



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Γεωπονικής
Βιοτεχνολογίας
Τομέας Βιολογίας Φυτών
Εργαστήριο Φυσιολογίας
και Μορφολογίας **Φυτών**

«Διαχείριση του σιδήρου σε φυτά
αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε
συνθήκες έλλειψης θεικών»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
στα πλαίσια του
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ **ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ** ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Χαρίκλεια Καζίλα

Αθήνα 2011

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών

Μεταπτυχιακή Διατριβή με τίτλο: «Διαχείριση του σιδήρου σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε συνθήκες έλλειψης θεικών»

Ον/μο φοιτήτριας: Χ. Καζίλα

Τόπος: Αθήνα 2011

Επιβλέπων Καθηγητής: καθ. Δ. Μπουράνης

Η ανάθεση της μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της γενικής συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (5.7.2011) με αρ. πρωτοκόλλου 1158/30.6.2011, κατά την οποία εγκρίθηκε το θέμα «Διαχείριση του σιδήρου σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε συνθήκες έλλειψης θεικών» για την φοιτήτρια Χαρίκλεια Καζίλα και ορίστηκε 3μελής εξεταστική επιτροπή, η οποία απαρτίζεται από τους:

Δ. Μπουράνης, Καθηγητής	(Επιβλέπων)
Π. Κατινάκης, Καθηγητής	(Μέλος)
Σ. Χωριανοπούλου, Λέκτορας	(Μέλος)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρόσληψη και η διαχείριση του σιδήρου αποτελεί ένα μεγάλο πεδίο έρευνας για τη φυσιολογία της θρέψης του φυτού. Στις διαδικασίες αυτές συμμετέχουν διάφοροι μεταβολίτες, πρωτεΐνες, μορφολογικές δομές και βιοχημικές διεργασίες που καταλύουν διεργασίες σχετικές με την διαχείρισή του.

Συγκεκριμένα, τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της ριζόσφαιρας ευνοούν τη δημιουργία εναποθέσεων σιδήρου που κάνει το πρόβλημα της πρόσληψης του σιδήρου ακόμα πιο περίπλοκο. Ο σίδηρος που υπάρχει στο θρεπτικό διάλυμα προσλαμβάνεται από το φυτό με την απελευθέρωση φυτοσιδηροφόρων, που είναι τροποποιημένα μόρια νικοτιαναμίνης. Τα φυτοσιδηροφόρα (PS) δεσμεύουν τον Fe^{3+} και το σύμπλοκο Fe-PS περνάει μέσα από τα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας με τον μεταφορέα ZmYS1. Ο σίδηρος στη συνέχεια διακινείται μέσα στο φυτό με το σύμπλεγμα νικοτιαναμίνης-Fe ή κιτρικού-Fe. Για τη διακυτταρική μεταφορά του συμπλόκου χρησιμοποιούνται γενικότερα μεταφορείς τύπου YSL που για την περίπτωση του αραβοσίτου, απαντούν στην ίδια ισομορφή με τον YS1.

Η μελέτη έγινε σε φυτά καλαμποκιού που αναπτύχθηκαν σε σύστημα υδροπονίας με θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο, καθώς και σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και μελετήθηκε η κατανομή του σιδήρου στο σπόρο, το υπέργειο και το ριζικό. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν κατάλληλα και ο σίδηρος προσδιορίστηκε με ατομική απορρόφηση. Στα δείγματα έγινε χειρισμός με DCB ένα διάλυμα αλάτων το οποίο συμπλοκοποιεί το σίδηρο και τον απομακρύνει από τις εξωτερικές επιφάνειες των επιδερμικών κυττάρων. Τα επίπεδα του σιδήρου στη ρίζα μετά τον χειρισμό είναι έντονα μειωμένα, όπως επίσης χαμηλότερος ήταν και στο σπόρο και στα φύλλα. Επαληθεύτηκε η σχέση του θείου με το σίδηρο όπου μειωμένη πρόσληψη θείου, οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα σιδήρου στους ιστούς. Παράλληλα, συσχετίστηκε η ξηρή μάζα με τον περιεχόμενο σίδηρο χωρίς και με το χειρισμό με DCB και βρέθηκε ότι η συσσώρευση του σιδήρου έχει θετική συσχέτιση με την αύξηση της βιομάζας στα control φυτά αλλά αρνητική στα -S φυτά.

Σε επόμενη φάση εφαρμόστηκε ιστοχημική χρώση Perl στο ριζικό σύστημα των φυτών και ακολούθησε μακροσκοπική και στερεοσκοπική παρατήρηση. Η μακροσκοπική παρατήρηση ολόκληρου του ριζικού συστήματος, εξαιτίας της διαβάθμισης του prussian blue που σχηματιζόταν έδειξε ότι πιθανόν στη ρίζα να υπάρχουν ιόντα Fe τόσο δισθενή όσο και τρισθενή. Η μακροσκοπική παρατήρηση των διαφόρων μερών της ρίζας οδήγησε σε χαρτογράφηση της χρώσης στις πρωτογενείς, δευτερογενείς και βλαστογενείς ρίζες, με άμεσο αποτέλεσμα την συσχέτιση της άβαφης περιοχής με το ακρορίζιο, περιοχή από την οποία εκκρίνονται τα φυτοσιδηροφόρα. Επιπλέον, η στερεοσκοπική παρατήρηση έδωσε μια εικόνα των εναποθέσεων στη ρίζα, το σπόρο και τη βάση του βλαστού, ορίζοντας τις εναποθέσεις ως λεπτά υμένια που δεν εισέρχονται στα επιδερμικά

κύτταρα, βλέννες που συναντώνται στη ριζόσφαιρα γενικά αλλά και ειδικότερα κοντά στο ακρορίζιο (root mucilage) και σχηματισμούς δικτύων στις επίπεδες επιφάνειες του σπόρου και του βλαστού.

Τέλος, έγινε μελέτη του μεταφορέα ZmYS1 με τη μέθοδο της qRT-PCR, σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό ελλειμματικό σε θείο. Η έκφραση του μεταφορέα βρέθηκε μικρή και μόνο για τις πρώτες μέρες του πειράματος στο υπέργειο και τη ρίζα των control φυτών, ενώ φάνηκε ένα ασθενές σήμα για τις ρίζες των -S φυτών, που όμως σε σχέση με το μηδενικό σήμα που αντιστοιχεί στα φύλλα αποτελεί μια σημαντική έκφραση του μεταφορέα.

ABSTRACT

Iron intake and management is a major area of research for plant nutrition physiology. A number of metabolites, proteins, structures and biochemical functions are involved in these procedures.

More specific, iron depositions which are formed in the rhizosphere make the problem of iron's intake more complicated. Iron that is diluted at the nutrient solution is absorbed by binding molecules, phytosiderophores (PS), which are modified nico-tianamine molecules. PS chelates Fe^{3+} and the PS-Fe complex is transferred into root's epidermal cells using ZmYS1 transporter. Iron trafficks in the plant as a nico-tianamine-PS complex or citric-Fe complex. This complex passes through paren-chyma or companion cells, or other type of cells, by YS1 transporters in the above-ground tissues, as well.

Iron deposition was monitored in maize plants cultivated in hydroponic system by means of a sulfur-deprived nutrient solution against a complete one. After samples processing, iron concentration was determined by atomic absorption spectrometry. Also, DCB treatment was performed, as this salt solution is capable for chelating iron and removing it from the surface of the root epidermal cells. Iron's levels were found to be reduced after this treatment. Iron was reduced in seeds and leaves after DCB treatment. A consequence of the -S treatment the iron levels were reduced in the plant tissues. Moreover, the dry mass accumulation was correlated with the accumulated iron amounts before and after DCB treatment and it was found that iron accumulation was positively correlated with the increase of biomass in control plants, whilst it was negatively correlated in the -S plants.

In addition, the whole root system of plants showed that in the rhizosphere Fe^{3+} cations may coexist with Fe^{2+} ones. Stain mapping in the root revealed that the root tip area was unstained, a result that is in line with phytosiderophores release by this root section. Iron deposition seemed to coexist in various forms, like thin layers are not entering the epidermal cell's symplast, and accumulated mucus at the epidermal cells surface, as well as the seed and shoot surfaces in contact with the nutrient solution.

Finally, ZmYS1 gene expression was studied by means of qRT-PCR relative to ubiquitine in both sulphur deprived maize plantlets and control ones. When the plants were grown in the complete nutrient solution ZmYS1 was expressed in lower levels and only at the beginning of the experiment. On the other hand, the weak signal

which observed in the -S roots was a remarkable result compared with the diminutive ZmYS1 expression in shoots and leaves.

Στους γονείς μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημητρίου Μπουράνη, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας με τίτλο Βιοτεχνολογία και Εφαρμογές στη Γεωπονία στην κατεύθυνση Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών.

Η εργασία του ΜΔΕ που μου ανατέθηκε θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί χωρίς τη συμβολή προσώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω. Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή κ. Δ. Μπουράνη για την πολύτιμη παρουσία του στις σπουδές μου. Το ενδιαφέρον του για τους φοιτητές και το Ίδρυμα ήταν αυτό που με κέντρισε και ήδη από το 3^ο έτος των σπουδών μου αναζήτησα την καθοδήγησή του. Πολλές ήταν οι φορές που η έμπειρη συμβουλή του και το αμέριστο ενδιαφέρον του έλυσαν προβλήματα, έδωσαν καινούριες προοπτικές και έπλασαν τη σκέψη μου έτσι ώστε από πρωτόλεια να τείνει να γίνει επιστημονική και τεκμηριωμένη. Θα αποτελεί πάντα πρότυπο πανεπιστημιακού και ανθρώπου για μένα.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής και εξεταστικής μου επιτροπής, τον κ. Π. Κατινάκη για την ειλικρινή και βοηθητική συνεργασία του, καθώς επίσης και τη Λέκτορα Στυλιανή Χωριανοπούλου, χωρίς τη βοήθεια της οποίας θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία. Τα αισθήματα ευγνωμοσύνης μου είναι βαθιά για την πολύτιμη βοήθειά της, τη στοχευμένη και μεθοδική σκέψη της, τη διάθεσή της να ωθήσει προς την ουσιαστική επιστημονική εργασία που αποτέλεσαν πυξίδα για την παρούσα εργασία, αλλά και εφόδιο και τη μετέπειτα πορεία μου. Δεν μπορώ να παραλείψω τη βοήθεια της Λέκτορος Μαρίας Δήμου, που ήδη από τα προπτυχιακά χρόνια προσπάθησε να με μυήσει στα μυστικά της εργαστηριακής καθημερινότητας δίνοντάς μου μαθήματα που αποτελούν ακριβώς αποκτήματα της εμπειρίας της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Φυτών για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε προσπαθώντας να λύσουμε το μυστήριο της έρευνας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστώ στον πατέρα και τη μητέρα μου που δεν έπαψαν ποτέ να πιστεύουν σε μένα, να με καθοδηγούν, να με διορθώνουν και να βοηθούν με το δικό τους μοναδικό τρόπο, όταν τους το ζητούσα αλλά και όταν το διαισθάνονταν. Χάρис στα αδέρφια μου Χρήστο, Αιμιλία, Κατερίνα, Θεοδοσία και Σεραφείμ πολλές απ' τις σελίδες αυτής της εργασίας απέκτησαν άλλη προοπτική και αρτιότερη εμφάνιση και περιεχόμενο.

Τέλος, η ευγνωμοσύνη μου στο Θεό είναι μεγάλη γιατί με αξίωσε κλείσω άλλο ένα σημαντικό κεφάλαιο της ζωής μου: τα φοιτητικά μου χρόνια..

Περίληψη
Abstract
Πρόλογος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. Εισαγωγή

A.1 Γενικά για το καλαμπόκι.....	16
A.2 Μορφολογία καλαμποκιού.....	16
A.2.1 Ριζικό σύστημα.....	16
A.2.2 Ο Βλαστός.....	17
A.2.3 Τα φύλλα.....	17
A.3 Ανάπτυξη των φυτών.....	17
A. 3. 1 Φύτρωμα του σπόρου και ανάπτυξη των φυταρίων.....	17
A.3.2 Ανάπτυξη του ριζικού συστήματος.....	18
A.3.3 Βλαστητική ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος.....	18
A.4. Προσαρμοστικότητα.....	19
A.4.1 Θερμοκρασία.....	19
A.4.2 Φωτοπερίοδος.....	19
A.5 Θείο.....	20
A.5.1 Οι πηγές θείου για το φυτό.....	20
A.5.2 Η απορρόφηση των θεικών από τη ρίζα.....	20
A.5.3 Η μετακίνηση των θεικών μέσα στο φυτό.....	20
A.5.4 Λειτουργίες	21
A.5.4.1 Τα αμινοξέα και οι πρωτεΐνες που περιέχουν θείο....	21
A.5.5 Έλλειψη.....	22
A.5.5.1 Τα αίτια για την έλλειψη του θείου.....	22
A.5.5.2 Τα συμπτώματα της έλλειψης θείου στο φυτό.....	22
A.6 Σίδηρος.....	23
A.6.1 Η φυσιολογία του σιδήρου στο φυτό.....	24
A.6.1.1 Πρόσληψη.....	24
A.6.1.2 Μεταφορά και αφομοίωση.....	25
A.6.1.3 Λειτουργίες.....	25
A.6.1.4 Εύρος επάρκειας.....	26
A.6.1.5 Έλλειψη.....	26
A.6.1.6 Τοξικότητα.....	26
A.6.2 Αλληλεπιδράσεις.....	27
A.6.3.1 pH και ασβέστωση.....	27
A.6.3.2 Άζωτο.....	27

A.6.3.2 Φωσφόρος.....	27
A.6.3.3 Κάλιο.....	27
A.6.3.4 Βόριο, χαλκός & μαγγάνιο.....	27
A.6.3.5 Χλώριο.....	28
A.6.3.6 Θείο.....	28
A.7 Οι μεταφορείς yellow stripe like (YSL) στα φυτά.....	29
A.7.1 Ο φυσιολογικός ρόλος των YSL, τα ιδρυτικά μέλη της ομάδας και η απορρόφηση του σιδήρου από τις ρίζες των αγρωστωδών.....	29
A.7.2 Πρόσληψη και μεταφορά του σιδήρου, διαφορετικές λειτουργίες για τις πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας.....	30
A.7.3 Ο ρόλος των YSLs στην μεταλλική ομοίωση: μελέτη της γονιδιακής τους έκφρασης.....	32
A.7.4 Τοπολογικός προσδιορισμός των YSL γονιδίων στους ιστούς.....	32
A.7.5 Ο ρόλος των YSLs στην ανάπτυξη των αναπαραγωγικών οργάνων.....	33
A.8 Εναποθέσεις σιδήρου στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας.....	35
A.8.1 Σε ποια φυτά παρουσιάζεται και σε ποιο μέρος του φυτού εδράζεται;.....	35
A.8.2 Πώς δημιουργείται in vivo και ποια η σύστασή της;.....	36
A.8.3 οπτικές παρατηρήσεις της δομής της πλάκας σιδήρου.....	37
A.8.4 Η φυσιολογική δράση των εναποθέσεων σιδήρου στο φυτό.....	39
A.8.5 Συσχέτιση των εναποθέσεων σιδήρου με το φωσφόρο.....	40
A.8.6 Σχέση των εναποθέσεων σιδήρου με το S.....	41
A.8.7 Σχέση των εναποθέσεων σιδήρου και των φυτοσιδηροφόρων.....	42
A.9 Σκοπός της εργασίας.....	43
B. Υλικά και Μέθοδοι	
B.1 Καλλιέργεια αραβοσίτου (<i>Zea mays</i> , L) σε υδροπονικό σύστημα.....	44
B.2. Δειγματοληψία.....	45
B.3 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.....	46
B.4 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο μετά από χειρισμό με DCB.....	48
B.5 Μελέτη της κατανομής των εναποθέσεων του σιδήρου σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο με χρήση της ιστοχημικής τεχνικής χρώσης Perl's.....	49

B.6 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης του μεταφορέα YS1 στον αραβόσιτο σε φυτά που έχουν αναπτυχθεί σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.....	50
B.6.1 Απομόνωση και καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων από φυτικούς ιστούς.....	51
B.6.1.1 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.....	51
B.6.1.2 Έλεγχος απομόνωσης RNA και γονιδιωματικού DNA. Μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA με το NanoDrop™ 2000.....	53
B.6.1.3 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	53
B.6.1.4 Καθαρισμός ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.....	55
B.6.1.4.1 Χειρισμός με DNase.....	55
B.6.1.4.2 Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη.....	55
B.6.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	57
B.6.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα μόρια RNA (RT-PCR).....	60
B.6.4 Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με τη χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (qReal Time- PCR).....	63
B.6.5 Επεξεργασία με ειδικά softwares.....	65

Γ. Αποτελέσματα

Γ.1 Προσδιορισμός της κατανομής του σιδήρου στον αραβόσιτο.	
Γ.1.1 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.....	67
Γ.1.2 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.....	69
Γ.1.3 Συγκριτική απεικόνιση κατανομής σιδήρου σε φυτά σε πλήρες και ελλειμματικό σε θείο θρεπτικό διάλυμα.....	71
Γ.2 Προσδιορισμός της κατανομής του σιδήρου με απομάκρυνση του σιδήρου από το περιβάλλον της ρίζας με χειρισμό DCB.....	73
Γ.2.1 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα με απομάκρυνση του σιδήρου από το περιβάλλον της ρίζας με χειρισμό DCB.....	73
Γ.2.2 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο με απομάκρυνση του σιδήρου από το περιβάλλον της ρίζας με χειρισμό DCB.....	74

Γ.3 Σύγκριση των συγκεντρώσεων σιδήρου για την κατανομή σιδήρου και την κατανομή σιδήρου μετά από χειρισμό με DCB.....	77
Γ.3.1 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα χωρίς χειρισμό και με χειρισμό DCB.....	77
Γ.3.2 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο χωρίς χειρισμό και με χειρισμό DCB.....	77
Γ.4 Μελέτη των συγκεντρώσεων του σιδήρου που ανιχνεύεται στο περιβάλλον της ρίζας και των συγκεντρώσεων που ανιχνεύονται στους φυτικούς ιστούς της ρίζας.....	83
Γ.5 Μελέτη και συσχέτιση της ξηρής μάζας του φυτικού ιστού και του περιεχομένου της σε σίδηρο.....	85
Γ.6 Χαρτογράφηση της διαφορικής χρώσης Perl's για το ριζικό του <i>Zea mays</i> σε control και -S συνθήκες.....	88
Γ.6.1 Μακροσκοπική παρατήρηση της χρώσης Perl's για τη ρίζα των φυτών σε πλήρες και ελλειμματικό θρεπτικό διάλυμα.....	88
Γ.7 Διαφορική χρώση ολόκληρου του ριζικού συστήματος σε σχέση με το διαφορετικό θρεπτικό περιεχόμενο των χειρισμών.....	92
Γ.7.1 Ολιστική προσέγγιση χρώσης ριζικού συστήματος σε σχέση με το διαφορετικό θρεπτικό περιεχόμενο των χειρισμών.....	92
Γ.7.2 Στερεοσκοπική παρατήρηση των εναποθέσεων σιδήρου στο περιβάλλον της ρίζας.....	93
Γ.8 In silico ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τον μεταφορέα YS1 στη ρίζα και τα φύλλα του αραβόσιτου.....	95
Γ.8.1 Μελέτη του τρόπου έκφρασης των γονιδίων του μεταφορέα yellow stripe 1 στη ρίζα και στο υπέργειο του <i>Zea mays</i>	99
Γ.9 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του μεταφορέα YS1 στο <i>Zea mays</i>	101
Γ.9.1 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του YS1 στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.....	103
Γ.9.2 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του YS1 στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.....	104

Δ. Συζήτηση	
Δ.1 Κατανομή του σιδήρου.....	106
Δ.2 Συσχέτιση της ξηρής μάζας και του περιεχομένου της σε σίδηρο.....	110
Δ.3 Χαρτογράφηση της διαφορικής χρώσης Perl's για το ριζικό του <i>Zea mays</i> σε control και -S συνθήκες.....	112
Δ.4 Διαφορική χρώση ολόκληρου του ριζικού συστήματος σε σχέση με το διαφορετικό θρεπτικό περιεχόμενο των χειρισμών.	112
Δ.5 Στερεοσκοπική παρατήρηση των εναποθέσεων σιδήρου στο περιβάλλον της ρίζας.....	112
Δ.6 Μελέτη της έκφρασης του YS1 στον αραβόσιτο.	113
Δ.6.1 Μελέτη της έκφρασης του μεταφορέα σε φυτά καλαμποκιού που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.	113
Δ.6.2 Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης του μεταφορέα YS1 και της γονιδιακής έκφρασης των φερριτινών στον αραβόσιτο.	115
E. Συμπεράσματα.....	119
ΣΤ. Βιβλιογραφία.....	122

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. Εισαγωγή

A.1 Γενικά για το καλαμπόκι

Το καλαμπόκι (*Zea mays, L.*) είναι η δεύτερη κατά σειρά σπουδαιότητας καλλιέργεια όσον αφορά στα δημητριακά, αμέσως μετά το σιτάρι. Η συνολική παγκόσμια παραγωγή υπερβαίνει τα 400 εκατομμύρια τόνους (FAO, 1992). Αποτελεί το κυριότερο δημητριακό για τη διατροφή του ανθρώπου. Στην Ελλάδα χρησιμοποιείται και ως ζωοτροφή, καθώς επίσης και ως πηγή αρκετών βιομηχανικών προϊόντων.

A.2 Μορφολογία καλαμποκιού

A.2.1 Ριζικό σύστημα

Το ριζικό σύστημα αποτελείται από 3 κατηγορίες ριζών.

α) Εμβρυακές ρίζες. Διακρίνονται στην πρωτογενή εμβρυακή ρίζα, που προέρχεται από την επιμήκυνση του ριζιδίου του εμβρύου (Yamashita 1991, Yamashita and Ueno 1992), και στις δευτερογενείς εμβρυακές ρίζες, οι καταβολές των οποίων βρίσκονται στο μεσοκοτύλιο, κοντά στο σπόρο και ο αριθμός τους ποικίλει από 0 έως 13, κάτι που εξαρτάται από γενετικούς παράγοντες (Kiesselbach 1949, Sass 1977, Feldman 1994). Οι τελευταίες εκφύονται κατά ζεύγη και έχουν ως σκοπό τους τον πληρέστερο εφοδιασμό του φυταρίου με νερό και ανόργανα άλατα. Σε περίπτωση καταστροφής της πρωτογενούς ρίζας, οι δευτερογενείς αντικαθιστούν τελείως την πρωτογενή ρίζα.

β) Μόνιμες ρίζες. Αποτελούν την κύρια μάζα του ριζικού συστήματος του φυτού. Εκφύονται αμέσως κάτω από την επιφάνεια του εδάφους, από το λαιμό του φυτού που αποτελείται από τα πολύ βραχεία μεσογονάτια των πρώτων 7-8 κόμβων, μεταξύ του μεσοκοτυλίου και της επιφάνειας του εδάφους. Οι μόνιμες ρίζες εκφύονται γύρω από τον καθένα από τους υπόγειους κόμβους και έχουν τάση να προχωρούν οριζόντια, συνήθως μέχρι μία απόσταση 30-60 cm από το στέλεχος και κατόπιν να κάμπτονται κατακόρυφα και να εισχωρούν σε βαθύτερα στρώματα (Horpe *et al.* 1986, Feldman 1994, Καραμάνος 1999).

γ) Εναέριες ρίζες. Εκφύονται από τους πρώτους 2-3 κόμβους πάνω από την επιφάνεια του εδάφους κατά τα τελευταία στάδια της βλαστικής ανάπτυξης του φυτού. Όταν και εάν φθάσουν στην επιφάνεια του εδάφους, εισδύουν μέσα σε αυτό και αποκτούν τη λειτουργικότητα φυσιολογικών ριζών (Feldman, 1994). Ο αριθμός των εναέριων ριζών καθώς και οι κόμβοι από τους οποίους παράγονται διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία, την πυκνότητα της φυτείας και την θρεπτική κατάσταση των φυτών (Horpe *et al.* 1986, Καραμάνος 1999).

δ) Πλάγιες ρίζες. Οι πλάγιες ρίζες εκφύονται από τα υπόλοιπα είδη ριζών που προαναφέρθηκαν. Έχουν μεγάλη επιρροή στην αρχιτεκτονική της ρίζας (Lynch 1997), και είναι υπεύθυνες για το μεγαλύτερο μέρος της απορρόφησης του νερού και των θρεπτικών στοιχείων (McCully and Canny 1988, Wang *et al.* 1991, Varney and Canny 1993, Wang *et al.* 1994) εξαιτίας των διακλαδώσεών τους που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πλαγίων ριζών 1^{ου}, 2^{ου}, 3^{ου} και μεγαλύτερου βαθμού πλαγίων ριζών. Οι πλάγιες ρίζες προέρχονται από διαφοροποιημένα κύτταρα του περικύκλιου (Esau 1965).

Στο σύνολο της η μορφή του ριζικού συστήματος του αραβοσίτου είναι θυσσανώδης με φτωχές διακλαδώσεις και καθορίζεται κυρίως από τη διάταξη των μόνιμων ριζών στην εδαφική μάζα.

A.2.2 Ο Βλαστός

Ο βλαστός του αραβοσίτου είναι κάλαμος συμπαγής, κυλινδρικής διατομής με πλάγια επιμήκη αύλακα και φέρει συνήθως 8-21 μεσογονάτια, από τα οποία τα μεσογονάτια της βάσεως είναι βραχύτερα από εκείνα της κορυφής.

A.2.3 Τα φύλλα

Τα φύλλα αναπτύσσονται ανά ένα σε κάθε κόμβο. Ο αριθμός τους ανά φυτό, ποικίλλει από 8-48 (συνήθως 8-21) στους διάφορους βιότυπους του αραβοσίτου και είναι συνάρτηση κυρίως του γονότυπου του και δευτερευόντως της θερμοκρασίας του μεριστώματος κατά την περίοδο του σχηματισμού των καταβολών. Το φύλλο του αραβοσίτου αποτελείται από έναν ισχυρό κολεό που περιβάλλει το μεσογονάτιο μέχρι τον αμέσως επόμενο κόμβο, ένα λογχοειδές έλασμα που είναι παραλληλόνευρο και τη γλωσσίδα (Duncan and Hesketh 1968). Τα φύλλα του καλαμποκιού ανήκουν στην κατηγορία των αμφιστοματικών φύλλων, αφού έχουν στομάτια και στις δύο επιφάνειες του φύλλου. Η πολικότητα των στοματίων της επάνω και κάτω επιφάνειας ελέγχεται γενετικά και καθορίζεται από την ανάπτυξη του φύλλου (Juarez *et al.* 2004).

A.3 Ανάπτυξη των φυτών

A. 3. 1 Φύτρωμα του σπόρου και ανάδυση των φυταρίων

Όταν ο σπόρος βρεθεί υπό ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και αερισμού, αρχίζει η γνωστή πορεία των μορφολογικών και βιοχημικών μεταβολών που είναι γνωστή ως βλάστηση του σπόρου. Το νερό προκαλεί τη διαβροχή του σπόρου εισερχόμενο από το περικάρπιο και διογκώνει πρώτα την κορυφή του ριζιδίου με την κολεόρριζα με αποτέλεσμα την επιμήκυνση της τελευταίας και τη διάρρηξη του περιβλήματος του σπόρου, 2-3 μέρες μετά την έναρξη της διαβροχής

(Sass, 1955). Σε ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας και αερισμού σημαντικότατο ρόλο στην ταχύτητα βλάστησης παίζει η θερμοκρασία. Η άριστη θερμοκρασία για την βλάστησή του είναι 20°C, η ανάδυση τότε πραγματοποιείται σε διάστημα 4-6 μερών μετά τη σπορά (Aldrich *et al.* 1975).

A.3.2 Ανάπτυξη του ριζικού συστήματος

Είναι συνάρτηση της δομής του εδάφους, της θερμοκρασίας, της υγρασίας και της στάθμης των θρεπτικών στοιχείων του εδάφους. Αποφασιστικό ρόλο στη διαμόρφωση του ριζικού συστήματος παίζει η υγρασία του εδάφους και η στάθμη των θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος επηρεάζει τη διαμόρφωση του ριζικού συστήματος.

A.3.3 Βλαστητική ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος

Υποδιαιρείται σε δύο περιόδους:

α) Την περίοδο που φθάνει μέχρι το τέλος του σχηματισμού των βλαστικών καταβολών στο κορυφαίο μεριστώμα, διαρκεί περίπου 3 βδομάδες από το φύτευμα των φυτών και τελειώνει όταν τα φυτά έχουν ύψος 35-45 cm και έχουν αναπτύξει 8-10 φύλλα.

β) Την περίοδο που αρχίζει με τη μετάπτωση του κορυφαίου μεριστώματος από βλαστητικό σε αναπαραγωγικό. Στην περίοδο αυτή και μέχρι την εμφάνιση της αρσενικής ταξιανθίας (φόβης) παρατηρείται ο μεγάλος ρυθμός βλαστητικής ανάπτυξης των φυτών που χαρακτηρίζεται από έντονη επιμήκυνση των μεσογονατίων και γρήγορη εμφάνιση και ανάπτυξη των φύλλων. Στο διάστημα αυτό η φυλλική επιφάνεια αυξάνει κατά 5-10 φορές και το μήκος του στελέχους κατά 50-100 φορές. Το τελικό ύψος του φυτού είναι ένα σύνθετο αποτέλεσμα του αριθμού των μεσογονατίων που αναπτύσσει το φυτό και του μεγέθους των επί μέρους μεσογονατίων. Το μήκος των μεσογονατίων επηρεάζεται από την υδατική κατάσταση του φυτού (έλλειψη νερού προκαλεί επιβράδυνση ή και αναστολή της επιμήκυνσης των κυττάρων με αποτέλεσμα βραχύτερα μεσογονάτια), τη θερμοκρασία (που επηρεάζει θετικά την επιμήκυνση των μεσογονατίων) και την πυκνότητα φύτευσης (που επηρεάζει το ύψος των φυτών).

Ο ρυθμός φωτοσύνθεσης του αραβοσίτου είναι υψηλότερος από εκείνο των άλλων σιτηρών και επηρεάζεται α) από το φωτισμό. Συνθήκες υψηλού φωτισμού συνεπάγεται ρυθμό φωτοσύνθεσης εξαιρετικά αποδοτικό, επειδή ανήκει στα φυτά τύπου C₄, τα οποία δεν δείχνουν τάση κορεσμού σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας όπως τα φυτά τύπου C₃ β) από τη θερμοκρασία, η άριστη βρίσκεται μεταξύ 30-40°C, γ) από την ηλικία του φύλλου, η μέγιστη ικανότητα για φωτοσύνθεση παρατηρείται στα νεαρά στάδια των φύλλων και συμπίπτει με το χρόνο όπου το έλασμα των φύλλων παρουσιάζει το μέγιστο ρυθμό αυξήσεως. Ο ρυθμός φωτοσύνθεσης μειώνεται όσο αυξάνεται η ηλικία των φύλλων, δ) από τη θρεπτική κατάσταση του

φυτού, φύλλα με μικρότερη περιεκτικότητα σε άζωτο φωτοσυνθέτουν λιγότερο έντονα από φύλλα με επαρκεί ποσά αζώτου, ε) από την υδατική κατάσταση του ιστού. Λόγω της απουσίας της φωτοαναπνοής στον αραβόσιτο, οι απώλειες σε ξηρή ουσία οφείλονται κυρίως στην αναπνοή κατά τη νύχτα. Η φωτοσύνθεση και η βλαστητική ανάπτυξη φθάνουν στο μέγιστο του ρυθμού τους στους 30-33°C. Η θερμοκρασία επιδρά στο ρυθμό φωτοσύνθεσης μόνο κατά τη διάρκεια της ημέρας, ενώ στο ρυθμό ανάπτυξης όλο το εικοσιτετράωρο. Από αυτό προκύπτει ότι συνδυασμός υψηλών θερμοκρασιών κατά την μέρα και χαμηλών κατά τη νύκτα θα προκαλέσει χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης σε ολόκληρο το εικοσιτετράωρο. Αντίθετα, υψηλότερες θερμοκρασίες νύκτας αυξάνουν σημαντικά το ρυθμό ανάπτυξης.

A.4. Προσαρμοστικότητα

A.4.1 Θερμοκρασία

Ο αραβόσιτος χαρακτηρίζεται ως φυτό θερμών κλιμάτων. Για το φύτεμα των σπόρων η ελάχιστη θερμοκρασία είναι 10°C και η άριστη γύρω στους 20 °C. Η βλαστητική ανάπτυξη αυξάνει γραμμικά με τη θερμοκρασία από τους 15°C ως τους 24-30°C (Shaw 1955). Παρά το γεγονός ότι οι ρυθμοί φωτοσύνθεσης και αύξησης μεγιστοποιούνται στους 30-35 °C, θερμοκρασίες ψηλότερες των 30 °C κατά τη διάρκεια της μέρας ασκούν μάλλον ανασταλτική επίδραση στην αύξηση γιατί σχετίζονται με αυξημένες απώλειες νερού λόγω εξατμισοδιαπνοής.

A.4.2 Φωτοπερίοδος

Ο αραβόσιτος είναι φυτό βραχείας ημέρας (Kiesselbach 1950). Μακρές μέρες προκαλούν σημαντική αύξηση στη διάρκεια της βλαστητικής περιόδου, με αποτέλεσμα τη μεγάλη ανάπτυξη του φυτικού σώματος (ύψος φυτού, αριθμός φύλλων) και την πολύ όψιμη εμφάνιση των ταξιανθιών, γεγονότα που έχουν ως επακόλουθο τη σημαντική μείωση ή και εκμηδένιση της παραγωγής καρπού.

Ανόργανη θρέψη του καλαμποκιού

Λόγω της υψηλής παραγωγικότητας του σε βιομάζα και καρπό, ο αραβόσιτος απορροφά μεγάλες ποσότητες ανόργανων θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος το οποίο και εξαντλεί. Κατά συνέπεια, η διατήρηση της παραγωγικότητας της καλλιέργειας σε υψηλά επίπεδα προϋποθέτει τον επαρκή εφοδιασμό του εδάφους σε θρεπτικά στοιχεία. Οι απαιτήσεις αυτές σε συνδυασμό με την περιεκτικότητα του εδάφους στα διάφορα στοιχεία παρέχουν ενδείξεις για την ενδεδειγμένη λίπανση.

Από τα διάφορα ιχνοστοιχεία, προβλήματα στη θρέψη του αραβοσίτου δημιουργούν κυρίως ο ψευδάργυρος και ο σίδηρος και δευτερευόντως ο χαλκός.

A.5 Θείο

A.5.1 Οι πηγές θείου για το φυτό

Το φυτό αξιοποιεί το θείο που υπάρχει στα θειικά ιόντα (SO_4^{2-}) του εδαφικού διαλύματος ή στο διοξείδιο του θείου (SO_2) της ατμόσφαιρας. Τα θειικά ιόντα αποτελούν την πιο σημαντική πηγή θείου για το φυτό και παραλαμβάνονται από τις ρίζες, ενώ το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του θείου παραλαμβάνεται και χρησιμοποιείται από τα εναέρια μέρη των ανωτέρων φυτών (Mills and Jones 1996).

A.5.2 Η απορρόφηση των θεικών από τη ρίζα

Τα θειικά μετακινούνται προς τη ρίζα κυρίως με μαζική μεταφορά, η οποία κάνει την πρόσληψη να εξαρτάται από την εδαφική υγρασία. Συγκεντρώσεις 3 ως 5 mg S ανά L εδαφικού διαλύματος επαρκούν για τα περισσότερα φυτικά είδη. Τα θειικά ιόντα μόλις βρεθούν στην επιφάνεια της ρίζας απορροφούνται ενεργά αντίθετα από την ηλεκτροχημική διαβάθμιση. Το θειικό ανιόν λαμβάνεται από τις ρίζες με σχετικά αργό ρυθμό στο συνηθισμένο εύρος pH του εδάφους. Το pH του εδάφους και η παρουσία άλλων θρεπτικών στοιχείων έχει γενικά περιορισμένη επίδραση στην απορρόφηση θεικών. Για τις περισσότερες καλλιέργειες, η πρόσληψη θείου είναι παρόμοια με αυτή του φωσφόρου και κυμαίνεται από 1 kg.στρ⁻¹ για τα αγρωστώδη μέχρι 4,5 kg.στρ⁻¹ για τα σταυρανθή.

Εκτός από τη συγκέντρωση του ολικού θείου στο θρεπτικό υπόστρωμα, είναι πολύ σημαντική και η σχέση N:S, καθώς και η σχέση $\text{SO}_4\text{-S}$: ολικό-S σ' αυτό. Μία σχέση N:S = 15:1 είναι επαρκής για τα περισσότερα φυτικά είδη, για τα σταυρανθή είναι 3:1 και για τα αγρωστώδη 17:1 (Marschner 1995).

A.5.3 Η μετακίνηση των θεικών μέσα στο φυτό

Τα θειικά μετά την πρόσληψή τους μετακινούνται στο βλαστό μέσα από τα αγγεία του ξύλου. Σε περίπτωση περιορισμένης τροφοδοσίας, τα θειικά αναδιανέμονται από τις ρίζες και τους μίσχους σε νεαρότερους ιστούς. Τα παλαιότερα φύλλα δεν συνεισφέρουν σημαντικά στον εφοδιασμό των νεαρότερων ιστών με θειικά (Marschner 1995).

Η μετακίνηση των θεικών μέσα στον ηθμό είναι πολύ περιορισμένη. Το θείο που μετακινείται στον ηθμό βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή, αυτή των ενώσεων που περιέχουν σουλφυδρυλομάδες (-SH). Έτσι, τα θεικά πρέπει να αναχθούν, για να δημιουργηθούν οι σουλφυδρυλομάδες που θα ενσωματωθούν στα αμινοξέα κυστεΐνη, κυστίνη και μεθειονίνη. Η αναγωγή των θεικών γίνεται κατά κύριο λόγο στις μεμβράνες των χλωροπλαστών των πράσινων ιστών, ιδιαίτερα κατά τις φωτεινές ώρες της ημέρας.

A.5.4 Λειτουργίες

Πολλές βασικές λειτουργίες του φυτού χρειάζονται θείο για να πραγματοποιηθούν απρόσκοπτα (Marschner 1995). Δισουλφιδικοί δεσμοί (-S-S-) σχηματίζονται από δύο σουλφυδρυλομάδες (-SH) της κυστεΐνης ή της μεθειονίνης. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί συμμετέχουν στη διαμόρφωση της τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Έτσι, το θείο εμπλέκεται στη διαμόρφωση και τη δραστικότητα πολλών ενζύμων (Marschner 1995).

Μία από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες που περιέχουν θείο είναι η φερεδοξίνη. Η φερεδοξίνη συμμετέχει στην αφομοίωση του διοξειδίου του άνθρακα CO₂, στη σύνθεση της γλυκόζης, στη σύνθεση του γλουταμικού, στην ενσωμάτωση του N₂ και στην αναγωγή των νιτρικών.

Το θείο είναι συστατικό του συνενζύμου-A (CoA), των βιταμινών βιοτίνης και θειαμίνης και του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης. Το CoA έχει σημαντικό ρόλο στον κύκλο του κιτρικού οξέος και στο μεταβολισμό των λιπιδίων και των λιπαρών οξέων. Η βιοτίνη σχετίζεται με την αφομοίωση του CO₂ και την αποκαρβοξυλίωση. Η θειαμίνη δρα ως συνένζυμο στην αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού και την οξείδωση των α-κετονοξέων. Από το οργανικό ανηγμένο θείο στο φυτό, το 2% περίπου υπάρχει ως υδατοδιαλυτό θειολικό κλάσμα (R-SH). Το 90% αυτού του κλάσματος (Dekok and Stulen 1993) κάτω από κανονικές συνθήκες είναι ένα τριπεπτίδιο που ονομάζεται γλουταθειόνη και συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες του φυτού (Bergmann and Rennenberg 1993).

Το θείο είναι βασικό συστατικό των πτητικών ενώσεων που βρίσκονται σε φυτά της οικογένειας του κρεμμυδιού και του σκόρδου. Προάγει τον σχηματισμό των φυματίων στα ψυχανθή, ενεργοποιεί τον σχηματισμό των σπερμάτων και βοηθάει τα φυτά να αντέξουν στις χαμηλές θερμοκρασίες.

A.5.4.1 Τα αμινοξέα και οι πρωτεΐνες που περιέχουν θείο

Το θείο είναι συστατικό των δύο αμινοξέων κυστεΐνης και μεθειονίνης, καθώς και των πρωτεϊνών που τα περιέχουν. Και τα δύο αμινοξέα είναι πρόδρομοι άλλων

ενώσεων που περιέχουν θείο, όπως τα συνένζυμα και οι δευτερογενείς μεταβολίτες. Το θείο είτε είναι δομικό συστατικό αυτών των ενώσεων (π.χ. R₁-C-S-C-R₂), είτε δρα ως λειτουργική ομάδα (π.χ. R-SH) που συμμετέχει άμεσα σε μεταβολικές αντιδράσεις.

Η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε θείο ποικίλλει σημαντικά τόσο μεταξύ των πρωτεϊνικών κλασμάτων των επιμέρους κυττάρων όσο και μεταξύ των φυτικών ειδών. Οι πρωτεΐνες των ψυχανθών περιέχουν κατά μέσον όρο λιγότερο θείο από τις πρωτεΐνες των σιτηρών, ενώ ο λόγος N:S είναι 40:1 και 30:1 αντίστοιχα (Dijkshoorn and Wijk 1967).

