριο, πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης, υδατοπορίνες, υδρόθειο

6.2. Εισαγωγή

Η σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας της γης, ως αποτέλεσμα της κλιματικής αλλαγής, καθιστά τη θερμική καταπόνηση έναν επιπλέον σημαντικό παράγοντα μείωσης και υποβάθμισης της αγροτικής παραγωγής, κυρίως σε χώρες της τροπικής και εύκρατης ζώνης (Hall, 2001, Giaveno and Ferrero, 2003, Wahid et al., 2007α). Τα φυτά που εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες (θερμική καταπόνηση) ενδέχεται να εμφανίσουν σοβαρή κυτταρική βλάβη, η οποία μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο μέσα σε λίγα λεπτά (Schöffl et al., 1998). Έχει αποδειχθεί ότι η φωτοσύνθεση (Yamada et al., 1996, Wise et al., 2004, Allakhverdiev et al., 2008), το υδατικό δυναμικό (Mazorra et al., 2002), η διαδικασία αφομοίωσης του άνθρακα (Sharkey, 2005, Murata et al., 2007) και η δομή και λειτουργικότητα των μεμβρανών (Zhang et al., 2005) πλήττονται σοβαρά κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Σε κυτταρικό επίπεδο, η θερμική καταπόνηση προκαλεί αλλαγές στη δομή και στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών, καθώς επίσης και τη συσσωμάτωσή τους. Επιπλέον, η έκθεση των φυτών σε υψηλές θερμοκρασίες έχει ως συνέπεια την αύξηση της ρευστότητας των μεμβρανικών τους λιπιδίων, την αδρανοποίηση των ενζύμων στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια, την αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών, καθώς επίσης και τη δευτερογενή οξειδωτική καταπόνηση μέσω της αυξημένης ROS (Suzuki and Mittler, 2006, Tan et al., 2011, Wang et al., 2011).

Κατά συνέπεια, τα φυτά ενεργοποιούν διάφορους μηχανισμούς για τον εγκλιματισμό και την προστασία τους έναντι των υψηλών θερμοκρασιών. Το αρχικό σήμα της θερμικής καταπόνησης, το οποίο πιθανώς αποτελεί η αύξηση της ρευστότητας των λιπιδίων στη διπλοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης (Horvath et al., 1998), ενεργοποιεί τις διαδικασίες μεταγωγής του σήματος κατόπιν, με στόχο τη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων ανθεκτικότητας (Wang et al., 2003, Mahajan and Tuteja, 2005, Vinocur and Altman, 2005). Η ρύθμιση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος των πρωτεϊνικών κινάσων (MAPK & CDPK), μέσω της επαγωγής της εισροής ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα και της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού, φαίνεται να είναι πρωτεύουσας σημασίας

κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (Sangwan et al., 2002). Επιπροσθέτως, η μεταγωγή σήματος μέσω των ROS και των HSPs, καθώς και η ενεργοποίηση συγκεκριμένων ορμονών, φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας (Sung et al., 2003). Ως εκ τούτου, σημαντικοί μηχανισμοί προσαρμογής και εγκλιματισμού, όπως είναι η επαγωγή του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, η συσσώρευση HSPs και ωσμολυτών, και η ρύθμιση των δευτερογενών μεταβολιτών, ενεργοποιούνται, οδηγώντας έτσι στην κυτταρική ομοιόσταση και την αποκατάσταση των κατεστραμμένων κυτταρικών δομών.

Μακροχρόνιες προσπάθειες βελτίωσης των φυτών μέσω πειραμάτων αναπαραγωγής, και πρόσφατα μέσω εκτεταμένων διαγονιδιακών προσεγγίσεων, έχουν σε μεγάλο βαθμό επικυρώσει ότι η ανθεκτικότητα στις υψηλές θερμοκρασίες είναι πολυγονιδιακό γνώρισμα (Howarth, 2005). Τα αποτελέσματα των διαγονιδιακών προσεγγίσεων περιορίζονται σε εργαστηριακές συνθήκες, αφού η προσέγγιση αυτή δεν έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικής καλλιέργειας στη θερμική καταπόνηση, με καλά αγρονομικά χαρακτηριστικά, υπό πραγματικές συνθήκες αγρού (Sung et al., 2003). Έτσι, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στον μετριασμό των αρνητικών επιπτώσεων της θερμικής καταπόνησης στα φυτά, μέσω της εξωγενούς εφαρμογής ορισμένων παραγόντων βιολογικής διέγερσης. Ερευνητικά αποτελέσματα των τελευταίων ετών αποκάλυψαν ότι η εξωγενής εφαρμογή μορίων σήματος, όπως είναι το Ca^{2+} (Wang et al., 2009, Wang et al., 2010δ, Tan et al., 2011), το ασκορβικό οξύ (Kumar et al., 2011), το ABA (Larkindale and Huang, 2005), το SA (Larkindale and Huang, 2005, Wang et al., 2010γ), το H_2O_2 και το NO (Uchida et al., 2002), είναι δυνατόν να επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Επιπλέον, η προ-μεταχείριση σπερμάτων με H_2O_2 αύξησε την ανθεκτικότητα των σποροφύτων σιταριού και αραβοσίτου έναντι των υψηλών θερμοκρασιών, κυρίως μέσω του μετριασμού της δευτερογενούς οξειδωτικής καταπόνησης και της έκφρασης πρωτεϊνών καταπόνησης (Wahid et al., 2007β, Wahid et al., 2008).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο προηγούμενο Κεφάλαιο, οι ενώσεις που εμπλέκονται στους μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού των φυτών και περιέχουν στο μόριο τους θείο (θειούχες ενώσεις άμυνας - Sulfur containing defense compounds, SDCs), είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των φυτών κατά την έκθεσή τους σε παράγοντες βιοτικής ή αβιοτικής καταπόνησης (Bloem et al., 2004, Bloem et al., 2005, Dubuis et al., 2005, Klikocka et al., 2005, Rausch and Wachter, 2005). Πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα έχουν αποκαλύψει τον κεντρικό ρόλο του H_2S στον συντονισμό και την

ενορχήστρωση της αντίδρασης των φυτών κατά την έκθεσή τους σε παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης (Zhang et al., 2008, Zhang et al., 2009β, Wang et al., 2010α, Zhang et al., 2010α, Zhang et al., 2010β,γ, Shan et al., 2011,), καθιστώντας το έτσι ως ένα εν δυνάμει σημαντικό αέριο μόριο σήματος στα φυτά, όπως συμβαίνει και στα θηλαστικά (Wang, 2002). Η επαγόμενη από το H₂S ανθεκτικότητα των φυτών έναντι διαφόρων παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης στις παραπάνω μελέτες, φαίνεται να οφείλεται στη μείωση της δευτερογενούς οξειδωτικής καταπόνησης, ως συνέπεια της αύξησης της δραστηριότητας των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων.

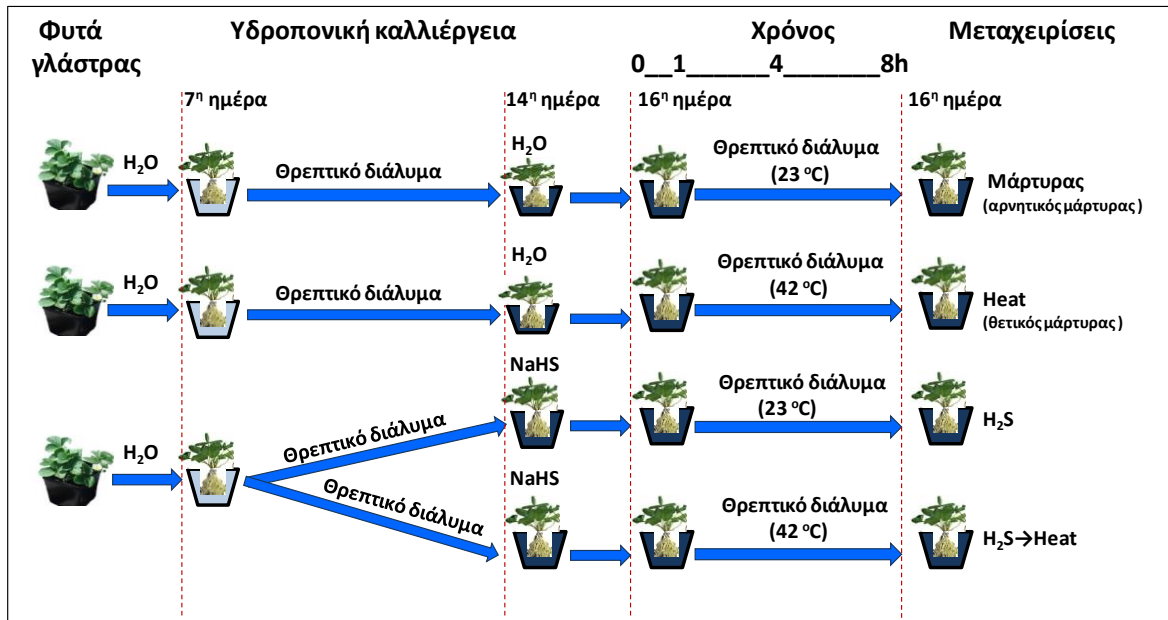
Στην παρούσα εργασία υποθέσαμε ότι το H₂S θα μπορούσε να επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών φράουλας κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών. Ως εκ τούτου, εξετάσαμε τα αποτελέσματα της παροδικής εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα μικρής συγκέντρωσης NaHS (100 μmol L⁻¹, 48 h), στις κυριότερες συνιστώσες των μηχανισμών προσαρμογής και εγκλιματισμού στα φύλλα των φυτών, κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (42°C, 8 h).

6.3. Υλικά και μέθοδοι

Για τη δοκιμασία της παραπάνω υπόθεσης πραγματοποιήθηκε υδροπονικό πείραμα γλάστρας με τη χρήση 48 φυτών φράουλας (ποικ. Camarosa). Αρχικά, φυτά ηλικίας 6 μηνών τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα τύρφης:περλίτη (3:1) σε θερμοκήπιο, μεταφέρθηκαν και καλλιεργήθηκαν υδροπονικά σε απιονισμένο νερό σε γλάστρες 15 L, σε θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16/8 ωρών (250 μmol m⁻² s⁻¹) και θερμοπερίοδο 23/20 °C, για 7 ημέρες. Έπειτα τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης για επιπλέον 7 ημέρες, μέχρι την έναρξη του πειράματος. Με την έναρξη του πειράματος, τα μισά φυτά προ-μεταχειρίστηκαν με την εμβάπτιση των ριζών τους σε απιονισμένο νερό για 48 h, ενώ τα υπόλοιπα φυτά προ-μεταχειρίστηκαν με την εμβάπτιση των ριζών τους σε απιονισμένο νερό που περιείχε 100 μmol L⁻¹ όξινο θειούχο νάτριο (NaHS – πρόδρομη ένωση του H₂S) (48 h, αλλαγή διαλύματος κάθε 12 h). Κατόπιν, όλα τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης για την άμεση έναρξη των μεταχειρίσεων. Το πείραμα περιελάμβανε 4 μεταχειρίσεις, ως εξής: **Μάρτυρας**: φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με H₂O και μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης σε θερμοκρασία 23 °C (αρνητικός μάρτυρας),

H₂S: φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με 100 μmol L⁻¹ NaHS και μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης σε θερμοκρασία 23 °C, **Heat**: φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με H₂O και μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης σε θερμοκρασία 42 °C (θετικός μάρτυρας), και **H₂S→Heat**: φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με 100 μmol L⁻¹ NaHS και μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland ημίσειας συγκέντρωσης σε θερμοκρασία 42 °C. Η διάρκεια παραμονής των φυτών στο θάλαμο ανάπτυξης, είτε σε κανονική θερμοκρασία (23 °C), είτε σε θερμοκρασία θερμικής καταπόνησης (42 °C), ήταν 8 h. Κάθε μεταχείριση επαναλήφθηκε 3 φορές και περιελάμβανε 4 φυτά. Η απεικόνιση των μεταχειρίσεων του εν λόγω πειράματος φαίνεται στο Διάγραμμα 21.

Δείγματα πλήρως εκπτυγμένων φύλλων λήφθηκαν αμέσως μετά την εμβάπτιση των ριζών των φυτών σε απιονισμένο νερό ή διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS (0 h), και μετά από 1, 4 και 8 h έκθεσης των φυτών είτε σε κανονική θερμοκρασία (23 °C), είτε σε θερμοκρασία θερμικής καταπόνησης (42 °C). Σε αυτά προσδιορίστηκε η μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα (F_v/F_m), ο βαθμός υπεροξειδωσής των μεμβρανικών λιπιδίων (Heath and Packer, 1968), καθώς επίσης και η φυλλική συγκέντρωση του H₂O₂ (Loreto and Velikova, 2001), του NO (Zhou et al., 2005) και του H₂S (Nashef et al., 1977). Επιπλέον, προσδιορίστηκε η φυλλική συγκέντρωση σε ασκορβικό (ASC) και δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA) (Foyer et al., 1983) και σε ανηγμένη (GSH) και οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) (Griffith, 1980), καθώς επίσης και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης. Τέλος, με τη χρήση της τεχνικής της qRT-PCR, έγινε ανάλυση της έκφρασης γονιδίων-στόχων στα φύλλα, που άμεσα εμπλέκονται στους μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού του φυτού, στην αποτοξίνωση των ROS, στην προστασία της δομής των μεμβρανών και των πρωτεϊνών, στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων και στη μεταγωγή σήματος. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GS), τη συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), την αφυδρογονάση της L-γαλακτόζης (GDH), την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), την καταλάση (CAT), την ασκορβική περοξειδάση (cAPX), τη σουπεροξειδική δισμουτάση του μαγγανίου (MnSOD), τη νιτρική αναγωγή (NR), τον σχετικό με την αφυδάτωση μεταγραφικό παράγοντα DREB καθώς και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης HSP70, HSP80 και HSP90 και την υδατοπορίνη (PIP aquaporin). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το δομικό γονίδιο *18S* (Bustamante et al., 2006).

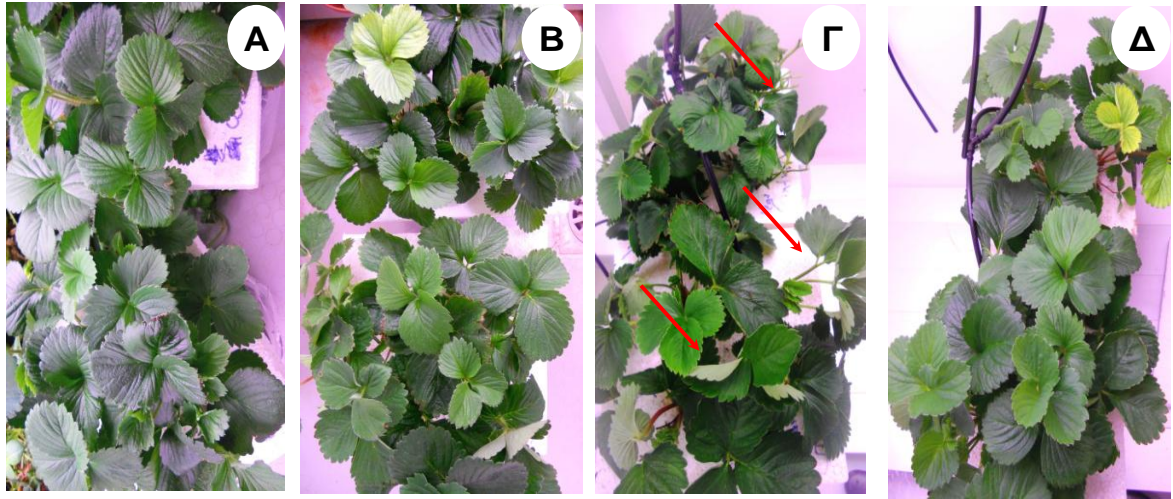


Διάγραμμα 21: Σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων του πειράματος

6.4. Αποτελέσματα

Η Εικόνα 7 παρουσιάζει τις επιπτώσεις της προ-μεταχείρισης φυτών φράουλας με την εμβάπτιση των ριζών τους είτε σε απιονισμένο νερό, είτε σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στον φαινότυπο των φυτών κατά την έκθεσή τους ή όχι, σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^\circ\text{C}$), για 8 h. Τα φυτά φράουλας που προ-μεταχειρίστηκαν με απιονισμένο νερό και καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε θερμοκρασία $42 \text{ }^\circ\text{C}$ για 8 h (Heat, θετικός μάρτυρας) παρουσίασαν συμπτώματα μάρανσης και καρουλιάσματος στα φύλλα (Εικ. 7Γ, κόκκινα βέλη). Αντίθετα, η προ-μεταχείριση των φυτών με $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NaHS πριν τη θερμική καταπόνησή τους, είχε ως αποτέλεσμα την εκμηδένιση των αρνητικών επιπτώσεων της θερμικής καταπόνησης στον φαινότυπο των φυτών, αφού αυτά διατήρησαν τη σπαργή και τη δομή των φύλλων τους (Εικ. 7Δ), σε επίπεδα όμοια με του αρνητικού μάρτυρα (Μάρτυρας) (Εικ. 7Α). Επιπλέον, τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και δεν καταπονήθηκαν παρουσίασαν φαινότυπο όμοιο με του αρνητικού μάρτυρα, καταδεικνύοντας τη προστατευτική, μη τοξική δράση του NaHS, στη δόση που εφαρμόστηκε (Εικ. 7Β).