Η κυστεΐνη έχει ιδιαίτερη επίδραση στη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών ως δομικό συστατικό τους. Ο αναστρέψιμος σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ δύο γειτονικών δομικών μονάδων κυστεΐνης (κυστεΐνυλο-τμήμα του μορίου) στην πολυπεπτιδική αλυσίδα έχει θεμελιώδη σημασία για την τεταρτοταγή δομή και επομένως τη λειτουργία των ενζυμικών πρωτεϊνών. Αυτός ο δεσμός μπορεί να σχηματίσει μία μόνιμη ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ πολυπεπτιδικών αλυσίδων ή μία αντιστρεπτή διπεπτιδική γέφυρα, συγκρίσιμη με τις οξειδοαναγωγικές λειτουργίες της γλουταθειόνης.

Κατά την ενυδάτωση, ο αριθμός των δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες αυξάνει με κατανάλωση σουλφυδρυλικών ομάδων και αυτή η μετάπτωση σχετίζεται με συσσωμάτωση και αποδόμηση πρωτεϊνών (Tomati and Galli 1979). Η προστασία των σουλφυδρυλικών ομάδων στις πρωτεΐνες από το σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών θεωρείται ότι έχει μεγάλη σημασία στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας του κυττάρου στην αφυδάτωση (που προκαλείται από την ξηρασία και την θερμότητα) και στην καταστροφή από ψύξη (Levitt 1980).

A.5.5 Έλλειψη

A.5.5.1 Τα αίτια για την έλλειψη του θείου

Οι βασικές αιτίες για την έλλειψη θείου σε καλλιεργούμενες φυτείες είναι:

- τα χαμηλά επίπεδα θείου στο έδαφος,
- τα υψηλά επίπεδα αζώτου στο έδαφος,
- η έκπλυση των θεικών, ή
- η ανεπαρκής παρουσία νερού

A.5.5.2 Τα συμπτώματα της έλλειψης θείου στο φυτό

Τα συμπτώματα της έλλειψης θείου μοιάζουν με τα συμπτώματα της έλλειψης αζώτου, γιατί και το θείο συμμετέχει στο σχηματισμό πρωτεϊνών και χλωροφύλλης.

Όμως, σε αντίθεση με το άζωτο, το θείο δεν είναι πολύ ευκίνητο στο φυτό. Έτσι, τα συμπτώματα της έλλειψης θείου εμφανίζονται πρώτα στα νεαρά φύλλα. Τα φύλλα με έλλειψη θείου αρχικά εμφανίζουν ελαφρά κίτρινο-πράσινο χρώμα, το οποίο αργότερα μπορεί να γίνει κόκκινο ή πορφυρό και η επιφάνειά τους είναι περιορισμένη. Οι βλαστοί γίνονται ξυλώδεις, λεπτότεροι και κοντότεροι. Οι καρποί είναι ελαφρά πράσινοι, χωρίς να είναι χυμώδεις. Η εγκατάστασή τους είναι περιορισμένη, ενώ στις καλλιέργειες για καρπό καθυστερεί η ωρίμανση. Οι ρίζες είναι μακρύτερες απ' ό τι συνήθως και στα ψυχανθή, η δημιουργία φυματίων είναι περιορισμένη. Συμπτώματα έλλειψης θείου μπορεί να εμφανιστούν σε φυτάρια που φύτεψαν πρόσφατα αλλά τείνουν να εξαφανιστούν με την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος.

A.6 Σίδηρος

Οι αλληλεπιδράσεις μετάλλων με οργανικά συστατικά είναι πολλές στους ζωντανούς οργανισμούς, διότι είναι απαραίτητα για πολλές βιοχημικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα μέσα στα κύτταρα και αφορούν όχι μόνο το μεταβολισμό αλλά και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Ανάμεσα στα μέταλλα, ο σίδηρος κατέχει ιδιαίτερη θέση καθώς η παρουσία του είναι απαραίτητη σε περισσότερες από τις κυτταρικές οξειδωτικές καταστάσεις και είναι ένα από τα κύρια μέταλλα που λαμβάνουν μέρος στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Παράλληλα, σημαντική θέση κατέχει ο σίδηρος και για το σημαντικό ρόλο που έχει στη φωτοσυνθετική διαδικασία. Συγκεκριμένα, δεσμεύεται στο ενεργό μέρος της γλουταμινο-ρεδουκτάσης του tRNA, ενός ενζύμου που είναι απαραίτητο στο σχηματισμό του 5-αμινολεβουλινικού οξέος, το οποίο είναι πρόδρομο μόριο της χλωροφύλλης.

Όμως, η έντονη διαδραστικότητά του με το οξυγόνο καθιστά δύσκολο το χειρισμό του στους αερόβιους οργανισμούς. Επίσης, και η διαλυτότητά του στη μορφή των υδροξειδίων του σιδήρου (ferric hydroxides) αλλά και η τοξικότητά του μέσω της αντίδρασης Fenton που παράγει ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες είναι από τα πιο ενεργά συστατικά, αποτελούν σημαντικά προβλήματα. Έτσι, έχουν δημιουργηθεί διάφοροι εξελικτικοί μηχανισμοί έτσι ώστε να διατίθεται σε ασφαλή και χρήσιμη μορφή για τους ζωντανούς οργανισμούς. Η διαθεσιμότητα της συγκέντρωσης του σιδήρου που απαιτείται για τις κυτταρικές ανάγκες ελέγχεται αυστηρά από βιολογικές διαδικασίες που δρουν τόσο στο μεταφορικό όσο και στο αποθηκευτικό επίπεδο.

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, οι μεταφορικοί μηχανισμοί ρυθμίζουν τη διακίνηση του σιδήρου από την πρόσληψη, μέχρι τη διανομή σε μεγάλη απόσταση διανομή στους ιστούς αλλά και την υποκυτταρική τοποθέτηση. Κατά τις

αναπτυξιακές διαδικασίες ή ως απόκριση σε περιβαλλοντικές προκλήσεις, η ρύθμιση και η παροδική αποθήκευση του σιδήρου αποτελούν επίσης ομοιοστατικούς μηχανισμούς. Οι φερριτίνες είναι μια ειδική κατηγορία πρωτεϊνών που εμπλέκεται σε αυτή την τελευταία λειτουργία (Briat 2009).

A.6.1 Η φυσιολογία του σιδήρου στο φυτό

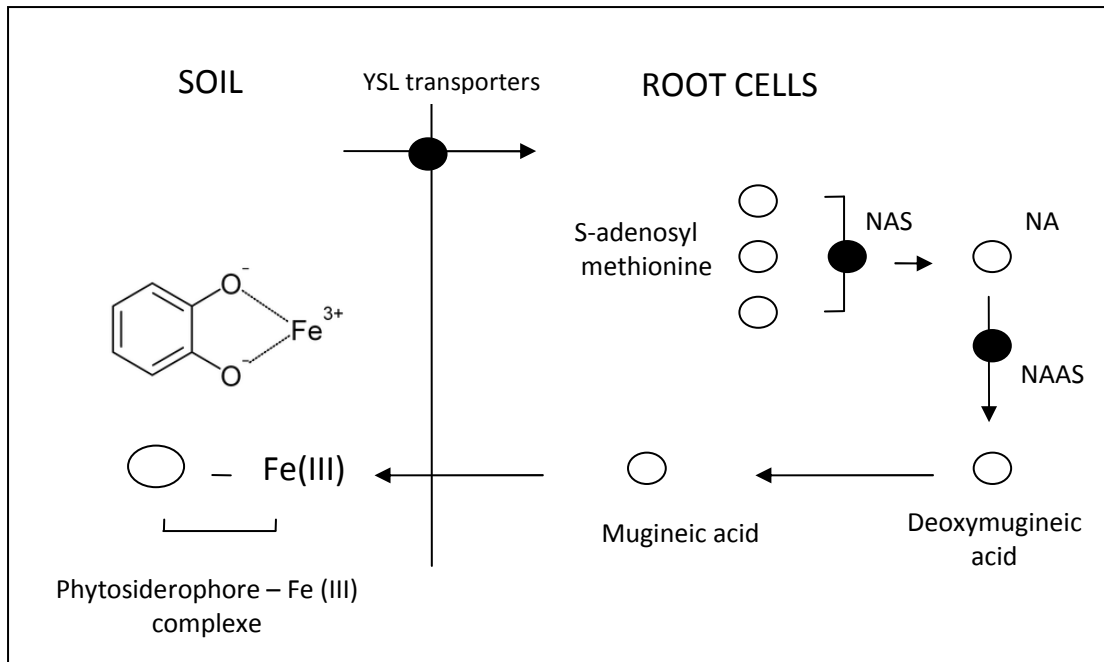
A.6.1.1 Πρόσληψη

Το ιόν Fe^{3+} είναι η μορφή του σιδήρου που απαντά στο έδαφος, αλλά το ιόν Fe^{2+} είναι η φυσιολογικά ενεργή μορφή. Επομένως, ο σίδηρος πρέπει να βρίσκεται σε οξειδωμένη μορφή για να μπορεί να αφομοιωθεί. Η πρόσληψη του σιδήρου ελέγχεται από μοριακούς μηχανισμούς που καθορίζονται από τα γενετικά χαρακτηριστικά του οργανισμού. Για τους φυτικούς οργανισμούς είναι γνωστοί δύο μηχανισμοί πρόσληψης του σιδήρου, η στρατηγική I και η στρατηγική II. Για τη στρατηγική I το ιόν Fe^{2+} ανάγεται σε Fe^{3+} με απελευθέρωση ηλεκτρονίων και πρωτονίων στο πλασμάλημμα των κυττάρων της ρίζας. Αυτή η απελευθέρωση αυξάνει την δραστικότητα του ενζύμου ρεδοκτάση του Fe^{2+} , που καθιστά τον σίδηρο τρισθενή και επομένως αφομοιώσιμο από τους οργανισμούς.

Τα αγρωστώδη, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα δημητριακά, όπως ο αραβόσιτος, το σιτάρι και το ρύζι χρησιμοποιούν μια στρατηγική χηλικοποίησης (Στρατηγική II) για να απορροφήσουν το σίδηρο από το έδαφος. Συστατικά μικρού μοριακού βάρους όπως το μουγινεϊκό οξύ (mugineic acid, MA), το δεοξυμουγινεϊκό οξύ (deoxymugineic acid, DMA) και το επυδροξυμουγινεϊκό οξύ (epi-hydroxymugineic acid, epi-HMA), τα λεγόμενα φυτοσιδηροφόρα, απελευθερώνονται στο έδαφικό διάλυμα όπου δεσμεύουν τον διαλυτό σίδηρο Fe^{3+} (Mori 1999). Το σύμπλοκο φυτοσιδηροφόρου- Fe^{3+} μπορεί να μετακινηθεί μέσα στο φυτό. Για να συντεθούν τα MA, δρα στη μεθειονίνη η συνθάση της νικοτιαναμίνης (NAS) η οποία συμπυκνώνει τρία μόρια S-αδενοσυλο μεθειονίνης για να σχηματίσει τη νικοτιαναμίνη (NA). Στη συνέχεια η αμινομεταφοράση της νικοτιαναμίνης μετατρέπει την NA σε μουγινεϊκό οξύ (Grotz 2002).

Κατά τη μεταφορά του συμπλόκου φυτοσιδηροφόρο- $Fe(III)$ δρα ένας μεταφορέας ο yellow stripe, YSx ή YSL, που καταλύει τη μεταφορά από τη ριζόσφαιρα προς επιδερμικά κύτταρα της ρίζας (Curie et al. 2001). Εκτενής αναφορά για την οικογένεια των μεταφορέων YSL γίνεται παρακάτω.

Ο Fe^{2+} μπορεί να οξειδώνεται μέσα στα κύτταρα της ρίζας ή να μεταφέρεται ως Fe^{3+} που συνδέεται με κιτρικό.



Εικόνα Α.6.1.1.1: Σχηματική περιγραφή της χηλικοποίησης του Fe^{3+} από την οικογένεια των μουγινεϊκών οξέων.

A.6.1.2 Μεταφορά και αφομοίωση

Ο σίδηρος κινείται στα αγγεία του ξύλου και στο φλοιό κυρίως προς τους χλωροπλάστες όπου τα επίπεδά του ελέγχονται με αντιστρεπτή σύνδεση με φωσφοπρωτεΐνη του Fe^{3+} και φερριτίνη. Συγκεκριμένα, στα αγγεία του ξύλου μεταφέρεται ως σύμπλοκο Fe-κιτρικού ενώ στο ηθμό ως σύμπλοκο Fe- NA (νικοτιαναμίνη) (Briat 2007).

A.6.1.3 Λειτουργίες

Οι βασικές λειτουργίες του σιδήρου σχετίζονται με αλλαγές στις καταστάσεις οξειδωσης-αναγωγής και στις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο σίδηρος είναι συστατικό ενζυμικών συστημάτων, όπως οι κυτοχρωμο-οξειδάσες, οι καταλάσες, οι υπεροξειδάσες καθώς επίσης τα κυτοχρώματα και οι χρωστικές που περιέχουν αίμη. Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για την παραγωγή χλωροφύλλης και ως εκ τούτου η έλλειψή του προκαλεί χλόρωση. Για παράδειγμα, ο σίδηρος χρησιμοποιείται στο ενεργό κέντρο της γλουτάμυλ-tRNA ρεδοκτάσης, ενός ενζύμου που χρησιμοποιείται στο σχηματισμό του 5-αμινολεβουλικού οξέος το οποίο είναι πρόδρομο μόριο της αίμης και της χλωροφύλλης (Kumar 2000). Παράλληλα, συμμετέχει στη σύνθεση του DNA (νουκλεοτιδική ρεδοκτάση) και στην σύνθεση του αιθυλενίου μέσω της συνθάση του ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid) και την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με τη λιποξυγενάση.

Ο σίδηρος είναι επίσης συστατικό της πρωτεΐνης φερρεδοξίνης, η οποία απαιτείται για την αναγωγή των νιτρικών, την αναγωγή των θεικών, την αφομοίωση του μοριακού αζώτου (νιτρογενάση) και την παραγωγή ενέργειας (NADP). Έμμεσες λειτουργίες που αποδίδονται στον σίδηρο περιλαμβάνουν την μεριστωματική αύξηση του άκρου της ρίζας και τον έλεγχο της σύνθεσης της αλανίνης.

A.6.1.4 Εύρος επάρκειας

Το εύρος επάρκειας για τον σίδηρο δεν έχει οριστεί με ακρίβεια αν και στους περισσότερους ιστούς ο Fe ποικίλλει μεταξύ 50 και 75 mg.kg⁻¹ (ppm).

A.6.1.5 Έλλειψη

Η τροφοπενία σε επίπεδο φυτού εμφανίζεται κυρίως σε αμμώδη εδάφη ή σε ελαφρά ασβεστούχα. Μπορεί να παρατηρηθεί κατά τόπους μέσα στον αγρό ή και σε υδροπονικά συστήματα. Τα συμπτώματα της έλλειψης σιδήρου είναι παρόμοια με εκείνα της έλλειψης μαγνησίου, επειδή και τα δύο στοιχεία συμμετέχουν στην παραγωγή χλωροφύλλης. Όμως, επειδή ο σίδηρος δεν είναι ευκίνητος (ενώ το μαγνήσιο είναι), τα συμπτώματα της έλλειψης σιδήρου εμφανίζονται πρώτα στα νεαρά φύλλα. Η έλλειψη σιδήρου περιγράφεται ως μεσονεύρια χλώρωση, και καθώς αυξάνει η σοβαρότητα της έλλειψης, η χλώρωση απλώνεται στα παλαιότερα φύλλα, τα οποία γίνονται άσπρα. Όταν τα φυτά είναι ελλειμματικά σε σίδηρο τείνουν να συσσωρεύονται αμινοξέα και νιτρικά.

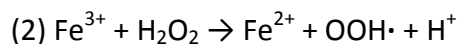
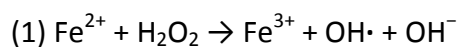
Ο σίδηρος είναι μοναδικός μεταξύ των μικροστοιχείων καθόσον η διαθεσιμότητά του και η πρόσληψη από το φυτό μπορούν να επηρεαστούν από το ίδιο το φυτό. Υπάρχουν φυτά μέσα στο ίδιο είδος που είναι ικανά να χειρίζονται τον σίδηρο, ενώ άλλα δεν έχουν αυτή την ικανότητα. Αυτά που έχουν την ικανότητα μπορούν να οξυνίζουν τη ριζόσφαιρα ή και να απελευθερώνουν συμπλεκτικές ενώσεις που προάγουν την πρόσληψη του σιδήρου.

Θεραπεία της τροφοπενίας επιτυγχάνεται με διαφυλλικές λιπάνσεις θεικού σιδήρου κάθε 3-4 μέρες και παράλληλα συνίσταται η προσθήκη χηλικού σιδήρου στο νερό ποτίσματος.

A.6.1.6 Τοξικότητα

Η τοξικότητα του σιδήρου αναπτύσσεται ως εμφάνιση χρώματος χαλκού στα φύλλα που ακολουθείται από ασημένιες-καφέ κηλίδες. Ο σίδηρος μπορεί συχνά να συσσωρεύεται σε επίπεδα 300-400 mg.kg⁻¹ χωρίς να επάγεται τοξικότητα. Παρόλα αυτά σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις σιδήρου (μεγαλύτερες του 400 mg.kg⁻¹) ο σίδηρος γίνεται τοξικός μέσω της αντίδρασης Fenton. Η αντίδραση αρχίζει όταν υψηλά επίπεδα Fe²⁺ οξειδώνονται με υπεροξείδιο του υδρογόνου σε Fe³⁺ και ρίζες

υδροξυλίου. Η συνέχεια της αντίδρασης δίνει μια περοξειδική ρίζα και ένα πρωτόνιο, όπως φαίνεται παρακάτω:



Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν κυτταρικές ζημιές τόσο στις δομές τους κυττάρου όσο και στις λειτουργίες του. Για παράδειγμα, μερικά είδη καρκίνου θεωρείται ότι προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες οι οποίες προκαλούν μεταλλάξεις. Επίσης, η κυτταρική γήρανση είναι ένα αποτέλεσμα της δράσης των ελεύθερων ριζών.

Για να αποφευχθούν όλες αυτές οι κυτταρικές δυσλειτουργίες, μηχανισμοί του κυττάρου δεσμεύουν τα ελεύθερα ιόντα σιδήρου και τα αποθηκεύουν στο κέντρο των φερριτινών. Έτσι, φαίνεται ο διττός ρόλος των φερριτινών που είναι τόσο αποθηκευτικός όσο και αντιοξειδωτικός, αφού εμποδίζει την οξείδωση στο κύτταρο.

A.6.2 Αλληλεπιδράσεις

A.6.3.1 pH και ασβέστωση

Μία αύξηση στο pH (>7.0) μετά από ασβέστωση μπορεί να οδηγήσει σε χλώρωση σιδήρου. Αυτό οφείλεται κυρίως στη μη-διαθεσιμότητα του σιδήρου ως $\text{Fe}(\text{OH})_3$ σε υψηλότερα pH παρά στην παρεμποδιστική επίδραση του HCO_3^- στη μετακίνηση του σιδήρου μέσα στο φυτό.

A.6.3.2 Άζωτο

Το άζωτο εντείνει την έλλειψη του σιδήρου λόγω της εντεινόμενης αύξησης του ιστού. Υψηλά επίπεδα pH που επάγονται από νιτρικά στον ελεύθερο χώρο της ρίζας και στη ριζόσφαιρα μπορούν να περιορίσουν την πρόσληψη σιδήρου λόγω της επίδρασης του pH στη διαθεσιμότητα του σιδήρου.

A.6.3.2 Φωσφόρος

Υψηλά επίπεδα φωσφόρου μειώνουν τη διαλυτότητα του σιδήρου στο φυτό. Μία σχέση P:Fe = 29:1 θεωρείται άριστη για τα περισσότερα φυτά.

A.6.3.3 Κάλιο

Το κάλιο αυξάνει την κινητικότητα και την διαλυτότητα του σιδήρου στο φυτό και μπορεί επίσης να αυξήσει έμμεσα τον ρυθμό πρόσληψης του σιδήρου. Το κάλιο

εμπλέκεται στη σύνθεση των φυτοσιδηροφόρων και οργανικών οξέων της Στρατηγικής II.

A.6.3.4 Βόριο, χαλκός & μαγγάνιο

Κάθε ένα από αυτά τα μικροστοιχεία ανταγωνίζεται τον σίδηρο κατά την πρόσληψη.

A.6.3.5 Χλώριο

Το χλώριο μπορεί να προάγει την πρόσληψη του σιδήρου.

A.6.3.6 Θείο

Μελέτες έδειξαν ότι μεταξύ του σιδήρου και του θείου υπάρχουν αλληλεπιδράσεις (Astolfi et al. 2003, Bouranis et al. 2003). Συγκεκριμένα, τα δύο στοιχεία φαίνεται να έχουν θετική συσχέτιση κίνησης όσον αφορά την πρόσληψη τους από τη ριζόσφαιρα και να έχουν θετική σχέση οι απορροφήσεις τους. Μελέτες έδειξαν (Astolfi et al. 2003) ότι το περιεχόμενο του φύλλου σε σίδηρο είναι χαμηλότερο όταν υπάρχει έλλειψη θείου στον αραβόσιτο, σε σχέση με τα φυτά που δεν έχουν τροφοπενία. Έτσι, όσο το περιεχόμενο του φυτού σε θείο είναι στα κανονικά επίπεδα, γίνεται απρόσκοπτα και η πρόσληψη του σιδήρου. Τα ίδια δεδομένα υπάρχουν και για το κριθάρι (Poaceae) με την πρόσληψη του σιδήρου να μειώνεται όσο μειώνεται η διαθεσιμότητα του θείου (Astolfi et al. 2006).

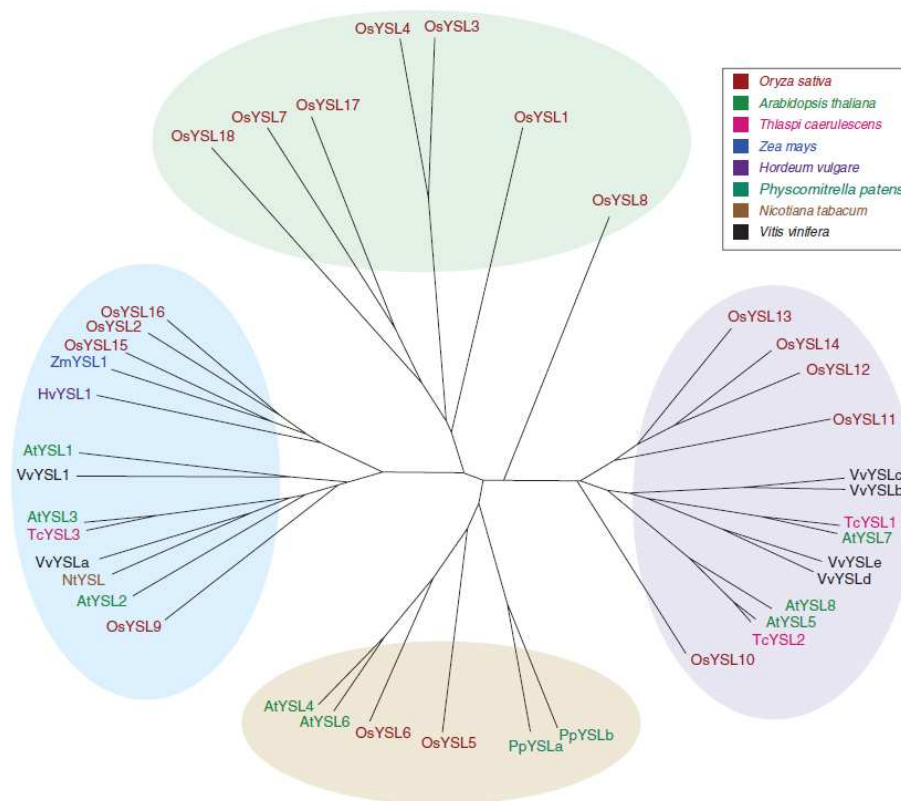
Η επίδραση αυτή της έλλειψης θείου στο περιεχόμενο σε σίδηρο μπορεί να εξηγείται, έστω και μερικώς, αν λάβουμε υπόψη μας ότι ο σίδηρος στα αγρωστώδη χρησιμοποιεί τη στρατηγική II. Έτσι, για την πρόσληψη του σιδήρου είναι απαραίτητο το πρόδρομο μόριο της μεθειονίνης που απαιτείται για την βιοσύνθεση των φυτοσιδηροφόρων.

Αντίθετα, σε φυτά που αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου, τα επίπεδα του ολικού θείου τόσο στη ρίζα όσο και στο υπέργειο αυξάνονται, ακόμα και σε φυτά που έχουν ταυτόχρονα και έλλειψη θείου (Zuchi et al. 2011). Έτσι, συμπεραίνεται ότι η απαίτηση σε θείο και η συσσώρευσή του αυξάνονται μάλλον ως απόκριση στην μείωση του σιδήρου στο θρεπτικό διάλυμα παρά μειώνονται, όπως αναφερόταν μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία (Lee et al. 1993, Eriksen et al 2001).

A.7 Οι μεταφορείς yellow stripe like (YSL) στα φυτά.

A.7.1 Ο φυσιολογικός ρόλος των YSL, τα ιδρυτικά μέλη της ομάδας και η απορρόφηση του σιδήρου από τις ρίζες των αγρωστωδών.

Οι μεταφορείς YSL ανήκουν στους ολιγοπεπτιδικούς μεταφορείς (oligopeptide transporters, OPT), μια οικογένεια πρωτεϊνών που δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένη και που συμπεριλαμβάνει στη μεταφορά τρι-, τέτρα-, πέντα-, και εξαπεπτίδια καθώς επίσης και παράγωγα αμινοξέων. Οι μεταφορείς έχουν αντιπρόσωπους μόνο στα φυτά, στους μύκητες, στα βακτήρια και στα αρχαία (Yen et al. 2001). Μέσα στην οικογένεια των μεταφορέων OPT, οι μεταφορείς YSL διαμορφώνουν μια ξεχωριστή ενότητα η οποία έχει <20% ομολογία για τις OPT πρωτεΐνες στα φυτά. Οι πρωτεΐνες YSL ανήκουν σε 4 υποοικογένειες, οι οποίες περιλαμβάνουν κυρίως αγρωστώδη φυτά, υποδεικνύοντας τη λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών ως εξειδικευμένη για τα Poaceae. Από τις 4 υποοικογένειες έχει μελετηθεί εκτενώς μόνο η I, στην οποία ανήκει και ο ZmYSL1.



Εικόνα A.7.1.1: Φυλογενετικό δέντρο της οικογένειας πρωτεϊνών yellow stripe 1-like. Ο υπολογισμός και ο σχεδιασμός του δέντρου έγινε με το λογισμικό Dendroscope (Curie et al. 2009).

Ο yellow stripe 1 του αραβοσίτου, ένα από τα συστατικά μέλη της οικογένειας μεταφορέων OPT, μεταφέρει τα σύμπλοκα Fe-PS. Ως απόκριση στην έλλειψη σιδήρου, συντίθενται και εκκρίνονται στο έδαφος τα φυτοσιδηροφόρα, όπου και

συμπλοκοποιούνται με τα υδροξείδια του σιδήρου. Στη συνέχεια ο μεταφορέας μεταφέρει το σύμπλοκο Fe(III)-PS στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων της επιδερμίδας (Curie et al. 2001, Scaaf et al. 2004, Murata et al. 2006). Σε φυτά αραβοσίτου που έχει εφαρμοστεί μετάλλαξη σίγησης για το γονίδιο YS1 υπάρχει μια λανθάνουσα χαρακτηριστική χλώρωση κατά μήκος των αγγείων, γι' αυτό και ονομάστηκε yellow stripe (χλωρωτική ράβδωση), μειωμένη ανάπτυξη, μιας και το σύμπλοκο Fe-PS δεν μπορεί να μπει μέσα στο φυτό (von Wiren et al. 1994). Ο μεταφορέας ZmYS1 και ο ομόλογός του για το κριθάρι HvYS1 επάγονται από την τροφопενία σιδήρου. Ανοσοϊστολογικές και χρώσεις παροδικής έκφρασης (GFP fusion) έδειξαν ότι ο μεταφορέας HvYS1 βρίσκεται τοποθετημένος στην πλασματική μεμβράνη των επιδερμικών κυττάρων.

Ηλεκτροχημικές μέθοδοι έδειξαν ότι ο ZmYS1 μεταφέρει το σύμπλοκο Fe-PS με $K_m=5-10 \mu M$ και ότι αυτή η μεταφορά εξαρτάται από μια πρωτονιακή συμμεταφορά και από το δυναμικό της μεμβράνης (Schaaf et al. 2004). Η παρατήρηση ότι ο ZmYS1 έχει μεγαλύτερη ικανότητα μεταφοράς σε υψηλό pH δεν συνάδει με την άποψη ότι ο μεταφορέας επάγεται σε συνθήκες τροφопενίας Fe, αφού η συγκεκριμένη κατάσταση συναντάται στη φύση στο αξιοσημείωτα αλκαλικό pH των ασβεστωδών εδαφών. Όμως, η μεταφορά Fe-PS μπορεί ακόμα να γίνεται και σε αλκαλικό pH όσο υπάρχει αρνητικό δυναμικό στη μεμβράνη και η ενεργότητα της πρωτονιακής ATPάσης της πλασματικής μεμβράνης είναι υψηλή, ώστε να αποφευχθεί η μικροπεριβαλλοντική έλλειψη πρωτονίων (Curie et al. 2008). Ανάμεσα στα 18 μέλη της οικογένειας των μεταφορέων YSL για το ρύζι, ο OsYSL15 είναι αυτός που καταλύει καλύτερα τη λειτουργία της πρόσληψης σιδήρου από το έδαφος. Επίσης, ο OsYSL15 εκφράζεται στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας και επάγεται υπό συνθήκες τροφопενίας σιδήρου. Ο OsYSL15 είναι το μέλος της οικογένειας των μεταφορέων στο ρύζι, που είναι πιο στενά συνδεδεμένος με τον ZmYS1 (Εικ. 2)

Ο ZmYS1 και ο HvYS1 παρουσιάζουν εκλεκτικότητα σε διαφορετικά υποστρώματα που αφορούν και στις δύο περιπτώσεις μέταλλο και ένα μόριο σύνδεσης (ligand). Ηλεκτροφυσιολογικές αναλύσεις έδειξαν ότι ο HvYS1 μεταφέρει μόνο σίδηρο χηλικοποιημένο στο PS ενώ ο ZmYS1 μεταφέρει διάφορα μέταλλα όπως Fe(II), Fe(III), Ni(II), Zn(II), Cu(II), Mn(II) και Cd(II) (Schaaf et al. 2004, Murata et al. 2006). Μελέτες αυτών των δύο μεταφορέων έδειξαν ότι ο καθοριστικός παράγοντας για την εκλεκτικότητα στα διαφορετικά υποστρώματα βρίσκεται στη σύνδεση των εξωτερικών βρόχων ανάμεσα στα υποτιθέμενα διαμεμβρανικά μέρη 6 και 7 της πρωτεΐνης (Harada et al. 2007). Η φυσιολογική συνάφεια του ευρέως φάσματος του ZmYS1 δεν είναι ξεκάθαρη, εκτός από τον Zn. Στον αραβόσιτο, η μετάλλαξη *ys1* έδωσε χαμηλότερη απορρόφηση Zn, από τον άγριο τύπο (von Wiren et al. 1996).

A.7.2 Πρόσληψη και μεταφορά του σιδήρου, διαφορετικές λειτουργίες για τις πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας.

Παράλληλα, υπάρχουν πολλές ενδείξεις για το γεγονός ότι το σύμπλεγμα των YSL μεταφορέων (YSL cluster) της οικογένειας των OPT δεν περιορίζεται μόνο στην πρόσληψη του Fe-PS από τις ρίζες. Για το *Zea mays* συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ο ZmYS1 μπορεί επίσης να μεταφέρει το σύμπλοκο Fe(II)-NA και Ni(II)-NA στο υπέργειο (Schaaf et al. 2004), το οποίο συμφωνεί με το γεγονός ότι NA και PS είναι χημικά κοντινές δομές, έχουν παρόμοια υψηλή χημική συγγένεια με διάφορα μεταλλικά κατιόντα και έτσι μπορούν να θεωρηθούν ως μόρια μεταφοράς για διάφορα υποστρώματα. Για τα αγρωστώδη, η κατάσταση δεν μπορεί να περιγραφεί πολύ καλά, εξαιτίας της συνύπαρξης του PS και της NA στο φυτό. Έτσι, υποτίθεται ότι οι μεταφορείς YSL μπορούν να συμμετέχουν είτε στην πρόσληψη του σιδήρου από τη ρίζα, είτε στην εσωτερική μεταφορά του, ή και στα δύο. Στον αραβόσιτο, το γονίδιο του ZmYS1 που είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά του Fe-PS δεν εκφράζεται μόνο στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας, αλλά εκφράζεται με μεγάλη συχνότητα και ένταση και στο υπέργειο φυτών που υπόκεινται σε έλλειψη σιδήρου (Curie et al. 2001). Παράλληλα, αφού το σύμπλοκο Fe-NA μπορεί επίσης να θεωρηθεί υπόστρωμα για τον ZmYS1, φαίνεται ότι ο μεταφορέας μπορεί να μεταφέρει το σύμπλοκο αυτό στο εσωτερικό του φυτού.

Εναλλακτικά, ο μεταφορέας μπορεί να μεταφέρει το σύμπλοκο PS –Fe στο υπέργειο, αφού η παρουσία των φυτοσιδηροφόρων ανιχνεύεται και στο υπέργειο των αγρωστωδών, αν και ο ρόλος τους εκεί δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος. Η παρατήρηση της παρουσίας των φυτοσιδηροφόρων στα αγγεία του ηθμού και του ξύλου στο κριθάρι, εισηγείται ότι τα φυτοσιδηροφόρα μπορούν αν έχουν ένα παρόμοιο ρόλο με την NA ως μεταλλικοί δεσμευτές στα αγγεία (Mori et al. 2001). Τελικά, γίνεται αντιληπτό ότι τα PS εκκρίνονται στον αποπ्लाσμικό χώρο του υπέργειου για να χηλικοποιήσουν τον αποθηκευμένο Fe(III) και ότι το σύμπλοκο Fe(III)-PS που σχηματίζεται μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα από έναν YSL μεταφορέα, παρόμοια με τον τρόπο που μεταφέρεται το Fe(III)-PS στη ρίζα από τον YSL.

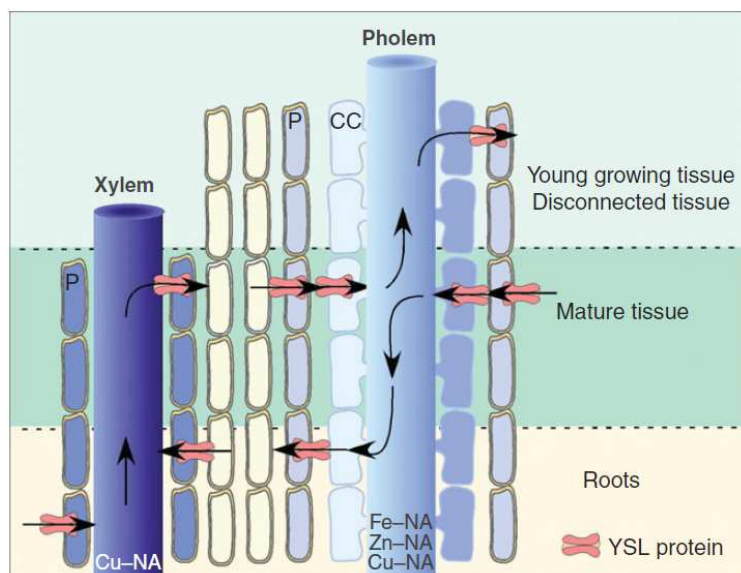
Μετά από πειράματα ετερόλογης έκφρασης του μεταφορέα σε μύκητες, προέκυψε ότι τυπικά, ο μεταφορέας ZmYS1 καταλύει τη μεταφορά Fe(III)-DMA, Fe(III)-NA ή Fe(II)-NA αλλά δεν καταλύει τη μεταφορά Fe(III)-κιτρικού (Curie et al. 2001, Schaaf et al. 2004).

A.7.3 Ο ρόλος των YSLs στην μεταλλική ομοίωση: μελέτη της γονιδιακής τους έκφρασης.

Αφού η εκλεκτικότητα του μεταφορέα για τα μεταλλικά υποστρώματα, όπου υπάρχει, είναι αρκετά ευρεία, η διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασής του έχει αναλυθεί σε σχέση με το περιεχόμενο σε διάφορα μέταλλα, έτσι ώστε ίσως να διαφωτιστεί ο φυσιολογικός ρόλος αυτών των πρωτεϊνών. Όπως αναμενόταν, λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο των πρωτεϊνών στην πρόσληψη του Fe-PS, ZmYSL1, HnYSL1 και OsYSL15 επάγονται ισχυρά σε απόκριση της μειωμένης εφαρμογής σιδήρου (Curie et al. 2001, Koike et al. 2004, Murata et al. 2006). Αντίθετα, η έκφραση των AtYSL1-8, TcYSL3,5,7 και τα περισσότερα από τα γονίδια OsYSL εκτός από το OsYSL2, δεν έχουν έκφραση σε σχέση με το περιεχόμενο του φυτού σε μέταλλα. Η έκφραση της ομάδας AtYSL1-3 μειώνεται σχεδόν 2 φορές σε τροφопενία σιδήρου και επάγεται σε περίσσεια σιδήρου (DiDonato et al. 2004). Παρόμοια συμπεριφορά έχουν και τα άλλα γονίδια που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα. Σχέση με άλλα μέταλλα φαίνεται να υπάρχει μόνο στο AtYSL2, που έδειξε ότι η έκφρασή του καταστέλλεται σημαντικά από τροφопενία Zn (Schaaf et al. 2005) και ελαφρώς σε περίσσεια Cu (DiDonato et al. 2004). Στο τελευταίο πείραμα, παρόλα αυτά, εξαιτίας του ότι ο Cu προκαλεί τροφопενία Fe μέσω του ανταγωνισμού, η επαγόμενη έκφραση από το χαλκό ίσως είναι έμμεση.

A.7.4 Τοπολογικός προσδιορισμός των YSL γονιδίων στους ιστούς.

Γονίδια που κωδικοποιούν για τους μεταφορείς YSL υπάρχουν, όπως αναμενόταν, στα επιδερμικά κύτταρα των ριζών. Άλλα γονίδια YSL έχουν τρεις κυρίως περιοχές έκφρασης: αγγειακούς ιστούς σε όλο το φυτό, στη γύρη και στους σπόρους. Βάσεις δεδομένων για microarray δείχνουν επίσης μια αξιοσημείωτη αύξηση της έκφρασης στα γηραιότερα φύλλα για τα περισσότερα AtYSL γονίδια, ένα πρότυπο που επιβεβαιώθηκε και πειραματικά με τα AtYSL1 και AtYSL3 (Waters et al. 2006). Αυτά τα πρότυπα έκφρασης συνεπάγονται ρόλους για τους μεταφορείς YSL σε μεταφορές μεγάλης απόστασης μέσω των αγγείων, στη μικροσποριογένεση, την γονιμότητα και τις πρώτες αναπτυξιακές φάσεις του σπόρου καθώς επίσης και στην επανακινητοποίηση κατά την γήρανση.



Εικόνα Α.7.4.1: Σχηματική αναπαράσταση της υποτιθέμενης μεταφορικής δραστηριότητας των YSL πρωτεϊνών μέσα και ανάμεσα στα αγγεία. Η μεταφορά από τα αγγεία του ξύλου στο φλοιό προτείνεται ότι γίνεται στους νεαρούς αναπτυσσόμενους ιστούς, ενώ η αντίστροφη μεταφορά γίνεται στις ρίζες. Αν όλοι οι YSL μεταφορείς ακολουθούν την πρωτονιακή διαβάθμιση και λειτουργούν ως εισαγωγείς οι πρωτεΐνες έχουν σχεδιαστεί για να δείχνουν την εσωτερική πολική μεταφορά στα παρεγχυματικά κύτταρα που περιβάλλονται από αγγεία ή για το φλοιώμα από συνοδευτικά κύτταρα. Μόνο το Cu-NA ίσως να βρίσκεται σταθερά στο pH του χυμού του ξύλου, ενώ τα Cu-NA, Fe-NA, και Zn-NA είναι σταθερά στο συμπλασμικό pH και επομένως μπορούν να κινητοποιούνται στο φλοιώμα (P, παρέγχυμα, CC: συνοδό κύτταρα) (Curie et al. 2008).

A.8 Εναποθέσεις σιδήρου στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας.

A.8.1 Σε ποια φυτά παρουσιάζεται και σε ποιο μέρος του φυτού εδράζεται;

Η πλάκα σιδήρου είναι ένα χαρακτηριστικό των φυτών που αναπτύσσονται σε υδατικό θρεπτικό σύστημα, ξεκινώντας από υδροχαρή φυτά όπως τα απλά καλάμια (reeds) μέχρι υψηλής διατροφικής και οικονομικής αξίας φυτά, όπως το ρύζι (*Oryza sativa*).

Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ο σχηματισμός της πλάκας στη μορφή των οξειδίων των μετάλλων στις ρίζες των μακροφύτων σε ποικίλους υδάτινους οικοτόπους, όπως σε λίμνες (γλυκό νερό), σε υγρά τοπους και σε φυτά ελωδών οικοσυστημάτων. Επίσης αναφέρεται ο σχηματισμός της σε σπορόφυτα μαγγοβίων, δηλαδή ξυλώδη δέντρα ή θάμνοι που αυξάνονται στους παράκτιους βιότοπους ή mangal (Hogarth et al. 1999). Τέλος, υπάρχουν αναφορές για παρατήρηση πλάκας σιδήρου σε όργανα φυκών (seagrasses). Εκτεταμένη, όμως, έρευνα έχει γίνει για τα παρακάτω φυτικά είδη: *Oryza sativa*, *Phragmites australis*, *Juncus bulbosus*, *Aster trifolium* και *Spartina alterniflora*.

Παράλληλα, υπάρχουν αναφορές για την παρουσία μεταλλικών εναποθέσεων σε σπορόφυτα κωνοφόρων, συμπεριλαμβανομένων της πεύκης (red and white pine), της ελάτης (black and white spruce) και του ευρωπαϊκού αγριόπευκου (euro-pean larch). Σε αντίθεση με τα υδροχαρή φυτά, τα φυτά αυτά δεν έχουν καλά αναπτυγμένο πορώδες στο ριζικό τους σύστημα, ενώ δεν είναι φυσιολογικώς προσαρμοσμένα για επιβίωση σε κατακλυσμένα εδάφη (Levan 1986).

Επίσης, η ερευνητική ομάδα της Nadia Ali (Ali et al. 2002) από το Εργαστήριο Οικολογίας του Πανεπιστημίου του Μαρόκο, μελέτησε και συνέκρινε τα αποτελέσματα της βιοσυσσώρευσης μετάλλων σε κοινά καλάμια (*P. australis*) και στον αραβόσιτο, σε υδροπονική καλλιέργεια, συμπεραίνοντας ότι η υψηλή συσσώρευση Fe στο ριζικό σύστημα μαρτυρεί την παρουσία πλάκας σιδήρου στα καλάμια. Στην ίδια μελέτη, η αύξηση του σιδήρου στο ριζικό σύστημα του αραβοσίτου ήταν περισσότερο θεαματική καθώς η συγκέντρωση του Fe στη ρίζα πλησίαζε τις 60 φορές μεγαλύτερη από τα control φυτά.

Δεδομένης της άμεσης σύγκρισης της συμπεριφοράς των δύο ειδών στη βιοσυσσώρευση μετάλλων υπαινίσσεται εύκολα ο σχηματισμός πλάκας σιδήρου σε υδροπονική καλλιέργεια αραβοσίτου. Είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι πολλές από τις μελέτες που αφορούν τα υδροχαρή φυτά, γίνονται in vitro και επομένως η χρήση υδροπονικών συστημάτων είναι αναπόφευκτη. Το υδροπονικό περιβάλλον τείνει να είναι ομόλογο των λιμναζόντων υδάτων, χωρίς όμως το μικροβιακό φορτίο και άλλους αστάθμητους και άγνωστους παράγοντες. Γενικά, αναφέρεται ότι η πλάκα σιδήρου επάγεται και in vitro σε υδροπονικά συστήματα (Hu et al 2009).

Οι εναποθέσεις του σιδήρου γίνονται κυρίως στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος. Συχνά η πλάκα σιδήρου παρατηρείται μακροσκοπικά ως μια

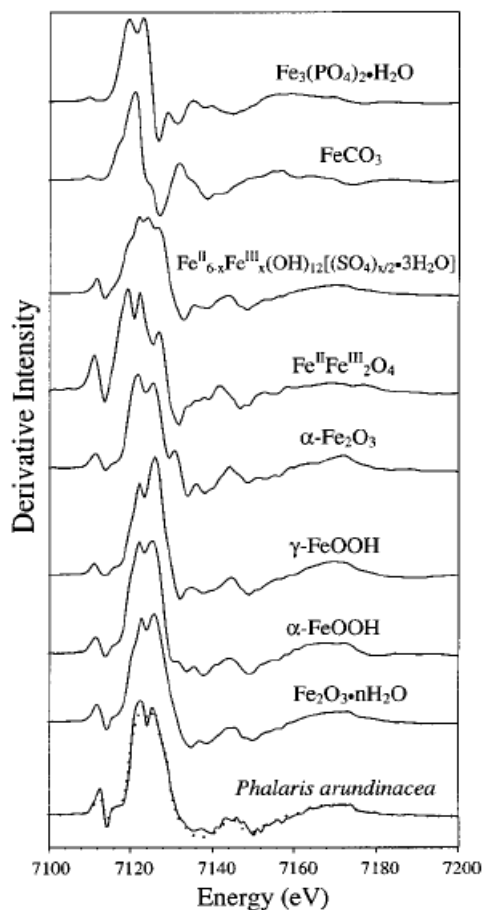
καστανοκόκκινη χρώση, που αποτελείται βασικά από οξείδια σιδήρου. Οι εναποθέσεις αυτές επικάθονται στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας και στον εξωτερικό φλοιό, ενώ μερικές φορές επεκτείνονται και σε μία ακτίνα του περιβάλλοντος της ριζόσφαιρας. Αυτός ο οξειδωμένος φλοιός μπορεί να αποτελέσει εμπόδιο στην τροφοδότηση του φυτού με τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, όπως ο φωσφόρος, το κάλιο, το ασβέστιο και το μαγνήσιο (Green and Etherington 1977).

A.8.2 Πώς δημιουργείται in vivo και ποια η σύστασή της;

Τα φυτά που παρουσιάζουν πλάκα σιδήρου, είναι μερικώς ή μονίμως σε κατακλυσμένα περιβάλλοντα, γεγονός που επάγει τη δημιουργία συστήματος εσωτερικού αερισμού (air lacunae) που επιτρέπει στο ριζικό σύστημα να εφοδιάζεται με οξυγόνο αποφεύγοντας την ανοξία. Κατά τη δημιουργία της πλάκας σιδήρου και υπό αναερόβιες συνθήκες, το οξυγόνο που απελευθερώνεται από τις ρίζες του φυτού επάγει το σχηματισμό εναποθέσεων σιδήρου στην επιφάνεια της ρίζας (Armstrong et al. 1967). Πιο συγκεκριμένα, η φυσιολογική προσαρμογή των υδροχαρών φυτών επιτρέπει την απορρόφηση του O_2 από το υπέργειο μέρος του φυτού που ακολουθείται από τη μεταφορά και την απελευθέρωση του οξυγόνου μέσα στη ριζόσφαιρα (Barlett et al. 1961). Ο σίδηρος οξειδώνεται άμεσα παρουσία

O_2 με αποτέλεσμα το σχηματισμό (υδροξειδίων του σιδήρου ως εναπόθεση στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας.

Ο σχηματισμός της πλάκας σιδήρου στη ρίζα έχει περιγραφεί πλήρως για υδροχαρή φυτικά είδη (aquatic plant species) συμπεριλαμβανομένων των *Oryza sativa*, *Phragmites australis*, *Juncus bulbosus*, *Aster trifolium* και *Spartina alterniflora*. Πολλές μελέτες έχουν καταδείξει τη σύσταση της πλάκας ως υδροξειδική, δηλαδή ότι αποτελείται από υδροξείδια σιδήρου. Στη σύστασή της ταυτοποιείται η παρουσία ενώσεων όπως λεπιδοκροκίτης, γκαιτίτης και άμορφα ή κρυσταλλικά υδροξείδια (Hansel et al. 2001). Παράλληλα, μια μελέτη έδειξε ότι η πλάκα σιδήρου αποτελείται από οξειδωμένο σίδηρο (ferrous iron) (Wang et al. 1999) και από ανθρακικό σίδηρο, όπως ο σιδηρίτης (Hansel et al. 2001).



Πιο συγκεκριμένα, η πλάκα σιδήρου αποτελείται κυρίως από ένυδρο οξυυδροξειδικό σίδηρο (ferrihydrite, FH), γκαιτίτη (goethite) και σιδηρίτη (siderite), με σύνθεση 63%, 32% και 5% αντίστοιχα. Αυτό όμως δεν αποκλείει και την παρουσία άλλων μορφών σιδηρούχων οξειδίων όπως ο αιματίτης (hematite), λεπιδοκροκίτης (lepidocrocite) (Zhang et al. 1999) και άλατα φωσφορικού σιδήρου.

Εξαιτίας μεγάλης ποικιλομορφίας στη διαδραστικότητα των ενώσεων σιδήρου που αναφέρθηκαν παραπάνω, αυτή η απόκλιση στον ανόργανο σκελετό της πλάκας σιδήρου κάνει δύσκολη την εκτίμηση της διαδραστικότητας της και του επακόλουθου ρόλου της.

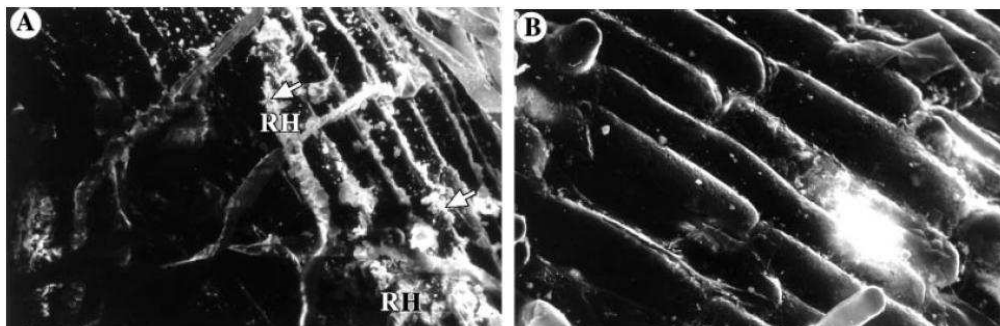
Ορολογία στα αγγλικά	Ορολογία στα ελληνικά	Χημικός τύπος	Συνεισφορά στην πλάκα σιδήρου (%)
Ferrihydrite	ένυδρα όξυ-υδροξείδια του σιδήρου	$(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$	62
Goethite	γκαιτίτης	$\alpha\text{-FeO(OH)}$	32
Siderite	σιδερίτης	FeCO_3	5
Hematite	αιματίτης	iron(III) oxide, Fe_2O_3 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	<1
Lepidocrocite	λεπιδοκροκίτης	$\gamma\text{-FeO(OH)}$	<1
ferrous phosphate	φωσφορικός σίδηρος	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	<1

Συμπερασματικά λοιπόν, οι εναποθέσεις σιδήρου στο ριζικό σύστημα μπορούν να ευνοηθούν in vivo από τη φυσική οξείδωση της ριζόσφαιρας για τα φυτά που αναπτύσσονται σε υδατικό περιβάλλον ή από κατακλυσμένα εδάφη. Αντίστοιχα, μπορεί η παρουσία τους να προκύψει και από in vitro χειρισμούς παρουσία δισθενούς σιδήρου ή παρουσία οξειδίων σιδήρου στο θρεπτικό διάλυμα ή με FeSO_4 . Άλλες ενώσεις που μπορούν να επάγουν τεχνητά το φαινόμενο είναι $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ και Fe(II)- EDTA, απουσία όμως φωσφόρου (Batty et al., 2000, 2002; Liu et al., 2004).

A.8.3 Οπτικές παρατηρήσεις της δομής της πλάκας σιδήρου.

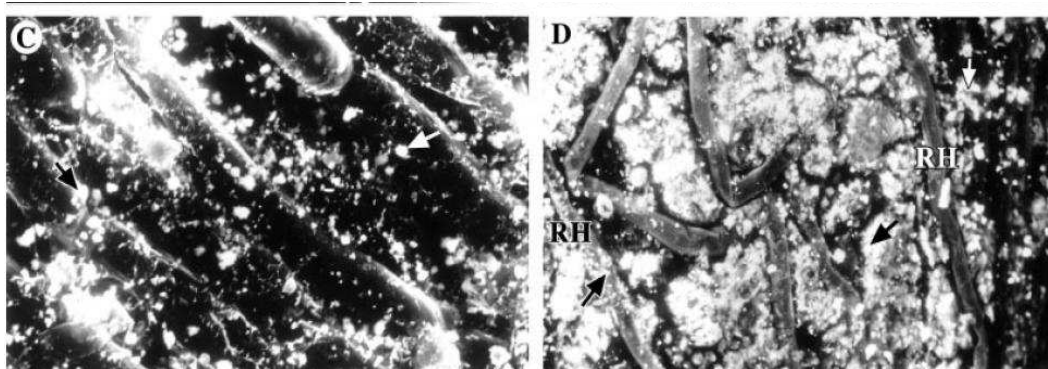
Η ερευνητική ομάδα του L. Batty του πανεπιστημίου του Newcastle μελέτησε την παρουσία και τη μορφή των εναποθέσεων σιδήρου στο υδροχαρές αγρωστώδες *Phragmites australis*, (Poaceae) (Batty et al. 2002). Στα συμπεράσματα της εργασίας τους συμπεριλαμβάνονται διαπιστώσεις τόσο ορατές με γυμνό μάτι, όσο και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (scanning electron microscope, SEM).

Με γυμνό μάτι, η πλάκα σιδήρου είναι ορατή ως μία καστανή χρώση που ξεκινάει περίπου 1 cm πριν το ακρορίζιο και σκουραίνει βαθμιαία ανάλογα με την απόσταση σε αυτή την περιοχή. Οι εναποθέσεις σιδήρου στο ρύζι τείνουν να σχηματίζονται σε πιο παλιά σημεία της ρίζας απ' ότι είναι το ενεργό ακρορίζιο και τα νέα ριζικά τριχίδια.



Εικόνα Α.8.3.1: Σάρωση ηλεκτρομικρογραφημάτων των εναποθέσεων που σχηματίζονται στις ρίζες του *P. australis* που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα πλήρες σε μέταλλα. (Α) $50 \text{ mg l}^{-1} \text{ Fe}$. Τα βέλη δείχνουν τις εναποθέσεις σιδήρου. (Β) $50 \text{ mg l}^{-1} \text{ Fe}$, περιοχή που δεν παρουσιάζει εναποθέσεις σιδήρου. RH, root hairs.

Παρατηρήσεις με SEM δείχνουν ότι οι εναποθέσεις παρατηρούνται ως μια μη κρυσταλλική μοριακή επένδυση στην επιφάνεια που καλύπτει ολόκληρη την περιφέρεια της ρίζας. Αυτή η επένδυση καλύπτει μεγάλο μέρος της επιφάνειας, υπάρχουν όμως και σημεία στα οποία δεν ανιχνεύεται καμία παρουσία εναποθέσεων σιδήρου. Σε αυτές τις περιοχές τα επιδερμικά κύτταρα είναι ορατά χωρίς να υπάρχει κάποια καταστροφή, γεγονός που καταδεικνύει την φυσιολογική απουσία των εναποθέσεων.

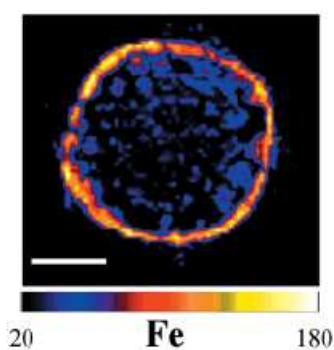


Εικόνα Α.8.3.2: Σάρωση ηλεκτρομικρογραφημάτων των εναποθέσεων που σχηματίζονται στις ρίζες του *P. australis* που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα πλήρες σε μέταλλα.(C) $50 \text{ mg l}^{-1} \text{ Mn}$. Τα βέλη δείχνουν τις εναποθέσεις Mn) (D) $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Al}$. Τα βέλη δείχνουν τις εναποθέσεις Al. RH, root hairs.

Οι εναποθέσεις δε φαίνεται να σχηματίζουν μήτρα στο σχήμα των κυττάρων ή πολυέδρα ως κρυσταλλικές μορφές. Παράλληλα, δεν εισχωρούν μέσα στις κυτταρικές κοιλότητες και αποτελούν μόνο εξωτερικές εναποθέσεις. Στις περιοχές

των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας που παρατηρείται η πλάκα, η ανάπτυξη των ριζικών τριχιδίων γίνεται κανονικά. Τα ριζικά τριχίδια που αναπτύσσονται σε περιοχές με εναποθέσεις σιδήρου είναι συχνά καλυμμένες με μοριακά συστατικά της πλάκας σιδήρου. Παράλληλα, στο SEM φάνηκε ότι η πλάκα σιδήρου, αναπτύσσεται ταυτόχρονα με άλλες πλάκες μεταλλικών στοιχείων όπως πλάκα μαγγανίου και αλουμινίου.

Μελέτες μικροτομογραφίας φθορισμού έδειξαν ότι ο σίδηρος εναποτίθεται στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας χωρίς να ανιχνεύεται σήμα φθορισμού εσωτερικά του ριζικού φλοιού (Hansel et al. 2001). Επομένως η πλάκα σιδήρου δεν φαίνεται να συνεισφέρει ιδιαίτερα στον εφοδιασμό του φυτού με σίδηρο. Παρ' όλα αυτά, σε περίπτωση έλλειψης σιδήρου, η παρουσία των φυτοσιδηροφόρων φαίνεται να είναι περίπου 4 φορές μεγαλύτερη (Zheng et al. 1999), γεγονός που υπογραμμίζει τη χρήση και την πιθανή εκμετάλλευση της πλάκας όταν οι δεξαμενές σιδήρου είναι χαμηλές.



Εικόνα Α.8.3.3: Μεταλλικές εναποθέσεις Fe πάνω και μέσα στις ρίζες του *Phalaris arundinacea* απεικονίζεται από μικροτομογραφία φθορισμού. Η βαθμονομημένη κλίμακα αντιπροσωπεύει 150μm και οι μονάδες της χρωματικής κλίμακας είναι fentograms/μm³ (Hansel et al. 2001).

Α.8.4 Η φυσιολογική δράση των εναποθέσεων σιδήρου στο φυτό.

Οι εναποθέσεις σιδήρου και άλλων μετάλλων στη ρίζα δεν φαίνεται να είναι τυχαία. Δεν έχει, όμως, ακόμα διασαφηνιστεί ακριβώς ο ρόλος της πλάκας σιδήρου εξαιτίας και του ότι η παρουσία και έκτασή της εξαρτάται από τα μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά τα οποία ρυθμίζουν την παροχή οξυγόνου στο ριζικό σύστημα και την απελευθέρωση του οξυγόνου στη ριζόσφαιρα (Sand-Jensen et al. 2005, Borum et al. 2006). Οι ριζικές αυτές εναποθέσεις, παράλληλα, καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό και από τα χημικά χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος της ρίζας, τόσο του σιδήρου και του μαγγανίου, όσο και του περιεχόμενου της υδάτινης φάσης αλλά και του pH, της οξειδωτικής κατάστασης και του περιεχομένου σε οργανική ουσία (Christensen et al 1997).

Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του '90, έγινε γνωστό ότι μια από τις πολλές τοξικές χημικές ενώσεις, που είναι αποτέλεσμα της απουσίας οξυγόνου στο περιβάλλον της ρίζας είναι τα σουλφίδια και κυρίως το υδρόθειο (H₂S), ενώσεις ισχυρά δραστικές και επομένως τοξικές. Έτσι, η παρουσία της πλάκας σιδήρου στις ρίζες και στα ριζώματα φαίνεται να είναι ευεργετική για την επιβίωση του φυτού

υπό συνθήκες ανοξίας αφού λειτουργεί ως ένας φραγμός για προϊόντα οξειδωσης που είναι άφθονα σε ανοξικά περιβάλλοντα (Koch and Mendelsohn 1989).

Σύμφωνα με τους Curie και Briat (2003), η παρουσία της πλάκας σιδήρου μπορεί να χρησιμεύει και ως μια δεξαμενή για την πρόσληψη σιδήρου σε περιόδους που το περιβάλλον της ρίζας δεν είναι ικανό να παρέχει την απαιτούμενη ποσότητα του μικροστοιχείου αυτού. Από την άλλη μεριά, νωρίτερα είχε διαπιστωθεί από τους Christensen και Sand- Jensen ότι η πλάκα σιδήρου στις ρίζες του υδροχαρούς φυτού *Lobelia dortmanna* φαινόταν να εμποδίζει την πρόσληψη του φωσφόρου οδηγώντας σε έλλειψή του, δεδομένου του ότι ο φωσφόρος συνδέεται στον οξειδωμένο σίδηρο (Christensen και Sand- Jensen 1998). Έτσι, ο ρόλος της πλάκας σιδήρου μπορεί να είναι και προληπτικός στην υπερβολική πρόσληψη σιδήρου, όταν αυτός είναι σε περίσσεια (Tanaka et al. 1966).

Η κύρια αιτία σχηματισμού, όμως, της πλάκας σιδήρου στις ρίζες των κατακλυσμένων φυτών είναι σύμφωνα με πολλούς ερευνητές η προφύλαξή τους από τα βαρέα και φυτοτοξικά μέταλλα και μεταβολίτες. Τα βαρέα μέταλλα αποτελούν μια σοβαρή απειλή για τα φυσικά οικοσυστήματα, διότι μπορούν να είναι τοξικά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Επίσης δεν είναι βιοδιασπάσιμα και επομένως μπορούν να συμμετέχουν στο βιολογικό κύκλο των οικοσυστημάτων και να βιοσυσσωρεύονται. Εκτεταμένες μελέτες της ανοχής και της συσσώρευσης των βαρέων μετάλλων από τα φυτά υπογραμμίζουν τη χρησιμότητά τους στην αποκατάσταση των εδαφών από τους ρύπους. Οι μεταλλικές εναποθέσεις της πλάκας φαίνεται να συνδέονται με πολλά μέταλλα και μεταλλοειδή, όπως Cu, As, Zn και Mn (Otte et al. 1989, 1991, St.Cyr et al. 1990).

Και ενώ οι συσχετίσεις μεταξύ του σιδήρου και των μετάλλων που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι φανερές, οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στην απομάκρυνσή τους δεν είναι εξακριβωμένοι. Μέχρι τώρα, η γνώση μας για την δημιουργία και το δομικό περιβάλλον των μετάλλων ορίζει επιτακτική την ανάγκη για πρόβλεψη και μοντελοποίηση της μεταφοράς τους και του προορισμού τους σε κατακλυσμένα εδάφη.

A.8.5 Συσχέτιση των εναποθέσεων σιδήρου με το φωσφόρο.

Πολλές είναι οι αναφορές που συνδέουν τις εναποθέσεις σιδήρου στη ρίζα με την παρουσία φωσφόρου. Δεδομένου του ότι οι φυσικές και χημικές ιδιότητες της πλάκας σιδήρου είναι ίδιες με αυτές των οξειδίων σιδήρου στο έδαφος, είναι φανερό ότι θα απορροφούν φωσφόρο σε μεγάλη κλίμακα. Ο Greipsson και η ομάδα του το 1995 αναφέρει ότι η πλάκα σιδήρου στο ριζικό σύστημα του ρυζιού δεν εμποδίζει την πρόσληψη του φωσφόρου. Επί πλέον, ερευνητές αναφέρουν ότι στην πλάκα υπάρχουν σημαντικά συμπληρωματικά στοιχεία όπως ο P, το S και το Mg. Αυτά τα στοιχεία βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία σε φυτά (*Typha*, *Carex*) που

έχουν σχηματίσει πλάκα σιδήρου, παρά σε φυτά που δεν έχουν τέτοιες εναποθέσεις. Αυτή η παρατήρηση καταδεικνύει όχι την απλή παρουσία αλλά τη συμμετοχή του P στη δομή και την συμπεριφορά της πλάκα σιδήρου. Παράλληλα, μπορεί να υποτεθεί ότι ο φωσφόρος που δεσμεύεται στην πλάκα μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το φυτό σε περίπτωση έλλειψής του. Όμως υπάρχουν και αντιφατικές αναφορές, όπως αυτή του Otte et al. (1991) όπου υποστηρίζεται ότι δεν υπάρχει σημαντική συσσώρευση του φωσφόρου στη ριζόσφαιρα του φυτού *Aster trifolium* που αναπτύσσεται σε κατακλυσμένα εδάφη. Παράλληλα υποστηρίζεται (Jones 1973) ότι η πρόσληψη P από κάποια αγρωστώδη είναι περιορισμένη αλλά και ότι η πλάκα σιδήρου επάγει την πρόσληψη P στο ρύζι (Jugsujinda 1975). Επομένως, δεν είναι σαφής ο τρόπος με τον οποίο η πλάκα σιδήρου επηρεάζει την πρόσληψη φωσφόρου στα φυτά.

Ο Zhang και η ερευνητική του ομάδα το 1999, με μια σειρά πειραμάτων σε υδροπονική καλλιέργεια ρυζιού κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το ποσοστό του φωσφόρου που προσροφάται στη ρίζα αυξάνεται σημαντικά με την αύξηση της πλάκας σιδήρου καταδεικνύοντας ότι η πλάκα σιδήρου έχει μεγάλη ικανότητα απορρόφησης φωσφόρου από το μέσο αύξησης. Επίσης, φαίνεται ότι υπάρχει επίδραση της πλάκας σιδήρου στην πρόσληψη του φωσφόρου. Η συγκέντρωση του φωσφόρου στο φυτό ποικίλει ανάλογα με το ποσό των $Fe(OH)_3$ στο θρεπτικό διάλυμα. Η συγκέντρωση του φωσφόρου στο βλαστό αυξάνεται περισσότερο από 70% όταν προστίθενται $Fe(OH)_3$ στο θρεπτικό διάλυμα προάγοντας μια αντίστοιχη αύξηση της πλάκας σιδήρου στη ρίζα, γεγονός που υποδεικνύει την επαύξηση της πρόσληψης του φωσφόρου χάρη στην πλάκα σιδήρου.

Σε αντίθετη περίπτωση, σε έλλειψη σιδήρου δηλαδή, η πρόσληψη φωσφόρου από φυτά που έχουν ήδη έλλειψη σιδήρου σε σχέση με την πρόσληψη από φυτά με αποθέματα σιδήρου, δεν παρουσιάζει διαφορές. Έτσι, παρά την μεγαλύτερη απελευθέρωση φυτοσιδηροφόρων από τα φυτά που έχουν έλλειψη φωσφόρου, δεν ανιχνεύεται περισσότερος φώσφορος. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι τα φυτοσιδηροφόρα δεν συμβάλλουν στην πρόσληψη φωσφόρου (Zhang et al. 1999).

Μελέτες υποστηρίζουν ότι ο φωσφόρος που συσσωρεύεται στην πλάκα σιδήρου και επομένως αυξάνει την συγκέντρωση του φωσφόρου στην επιφάνεια της ρίζας είναι πιθανό να αυξάνει και τη συγκέντρωση του P στο βλαστό. Ακόμα όμως δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός με τον οποίο η πλάκα σιδήρου βοηθά την πρόσληψη του φωσφόρου από το φυτό.

A.8.6 Σχέση των εναποθέσεων σιδήρου με το S.

Η σχέση του θείου με τις ριζικές εναποθέσεις του σιδήρου ορίζουν ένα σημαντικό πεδίο έρευνας που αφορά τις μορφές του εφαρμοζόμενου θείου, την οξειδωτική κατάσταση, την σχέση πρόσληψης θείου και σιδήρου τόσο στο περιβάλλον της

ριζόσφαιρας όσο και στους ιστούς της ρίζας και του υπέργειου. Υπάρχουν πολλές αναφορές για την επίδραση του θείου, όταν βρίσκεται σε μορφές υψηλού οξειδωτικού δυναμικού, όπως τα σουλφίδια. Σε περιβάλλοντα όπως τα θαλάσσια, όπου η συγκέντρωση των σουλφιδίων είναι για διάφορους λόγους υψηλή και το οξυγόνο μπορεί να είναι μειωμένο, έχει συνδεθεί η παρουσία των εναποθέσεων σιδήρου με έναν προστατευτικό ρόλο απέναντι σε τοξικές μορφές, όπως αυτές των σουλφιδίων.

Παρόλα αυτά υπάρχει θετική συσχέτιση του θείου με τις εναποθέσεις σιδήρου στη ρίζα, ακόμα και σε περιβάλλοντα που τα φυτά δεν απειλούνται άμεσα από την παρουσία σουλφιδίων. Μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ του εφαρμοζόμενου θείου και του προσλαμβανόμενου σιδήρου από το περιβάλλον της ριζόσφαιρας, μέσω των εναποθέσεων σιδήρου (Hu et. al 2007). Συγκεκριμένα, ο εκχυλιζόμενος σίδηρος των εναποθέσεων σιδήρου φαίνεται να αυξάνεται υπό +S συνθήκες. Ομοίως, παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την αυξανόμενη παρουσία του θείου στο ίδιο περιβάλλον, κυρίως απουσία βαρέων μετάλλων όπως το As. Η σχέση αυτή φαίνεται να είναι πιο ισχυρή όταν η μορφή του εφαρμοζόμενου θείου είναι SO_4^{2-} σε αντιδιαστολή με εφαρμογές θείου με S^0 . Ακόμα, σημειώνεται ότι το θείο μπορεί όχι απλά να αυξήσει την συγκέντρωση των εναποθέσεων σιδήρου στη ριζόσφαιρα αλλά να συμβάλλει σημαντικά και στην επαγωγή του φαινομένου της πλάκας σιδήρου.

A.8.7 Σχέση των εναποθέσεων σιδήρου και των φυτοσιδηροφόρων

Παλαιότερες εργασίες του Zhang και της ομάδας του (Zhang et al 1996) έδειξαν ότι τα φυτοσιδηροφόρα που εκκρίνονται από τα φυτά που έχουν έλλειψη σιδήρου μπορούν να κινητοποιήσουν τον ψευδάργυρο που βρίσκεται απορροφημένος στην πλάκα σιδήρου ώστε να τον προσλάβει το φυτό. Έτσι, σε επόμενη εργασία, έγινε εφαρμογή $Fe(OH)_3$ σε φυτά προκειμένου να σχηματιστούν οι εναποθέσεις σιδήρου και παράλληλα έγινε εφαρμογή P. Μέτρηση της συγκέντρωσης των φυτοσιδηροφόρων σε αυτά τα φυτά έδειξε υψηλότερα επίπεδα φυτοσιδηροφόρων με ίδια όμως επίπεδα φωσφόρου σε όλους τους χειρισμούς. Έτσι, παρατηρήθηκε ότι η έκκριση των φυτοσιδηροφόρων σε μπορεί να συνδέεται με τον φωσφόρο που βρίσκεται συσσωρευμένος στην πλάκα σιδήρου.

Παρόλα αυτά, σημειώνεται ότι η επαγωγή της πλάκας σιδήρου με εφαρμογή $Fe(OH)_3$ προκάλεσε τη βιοσύνθεση φυτοσιδηροφόρων, χωρίς να διευκρινίζεται αν η επαγωγή των φυτοσιδηροφόρων έχει σχέση με την κινητοποίηση του σιδήρου από τις εναποθέσεις του περιβάλλοντος της ρίζας.

A.9 Σκοπός της εργασίας.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της διαχείρισης του σιδήρου στον αραβόσιτο, με έμφαση στην κατανομή του στους ιστούς, στη συσσώρευσή του στην επιφάνεια της ρίζας και στην γονιδιακή έκφραση του μεταφορέα Fe-PS, ZmYS1. Η μελέτη έγινε σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο συγκριτικά με φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Η συσσώρευση του σιδήρου μετρήθηκε στο σπόρο, στη ρίζα και στο υπέργειο. Στη συνέχεια απομακρύνθηκαν οι εναποθέσεις του σιδήρου από την επιφάνεια της ρίζας, του σπόρου και της βάσης του υπέργειου με διάλυμα DCB και μετρήθηκε η ποσότητά τους. Παράλληλα, μελετήθηκε μακροσκοπικά η κατανομή των εναποθέσεων του σιδήρου στη ρίζα και χαρτογραφήθηκε η παρουσία τους με χρήση της χρώσης Perl. Τέλος, μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου ZmYS1 υπό control και -S συνθήκες.

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B. Υλικά και Μέθοδοι

B.1 Καλλιέργεια αραβοσίτου (*Zea mays*, L) σε υδροπονικό σύστημα.

Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι καλαμποκιού (*Zea mays*, L.) από το υβρίδιο Cisco της Sygenta με μικρό βιολογικό κύκλο. Τα σπέρματα είναι επενδεδυμένα με GAUCHO®, μείγμα δύο μυκητοκτόνων και ενός εντομοκτόνου και γι' αυτό ξεπλένονται με απιονισμένο νερό. Η σπορά έγινε σε ειδικές παλέτες ανάμεσα σε υγρό διηθητικό χαρτί και τα σπέρματα αφέθηκαν για τρεις μέρες να βλαστήσουν στους 27-28 °C με σχετική υγρασία 79% στο σκοτάδι.

Μετά από τρεις ημέρες, όταν έχει εμφανιστεί η πρωτογενής και η δευτερογενής εμβρυακή, επιλέχθηκαν 90 φυτάρια και μεταφέρθηκαν σε παλέτες των 30 θέσεων. Κάθε παλέτα τοποθετήθηκε σε λεκάνη με περίπου 7 L απεσταγμένου νερού στις οποίες εφαρμόστηκαν αντλίες οξυγόνου. Οι λεκάνες μπήκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με χαρακτηριστικά:

- θερμοκρασία 27-28 °C
- σχετική υγρασία 36-37%
- πυκνότητα φωτονιακής ροής 186 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- φωτοπερίοδος 16d/8n
- συγκέντρωση O_2 : 7,2 ppm

Την ημέρα 3 μεταφυτεύσαμε τα φυτάρια σε παλέτες των 12 θέσεων που περιείχαν θρεπτικό διάλυμα με δυναμικότητα 50% του πλήρους και pH 5,5 για την προσαρμογή των φυτών από το απιονισμένο νερό στο θρεπτικό καλλιέργειας. Στη συνέχεια, γίνονταν αλλαγές ανά τρεις μέρες με πλήρες διάλυμα σε όλες τις λεκάνες, ενώ από την 14^η μέρα και μετά χωρίζουμε δύο λεκάνες με πλήρες θρεπτικό διάλυμα και δύο με διάλυμα θρεπτικής καταπόνησης θείου (-S).

Η σύσταση του πλήρους θρεπτικού διαλύματος (C) ήταν : 5 mM KNO_3 , 1 mM KH_2PO_4 , 2 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mM $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.07 mM EDTA FeNa, 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.9 μM ZnCl_2 , 30 μM H_3BO_3 , 0.9 μM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 μM MoO_3 85% και 20 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Παράρτημα B2).

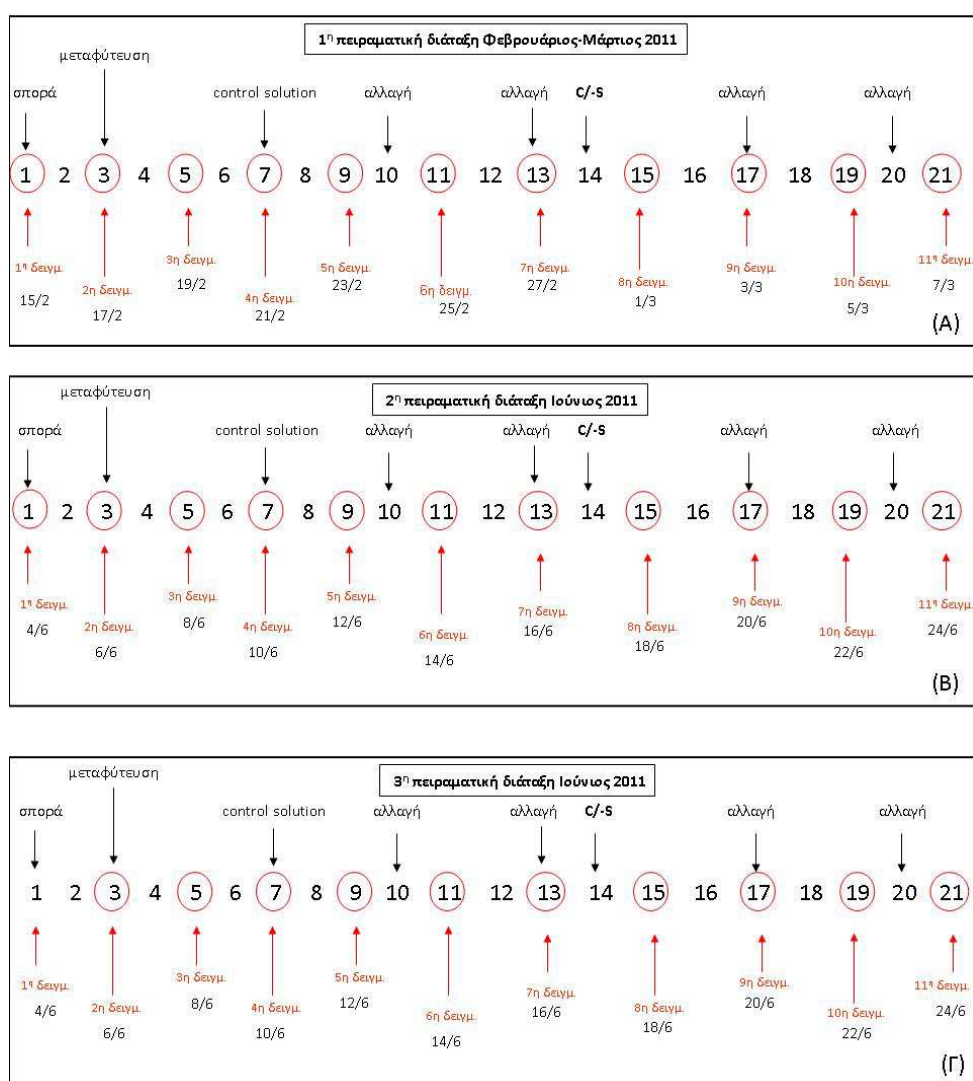
Η σύσταση του ελλειμματικού σε θειικά διαλύματος (-S) ήταν : 5 mM KNO_3 , 1 mM KH_2PO_4 , 2 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.07 mM EDTA FeNa, 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.86 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.9 μM ZnCl_2 , 30 μM H_3BO_3 , 0.9 μM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 μM MoO_3 85% και 20 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Παράρτημα A1).

Η διόρθωση που χρειάστηκαν για το pH ήταν 350 μL KOH 1M για το πλήρες θρεπτικό διάλυμα συγκέντρωσης 1M, ενώ αντιστοίχως ως προς τη συγκέντρωση του διαλύματος στις λεκάνες υδροπονικής καλλιέργειας χρειάστηκαν 600 μL KOH 1M και 1200 μL KOH 1M για το ελλειμματικό σε θείο θρεπτικό διάλυμα.

B2. Δειγματοληψία

Δεδομένου ότι το συγκεκριμένο πειραματικό μελετούσε τη ρίζα (υπόγειο μέρος) και το βλαστό με τα φύλλα (υπέργειο μέρος) και σπόρο, δε μελετήθηκαν γενικά ξεχωριστά τα διάφορα μέρη του υπέργειου ή το υπόγειου μέρους του φυτού, παρά μόνο με τη χρώση Prussian blue. Έτσι, πήραμε δείγματα σπόρου, φύλλων και βλαστών που τα ονομάσαμε Σ (σπόροι) και δείγματα ριζών που τα ονομάσαμε Ρ (ρίζες) και Υ (υπέργειο).

Οι πειραματικές διαδικασίες της παραγωγής και δειγματοληψίας του φυτικού υλικού διήρκησαν 21 μέρες, όπως φαίνεται στην εικόνα B.1.1. Οι αλλαγές θρεπτικών γίνονταν κάθε τρεις μέρες.



Εικόνα B.1.1: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των πειραματικών υδροπονιών. (Α) Απλή μελέτη κατανομής σιδήρου στο ριζικό σύστημα. (Β) Μελέτη της κατανομής με απομάκρυνση των εναποθέσεων σιδήρου στο ριζικό σύστημα. (Γ). Χαρτογράφηση του ριζικού συστήματος με χρώση Perl (prussian blue).

Συγκεκριμένα, πήραμε δείγματα την 1^η, 3^η, 5^η, 7^η, 9^η, 11^η, 13^η, 15^η, 17^η, 19^η και την 21^η μέρα. Σε κάθε δειγματοληψία ανάλογα με το σκοπό του πειράματος λάβαμε διαφορετικό αριθμό φυτών, κυρίως όμως ακολουθήθηκε το μοτίβο των 3 φυτών, δηλαδή των 3 βιολογικών επαναλήψεων.

B.3 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Στην πρώτη πειραματική διάταξη (Φεβρουάριος 2011) μελετήθηκε η κατανομή του σιδήρου στο ριζικό σύστημα, στο υπέργειο μέρος και στους σπόρους του αραβοσίτου. Υπάρχει μία συγκεκριμένη ποσότητα του σιδήρου ($\mu\text{mol Fe}$) για ένα συγκεκριμένο μέρος του φυτού (ρίζα, σπόρος, υπέργειο), σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή (ημέρα πειράματος). Ελήφθησαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δειγματοληψία, η οποία μπορεί να περιελάμβανε ένα ή περισσότερα φυτά ανάλογα με την περίπτωση και ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Συγκομιδή ορισμένης ποσότητας φυτών και των βιολογικών τους επαναλήψεων ή μεγάλου αριθμού φυτών που εμπεριέχουν τις βιολογικές επαναλήψεις.
2. Ζύγιση και καταγραφή του νωπού βάρους ανά μέρος φυτού.
3. Ξήρανση για 3 ημέρες σε κλίβανο στους 80°C.
4. Ζύγιση και καταγραφή ξηρού βάρους ανά μέρος φυτού.
5. Λειοτρίβιση του ιστού σε μύλο μέχρι να γίνει μια ομοιόμορφη σκόνη.
6. Ορισμός ποσότητας για καύση σύμφωνα με τα όρια μέτρησης της ατομικής απορρόφησης.
7. Καύση του δείγματος με H_2SO_4 και H_2O_2 σε θερμοαντιδραστήριο σώμα.
8. Διήθηση με διηθητικό χαρτί και αραίωση μέχρι συγκεκριμένο τελικό όγκο με απιονισμένο νερό.
9. Μέτρηση της συγκέντρωσης του σιδήρου στην ατομική απορρόφηση.
10. Υπολογισμός της συσσώρευσης Fe ($\mu\text{mol Fe/ μέρος φυτού}$).