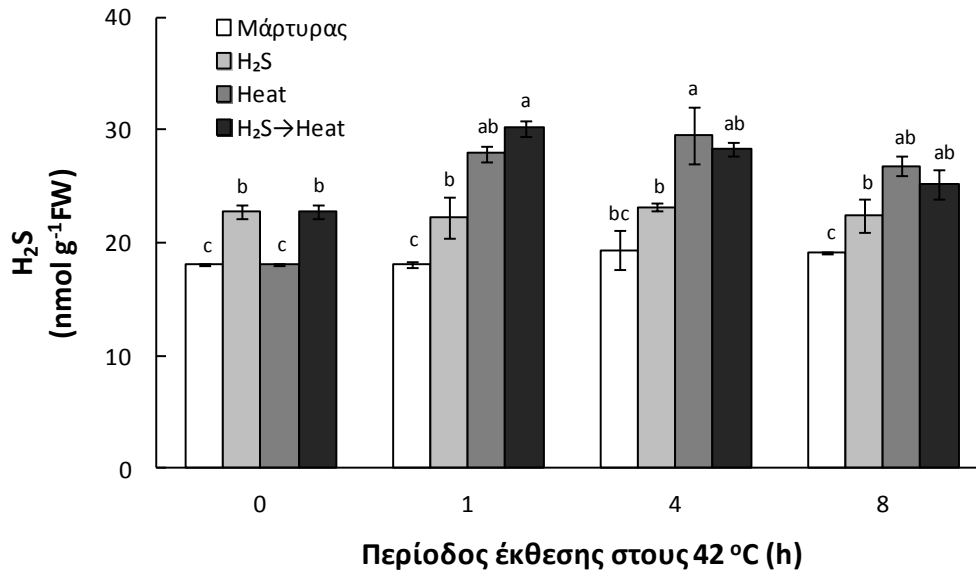
Όπως και στο πείραμα που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5, προσδιορίσαμε τη φυλλική συγκέντρωση του H₂S με στόχο να επικυρώσουμε τη δράση του NaHS ως πρόδρομης ένωσης του H₂S. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τον ρόλο του NaHS ως μορίου δωρητή



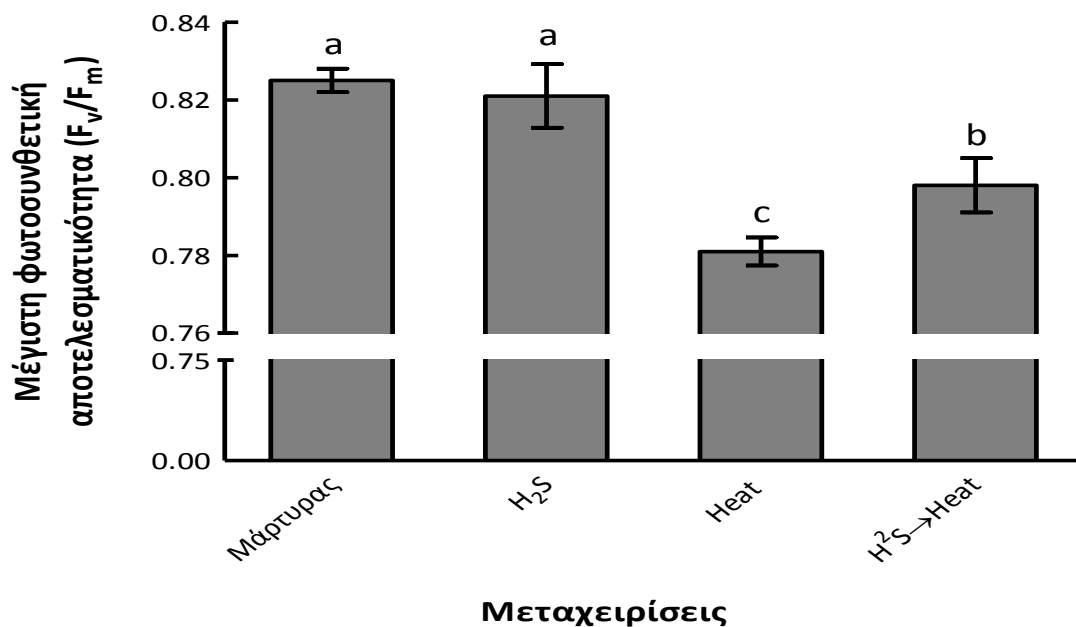
Εικόνα 7: Επιδράσεις της εμφάνισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στο υπέργειο μέρος των φυτών μετά από 8 h έκθεσής τους είτε σε κανονική θερμοκρασία ($23 \text{ }^{\circ}\text{C}$), είτε σε θερμοκρασία θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^{\circ}\text{C}$) [(A) Μάρτυρας (αρνητικός μάρτυρας), (B) H_2S , (Γ) Heat (θετικός μάρτυρας), (Δ) $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{Heat}$].

του H_2S . Η εμφάνιση των ριζών των φυτών σε διάλυμα $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NaHS είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της φυλλικής συγκέντρωσης του H_2S κατά 25% περίπου. Η θερμική καταπόνηση είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση της φυλλικής συγκέντρωσης του H_2S . Συγκεκριμένα, η αύξηση της φυλλικής συγκέντρωσης του H_2S έφτασε το 55% μετά από 1 h έκθεσης των φυτών του θετικού μάρτυρα στους $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ σταδιακά μειωνόταν για να φτάσει στο 40% μετά από 8 h έκθεσης των φυτών στους $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Η φυλλική συγκέντρωση του H_2S στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS πριν τη θερμική καταπόνησή τους είχε ίδια τάση με αυτή στα φυτά του θετικού μάρτυρα, με τη διάφορα ότι η αύξησή της κατά την 1^η h της θερμικής καταπόνησης ήταν μεγαλύτερη (66%, Διάγραμμα 22).

Οι αρνητικές επιπτώσεις της θερμικής καταπόνησης στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό των φυτών φράουλας ήταν σημαντικές. Αυτό αποδεικνύεται από τη μείωση κατά 8,4% στον λόγο F_v/F_m στα φύλλα των φυτών που υποβλήθηκαν σε θερμική καταπόνηση για 8 h, σε σύγκριση με τα φυτά του αρνητικού μάρτυρα. Αντίθετα, η προ-μεταχείριση με NaHS πριν από την έκθεση των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης είχε ως συνέπεια τη διατήρηση της κβαντικής απόδοσης του φωτοσυστήματος II σε υψηλότερα επίπεδα (3,2% μείωση), σε σύγκριση με τα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς προ-μεταχείριση (Διάγραμμα 23).

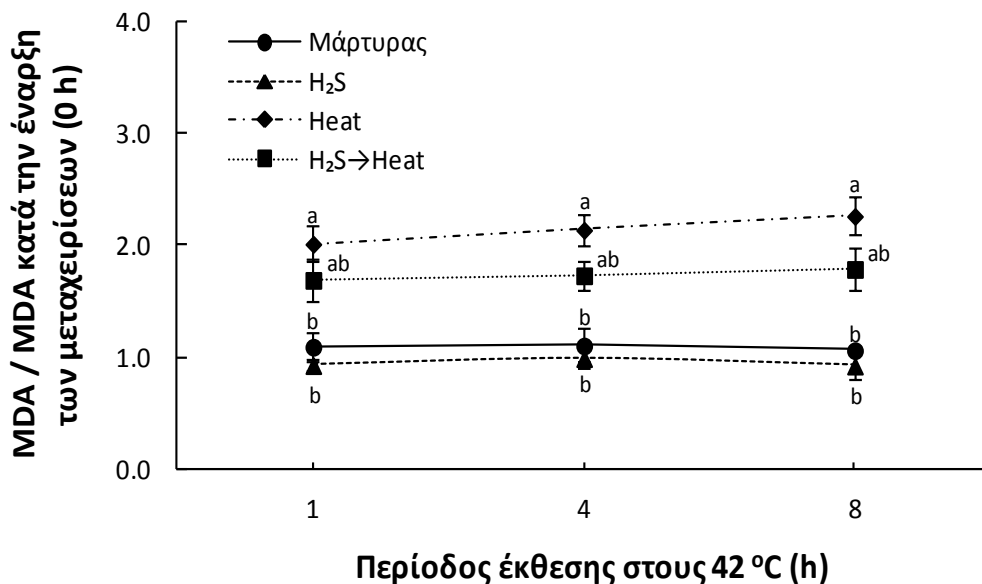


Διάγραμμα 22: Επιδράσεις της εμφάνισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στη φυλλική συγκέντρωση H_2S , κατά τη διάρκεια έκθεσης ή όχι των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^\circ\text{C}$). Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm το τυπικό σφάλμα ($n=3$). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).



Διάγραμμα 23: Επιδράσεις της εμφάνισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στη μέγιστη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα των φύλλων, μετά από 8 h έκθεσης ή όχι των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^\circ\text{C}$). Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=9$). Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

Ο βαθμός υπεροξειδωσης των μεμβρανικών λιπιδίων στα φύλλα των φυτών φράουλας κατά τη διάρκεια του πειράματος παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 24. Η θερμική καταπόνηση είχε ως συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης της MDA στα φύλλα. Η αύξηση ήταν άμεση, αφού το περιεχόμενο της MDA στα φύλλα είχε σχεδόν διπλασιαστεί σε σχέση με το αρχικό από την 1^η h έκθεσης των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (αύξηση x1,9 φορές), και κυμάνθηκε στα επίπεδα αυτά καθ' όλη τη διάρκειά της (~x2,1 φορές αύξηση κατά την 8^η h έκθεσης στους 42 °C). Η μεταχείριση των φυτών με NaHS πριν την καταπόνησή τους είχε ως αποτέλεσμα τη συγκράτηση του βαθμού υπεροξειδωσης των μεμβρανικών τους λιπιδίων, αφού η αύξηση της συγκέντρωσης MDA στα φύλλα των φυτών αυτών ήταν μικρότερη, σε σύγκριση με αυτή που παρατηρήθηκε στα φυτά του θετικού μάρτυρα (~ x1,7 φορές αύξηση σε σχέση με την αρχική μετά από 8 h έκθεσης των προ-μεταχειρισμένων φυτών στους 42 °C). Τέλος, το NaHS δεν προκάλεσε οποιαδήποτε ζημιά στη διπλοστοιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών στη δόση που εφαρμόστηκε, αφού δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στη συγκέντρωση της MDA σε σχέση με αυτή στα φυτά του αρνητικού μάρτυρα (Διάγραμμα 24).

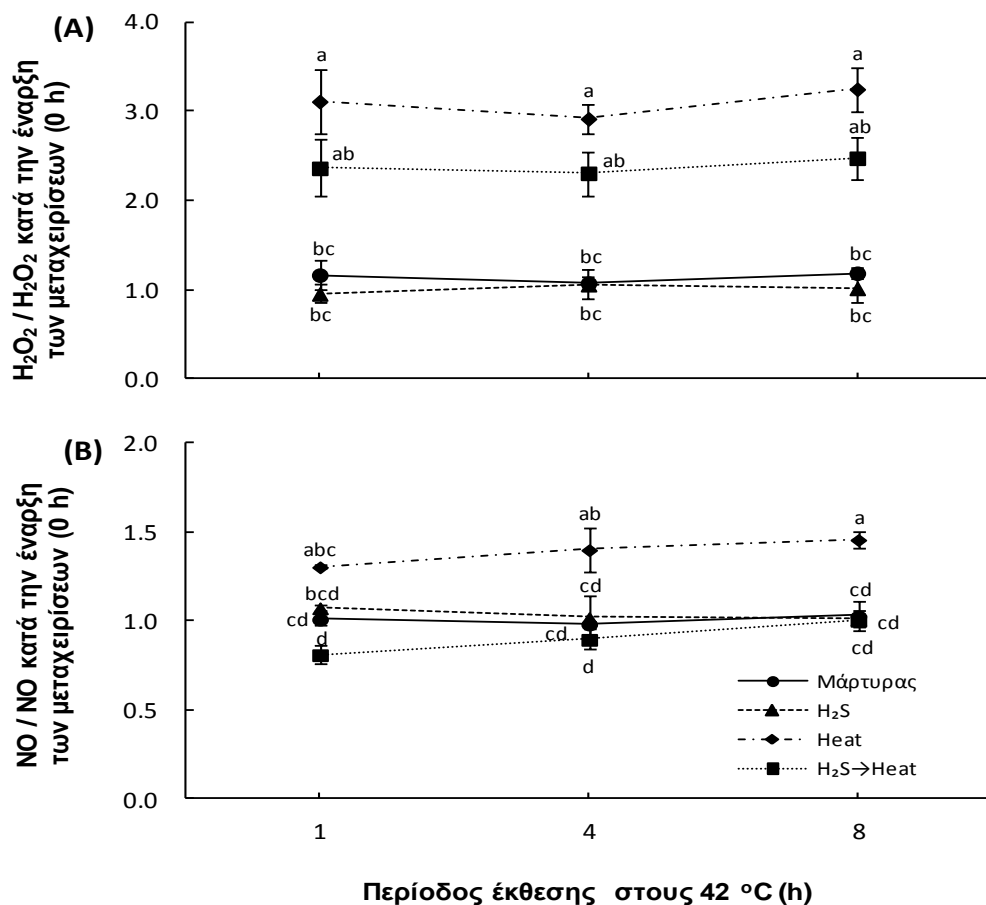


Διάγραμμα 24: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), στη φυλλική συγκέντρωση MDA κατά τη διάρκεια έκθεσης ή όχι των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (42 °C), σε σχέση με τη συγκέντρωση κατά την έναρξη των μεταχειρίσεων (0 h). Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα (n=3). Αποτελέσματα που σημαίνονται με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

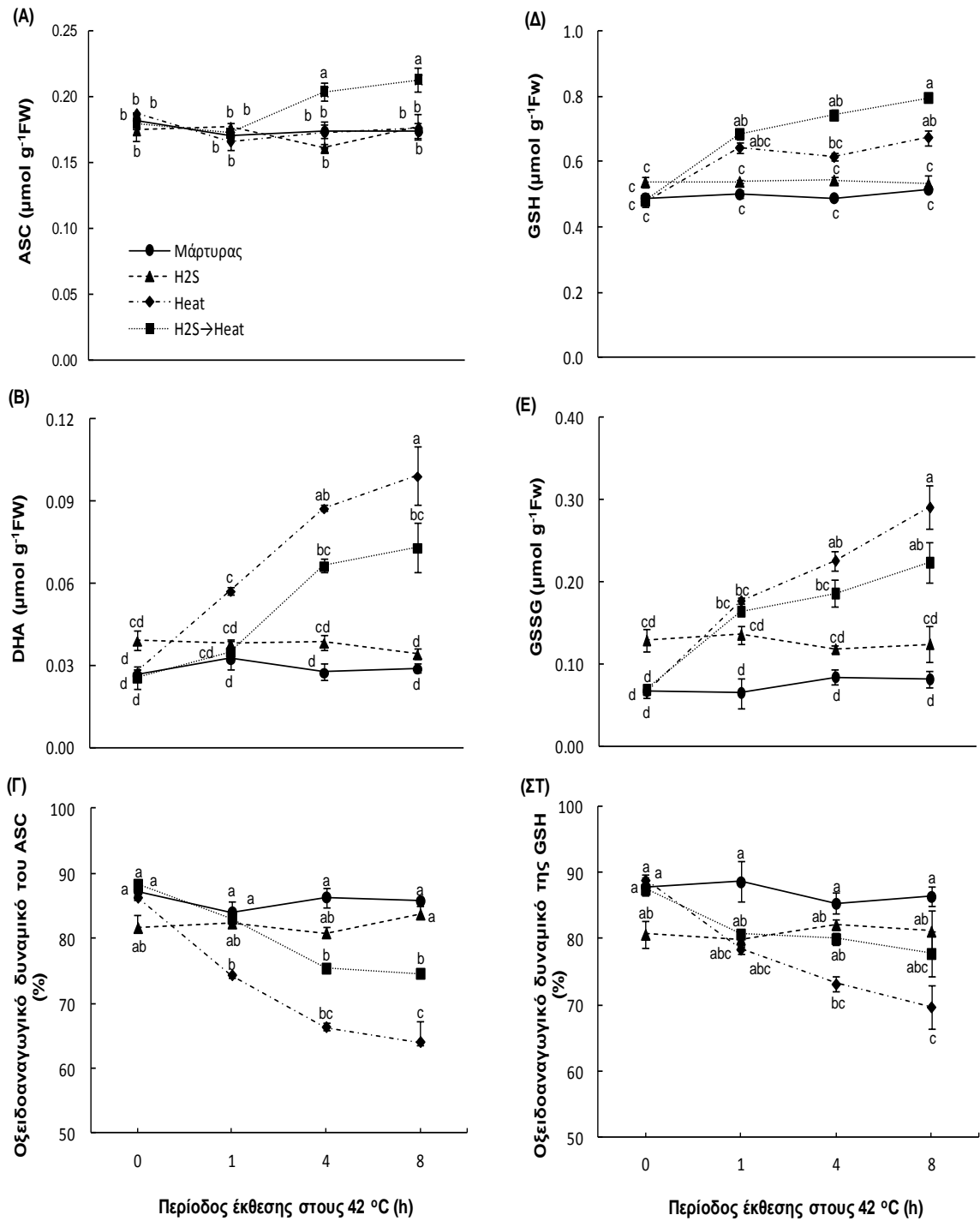
Η παρατεταμένη έκθεση των φυτών στους 42 °C είχε ως αποτέλεσμα την προοδευτική αύξηση της συγκέντρωσης τόσο του H₂O₂, όσο και του NO στα φύλλα (Διάγραμμα 25). Το γεγονός αυτό είναι σε συμφωνία με τη δευτερογενή οξειδωτική και νιτροδωτική καταπόνηση των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Συγκεκριμένα, στα φυτά του θετικού μάρτυρα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης τόσο του H₂O₂, όσο και του NO (x2,9 και x1,8 φορές αύξηση σε σχέση με την αρχική, αντίστοιχα, μετά από 8 h έκθεσης των φυτών στους 42 °C). Η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS πριν τη θερμική καταπόνησή τους, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού βιοσυσσώρευσης του H₂O₂ στα φύλλα (x2 φορές αύξηση μετά από 8 h στους 42 °C, Διάγραμμα 25A). Επιπλέον, η περιεκτικότητα των φύλλων σε NO στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS πριν την καταπόνησή τους ήταν όμοια με εκείνη στα φυτά του αρνητικού μάρτυρα (Διάγραμμα 25B).

Η έκθεση των φυτών του θετικού μάρτυρα σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ολικής συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, κατά 35 και 62%, αντίστοιχα (Διάγραμμα 26). Η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS πριν τη μετέπειτα έκθεσή τους στους 42 °C, οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης των δυο αντιοξειδωτικών ενώσεων (41 και 71% αύξηση, αντίστοιχα). Η παρατηρούμενη αύξηση στη συγκέντρωση των δυο αντιοξειδωτικών ενώσεων μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση τόσο των ανηγμένων, όσο και των οξειδωμένων μορφών τους. Συγκεκριμένα, η θερμική καταπόνηση δεν προκάλεσε σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση του ανηγμένου ασκορβικού οξέος (ASC), ενώ αντιθέτως η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) αυξήθηκε κατά 31%. Η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS πριν την καταπόνησή τους, οδήγησε στη σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του ASC (23%) και σε ακόμα μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης της GSH (55%) (Διάγραμμα 26A, Δ). Από την άλλη μεριά, οι οξειδωμένες μορφές του ασκορβικού οξέος (DHA) και της γλουταθειόνης (GSSG) στα φυτά του θετικού μάρτυρα προσδιορίζονταν σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες μετά από 8 h έκθεσης των φυτών στους 42 °C (x2,4 και x2,6 φορές αύξηση, αντίστοιχα), σε σύγκριση με αυτές του αρνητικού μάρτυρα. Αντιθέτως, η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS πριν την καταπόνησή τους είχε ως αποτέλεσμα τη συγκράτηση της παρατηρούμενης αύξησης στη συγκέντρωση τόσο του DHA, όσο και του GSSG (x1,5 και x1,7 φορές αύξηση, αντίστοιχα, Διάγραμμα 26B, E). Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να συνοψιστούν με βάση το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης. Η προ-

μεταχείριση των φυτών φράουλας με NaHS είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού τόσο του ασκορβικού οξέος, όσο και της γλουταθειόνης, σε υψηλότερα επίπεδα (14 και 10% μείωση σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα), σε σύγκριση με τα φυτά που καταπονήθηκαν χωρίς προ-μεταχείριση (26 και 20% μείωση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 26Γ, ΣΤ). Επιπλέον, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και δεν καταπονήθηκαν διατηρήθηκε στα επίπεδα του αρνητικού μάρτυρα.



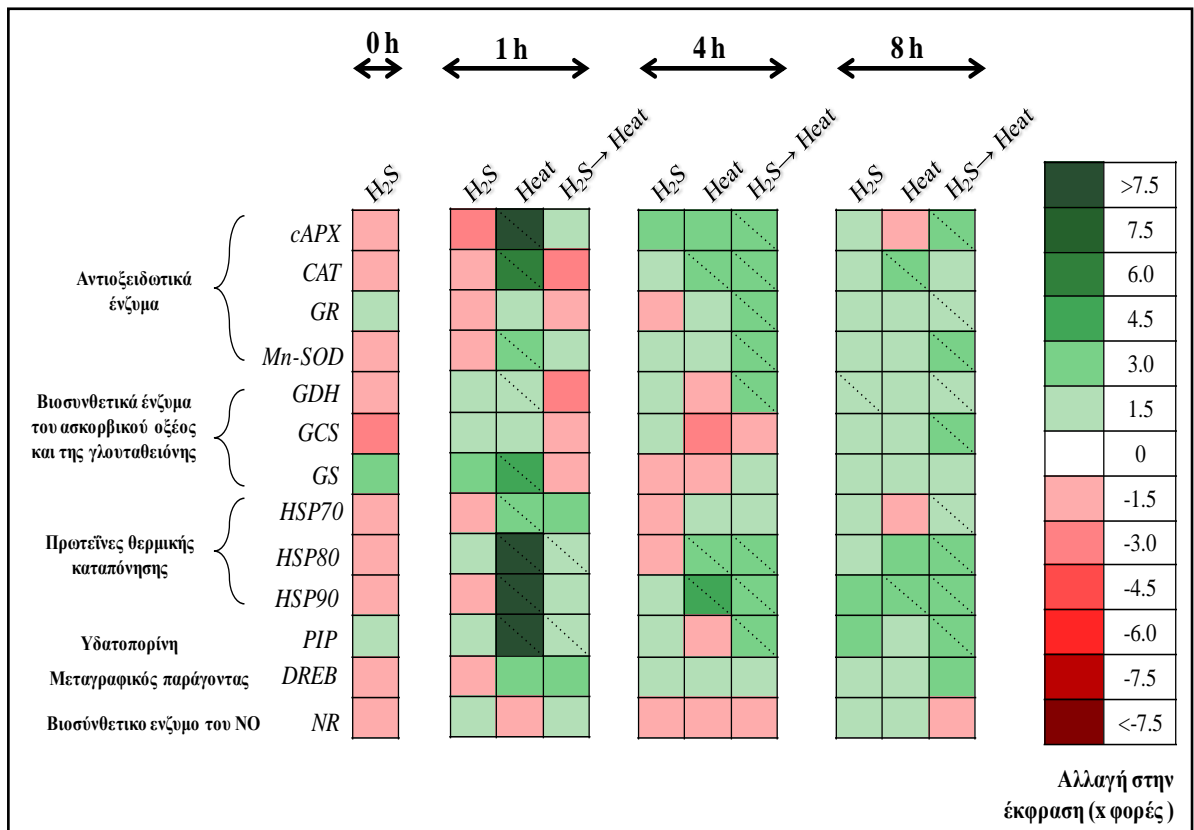
Διάγραμμα 25: Επιδράσεις της εμφάνισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS (100 μmol L⁻¹), στη φυλλική συγκέντρωση H₂O₂ (A) και NO (B), κατά τη διάρκεια έκθεσης ή όχι των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (42 °C), σε σχέση με τη συγκέντρωση κατά την έναρξη των μεταχειρίσεων (0 h). Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (n=3). Αποτελέσματα που σημαίνονται με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (*P* < 0,05).



Διάγραμμα 26: Επιδράσεις της εμβάπτισης των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), στη φυλλική συγκέντρωση και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, κατά τη διάρκεια έκθεσης ή όχι των φυτών φράουλας σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης ($42 \text{ }^\circ\text{C}$). [ASC (A), DHA (B), οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος % (Γ), GSH (Δ), GSSG (E) και οξειδοαναγωγικό δυναμικό της γλουταθειόνης % (ΣΤ)]. Τα δεδομένα είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($n=3$). Αποτελέσματα που σημαίνονται με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

Το Διάγραμμα 27 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των δοκιμών qRT-PCR που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την αξιολόγηση της γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται είτε στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό και στη ρύθμιση του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, είτε στη μεταγωγή σήματος, είτε στη διατήρηση της δομής και σταθερότητας των πρωτεϊνών, ως συνέπεια της προ-μεταχείρισης των φυτών με NaHS και της μετέπειτα έκθεσής τους ή όχι σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Γενικά, η προ-μεταχείριση των φυτών φράουλας με NaHS και η επακόλουθη θερμική καταπόνησή τους είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική επαγωγή της έκφρασης όλων των γονιδίων που εξετάστηκαν, με μοναδική εξαίρεση αυτή της νιτρικής αναγωγάσης (NR), υποδηλώνοντας ότι το H₂S διαδραματίζει βασικό ρόλο στη συντονισμένη ρύθμιση πολλαπλών μονοπατιών μεταγραφικής ρύθμισης κατά την έκθεση των φυτών φράουλας σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα [ασκορβική περοξειδάση (cAPX), καταλάση (CAT), σουπεροξειδική δισμουτάση του μαγγανίου (MnSOD), αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)], βιοσυνθετικά ένζυμα του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης [συνθετάση της γλουταθειόνης (GS), συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), αφυδρογονάση της L-γαλακτόζης (GDH)], το ένζυμο NR για τη βιοσύνθεση του NO, τον σχετικό με την αφυδάτωση μεταγραφικό παράγοντα (DREB), καθώς και τις πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης HSP70, HSP80 και HSP90 και την υδατοπορίνη (PIP).

Οι κυριότερες τάσεις γονιδιακής έκφρασης που αποκαλύφθηκαν διαμέσου των δοκιμών qRT-PCR ήταν τα γενικά χαμηλά επίπεδα μεταγραφικής ρύθμισης (κυρίως έως 1,5 φορές επαγωγή ή καταστολή) των γονιδίων που εξετάστηκαν στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS και δεν καταπονήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, σε σύγκριση με τα δείγματα του αρνητικού μάρτυρα (Διάγραμμα 27). Ωστόσο, η εξέταση της γονιδιακής έκφρασης στα φυτά του θετικού μάρτυρα αποκάλυψε τη σημαντική πρόωμη επαγωγή των περισσότερων γονιδίων που εξετάστηκαν (με εξαίρεση τα γονίδια που κωδικοποιούν την GR, τη NR, την GCS και τον DREB), η οποία αποκλιμακωνόταν σταδιακά μετά από την παρατεταμένη έκθεση των φυτών στους 42 °C, φτάνοντας τελικά μετά από 8 h έκθεσης των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης σε επίπεδα γονιδιακής έκφρασης όμοια με αυτά του αρνητικού μάρτυρα (με εξαίρεση τη σημαντική επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης της CAT και της HSP90 κατά 1,8 και 1,6 φορές, αντίστοιχα, μετά από 8 h έκθεσης στους 42 °C). Αξιοσημείωτα, η θερμική καταπόνηση προκάλεσε την πρόωμη συσσώρευση υψηλών ποσοτήτων μετάγραφων της cAPX, της PIP,



Διάγραμμα 27: Θερμικός χάρτης που καταδεικνύει το χρονικό πρότυπο έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με ορισμένες ενζυμικές αντιοξειδωτικές ενώσεις, τη βιοσύνθεση RNS, την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, τη μεταγωγή σήματος, τη διατήρηση της δομής και σταθερότητας των πρωτεϊνών και τη ρύθμιση της μεταφοράς νερού, στα φύλλα των φυτών φράουλας που προ-μεταχειρίστηκαν με την εμφύσηση των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), και καταπονήθηκαν ή όχι με την έκθεσή τους σε θερμοκρασία θερμικής καταπόνησης (42°C), για 8 h. Η δειγματοληψία των ιστών έγινε αμέσως μετά την προ-μεταχείριση των φυτών με H_2S (0 h) και 1, 4 και 8 h μετά την προ-μεταχείρισή τους. Η σχετική έκφραση/αφθονία του mRNA εκτιμήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (real-time RT-PCR) χρησιμοποιώντας τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης καταδεικνύεται με πράσινο χρώμα, ενώ η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης με κόκκινο χρώμα. Οι διαγώνιες διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

της HSP80 και της HSP90, αφού παρατηρήθηκε επαγωγή στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων κατά 11,5, 9,2, 62,1 και 58,5 φορές, αντίστοιχα, μόλις 1 h μετά την έκθεση των φυτών του θετικού μάρτυρα σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι η επίδραση της προ-μεταχείρισης των ριζών με NaHS στην ανθεκτικότητα των φυτών στη θερμική καταπόνηση γινόταν σαφής μόνο μετά την πάροδο

4 h από την έκθεση των φυτών στους 42 °C, όπου καταγραφόταν μια σημαντική επαγωγή στη γονιδιακή έκφραση της πλειονότητας των γονιδίων που εξετάστηκαν. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της προ-μεταχείρισης των φυτών με NaHS ήταν εντονότερα μετά την παρατεταμένη έκθεση των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (8 h). Συγκεκριμένα, τα μετάγραφα mRNAs όλων των γονιδίων που εξεταστήκαν (εκτός από τα μετάγραφα που κωδικοποιούν την CAT, τη NR, την GS και την HSP90) ανιχνεύονταν σε υψηλότερα επίπεδα στα προ-μεταχειρισμένα με NaHS φυτά που εκτέθηκαν για 8 h στους 42 °C, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα στα φυτά του θετικού μάρτυρα, τονίζοντας τη σημασία των μηχανισμών προσαρμογής και εγκλιματισμού που εξετάστηκαν, έναντι της θερμικής καταπόνησης, και τη δυνητική σημασία της ρύθμισής τους από το H₂S (Διάγραμμα 27).

6.5. Συζήτηση

Η θερμική καταπόνηση επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα μεταβολικών λειτουργιών και δομών στα φυτικά κύτταρα, προκαλώντας συχνά ανεπανόρθωτες βλάβες στην ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών. Κατά συνέπεια, οι επιστήμονες κατά την τελευταία δεκαετία κάνουν συνεχείς προσπάθειες για την κατανόηση της συμπεριφοράς των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης, με στόχο τη βελτίωση της θερμοανθεκτικότητάς τους. Παρόλα αυτά, τα παραδείγματα θερμοανθεκτικών φυτών, ως αποτέλεσμα εκτεταμένων προσπαθειών είτε μέσω της παραδοσιακής τεχνικής του πολλαπλασιασμού, είτε μέσω της διαγονιδιακής προσέγγισης και της βιοτεχνολογίας, είναι ελάχιστα, και συνήθως περιορίζονται σε εργαστηριακές συνθήκες (Sung et al., 2003). Στην παρούσα μελέτη, μια σειρά από φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές προσεγγίσεις αποκάλυψαν ότι η προ-μεταχείριση των φυτών φράουλας με NaHS, μιας πρόδρομης ένωσης του H₂S, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοανθεκτικότητας των φυτών. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερης σημασίας, αφού έχει αποδεδειχθεί ότι η καλλιέργεια της φράουλας επηρεάζεται δυσμενώς όταν τα φυτά εκτίθενται σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών (Nishiyama et al., 2003, Kadir et al., 2006). Επιπλέον, τα αποτελέσματα παρέχουν περαιτέρω στήριξη στην άποψη ότι το H₂S αποτελεί μια ενεργή βιολογική ένωση στα φυτά, με συμμετοχή στη μεταγωγή σήματος και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων.

Το PSII είναι ιδιαίτερα θερμοευαίσθητο. Κατά συνέπεια, η δραστηριότητά του μειώνεται σε πολύ μεγάλο βαθμό ή και εν μέρει σταμάτα κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών (Wahid et al., 2007α, Rowland et al., 2010). Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με εκείνα του Camejo και των συνεργατών του (2005), όπως επίσης και του Tan και των συνεργατών του (2011), οι οποίοι αναφέρουν ότι η μέγιστη απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας της φωτοσύνθεσης (F_v/F_m) στα φύλλα τομάτας και καπνού, αντίστοιχα, μειώθηκε σημαντικά κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Στο δικό μας πείραμα, η εξωγενής εφαρμογή NaHS φαίνεται να αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο για τον μετριασμό των αρνητικών συνεπειών της θερμικής καταπόνησης στην απόδοση του PSII, όπως προκύπτει από την υψηλότερη αναλογία F_v/F_m στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS πριν την καταπόνησή τους, σε σχέση με τα φυτά του θετικού μάρτυρα.