Αναλυτικά, κατά τη συγκομιδή συλλέχθηκαν από την υδροπονική εγκατάσταση τα φυτά που προορίζονταν για τη δειγματοληψία. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το νερό που έχει απομείνει στις ρίζες με απορροφητικό χαρτί, έτσι ώστε να μην υπάρχει υδατικό φορτίο στο δείγμα. Έπειτα, ξεχωρίστηκαν τα μελετώμενα μέρη του φυτού, δηλαδή υπέργειο (ελάσματα και κολεοί), ριζικό σύστημα και σπόρος. Ακολούθησε η ζύγιση με ζυγαριά ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων και η καταγραφή του νωπού βάρους του κάθε δείγματος. Τα δείγματα παρέμειναν για 3 ημέρες τουλάχιστον στον κλίβανο στους 80°C έτσι ώστε να ξηρανθούν μέχρι σταθερού βάρους. Καταγράφηκε το ξηρό βάρος τους και ο ιστός

λιοτριβήθηκε σε μύλο (IKA Labortechnik). Για το συγκεκριμένο πειραματικό και για το μελετώμενο σίδηρο ορίστηκε ως ποσότητα μελέτης 500 mg ξηρής μάζας από κάθε δείγμα.

Στη συνέχεια του πειραματικού, έγιναν καύσεις των δειγμάτων με H_2SO_4 και H_2O_2 .

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της καύσης με H_2SO_4 και H_2O_2 . Σύμφωνα με τους Mills & Jones (1996) το πρωτόκολλο καύσης φυτικού υλικού είναι:

α. Σε ποτήρια ζέσεως των 250 mL τοποθετείται η ποσότητα του δείγματος (0,5 g), προστίθενται 5 mL H_2SO_4 με γυάλινη πιπέτα και το ποτήρι ζέσεως καλύπτεται με μία ύαλο ωρολογίου.

β. Το ποτήρι με το περιεχόμενό του τοποθετείται σε θερμαντική πλάκα και αφήνεται 4-5 min σε θερμοκρασία ελαφρά χαμηλότερη από το σημείο βρασμού του θειϊκού οξέος.

γ. Η καύση συνεχίζεται με την προσθήκη H_2O_2 με τη βοήθεια σύριγγας.

δ. Όταν το δείγμα γίνει διαυγές τότε αποσύρεται από τη θέρμανση και η καύση θεωρείται ολοκληρωμένη.

Ως αποτέλεσμα της καύσης λαμβάνουμε ένα διάλυμα στο οποίο βρίσκονται διαλυμένα όλα τα ανόργανα συστατικά του φυτικού υλικού. Μετά τη διαδικασία της καύσης ακολουθεί η διήθηση και η αραιώση του δείγματος σε έναν συγκεκριμένο τελικό όγκο.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του σιδήρου στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της φασματοφωτομετρίας ατομικής απορρόφησης. Το Εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών διαθέτει σύστημα ατομικής απορρόφησης φλόγας. Συγκεκριμένα, ο τύπος της φλόγας είναι αέρος – ασετυλίνης. Η λάμπα που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ακτινοβολίας είναι των 7.0 mA. Το μήκος κύματος για τη μέτρηση σιδήρου Fe είναι σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του συστήματος 248,3 nm. Η βαθμονόμηση ελέγχεται πειραματικά από το λογισμικό της ατομικής απορρόφησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (Linear LS Through Zero). Η παροχή του καυσίμου (ασετυλίνης) καθορίστηκε στα 1,05 l/min και ο ρυθμός οξειδωσης στα 20.1 l/min. Το δείγμα μετρούνταν κάθε φορά 3 φορές με 3 επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης από το σύστημα. Ο χρόνος μέτρησης για κάθε δείγμα καθορίστηκε στα 3.0 s.

Οι μετρήσεις του συστήματος μεταφέρθηκαν σε υπολογιστή μέσω του λογισμικού GBC Avanta Ver 1.31 απ' όπου προέκυψαν μετά από υπολογισμούς και στατιστική επεξεργασία συγκεκριμένες συγκεντρώσεις σιδήρου για κάθε δείγμα.

B.4 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο μετά από χειρισμό με DCB.

Στην δεύτερη πειραματική διάταξη (Ιούνιος 2011) θεωρήθηκε σκόπιμο να απομακρυνθεί η ποσότητα σιδήρου η οποία δεν βρίσκεται εντός των κυττάρων των ριζών παρά σχηματίζει εναποθέσεις στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος του φυτού. Προκειμένου να γίνει αυτό τα φυτά, αφού συγκομίζονταν από την υδροπονία και πριν υποστούν κάποιον άλλο χειρισμό αφήνονταν σε διάλυμα DCB (Zohlen et al. 1997, Chen et al. 2006 και Zhang et al. 1997). Οι παραπάνω θεωρούν ότι η απομάκρυνση των εναποθέσεων σιδήρου από τη ρίζα του φυτού γίνεται με διάλυμα DCB, (**D**ithionite **C**itrate **B**icarbonat**e**).

Πίνακας Β.4.1: Η σύσταση του διαλύματος DCB.

Χημικός τύπος	Ονοματολογία ένωσης	Συγκέντρωση (M)
$C_3H_4OH(COOH)_2COONa \cdot 2H_2O$	sodium bicarbonate	0.03
$NaHCO_3$	sodium citrate	0.125
$Na_2S_2O_4$	sodium dithionite	0.6 g

Δεδομένου ότι το διάλυμα οξειδώνεται σε θερμοκρασία δωματίου, είναι απαραίτητο να παρασκευάζεται κάθε φορά μικρό χρονικό διάστημα πριν το χειρισμό. Παράλληλα, η βιβλιογραφία αναφέρει ότι το διάλυμα είναι ευαίσθητο και στην φωτοξείδωση, επομένως όλοι οι χειρισμοί από τη φύλαξη του διαλύματος, τη διαδικασία εκχύλισης του ριζικού συστήματος για 60 min στο διάλυμα αυτό και η φύλαξη των εκχυλισμάτων μέχρι τον προσδιορισμό γίνεται στο σκοτάδι. Παρατηρήθηκε ότι ένα διάστημα της τάξης των 30 min δεν επηρέαζε τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του διαλύματος (χρώμα, ίζημα κλπ).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι τροποποίηση της διαδικασίας που ακολουθείται για να γίνει η εκχύλιση των εναποθέσεων σιδήρου από το ριζικό σύστημα (Zohlen et al. 1997, Chen et al. 2006 και Zhang et al. 1997). Συγκεκριμένα:

1. Ξεπλένεται πολύ καλά το ριζικό σύστημα ενός άθικτου φυτού με απιονισμένο νερό.
2. Εμβαπτίζεται πλήρως σε ορισμένο όγκο διαλύματος εκχύλισης για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C).
3. Ξεπλένεται πολύ καλά (3 φορές) με απιονισμένο νερό, εμβαπτίζοντας διαδοχικά σε τρία ποτήρια ζέσεως με την ελάχιστη δυνατή ποσότητα απιονισμένου νερού. Προστίθεται το σύνολο του διαλύματος αυτού στο προηγούμενο διάλυμα εκχύλισης.

4. Διηθείται το τελικό διάλυμα εκχύλισης που προέκυψε και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι συγκεκριμένο όγκο, ο οποίος και καταγράφεται.

Ο σίδηρος του διαλύματος (δείγματος) προσδιορίζεται με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης, όπως και στην πρώτη πειραματική διάταξη.

B.5 Μελέτη της κατανομής των εναποθέσεων του σιδήρου σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο με χρήση της ιστοχημικής τεχνικής χρώσης Perl's.

Στην τρίτη πειραματική διάταξη (Ιούνιος 2011) μελετήθηκε η κατανομή των εναποθέσεων σιδήρου κατά μήκος του ριζικού συστήματος του αραβοσίτου με χρώση Perl. Βασικό αντιδραστήριο της χρωστικής Perl είναι το σιδηροκυανιούχο κάλιο.

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ιστοχημικής χρώσης του σιδήρου για να προσδιοριστεί η παρουσία ή η απουσία των εναποθέσεων του σιδήρου στις ρίζες του αραβοσίτου. Η χρωστική αυτή συναντάται στη βιβλιογραφία και ως Prussian Blue stain. Η διαδικασία της χρώσης υπάρχει στη βιβλιογραφία (Roschztardt et al. 2009, Cvitanich et al. 2010, Stacey et al. 2008) και γίνεται ως εξής: Για 100 mL διαλύματος χρωστικής Perl, διαλύονται 2 g σιδηροκυανιούχο κάλιο (κρυσταλλικής μορφής) σε 80 mL απιονισμένου νερού. Προστίθενται 2 mL διαλύματος HCl 37% και συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τα 100 mL. Το διάλυμα είναι ευαίσθητο στο φως και στη θερμοκρασία και γι' αυτό είναι απαραίτητο να παρασκευάζεται μικρό χρονικό διάστημα πριν τη χρήση του.

Μια τροποποίηση των τεχνικών που αναφέρονται στις παραπάνω αναφορές, η οποία είναι το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, είναι η εξής:

1. Ξεπλένεται πολύ καλά το ριζικό σύστημα ενός άθικτου φυτού με απιονισμένο νερό.
2. Εμβαπτίζεται πλήρως το ριζικό σύστημα στο διάλυμα της χρωστικής για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C).
3. Το δείγμα ξεπλένεται 3 φορές με απιονισμένο νερό.

Μετά το πέρας της διαδικασίας της χρώσης γίνεται η παρατήρηση του δείγματος μακροσκοπικά και στερεοσκοπικά. Μακροσκοπικά, χαρτογραφήθηκε η παρουσία του σιδήρου σε όλο το μήκος της πρωτογενούς ρίζας, των δευτερογενών και των βλαστογενών ριζών, μέσω φωτογραφιών του λήφθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Τα φυτά φωτογραφήθηκαν επάνω σε βαθμονομημένο χαρτί (millimeter). Στη συνέχεια οι φωτογραφίες υπέστησαν επεξεργασία με το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας Photoshop έτσι ώστε να διορθωθεί η προοπτική

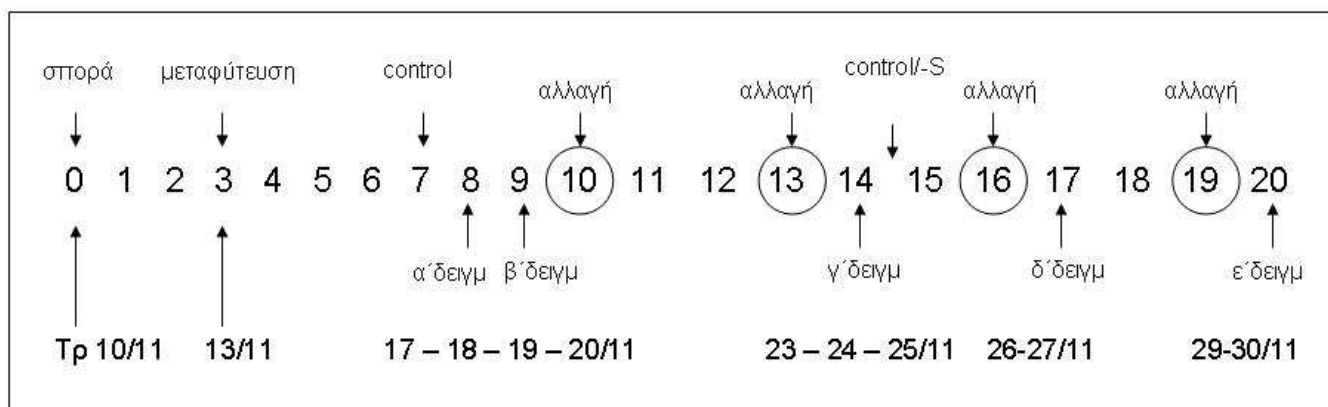
λήψης της φωτογραφίας και να μπορούν να μετρηθούν με ψηφιακό λογισμικό. Ακολούθησε επεξεργασία με το λογισμικό Revit Architecture 2009 (Autodesk) με το οποίο μετρήθηκαν τα εκατοστά (cm) της χρώσης όπου αυτή φαινόταν, και σημειώθηκε ιδιαίτερα η απουσία της (cm) όπου ήταν φανερό.

Στερεοσκοπικά χρησιμοποιήθηκε στερεοσκόπιο τύπου Leica WILD M3B με προσαρμοσμένο φακό και ψηφιακή φωτογραφική μηχανή τύπου Canon PowerShot G11, εξοπλισμό με τη βοήθεια του οποίου φωτογραφήθηκαν όλα τα δείγματα σε μεγεθύνσεις 2x, 5x και 10x.

B.6 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης του μεταφορέα YS1 στον αραβόσιτο σε φυτά που έχουν αναπτυχθεί σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Σε μια τέταρτη πειραματική διάταξη (Νοέμβριος 2010) μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση του μεταφορέα ZmYS1. Δεδομένου ότι το συγκεκριμένο πειραματικό μελετούσε τη ρίζα (υπόγειο μέρος) και το βλαστό με τα φύλλα (υπέργειο μέρος). Έτσι, πήραμε δείγματα φύλλων και βλαστών που τα ονομάσαμε L (leaves) και δείγματα ριζών που τα ονομάσαμε R (roots).

Η πειραματική διαδικασία της παραγωγής και δειγματοληψίας του φυτικού υλικού διήρκεσε 20 μέρες, όπως φαίνεται στην εικόνα 1. Οι αλλαγές θρεπτικών γίνονταν κάθε τρεις μέρες.



Εικ. Β.6.1: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση του πειραματικού της υδροπονίας για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του ZmYS1, που πραγματοποιήθηκε το Νοέμβριο του 2010.

Συγκεκριμένα, πήραμε δείγματα την 8^η, 9^η, 14^η, 17^η και 20^η μέρα. Σε κάθε δειγματοληψία λάβαμε τρία φυτά (βιολογικές επαναλήψεις) για κάθε χειρισμό.

B.6.1 Απομόνωση και καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων από φυτικούς ιστούς

B.6.1.1 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Brusslan & Tobin (1992), μερικώς παραλλαγμένη εξ' αιτίας της ιδιομορφίας του φυτικού υλικού. Σύμφωνα με τους Brusslan & Tobin (1992), το πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από φυτικούς ιστούς είναι:

- 0,2 g φυτικού ιστού ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου.
- Το δείγμα μεταφέρεται με αποστειρωμένη σπάτουλα σε σωλήνα errendorf που περιέχει 300 μL διαλύματος εκχύλισης RNA (REB) και 300 μL μίγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 24:24:1 (PIC pH: 8,3).
- Ακολουθεί καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδάτινη φάση (υπερκείμενο) μεταφέρεται σε νέο σωλήνα errendorf και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με 300 μL μίγματος PIC.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται στις 13000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα errendorf και τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 όγκου 3M οξικού νατρίου pH: 5,2 και ενός όγκου ισοπροπανόλης.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται στις 13000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα των νουκλεϊνικών οξέων επαναδιαλύεται σε 1125 μL διαλύματος 10T/10E και το RNA κατακρημνίζεται εκλεκτικά με την προσθήκη 375 μL διαλύματος 8M LiCl και επώαση στους -20°C για τουλάχιστον 12 ώρες.
- Μετά το πέρας της επώασης το ολικό RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται στις 13000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στο πάγο.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος 10T/1E ή ddH₂O.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, εξ' αιτίας της ιδιομορφίας του φυτικού υλικού (ρίζες καλαμποκιού) χρειάστηκε να τροποποιηθεί το πρωτόκολλο των Brusslan & Tobin. Τελικά η απομόνωση του ολικού RNA έγινε ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα:

1. Ομογενοποιούνται 0,1 – 0,5 g φυτικού ιστού σε γουδί λιοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου.
2. Το δείγμα μεταφέρεται αμέσως σε erpendorf με παγωμένη και αποστειρωμένη σπάτουλα. Εκεί προστίθενται 300 µL διαλύματος εκχύλισης RNA (REB) και 300 µL μίγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 24:24:1 (PIC pH: 8,3).
3. Πολύ καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec. Φυγοκέντρηση (στροφές: 14000, χρόνος: 7 min, θερμοκρασία: 4°C).
4. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με 300 µL μίγματος PIC.
5. Πολύ καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec. Φυγοκέντρηση (στροφές: 14000, χρόνος: 7 min, θερμοκρασία: 4°C).
6. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με 300 µL μίγματος PIC.
7. Πολύ καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec. Φυγοκέντρηση (στροφές: 14000, χρόνος: 7 min, θερμοκρασία: 4°C).
8. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος μίγματος SEVAG (χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη, 24:1)
9. Πολύ καλή ανάδευση με το χέρι. Φυγοκέντρηση (στροφές: 14000, χρόνος: 10 min, θερμοκρασία: 4°C).
10. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 όγκου 3M οξικού νατρίου pH: 5,2. Προστίθεται επίσης 2,5 φορές ο όγκος του υπερκειμένου 100% αιθανόλη παγωμένη.
11. Επώαση στους -20°C για τουλάχιστον 12 ώρες.
12. Φυγοκέντρηση (στροφές: 13000, χρόνος: 30 min, θερμοκρασία: 4°C).
13. Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στο πάγο.
14. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 25µL νερού (HPLC απεσταγμένο).

B.6.1.2 Έλεγχος απομόνωσης RNA και γονιδιωµατικού DNA. Μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA με το NanoDrop™ 2000.

Η μέτρηση της πυκνότητας ενός δείγματος σε RNA γίνεται με τη χρήση του NanoDrop. Συγκεκριμένα, φορτώνεται 1 µL δείγματος στην επιφάνεια υποδοχής του μηχανήματος και με τη βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού υπολογίζεται η

συγκέντρωση (ng/μL) σε RNA καθώς και οι λόγοι καθαρότητας (230/280 και 230/260), αριθμοί που περιγράφονται και από την καμπύλη της απορρόφησης με το μήκος κύματος. Οι δείκτες αυτοί πρέπει να είναι κοντά στο 2 προκειμένου να πιστοποιηθεί η καθαρότητα του δείγματος.

Πίνακας B.6.1.2.1: Ενδεικτικές μετρήσεις συγκέντρωσης RNA με το NanoDrop 2000 μετά την απομόνωση του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς.

Sample no	RNA concentration (ng/ μL)	OD 230/260	OD 230/280
LA3	1536.3	2.09	2.08
RB3	1638.6	2.03	1.99
RE2-S	1228.8	2.03	1.98
LE1-S	1492.1	2.10	1.98

B.6.1.3 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Μετά την απομόνωση αναλύουμε τα νουκλεϊνικά οξέα για να ελέγξουμε το RNA που απομονώσαμε. Ο διαχωρισμός των δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων με βάση το μέγεθος και την διαμόρφωσή τους, γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Αν πρέπει να διαχωριστούν γραμμικά δίκλινα μόρια, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθός τους είναι ημιλογαριθμική. Η κινητικότητα μη γραμμικών μορίων εντός του ηλεκτρικού πεδίου της πηκτής δεν είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους τους, αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωσή τους στο χώρο.

Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από την συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη και κυμαίνεται από 0,1 έως 100kb. Στον πίνακα B.1 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης, ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Πίνακας B.6.1.3.1: Συγκέντρωση αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (kb)
0,3	1,7-70
0,5	0,7-45
0,8	0,4-20
1,0	0,3-10
1,2	0,2-8
1,5	0,2-6
2,0	0,1-5

Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός.

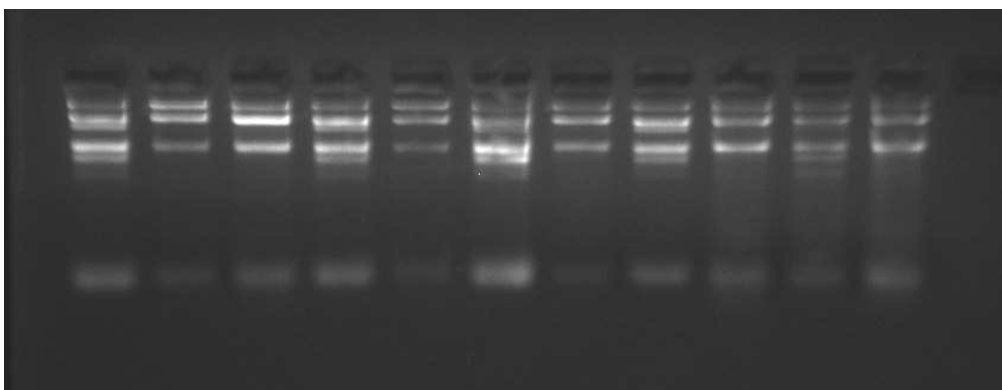
Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης, γίνεται ως εξής:

1. Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει. Η ποσότητα της αγαρόζης εξαρτάται από την επιθυμητή τελική συγκέντρωση της αγαρόζης στην πηκτή.
2. Στην λιωμένη αγαρόζη προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/mL) σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/mL και αναμιγνύεται πολύ καλά..
3. Αφού κρυώσει λίγο η αγαρόζη (μέχρι τους 50°C), τοποθετείται στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνεται η χτένα και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE.

Η διαδικασία «φορτώματος» των δειγμάτων στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης γίνεται ως εξής:

1. Το προς εξέταση δείγμα αραιώνεται με νερό σύμφωνα με μια αναλογία 1:4 ή 1:6, ανάλογα με το στάδιο της διαδικασίας.
2. Κατάλληλος όγκος από το αραιωμένο δείγμα αναμιγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης, και μεταφέρεται στο 'πηγαδάκι' της πηκτής αγαρόζης.
3. Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 Vcm⁻¹. Τόσο η τάση του ηλεκτρικού πεδίου όσο και ο χρόνος εφαρμογής του εξαρτώνται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν.

Τα δείγματα μετά από την απομόνωση παρουσίαζαν την παρακάτω μορφή στην πηκτή αγαρόζης (~2%).



Εικόνα Β.6.1.3.1 : Απομόνωση ολικού RNA από φύλλα και ρίζες αραβόσιτου σε πηκτή αγαρόζης 2%.

Β.6.1.4 Καθαρισμός ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.

Β.6.1.4.1 Χειρισμός με DNase.

Κατά τη διάρκεια όλης της διαδικασίας απομόνωσης του ολικού RNA, απομονώνεται και μέρος του γονιδιωματικού DNA των φυτικών ιστών. Αυτό είναι ανεπιθύμητο γιατί θα προκύψουν λανθασμένα αποτελέσματα κατά την μελέτη της μεταγραφής και έκφρασης γονιδίων. Έτσι απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Αυτή η διαδικασία βασίζεται στη δράση συγκεκριμένων ενζύμων που κόβουν το DNA ενώ ταυτόχρονα αφήνουν ανέπαφο το RNA.

Στη διαδικασία καθαρισμού του ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε η δεσοξυριβονουκλεάση RQ1 (DNAase RNAse free, Promega) η οποία είναι μια ενδονουκλεάση που αποικοδομεί τόσο ssDNA όσο και dsDNA υπόστρωμα. Τα προϊόντα αποικοδόμησης του υποστρώματος είναι 5' – φωσφορυλιωμένα δι-, τρι- και ολιγονουκλεοτίδια. Το ένζυμο απομονώνεται από το πάγκρεας του μοσχαριού και δεν παρουσιάζει εξειδίκευση αναφορικά με την αλληλουχία στόχο που αναγνωρίζει.

Εφαρμόσθηκε το πρωτόκολλο που προτείνει η Promega με μόνη διαφοροποίηση την ώρα επώασης στους 37°C. Για καλύτερη δράση της DNAάσης τα δείγματα επώασθηκαν για 90 λεπτά και όχι μόνο για 30 λεπτά στους 37°C.

1. Σε σωλήνα erpendorf προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- | | |
|--|-------------|
| ▪ Δείγμα RNA | 8-10 µg |
| ▪ 10x ρυθμιστικό διάλυμα DNAσης | 4µL |
| ▪ DNAση (1unit/µL) | 1µL /µg RNA |
| ▪ ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο | 40µL |

(Ο τελικός όγκος της αντίδρασης μπορεί να τροποποιηθεί και καθορίζεται από τη συγκέντρωση του απομονωμένου RNA)

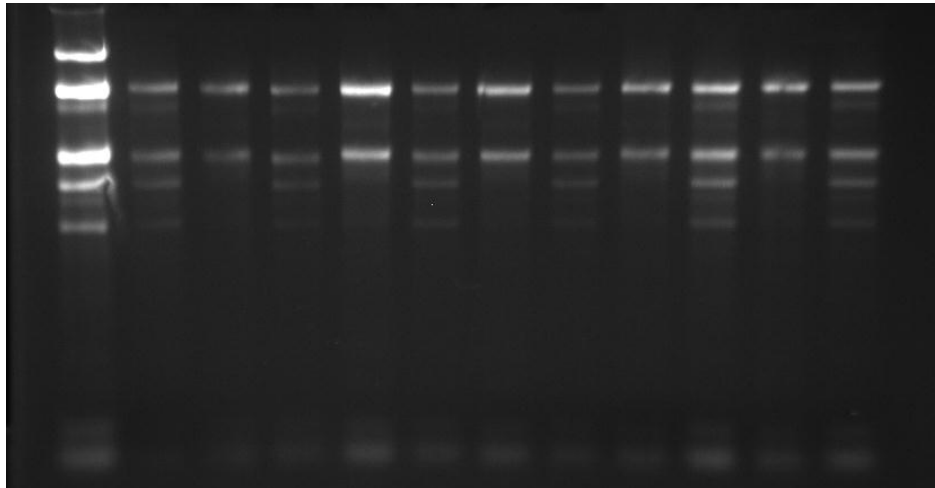
2. Το μίγμα των αντιδραστηρίων επώάζεται στους 37°C για 90 λεπτά.

3. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού του μίγματος με τη διαδικασία του καθαρισμού των νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη.

B.6.1.4.2 Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη.

Μετά τη διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA καθώς και μετά τη μεταχείριση με DNAση, θεωρείται απαραίτητος ο καθαρισμός των νουκλεϊνικών οξέων με τη χρησιμοποίηση φαινόλης. Το πρωτόκολλο που ακολουθεί αφορά το καθαρισμό του RNA μετά από τον χειρισμό με DNAση που περιγράφηκε προηγουμένως:

1. Στο μίγμα των αντιδραστηρίων που επωάζονται στο υδατόλουτρο στους 37°C, προστίθεται νερό (HPLC) μέχρι τελικό όγκο 300 μL.
2. Προστίθενται 300 μL μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης 24:24:1 (PIC)
3. Το μίγμα αναδεύεται καλά με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec. Φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθενται 300 μL PIC.
5. Το μίγμα αναδεύεται καλά με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec. Φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθενται 300 μL SEVAG (χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη, 24:1).
7. Το μίγμα αναδεύεται πολύ καλά με το χέρι και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 12000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 όγκου 3M οξικού νατρίου pH: 5,2. Προστίθεται επίσης 2,5 φορές ο όγκος του υπερκειμένου 100% αιθανόλη παγωμένη.
9. Επώαση στους -20°C για τουλάχιστον 12 ώρες.
10. Φυγοκέντρηση (στροφές: 13000, χρόνος: 30 min, θερμοκρασία: 4°C).
11. Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στο πάγο.
12. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20μL νερού (HPLC απεσταγμένο).



Εικόνα Β.6.1.4.2.1: Τα δείγματα μετά από χειρισμό με RQ1 DNase. Στην πρώτη στήλη φαίνεται ο μάρτυρας, δηλαδή το δείγμα στο οποίο δεν έχει γίνει χειρισμός με DNase.

Β.6.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενισχύσεως ακολουθιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ* (Mullis K et al. 1986, Mullis and Faloona 1987). Η αντίδραση προϋποθέτει την ύπαρξη δύο ολιγονουκλεοτιδίων, που έχουν την ικανότητα να υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA ή cDNA, τα οποία δρουν ως εκκινητές της σύνθεσης της αλυσίδας του DNA. Η όλη διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη.

Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη τα εξής:

1. Οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν σχετικά μικρό μέγεθος (15-30 νουκλεοτίδια) ώστε η θερμοκρασία υβριδισμού με το DNA να είναι μέσα σε λογικά πλαίσια.
2. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή πρέπει να είναι μοναδική και να υβριδίζει σε μια μόνο περιοχή του DNA.
3. Οι εκκινητές δε θα πρέπει να έχουν δευτεροταγή δομή. Στην αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών, θα πρέπει τα 3' άκρα τους να μην είναι συμπληρωματικά.
4. Ο σχεδιασμός των εκκινητών θα πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε οι δύο εκκινητές να περιέχουν περίπου ίση αναλογία σε GC/AT.
5. Ο κάθε εκκινητής θα πρέπει να περιέχει στα άκρα του G ή C.

Η σχεδίαση των εκκινητών είναι τέτοια, ώστε η σύνθεση της αλυσίδας του DNA να γίνεται προς τη κατεύθυνση του άλλου. Η σύνθεση γίνεται με τη δράση μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης η οποία χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούριας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'- 3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου που είναι δίκλωνο. Απαραίτητη είναι η ύπαρξη νουκλεοτιδίων, καθώς και ιόντων Mg^{+2} . Αρχικά για την PCR χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση του *E. coli* αλλά το ένζυμο αυτό είναι θερμοευαίσθητο και καταστρέφεται στις θερμοκρασίες εκείνες που απαιτούνται για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Σήμερα χρησιμοποιείται η DNA πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus*, και έχει άριστη θερμοκρασία δραστηριότητας στους 72°C, Αυτή η πολυμεράση αναφέρεται ως Taq πολυμεράση και η δραστηριότητά της παραμένει σε υψηλά επίπεδα ακόμη και μετά από επανειλημμένη αύξηση της θερμοκρασίας στους 94°C.

Κατά τη διάρκεια μια τυπικής αντίδρασης, πρώτο στάδια αποτελεί η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, με τη θέρμανση του δείγματος στους 94°C. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων γίνεται με θέρμανση του δείγματος στη βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Στη συνέχεια, οι αρχικές αλυσίδες καθώς και αυτές που συντέθηκαν στον προηγούμενο κύκλο, αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση στους 94°C, μπορούν να χρησιμεύσουν ξανά ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδίσουν οι εκκινητές. Η όλη διαδικασία αποδιάταξης, υβριδισμού των εκκινητών και σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας επαναλαμβάνεται για έναν αριθμό κύκλων (συνήθως 20-35). Κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων και εφ' όσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες όπως έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών ή παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης, η συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία υβριδισμού και από την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στη μήτρα του.

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησεως μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Συγκεκριμένα η ποσότητα του DNA που προστίθεται ως μήτρα εξαρτάται από το είδος του. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε γενωματικό DNA ως μήτρα γι' αυτό και η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μέχρι 0,5 μg. Επίσης η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεως (T_m). τους.

Στον πίνακα B.6.2.1 παρουσιάζεται μια τυπική αντίδραση PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Promega που εφαρμόστηκε και στη παρούσα εργασία.

Πίνακας Β.6.2.1: Πρωτόκολλο μιας τυπικής αντίδρασης PCR.

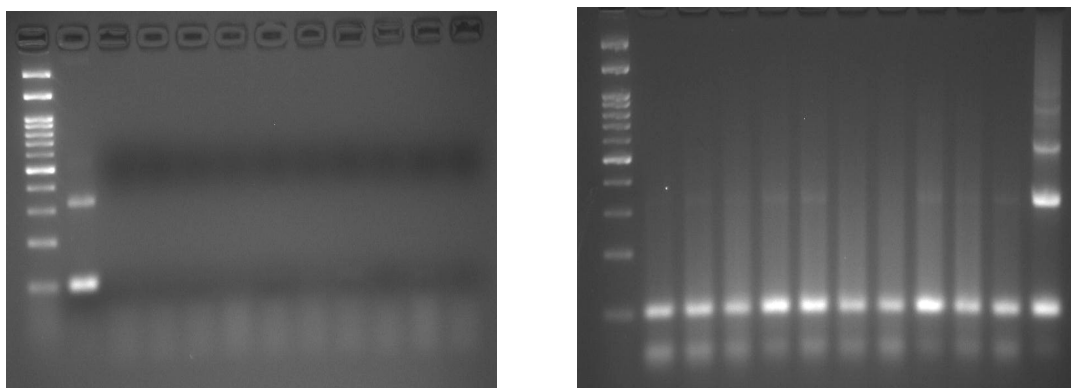
Σε ειδικό σωλήνα erpendorf (200μL) προστίθενται τα παρακάτω		
Συστατικό	Τελική συγκέντρωση (στα 50 μL της αντίδρασης)	Τελικός όγκος (μL)
Μήτρα DNA	Μέχρι 0,5 μg	Προσαρμόζεται κάθε φορά ανάλογα με τη συγκέντρωση του δείγματος.
Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10μM)	1μM	2,5μL
Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10μM)	1μM	2,5μL
Μίγμα dNTPs (10mM το καθένα)	0,2mM (το καθένα)	1μL
5x PCR ρυθμιστικό διάλυμα	1x	10μL
Διάλυμα MgCl ₂ 25mM	1-4mM	2-8μL
Taq DNA πολυμεράση (1u/μL)	1.25u	1.25μL
ddH ₂ O	-	Μέχρι τελικό όγκο 50μL

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του DNA για 25-35 κύκλους, είναι:

- Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation) 95°C για 2 λεπτά
- Αποδιάταξη (denaturation) 95°C για 1 λεπτό
- Υβριδισμός εκκινητών (annealing) 42-65°C για 1 λεπτό
- Επιμήκυνση (extension) 72°C για 1 λεπτό/kb προϊόντος
- Τελική επιμήκυνση (final extension) 72°C για 5 λεπτά
- Τοποθέτηση στους 4°C (πάγος) ή ρυθμίζεται επιπλέον βήμα στη PCR.

Πέρα από την τυπική αντίδραση ενίσχυσης δίκλωνων τμημάτων DNA, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί παραλλαγές της βασικής διαδικασίας που περιγράφηκε προηγουμένως. Μια από αυτές επιτρέπει τη χρησιμοποίηση μορίων RNA, ως αρχική μήτρα για την αντίδραση ενίσχυσης (RT-PCR), τα οποία αρχικά μεταγράφονται σε cDNA με την δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Επιπλέον είναι δυνατή η παρακολούθηση της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, σε όλη τη διάρκειά της, σε πραγματικό χρόνο. Η τεχνική αυτή ονομάζεται Real Time PCR και πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας χρωστικής ουσίας, της Sybergreen (SYBR Green), η οποία έχει τη δυνατότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεσή της στα δίκλινα μόρια του DNA. Αυτές οι δύο τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης και θα παρουσιαστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε σε πολλές περιπτώσεις κατά τη διάρκεια εκτέλεσης του πειραματικού. Μια περίπτωση ήταν και έλεγχος παρουσίας γενωματικού DNA στα δείγματα τα οποία είχαν καθαριστεί με DNase. Έτσι, σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές (primers) με τη χρήση του προγράμματος Primer3Plus που είναι διαθέσιμο στο διαδίκτυο. Θεωρήθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί η παρουσία γενωματικού χρησιμοποιώντας εκκινητές για το γονίδιο της ουμπικουιλίνης, ενός γονιδίου αναφοράς για τον αραβόσιτο αλλά και άλλα φυτικά είδη.



(α)

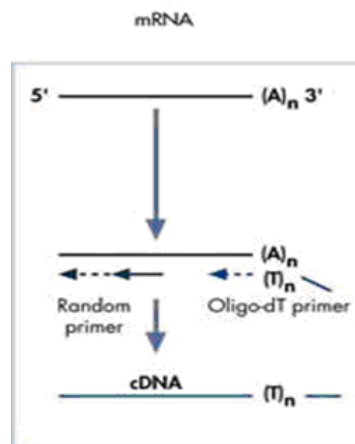
(β)

Εικόνα B.6.2.1: (α) Ηλεκτροφόρηση αгарόζης στην οποία υπάρχει γενωματικό DNA, αφού δεν υπάρχει σήμα ενίσχυσης μετά από PCR. (β) Ηλεκτροφόρηση αгарόζης στην οποία υπάρχει γενωματικό DNA που μαρτυρείται από την ύπαρξη σήματος μετά από ενίσχυση με PCR.

B.6.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα μόρια RNA (RT-PCR)

Επειδή σκοπός είναι να μετρηθεί η μεταγραφική δραστηριότητα των προς μελέτη γονιδίων το επόμενο βήμα είναι να μεταγραφεί το RNA που έχει εκχυλιστεί σε DNA. Αυτό γίνεται με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription).

Η αντίδραση RT-PCR πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, το RNA μεταγράφεται σε cDNA με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η μεταγραφή ξεκινά από τον κατάλληλο εκκινητή, που μπορεί να είναι dT-ολιγονουκλεοτίδιο, όπου και μεταγράφεται το σύνολο των mRNA ή ολιγονουκλεοτίδιο εξειδικευμένο για το συγκεκριμένο RNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Κατά το δεύτερο στάδιο, τα μόρια του cDNA που δημιουργήθηκαν με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, ενισχύονται σε μια τυπική αντίδραση PCR, με την παρουσία εξειδικευμένων εκκινητών



Εικόνα Β.6.3.1: Σχηματική απεικόνιση μιας τυπικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.

Έγινε εφαρμογή του πρωτοκόλλου που προτείνει η promega για την ImProm-II™ reverse transcriptase. Στην αρχή, γίνεται η προετοιμασία μίγματος (RT mix) που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα, το $MgCl_2$, τα dNTPs, τον παρεμποδιστή RNAσών (RNAsin), και το ένζυμο (αντίστροφη μεταγραφάση). Στη συνέχεια αναμιγνύεται το δείγμα ολικού RNA με τα oligo (dT), με προσθήκη νερού. Η αντίδραση RT πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μL.

Επειδή η συγκέντρωση του RNA σε κάθε δείγμα είναι διαφορετική, απαιτούνται κατάλληλες αραιώσεις έτσι ώστε η μήτρα για τη σύνθεση του cDNA να είναι περίπου ίδια σε όλα τα δείγματα. Βασικά όμως πρέπει να υπάρχει ομοιομορφία διότι χρησιμοποιείται το ίδιο master mix σε όλες τις αντιδράσεις με την ίδια ποσότητα ενζύμου και άλλων αντιδραστηρίων που αντιστοιχούν σε μια συγκέντρωση RNA.

Πίνακας Β.6.3 .1: Παρασκευή του RT mix.

Προετοιμασία του Reverse Transcription mix (RT mix)		
Συστατικό	Τελική συγκέντρωση για αντίδραση των 20μL	Όγκος (μL)
ddH ₂ O	-	6.1μL
5x RT ρυθμιστικό διάλυμα	1x	4μL
Διάλυμα $MgCl_2$ 25mM	3mM	2.4μL
Μίγμα dNTPs (10mM το καθένα)	0,5mM (το καθένα)	1μL
RNAsin	1u/μL	0.5μL
Αντίστροφη μεταγραφάση (RT)	-	1μL
Τελικός όγκος RT mix για αντίδραση των 20μL:		15μL

Το πρωτόκολλο χειρισμού των δειγμάτων ολικού RNA με αντίστροφη μεταγραφάση, έχει ως εξής:

1. Σε σωλήνα erppendorf των 200μL προστίθενται τα εξής:

Συστατικό	Ποσότητα / Όγκος
Δείγμα RNA.	Μέχρι 1μg
Oligo (dT)	0,5μg =1μL
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 5μL

2. Το δείγμα επωάζεται στους 70°C για 5 λεπτά για να αποδιαταχθεί το RNA.
3. Το δείγμα μεταφέρεται αμέσως σε πάγο για 5 λεπτά για να διατηρηθεί το RNA σε μονόκλωνη κατάσταση.
4. Προστίθενται 15μL RT mix.
5. Τα erppendorf τοποθετούνται στη συσκευή της PCR που έχει ρυθμιστεί στο παρακάτω θερμοκρασιακό πρόγραμμα:
- Υβριδισμός εκκινητών (annealing) 25°C για 5 λεπτά
 - Επιμήκυνση (extension) 42 °C για 60 λεπτά
 - Απενεργοποίηση του ενζύμου 70 °C για 15 λεπτά
6. cDNA αποθηκεύεται στους -20°C.

Το cDNA που προέκυψε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων. Η ενίσχυση αυτή πραγματοποιείται με μια τυπική αντίδραση PCR και χρήση εξειδικευμένων εκκινητών. Ως μήτρα χρησιμοποιείται συνήθως το 10% του όγκου που προέκυψε από το πρώτο στάδιο, δηλαδή 2μL cDNA.