Προκειμένου να επικυρωθεί ο ρόλος της εμβάπτισης των ριζών σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaHS στον μετριασμό της δευτερογενούς οξειδωτικής καταπόνησης, ποσοτικοποιήσαμε τον βαθμό υπεροξειδωσίας των μεμβρανικών λιπιδίων και τη φυλλική συγκέντρωση του H_2O_2 . Με ενδιαφέρον παρατηρήσαμε ότι η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS συγκράτησε σε μεγάλο βαθμό την αύξηση της συγκέντρωσης της MDA και του H_2O_2 στα φύλλα των φυτών φράουλας, όταν αυτά εκτέθηκαν στους 42 °C, σε σύγκριση με αυτά του θετικού μάρτυρα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η οξειδωτική βλάβη στις μεμβράνες και σε άλλες δομές των κυττάρων, μετριάστηκε μετά την προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS. Τα ευρήματά μας παρέχουν περαιτέρω στήριξη στα προηγούμενα αποτελέσματα του Zhang και των συνεργατών του, οι οποίοι αναφέρουν ότι η προ-μεταχείριση φυτών σόγιας, σιταριού και γλυκοπατάτας με NaHS οδήγησε σε χαμηλότερη περιεκτικότητα τόσο της MDA, όσο και του H_2O_2 στα καταπονημένα φυτά, σε σύγκριση με αυτά των θετικών μαρτύρων (Zhang et al., 2009β, Zhang et al., 2010β, Zhang et al., 2010γ). Ωστόσο, η πρόωμη παραγωγή και βιοσυσσώρευση του H_2O_2 στα φυτά του θετικού μάρτυρα ίσως να καταδεικνύει τον πιθανό ρόλο του H_2O_2 στην αξιοσημείωτη πρόωγη επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικής καταπόνησης, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε σχετικές έρευνες (Volkov et al., 2006, Banti et al., 2010). Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας ενισχύονται και από την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων (cAPX, CAT, MnSOD και GR), αφού η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα αυτά παρουσίασε σημαντική επαγωγή στα προ-μεταχειρισμένα φυτά, σε σύγκριση με τα φυτά του θετικού μάρτυρα, μετά από την

παρατεταμένη έκθεση των φυτών στους 42 °C (περισσότερες από 4 h). Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης που παρατηρήθηκαν στη δική μας εργασία βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες ενζυμικές δοκιμές αντιοξειδωτικών ενώσεων, οι οποίες καθιστούν σαφές ότι η αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της SOD, της CAT και της APX, αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό της επαγόμενης από το NaHS ανθεκτικότητας σε φυτά μηδικής και σόγιας που καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης καδμίου (Li et al., 2012α) και ξηρασίας (Zhang et al., 2010β), αντίστοιχα, καθώς επίσης και προ-μεταχειρισμένων με NaHS σπερμάτων μηδικής που αφέθηκαν να βλαστήσουν σε υπόστρωμα αυξημένης αλατότητας (Wang et al., 2012).

Πέραν των ROS, κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων υπερ-παράγονται και βιοσυσσωρεύονται στα κύτταρα RNS, όπως είναι το NO και άλλα παράγωγά του, προκαλώντας δευτερογενή νιτροδοτική καταπόνηση (Corpas et al., 2007α, Corpas et al., 2007β, Valderrama et al., 2007, Filippou et al., 2011). Ωστόσο, έχει επίσης αποδειχθεί ότι πέραν της νιτροδοτικής καταπόνησης, το NO είναι δυνατόν να ενεργεί παράλληλα με άλλα μόρια σήματος για τη ρύθμιση πολλών βιολογικών διεργασιών στα φυτά, συμπεριλαμβανομένης και της αντίδρασής τους κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (Capone et al., 2004, Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007, Nasibi and Kalantari, 2009, Molassiotis and Fotopoulos, 2011, Tanou et al., 2012α). Στην παρούσα εργασία, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του NO στα προ-μεταχειρισμένα με NaHS φυτά που καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους στους 42 °C για 8 h διατηρήθηκε σε επίπεδα όμοια με αυτά του αρνητικού μάρτυρα. Η διατήρηση της γονιδιακής έκφρασης της NR στα φυτά αυτά σε επίπεδα όμοια με αυτά του αρνητικού μάρτυρα, ενισχύει τα ευρήματα των βιοχημικών δοκιμών για τη ποσοτικοποίηση του NO. Αντίθετα, τα φυτά φράουλας που καταπονήθηκαν χωρίς προ-μεταχείριση παρουσίασαν σημαντική αύξηση στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση NO, παρόλο που τα μετάγραφα NR ποσοτικοποιήθηκαν στα ίδια επίπεδα με αυτά του αρνητικού μάρτυρα. Ωστόσο, η πρόωμη αύξηση της συγκέντρωσης του NO στα φυτά του θετικού μάρτυρα ίσως να παρέχει το απαραίτητο σήμα για την πρόωμη υψηλή συσσώρευση των *HSPs* μετάγραφων που παρατηρήθηκαν στα φυτά αυτά, όπως προτείνεται από την Xuan και τους συνεργάτες της (2010), οι οποίοι αναφέρουν ότι το NO δρα για τη μεταγωγή σήματος και τη συσσώρευση μεταγραφικών παραγόντων υπεύθυνων για τη μεταγραφή και βιοσυσσώρευση των *HSPs*. Η παρατηρούμενη αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση του NO και τη γονιδιακή έκφραση της NR θα μπορούσε να αποδοθεί στην αναδραστική αναστολή της γονιδιακής

έκφρασης της NR, σύμφωνα με τα ευρήματα της Rosales και των συνεργατών της (2011), ενδεχομένως λόγω της τοξικότητας του NO (Shapiro, 2005).

Εκτός από τη συμμετοχή τους σε διάφορες οξειδωτικές διαδικασίες που μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβη διάφορες κυτταρικές δομές, οι ROS συμβάλλουν ενεργά στη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του κυττάρου και κατ' επέκταση στην ανίχνευση, τον πολλαπλασιασμό και τη μεταγωγή του σήματος διαφόρων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (Fotopoulos et al., 2010, Gill and Tuteja, 2010). Το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη αποτελούν επίσης σημαντικά μόρια με ενεργό ρυθμιστικό ρόλο όσον αφορά στο κυτταρικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό και τη μεταγωγή σήματος στα φυτά υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (Noctor, 2006, Shao et al., 2008, Potters et al., 2010). Στην παρούσα μελέτη, αποδείχθηκε ότι η εμφάνιση των ριζών φυτών φράουλας σε διάλυμα $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NaHS πριν από την έκθεση των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης, συνέβαλε ουσιαστικά στη διατήρηση υψηλότερων λόγων στις σχέσεις ASC/DHA και GSH/GSSG, σε σύγκριση με τους λόγους στα φυτά του θετικού μάρτυρα. Αυτό αποδεικνύεται από τα υψηλότερα ποσοστά του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης στα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS πριν την καταπόνησή τους, σε σχέση με τα φυτά του θετικού μάρτυρα. Όπως αναμενόταν, η θερμική καταπόνηση οδήγησε στην προοδευτική αύξηση της συγκέντρωσης του ASC, της GSSG, καθώς επίσης και του DHA. Ωστόσο, η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS πριν από τη θερμική καταπόνησή τους οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του ASC, όπως επίσης και της GSH, και σε ταυτόχρονη μείωση των οξειδωμένων τους μορφών, αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη επαγωγή στη γονιδιακή έκφραση της cAPX, της GDH, της GCS και της GR, όπως αποδείχθηκε από τις δοκιμές qRT-PCR, ενισχύει τα αποτελέσματα των ποσοτικών δοκιμών του ASC και της GSH, αφού τα παραπάνω ένζυμα συμμετέχουν ενεργά στη βιοσύνθεση και τη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, τόσο του ασκορβικού οξέος, όσο και της γλουταθειόνης. Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με εκείνα του Shan και των συνεργατών του (2011, 2012), οι οποίοι αναφέρουν ότι η προ-μεταχείριση σποροφύτων σιταριού με NaHS πριν την καταπόνησή τους με την έκθεσή τους σε διάλυμα αυξημένης συγκέντρωσης PEG-6000 και χαλκού, οδήγησε στην αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων (APX, GR, DHAR), καθώς και των βιοσυνθετικών του ασκορβικού οξέος (GalLDH) και της γλουταθειόνης (GCS) ενζύμων, έχοντας ως αποτέλεσμα της αύξησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ASC, του GSH,

του ολικού ασκορβικού οξέος και της ολικής γλουταθειόνης, σε σύγκριση με τα φυτά του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα. Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των παραπάνω αποτελεσμάτων, θα μπορούσε κανείς να συμπεράνει ότι η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS πριν την καταπόνησή τους, προκαλεί τέτοιες αλλαγές στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, και κατ' επέκταση στο κυτταρικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό, οι οποίες με τη σειρά τους διαμορφώνουν τη γονιδιακή έκφραση με τρόπο τέτοιο που να οδηγεί στην αύξηση της ανθεκτικότητας και τον εγκλιματισμό των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης.

Οι διάφορες αλλαγές στη γενοτυπική έκφραση που είναι δυνατόν να έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη σύνθεση των HSPs, αποτελούν ίσως τη σημαντικότερη πρώιμη αντίδραση εγκλιματισμού στα κύτταρα που έχουν υποστεί κάθε είδους καταπόνηση (Feder and Hofmann, 1999, Wang et al., 2004). Οι πρωτεΐνες αυτές, των οποίων το M.B. κυμαίνεται περίπου από 10 έως 200 kDa, έχουν βρεθεί να βιοσυσσωρεύονται σε σημαντικές ποσότητες σε διάφορες κυτταρικές δομές, όπως το κυτταρικό τοίχωμα, οι χλωροπλάστες, τα ριβοσώματα και τα μιτοχόνδρια, κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (Schöffl et al., 1999, Yang et al., 2006). Ο ρόλος των HSPs στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης κατά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης εστιάζεται κυρίως στη σωστή αναδίπλωση και διάπλαση των συσσωρευμένων πρωτεϊνών που έχουν απολέσει την τρισδιάστατη λειτουργική τους δομή, την πρόληψη της βιοσυσσώρευσης και την πρωτεολυτική αποδόμηση των παραπάνω πρωτεϊνών, καθώς και στην ενεργή συμμετοχή τους στη μεταγωγή σήματος (Kotak et al., 2007, Rampino et al., 2009, Gupta et al., 2010). Στην παρούσα εργασία, προκύπτει ότι οι HSPs βιοσυσσωρεύονται άμεσα σε σημαντικές ποσότητες στα κύτταρα, αφού η HSP70, η HSP80 και η HSP90 παρουσίασαν επαγωγή στη γονιδιακή τους έκφραση κατά 1,7, 62,1 και 58,5 φορές, αντίστοιχα, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, μόλις κατά την 1^η h έκθεσης των φυτών του θετικού μάρτυρα στους 42 °C. Η παρατηρούμενη επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης των HSPs στα φυτά του θετικού μάρτυρα εξασθένησε μετά την παρατεταμένη έκθεση των φυτών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (μετά από 4 ή 8 h στους 42 °C). Η παρατηρούμενη πρώιμη επαγωγή της μεταγραφής των HSPs στα φυτά του θετικού μάρτυρα μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην πρώιμη αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του H₂O₂ και του NO στα φυτά αυτά, αφού τα δυο αυτά μόρια σήματος μετέχουν ενεργά στη μεταγωγή σήματος για τη μεταγραφική ρύθμιση της παραγωγής των HSPs (Volkov et al., 2006, Banti et al., 2010,

Xuan et al., 2010). Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με αυτά προηγούμενων μελετών, τα οποία τονίζουν τη σημασία της έγκαιρης συσσώρευσης των HSPs για την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες ακραίων θερμοκρασιών (Huang and Xu, 2008, Xu and Huang, 2008, Rampino et al., 2009). Ο ρόλος της HSP70 στην αντίδραση και τη θερμοανθεκτικότητα φυτών *Arabidopsis thaliana* κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης, έχει πρόσφατα αποκαλυφθεί (Montero-Barrientos et al., 2010, Zhang et al., 2010δ). Αντίθετα, τα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS πριν την καταπόνησή τους, παρουσίασαν επαγωγή στη γονιδιακή έκφραση των HSPs, μόνο μετά την πάροδο 4 h από την έκθεση των φυτών στους 42 °C, παρέχοντας έτσι αποδείξεις για την πιθανή συμβολή των HSPs στον παρατηρούμενο μετριασμό των καταστροφικών επιπτώσεων της θερμικής καταπόνησης στα φυτά αυτά. Οι μειωμένες συγκεντρώσεις τόσο του H₂O₂, όσο και του NO στα προ-μεταχειρισμένα με NaHS φυτά κατά τα πρώτα στάδια της έκθεσής τους σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης, σε σύγκριση με τα φυτά του θετικού μάρτυρα, ίσως να οδήγησαν στην καθυστερημένη συσσώρευση των HSPs μετάγραφων (μετά την πάροδο 4 h από την επιβολή της θερμικής καταπόνησης), αφού και τα δυο ενεργά μόρια λειτουργούν παράλληλα για τη μεταγωγή σήματος και τη γονιδιακή έκφραση των HSPs, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Σχετικά, η προ-μεταχείριση των φυτών *Aloe vera* με την έκθεσή τους σε λιγότερο σοβαρές ακραίες θερμοκρασίες, καθώς επίσης και η προ-μεταχείριση φυτών *Arabidopsis thaliana* με την πολυαμίνη σπερμίνη, πριν από την έκθεσή τους σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης, οδήγησε στην αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των HSPs (Sagor et al., 2013, Huerta et al., 2012). Τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν ότι ένας πιθανός τρόπος με τον οποίο το H₂S δύνανται να επάγει την ανθεκτικότητα των φυτών φράουλας σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης, είναι και η μεταγραφική ενίσχυση και βιοσυσσώρευση των HSPs.

Ο μοριακός και λειτουργικός χαρακτηρισμός των υδατοπορινών (PIPs), μιας κατηγορίας πρωτεϊνών που διευκολύνουν τη διάχυση του νερού διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών, αποκάλυψε την καθοριστική συμβολή τους στη ρύθμιση της απόκρισης και της ανθεκτικότητας των φυτών κατά την έκθεσή τους σε διάφορα δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Maurel et al., 2002, Luu and Maurel, 2005, Ayadi et al., 2011). Στα φυτά, οι υδατοπορίνες απαντώνται σε αφθονία κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και στη μεμβράνη του χυμοτοπίου (Johansson et al., 2000). Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν τον πιθανό ρόλο των υδατοπορινών στην ανθεκτικότητα των φυτών κατά την έκθεσή τους σε

συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Συγκεκριμένα, ο Ayadí και οι συνεργάτες του (2011) επιβεβαίωσαν τον ρόλο των υδατοπορινών PIP1 και PIP2 κατά την έκθεση σποροφύτων σκληρού σιταριού σε συνθήκες αλατότητας και υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης, ενώ ο López-Pérez και οι συνεργάτες του (2009) έδειξαν ότι η αλατότητα αυξάνει τη γονιδιακή έκφραση των υδατοπορινών των υποοικογενειών PIP1 και PIP2 σε φυτά μπρόκολου. Επιπλέον, ο Iglesias-Acosta και οι συνεργάτες του (2010) ανέφεραν τη μείωση της συγκέντρωσης των υδατοπορινών PIP1 και PIP2 στις ρίζες των φυτών μπρόκολου κατά την έκθεσή τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Στην παρούσα μελέτη, οι δοκιμές qRT-PCR αποκάλυψαν ότι το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης της PIP ήταν όμοιο με αυτό των HSPs. Συγκεκριμένα, η έκθεση των φυτών του θετικού μάρτυρα σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης προκάλεσε την πρόωμη επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης της PIP (x9,2 φορές αύξηση μετά από 1 h έκθεσης των φυτών στους 42 °C), η οποία αποκλιμακώθηκε μετά από την παρατεταμένη θερμική καταπόνηση των φυτών (8 h έκθεση στους 42 °C). Από την άλλη πλευρά, η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης της PIP στα καταπονημένα φυτά που προ-μεταχειρίστηκαν με NaHS, έγινε σαφής μόνο μετά την πάροδο 4 h από την έκθεση των φυτών στους 42 °C (x1,5 και x2,5 φορές αύξηση μετά από 4 και 8 h έκθεσης των προ-μεταχειρισμένων φυτών σε θερμοκρασία 42 °C, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματά μας υπογραμμίζουν τον κεντρικό ρόλο της PIP στην ανθεκτικότητα των φυτών έναντι της θερμικής καταπόνησης, αφού η επαγωγή της γονιδιακής της έκφρασης στα προ-μεταχειρισμένα φυτά που παρουσίασαν ανθεκτικότητα, συμπίπτει χρονικά με την εμφάνιση των αρνητικών συμπτωμάτων της θερμικής καταπόνησης στα φυτά του θετικού μάρτυρα.

Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των αποτελεσμάτων των αναλύσεων της γονιδιακής έκφρασης, μπορούμε να διακρίνουμε μια ξεκάθαρη τάση όσον αφορά στην έκφραση των γονιδίων-στόχων στα φυτά που καταπονήθηκαν με την έκθεσή τους στους 42 °C. Ειδικότερα, διακριτή είναι η παροδική πρόωρη επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων, της PIP και των HSPs, η οποία αποκλιμακωνόταν σταδιακά, στα φυτά του θετικού μάρτυρα. Η παρατηρούμενη πρόωρη ρύθμιση των γονιδίων-στόχων στα φυτά αυτά φαίνεται να παρέχει ανεπαρκή μεταγωγή του σήματος της θερμικής καταπόνησης, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε μη ικανοποιητική μεταγραφή και συσσώρευση αμυντικών πρωτεϊνών, και ως εκ τούτου σε μειωμένη ανθεκτικότητα έναντι της θερμικής καταπόνησης. Αντίθετα, η προ-μεταχείριση των φυτών με NaHS δεν φαίνεται να επηρεάζει αισθητά τη γονιδιακή μεταγραφή στα καταπονημένα φυτά, έως

ότου η θερμική καταπόνηση ενεργοποιήσει τον μηχανισμό προσαρμογής και εγκλιματισμού των φυτών. Ως αποτέλεσμα, η προ-μεταχείριση με NaHS προκαλεί μακροπρόθεσμη μεταγραφική ρύθμιση, με αποτέλεσμα την επαρκή παραγωγή προστατευτικών πρωτεϊνών, όπως οι HSPs και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα οποία σε συνάρτηση με την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, είναι επαρκή για την προστασία των φυτών φράουλας κάτω από αυτές τις δυσμενείς συνθήκες καταπόνησης.

Τα αποτελέσματα των φυσιολογικών, βιοχημικών και μοριακών δοκιμών στη μελέτη μας έδειξαν ότι η προ-μεταχείριση των φυτών φράουλας με NaHS, μιας πρόδρομης ένωσης του H₂S, επάγει τη διασυστηματική ανθεκτικότητα στα φυτά κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε ακραίες θερμοκρασίες ανάπτυξης (42 °C). Η επαγόμενη θερμοανθεκτικότητα φαίνεται να οφείλεται στη ρύθμιση-διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης, την ομοιόσταση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού και την αύξηση της δραστηριότητας του αντιοξειδωτικού «οπλοστασίου» στα φυτά. Τα πειραματικά δεδομένα στο σύνολό τους, προσθέτουν νέα γνώση όσον αφορά στην προσπάθεια βελτίωσης της ανθεκτικότητας των καλλιεργούμενων ειδών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης και υποστηρίζουν περαιτέρω τον πιθανό ρόλο του H₂S στους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των φυτών κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση του ακριβούς ρόλου και της συνεισφοράς του H₂S στους προαναφερόμενους μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού.

7. Συμπεράσματα

Οι επιπτώσεις των υπό εξέταση αβιοτικών καταπονήσεων, τόσο από πλευράς παραγωγής, όσο και από οικονομικής πλευράς, είναι πολλές φορές καταστροφικές. Η επιστημονική κοινότητα καταβάλλει προσπάθειες για την ανάπτυξη ανθεκτικών έναντι των διαφόρων παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης φυτών, ή/και για τον μετριασμό των καταστροφικών συνεπειών των αβιοτικών καταπονήσεων στην ποσότητα και την ποιότητα της αγροτικής παραγωγής. Μέσα σε αυτά τα πλαίσια κινήθηκε και η έρευνα στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αφού σκοπός της ήταν να εξεταστεί η συμπεριφορά φυτών της καλλιεργούμενης ποικιλίας φράουλας (Camargosa), κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, υπερ-οσμωτικής καταπόνησης και υψηλών θερμοκρασιών. Επιπρόσθετα, σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να εξεταστούν οι επιδράσεις της προ-μεταχείρισης των φυτών με διάφορα μόρια σήματος (H_2O_2 , NO, H_2S), στη βιολογική διέγερση και την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Η επιλογή των φυτών φράουλας για τη διερεύνηση των παραπάνω υποθέσεων έγινε γιατί αυτά παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας και υψηλών θερμοκρασιών, και γιατί η καλλιέργεια της φράουλας παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, τόσο στην Κύπρο, όσο και παγκοσμίως. Για την εξέταση των παραπάνω στόχων, πραγματοποιήθηκαν 4 αλληλένδετα και ταυτόχρονα ανεξάρτητα πειράματα.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της διδακτορικής διατριβής κατέδειξαν ότι και τα τρία μόρια σήματος που εξετάστηκαν (H_2O_2 , NO, H_2S) έχουν τη δυνατότητα, μέσω της βιολογικής διέγερσης, να επάγουν την ανθεκτικότητα των φυτών κατά την έκθεσή τους στους υπό εξέταση παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης. Η δυνατότητα τόσο του H_2O_2 , όσο και του NO, να επάγουν την ανθεκτικότητα των φυτών σε διάφορα δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα, έχει τεκμηριωθεί προ πολλού. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία αποδεικνύεται ότι ο μετριασμός των διαταραχών στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, ως αποτέλεσμα της προ-μεταχείρισης των φυτών είτε με H_2O_2 , είτε με SNP, πριν την καταπόνησή τους με την έκθεσή τους σε διάλυμα 100 mmol L^{-1} NaCl, αποτελεί σημαντική συνιστώσα του H_2O_2 - και NO-επαγόμενου μηχανισμού προσαρμογής και εγκλιματισμού. Η οξειδοαναγωγική ομοίωση φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος και τη

μεταγραφική ρύθμιση για την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών φράουλας έναντι της αλατότητας.

Η αναφερόμενη από το H_2S επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα έχει κυρίως αποδοθεί στον μετριασμό της δευτερογενούς οξειδωτικής καταπόνησης μέσω της αύξησης της απόδοσης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Στην παρούσα εργασία, πέραν του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, το H_2S αποδείχθηκε ότι ρυθμίζει το κυτταρικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό και τη γονιδιακή έκφραση σημαντικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος και την ανθεκτικότητα των φυτών κατά την έκθεσή τους στους υπό εξέταση παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία το H_2S διατήρησε τη γονιδιακή έκφραση των ενζύμων που εμπλέκονται στο ευαίσθητο στην αλατότητα μονοπάτι μεταγωγής σήματος (SOS), καθώς επίσης και του σχετικού με την αφυδάτωση μεταγραφικού παράγοντα (DREB), σε επίπεδα όμοια με αυτά των φυτών που δεν καταπονήθηκαν (αρνητικός μάρτυρας), σε αντίθεση με τη γενική καταστολή στη γονιδιακή έκφραση των ενζύμων αυτών στα φυτά που εκτέθηκαν σε συνθήκες αλατότητας και υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης χωρίς προ-μεταχείριση (θετικός μάρτυρας). Οι αναφορές στο γεγονός ότι το H_2S επηρεάζει τη μεταγωγή σήματος μέσω του SOS μονοπατιού μεταγωγής σήματος, και τη μεταγραφική ρύθμιση μέσω του μεταγραφικού παράγοντα DREB, είναι οι πρώτες στην παγκόσμια βιβλιογραφία. Επιπλέον, η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικής καταπόνησης HSP70, HSP80 και HSP90, καθώς και της υδατοπορίνης (PIP), ως αποτέλεσμα της προ-μεταχείρισης με NaHS, φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας για τη θερμοανθεκτικότητα που παρουσίασαν τα προ-μεταχειρισμένα με NaHS φυτά.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής στο σύνολό τους, καταδεικνύουν ότι η βιολογική διέγερση των φυτών φράουλας, ως συνέπεια της παροδικής εμβάπτισης των ριζών τους σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης των υπό εξέταση μορίων σήματος (H_2O_2 , NO και H_2S), αποτελεί μια σημαντική εναλλακτική προσέγγιση για την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών κατά τη μετέπειτα έκθεσή τους σε συνθήκες αλατότητας, υπερ-ωσμωτικής καταπόνησης και υψηλών θερμοκρασιών. Ιδιαίτερα η χρήση του H_2S , το οποίο μέχρι σήμερα θεωρείτο επιβλαβές αέριο, αποτελεί πρωτοποριακή προσέγγιση όσον αφορά στην επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Η ένταξη του H_2S στις ερευνητικές μας προσεγγίσεις, όπως επίσης η μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, εισήγαγε νέα γνώση

όσον αφορά στη βιολογική διέγερση με μόρια σήματος για την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι των υπό εξέταση παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης. Επιπλέον, με την είσοδο της περιόδου εγκλιματισμού μετά την προ-μεταχείριση των φυτών με τα τρία μόρια σήματος, μελετήθηκε και αποκλείστηκε η ύπαρξη κάποιας μορφής «μνήμης» στα φυτά, η οποία θα τους επέτρεπε να παρουσιάσουν ανθεκτικότητα, όταν καταπονούνταν μετά την πάροδο κάποιων ημερών από την προ-μεταχείρισή τους. Αντίθετα, αποδείχθηκε ότι η επαγόμενη ανθεκτικότητα ήταν διασυστηματική και ότι είναι δυσατόν να παρέχει ουσιαστική προστασία στα φυτά για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα (έως και 8 ημέρες έκθεσης σε δυσμενής συνθήκες καταπόνησης).

Ωστόσο, αρκετά ερευνητικά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα, καθιστώντας την περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών της επαγόμενης ανθεκτικότητας των φυτών μέσω της βιολογικής διέγερσης με διάφορα μόρια σήματος, επιτακτική. Σημαντικότερο ερώτημα που παραμένει αναπάντητο είναι ποιοι μηχανισμοί ενεργοποιούνται κατά τη βιολογική διέγερση των φυτών με την προ-μεταχείρισή τους με τα μόρια σήματος που εξετάστηκαν (H_2O_2 , NO και H_2S), οι οποίοι τελικά οδηγούν στην αύξηση της δραστηριότητας του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Όπως κατέστη φανερό μέσα από τις αναλύσεις της γονιδιακής έκφρασης, δεν παρατηρήθηκε οποιαδήποτε διαφοροποίηση στην έκφραση των γονιδίων που μελετήσαμε, αμέσως μετά την προ-μεταχείριση των φυτών με τα τρία μόρια σήματος (Ημέρα 0 ή Ωρα 0). Κατά συνέπεια, θα ήταν καλό να διερευνήσουμε τον πιθανό ρόλο που είναι δυνατόν να διαδραματίζει η σύνθεση και βιο-συσσώρευση ανενεργών πρωτεϊνών, καθώς και η μετα-μεταφραστική τροποποίηση ορισμένων πρωτεϊνών με σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή ή/και την ενίσχυση της μεταγραφής του σήματος των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, στη βιολογική διέγερση των φυτών και την παρατηρούμενη επαγόμενη ανθεκτικότητα κατά την έκθεση των φυτών έναντι των υπό εξέταση αβιοτικών καταπονήσεων. Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελλοντική μελέτη της πιθανής εμπλοκής είτε διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, είτε των ενεργών μιτωτικών πρωτεϊνικών κινάσεων, όπως επίσης και η πιθανή τροποποίηση της δομής της χρωματίνης, στη βιολογική διέγερση των φυτών με τη χρήση των τριών μορίων σήματος που εξετάστηκαν. Βεβαίως, για την ολοκληρωμένη εξέταση των παραπάνω υποθέσεων, απαιτείται η συμπερίληψη τεχνικών και δοκιμών αιχμής στις εργαστηριακές μας αναλύσεις, όπως είναι οι αναλύσεις μικροσυστοιχιών και οι πρωτεομικές και μεταβολομικές αναλύσεις.

Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε και η δυνατότητα εξέτασης των επιδράσεων της βιολογικής διέγερσης με την προ-μεταχείριση των φυτών με τα τρία μόρια σήματος, στην επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών κατά την έκθεσή τους σε δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα σε πραγματικές συνθήκες αγρού. Εξάλλου, οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των μορίων σήματος που χρησιμοποιήθηκαν, σε συνάρτηση με το σχετικά μικρό τους κόστος, καθιστούν πρόκληση τη διερεύνηση της πιθανότητας χρήσης τους σε μεγαλύτερη κλίμακα, και ιδιαίτερα σε συνθήκες αγρού. Μια πιθανή ουσιαστική βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι των υπό εξέταση αβιοτικών καταπονήσεων, σε συνθήκες αγρού, θα ήταν ιδιαίτερα υποσχόμενη και σημαντική.

8. Βιβλιογραφία

- Aaby, K., Skrede, G. & Wrolstad, R. E. 2005. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4032-4040.
- Aaby, K., Wrolstad, R. E., Ekeberg, D. & Skrede, G. 2007. Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; Impact of achene level and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5156-5166.
- Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. K. & Sopory, S. K. 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 25, 1263-1274.
- Ahmad, P., Sarwat, M. & Sharma, S. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51, 167-173.
- Allakhverdiev, S., Kreslavski, V., Klimov, V., Los, D., Carpentier, R. & Mohanty, P. 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 98, 541-550.
- Alvarez, C., Calo, L., Romero, L. C., Garcia, I. & Gotor, C. 2010. An O-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulphydrase activity regulates cysteine homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 152, 656-69.
- Apel, K. & Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J. & Kubiś, J. 2009. Involvement of nitric oxide in water stress-induced responses of cucumber roots. *Plant Science*, 177, 682-690.
- Arasimowicz, M. & Floryszak-Wieczorek, J. 2007. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, 172, 876-887.
- Asami, D. K., Hong, Y.-J., Barrett, D. M. & Mitchell, A. E. 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1237-1241.
- Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13, 17-42.

- Ashraf, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*, 27, 84-93.
- Ashraf, M. & Harris, P. J. C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166, 3-16.
- Asif, M. H., Dhawan, P. & Nath, P. 2000. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18, 109-115.
- Ayadi, M., Cavez, D., Miled, N., Chaumont, F. & Masmoudi, K. 2011. Identification and characterization of two plasma membrane aquaporins in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum) and their role in abiotic stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1029-1039.
- Ban, Q., Liu, G. & Wang, Y. 2011. A DREB gene from *Limonium bicolor* mediates molecular and physiological responses to copper stress in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 168, 449-458.
- Banti, V., Mafessoni, F., Loreti, E., Alpi, A. & Perata, P. 2010. The heat-inducible transcription factor *HsfA2* enhances anoxia tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 152, 1471-1483.
- Barroso, M. C. M. & Alvarez, C. E. 1997. Toxicity symptoms and tolerance of strawberry to salinity in the irrigation water. *Scientia Horticulturae*, 71, 177-188.
- Bartel, D. & Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Plant Science*, 24, 23-58.
- Bartosz, G. 2009. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochemical Pharmacology*, 77, 1303-1315.
- Bauer, C. C., Boyle, J. P., Porter, K. E. & Peers, C. 2010. Modulation of Ca²⁺ signalling in human vascular endothelial cells by hydrogen sulfide. *Atherosclerosis*, 209, 374-380.
- Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S. & Conrath, U. 2009. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21, 944-953.
- Beers, E. P. & McDowell, J. M. 2001. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 561-567.

- Beligni, M. V. & Lamattina, L. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 210, 215-221.
- Beligni, M. V. & Lamattina, L. 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell and Environment*, 24, 267-278.
- Berendzen, K., Searle, I., Ravenscroft, D., Koncz, C., Batschauer, A., Coupland, G., Somssich, I. & Ulker, B. 2005. A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plant Methods*, 1, 4.
- Besson-Bard, A., Pugin, A. & Wendehenne, D. 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 21-39.
- Bethke, P. C., Libourel, I. G. L. & Jones, R. L. 2006. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 57, 517-526.
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K. & Jahn, T. P. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758, 994-1003.
- Bloem, E., Haneklaus, S. & Schnug, E. 2005. Significance of sulfur compounds in the protection of plants against pests and diseases. *Journal of Plant Nutrition*, 28, 763-784.
- Bloem, E., Riemenschneider, A., Volker, J., Jutta, P., Schmidt, A., Salac, I., Haneklaus, S. & Schnug, E. 2004. Sulphur supply and infection with *Pyrenopeziza brassicae* influence L-cysteine desulphydrase activity in *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2305-2312.
- Blokhina, O. & Fagerstedt, K. V. 2010. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, 138, 447-462.
- Boveris, A., Galatro, A. & Puntarulo, S. 2000. Effect of nitric oxide and plant antioxidants on microsomal content of lipid radicals. *Biological Research*, 33, 159-165.
- Bowler, C. & Fluhr, R. 2000. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science*, 5, 241-246.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R. (eds.) *Biochemistry and Molecular*

- Biology of Plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, pp. 1158–1249.
- Bredt, D. S. & Snyder, S. H. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 682-685.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S. & Neill, S. J. 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal*, 45, 113-122.
- Bruce, T. J. A., Matthes, M. C., Napier, J. A. & Pickett, J. A. 2007. Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, 173, 603-608.
- Bustamante, C. A., Rosli, H. G., Añón, M. C., Civello, P. M. & Martinez, G. A. 2006. β -Xylosidase in strawberry fruit: Isolation of a full-length gene and analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Science*, 171, 497-504.
- Camejo, D., Rodriguez, P., Morales, M. A., Dell Amico, J. M., Torrecillas, A. & Alarcin, J. J. 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology*, 162, 281-289.
- Capone, R., Tiwari, B. S. & Levine, A. 2004. Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 425-428.
- Chai, Y., Zhang, Q., Tian, L., Li, C. L., Xing, Y., Qin, L. & Shen, Y. Y. 2013. Brassinosteroid is involved in strawberry fruit ripening. *Plant Growth Regulation*, 69, 63-69.
- Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11, 113-116.
- Chen, J., Liu, D., Jiang, Y., Zhao, M., Shan, W., Kuang, J. & Lu, W. 2011 α . Molecular characterization of a strawberry FaASR gene in relation to fruit ripening. *PLoS ONE*, 6, e24649.
- Chen, J., Wu, F.-H., Wang, W.-H., Zheng, C.-J., Lin, G.-H., Dong, X.-J., He, J.-X., Pei, Z.-M. & Zheng, H.-L. 2011 β . Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol

- redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 62, 4481-4493.
- Cheng, N.-H., Pittman, J. K., Zhu, J.-K. & Hirschi, K. D. 2004. The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 2922-2926.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R. D., Hancock, J. T. & Neill, S. J. 2000. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *The Plant Journal*, 24, 667-677.
- Clyde Hill, A. & Bennett, J. H. 1970. Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. *Atmospheric Environment*, 4, 341-348.
- Conrath, U., Beckers, G. J., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M. A., Pieterse, C. M., Poinssot, B., Pozo, M. J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L. & Mauch-Mani, B. 2006. Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 1062-71.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Carreras, A., Valderrama, R., Palma, J. M. & Del Río, L. A. 2007a. Nitrosative stress in plants: A new approach to understand the role of NO in abiotic stress. In: Lamattina, L. & Polacco, J. (eds.) *Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology*. Berlin Heidelberg: Springer, pp. 187-205.
- Corpas, F. J., Del Río, L. A. & Barroso, J. B. 2007b. Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends in Plant Science*, 12, 436-438.
- Courtois, C., Besson, A., Dahan, J., Bourque, S., Dobrowolska, G., Pugin, A. & Wendehenne, D. 2008. Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *Journal of Experimental Botany*, 59, 155-163.
- Cruz-Rus, E., Amaya, I., Sánchez-Sevilla, J. F., Botella, M. A. & Valpuesta, V. 2011. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany*, 62, 4191-4201.
- Cui, M., Zhang, W., Zhang, Q., Xu, Z., Zhu, Z., Duan, F. & Wu, R. 2011. Induced over-expression of the transcription factor OsDREB2A improves drought tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1384-1391.
- Cuypers, A., Karen, S., Jos, R., Kelly, O., Els, K., Tony, R., Nele, H., Nathalie, V., Suzy, V. S., Frank, V. B., Yves, G., Jan, C. & Jaco, V. 2011. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 168, 309-316.