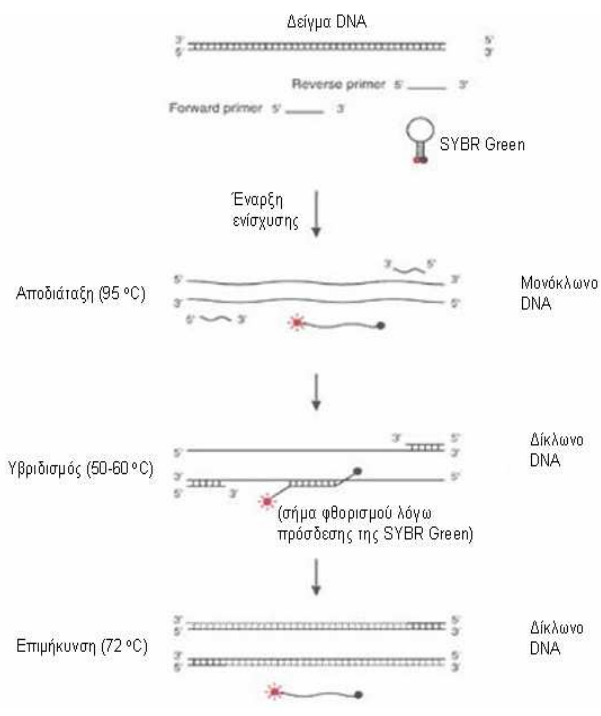
Στη παρούσα εργασία η ενίσχυση των επιθυμητών ακολουθιών έγινε με τη χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου, η οποία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

B.6.4 Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με τη χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (qReal Time- PCR).

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μια μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών DNA. Το βασικό της πλεονέκτημα συγκριτικά με την αντίδραση RT-PCR, είναι ότι δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της αλυσιδωτής αντίδρασης, σε όλη τη διάρκειά της, σε πραγματικό χρόνο. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης γίνεται λόγω της παρουσίας της χρωστικής SYBR Green (Applied Biosystems). Αυτή η χρωστική έχει την ικανότητα να φθορίζει όταν προσδεθεί στα δίκλινα μόρια του DNA (dsDNA). Κατά συνέπεια η μέτρηση των επιπέδων φθορισμού δίνει τη δυνατότητα εκτίμησης της εξέλιξης της αντίδρασης. Τα επίπεδα του φθορισμού μετρούνται στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση ρομποτικού σαρωτή.

Στην εργασία αυτή η qReal Time- PCR χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με τη μέθοδο της RT-PCR, για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικρών αλληλουχιών mRNA που έχουν μετατραπεί σε cDNA πρώτα, δίνοντας τη δυνατότητα μελέτης της έκφρασης γονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς του καλαμποκιού σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και σε συγκεκριμένες τροφικές καταπονήσεις του φυτού.

Η συσσώρευση των προϊόντων της PCR όπως προαναφέρθηκε, προσδιορίζεται σε πραγματικό χρόνο εξ' αιτίας της παρουσίας της SYBR Green. Τα επίπεδα φθορισμού διαφέρουν ανάλογα με τη φάση της αλυσιδωτής αντίδρασης.



Εικόνα Β.6.4.1: Γραφική απεικόνιση της διαδικασίας ενίσχυσης τμήματος DNA κατά την οποία διαφέρει η συγκέντρωση της φθορίζουσας χρωστικής ουσίας SYBR Green.

- Στη φάση της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA, ο φθορισμός που παράγεται είναι μικρός γιατί η SYBR Green βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή.
- Στις φάσεις του υβριδισμού (πρόσδεσης) των εκκινητών και της επιμήκυνσης, έχουμε δίκλωνο DNA. Έτσι η SYBR Green προσδέεται στη διπλή έλικα του DNA και ο φθορισμός που παράγεται αυξάνεται σημαντικά.

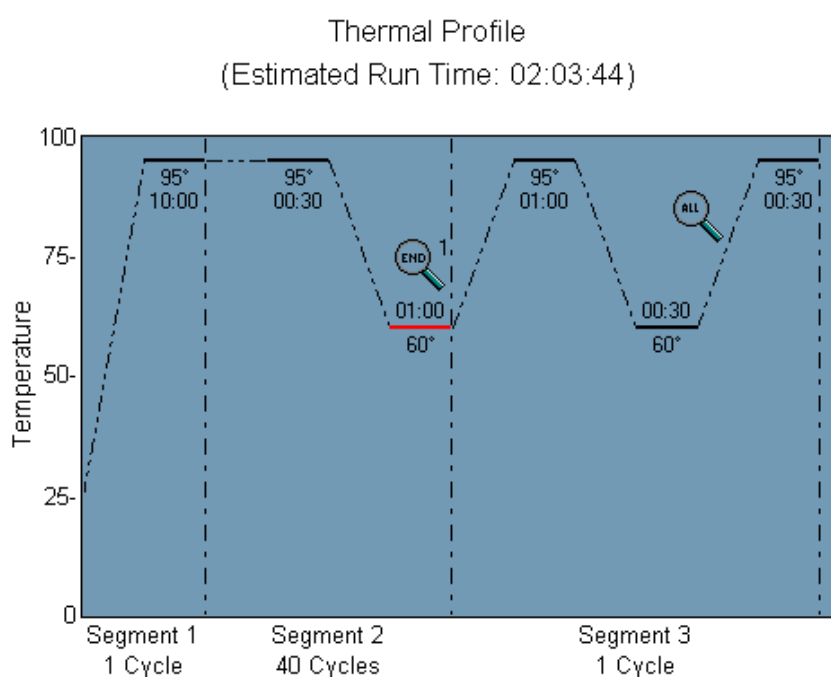
Η ανίχνευση του παραγόμενου φθορισμού, γίνεται από ένα ειδικό φωτόμετρο που ανιχνεύει το φθορισμό που παράγεται στα 520nm. Το σήμα του φθορισμού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα της μήτρας του DNA που υπάρχει κατά την έναρξη της αντίδρασης. Ωστόσο ο παραγόμενος φθορισμός είναι αποτέλεσμα της πρόσδεσης της SYBR Green σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως διμερή εκκινητών ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR. Γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητοι οι προσεκτικοί χειρισμοί κατά την διάρκεια των πειραμάτων για την

αποφυγή μολύνσεων. Επίσης ο σχεδιασμός των εκκινήτων πρέπει να είναι πολύ προσεκτικός ώστε να μην υπάρχουν εσφαλμένες μετρήσεις φθορισμού.

Για την εκτέλεση της μεθόδου της qReal Time- PCR χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mx3005P (Stratagene), και το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα MxPro-3005P.

Για μια τυπική αντίδραση όγκου 10μL, αναμιγνύονται τα εξής:

- | | |
|---|-----|
| ▪ 2x Fast Start SYBR-Green Master ROX (Roche) | 5μL |
| ▪ cDNA (χρησιμοποιείται ως μήτρα) | 1μL |
| ▪ Μίγμα εκκινήτων (τελική συγκέντρωση 200 nM ο καθένας) | 4μL |



Εικόνα Β.6.4.2 Τα στάδια της αντίδρασης και το θερμοκρασιακό της πρόγραμμα.

Πρέπει να αναφερθεί ότι απαιτείται κανονικοποίηση των δειγμάτων (ίδια ποσότητα μήτρας για κάθε αντίδραση), που γίνεται με επεξεργασία των πρώτων δεδομένων και κατάλληλες αραιώσεις με βάση το μεγαλύτερο Ct.

B.6.5 Επεξεργασία με ειδικά softwares

Στα αποτελέσματα της Real Time PCR έγινε επεξεργασία με τη βοήθεια του MxPro 4.1 (Stratagene). Με αυτό το πρόγραμμα υπολογίστηκαν τα Ct για κάθε δείγμα. Η απόδοση της αντίδρασης για κάθε δείγμα την υπολογίστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού LynRegPCR 11.0 (Ruijter et al. 2009), τα δεδομένα από το

οποίο έγιναν export στο Excel (Microsoft Office 2003). Στο Excel υπολογίστηκε ο λόγος $E^{(\Delta Ct)}_{goi} : E^{(\Delta Ct)}_{UBQ}$, όπου goi: gene of interest, UBQ: γονίδιο αναφοράς, ΔCt : (Ct control-Ct treat), E: η απόδοση της εκάστοτε αντίδρασης (Pfaffl, 2001). Ο λόγος αυτός ονομάστηκε relative expression ratio ή λόγος σχετικής έκφρασης και αποτέλεσε το μέτρο της απόλυτης έκφρασης για κάθε δείγμα.

Η στατιστική επεξεργασία (ANOVA test, t-test, Tuckey test) των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό GrapPad Prism 5.00.288 (GrapPad Software).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

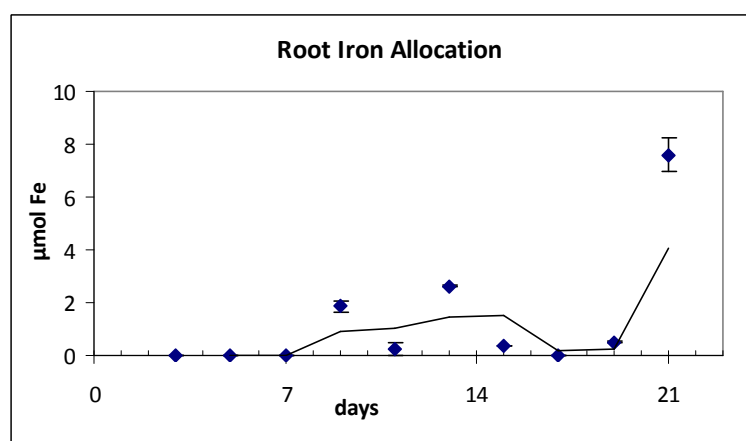
Γ. Αποτελέσματα

Γ.1 Προσδιορισμός της κατανομής του σιδήρου στον αραβόσιτο.

Με βάση το πειραματικό που περιγράφηκε παραπάνω ελήφθησαν δείγματα από σπόρο, ρίζα και υπέργειο. Οι δειγματοληψίες απείχαν δύο μέρες ή μία από την άλλη.

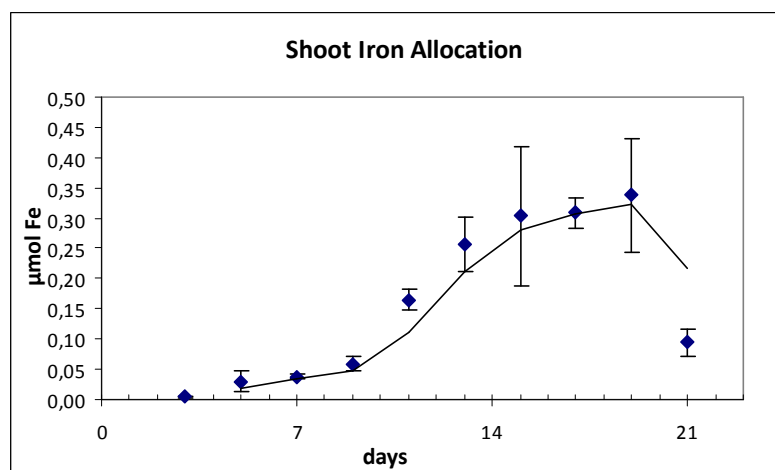
Γ.1.1 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Στο διάγραμμα της κατανομής του σιδήρου στη ρίζα φυτών που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα παρατηρείται αύξηση της ποσότητας του περιεχομένου σιδήρου στη ρίζα με επίπεδα που ξεκινούν από σχεδόν μηδενική βάση (0,004) και φτάνουν μέχρι τα 2,6 $\mu\text{mol Fe}$ για τη μέρα 13.



Διάγραμμα Γ.1.1.1: Η κατανομή του σιδήρου στη ρίζα σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Στη συνέχεια, μελετώντας τα δεδομένα για τις μέρες 19 και 21, συμπεραίνεται μια τάση αύξησης της ποσότητας που ορίζεται και από την καμπύλη στα δύο τελευταία σημεία της. Είναι αξιοσημείωτο ότι η τάση αυτή έχει υψηλότερη τιμή τα 7,6 $\mu\text{mol Fe}$. Η υψηλότερη τιμή ορίζεται για την 21η μέρα.

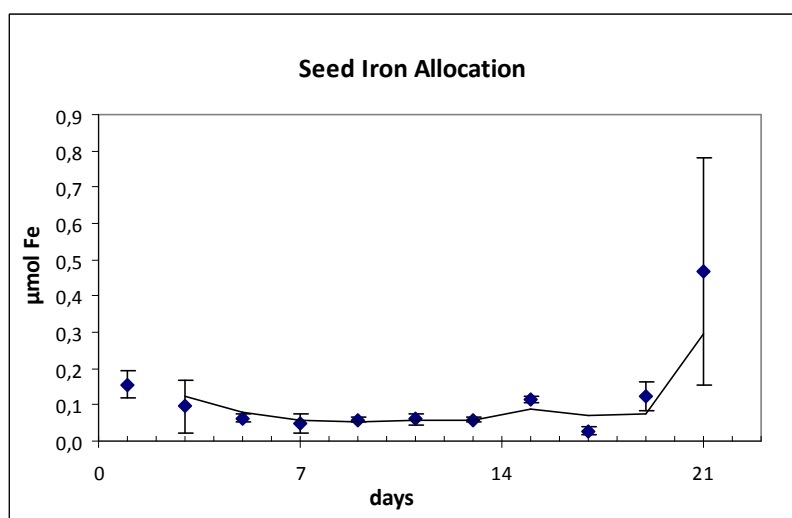


Διάγραμμα Γ.1.1.2: Η κατανομή του σιδήρου στο υπέργειο φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Η κατανομή του σιδήρου που ακολουθείται για το υπέργειο αντικατοπτρίζει ομαλή μεταφορά του σιδήρου στα φωτοσυνθέτοντα μέρη του φυτού με συσσωρεύσεις που φαίνονται να αυξάνονται με την αύξηση της βιομάζας του μελετώμενου μέρους.

Η καμπύλη ξεκινάει από την τιμή των 0,005 $\mu\text{mol Fe}$ για την 3η μέρα και παρουσιάζει μέγιστο την 19η μέρα με στάθμη 0,338 $\mu\text{mol Fe}$. Σε αντίθεση με τη ρίζα που συσσωρεύει σίδηρο σε πολύ υψηλότερα επίπεδα για την 21η μέρα του πειράματος, στο υπέργειο ο περιεχόμενος σίδηρος φαίνεται να είναι χαμηλός εκείνη τη μέρα. Η ποσότητά του είναι μόλις 0,09 $\mu\text{mol Fe}$, τιμή που αντιστοιχεί στην 9η περίπου μέρα της αύξησής του.

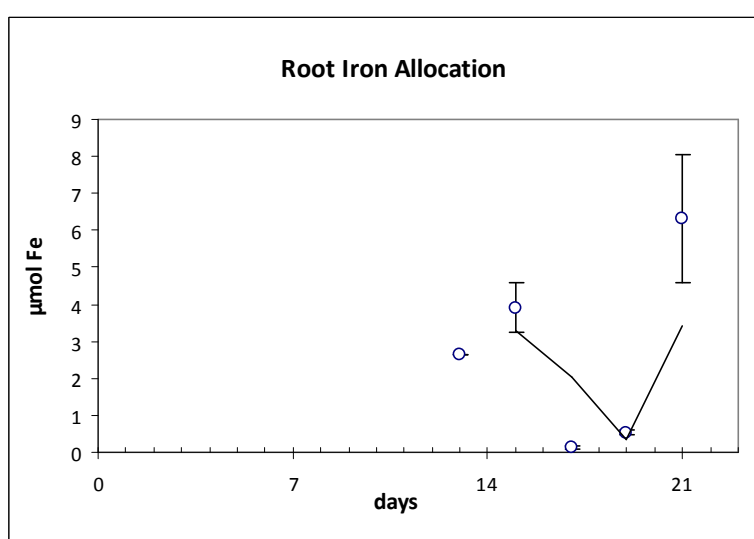
Στο υπέργειο ο περιεχόμενος σίδηρος δεν υπερβαίνει τα 0,3 μmol καθώς επίσης δεν παρουσιάζει σημαντικές αυξομειώσεις, αλλά δημιουργεί ένα τύπο πρόσληψης του Fe που σημειώνει διαφορετική συμπεριφορά μόνο για την 21η μέρα.



Διάγραμμα Γ.1.1.3: Κατανομή του σιδήρου στο σπόρο φυτών αραβοσίτου κατά τη διάρκεια ανάπτυξής τους σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

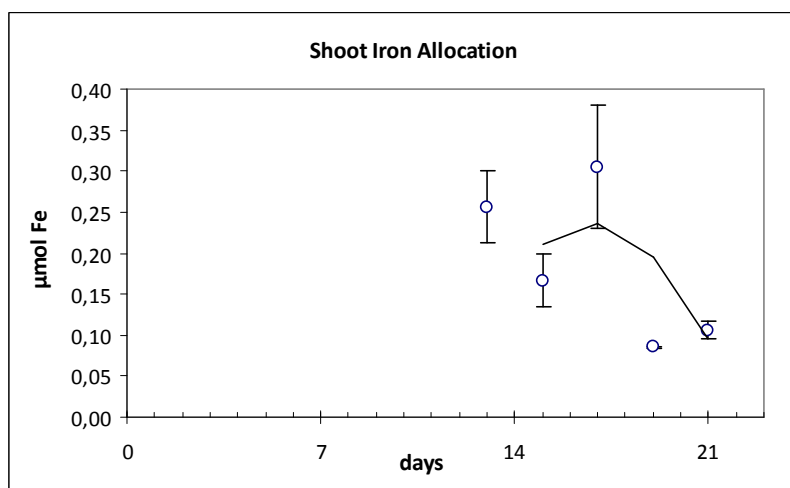
Η κατανομή του σιδήρου στο σπόρο παρουσιάζει μια μειούμενη ποσότητα στο περιεχόμενο σιδήρου με αρχική τιμή 0,155 μmol για την 1η μέρα και η οποία ελαττούμενη φτάνει τα 0,028 μmol Fe για την 17η μέρα. Οι τιμές της καμπύλης που αναπαριστά τις διάφορες ποσότητες ανά δειγματοληψία δεν υπερβαίνουν σε καμία περίπτωση τα 0,155 μmol της αρχικής τιμής μέχρι την 19η μέρα (0,123 μmol). Για τη μέρα 21 ορίζεται μια τιμή για το επίπεδο του σιδήρου, που προκύπτει από την πειραματική διαδικασία και σημειώνει αύξηση περίπου 4 φορές από τις προηγούμενες τιμές δηλαδή φτάνει τα 0,468 μmol Fe.

Γ.1.2 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο.



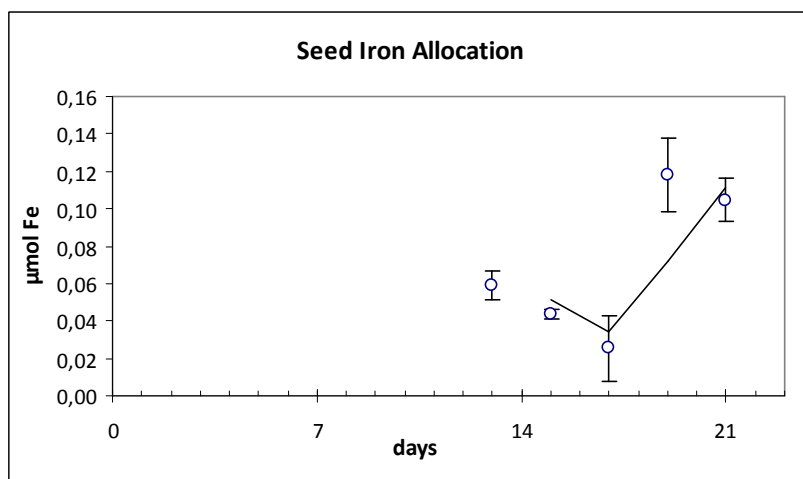
Διάγραμμα Γ.1.2.1: Κατανομή σιδήρου στις ρίζες αραβοσίτου σε φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο.

Η κατανομή του σιδήρου σε φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο φαίνεται να είναι διαφοροποιημένη από την αντίστοιχη καμπύλη για φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα. Συγκεκριμένα, την 13η και 15η μέρα του πειράματος, d0 (αρχική μέρα) και d2 (δεύτερη μέρα) του χειρισμού με θρεπτικό ελλειματικό σε θείο, οι τιμές βρίσκονται σε επίπεδα της τάξης των 3 μmol Fe. Στις δύο επόμενες μέρες τα επίπεδα του σιδήρου είναι χαμηλότερα σε επίπεδα της τάξης του 0,5 μmol Fe, οδηγώντας σε μία πτώση της γραμμής της καμπύλης. Η τιμή για την d8 του χειρισμού είναι 12 φορές μεγαλύτερη από την προηγούμενή της και οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης σιδήρου για την 21η μέρα του πειράματος.



Διάγραμμα Γ.1.2.2: Η κατανομή σιδήρου στο υπέργειο μέρος φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο.

Οι τιμές που περιγράφουν την κατανομή του σιδήρου στα υπέργεια φυτικά μέρη φαίνονται στο διάγραμμα και βρίσκονται μέσα σε ένα εύρος τιμών από 0,085 έως 0,305 $\mu\text{mol Fe}$. Ακραίες και χαμηλότερες τιμές φαίνεται πως είναι οι τελευταίες. Την ημέρα 6 του χειρισμού (19η μέρα του πειράματος) και την ημέρα 8 του χειρισμού (21η μέρα) οι τιμές για τα επίπεδα σιδήρου είναι 0,085 και 0,106 $\mu\text{mol Fe}$, αντίστοιχα. Έτσι, φαίνεται ότι η ποσότητα του σιδήρου είναι εξαιρετικά χαμηλή για τη 19η και 21η μέρα του πειράματος.

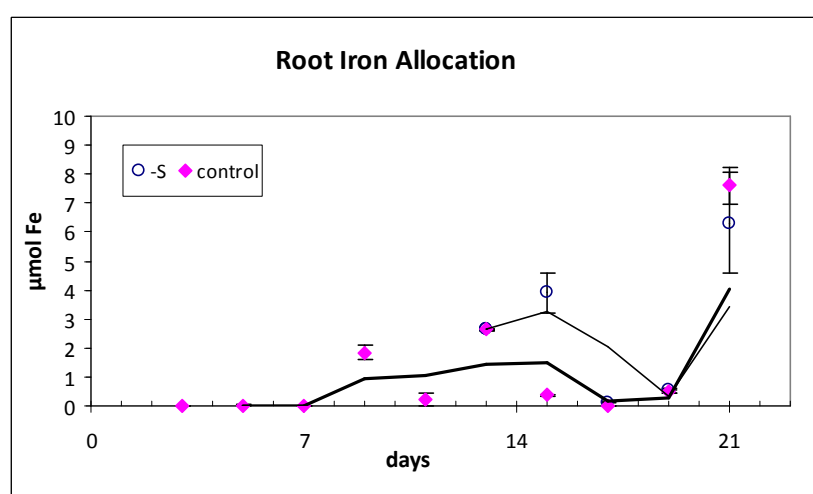


Διάγραμμα Γ.1.2.3: Η κατανομή του σιδήρου σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο.

Για τις πρώτες 3 δειγματοληψίες του χειρισμού η τιμή των επιπέδων του περιεχόμενου σιδήρου στο σπόρο ξεκινάει από 0,025 μέχρι 0,059 $\mu\text{mol Fe}$. Τις ημέρες 19 και 21 τα επίπεδα του περιεχόμενου σιδήρου αυξάνονται και φτάνουν μέχρι και τη διπλάσια τιμή, δηλαδή τα 0,118 $\mu\text{mol Fe}$.

Γ.1.3 Συγκριτική απεικόνιση κατανομής σιδήρου σε φυτά σε πλήρες και ελλειματικό σε θείο θρεπτικό διάλυμα.

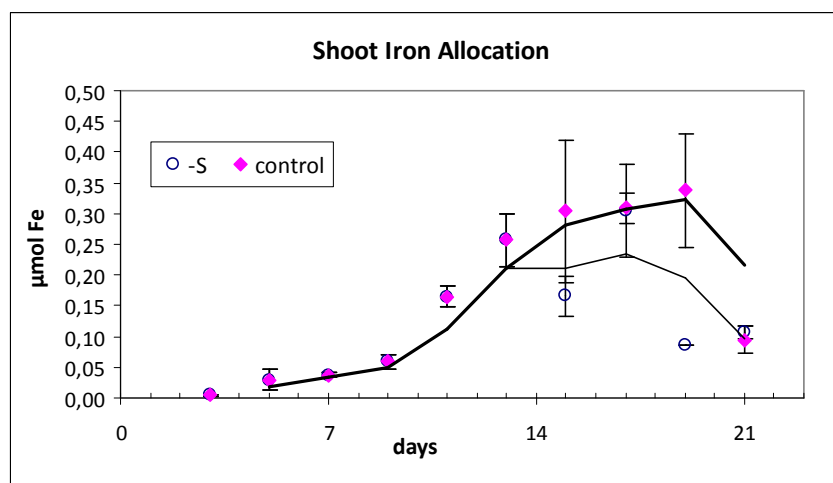
Για τις πρώτες 7 ημέρες τα φυτά της υδροπονίας δεν τοποθετούνται σε κάποιο θρεπτικό διάλυμα, δεδομένου ότι εκείνες τις ημέρες καταναλώνουν το απόθεμα του σπόρου. Σύμφωνα με τον παρόντα υδροπονικό χειρισμό, τα φυτά τοποθετούνται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα την 7^η ημέρα και διαχωρίζονται σε control (πλήρες θρεπτικό) και -S (θρεπτικό ελλειματικό σε θείο) την 14^η μέρα. Οι δειγματοληψίες συνεχίζονται μέχρι την 21^η μέρα του πειράματος ανά δύο μέρες, για το περιεχόμενο του σιδήρου τόσο σε φυτά από θρεπτικό ανεπαρκές σε θείο όσο και σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.



Διάγραμμα Γ.1.3.1: Κατανομή του σιδήρου στη ρίζα φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται (α) σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και (β) σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο.

Συγκρίνοντας τα διαγράμματα που φαίνονται παραπάνω και αντιπροσωπεύουν την κατανομή του σιδήρου για φυτά σε πλήρες θρεπτικό και φυτά σε θρεπτικό ελλειματικό σε θείο, παρατηρείται ότι τα φυτά που δεν έχουν θείο στο θρεπτικό τους συσσωρεύουν σίδηρο σε μεγαλύτερη ποσότητα από τα φυτά control για τις μέρες 13 και 15 του πειράματος. Την 19η ημέρα η υπεροχή των -S φυτών παύει να υπάρχει και ο περιεχόμενος σιδήρος βρίσκεται στα ίδια επίπεδα και για τους δύο χειρισμούς. Ομοίως, στην 21η μέρα παρατηρείται τάση αύξησης των επιπέδων του περιεχόμενου σιδήρου στα ίδια περίπου επίπεδα και για τους δύο χειρισμούς.

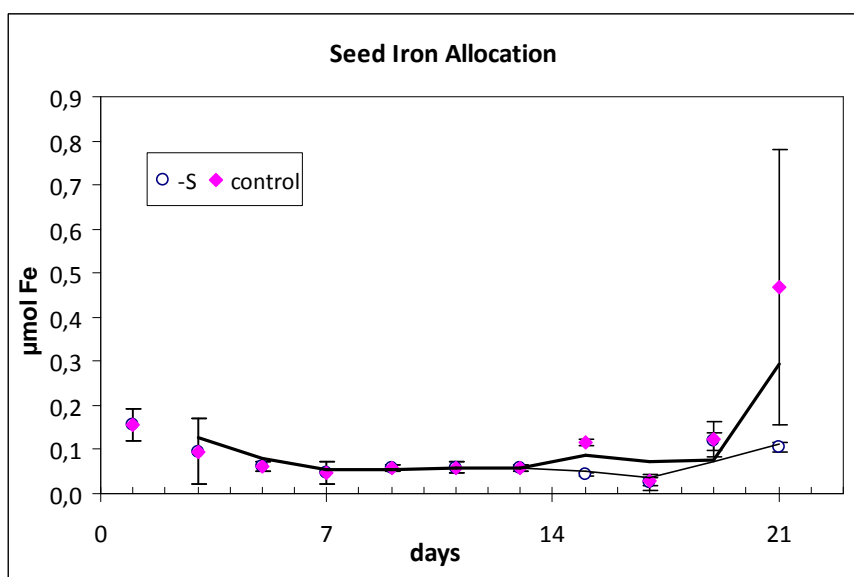
Προκειμένου να διαπιστωθεί αν όντως διαφοροποιούνται οι δύο χειρισμοί χρησιμοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος t-test (two tails). Έτσι, προκύπτει ότι ο προσδιοριζόμενος σίδηρος είναι περισσότερος μόνο για τις δύο πρώτες μέρες του χειρισμού (d2 και d4 που είναι αντίστοιχες με τις 15^η και 17^η ημέρα από το φύτευμα του σπόρου), με αύξηση 90% και 82% αντίστοιχα.



Διάγραμμα Γ.1.3.2: Κατανομή του σιδήρου στο υπέργειο φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται (α) σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και (β) σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο.

Αντίθετα με τη ρίζα, στο υπέργειο μέρος του φυτού όταν υπάρχει έλλειψη θείου ο περιεχόμενος σίδηρος φαίνεται λιγότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο σε φυτά που είναι αναπτυγμένα σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα. Η μορφή της κατανομής όμως είναι πανομοιότυπη για τους δύο χειρισμούς με μόνη διαφοροποίηση τα επίπεδα σιδήρου που αναφέρθηκαν παραπάνω. Συγκεκριμένα, για τη μέρα 19 τα φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα έχουν 74% περισσότερο σίδηρο.

Για το σπόρο οι δύο χειρισμοί έχουν σχεδόν πανομοιότυπη συμπεριφορά στην συγκέντρωση του περιεχόμενου σιδήρου. Όπως παρατηρείται και στο διάγραμμα, τα επίπεδα του Fe είναι ίδια. Στατιστική διαφορά σημειώνεται μόνο την 15^η μέρα όπου για το πλήρες θρεπτικό διάλυμα με 0,1 μmol Fe περίπου και το ελλειματικό θρεπτικό με 0,5 μmol Fe με μια αύξηση 80%.

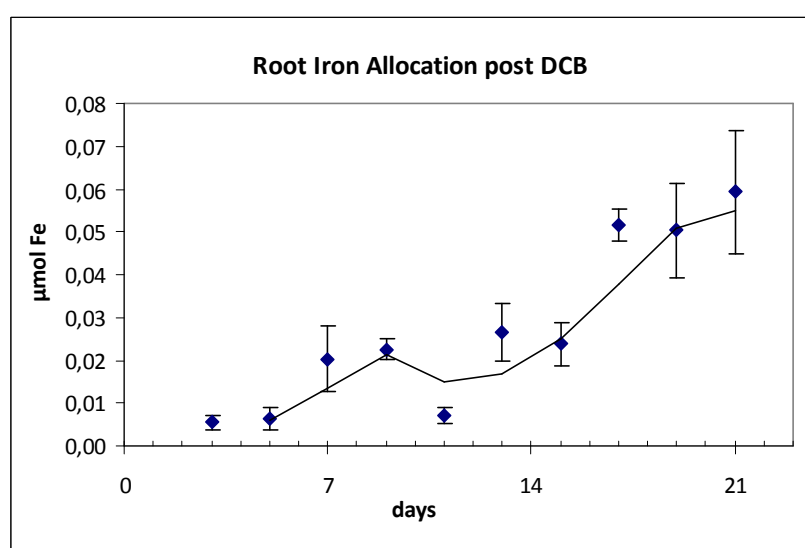


Διάγραμμα Γ.1.3.3: Κατανομή του σιδήρου στο σπόρο φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται (α) σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και (β) σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο.

Γ.2 Προσδιορισμός της κατανομής του σιδήρου με απομάκρυνση του σιδήρου από την επιφάνεια της ρίζας με χειρισμό DCB.

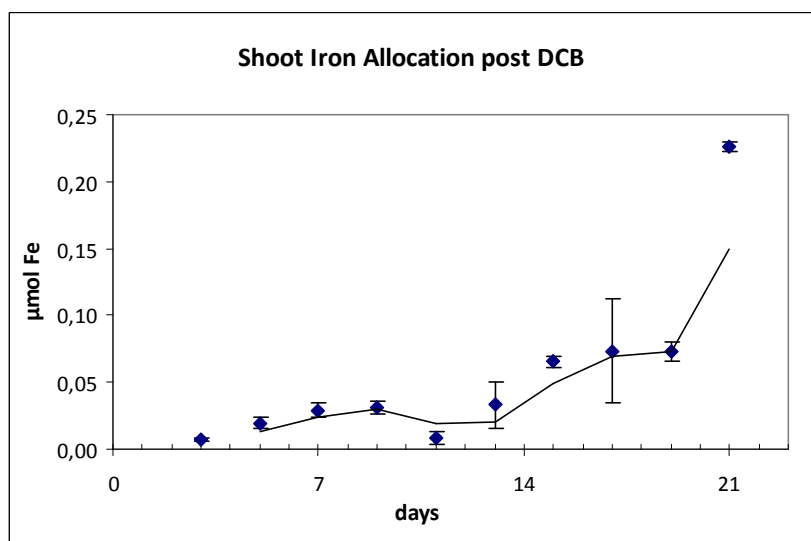
Γ.2.1 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα με απομάκρυνση του σιδήρου από την επιφάνεια της ρίζας με χειρισμό DCB.

Η κατανομή του σιδήρου στη ρίζα ακολουθεί μια πορεία αυξανόμενης ποσότητας, ξεκινώντας από μια τιμή περιεχόμενου σιδήρου ίση με 0,006 $\mu\text{mol Fe}$ για τη πρώτη μέρα της δειγματοληψίας και καταλήγοντας σε και μια 10πλάσια τιμή το 0,059 $\mu\text{mol Fe}$ την 21^η μέρα.



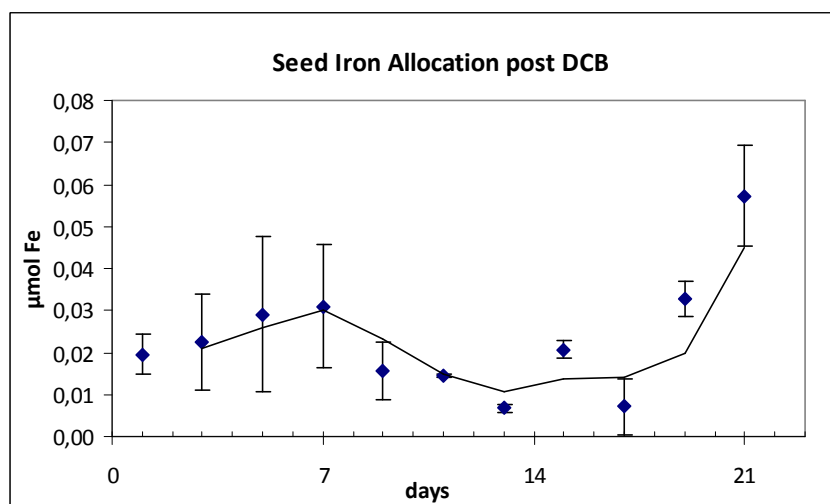
Διάγραμμα Γ.2.1.1: Κατανομή σιδήρου στη ρίζα σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα από τα οποία έχει απομακρυνθεί ο σίδηρος από την επιφάνεια της ρίζας με διάλυμα DCB.

Γενικότερα, τα επίπεδα του σιδήρου κυμαίνονται ανάμεσα στις δύο προαναφερθείσες τιμές χωρίς να παρουσιάζουν σημαντικές αυξομειώσεις αλλά ακολουθώντας μια ομαλή αυξητική πορεία κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του φυτού.



Διάγραμμα Γ.2.1.2: Κατανομή σιδήρου στο υπέργειο φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα από τα οποία έχει απομακρυνθεί ο σίδηρος από την επιφάνεια της ρίζας με διάλυμα DCB.

Η περιεχόμενη ποσότητα του σιδήρου στο υπέργειο μέρος των φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα παρουσιάζει και αυτή, όπως και η αντίστοιχη της ρίζας, πορεία ανάλογη με την αύξηση της βιομάζας. Τα επίπεδα ξεκινούν από τιμές χαμηλές όπως 0,007 μmol για την 3η μέρα του πειράματος και καταλήγουν σε 0,226 μmol Fe ιστού σε μια ποσότητα 35 φορές μεγαλύτερη.



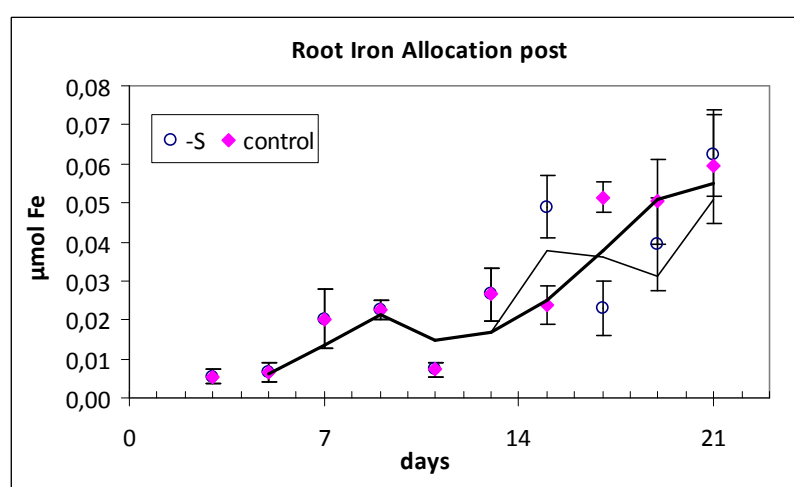
Διάγραμμα Γ.2.1.3: Κατανομή σιδήρου στο σπόρο φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα από τα οποία έχει απομακρυνθεί ο σίδηρος από την επιφάνεια της ρίζας με διάλυμα DCB.

Ο σπόρος παρουσιάζει μια ομαλή μείωση της ποσότητας του σιδήρου φτάνοντας τη 13η μέρα να έχει μόλις 0,007 μmol Fe ιστού. Αυτή η ομαλή μείωση ανατρέπεται τις τελευταίες μέρες του πειράματος όπου σημειώνεται αύξηση του επιπέδου του περιεχόμενου σιδήρου με τελική τιμή αυτή των 0,057 μmol Fe που είναι ανώτερη και από την αρχική τιμή. Είναι λοιπόν σαφές ότι την 19^η και 21^η μέρα

ο σίδηρος στο σπόρο αυξάνεται κατά 2,8 φορές σε σχέση με την αρχική ποσότητα σιδήρου. Συγκεκριμένα, την 1^η μέρα της δειγματοληψίας το περιεχόμενο του σπόρου σε σίδηρο φαίνεται να είναι 0,2 $\mu\text{mol Fe}$ ενώ στην 21^η μέρα ο προσδιοριζόμενος σίδηρος φτάνει τα 0,57 $\mu\text{mol Fe}$.

Γ.2.2 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο με απομάκρυνση του σιδήρου από την επιφάνεια της ρίζας με χειρισμό DCB.

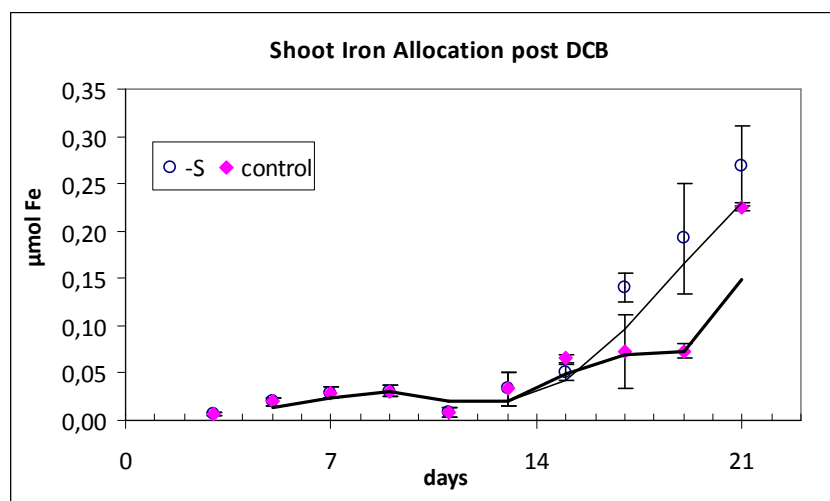
Η κατανομή του σιδήρου στη ρίζα του φυτού φαίνεται να είναι ίδια μετά το χειρισμό με DCB τόσο σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα όσο και σε θρεπτικό ελλειματικό σε θείο.



Διάγραμμα Γ.2.2.1: Κατανομή του σιδήρου στη ρίζα φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό ελλειματικό σε θείο, μετά από απομάκρυνση του σιδήρου από την επιφάνεια της ρίζας με DCB.