- Davis, A. R., Levi, A., Kim, S., King, S. R. & Hernandez, A. 2006. RNA extraction method from fruit tissue high in water and sugar. *HortScience*, 41, 1292-1294.
- De Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Enias-Filho, J., Rolim Medeiros, J.-V. & Gomes-Filho, E. 2005. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. *Journal of Plant Physiology*, 162, 1114-1122.
- De Gara, L., Locato, V., Dipierro, S. & De Pinto, M. C. 2010. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 173, S13-S19.
- De Gara, L., Paciolla, C., De Tullio, M. C., Motto, M. & Arrigoni, O. 2000. Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: Evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, 109, 7-13.
- De Stefano, M., Ferrarini, A. & Delledonne, M. 2005. Nitric oxide functions in the plant hypersensitive disease resistance response. *BMC Plant Biology*, 5, S10.
- De Tullio, M. C. 2010. Antioxidants and redox regulation: Changing notions in a changing world. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 289-291.
- Delaunay, A., Isnard, A.-D. & Toledano, M. B. 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO Journal*, 19, 5157-5166.
- Delledonne, M. 2005. NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 390-396.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. & Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394, 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. & Lamb, C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 13454-13459.
- Demeke, T. & Adams, R. P. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques*, 12.
- Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J. T. & Neill, S. J. 1999. H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Journal of Experimental Botany*, 50, 1863-1866.

- Desikan, R., Hancock, J. T., Ichimura, K., Shinozaki, K. & Neill, S. J. 2001. Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiology*, 126, 1579-1587.
- Dionisio-Sese, M. L. & Tobita, S. 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135, 1-9.
- Dong, X. 2004. NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 547-552.
- Drazkiewicz, M., Skórzynska-Polit, E. & Krupa, Z. 2003. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Science*, 164, 195-202.
- Du, W., Lin, H., Chen, S., Wu, Y., Zhang, J., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Wu, W. & Guo, Y. 2011. Phosphorylation of SOS3-like calcium-binding proteins by their interacting SOS2-like protein kinases is a common regulatory mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156, 2235-43.
- Dubuis, P. H., Marazzi, C., Städler, E. & Mauch, F. 2005. Sulphur deficiency causes a reduction in antimicrobial potential and leads to increased disease susceptibility of oilseed rape. *Journal of Phytopathology*, 153, 27-36.
- Durner, J. R., Wendehenne, D. & Klessig, D. F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 10328-10333.
- Eltelib, H. A., Badejo, A. A., Fujikawa, Y. & Esaka, M. 2011. Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). *Journal of Plant Physiology*, 168, 619-627.
- Eltelib, H. A., Fujikawa, Y. & Esaka, M. 2012. Overexpression of the acerola (*Malpighia glabra*) monodehydroascorbate reductase gene in transgenic tobacco plants results in increased ascorbate levels and enhanced tolerance to salt stress. *South African Journal of Botany*, 78, 295-301.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*, New York, John Wiley and Sons.
- Fan, H.-F., Du, C.-X. & Guo, S.-R. 2013. Nitric oxide enhances salt tolerance in cucumber seedlings by regulating free polyamine content. *Environmental and Experimental Botany*, 86, 52-59.

- Fan, H., Guo, S., Jiao, Y., Zhang, R. & Li, J. 2007. Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism, and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Frontiers of Agriculture in China*, 1, 308-314.
- Faostat. 2011. *Crop production* [Online]. Available: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- Feder, M. E. & Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61, 243-282.
- Ferrer, M. A. & Ros Barceló, A. 1999. Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant, Cell and Environment*, 22, 891-897.
- Filippou, P., Antoniou, C. & Fotopoulos, V. 2011. Effect of drought and rewatering on the cellular status and antioxidant response of *Medicago truncatula* plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6, 270-277.
- Filippou, P., Tanou, G., Molassiotis, A. & Fotopoulos, V. 2012. Plant acclimation to environmental stress using priming agents. In: Tuteja, N. & Gill, S. S. (eds.) *Plant Acclimation to Environmental Stress*. USA: Springer Science & Business Media, pp. 1-27.
- Flowers, T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55, 307-319.
- Fotopoulos, V., Sanmartin, M. & Kanellis, A. K. 2006. Effect of ascorbate oxidase over-expression on ascorbate recycling gene expression in response to agents imposing oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3933-3943.
- Fotopoulos, V., Ziogas, V., Tanou, G. & Molassiotis, A. 2010. Involvement of AsA/DHA and GSH/GSSG ratios in gene and protein expression and in the activation of defence mechanisms under abiotic stress conditions. In: Anjum, N. A., Chan, M.-T. & Umar, S. (eds.) *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. Springer, Netherlands, pp. 265-302.
- Foyer, C., Rowell, J. & Walker, D. 1983. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta*, 157, 239-244.

- Foyer, C. H. & Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17, 1866-1875.
- Foyer, C. H. & Noctor, G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11, 861-905.
- Gadjev, I., Stone, J. M., Gechev, T. S. & Kwang, W. J. 2008. Programmed cell death in plants: New insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. In: Kwang, J. (ed.) *International Review of Cell and Molecular Biology*. Knoxville: Academic Press, pp. 87-144.
- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T. S., Laloi, C., Minkov, I. N., Shulaev, V., Apel, K., Inze, D., Mittler, R. & Van Breusegem, F. 2006. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141, 436-445.
- Gao, Y., Guo, Y.-K., Lin, S.-H., Fang, Y.-Y. & Bai, J.-G. 2010. Hydrogen peroxide pretreatment alters the activity of antioxidant enzymes and protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves. *Scientia Horticulturae*, 126, 20-26.
- García-Mata, C. & Lamattina, L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126, 1196-1204.
- García-Mata, C. & Lamattina, L. 2010. Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New Phytologist*, 188, 977-984.
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I. & Laloi, C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28, 1091-1101.
- Giaveno, C. & Ferrero, J. 2003. Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe, Argentina. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 3, 89-94.
- Gill, S. S. & Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Giraud, E., Ho, L. H. M., Clifton, R., Carroll, A., Estavillo, G., Tan, Y.-F., Howell, K. A., Ivanova, A., Pogson, B. J., Millar, A. H. & Whelan, J. 2008. The absence of

- Alternative Oxidase1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiology*, 147, 595-610.
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M. & Toulmin, C. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327, 812-818.
- Goellner, K. & Conrath, U. 2008. Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 233-242.
- Gong, D., Guo, Y., Schumaker, K. S. & Zhu, J. K. 2004. The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134, 919-26.
- Gould, K. S., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A. & Wendehenne, D. 2003. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant, Cell and Environment*, 26, 1851-1862.
- Grant, O. M., Davies, M. J., Johnson, A. W. & Simpson, D. W. 2012. Physiological and growth responses to water deficits in cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) and in one of its progenitors, *Fragaria chiloensis*. *Environmental and Experimental Botany*, 83, 23-32.
- Griffith, O. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106, 207-212.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E. G. & Cicek, N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, 164, 728-736.
- Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K. & Chowdhuri, D. K. 2010. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sciences*, 86, 377-384.
- Halfter, U., Ishitani, M. & Zhu, J.-K. 2000. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 3735-3740.
- Hall, A. E. 2001. *Crop responses to environment*, Boca Raton, Florida, CRC Press LLC.
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.

- Halliwell, B., Zhao, K. & Whiteman, M. 1999. Nitric oxide and peroxy nitrite. The ugly, the uglier and the not so good. *Free Radical Research*, 31, 651-669.
- Hancock, J. F. 1999. *Strawberries*, New York, NY, CABI Publishing.
- Hao, G.-P. & Zhang, J.-H. 2009. *The role of nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plants under abiotic stress*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- He, H.-Y., He, L.-F., Gu, M.-H. & Li, X.-F. 2012. Nitric oxide improves aluminum tolerance by regulating hormonal equilibrium in the root apices of rye and wheat. *Plant Science*, 183, 123-130.
- Heath, R. & Packer, L. 1968. Photooxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
- Hemavathi, Upadhyaya, C. P., Young, K. E., Akula, N., Kim, H. S., Heung, J. J., Oh, O. M., Aswath, C. R., Chun, S. C., Kim, D. H. & Park, S. W. 2009. Over-expression of strawberry d-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C with enhanced abiotic stress tolerance. *Plant Science*, 177, 659-667.
- Henderson, D. C. & Hammond, J. 2013. CKC: Isolation of nucleic acids from a diversity of plants using CTAB and silica columns. *Molecular Biotechnology*, 53, 109-117.
- Herms, S., Seehaus, K., Koehle, H. & Conrath, U. 2002. A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Physiology*, 130, 120-127.
- Hernández, L. M., Padilla, M. N., Mancha, M. & Martínez-Rivas, J. M. 2009. Expression analysis identifies FAD2-2 as the olive oleate desaturase gene mainly responsible for the linoleic acid content in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6199-6206.
- Hodge, S., Pope, T. W., Holaschke, M. & Powell, G. 2006. The effect of β -aminobutyric acid on the growth of herbivorous insects feeding on Brassicaceae. *Annals of Applied Biology*, 148, 223-229.
- Hong, J. K., Yun, B.-W., Kang, J.-G., Raja, M. U., Kwon, E., Sorhagen, K., Chu, C., Wang, Y. & Loake, G. J. 2008. Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *Journal of Experimental Botany*, 59, 147-154.
- Horvath, I., Glatz, A., Varvasovszki, V., Balogh, G. & Kovacs, E. 1998. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: Identification of hsp17 as a "fluidity gene". *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 3513-3518.
- Hou, Z., Wang, L., Liu, J., Hou, L. & Liu, X. 2013. Hydrogen sulfide regulates ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55, 277-89.
- Howarth, C. J. 2005. Genetic Improvements Of Tolerance To High Temperature. In: Ashraf, M. & Harris, P. J. C. (eds.) *Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches*. New York Howarth Press Inc, pp. 277–300.
- Hu, C. G., Honda, C., Kita, M., Zhang, Z., Tsuda, T. & Moriguchi, T. 2002. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 69-69.
- Huang, B. & Xu, C. 2008. Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 1230-1237.
- Huang, X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M. & Durner, J. 2004. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 218, 938-946.
- Huerta, C., Freire, M. & Cardemil, L. 2012. Expression of hsp70, hsp100 and ubiquitin in *Aloe barbadensis* Miller under direct heat stress and under temperature acclimation conditions. *Plant Cell Reports*, 32, 1-15.
- Hughes, M. N., Centelles, M. N. & Moore, K. P. 2009. Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: A review. *Free Radical Biology and Medicine*, 47, 1346-1353.
- Husaini, A. M. & Abdin, M. Z. 2008. Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress. *Plant Science*, 174, 446-455.
- Iglesias-Acosta, M., Martínez-Ballesta, M. C., Teruel, J. A. & Carvajal, M. 2010. The response of broccoli plants to high temperature and possible role of root aquaporins. *Environmental and Experimental Botany*, 68, 83-90.
- Iqbal, N., Ashraf, M. & Ashraf, M. Y. 2008. Glycinebetaine, an osmolyte of interest to improve water stress tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.): water relations and yield. *South African Journal of Botany*, 74, 274-281.

- Ishibashi, Y., Yamaguchi, H., Yuasa, T., Iwaya-Inoue, M., Arima, S. & Zheng, S.-H. 2011. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology*, 168, 1562-1567.
- Jakab, G., Ton, J., Flors, V., Zimmerli, L., Mettraux, J.-P. & Mauch-Mani, B. 2005. Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiology*, 139, 267-274.
- Jan, K. 2008. Exogenous spermidine differentially alters activities of some scavenging system enzymes, H₂O₂ and superoxide radical levels in water-stressed cucumber leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165, 397-406.
- Japelaghi, R., Haddad, R. & Garoosi, G.-A. 2011. Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular Biotechnology*, 49, 129-137.
- Jasid, S. N., Galatro, A., Villordo, J. J., Puntarulo, S. & Simontacchi, M. 2009. Role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. *Plant Science*, 176, 662-668.
- Jaskiewicz, M., Conrath, U. & Peterhansel, C. 2011. Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Reports*, 12, 50-55.
- Jaspers, P. & Kangasjärvi, J. 2010. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*, 138, 405-413.
- Jebara, S., Jebara, M., Limam, F. R. & Aouani, M. E. 2005. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 162, 929-936.
- Jin, Z., Shen, J., Qiao, Z., Yang, G., Wang, R. & Pei, Y. 2011. Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414, 481-486.
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. & Kjellbom, P. 2000. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465, 324-342.
- Joo, J. H., Bae, Y. S. & Lee, J. S. 2001. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology*, 126, 1055-1060.

- Jubany-Mari, T., Munné-Bosch, S. & Alegre, L. 2010. Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 351-358.
- Kadir, S., Sidhu, G. & Al-Khatib, K. 2006. Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) growth and productivity as affected by temperature. *HortScience*, 41, 1423-1430.
- Kamada-Nobusada, T., Hayashi, M., Fukazawa, M., Sakakibara, H. & Nishimura, M. 2008. A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 49, 1272-1282.
- Karlıdag, H., Yildirim, E., Turan, M. 2009. Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry. *Scientia Agricola*, 66, 180-187.
- Kavitha, K., George, S., Venkataraman, G. & Parida, A. 2010. A salt-inducible chloroplastic monodehydroascorbate reductase from halophyte *Avicennia marina* confers salt stress tolerance on transgenic plants. *Biochimie*, 92, 1321-1329.
- Kaya, C., Ak, B. E., Higgs, D. & Murillo-Amador, B. 2002. Influence of foliar-applied calcium nitrate on strawberry plants grown under salt-stressed conditions. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42, 631-636.
- Kaya, C., Tuna, A. L., Ashraf, M. & Altunlu, H. 2007. Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 397-403.
- Keutgen, A. & Pawelzik, E. 2007 α . Modifications of strawberry fruit antioxidant pools and fruit quality under NaCl stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4066-4072.
- Keutgen, A. & Pawelzik, E. 2007 β . Modifications of taste-relevant compounds in strawberry fruit under NaCl salinity. *Food Chemistry*, 105, 1487-1494.
- Keutgen, A. & Pawelzik, E. 2008 α . Contribution of amino acids to strawberry fruit quality and their relevance as stress indicators under NaCl salinity. *Food Chemistry*, 111, 642-647.
- Keutgen, A. & Pawelzik, E. 2008 β . Quality and nutritional value of strawberry fruit under long term salt stress. *Food Chemistry*, 107, 1413-1420.
- Keutgen, A. J. & Pawelzik, E. 2009. Impacts of NaCl stress on plant growth and mineral nutrient assimilation in two cultivars of strawberry. *Environmental and Experimental Botany*, 65, 170-176.