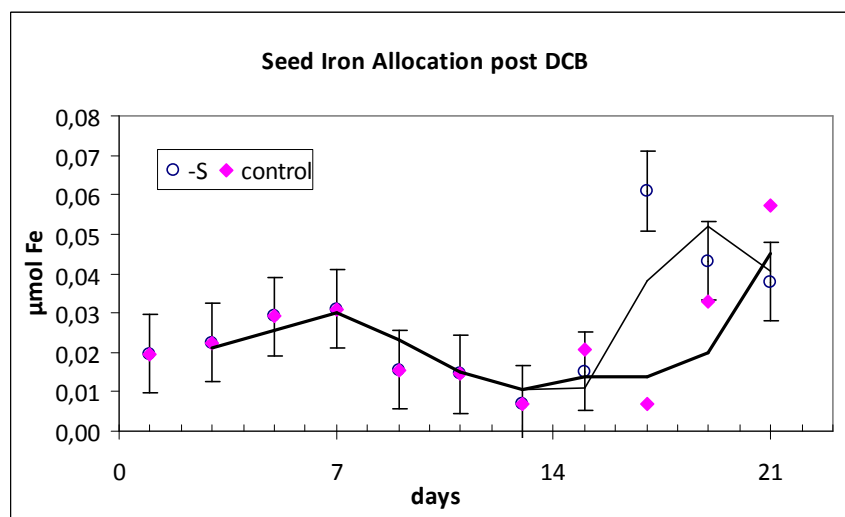
Προκειμένου να διαπιστωθεί αν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές οι ποσότητες του σιδήρου στους δύο διαφορετικούς χειρισμούς χρησιμοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος two tailed t-test. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι σημαντικά διαφορετικές είναι μόνο αυτές της 15^{ης} και 17^{ης} μέρας, όπως και στην κατανομή σιδήρου χωρίς χειρισμό με DCB. Για την 15^η μέρα παρατηρείται ότι τα -S φυτά έχουν περιεχόμενο σε σίδηρο 50% περισσότερο από τα control, ενώ την 17^η μέρα τα -S φυτά έχουν 54% λιγότερο σίδηρο από τα αντίστοιχα control.

Η κατανομή του σιδήρου στο υπέργειο του αραβοσίτου δε φαίνεται να διαφοροποιείται ιδιαίτερα για τα φυτά control από τα φυτά -S μετά από χειρισμό με DCB. Και στις δύο περιπτώσεις παρουσιάζει ελάχιστα επίπεδα τις πρώτες μέρες (0,06 $\mu\text{mol Fe}$ για την 1^η μέρα) και μέγιστο την 21η μέρα (0,059 $\mu\text{mol Fe}$) εμφανίζοντας μια αύξουσα πορεία. Στατιστικά σημαντική διαφορά δίνει μόνο η 19^η μέρα μεταξύ του control και -S χειρισμού με τα -S φυτά να παρουσιάζουν 61,9% περισσότερο σίδηρο.



Διάγραμμα Γ.2.2.2: Κατανομή του σιδήρου στο υπέργειο φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό ελλειμματικό σε θείο, μετά από απομάκρυνση του σιδήρου από την επιφάνεια της ρίζας με DCB.

Ο σπόρος μειώνει το περιεχόμενό του σε σίδηρο και στην περίπτωση του πλήρους θρεπτικού διαλύματος και στην περίπτωση του ελλειμματικού σε θείο. Έτσι, παρουσιάζεται μια κατανομή περίπου ίδιας μορφής και για τους δύο χειρισμούς, μετά από εκχύλιση του μη προσροφημένου σιδήρου με DCB. Η γενικά μειούμενη ποσότητα του σιδήρου είναι χαρακτηριστική μέχρι την 17η μέρα ή ημέρα 3 του χειρισμού -S, ενώ σημαντική είναι η αύξηση που παρατηρείται τις μέρες 19η και 21η ή ημέρα 6 και ημέρα 8.



Διάγραμμα Γ.2.2.3: Κατανομή του σιδήρου στο σπόρο φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό ελλειμματικό σε θείο, μετά από απομάκρυνση του σιδήρου από το περιβάλλον της ρίζας με DCB.

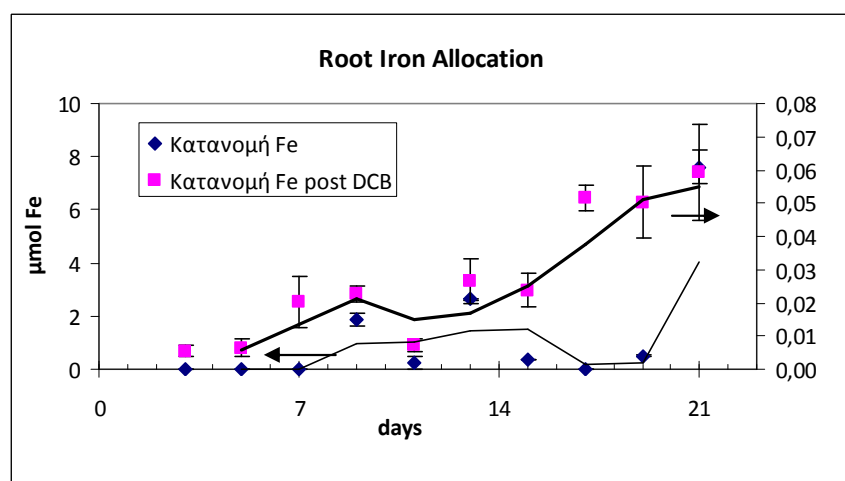
Σύμφωνα με τους στατιστικούς ελέγχους οι δύο χειρισμοί δεν διαφοροποιούν το περιεχόμενο σε σίδηρο, καθώς δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Παρόλα αυτά, σημαντικά διαφοροποιημένη είναι η 17^η και 21^η μέρα με

σαφώς χαμηλότερο σίδηρο για τα φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα απ' ό,τι τα φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό ελλειμματικό σε θείο. Συγκεκριμένα, για την 17^η μέρα τα -S φυτά έχουν 85,7% περισσότερο σίδηρο από τα control ενώ την 21^η μέρα τα control φυτά έχουν 33,3% περισσότερο σίδηρο από τα -S. Έτσι, παρατηρείται και εδώ η αντίστροφη συμπεριφορά που σημειώθηκε και στη ρίζα για τις μέρες 15^η και 17^η.

Γ.3 Σύγκριση του επιπέδου σιδήρου για την κατανομή σιδήρου και την κατανομή σιδήρου μετά από χειρισμό με DCB.

Γ.3.1 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα χωρίς χειρισμό και με χειρισμό DCB.

Η κατανομή του σιδήρου χωρίς κάποιον χειρισμό και η κατανομή του σιδήρου μετά το χειρισμό με DCB φαίνεται να διαφοροποιούνται, μιας και ο χειρισμός με DCB αφαιρεί τον αποπλασμικό σίδηρο του κυττάρου και της επιφάνειας της ρίζας. Ο χειρισμός έγινε για τα δείγματα της ρίζας, του υπέργειου και του σπόρου. Και για τις τρεις περιπτώσεις οι ποσότητες του σιδήρου για τη ρίζα, το υπέργειο και το σπόρο της κατανομής χωρίς κανένα χειρισμό φαίνεται να είναι υψηλότερες απ' ό,τι οι αντίστοιχες ποσότητες για το σίδηρο μετά από χειρισμό με DCB.

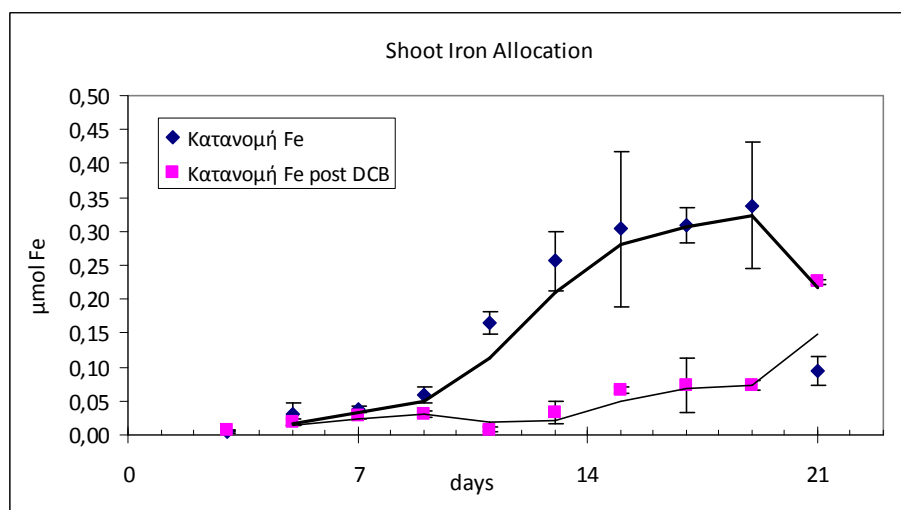


Διάγραμμα Γ.3.1.1: Σύγκριση της κατανομής του σιδήρου χωρίς κάποιο χειρισμό και μετά από χειρισμό με DCB για τη ρίζα φυτών που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα για τη ρίζα, οι τιμές των επιπέδων του σιδήρου για τα φυτά που έχουν υποστεί χειρισμό με DCB βρίσκονται σε κατώτατα επίπεδα και δεν ξεπερνούν το 1 μmol Fe, ακόμα και για την 21^η μέρα της πειραματικής διαδικασίας όπου για την κατανομή χωρίς κάποιον χειρισμό παρατηρούνται τα υψηλότερα επίπεδα στον προσδιορισμό της ποσότητας του σιδήρου. Έτσι, ενώ για την πρώτη μέρα ο σίδηρος δεν ξεπερνά τα 0,006 μmol Fe,

την 21^η μέρα βρίσκεται στα επίπεδα των 0,059 $\mu\text{mol Fe}$. Ακόμα όμως και αυτή η τιμή που μπορεί να θεωρηθεί υψηλή, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη της για την κατανομή χωρίς χειρισμό, φαίνεται να βρίσκεται σε σημαντικά μειωμένα επίπεδα, αφού για την 21^η μέρα η κατανομή σιδήρου είναι 7,604 $\mu\text{mol Fe}$.

Η ίδια παρατήρηση μπορεί να γίνει και για τις άλλες μέρες για τα δείγματα ριζικού των δύο συγκρινόμενων πειραμάτων όπου γενικά φαίνεται ότι η κατανομή σιδήρου χωρίς χειρισμό έχει υψηλά επίπεδα για το σίδηρο σχετικά με τα αντίστοιχα του χειρισμού με DCB. Οι τιμές είναι στατιστικά διαφορετικές για όλες τις αντιστοιχίες μεταξύ των δύο χειρισμών από την 9^η μέρα του πειράματος μέχρι την 21^η. Ενδεικτικά, την 19^η μέρα του πειράματος τα φυτά που έχουν υποστεί χειρισμό με DCB έχουν 89,9% λιγότερο σίδηρο από τα αντίστοιχα που δεν έχουν υποστεί χειρισμό. Την μέρα 21, επίσης, η διαφορά αυτή ανέρχεται στο ποσοστό του 99,2%.



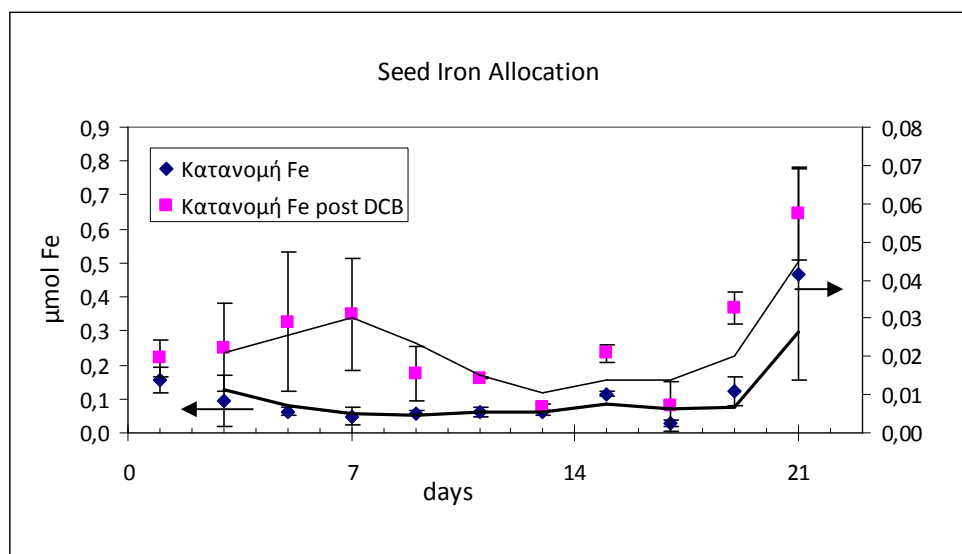
Διάγραμμα Γ.3.1.2: Σύγκριση της κατανομής του σιδήρου χωρίς κάποιο χειρισμό και μετά από χειρισμό με DCB για το υπέργειο φυτών που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Όσον αφορά το υπέργειο οι τιμές της κατανομής σε σχέση με την κατανομή DCB ακολουθούν την ίδια συμπεριφορά. Διαφοροποιούνται με τον ίδιο τρόπο, δίνοντας ποσοτικό προβάδισμα στην κατανομή χωρίς χειρισμό και εμφανίζοντας χαμηλές συγκεντρώσεις για την DCB κατανομή. Δηλαδή, η γραμμή που αντιπροσωπεύει την DCB κατανομή βρίσκεται συνεχώς χαμηλότερα απ' ότι βρίσκεται αυτή της κατανομής Fe χωρίς χειρισμό. Εξαίρεση στον κανόνα αυτόν αποτελεί η ημέρα 21 κατά την οποία η συγκέντρωση του σιδήρου για την κατανομή χωρίς DCB είναι μικρότερη, ενώ σύμφωνα με το t-test οι τιμές είναι διαφορετικές.

Συγκεκριμένα για την κατανομή του σιδήρου μετά από χειρισμό με DCB το επίπεδο καθορίζεται στα 0,266 $\mu\text{mol Fe}$ ενώ για την κατανομή χωρίς χειρισμό μόλις στα 0,094 $\mu\text{mol Fe}$. Δηλαδή η κατανομή με χειρισμό DCB έχει για τη 21^η μέρα, 58% περισσότερο σίδηρο από την κατανομή χωρίς χειρισμό. Μεγαλύτερη διαφοροποίηση στις τιμές μεταξύ DCB κατανομής και κατανομής χωρίς χειρισμό

παρατηρείται την 11^η μέρα όπου τα φυτά με χειρισμό DCB φαίνεται να έχουν 95,1% λιγότερο σίδηρο από τα φυτά που δεν έχουν δεχθεί χειρισμό.

Μελετώντας το σπόρο των ίδιων φυτών (control φυτά) παρατηρείται ότι και πάλι οι ποσότητες του σιδήρου για την κατανομή χωρίς χειρισμό είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές της κατανομής μετά από χειρισμό με DCB. Για την κατανομή με χειρισμό DCB οι τιμές των επιπέδων του σιδήρου φτάνουν μέχρι το 0,03 $\mu\text{mol Fe}$, με ακραία τιμή την 21^η μέρα με 0,057 μmol . Για την κατανομή χωρίς DCB η διαφορά της 21^{ης} μέρας είναι πολύ σημαντικότερη και φτάνει στα επίπεδα των 0,468 $\mu\text{mol Fe}$. Γενικότερα όμως φαίνεται ότι και στις δύο περιπτώσεις υπάρχει αύξηση του περιεχόμενου σιδήρου στο σπόρο σε σχέση με την προηγούμενη μέρα (ημέρα 19).



Διάγραμμα Γ.3.1.3: Σύγκριση της κατανομής του σιδήρου χωρίς κάποιο χειρισμό και μετά από χειρισμό με DCB για το υπέργαιο φυτών που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

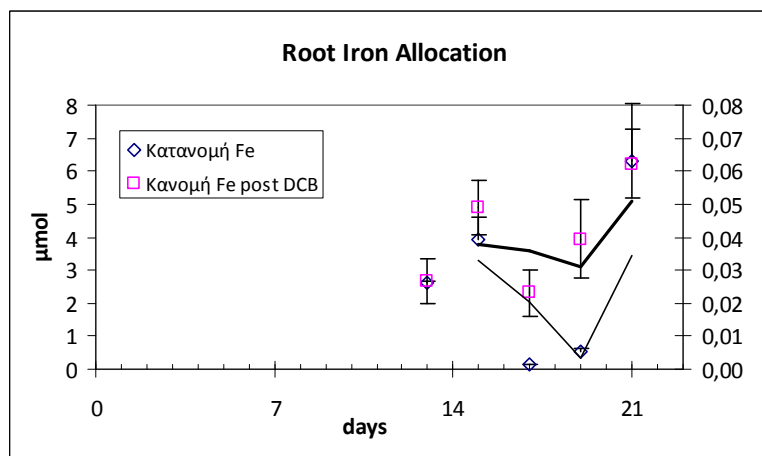
Ο στατιστικός έλεγχος έδειξε ότι οι τιμές διαφοροποιούνται σχετικά με τους δύο χειρισμούς αλλά η διαφοροποίηση δεν είναι τόσο ισχυρή όσο φαίνεται ότι είναι για τη ρίζα και το υπέργαιο, καθώς υπάρχουν μη σημαντικές διαφορές σε πολλές από τις αντίστοιχες ποσότητες για το περιεχόμενο του σιδήρου στο σπόρο. Παρόλα αυτά οι τιμές παρουσιάζουν σημαντική διαφορά για τις μέρες 9^η – 15^η και 19^η μέρα με μέγιστη διαφορά την 13^η μέρα, όπου ο σίδηρος μετά από χειρισμό με DCB παρουσιάζεται ελαττωμένος κατά 88,1%. Τέλος είναι σαφές ότι τα φυτά που δεν έχει απομακρυνθεί ο σίδηρος παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό σιδήρου που κυμαίνεται από 73 για την 19^η μέρα μέχρι 88% για την 13^η μέρα.

Πίνακας Γ.3.1.1: T-tests για το σπόρο φυτών σε φυτά που έχουν υποστεί χειρισμό με DCB και σε φυτά που δεν έχουν υποστεί κάποιο χειρισμό. Τα (***) δηλώνουν $P < 0.003$, τα (**) $P < 0.005$ και (*) $P < 0.01$.

Ημέρες		Στατιστικά σημαντική διαφορά	Μεταβολή της ποσότητας σιδήρου (%)
9DCB	9	**	74.1
11 DCB	11	**	76.6
13 DCB	13	***	88.1
15 DCB	15	***	81.7
17 DCB	17	-	-
19 DCB	19	*	73.1

Γ.3.2 Μελέτη της κατανομής του σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο χωρίς χειρισμό και με χειρισμό DCB.

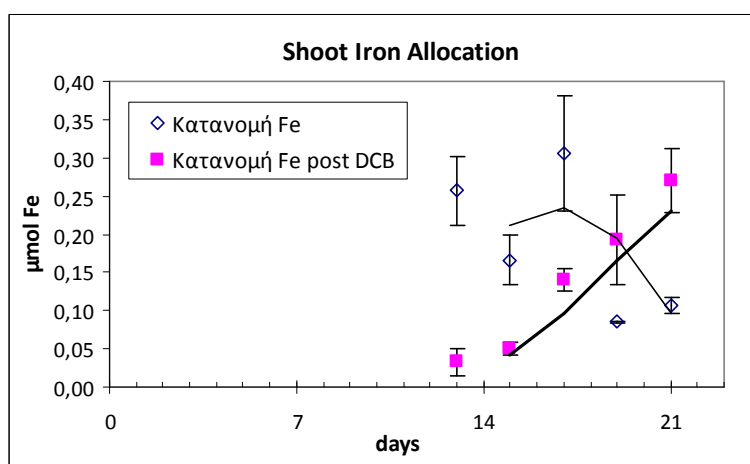
Για τη μελέτη της επίδρασης της έλλειψης θείου πρόεκυψαν 5 δειγματοληψίες για φυτά που έχουν αρχικά αναπτυχθεί σε πλήρες θρεπτικό και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό ελλειμματικό σε θείο. Μελετώντας τη επίδραση της έλλειψης θείου στα φυτά όσον αφορά το περιεχόμενό τους σε σίδηρο σε σχέση με το χειρισμό με DCB παρατηρούμε και πάλι τα ίδια συμπεράσματα. Ο σίδηρος για το πείραμα με χειρισμό DCB, και επομένως με απομάκρυνση του σιδήρου από την επιφάνεια της ρίζας, είναι χαμηλότερος σε σχέση με την κατανομή του σιδήρου χωρίς χειρισμό. Οι τιμές της κατανομής DCB αγγίζουν τα επίπεδα της κατανομής χωρίς DCB μόνο την 17^η μέρα αλλά και τη 19^η με επίπεδα σιδήρου από 0,1-0,5 μmol Fe.



Διάγραμμα Γ.3.2.1: Σύγκριση της κατανομής του σιδήρου χωρίς κάποιο χειρισμό και μετά από χειρισμό με DCB για τη ρίζα φυτών που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Ο έλεγχος t-test για τα ζεύγη κατανομή Fe- κατανομή Fe μετά από χειρισμό με DCB δείχνει διαφοροποίηση των τιμών τους σε όλο το εύρος τους. Ο σίδηρος της κατανομής χωρίς απομάκρυνση με DCB είναι σε κάθε περίπτωση περισσότερος από τις συγκεντρώσεις στα δείγματα που έχουν υποστεί χειρισμό με DCB. Συγκεκριμένα, την 13^η μέρα και ημέρα 0 του χειρισμού η συγκέντρωση του σιδήρου στην κατανομή που έχει υποστεί χειρισμό με DCB είναι 99% μικρότερη από της αντίστοιχης της κατανομής.

Την 2^η μέρα του χειρισμού με -S (μέρα 15), η διαφορά αυτή παραμένει περίπου στα ίδια επίπεδα με ποσοστιαία διαφορά 98,7%, ενώ και την ημέρα 21 και 8^η μέρα του χειρισμού η διαφορά αυτή παραμένει στα ίδια υψηλά επίπεδα με 99% περισσότερο σίδηρο για τα φυτά που δεν έχουν υποστεί χειρισμό με DCB.



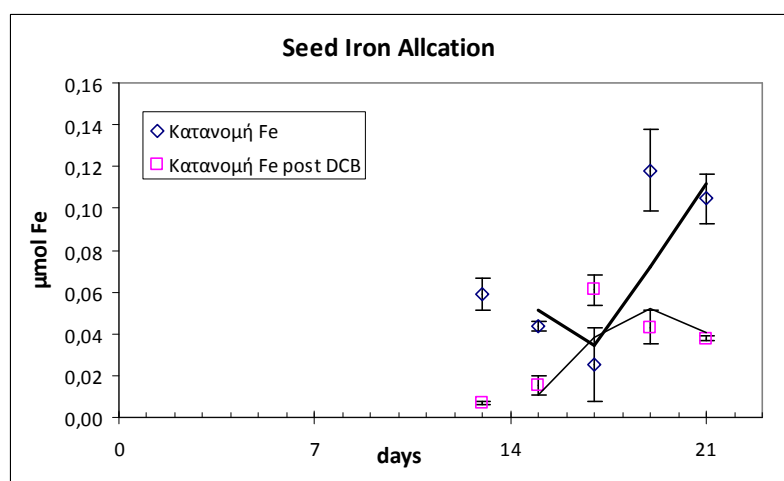
Διάγραμμα Γ.3.2.2: Σύγκριση της κατανομής του σιδήρου χωρίς κάποιο χειρισμό και μετά από χειρισμό με DCB για το υπέργειο φυτών που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Αντίθετα στο υπέργειο φυτών που αναπτύσσονται σε θρεπτικό ελλειμματικό σε θείο δεν έχει στατιστικά σημαντικές διαφορές για όλα τα σημεία της καμπύλης και επομένως σε όλες τις μέρες του χειρισμού. Συγκεκριμένα, ενώ αρχικά ο σίδηρος είναι περισσότερος για τα φυτά που δεν υπόκεινται σε κάποιον χειρισμό, στις δύο τελευταίες δειγματοληψίες της 19^{ης} και της 21^{ης} μέρας η σχέση γίνεται αντίθετη, με τα φυτά της κατανομής DCB να έχουν υψηλότερο περιεχόμενο σε σίδηρο.

Όπως φαίνεται στον πίνακα Γ.3.2.1 τα φυτά που δεν έχουν υποστεί χειρισμό με DCB παρουσιάζουν 53-69 % περισσότερο σίδηρο από τα αντίστοιχά τους. Από την άλλη τα φυτά με χειρισμό DCB παρουσιάζουν περισσότερο σίδηρο για τις μέρες 19 και 21 με 39% και 60% αντίστοιχα περισσότερο σίδηρο από τα φυτά χωρίς χειρισμό.

Πίνακας Γ.3.2.1: t-tests για το υπέργειο φυτών σε φυτά που έχουν υποστεί χειρισμό με DCB και σε φυτά που δεν έχουν υποστεί κάποιο χειρισμό. Τα (**) δηλώνουν $P < 0.003$ και (*) $P < 0.03$.

Ημέρες		Στατιστικά σημαντική διαφορά	Μεταβολή της συγκέντρωσης σιδήρου (%)
15 DCB	15	**	69.2
17 DCB	17	*	53.7
19 DCB	19	*	39.7
21 DCB	21	**	60.5



Διάγραμμα Γ.3.2.3: Σύγκριση της κατανομής του σιδήρου χωρίς κάποιο χειρισμό και μετά από χειρισμό με DCB για το σπόρο φυτών που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Για το σπόρο η επίδραση του χειρισμού είναι ισχυρή όπως και στη ρίζα του φυτού. Φαίνεται και πάλι ότι, ο χειρισμός με DCB απομακρύνει τον σίδηρο με αποτέλεσμα η συγκέντρωση να είναι χαμηλότερη σε αυτά τα φυτά. Τη και 2^η μέρα του χειρισμού με -S (μέρα 15 του πειράματος) η κατανομή με χειρισμό DCB παρουσιάζει 65,9% λιγότερο σίδηρο απ' τα αντίστοιχα δεδομένα για τα φυτά που δεν έχουν υποστεί χειρισμό με DCB. Αντίθετα, για τη μέρα 17 και μόνο τα φυτά με χειρισμό DCB έχουν παρόλα αυτά 59% περισσότερο σίδηρο από τα φυτά χωρίς χειρισμό. Η υπεροχή στην ποσότητα του σιδήρου που προϋπάρχει στις δειγματοληψίες των ημερών 13 και 15 επανέρχεται τη μέρα 17 και συνεχίζει τη μέρα 19 με 63,5% και 63,8% περισσότερο σίδηρο, αντίστοιχα.

Γ.4 Μελέτη των επιπέδων του σιδήρου που ανιχνεύεται στο περιβάλλον της ρίζας και των συγκεντρώσεων που ανιχνεύονται στους φυτικούς ιστούς της ρίζας.

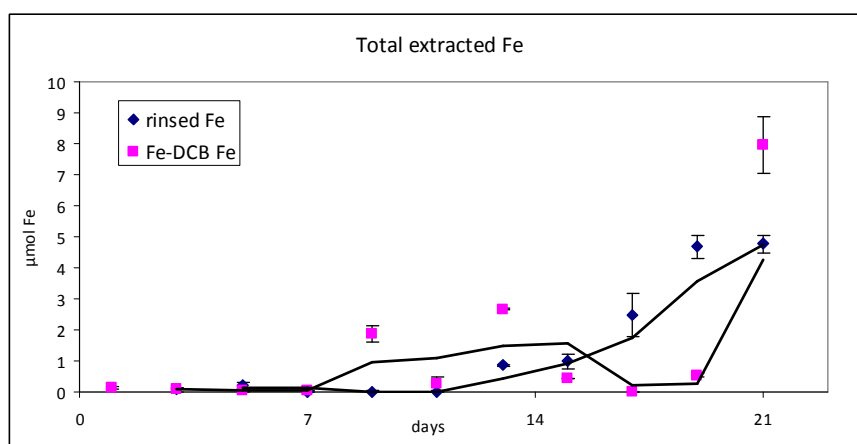
Σύμφωνα με το πειραματικό προκειμένου να υπολογιστεί η ποσότητα του σιδήρου που βρίσκεται στην επιφάνεια της ρίζας γίνεται χειρισμός με DCB διάλυμα. Το DCB απομακρύνει τον σίδηρο που βρίσκεται στην επιφάνεια της ρίζας. Έτσι, ο σίδηρος αυτός απομακρύνεται από τους φυτικούς ιστούς και δεν προσμετράται στις διαδικασίες που ακολουθούν για την μελέτη της κατανομής του σιδήρου. Επειδή όμως, ο συμπλοκοποιημένος σίδηρος από το DCB είναι, κατ' άλλους, αποθέσεις σιδήρου είναι σκόπιμο να προσδιοριστεί η ποσότητά τους και να εκτιμηθεί η συμμετοχή τους στα αποτελέσματα της κατανομής σιδήρου.

Έτσι, προκειμένου να προσδιοριστεί ο σίδηρος που βρίσκεται ως εναποθέσεις σιδήρου στο περιβάλλον της ρίζας αφαιρέθηκε από την ποσότητα για την κατανομή του σιδήρου η ποσότητα που αντιστοιχεί στον φυτικό ιστό από την κατανομή μετά από χειρισμό με DCB, σύμφωνα με τη σχέση (I).

$$\text{Εναποθέσεις σιδήρου} = C_{\text{Fe}} - C_{\text{Fe post DCB}} \quad (\text{I})$$

όπου C_{Fe} = ποσότητα του σιδήρου σε φυτό ως έχει (μmol)

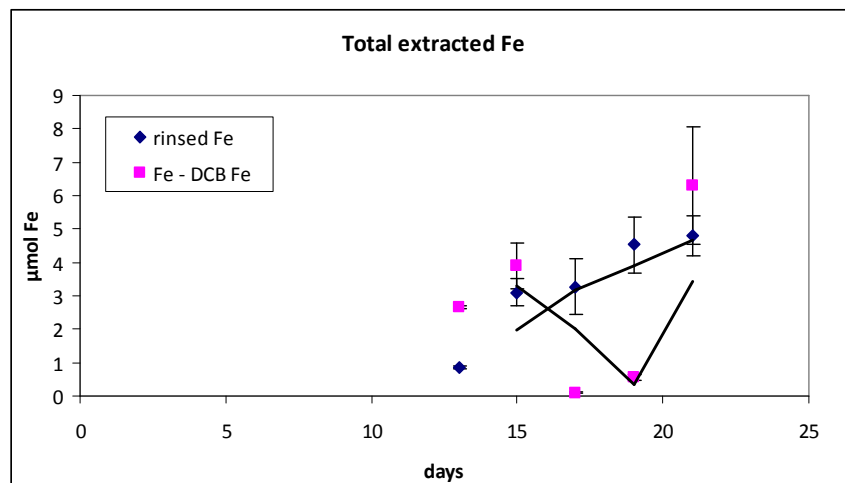
$C_{\text{Fe post DCB}}$ = ποσότητα του σιδήρου μετά από χειρισμό με DCB (μmol)



Διάγραμμα Γ.4.1: Απεικόνιση του ολικού εκχυλισμένου σιδήρου (σχέση I, Fe-DCB Fe) και του σιδήρου που βρίσκεται στο διάλυμα εκχύλισης DCB για φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Συγκεκριμένα, για τα control φυτά τις πρώτες ημέρες του πειράματος (3^η, 5^η και 7^η ημέρα) ο σίδηρος δεν διαφοροποιείται. Η διαφοροποίηση ξεκινάει την 9^η μέρα με τον σίδηρο που προσδιορίζεται στο διάλυμα εκχύλισης DCB να είναι 99,4% περισσότερος από τον σίδηρο που προκύπτει από τη σχέση (I). Παρατηρείται ότι για τις μέρες 9, 11, 13 και 21 ισχύει ότι $Fe_{\text{rinsed Fe}} < Fe_{\text{Fe-DCB Fe}}$ (σχέση II), ενώ για τις μέρες 15, 17 και 19 η σχέση γίνεται αντίστροφη: $Fe_{\text{rinsed Fe}} > Fe_{\text{Fe-DCB Fe}}$ (σχέση III).

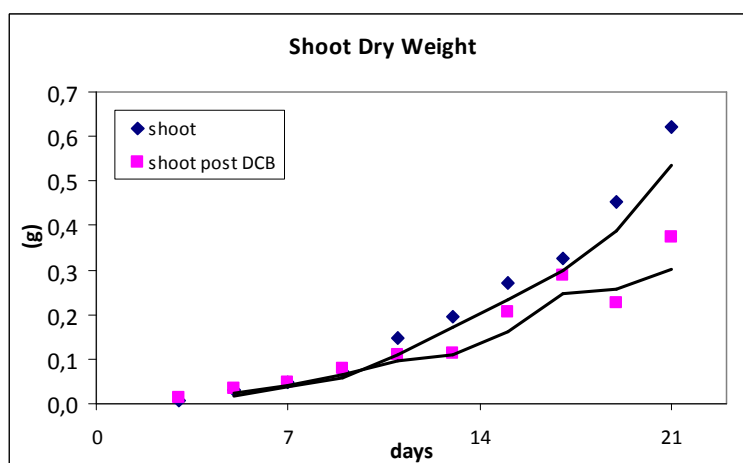
Αντίθετα, για τα -S φυτά η σχέση II ισχύει μόνο για τις μέρες 15^η και 21^η, ενώ για τις μέρες 17, 19 ισχύει η σχέση III. Δηλαδή, ο σίδηρος που υπολογίζεται ότι υπάρχει στην επιφάνεια της ρίζας μέσω του εκχυλίσματος του DCB είναι περισσότερος από τον αντίστοιχο του της σχέσης I για τις μέρες 17 και 19 (4^η και 6^η μέρα του χειρισμού αντίστοιχα), ενώ η σχέση γίνεται αντίστροφη για την 2^η και 8^η μέρα του χειρισμού.



Διάγραμμα Γ.4.2: Απεικόνιση του ολικού σιδήρου (σχέση I) και του σιδήρου που βρίσκεται στο διάλυμα εκχύλισης DCB για φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο.

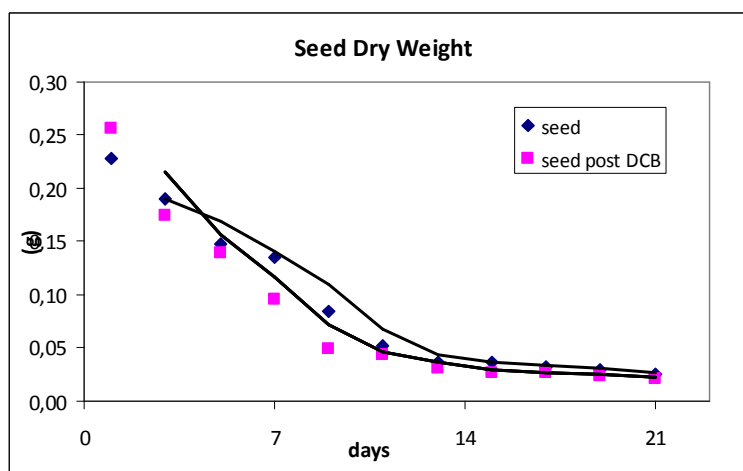
Γ.5 Μελέτη της ξηρής μάζας του φυτικού ιστού και συσχέτιση με τον περιεχόμενο σίδηρο.

Η μελέτη ξηρών μαζών των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα, τόσο αυτών που έχουν υποστεί χειρισμό με DCB όσο και αυτών που δεν έχουν τέτοιο χειρισμό, έδωσε αποτελέσματα που ποικίλουν ανάλογα με το μελετώμενο μέρος του φυτού. Για το υπέργειο, οι ξηρές μάζες δε φαίνεται να διαφοροποιούνται καθώς για κάθε δειγματοληψία βρίσκονται γύρω από ένα σημείο χωρίς να εμφανίζουν μεγάλες αποκλίσεις.



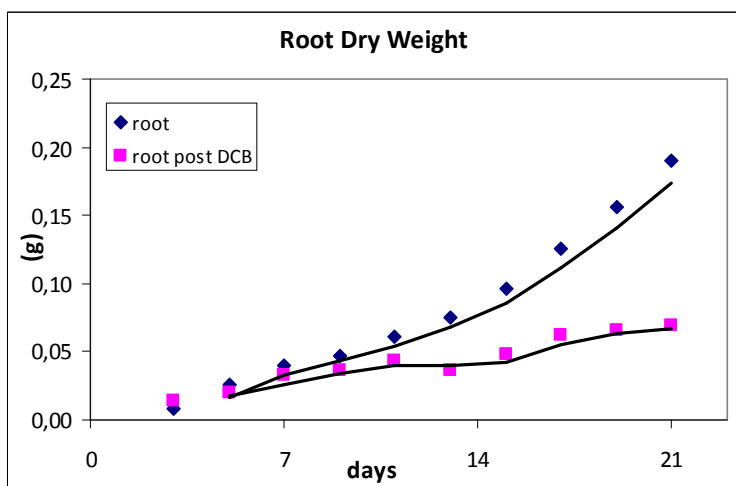
Διάγραμμα Γ.5.1: Απεικόνιση της ξηρής μάζας του υπέργειου φυτών που έχουν υποστεί ή όχι χειρισμό με DCB και έχουν αναπτυχθεί σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Ομοίως, το ίδιο ομαλή και μη διαφοροποιημένη ανάμεσα στους δύο χειρισμούς φαίνεται να είναι και η κατανομή της ξηρής μάζας του σπόρου. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 5.2 το άδειασμα του σπόρου και μείωση της ξηρής μάζας του ακολουθούν σχεδόν την ίδια κατανομή, με παρόμοιο μάλιστα ρυθμό από την 13^η μέρα μέχρι το τέλος του πειράματος.



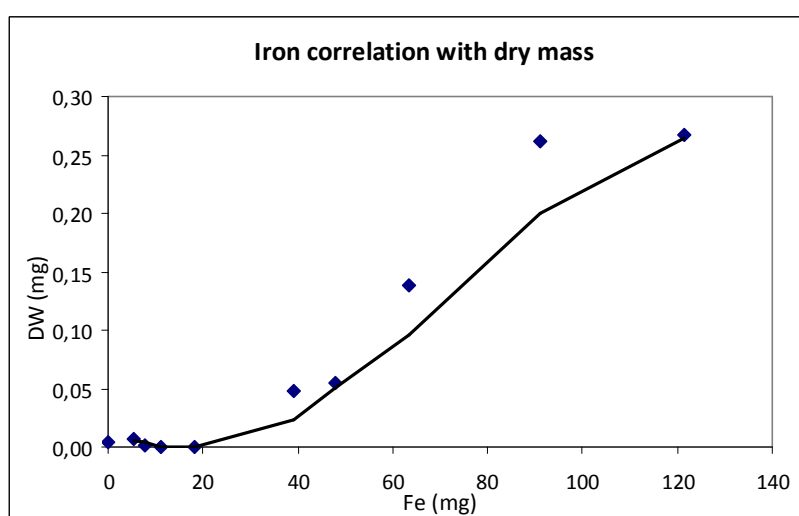
Διάγραμμα Γ.5.2: Απεικόνιση της ξηρής μάζας του σπόρου φυτών που έχουν υποστεί ή όχι χειρισμό με DCB και έχουν αναπτυχθεί σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Στη ρίζα όμως, οι ξηρές μάζες φαίνονται να διαφοροποιούνται. Έτσι, από την 13^η μέρα και μετά οι ρίζες των φυτών που έχουν υποστεί χειρισμό με DCB παρουσιάζουν μικρότερες ξηρές μάζες από τις αντίστοιχες των φυτών που δεν έχουν υποστεί χειρισμό. Η διαφορά αυτή στις ξηρές μάζες μπορεί να περιέχει διάφορα άλλα συστατικά, εκ των οποίων ένα είναι και ο σίδηρος. Ενδεικτικός είναι ο σίδηρος που εκχυλίστηκε από το διάλυμα DCB από τις ρίζες, με βάση τον οποίο μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσοστό συμμετοχής του σιδήρου στην ξηρή μάζα της ρίζας σε φυτά που έχουν υποστεί ή όχι χειρισμό με DCB.



Διάγραμμα Γ.5.3: Απεικόνιση της ξηρής μάζας του ριζικού φυτών που έχουν υποστεί ή όχι χειρισμό με DCB και έχουν αναπτυχθεί σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 3 η διαφορά των ξηρών βαρών ανάμεσα στους δύο χειρισμούς παρουσιάζει μια αύξουσα πορεία ξεκινώντας από 38 mg ξηρού ιστού για τη 13^η μέρα και καταλήγοντας σε 121 mg για την 21^η μέρα.



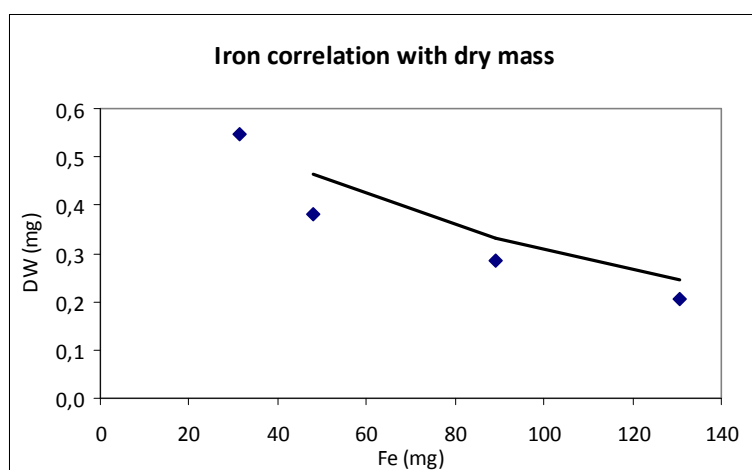
Διάγραμμα Γ.5.4: Απεικόνιση της συσχέτισης της ξηρής μάζας με τον περιεχόμενο της σιδήρου για τις μέρες 3-21 σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Παρατηρείται ότι η αύξηση του ξηρού βάρους του ιστού είναι ιδιαίτερα έντονη σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης του σιδήρου η οποία παρουσιάζει πιο ήπιο ρυθμό. Έτσι, ο σίδηρος της 13^{ης} μέρας βρίσκεται στο 0,12% ενώ της 21^{ης} μέρας στο 0,22%. Η αύξηση της ξηρής μάζας από την 13^η-21^η μέρα αγγίζει το 67,8% ενώ η αύξηση του σιδήρου είναι λίγο χαμηλότερα και φτάνει στο 45,4%.

Πίνακας Γ.5.1: Απεικόνιση της διαφοράς της ξηρής μάζας και της συμμετοχής του σιδήρου σε αυτήν σε control φυτά που έχουν υποστεί χειρισμό με DCB και σε φυτά που δεν έχουν υποστεί κάποιο χειρισμό.

days	Διαφορά ξηρής μάζας (mg)	% Fe
13	38,967	0,12
15	47,917	0,11
17	63,542	0,22
19	90,967	0,29
21	121,314	0,22

Για τα -S φυτά τα δεδομένα είναι παρόμοια, με την ξηρή μάζα της ρίζας να διαφοροποιείται στους δύο χειρισμούς. Συγκεκριμένα, για την 2^η μέρα του χειρισμού με -S (15^η μέρα του πειράματος) η ξηρή μάζα της ρίζας είναι 31,54 mg και την 8^η μέρα του χειρισμού (21^η μέρα του πειράματος) έχει φτάσει τα 130 mg, με μια ποσοστιαία αύξηση της τάξης του 75,8%. Αντίθετα όμως, ο περιεχόμενος σίδηρος φαίνεται να μειώνεται. Έτσι, για τη μέρα 15 του πειράματος και 2^η μέρα του χειρισμού είναι 0,55% μετά από 6 ημέρες έχει μειωθεί μέχρι τα 0,21%. Η ποσοστιαία μείωση του σιδήρου είναι 61,8%.



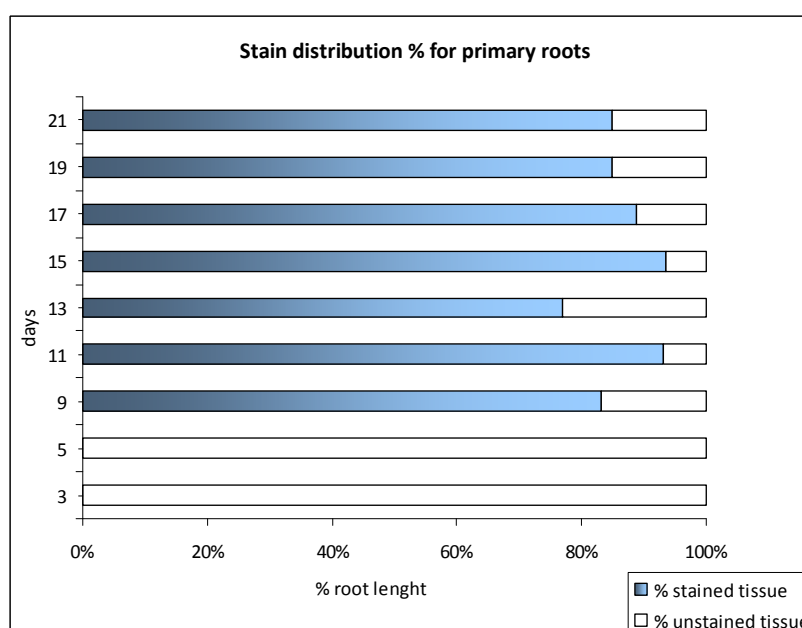
Διάγραμμα Γ.5.5: Απεικόνιση της συσχέτισης της ξηρής μάζας με τον περιεχόμενο της σιδήρου για τις μέρες 3-21 σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Γ.6 Χαρτογράφηση της χρώσης PerI του ριζικού συστήματος του *Zea mays* σε συνθήκες control και -S.

Για να μελετηθεί η χρώση PerI για τη ρίζα των φυτών που αναπτύσσονται σε πλήρες και σε ελλειμματικό σε θείο θρεπτικό διάλυμα ακολουθήθηκαν οι ίδιες δειγματοληψίες όπως και στις κατανομές που περιγράφηκαν προηγουμένως. Συγκεκριμένα, φυτά λαμβάνονταν κάθε δύο μέρες με το πλήρες θρεπτικό διάλυμα να μπαίνει την 7^η μέρα ενώ το -S μία εβδομάδα μετά (14^η μέρα). Όπως αναφέρεται και στο πειραματικό, ολόκληρα φυτά εμβαπτιζόνταν σε διάλυμα χρωστικής για 30 min και στη συνέχεια παρατηρούνταν μακροσκοπικά και στερεοσκοπικά.

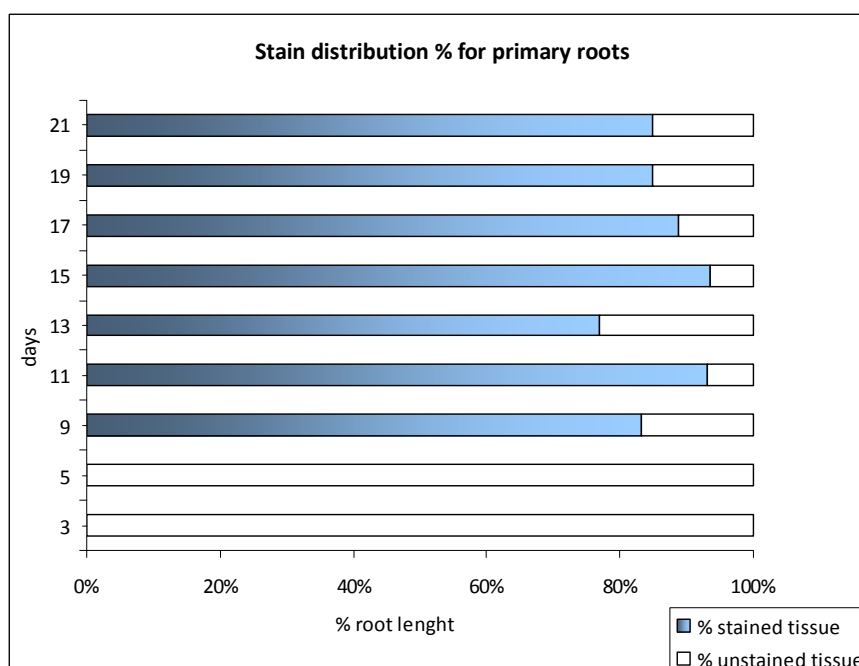
Γ.6.1 Μακροσκοπική παρατήρηση της χρώσης PerI για τη ρίζα των φυτών σε πλήρες και ελλειμματικό θρεπτικό διάλυμα.

Μετά το τέλος της διαδικασίας της χρώσης τα φυτά μεταφέρονταν σε βαθμονομημένο χαρτί και μετρούνταν η απόσταση της βαμμένης περιοχής από την εκβολή της ρίζας και η απόσταση της άβαφης περιοχής κοντά στο ακρορίζιο. Μετά από επεξεργασία με διάφορα λογισμικά, όπως αναφέρονται στο πειραματικό μέρος, προκύπτει η χαρτογράφηση. Η χαρτογράφηση προκειμένου να είναι αντιπροσωπευτική του μήκους της κάθε ρίζας που βάφτηκε εκφράστηκε σε ποσοστιαίες μονάδες και αναπαραστάθηκε σε ραβδογράμματα. Γενικά, η άβαφη περιοχή προσδιορίζεται σε κάθε περίπτωση για την περιοχή του ακρορίζιου, με διαφορετικά όμως μήκη για κάθε περίπτωση.

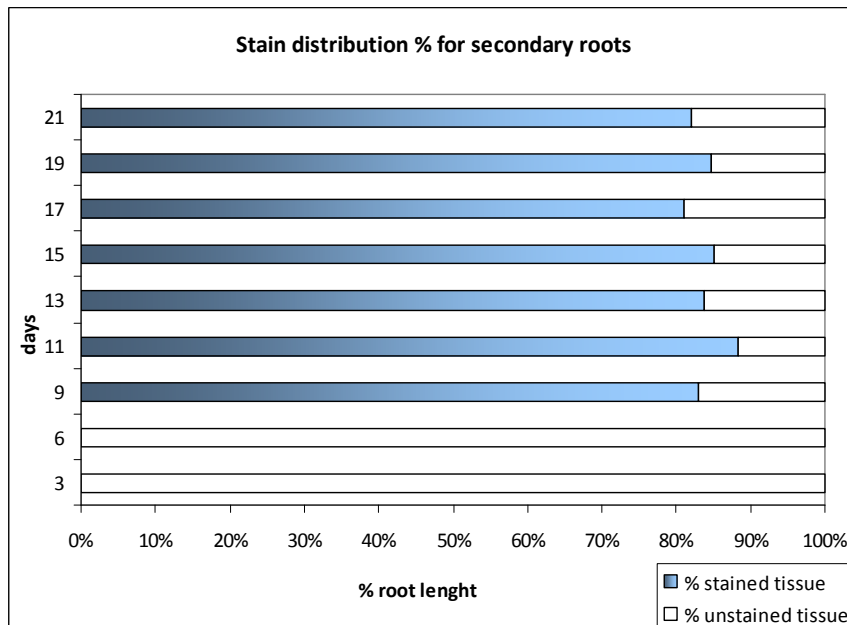


Διάγραμμα Γ.6.1.1: Η χρώση της πρωτογενούς ρίζας στον αραβόσιτο σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα από την 3^η έως την 21^η μέρα. Στο 0% βρίσκεται η βάση της ρίζας και το ακρορίζιο στο 100%.

Οι πρωτογενείς ρίζες στα control φυτά βάφονται με διαφορετικό ποσοστό συμμετοχής του ιστού που έχει υποστεί χρώση σε σχέση με αυτόν που παραμένει άβαφος παρόλη τη διαδικασία της χρώσης. Από το διάγραμμα Γ.6.1.1 παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο μήκος χρώσης υπάρχει την 15η μέρα (93,5%), όμως οι διαφορές με τις άλλες μέρες δε φαίνεται να είναι σημαντικές. Ομοίως, παρατηρείται μια μέγιστη χρώση για τις μέρες 15^η και 17^η με 92,6% και 82,2% χρώση αντίστοιχα στα φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό με έλλειψη θεικών η οποία μειώνεται βαθμιαία μέχρι τη 21^η μέρα του πειράματος και 8^η μέρα του χειρισμού όπου και αποκτά το μικρότερο μήκος της (61,8%).

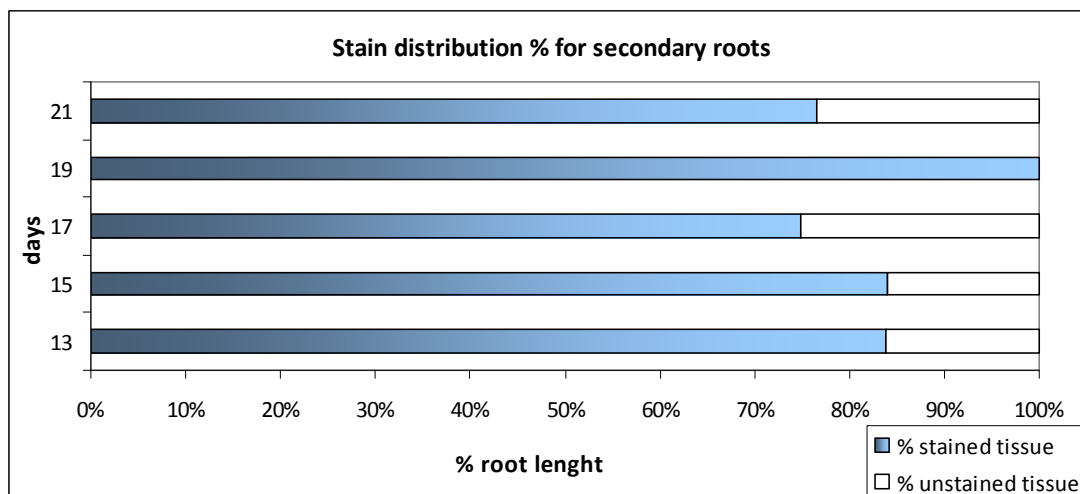


Διάγραμμα Γ.6.1.2: Η χρώση της πρωτογενούς ρίζας στον αραβόσιτο σε φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο από την 13^η (d0 του χειρισμού) έως την 21^η ημέρα (d8 του χειρισμού με -S). Στο 0% βρίσκεται η βάση της ρίζας και το ακρορίζιο στο 100%.



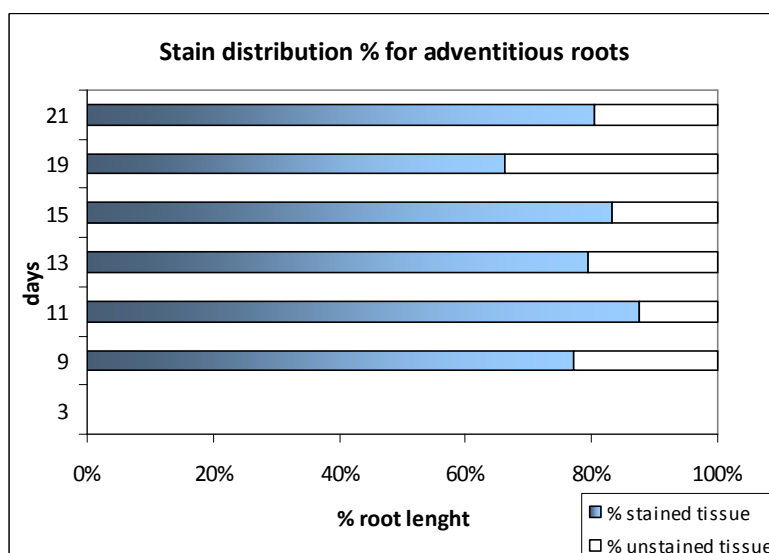
Διάγραμμα Γ.6.1.3: Η χρώση της δευτερογενών ριζών σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα. Στο 0% βρίσκεται η βάση της ρίζας και το ακρορίζιο στο 100 %.

Για τις δευτερογενείς ρίζες η χρώση δε φαίνεται να διαφοροποιείται ιδιαίτερα, αφού κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα στη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών. Κυμαίνεται μεταξύ 81-88% με μέγιστη χρώση την 11^η μέρα (88,4%). Για την 3^η και 6^η μέρα όπου το φυτό τρέφεται από τα αποθέματα του σπόρου και δεν υποστηρίζεται θρεπτικά από κάποιο θρεπτικό διάλυμα, δεν παρατηρείται χρώση.



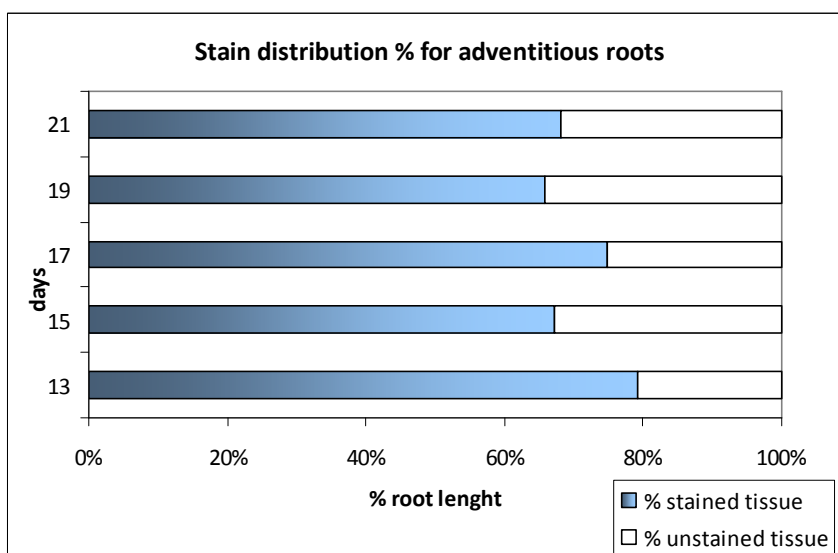
Διάγραμμα Γ.6.1.4: Η χρώση των δευτερογενών ριζών στον αραβόσιτο σε φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειματικό σε θείο. Στο 0% βρίσκεται η βάση της ρίζας και το ακρορίζιο στο 100 %.

Στην 19^η μέρα του πειράματος και 6^η μέρα του χειρισμού με $-S$ στη δευτερογενή ρίζα παρατηρείται χρώση 100%. Αντίθετα η προηγούμενη δειγματοληψία έχει ποσοστιαία χρώση 74,8% και είναι η μικρότερη σε μήκος χρώση που παρατηρείται για τις δευτερογενείς ρίζες υπό συνθήκες $-S$.



Διάγραμμα Γ.6.1.5: Η χρώση των βλαστογενών ριζών στον αραβόσιτο σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα. Στο 0% βρίσκεται η βάση της ρίζας και το ακρορίζιο στο 100 %.

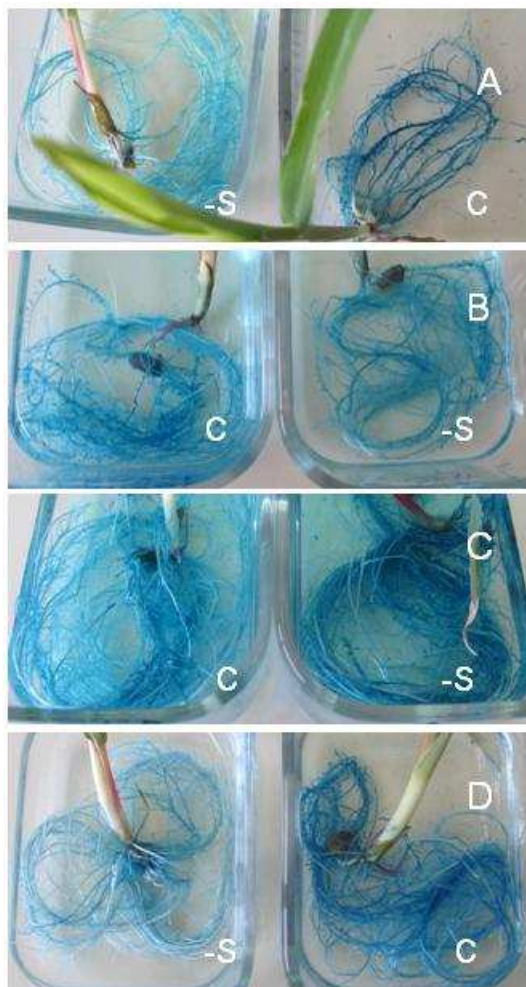
Η δειγματοληψία για τις βλαστογενείς ρίζες ξεκινάει από την 9^η μέρα του πειράματος και τα φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα παρουσιάζουν μέγιστη χρώση την 11^η μέρα με 87,5%. Το εύρος των τιμών κυμαίνεται από 66,3% (19^η μέρα) μέχρι 87,5%. Για τα φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο παρουσιάζει μέγιστο την 1^η μέρα του χειρισμού και 13^η μέρα του πειράματος και φτάνει στις 79,3 ποσοστιαίες μονάδες. Ελάχιστο παρατηρείται την 15^η μέρα με χρώση 67,1%.



Διάγραμμα Γ.6.1.6: Η χρώση των βλαστογενών ριζών στον αραβόσιτο σε φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο. Στο 0% βρίσκεται η βάση της ρίζας και το ακρορίζιο στο 100%.

Γ.7 Χρώση ολόκληρου του ριζικού συστήματος σε σχέση με το διαφορετικό θρεπτικό περιεχόμενο των χειρισμών.

Γ.7.1 Συνολική εικόνα της χρώσης του ριζικού συστήματος σε σχέση με το διαφορετικό θρεπτικό περιεχόμενο των χειρισμών.



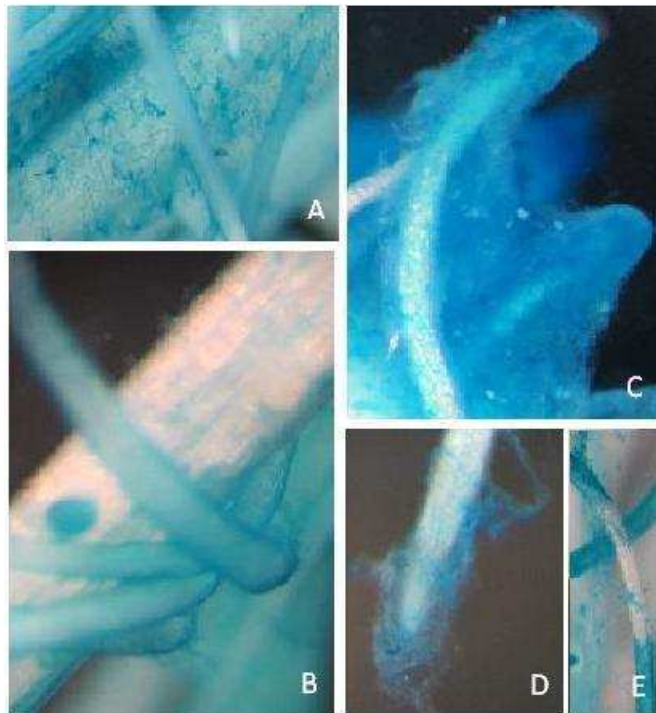
Το ριζικό των φυτών την (A) 15η μέρα, (B) 17η μέρα, (C) 19η μέρα, (D) 21η μέρα του πειράματος μετά από χρώση Perla.

Η χρώση Perla για ολόκληρο το ριζικό σύστημα των μελετώμενων φυτών έδωσε αποτελέσματα που διαφοροποιούνταν ανάλογα με την θρεπτική κατάσταση και την ημέρα του πειράματος για το κάθε φυτό. Τα φυτά αφού ξεπλένονταν καλά τοποθετούνταν σε χρωστική Perla για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Έτσι, για την 15^η μέρα (Εικ. 1A) του πειράματος, δηλαδή για την 8^η μέρα για τα φυτά σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και μόλις την 1^η μέρα για τα φυτά σε -S, παρατηρείται διαφορετική ένταση χρώσης για τους δύο χειρισμούς. Για το μεν -S παρατηρούμε ελαφρά χρώση, ενώ το control φυτό έχει μεγαλύτερη ένταση χρώσης. Η χρώση του control για αυτή τη μέρα φαίνεται να είναι ισχυρή για τις πλάγιες ρίζες. Παρόλο όμως που υπάρχουν πλάγιες ρίζες στο φυτό που αναπτύσσεται σε θρεπτικό ελλειμματικό σε θείο, δεν παρατηρείται παρόμοια εντεταμένη χρώση.

Για την 17^η μέρα (Εικ. 1B), η μακροσκοπική παρατήρηση δεν μπορεί να είναι ακριβής. Τα -S φυτά βάζονται ισχυρότερα μεν από τα -S φυτά της 15^η μέρας αλλά όχι και πιο ισχυρά από τα αντίστοιχά τους control. Και πάλι μπορεί να γίνει η ίδια παρατήρηση για τις πλάγιες ρίζες, με ισχυρότερη ή διαφορετική χρώση για αυτές τις περιοχές.

Η ίδια διαφορά στη χρώση επανέρχεται την 19^η μέρα (Εικ. 1C) με τα φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα να βάζονται λιγότερο έντονα από τα αντίστοιχα που αναπτύσσονται σε θρεπτικό ελλειμματικό σε θείο. Παρόλο που παρατηρείται έντονη χρώση για τις πλάγιες ρίζες στα control φυτά, δεν μπορεί σε καμία περίπτωση να συγκριθεί η έντασή της με αυτή των -S φυτών.

Αντίστροφη συμπεριφορά παρατηρείται την 21^η μέρα του πειράματος και 8^η μέρα του χειρισμού. Τα φυτά που έχουν αναπτυχθεί σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα



Εικόνα 2: (Α) ριζικά τριχίδια, (Β) πλάγιες ρίζες (C) εναποθέσεις σε μορφή υμένα, (D) εναποθέσεις σε ακρορίζιο σε μορφή βλέννας, (E) τραυματισμός του υμένα της εναπόθεσης σε ρίζα.

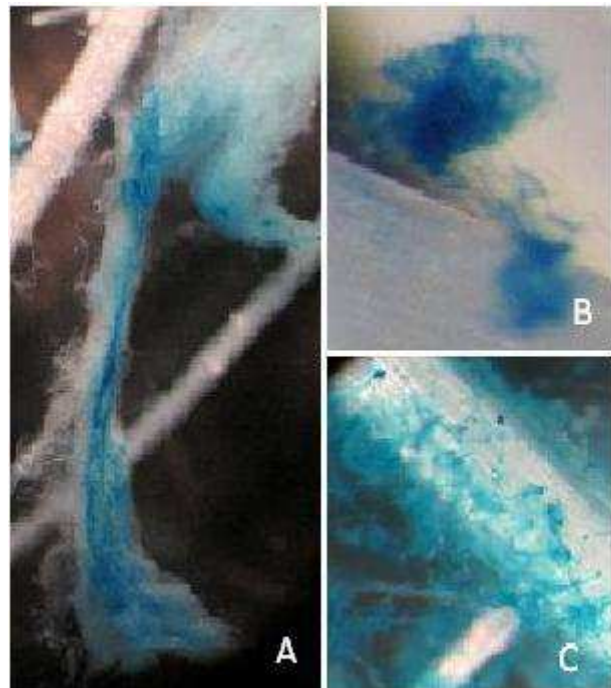
παρουσιάζουν περισσότερη χρώση από αυτά που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο, παρόλη την ίδια ανάπτυξη του συστήματος των πλαγίων ριζών που εντείνουν τη χρώση.

Γ.7.2 Στερεοσκοπική παρατήρηση των εναποθέσεων σιδήρου στην επιφάνεια της ρίζας.

Αμέσως μετά τη χρώση και την μακροσκοπική παρατήρηση γινόταν και παρατήρηση σε στερεοσκόπιο τύπου Leica WILD M3B. Έτσι, οι εναποθέσεις που περιέχουν σίδηρο είναι δυνατόν να γίνουν ορατές αφού βάφονται με χρώμα μπλε (prussian blue).

Οι εναποθέσεις βρίσκονται στο ριζικό, είτε ως μορφή συσσωματωμάτων

που αιωρούνται ή που βρίσκονται προσκολλημένα στα φυτικά όργανα είτε υπάρχουν ως λεπτό υμένιο πάνω σε φυτικές επιφάνειες. Επίσης μπορεί να είναι ορατές και να βάφουν ακόμα και επιφάνειες όπως τα ριζικά τριχίδια (Εικ.2Α). Οι εναποθέσεις κάποιες φορές δημιουργούν επικαλύψεις μικρού πάχους στα επιδερμικά κύτταρα των ριζών που μοιάζει να αποτελούν μέρος της δομής τους (Εικ. 2B) κάτι το οποίο δεν ισχύει διότι τραυματισμοί ή άλλοι εξωτερικοί παράγοντες είναι δυνατόν να απομακρύνουν τις εναποθέσεις αποκαλύπτοντας τα λευκά επιδερμικά κύτταρα



Εικόνα 3: Δομές συσσωματωμάτων όπως παρατηρούνται στο στερεοσκόπιο (Α) μεγάλου μήκους (cm²), (Β) μερικών mm, (C) της ίδιας τάξης μεγέθους των ριζικών τριχιδίων.

των ριζών (Εικ. 2Ε). Συχνά, συσσωματώματα και δομές μορφής βλέννας αγκιστρώνονται στα ακρορίζια και δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον που φαίνεται να συνδέεται άμεσα με τη βλέννα του ακρορίζιου (Εικ. 2D).

Στο περιβάλλον της ρίζας εκτός από εναποθέσεις σε ιστούς τα βαμμένα οξείδια του σιδήρου και τα άλλα συστατικά που ίσως περιέχονται, συχνά απαντούν και ως αιωρούμενη βλέννα διαφόρων σχηματισμών που επικάθεται ή όχι πάνω



Εικόνα 4: Δίκτυο οξειδίων σιδήρου όπως φαίνεται (Α) στη βάση του βλαστού και (Β), (C), (D) στο σπόρο.

στους ιστούς. Φαίνεται ότι δημιουργείται στο περιβάλλον της ρίζας και παραμένει εκεί, αφού οι μορφές παρατηρούνται στο περιβάλλον της ρίζας χωρίς να είναι συμπιεσμένες ή διαφοροποιημένες από περιοχή σε περιοχή. Το μέγεθός τους ποικίλει και είναι δυνατόν να δημιουργηθούν δομές λίγο μικρότερες από 1 cm (Εικ. 3Α), δομές που είναι ορατές με μεγέθυνση του στερεοσκοπίου και δεν ξεπερνούν τα μερικά mm (Εικ. 3B) και δομές που βρίσκονται ανάμεσα στα ριζικά τριχίδια και είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτά.

Παράλληλα, ο σπόρος (Εικ. 4B) και το μεσοκοτύλιο (Εικ. 4A) που βρίσκονται μέσα στο θρεπτικό διάλυμα της υδροπο-

νίας παρουσιάζουν δομές που μοιάζουν με «δίκτυο» οξειδίων του σιδήρου που καλύπτει τις φυτικές επιφάνειες. Το «δίκτυο» αυτό δημιουργεί σχηματισμούς πάνω στους ιστούς που μπορούν να είναι ορατοί σε μικρές μεγεθύνσεις όπως 2x ή 5x. Οι σχηματισμοί αυτοί βρίσκονται κυρίως στις μεγάλες επιφάνειες του σπόρου ή του μεσοκοτυλίου και της βάσης του στελέχους. Ο υμένας αυτός μπορεί για διάφορους λόγους να αποκολληθεί από το φυτικό όργανο και να αποκαλύψει την επιφάνεια του φυτικού ιστού που δεν είναι τροποποιημένη με κανένα τρόπο από τον υμένα (Εικ. 4D).

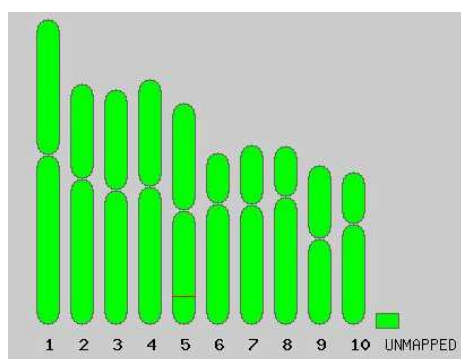
Γ.8 In silico ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τον μεταφορέα YS1 στη ρίζα και τα φύλλα του αραβόσιτου.

Σε αυτή την ενότητα προσδιορίστηκαν οι ακολουθίες που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων και αντιπροσωπεύουν την αλληλουχία του μεταφορέα YS1 του *Zea mays*. Αρχικά, αναζητήθηκαν οι ακολουθίες στη βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI), όπου και βρέθηκε το γονίδιο με αναφορά αλληλουχίας στο NCBI: NM_001111482.1. Η αλληλουχία είναι γραμμικό mRNA, μήκους 2494 bp και έχει κατατεθεί στη βάση δεδομένων στις 10 Μαρτίου 2010 (Ueno 2009, Roberts 2004, Schaaf 2004, Curie 2001). Αυτή η αλληλουχία είναι η μοναδική που αντιπροσωπεύει το μεταφορέα στο NCBI αφού η ομοιότητά της με άλλες δεν ξεπερνά το 70%.

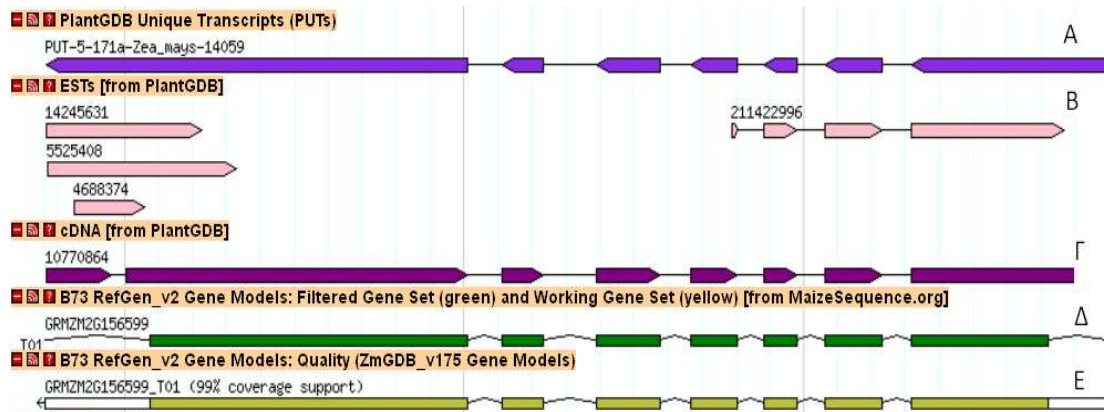
Επίσης, στη βάση δεδομένων υπήρχε ήδη από το 2007 μια αλληλουχία με το όνομα selective transporter gene for Iron-phytosiderophore (Iwashita, T. and Murata, Y. Patent: WO 2006126294-A 2 30-NOV-2006). Αυτή η αλληλουχία (accession number: DD437143), σύμφωνα με τον αλγόριθμο BLAST έχει πανομοιότυπη σύσταση με το πιο πρόσφατο που αναφέρεται πιο πάνω, με τη διαφορά ότι δεν είναι ολόκληρη η αλληλουχία αλλά ξεκινάει από τη βάση 184 του NM_001111482.1.

Με τη βοήθεια του αλγορίθμου BLAST (Altschul 1997) ερευνήθηκε η ύπαρξη παρόμοιων αλληλουχιών στη βάση δεδομένων TIGR. Η βάση δεδομένων TIGR περιλαμβάνει περίπου 650.000 ESTs (expression sequence tags) που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα για το *Zea mays*. Η ευθυγράμμιση των ESTs παράγει μια αλληλουχία (Tentative Consensus, TC), η οποία περιλαμβάνει και ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF). Σε αυτή τη βάση εντοπίστηκαν οι αλληλουχίες που πιθανώς κωδικοποιούν το γονίδιο μελέτης. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα TC που έχουν μεγαλύτερο αριθμό ESTs.

Έτσι, βρέθηκε ότι το αντίστοιχο TC για το mRNA του NCBI για τον YS1 μεταφορέα του *Zea mays* στη βάση δεδομένων TIGR είναι το TC472541, με ομοιότητα 99% με το mRNA του YS1 που βρέθηκε στο NCBI. Παράλληλα, βρέθηκε και το TC515099 που όμως αποτελεί παλαιότερη καταχώρηση και είναι μέρος του 472541. Έτσι, θεωρήθηκε σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί το πρώτο TC ως πιο ολοκληρωμένο.



Εικόνα Γ.8.1: Η θέση του γονιδίου yellow stripe 1 είναι στον μακρύ βραχίονα του 5^{ου} χρωμοσώματος του γονιδιώματος του *Zea mays* (Maize GDB).

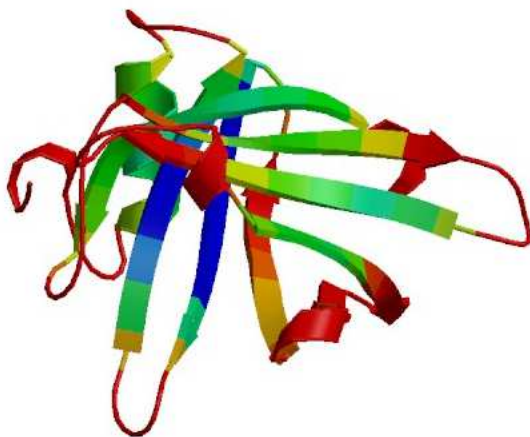


Εικόνα Γ.8.2: Γραφική απεικόνιση του YS1 για την διάταξη (Α) των μεταγραφημάτων (mRNA), (Β) των κατατεθειμένων ESTs, (Γ) του cDNA, (Δ) ομάδα γονιδιακών αλληλουχιών που απαρτίζουν τον YS1 και (Ε) ποιοτική απεικόνιση των αλληλουχιών (Maize GDB).

Με βάση την παραπάνω έρευνα αλληλουχιών και σύμφωνα με την βάση δεδομένων Maize Genetics and Genomics Database (Maize GDB) το ολοκληρωμένο όνομα του προς μελέτη γονιδίου είναι *yellow stripe1* και βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 5 του οργανισμού. Συγκεκριμένα το YS1 locus βρίσκεται ανάμεσα στη θέση 190,674,766 και 190,677,896 στο χρωμόσωμα 5. Η πληροφορία αυτή βασίζεται, σύμφωνα με το Maize GDB, σε συνδυασμένες θέσεις γονιδιακών μοντέλων και αποτελείται από 3,130 ζευγάρια βάσεων.

Το προϊόν του μελετώμενου γονιδίου είναι ο μεταφορέας μέσω του οποίου περνάει το σύμπλοκο Fe(III)-φυτοσιδηροφόρο στον αποπλασμικό χώρο των κυττάρων της ρίζας, ενώ είναι γνωστοί και μοριακοί δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ταυτοποίησή του (p-YS1-XX για μη καθορισμένη μέθοδο και IDP187 για τη μέθοδο INDEL).

Συγχρόνως, το γονίδιο του YS1 παρουσιάζει και ισχυρούς πολυμορφισμούς που κυρίως εκφράζονται ως DNA πολυμορφισμοί αλλά και ως πολυμορφισμοί των αλληλομόρφων. Γενικά πάντως, σύμφωνα με το MaizeGDB, ο φαινότυπος των μεταλλαγμένων στελεχών για τον μεταφορέα είναι αδυναμία της πρόσληψης σιδήρου και τροφопενία σιδήρου στα φύλλα.



Εικόνα 7: Μοντελοποίηση του μεταφορέα YS1 από το σύστημα του Swiss Model (Masuda et al, 2009).

Κάνοντας χρήση του ιστότοπου του Ελβετικού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής (Swiss model of Bioinformatics) και με βάση την αλληλουχία που βρίσκεται στο NCBI για την αμινοξική σύσταση του μεταφορέα, προβλέφθηκε το μοντέλο για την μελετώμενη πρωτεΐνη (Εικ. 7).

Η ομολογία της πρωτεΐνης με το μοντέλο δεν ξεπερνάει το 16.55 %, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν είναι απόλυτη η απεικόνισή της, όμως εξυπηρετεί τις ανάγκες της παρούσας εργασίας. Παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη είναι μια σχετικά μεγάλη δομή, γεγονός που φαίνεται και από το μοριακό της βάρος. Αποτελείται από μια εναλλαγή βρόχων, β-έλικας και β-κλώνων β-πτυχωτής επιφάνειας, που συνθέτουν τη διαμεμβρανική αυτή πρωτεΐνη. Παράλληλα, η δομή ορίζεται ως διμερές.



Εικόνα 8: Το προβλεπόμενο μοντέλο (μπλε γραμμή) δεν έχει απόλυτη κάλυψη της πραγματικής αμινοξικής ακολουθίας (πράσινη γραμμή) αλλά έχει κάλυψη από το 22ο αμινοξύ μέχρι το 153ο. Swiss Model report Workunit: P000010.

Στο NCBI δίνεται ως αντίστοιχη πρωτεΐνη η iron-phytosiderophore transporter yellow stripe 1 με accession number NP_001104952. Πρόκειται για μια αμινοξική ακολουθία μήκους 682 αμινοξέων που κατατέθηκε στο σύστημα στις 10 Μαρτίου 2011 και αναφέρεται πρώτη φορά το 2001 (Curie et al. 2001), παρομοίως με την γονιδιακή αλληλουχία του μεταφορέα. Έχει μοριακό βάρος 74418.0 και θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο 9.02. Το άθροισμα των αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων της (Asp και Glu) είναι 47 αμινοξέα ενώ το άθροισμα των θετικά φορτισμένων (Arg και Lys) 59. Έτσι, συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη είναι θετικά φορτισμένη. Έχει υπολογιζόμενο χρόνο ημιζωής >10 ώρες για τα βακτήρια, ενώ δεν αναφέρεται (Ex-pasy Proteomics Server) ο χρόνος ημιζωής για τους φυτικούς οργανισμούς. Γενικά θεωρείται μια σταθερή πρωτεΐνη.