- Khan, M. N., Siddiqui, M. H., Mohammad, F. & Naeem, M. 2012. Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide*, 27, 210-218.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R. & Takabayashi, J. 2005. Volatile C6-aldehydes and Allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 46, 1093-1102.
- Klessig, D. F., Durner, J. R., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. & Silva, H. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 8849-8855.
- Klikocka, H., Haneklaus, S., Bloem, E. & Schnug, E. 2005. Influence of sulfur fertilization on infection of potato tubers with *Rhizoctonia solani* and *Streptomyces scabies*. *Journal of Plant Nutrition*, 28, 819 - 833.
- Knight, H. & Knight, M. R. 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, 6, 262-267.
- Kohler, A., Schwindling, S. & Conrath, U. 2002. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 128, 1046-56.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., Von Koskull-Döring, P., Vierling, E. & Scharf, K. D. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 310-316.
- Krasensky, J. & Jonak, C. 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63, 1593-1608.
- Kuk, Y. I., Shin, J. S., Burgos, N. R., Hwang, T. E., Han, O., Cho, B. H., Jung, S. & Guh, J. O. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science*, 43, 2109-2117.
- Kumar, R. G., Shah, K. & Dubey, R. S. 2000. Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. *Plant Science*, 156, 23-34.
- Kumar, S., Kaur, R., Kaur, N., Bhandhari, K., Kaushal, N., Gupta, K., Bains, T. S. & Nayyar, H. 2011. Heat-stress induced inhibition in growth and chlorosis in

- mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is partly mitigated by ascorbic acid application and is related to reduction in oxidative stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 2091-2101.
- Lamotte, O., Courtois, C. C., Dobrowolska, G., Besson, A. L., Pugin, A. & Wendehenne, D. 2006. Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 1369-1376.
- Larkindale, J. & Huang, B. 2005. Effects of abscisic acid, salicylic acid, ethylene and hydrogen peroxide in thermotolerance and recovery for creeping bentgrass. *Plant Growth Regulation*, 47, 17-28.
- Leshem, Y. A. Y. & Haramaty, E. 1996. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *Journal of Plant Physiology*, 148, 258-263.
- Leshem, Y. A. Y., Wills, R. B. H. & Ku, V. V. V. 1998. Evidence for the function of the free radical gas nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 825-833.
- Li, L., Wang, Y. & Shen, W. 2012 α . Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots. *BioMetals*, 25, 617-631.
- Li, S.-W., Xue, L., Xu, S., Feng, H. & An, L. 2009. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 65, 63-71.
- Li, X.-J., Yang, M.-F., Chen, H., Qu, L.-Q., Chen, F. & Shen, S.-H. 2010. Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: Proteomic evidence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804, 929-940.
- Li, Z.-G., Gong, M., Xie, H., Yang, L. & Li, J. 2012 β . Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L) suspension cultured cells and involvement of Ca²⁺ and calmodulin. *Plant Science*, 185-186, 185-189.
- Lin, X., Xiao, M., Luo, Y., Wang, J. & Wang, H. 2013. The effect of RNAi-induced silencing of FaDFR on anthocyanin metabolism in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *Scientia Horticulturae*, 160, 123-128.

- Lin, Y., Liu, Z., Shi, Q., Wang, X., Wei, M. & Yang, F. 2012. Exogenous nitric oxide (NO) increased antioxidant capacity of cucumber hypocotyl and radicle under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 142, 118-127.
- Lindermayr, C., Saalbach, G. & Durner, J. 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 137, 921-930.
- Lisjak, M., Srivastava, N., Teklic, T., Civale, L., Lewandowski, K., Wilson, I., Wood, M. E., Whiteman, M. & Hancock, J. T. 2010. A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 931-935.
- Liu, J., Hou, Z.-H., Liu, G.-H., Hou, L.-X. & Liu, X. 2012. Hydrogen sulfide may function downstream of nitric oxide in ethylene-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. *Journal of Integrative Agriculture*, 11, 1644-1653.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.-S. & Zhu, J.-K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 3730-3734.
- Liu, J. & Zhu, J.-K. 1998. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, 280, 1943-1945.
- Liu, Y., Shi, L., Ye, N., Liu, R., Jia, W. & Zhang, J. 2009. Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 183, 1030-1042.
- López-Pérez, L., Martínez-Ballesta, M. D. C., Maurel, C. & Carvajal, M. 2009. Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry*, 70, 492-500.
- Loreto, F. & Velikova, V. 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, 127, 1781-1787.
- Lu, S., Su, W., Li, H. & Guo, Z. 2009. Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 132-138.
- Luu, D.-T. & Maurel, C. 2005. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell and Environment*, 28, 85-96.

- Maas, E. V. & Hoffman, G. J. 1977. Crop salt tolerance - current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division. ASCE*, 103, 115-134.
- Macarisin, D., Wisniewski, M., Bassett, C. & Thannhauser, T. 2009. Proteomic analysis of b-aminobutyric acid priming and abscisic acid - induction of drought resistance in crabapple (*Malus pumila*): effect on general metabolism, the phenylpropanoid pathway and cell wall enzymes *Plant, Cell and Environment*, 32, 1612-1631.
- Mahajan, S. & Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139-158.
- Mancardi, D., Penna, C., Merlino, A., Del Soldato, P., Wink, D. A. & Pagliaro, P. 2009. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: Hydrogen sulfide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787, 864-872.
- Manjunatha, G., Raj, S. N., Shetty, N. P. & Shetty, H. S. 2008. Nitric oxide donor seed priming enhances defense responses and induces resistance against pearl millet downy mildew disease. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91, 1-11.
- Martinez, C. A., Loureiro, M. E., Oliva, M. A. & Maestri, M. 2001. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Science*, 160, 505-515.
- Martínez, G. A. & Civello, P. M. 2008. Effect of heat treatments on gene expression and enzyme activities associated to cell wall degradation in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 38-45.
- Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P., Tournaire, C., Santoni, V., Heyes, J. & Thomas Zeuthen, W. D. S. 2002. Molecular physiology of aquaporins in plants. *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 105-148.
- Mazorra, L. M., Nunez, M., Hechavarria, M., Coll, F. & Sanchez-Blanco, M. J. 2002. Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. *Biologia Plantarum*, 45, 593-596.
- Mazzara, M. & James, D. 2000. The influence of photoperiodic growth condition on isolation of RNA from strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) tissue. *Molecular Biotechnology*, 15, 237-241.
- Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Crosatti, C., Guerra, D., Stanca, A. M. & Cattivelli, L. 2008. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science*, 174, 420-431.

- Medina, J., Catala, R. & Salinas, J. 2011. The CBFs: Three arabidopsis transcription factors to cold acclimate. *Plant Science*, 180, 3-11.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9, 490-498.
- Mittova, V., Theodoulou, F. L., Kiddle, G., Gómez, L., Volokita, M., Tal, M., Foyer, C. H. & Guy, M. 2003. Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. *FEBS Letters*, 554, 417-421.
- Miyawaki, K., Fukuoka, S., Kadomura, Y., Hamaoka, H., Mito, T., Ohuchi, H., Schwab, W. & Noji, S. 2012. Establishment of a novel system to elucidate the mechanisms underlying light-induced ripening of strawberry fruit with an Agrobacterium-mediated RNAi technique. *Plant Biotechnology*, 29, 271-277.
- Molassiotis, A. & Fotopoulos, V. 2011. Oxidative and nitrosative signaling in plants: Two branches in the same tree? *Plant signaling and behaviour*, 6, 210-214.
- Moller, I. M., Jensen, P. E. & Hansson, A. 2007. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 459-481.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., Nicolas, C. & Monte, E. 2010. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, 167, 659-665.
- Moreira, D. 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research*, 26, 3309-3310.
- Mortaji, Z., Tavakkol Afshari, R., Alizadeh, H. & Yazdi Samadi, B. 2008. RNA isolation and expression from different dormant and after-ripened wheat (*Triticum aestivum*) seed tissues rich in polysaccharides and proteins. *Asian Journal of Plant Science*, 7, 201-206.
- Moser, C., Gatto, P., Moser, M., Pindo, M. & Velasco, R. 2004. Isolation of functional RNA from small amounts of different grape and apple tissues. *Molecular Biotechnology*, 26, 95-99.
- Munns, R. & Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.

- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. & Allakhverdiev, S. I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767, 414-421.
- Nashef, A. S., Osuga, D. T. & Feeney, R. E. 1977. Determination of hydrogen sulfide with 5,5β'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), N-ethylmaleimide, and parachloromercuribenzoate. *Analytical Biochemistry*, 79, 394-405.
- Nasibi, F. & Kalantari, K. 2009. Influence of nitric oxide in protection of tomato seedling against oxidative stress induced by osmotic stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 1037-1044.
- Neill, S., Desikan, R. & Hancock, J. 2002α. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 388-395.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A. & Hancock, J. T. 2002β. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology*, 128, 13-16.
- Neocleous, D. & Minas, G. J. 2007. An in vitro test for salt (NaCl) tolerance of red raspberry (*Rubus idaeus L.*) cultures. *Acta Horticulturae*, 741, 289-294.
- Neocleous, D. & Vasilakakis, M. 2012. Effects of cultivars and substrate on soilless strawberry production in Cyprus. *Acta Horticulturae*, 926, 435-440.
- Neocleous, D., Vasilakakis, M. 2008α. Fruit quality of red raspberry as affected by salinity. *European Journal of Horticultural Science*, 73, 131-137.
- Neocleous, D., Vasilakakis, M. 2008β. Effects of boron and salinity on red raspberry in vitro. *International Journal of Fruit Science*, 8, 216-225.
- Newman, M. A., Von Roepenack-Lahaye, E., Daniels, M. J. & Dow, J. M. 2000. Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology*, 1, 25-31.
- Newman, M. A., Von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M. J. & Dow, J. M. 2002. Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *The Plant Journal*, 29, 487-495.
- Newman, M. A., Von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M. J. & Dow, J. M. 2001. Induction of hydroxycinnamoyl-tyramine conjugates in pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by hrp gene-dependent and hrp gene-independent mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14, 785-92.

- Nicholson, C. K. & Calvert, J. W. 2010. Hydrogen sulfide and ischemia-reperfusion injury. *Pharmacological Research*, 62, 289-297.
- Nishiyama, M., Ohkawa, W. & Kanahama, K. 2003. Effect of photoperiod on the development of inflorescences in everbearing strawberry 'summerberry' plants grown at high temperature. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 53, 43-52.
- Noctor, G. 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment*, 29, 409-425.
- Noctor, G., Leonardo, G., Vanacker, H. & Foyer, H. C. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling *Journal of Experimental Botany*, 53, 1283-1304
- Noritake, T., Kawakita, K. & Doke, N. 1996. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology*, 37, 113-116.
- Norman, C., Howell, K. A., Millar, A. H., Whelan, J. M. & Day, D. A. 2004. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiology*, 134, 492-501.
- Oka, Y., Cohen, Y. & Spiegel, Y. 1999. Local and systemic induced resistance to the root-knot nematode in tomato by DL-beta-amino-n-butyric acid. *Phytopathology*, 89, 1138-1143.
- Olson, K. R. 2009. Is hydrogen sulfide a circulating "gasotransmitter" in vertebrate blood? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787, 856-863.
- Orsini, F., Alnayef, M., Bona, S., Maggio, A. & Gianquinto, G. 2012. Low stomatal density and reduced transpiration facilitate strawberry adaptation to salinity. *Environmental and Experimental Botany*.
- Ortuno, A., Botia, J. M., Fuster, M. D., Porrás, I., García-Lidon, A. & Del Río, J. A. 1997. Effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of *Tangelo Nova*, *Citrus paradisi*, and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2740-2743.
- Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., Lombardo, M. C. & Lamattina, L. 2004. Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiology*, 135, 279-86.

- Palmieri, M. C., Sell, S., Huang, X., Scherf, M., Werner, T., Durner, J. R. & Lindermayr, C. 2008. Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *Journal of Experimental Botany*, 59, 177-186.
- Palomer, X., Llop-Tous, I., Vendrell, M., Krens, F. A., Schaart, J. G., Boone, M. J., Van Der Valk, H. & Salentijn, E. M. J. 2006. Antisense down-regulation of strawberry endo- β -(1,4)-glucanase genes does not prevent fruit softening during ripening. *Plant Science*, 171, 640-646.
- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D. W. & Goldman, S. L. 2004. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*, 2, 359-366.
- Parida, A. K. & Das, A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324-349.
- Pei, Z.-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G. J., Grill, E. & Schroeder, J. I. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406, 731-734.
- Perez, A. 2011. *Fruit and Tree Nuts Outlook. FTS-346, Economic Research Service, USDA*.
- Perna, A. F., Luciano, M. G., Ingrosso, D., Raiola, I., Pulzella, P., Sepe, I., Lanza, D., Violetti, E., Capasso, R., Lombardi, C. & De Santo, N. G. 2010. Hydrogen sulfide, the third gaseous signaling molecule with cardiovascular properties, is decreased in hemodialysis patients. *Journal of Renal Nutrition*, 20, S11-S14.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (RESTB[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, e36.
- Pfannschmidt, T. 2003. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science*, 8, 33-41.
- Pieterse, C. M., Van Wees, S. C. M., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J. & Van Loon, L. C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1571-1580.
- Pombo, M. A., Martínez, G. A. & Civello, P. M. 2011. Cloning of FaPAL6 gene from strawberry fruit and characterization of its expression and enzymatic activity in two cultivars with different anthocyanin accumulation. *Plant Science*, 181, 111-118.

- Potters, G., Horemans, N. & Jansen, M. A. K. 2010. The cellular redox state in plant stress biology - A charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 292-300.
- Prochazkova, D. & Wilhelmova, N. 2011. Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. *Nitric Oxide*, 24, 61-65.
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S. & Zhu, J.-K. 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8436-8441.
- Radi, R. 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 4003-4008.
- Rampino, P., Mita, G., Pataleo, S., De Pascali, M., Di Fonzo, N. & Perrotta, C. 2009. Acquisition of thermotolerance and HSP gene expression in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 257-264.
- Rausch, T. & Wachter, A. 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science*, 10, 503-509.
- Raza, S. H., Athar, H. R., Ashraf, M. & Hameed, A. 2007. Glycinebetaine-induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 368-376.
- Richardson, A. D., Duigan, S. P. & Berlyn, G. P. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153, 185-194.
- Riemenschneider, A., Wegele, R., Schmidt, A. & Papenbrock, J. 2005. Isolation and characterization of a D-cysteine desulphydrase protein from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, 272, 1291-1304.
- Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Pazmino, D. M., Testillano, P. S., Risueno, M. C., Del Rio, L. A. & Sandalio, L. M. 2009. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology*, 150, 229-243.
- Rosales, E. P., Iannone, M. F., Groppa, M. D. & Benavides, M. P. 2011. Nitric oxide inhibits nitrate reductase activity in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 124-130.

- Rowland, J. G., Pang, X., Suzuki, I., Murata, N., Simon, W. J. & Slabas, A. R. 2010. Identification of components associated with thermal acclimation of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC6803. *PLoS ONE*, 5, e10511.
- Sagor, G. H. M., Berberich, T., Takahashi, Y., Niitsu, M. & Kusano, T. 2013. The polyamine spermine protects *Arabidopsis* from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic Research*, 22, 595-605.
- Saied, A. S., Keutgen, A. J. & Noga, G. 2005. The influence of NaCl salinity on growth, yield and fruit quality of strawberry cvs. 'Elsanta' and 'Korona'. *Scientia Horticulturae*, 103, 289-303.
- Samanta, P., Sadhukhan, S., Das, S., Joshi, A., Sen, S. & Basu, A. 2011. Isolation of RNA from field-grown jute (*Corchorus capsularis*) plant in different developmental stages for effective downstream molecular analysis. *Molecular Biotechnology*, 49, 109-115.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sang, J., Jiang, M., Lin, F., Xu, S., Zhang, A. & Tan, M. 2008. Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular antioxidant defense in maize plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 231-243.
- Sangwan, V., Orvar, B. L., Beyerly, J., Hirt, H. & Dhindsa Rajinder, S. 2002. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant Journal*, 31, 629-638.
- Schmidt, H. H. H. W. & Walter, U. 1994. NO at work. *Cell*, 78, 919-925.
- Schöffl, F., Prandl, R. & Reindl, A. 1999. Molecular responses to heat stress. In: Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (eds.) *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*. Austin, Texas: R.G. Landes Co, pp. 81-98.
- Schöffl, F., Prändl, R. & Reindl, A. 1998. Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiology*, 117, 1135-1141.
- Shan, C.-J., Zhang, S.-L., Li, D.-F., Zhao, Y.-Z., Tian, X.-L., Zhao, X.-L., Wu, Y.-X., Wei, X.-Y. & Liu, R.-Q. 2011. Effects of exogenous hydrogen sulfide on the ascorbate and glutathione metabolism in wheat seedlings leaves under water stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 2533-2540.

- Shan, C., Dai, H. & Sun, Y. 2012. Hydrogen sulfide protects wheat seedlings against copper stress by regulating the ascorbate and glutathione metabolism in leaves. *Australian Journal of Crop Science*, 6, 248-254.
- Shao, H.-B., Chu, L.-Y., Shao, M.-A., Jaleel, C. A. & Hong-Mei, M. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 433-441.
- Shapiro, A. D. 2005. Nitric oxide signaling in plants. *Vitamins and Hormones*, 72, 339-398.
- Sharkey, T. D. 2005. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell and Environment*, 28, 269-277.
- Sharma, A. D., Gill, P. K. & Singh, P. 2003. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, 314, 319-321.
- Shi, H., Xiong, L., Stevenson, B., Lu, T. & Zhu, J. K. 2002. The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance. *Plant Cell*, 14, 575-88.
- Shulaev, V., Sargent, D. J., Crowhurst, R. N., Mockler, T. C., Folkerts, O., Delcher, A. L., Jaiswal, P., et al. 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat Genet*, 43, 109-116.
- Siegrist, J., Orober, M. & Buchenauer, H. 2000. β -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56, 95-106.
- Simirgiotis, M. J. & Schmeda-Hirschmann, G. 2010. Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD-ESI-MS and free radical quenching techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 545-553.
- Simontacchi, M., Jasid, S. N. & Puntarulo, S. 2004. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Science*, 167, 839-847.

- Sims, D. A. & Gamon, J. A. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, 81, 337-354.
- Singh, B. K., Sharma, S. R. & Singh, B. 2010. Antioxidant enzymes in cabbage: Variability and inheritance of superoxide dismutase, peroxidase and catalase. *Scientia Horticulturae*, 124, 9-13.
- Sirova, J., Sedlarova, M., Piterkova, J., Luhova, L. & Petrivalsky, M. 2011. The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Science*, 181, 560-572.
- Smart, M. & Roden, L. C. 2010. A small-scale RNA isolation protocol useful for high-throughput extractions from recalcitrant plants. *South African Journal of Botany*, 76, 375-379.
- Song, L., Ding, W., Shen, J., Zhang, Z., Bi, Y. & Zhang, L. 2008. Nitric oxide mediates abscisic acid induced thermotolerance in the calluses from two ecotypes of reed under heat stress. *Plant Science*, 175, 826-832.
- Sparatore, A., Perrino, E., Tazzari, V., Giustarini, D., Rossi, R., Rossoni, G., Erdman, K., Schröder, H. & Soldato, P. D. 2009. Pharmacological profile of a novel H₂S-releasing aspirin. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 586-592.
- Srivastava, A. K., Srivastava, S., Penna, S. & D'souza, S. F. 2011. Thiourea orchestrates regulation of redox state and antioxidant responses to reduce the NaCl-induced oxidative damage in Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 676-686.
- Sticher, L., Mauchmani, B. & Metraux, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 235-270.
- Sultana, S., Khew, C.-Y., Morshed, M. M., Namasivayam, P., Napis, S. & Ho, C.-L. 2012. Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (AeMDHAR) confers salt tolerance on rice. *Journal of Plant Physiology*, 169, 311-318.
- Sumbele, S., Fotelli, M., Nikolopoulos, D., Tooulakou, G., Liakoura, V., Liakopoulos, G., Bresta, P., Dotsika, E., Adams, M. & Karabourniotis, G. 2012. Photosynthetic capacity is negatively correlated with the concentration of leaf phenolic compounds across a range of different species. *AoB Plants*, pls025; doi:10.1093/aobpla/pls025.

- Sung, D. Y., Kaplan, F., Lee, K. J. & Guy, C. L. 2003. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science*, 8, 179-187.
- Suzuki, N. & Mittler, R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*, 126, 45-51.
- Szalai, G., Kellős, T., Galiba, G. & Kocsy, G. 2009. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 66-80.
- Tan, B. H., Wong, P. T. H. & Bian, J.-S. 2010. Hydrogen sulfide: A novel signaling molecule in the central nervous system. *Neurochemistry International*, 56, 3-10.
- Tan, W., Meng, Q. W., Brestic, M., Olsovska, K. & Yang, X. 2011. Photosynthesis is improved by exogenous calcium in heat-stressed tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*, 168, 2063-2071.
- Tang, M., Liu, X., Deng, H. & Shen, S. 2011. Over-expression of JcDREB, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor gene in woody biodiesel plant *Jatropha curcas*, enhances salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 181, 623-631.
- Tanou, G., Filippou, P., Belghazi, M., Job, D., Diamantidis, G., Fotopoulos, V. & Molassiotis, A. 2012 α . Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *The Plant Journal*, 72, 585-599.
- Tanou, G., Fotopoulos, V. & Molassiotis, A. 2012 β . Priming against environmental challenges and proteomics in plants: Update and agricultural perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 3, 216.
- Tanou, G., Job, C., Belghazi, M., Molassiotis, A., Diamantidis, G. & Job, D. 2010. Proteomic signatures uncover hydrogen peroxide and nitric oxide cross-talk signaling network in citrus plants. *Journal of Proteome Research*, 9, 5994-6006.
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G., Molassiotis, A. & Job, D. 2009 α . Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *The Plant Journal*, 60, 795-804.

- Tanou, G., Molassiotis, A. & Diamantidis, G. 2009 β . Hydrogen peroxide- and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1904-1913.
- Tian, M., Gu, Q. & Zhu, M. 2003. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Science*, 165, 701-707.
- Ton, J., Ent, S. V. D., Hulten, M. H. A. V., Pozo, M., Oosten, V. V., Loon, L. C. V., Mauch-Mani, B. & Turlings, T. C. J. Priming as a mechanism behind induced resistance against pathogens, insects and abiotic stress. *In*: Schmitt, A., Birch, N., Dicke, M. & Mauch-Mani, B., (eds). Induced resistance in plants against insects and diseases 2009 Granada, Spain. IOBC/wprs Bulletin, pp. 3-13.
- Ton, J., Jakab, G., Toquin, V., Flors, V., Iavicoli, A., Maeder, M. N., Metraux, J. P. & Mauch-Mani, B. 2005. Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 987-99.
- Ton, J. & Mauch-Mani, B. 2004. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal*, 38, 119-130.
- Ton, J., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. J. 2002. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 27-34.
- Tseng, M. J., Liu, C.-W. & Yiu, J.-C. 2007. Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 822-833.
- Tulipani, S., Mezzetti, B., Capocasa, F., Bompadre, S., Beekwilder, J., De Vos, C. H. R., Capanoglu, E., Bovy, A. & Battino, M. 2008. Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 696-704.
- Tuna, A. L., Kaya, C., Dikilitas, M. & Higgs, D. 2008 α . The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and Experimental Botany*, 62, 1-9.

- Tuna, A. L., Kaya, C., Higgs, D., Murillo-Amador, B., Aydemir, S. & Girgin, A. R. 2008 β . Silicon improves salinity tolerance in wheat plants. *Environmental and Experimental Botany*, 62, 10-16.
- Tuteja, N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. In: Dieter, H. & Helmut, S. (eds.) *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 419-438.
- Uchida, A., Jagendorf, A. T., Hibino, T., Takabe, T. & Takabe, T. 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*, 163, 515-523.
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M. & Shinozaki, K. 2010. Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 132-138.
- Ushimaru, T., Nakagawa, T., Fujioka, Y., Daicho, K., Naito, M., Yamauchi, Y., Nonaka, H., Amako, K., Yamawaki, K. & Murata, N. 2006. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 163, 1179-1184.
- Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M. V., Colmenero-Varea, P., Del Río, L. A. & Barroso, J. B. 2007. Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters*, 581, 453-461.
- Van Den Burg, H. A. & Takken, F. L. W. 2009. Does chromatin remodeling mark systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science*, 14, 286-294.
- Van Der Ent, S., Van Hulten, M., Pozo, M. J., Czechowski, T., Udvardi, M. K., Pieterse, C. M. & Ton, J. 2009. Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and beta-aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytologist*, 183, 419-31.
- Van Hulten, M., Pelsler, M., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J. & Ton, J. 2006. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 5602-5607.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. & Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453-483.
- Van Loon, L. C., Geraats, B. P. J. & Linthorst, H. J. M. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 11, 184-191.
- Van Wees, S. C. M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., Van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. J. 1999. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is

- not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology*, 41, 537-549.
- Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentajac, M. & Pugin, A. 2006. Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 429-440.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inzé, D. & Van Breusegem, F. 2005. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology*, 139, 806-821.
- Verma, S. & Mishra, S. N. 2005. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *Journal of Plant Physiology*, 162, 669-677.
- Vinocur, B. & Altman, A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 123-132.
- Volkov, R., Panchuk, I., Mullineaux, P. & Schöffl, F. 2006. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 61, 733-746.
- Vranova, E., Inze, D. & Van Breusegem, F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1227-1236.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. & Foolad, M. R. 2007 α . Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 199-223.
- Wahid, A., Perveen, M., Gelani, S. & Basra, S. M. A. 2007 β . Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. *Journal of Plant Physiology*, 164, 283-294.
- Wahid, A., Sehar, S., Perveen, M., Gelani, S., Basra, S. M. A. & Farooq, M. 2008. Seed pretreatment with hydrogen peroxide improves heat tolerance in maize at germination and seedling growth stages. *Seed Science and Technology*, 36, 633-645.

- Wahid, A. & Shabbir, A. 2005. Induction of heat stress tolerance in barley seedlings by pre-sowing seed treatment with glycinebetaine. *Plant Growth Regulation*, 46, 133-141.
- Wallace, J. L., Caliendo, G., Santagada, V., Cirino, G. & Fiorucci, S. 2007. Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat. *Gastroenterology*, 132, 261-271.
- Wan, C. & Wilkins, T. A. 1994. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Analytical Biochemistry*, 223, 7-12.
- Wang, B.-L., Shi, L., Li, Y.-X. & Zhang, W.-H. 2010 α . Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Planta*, 231, 1301-1309.
- Wang, F.-Z., Wang, Q.-B., Kwon, S.-Y., Kwak, S.-S. & Su, W.-A. 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology*, 162, 465-472.
- Wang, H.-H., Huang, J.-J. & Bi, Y.-R. 2010 β . Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Science*, 179, 281-288.
- Wang, L.-J. & Li, S.-H. 2006. Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca²⁺ homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Science*, 170, 685-694.
- Wang, L. & Stegemann, J. P. 2010. Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials*, 31, 1612-1618.
- Wang, L. J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Liu, G. J., Cheng, J. S., Luo, H. B. & Li, S. H. 2010 γ . Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *BMC Plant Biology*, 10:34.
- Wang, R. 2002. Two's company, there's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal*, 16, 1792-1798.
- Wang, S. & Lin, H. 2003. Compost as a soil supplement increases the level of antioxidant compounds and oxygen radical absorbance capacity in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6844-50.

- Wang, W., Vinocur, B. & Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1-14.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. & Altman, A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9, 244-252.
- Wang, X., Cai, J., Jiang, D., Liu, F., Dai, T. & Cao, W. 2011. Pre-anthesis high-temperature acclimation alleviates damage to the flag leaf caused by post-anthesis heat stress in wheat. *Journal of Plant Physiology*, 168, 585-593.
- Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W. & Wang, R. 2012. Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant and Soil*, 351, 107-119.
- Wang, Y., Yu, Q., Tang, X. & Wang, L. 2009. Calcium pretreatment increases thermotolerance of *Laminaria japonica* sporophytes. *Progress in Natural Science*, 19, 435-442.
- Wang, Z.-Q., Yuan, Y.-Z., Ou, J.-Q., Lin, Q.-H. & Zhang, C.-F. 2007. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *Journal of Plant Physiology*, 164, 695-701.
- Wang, Z. Q., Ma, Z. B., Wang, C. L. & Lin, T. B. 2010δ. Exogenous Ca²⁺ alleviates nitrogen and water deficit, and improves growth of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to high temperature. *Plant Growth Regulation*, 61, 223-229.
- Wendehenne, D., Durner, J. & Klessig, D. F. 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 449-455.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. F. & Durner, J. R. 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science*, 6, 177-183.
- Wilson, I. D., Neill, S. J. & Hancock, J. T. 2008. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment*, 31, 622-631.
- Wilson, K., Ivanov, A., Ivanov, A., Grodzinski, B., Sarhan, F. & Huner, N. A. 2006. Energy balance, organellar redox status, and acclimation to environmental stress. *Canadian Journal of Botany*, 84, 1355-1370.

- Wilson, L. G., Bressan, R. A. & Filner, P. 1978. Light-dependent emission of hydrogen sulfide from plants. *Plant Physiology*, 61, 184-189.
- Wise, R. R., Olson, A. J., Schrader, S. M. & Sharkey, T. D. 2004. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. *Plant, Cell and Environment*, 27, 717-724.
- Wu, T.-H., Liao, M.-H., Kuo, W.-Y., Huang, C.-H., Hsieh, H.-L. & Jinn, T.-L. 2011. Characterization of copper/zinc and manganese superoxide dismutase in green bamboo (*Bambusa oldhamii*): Cloning, expression and regulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 195-200.
- Xu, C. & Huang, B. 2008. Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 59, 4183-4194.
- Xu, J., Li, H.-D., Chen, L.-Q., Wang, Y., Liu, L.-L., He, L. & Wu, W.-H. 2006. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*, 125, 1347-1360.
- Xu, Y., Sun, X., Jin, J. & Zhou, H. 2010. Protective effect of nitric oxide on light-induced oxidative damage in leaves of tall fescue. *Journal of Plant Physiology*, 167, 512-518.
- Xuan, Y., Zhou, S., Wang, L., Cheng, Y. & Zhao, L. 2010. Nitric oxide functions as a signal and acts upstream of AtCaM3 in thermotolerance in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, 153, 1895-1906.
- Yamada, M., Hidaka, T. & Fukamachi, H. 1996. Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Scientia Horticulturae*, 67, 39-48.
- Yamasaki, H. & Sakihama, Y. 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters*, 468, 89-92.
- Yamasaki, S. & Dillemburg, L. R. 1999. Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11, 69-75.
- Yang, K. A., Lim, C. J., Hong, J. K., Park, C. Y., Cheong, Y. H., Chung, W. S., Lee, K. O., Lee, S. Y., Cho, M. J. & Lim, C. O. 2006. Identification of cell wall genes modified by a permissive high temperature in Chinese cabbage. *Plant Science*, 171, 175-182.
- Yin, X., Allan, A. C., Chen, K. & Ferguson, I. B. 2010. Kiwifruit EIL and ERF genes involved in regulating fruit ripening. *Plant Physiology*, 153, 1280-1292.

- Yiu, J.-C., Liu, C.-W., Yi-Tan Fang, D. & Lai, Y.-S. 2009. Waterlogging tolerance of Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) enhanced by exogenous spermidine and spermine. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 710-716.
- Zago, E., Morsa, S., Dat, J. F., Alard, P., Ferrarini, A., Inze, D., Delledonne, M. & Van Breusegem, F. 2006. Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology*, 141, 404-411.
- Zhang, H., Hu, L., Li, P., Hu, K., Jiang, C. & Luo, J. 2010 α . Hydrogen sulfide alleviated chromium toxicity in wheat. *Biologia Plantarum*, 54, 743-747.
- Zhang, H., Hu, L. Y., Hu, K. D., He, Y. D., Wang, S. H. & Luo, J. P. 2008. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 1518-1529.
- Zhang, H., Hu, S.-L., Zhang, Z.-J., Hu, L.-Y., Jiang, C.-X., Wei, Z.-J., Liu, J., Wang, H.-L. & Jiang, S.-T. 2011 α . Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 251-257.
- Zhang, H., Jiao, H., Jiang, C.-X., Wang, S.-H., Wei, Z.-J., Luo, J.-P. & Jones, R. 2010 β . Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32, 849-857.
- Zhang, H., Tan, Z. Q., Hu, L. Y., Wang, S. H., Luo, J. P. & Jones, R. L. 2010 γ . Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 556-567.
- Zhang, H., Tang, J., Liu, X.-P., Wang, Y., Yu, W., Peng, W.-Y., Fang, F., Ma, D.-F., Wei, Z.-J. & Hu, L.-Y. 2009 α . Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51, 1086-1094.
- Zhang, H., Ye, Y.-K., Wang, S.-H., Luo, J.-P., Tang, J. & Ma, D.-F. 2009 β . Hydrogen sulfide counteracts chlorophyll loss in sweetpotato seedling leaves and alleviates oxidative damage against osmotic stress. *Plant Growth Regulation*, 58, 243-250.
- Zhang, J. H., Huang, W. D., Liu, Y. P. & Pan, Q. H. 2005. Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under cross-temperature stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47, 959-970.

- Zhang, J. X., Wang, C., Yang, C. Y., Wang, J. Y., Chen, L., Bao, X. M., Zhao, Y. X., Zhang, H. & Liu, J. 2010 δ . The role of *Arabidopsis* AtFes1A in cytosolic Hsp70 stability and abiotic stress tolerance. *Plant Journal*, 62, 539-548.
- Zhang, L.-L., Zhu, S.-H., Chen, C.-B. & Zhou, J. 2011 β . Metabolism of endogenous nitric oxide during growth and development of apple fruit. *Scientia Horticulturae*, 127, 500-506.
- Zhang, W., Jiang, B., Li, W., Song, H., Yu, Y. & Chen, J. 2009 γ . Polyamines enhance chilling tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through modulating antioxidative system. *Scientia Horticulturae*, 122, 200-208.
- Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, Q., Wei, Q. & Zhang, W. 2006. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta*, 224, 545-555.
- Zhou, B., Guo, Z., Xing, J. & Huang, B. 2005. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *Journal of Experimental Botany*, 56, 3223-3228.
- Zhu, J.-K. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124, 941-948.
- Zhu, J.-K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247-273.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Metraux, J.-P. & Mauch-Mani, B. 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 12920-12925.

9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