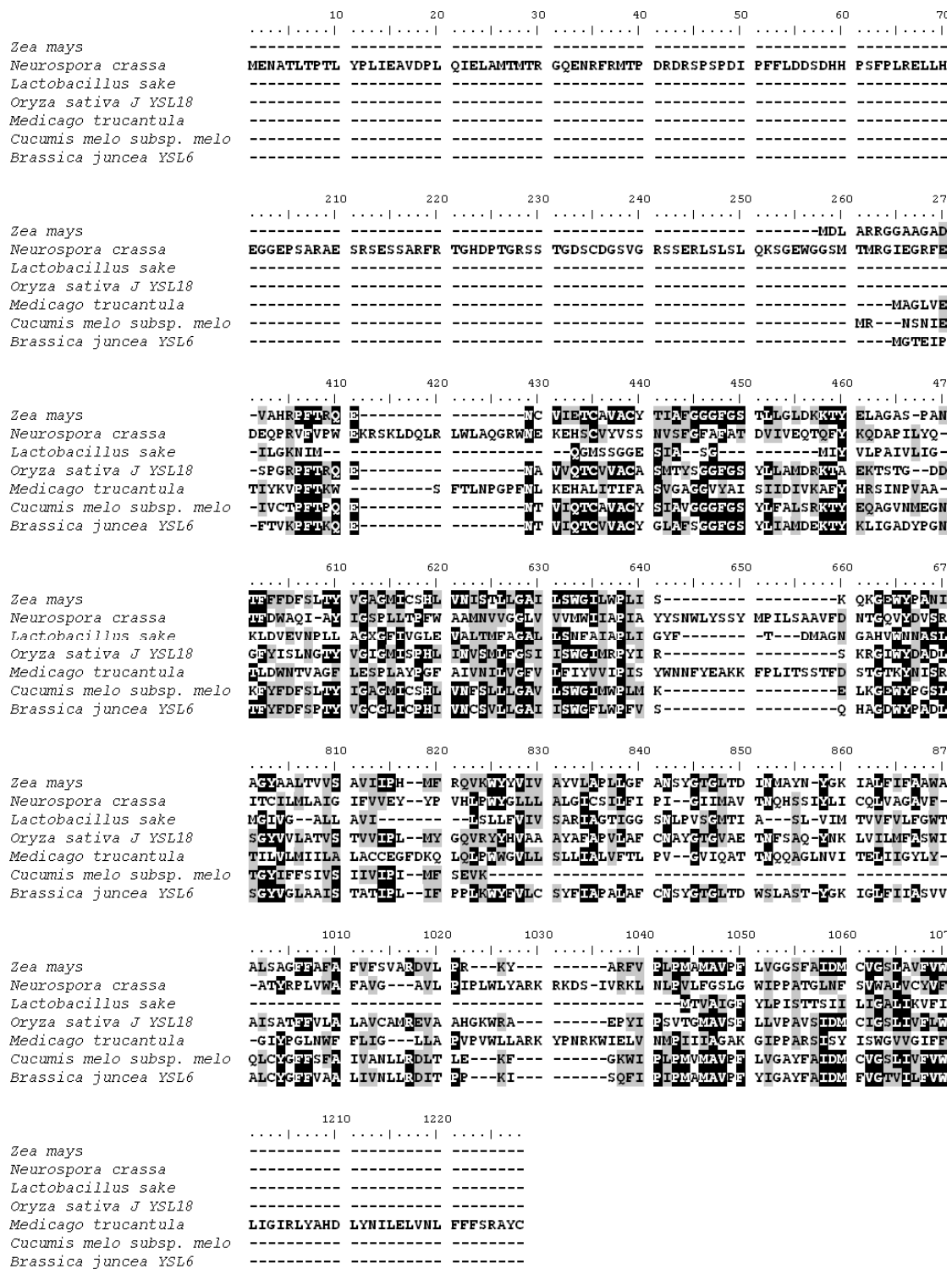
Ο μεταφορέας ανήκει στην οικογένεια μεταφορέων OPT (OligoPeptide Transporters). Οι ολιγοπεπτιδικοί μεταφορείς της οικογένειας είναι διαχωρισμένοι από τις οικογένειες των μεταφορέων ABC pfam00005 και τους PTR pfam00584. Οι συγκεκριμένοι μεταφορείς αναγνωρίστηκαν πρώτη φορά στους μύκητες (*Candida albicans* και *Schizosaccharomyces pombe*) αλλά πλέον έχουν αναγνωριστεί και σε ανώτερα φυτά, όπως το *Arabidopsis thaliana*. Θεωρούνται ότι έχουν 12-14 διαμεμβρανικά τμήματα (transmembrane domains) που περιέχουν το ακόλουθο μοτίφ: SPYxEVRxxVxxxDDP (NCBI database).

Χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST μελετήθηκε η ομολογία των μεταφορέων αρχικά μεταξύ των ομόλογων πρωτεϊνών διαφορετικών οργανισμών όπως το καλαμπόκι, στο μύκητα *Neurospora crassa*, στο πεπόνι, το ρύζι, τη μηδική και άλλα. Σύμφωνα με την εικ. 8, η διαφοροποίηση των μεταφορέων σε πρωτεϊνικό επίπεδο φάνηκε να είναι αρκετά μεγάλη και η παρουσία του χαρακτηριστικού μοτίφ διαφοροποιημένη και τοπικά και ποιοτικά.

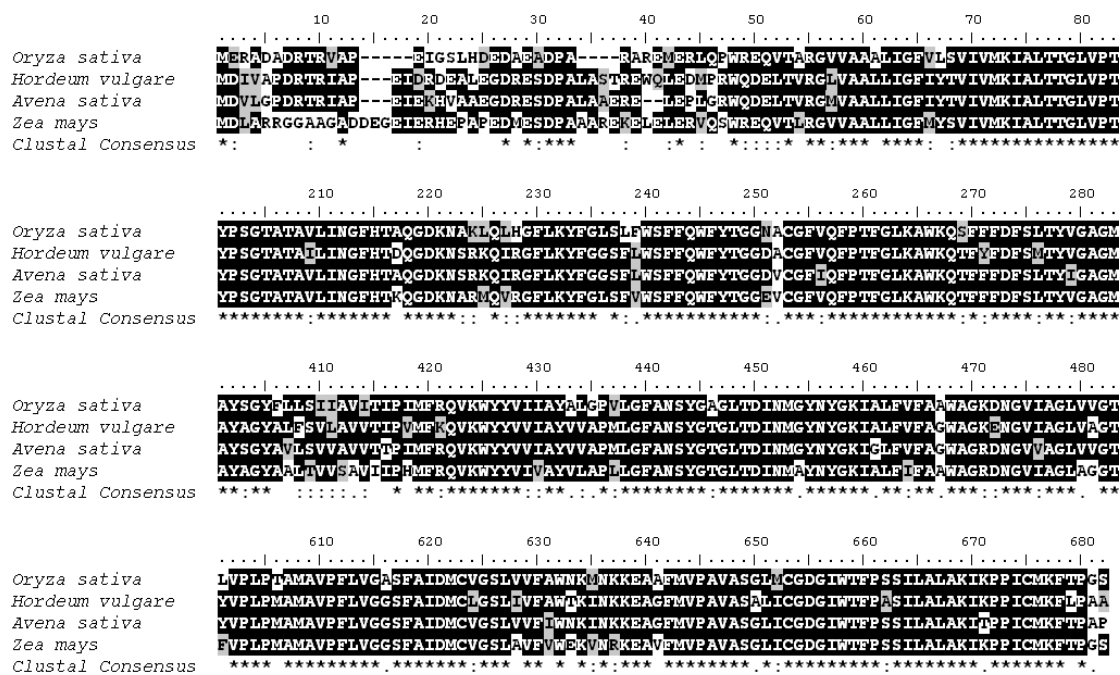
Σε επόμενο στάδιο επιχειρήθηκε η στοίχιση αλληλουχιών που ανήκουν σε είδη Poaceae, όπως η βρώμη (*Hordeum vulgare*), το κριθάρι (*Avena sativa*), το ρύζι

(*Oryza sativa*) και ο μελετώμενος οργανισμός το καλαμπόκι (*Zea mays*). Παρατηρήθηκε ότι στη στοίχιση αυτή οι πρωτεΐνες μοιράζονται πλέον πρωτεϊνικές αλληλουχίες σε μεγαλύτερη κάλυψη από ότι συνέβαινε στην προηγούμενη στοίχιση. Η ομοιότητα των πρωτεϊνικών αλληλουχιών διαφέρει κατά περίπτωση και είναι της τάξης του 70-80%.

Φυλογενετικά (EBI phylogeny) η πιο εξελιγμένη μορφή της πρωτεΐνης φαίνεται να είναι η ZmYS αφού απέχει από τη ρίζα 0.138 μονάδες και η OsYSL που απέχουν 0.137 μονάδες. Ο μεταφορέας στη βρώμη και στο κριθάρι παρουσιάζεται σε λιγότερο εξελιγμένη μορφή, αφού απέχει από τη ρίζα του δέντρου 0.067 και 0.088 μονάδες αντίστοιχα.



Εικόνα Γ.8.5: Πρωτεϊνικό BLAST σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς που διαθέτουν τον μεταφορέα yellow stripe.



Εικόνα Γ.8.6: Πρωτεϊνικό BLAST για τον μεταφορέα yellow stripe σιδήρου-φυτοσιδηροφόρου σε μονοκότυλα φυτά.

Γ.8.1 Μελέτη του τρόπου έκφρασης των γονιδίων του μεταφορέα yellow stripe 1 στη ρίζα και στο υπέργειο του *Zea mays*.

Τα δείγματα ελήφθησαν από το υπόγειο και το υπέργειο τμήμα του καλαμποκιού, συγκεκριμένα από την ολική ρίζα και το ολικό υπέργειο και οι δειγματοληψίες έγιναν τις μέρες 8,9,14,17 και 20 ξεκινώντας τη μέτρηση των ημερών από τη σπορά. Έγινε απομόνωση mRNA από τους ιστούς και καθαρισμός με DNase για την απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA. Εφόσον εξασφαλίστηκε καθαρό RNA, το επόμενο βήμα ήταν η κατασκευή cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription) και ενίσχυση του σήματος με PCR, μεταγράφοντας το σύνολο του mRNA.

Στα αποθηκευμένα στους -4° C δείγματα cDNA έγινε η μελέτη του επιπέδου έκφρασης με τη μέθοδο της Real Time PCR (qReal-Time PCR). Γι' αυτό το σκοπό σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για κάθε γονίδιο. Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε η ουμπικουιτίνη (TC549976 TC48823 TC61377 TC259447) με 301 ESTs και 3439 bp (accession number NCBI S94466).

Πίνακας Γ.8.1.1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις ενισχύσεις με PCR.

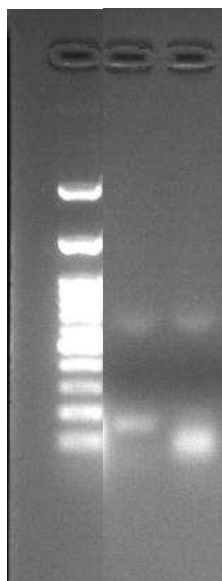
Gene	TC target	Forward primer	Reverse primer
ZmYS1	TC472541	5'- GAGTGGTACCCTGCGAACAT -3'	5'- AGCCGTTGATGCAGACTCTT -3'
ZmUBQ	TC549976	5-AAGCAGCTGGAGGATGGCCGTA-3'	5'ACGAAGATCTGCATGCCACCCCT-3'

Προκειμένου να σχεδιαστούν εκκινητές για την qRT-PCR ελήφθησαν υπόψιν παράγοντες όπως το μήκος του προϊόντος της αντίδρασης, η θερμοκρασία υβριδισμού (T_m) και το ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης (GC% content) που περιέχεται στον εκκινητή.

Πίνακας Γ.8.1.2: Ειδικά χαρακτηριστικά των εκκινητών.

Γονίδιο	F/R	T_m (°C)	GC(%)	Length (bp)	Product size (bp)
ZmYS1	F	60.0 °C	55.0 %	20	149
	R	60.0 °C	55.0 %	20	
ZmUBQ	F	59.98	59.09	22	101
	R	60.24	56.52	23	

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το Primer3Plus και το Primer-BLAST του NCBI. Η ομολογία τους με άλλα γονίδια ελέγχθηκε με BLAST.



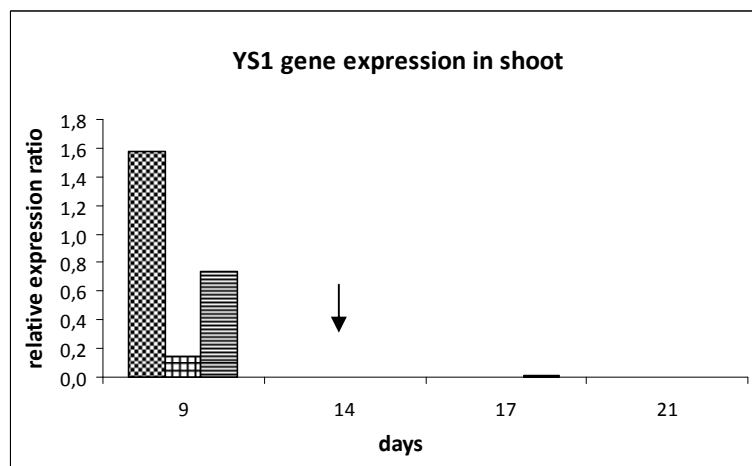
Εικόνα Γ.8.1.1: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης του YS1 (149 bp) και της UBQ (101 bp).

Γ.9 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του μεταφορέα YS1 στο *Zea mays*.

Γ.9.1 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του YS1 στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

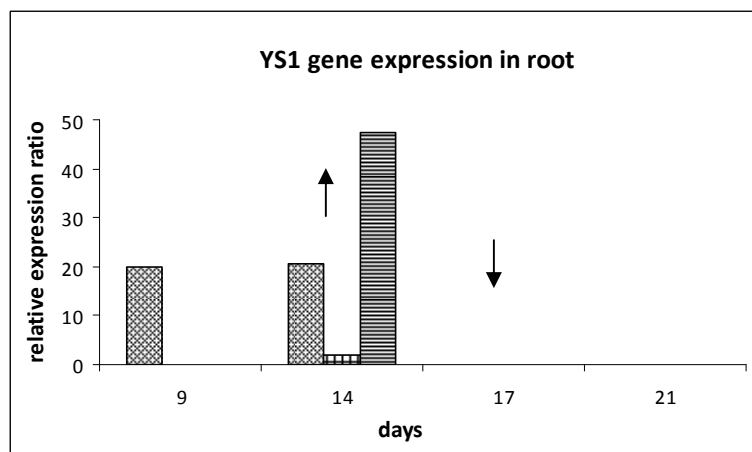
Η έκφραση του μεταφορέα σιδήρου-νικοτιαναμίνης, δηλαδή του γονιδίου YS1 για τον αραβόσιτο, παρουσιάζεται μειωμένη στα φύλλα ιδιαίτερα τις τελευταίες μέρες του πειράματος, ενώ η έκφραση στη ρίζα φαίνεται να είναι ίδιας μορφής, αλλά με καθυστερημένη απόκριση.

Συγκεκριμένα, για τα φύλλα την 9^η μέρα η ελάχιστη σχετική έκφραση είναι 0,141 ενώ η μέγιστη φτάνει στις 1,581 μονάδες. Την 14^η μέρα η έκφραση φαίνεται μηδενική με μείωση της έκφρασης στο μηδέν. Ομοίως, τις μέρες 14, 17 και 21 η έκφραση του YS1 στα φύλλα είναι μηδενική. Μικρή εξαίρεση είναι η 17^η μέρα όπου παρατηρείται πολύ μικρή έκφραση με σχετικό λόγο 0,012, η οποία όμως είναι πολύ μικρή και μη επαναλαμβανόμενη για να θεωρηθεί ως σχετική αύξηση της έκφρασης από την 14^η στην 17^η ημέρα.



Διάγραμμα Γ.9.1.1: Σχετική έκφραση του μεταφορέα YS1 για το υπέργειο φυτών που έχουν αναπτυχθεί σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Στο ριζικό η συσσώρευση των μεταγραφημάτων την 9^η μέρα είναι 19,91, η οποία ακολουθείται από μια αυξημένη σχετική έκφραση με ελάχιστη τιμή 1,99 και μέγιστη 47,23 μονάδες. Η ποσοστιαία αύξηση των μεταγραφημάτων για την μέγιστη τιμή είναι 57,8%. Η αύξηση της 14^{ης} ημέρας ακολουθείται από μείωση που οδηγεί σε μηδενική έκφραση για το μεταφορέα τις μέρες 17 και 21. Εφόσον είναι μηδενική η έκφραση τη μέρα 21, εύκολα συμπεραίνεται ότι η μεταβολή στη συσσώρευση των μεταγραφημάτων από τη μέρα 17 στη μέρα 21 είναι 0%.

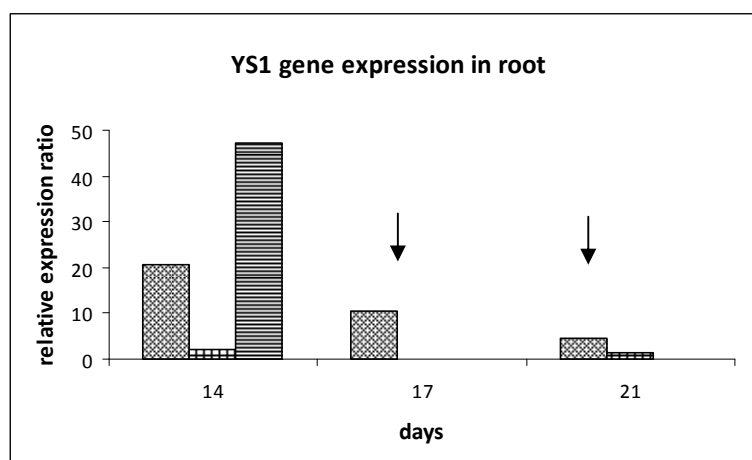


Διάγραμμα Γ.9.1.2: Σχετική έκφραση του μεταφορέα YS1 για το ριζικό φυτών που έχουν αναπτυχθεί σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Γενικά, παρατηρείται ότι στις μέρες του πειράματος 17^η και 21^η δεν υπάρχει συσσώρευση μεταγραφημάτων για τα φυτά που έχουν επάρκεια θρεπτικών συστατικών. Όσο νωρίτερα γίνεται η δειγματοληψία και όσο νεαρότερα είναι τα φυτά που αναπτύσσονται, τόσο υπάρχει ισχυρότερη έκφραση του μεταφορέα σιδήρου-φυτοσιδηροφόρου.

Γ.9.2 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του YS1 στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Τα φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο παρουσιάζουν συσσώρευση των μεταγραφημάτων του YS1 με διαφορετικό τρόπο. Στο υπέργειο των νεαρών φυτών αραβοσίτου η ανίχνευση της σχετικής έκφρασης του μεταφορέα σιδήρου-φυτοσιδηροφορου δεν έδωσε σήμα. Δηλαδή ο λόγος της σχετικής έκφρασης του YS1 ως προς το γονίδιο αναφοράς είναι μηδενικός.



Διάγραμμα Γ.9.2.1: Σχετική έκφραση του μεταφορέα YS1 για το ριζικό φυτών που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Έτσι, παρατηρείται ότι δεν ανιχνεύεται έκφραση του μεταφορέα σε επίπεδο μεταγραφημάτων για το υπέργειο φυτών αραβοσίτου που έχουν αναπτυχθεί αρχικά σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό ελλειμματικό σε θείο.

Στη ρίζα για την ημέρα 14 και ημέρα 0 της μεταχείρισης με -S η συσσώρευση του mRNA του YS1 για την ισχυρότερη έκφραση είναι 40,23 μονάδες. Βιολογικές επαναλήψεις του ίδιου δείγματος, επίσης, δίνουν εύρος από 1,99 έως 20,49 μονάδες σχετικής έκφρασης. Σε κάθε περίπτωση ο αριθμητικός μέσος των επαναλήψεων για την 14^η μέρα είναι 23,24 και είναι σαφώς υψηλότερος από την ανιχνευόμενη έκφραση για την 17^η μέρα, που είναι 10,52. Η διαφορά αυτή μεταφράζεται ποσοστιαία σε μείωση κατά 77,7% των μεταγραφημάτων από την ισχυρότερη έκφραση της 14^{ης} μέρας.

Για την ημέρα 21, η έκφραση του μεταφορέα παρουσιάζεται και πάλι μειωμένη. Δεδομένου του ότι η ισχυρότερη τιμή για τη συσσώρευση του mRNA του μεταφορέα δεν ξεπερνάει τις 4,64 μονάδες, μπορεί να σημειωθεί μείωση κατά 55,8%. Η μικρότερη τιμή για το λόγο σχετικής έκφρασης την 21^η μέρα είναι μόλις 0,12 ενώ η τρίτη επανάληψη ανιχνεύει έκφραση στα επίπεδα του 1,43. Σε κάθε περίπτωση ανιχνεύεται έκφραση του μεταφορέα την 21^η μέρα, ακόμα και αν αυτή βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δ. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η κατανομή του σιδήρου καθώς επίσης και η γονιδιακή έκφραση του μεταφορέα yellow stripe 1 που εμπλέκεται στη μεταφορά του σιδήρου από το περιβάλλον της ρίζας στο κυτταρόπλασμα των επιδερμικών κυττάρων. Η παρουσία του σιδήρου μελετήθηκε ιστοχημικά με τη χρώση Perl και ποσοτικοποιήθηκε με χειρισμό με DCB. Η μελέτη έγινε σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν με υδροπονικό σύστημα σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο καθώς και σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και αφορούσε σε ορισμένα επίπεδα το ριζικό σύστημα και σε άλλα, το σπόρο, τη ρίζα και το υπέργειο ως ξεχωριστά πεδία μελέτης.

Δ.1 Κατανομή του σιδήρου.

Η κατανομή του σιδήρου σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο. Για το σπόρο, φαίνεται ένα ομαλό άδειασμα καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης των νεαρών control φυτών με τα επίπεδα Fe να βρίσκονται στα 0,155 μmol μέχρι 0,028 μmol. Μη αναμενόμενη είναι η αύξηση που γίνεται την 19^η και την 21^η ημέρα με τα επίπεδα του σιδήρου να φτάνουν στα 0,428 μmol. Σε συνδυασμό με δεδομένα που δείχνουν αύξηση της ποσότητας του P (Κανελλόπουλος, 2010) για τις τελευταίες μέρες του πειράματος, μπορεί να συζητηθεί το ενδεχόμενο της επανακινητοποίησης στοιχείων στο σπόρο. Επειδή, όμως υπάρχουν δεδομένα για συσσώρευση μεταλλικών και άλλων εναποθέσεων στην επιφάνεια της ρίζας (Armstrong et al. 1967, Barlett et al. 1961, Bienfait et al. 1985, Hansel et al. 2001, Zhang 1999) θα μπορούσε να θεωρηθεί βάσιμη η άποψη της δημιουργίας εναποθέσεων σιδήρου και φωσφόρου στην επιφάνεια του σπόρου και στο μικροπεριβάλλον του. Αυτή η θεώρηση έρχεται σε συμφωνία με τα οπτικά ευρήματα της εργασίας αυτής όσον αφορά την παρουσία σιδήρου στην επιφάνεια των φυτικών ιστών του σπόρου, σε μορφή «δικτύου». Η χρώση έδωσε απόθεση prussian blue σε τμήματα της επιφάνειας του σπόρου, που δείχνει την παρουσία εναποθέσεων σιδήρου, ακόμα και μετά από διαδοχικά ξεπλύματα.

Για το υπέργειο η κατανομή του σιδήρου δίνει μια καμπύλη η οποία ξεκινά από συγκεντρώσεις σιδήρου 0,005 μmol για την 3^η ημέρα και αυξάνεται ομαλά μέχρι τα 0,338 μmol Fe για την 19^η μέρα. Αξιοσημείωτη είναι η πτώση του περιεχομένου σε σίδηρο την 21^η μέρα. Παράλληλα, υπάρχουν αναφορές που υποδεικνύουν ότι οι εναποθέσεις σιδήρου στην επιφάνεια της ρίζας λειτουργούν παρεμποδιστικά στη δράση της πρόσληψης στοιχείων όπως ο φωσφόρος με φορά από τη ρίζα στο υπέργειο (Bienfait et al. 1985, Christensen et al. 1998). Όταν, λοιπόν, ο σχηματισμός των εναποθέσεων έχει γίνει διακριτός στο ριζικό σύστημα,

δηλαδή αρκετά μετά τη βλάστηση του σπόρου, είναι πιθανό να δημιουργούνται περιορισμοί στην πρόσληψη του σιδήρου και του φωσφόρου που έχουν προσροφηθεί στις εναποθέσεις σιδήρου, αφού οι εναποθέσεις δημιουργούν ένα οριοθετημένο μικροπεριβάλλον.

Παράλληλα, η κατανομή του σιδήρου στη ρίζα ξεκινάει από τιμές της τάξης του 0,005 $\mu\text{mol Fe}$ για τις μέρες πριν την εφαρμογή του θρεπτικού διαλύματος (7^η μέρα) ενώ μετά την 9^η μέρα παρατηρούνται τιμές που φτάνουν μέχρι 2 μmol ενώ την 21^η μέρα η συγκέντρωση του σιδήρου φτάνει στα 7,6 $\mu\text{mol Fe}$. Το γεγονός αυτής της μεγάλης αύξησης του σιδήρου στη ρίζα εγείρει ερωτήματα για το πόσο πραγματικά αυτός ο σίδηρος αποτελεί περιεχόμενο της ρίζας. Δεδομένου ότι και οι άλλες δειγματοληψίες του ίδιου πειράματος έχουν υποστεί τους ίδιους χειρισμούς δεν μπορεί να υποτεθεί ότι η παρουσία του σιδήρου οφείλεται σε μη υπολογίσιμους παράγοντες. Έτσι, μπορεί να θεωρηθεί ότι αυτός ο σίδηρος υπάρχει ως εναποθέσεις στην επιφάνεια των κυττάρων της ρίζας. Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τις εναποθέσεις σιδήρου στα ριζικά συστήματα φυτών που αναπτύσσονται μέσα σε νερό και σχηματίζουν μορφές πλάκας σιδήρου (Hansel et al. 2001).

Η επίδραση του χειρισμού με $-S$ στη ρίζα, δεν φαίνεται να προκαλεί ισχυρές διαφοροποιήσεις του περιεχόμενου σε σίδηρο στα control φυτά. Για κάποιες δειγματοληψίες παρατηρείται υψηλότερος σίδηρος στα $-S$ φυτά απ' ότι στα control αλλά αυτό το πρότυπο είναι ασθενές και μη επαναλαμβανόμενο. Η ίδια συμπεριφορά συναντάται και στο σπόρο, με τα $-S$ φυτά να ακολουθούν το πρότυπο των control. Σημαντική διαφοροποίηση διαφαίνεται για το υπέργειο φυτών που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες. Συγκεκριμένα, ο περιεχόμενος σίδηρος στο υπέργειο (φύλλα και βλαστός) είναι λιγότερος στα $-S$ φυτά απ' ότι στα control. Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με ευρήματα (Astolfi et al. 2006, Astolfi et al. 2011) όπου αναφέρεται μια θετική συσχέτιση του μειωμένου θείου με την πρόσληψη μειωμένου σιδήρου. Η κατάσταση αυτή ερμηνεύεται σύμφωνα με τους παραπάνω από το γεγονός ότι χαμηλό περιεχόμενο σε θείο, σημαίνει και χαμηλή βιοσύνθεση μεθειονίνης, η οποία είναι το πρόδρομο μόριο της βιοσύνθεσης των φυτοσιδηροφόρων. Έτσι, μειωμένα φυτοσιδηροφόρα οδηγούν σε μειωμένο σίδηρο στο υπέργειο μέρος του φυτού (Astolfi et al. 2010)

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα του σιδήρου που βρίσκεται εξωτερικά των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας, έγινε χειρισμός με DCB. Σύμφωνα με τον Chen et al. (2006) το sodium dithionite είναι ισχυρός αναγωγικός παράγοντας παρουσία διαλύματος sodium bicarbonate και ανάγει το ιόν του σιδήρου από Fe^{3+} σε Fe^{2+} . Παράλληλα, το κιτρικό νάτριο (sodium nitrate) συμπλοκοποιεί τον Fe^{2+} (και

το Al^{3+}). Έτσι, παρουσία και των τριών χημικών γίνεται η απομάκρυνση των εναποθέσεων σιδήρου από την επιφάνεια του ριζικού συστήματος.

Τα δεδομένα για τη συγκέντρωση του σιδήρου μετά το χειρισμό με DCB είναι ιδιαίτερα διαφοροποιημένα από αυτά που προκύπτουν για τον σίδηρο χωρίς χειρισμό στη ρίζα. Συγκεκριμένα, στη ρίζα ο σίδηρος ξεκινά από 0,006 μmol για την 3^η μέρα και καταλήγει σε 0.05 μmol Fe για την 21^η μέρα του πειράματος, ακολουθώντας μια ομαλή αυξητική πορεία. Συγκρίνοντας τα δεδομένα των δύο χειρισμών παρατηρούμε ότι τα επίπεδα του περιεχόμενου σιδήρου στη ρίζα για το χειρισμό με DCB είναι πολύ χαμηλότερα από τα αντίστοιχα χωρίς κάποιον χειρισμό. Για την 19^η ημέρα η διαφορά αυτή ανέρχεται σε 89,9 % ενώ για τη μέρα 21 σε 99,2%. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν την ύπαρξη εναποθέσεων σιδήρου στο περιβάλλον της ρίζας. Αυτές οι εναποθέσεις δείχνουν την πολυπλοκότητα του περιβάλλοντος της ριζόσφαιρας στη διεπιφάνεια με τη ρίζα και σε υδροπονικές καλλιέργειες που δεν υπάρχουν αστάθμητοι παράγοντες, όπως στο έδαφος (πχ. μικροβιακό φορτίο).

Την ίδια συμπεριφορά του σιδήρου χωρίς και με χειρισμό DCB βρίσκουμε και για το υπέργειο και τον σπόρο. Συγκεκριμένα, στο σπόρο ο σίδηρος μετά από χειρισμό με DCB μπορεί να παρουσιαστεί ελαττωμένος μέχρι και 88,1% την 13^η μέρα ενώ για τις άλλες μέρες και όπου υπάρχει στατιστική διαφορά δεν διαφέρει λιγότερο από 73%. Αυτό το γεγονός ενισχύει τις υποψίες μας για σχηματισμό εναποθέσεων σιδήρου στην επιφάνεια και στο περιβάλλον του σπόρου, το οποίο δεσμεύει οξείδια του σιδήρου χωρίς να είναι σαφές αν αργότερα συνεισφέρει με αυτόν τον τρόπο στη θρέψη του φυτού με το μικροστοιχείο αυτό, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα.

Στο υπέργειο, οι διαφορές που παρατηρούνται είναι μικρότερες αφού ο χειρισμός είναι μετά την απομάκρυνση των φυτών από την υδροπονία. Παρόλα αυτά, ο σίδηρος που ανιχνεύθηκε στα φυτά που έχουν υποστεί χειρισμό με DCB είναι λιγότερος. Αυτό μπορεί να ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η εκχύλιση του σιδήρου από το ριζικό των φυτών, εμπειρείχε και ποσότητα σιδήρου που βρίσκεται στο σπόρο, το μεσοκοτύλιο και τη βάση του στελέχους του φυτού. Έτσι, συγκριτικά με την κατανομή χωρίς χειρισμό ο σίδηρος φαίνεται μειωμένος αφού έχει αφαιρεθεί το ποσοστό του σιδήρου των περιοχών αυτών.

Τα φυτά που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο, όταν γίνεται χειρισμός με DCB δεν ακολουθούν την ίδια συμπεριφορά με αυτά που δεν έχουν υποστεί χειρισμό με DCB. Έτσι, για τη ρίζα (Διάγραμμα Γ.2.2.1), ενώ στην πρώτη κατανομή ο σίδηρος στο χειρισμό με -S είναι περισσότερος, όταν γίνεται χειρισμός με DCB φαίνεται πως ο σίδηρος που υπάρχει στη ρίζα και όχι στο περιβάλλον της είναι άλλοτε περισσότερος, άλλοτε λιγότερος και άλλοτε δεν διαφοροποιείται. Υπάρχουν δεδομένα που αναφέρουν μια θετική συσχέτιση των

εναποθέσεων σιδήρου και του περιεχομένου σε θείο στους φυτικούς ιστούς (Hu et al. 2007), που σημαίνει ότι θα έπρεπε οι εναποθέσεις σιδήρου να είναι ενισχυμένες παρουσία θείου. Τα ίδια συμπεράσματα προκύπτουν και για τον σπόρο.

Στο υπέργειο, παρατηρείται ότι ισχύει η αντίστροφη σχέση από αυτήν που έχει προταθεί νωρίτερα όπου η επίδραση της $-S$ μεταχείρισης γίνεται αισθητή στα φύλλα, με αυξημένο περιεχόμενο σε σίδηρο. Στα φύλλα όμως, η επίδραση γίνεται αισθητή, ίσως μέσω της βιοσύνθεσης της νικοτιαναμίνης που αποτελεί μόριο-κλειδί για τη μεταφορά του σιδήρου από κύτταρο σε κύτταρο.

Είναι σημαντικό γενικά, να σημειωθεί ότι το πρότυπο της συμπεριφοράς του κάθε χειρισμού ανά τις δειγματοληψίες είναι περίπου το ίδιο. Εκεί που διαφοροποιούνται οι χειρισμοί είναι τα επίπεδα των συγκεντρώσεων του προσδιοριζόμενου σιδήρου.

Η επίδραση του χειρισμού με $-S$ μπορεί να καταδείξει τα σωστά επίπεδα του σιδήρου κατά τους δύο χειρισμούς, αφού απομακρύνει το σίδηρο που υπάρχει ως ελεύθερη δεξαμενή στο περιβάλλον της ρίζας (Bienfait et al. 1985). Έτσι, ο χειρισμός με sodium dithionite έδειξε ότι ο σίδηρος είναι λιγότερος μετά το χειρισμό κάτι που ενισχύει την άποψη για εναποθέσεις σιδήρου, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα. Στο υπέργειο (Διάγραμμα Γ.3.2.2) φαίνεται να υπάρχουν σοβαρές διαφοροποιήσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι δεξαμενές δεν υπάρχουν μέσα στο φυτό, αλλά μόνο στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας, όπου ευνοείται ο σχηματισμός τους. Στο σπόρο υπάρχουν διαφοροποιήσεις (είναι κι αυτός μέρος του περιβάλλοντος της ριζόσφαιρας ιδιαίτερα στην υδροπονική καλλιέργεια) που όμως διαφοροποιούνται εναλλάξ, όσον αφορά το υψηλότερο περιεχόμενο σε σίδηρο.

Στη ρίζα (Διάγραμμα Γ.3.2.1) ο σίδηρος που ανιχνεύεται μετά από χειρισμό με DCB είναι ξεκάθαρα λιγότερος από αυτόν που ανιχνεύεται όταν δεν γίνεται απομάκρυνση του σιδήρου του περιβάλλοντος της ριζόσφαιρας, γεγονός που δηλώνει καθαρά την παρουσία εναποθέσεων σιδήρου και στα $-S$ τροφοπενικά φυτά. Γενικά, ο σίδηρος της κατανομής μετά από χειρισμό με DCB είναι μειωμένος σε σχέση με αυτόν των φυτών που δεν έχουν υποστεί χειρισμό για τα $-S$ φυτά. Αυτό υποδηλώνει την παρουσία εναποθέσεων και στο σπόρο.

Η προσπάθεια συσχέτισης του σιδήρου που εκχυλίστηκε από τους ιστούς και του σιδήρου που ανιχνεύθηκε επιφανειακά της ρίζας, έδωσε αξιόλογα αποτελέσματα. Έτσι, για τα control φυτά (Διάγραμμα Γ.4.1), βρέθηκε ότι στις δειγματοληψίες όπου ο σίδηρος που εκχυλίζεται με διάλυμα DCB είναι χαμηλότερος από τον αντίστοιχο που υπολογίζεται ως η διαφορά του σιδήρου που υπάρχει στο φυτό χωρίς χειρισμό μείον τον σίδηρο που υπάρχει μετά από χειρισμό με DCB. Έτσι, τις μέρες 9, 11, 13 ο σίδηρος που προκύπτει για τις εναποθέσεις από τη διαφορά που αναφέραμε είναι περισσότερος ενώ για τις μέρες 15, 17, και 19 ισχύει το αντίθετο. Αυτό το φαινόμενο ίσως να ερμηνεύεται από το γεγονός ότι

στον σίδηρο που εκχυλίζεται με DCB συνυπάρχει και ο σίδηρος του σπόρου και της βάσης του στελέχους που δεν προσμετράται στον προσδιορισμό του σιδήρου στους ριζικούς ιστούς. Ενώ για τις μέρες 9, 11 και 13 αυτό το ποσοστό του σιδήρου δεν είναι σημαντικό, οπότε ο σίδηρος που εκχυλίζεται από το DCB δεν είναι περισσότερος, τις μέρες 15, 17, 21 ο σίδηρος των εναποθέσεων του σπόρου και της βάσης του στελέχους είναι αρκετός ώστε να αλλάζει η φορά της υπεροχής. Η ίδια ερμηνεία ενδεχομένως να ισχύει και για τα -S φυτά (Διάγραμμα Γ.4.2), όπου άλλοτε φαίνεται να υπερέχει ο σίδηρος της εκχύλισης DCB και άλλοτε ο σίδηρος που προκύπτει για τις εναποθέσεις από τη σχέση I των αποτελεσμάτων. Τελικά, και στις δύο περιπτώσεις (C/-S) φαίνεται ότι το πρότυπο αλλάζει ανά τρεις ημέρες.

Δ.2 Συσχέτιση της ξηρής μάζας και του περιεχομένου της σε σίδηρο

Επιχειρώντας συσχέτιση της ξηρής μάζας και του περιεχομένου της σε σίδηρο προκύπτουν ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Αρχικά, το ξηρό βάρος του υπέργειου και του σπόρου ανάμεσα στις μεταχειρίσεις για την κατανομή χωρίς χειρισμό και κατανομή μετά από DCB δεν προκύπτει διαφορετικό. Διαφορετική όμως προκύπτει η ξηρή μάζα για τη ρίζα ανάμεσα στους δύο χειρισμούς. Δεδομένου ότι το DCB απομακρύνει συστατικά του εξωτερικού περιβάλλοντος της ρίζας, είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί το ποσοστό που κατέχει ο σίδηρος σε αυτά τα συστατικά σε σχέση με την ξηρή μάζα της ρίζας χωρίς χειρισμό.

Από τη 13^η μέρα και μετά όταν αρχίζουν να διαφοροποιούνται τα δεδομένα για τις δύο μεταχειρίσεις, οι ξηρές μάζες των φυτών που έχουν υποστεί χειρισμό με DCB είναι από 23% μέχρι 63% χαμηλότερες από τις αντίστοιχες που δεν έχουν απομακρυνθεί συστατικά με DCB. Η συμμετοχή του σιδήρου για τα control φυτά σε αυτές τις διαφορές αυξάνεται όσο προχωρούν οι πειραματικές ημέρες. Έτσι, ενώ για όλες τις μέρες πριν την 11^η ημέρα η συμμετοχή του σιδήρου δεν ήταν μεγαλύτερη από 0,4 mg (0,004 %), από την 13^η ημέρα και μετά η συμμετοχή του σιδήρου αυξάνεται για να φτάσει την 21^η μέρα να είναι 261 mg Fe (0,29 %).

Για τα -S φυτά η κατάσταση είναι διαφορετική. Συγκεκριμένα, η συμμετοχή του σιδήρου δεν αυξάνεται με την πάροδο των ημερών του πειράματος, αλλά μειώνεται γεγονός που υποδεικνύει ότι η έλλειψη θείου στις ρίζες, μειώνει την πρόσληψη σιδήρου σε σχέση με τα control φυτά. Η βιβλιογραφία (Astolfi et al. 2003, Bouranis et al. 2003) αναφέρει ότι τέτοια σχέση υπάρχει για τα φύλλα των φυτών που έχουν τροφοπενία θείου, όμως εδώ γίνεται σαφής η αντίστοιχη σχέση των δύο στοιχείων και στη ρίζα. Τα αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευτούν αν λάβουμε υπόψη μας ότι για την πρόσληψη του σιδήρου σπουδαίο ρόλο έχουν τα φυτοσιδηροφόρα (PS) των οποίων πρόδρομο μόριο της βιοσύνθεσης είναι η μεθειονίνη. Έτσι, το φυτό εκκρίνει την μειωμένη ποσότητα φυτοσιδηροφόρων

(Zuchi et al. 2011) και λιγότερος σίδηρος συμπλοκοποιείται και μπαίνει μέσα στα κύτταρα της ρίζας από του μεταφορείς YSL.

Δ.3 Χαρτογράφηση της χρώσης Perl για το ριζικό του *Zea mays* σε control και -S συνθήκες.

Η μακροσκοπική μελέτη του ριζικού συστήματος του καλαμποκιού φαίνεται να έχει ένα κοινό σημείο μελέτης για όλους τους χειρισμούς: η ρίζα φαίνεται να είναι βαμμένη σε όλο το μήκος της εκτός από κάποια εκατοστά του άκρου. Αυτά τα εκατοστά διαφέρουν από χειρισμό σε χειρισμό αλλά και από μέρα σε μέρα, χωρίς όμως να είναι απόλυτα μετρήσιμη αυτή η διαφοροποίηση αφού η χρώση δε σταματάει απότομα, απλά εξασθενεί μέχρι να μην υπάρχει στο ακρορίζιο καθόλου χρωστική. Το Prussian blue σε όλες, επίσης, τις περιπτώσεις εμφανίζεται την 9^η μέρα, δηλαδή μετά την εφαρμογή του θρεπτικού διαλύματος στην υδροπονία.

Για τις πρωτογενείς ρίζες το ποσοστό της χρώσης ξεκινάει από 86% και φτάνει μέχρι και 93% χωρίς να είναι βαθμιαία η αύξηση με την πάροδο των ημερών, αλλά σχετικά ακανόνιστα. Για τις μέρες 15^η και 17^η φαίνεται να είναι μεγαλύτερο το ποσοστό της επιφάνειας που εμφανίζει Prussian blue, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι οι εναποθέσεις σιδήρου ξεκινούν μετά την 11^η μέρα. Για το -S τα ποσοστά ξεκινούν από 61% μέχρι 92% με μεγαλύτερο ποσοστό κάλυψης την 15^η και την 17^η μέρα, όπως και στα control φυτά.

Για τις δευτερογενείς ρίζες, το ποσοστό της βαμμένης επιφάνειας έχει μικρότερο εύρος. Αποτελεί το 81%-88% του μήκους της ρίζας και δεν διαφοροποιείται ιδιαίτερα από μέρα σε μέρα. Για το χειρισμό με -S τα φυτά παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά χρώσης, με ποσοστά που κυμαίνονται από 74%-83%. Παρατηρείται, λοιπόν ότι, οι δευτερογενείς ρίζες φαίνεται να είναι ομοιόμορφα βαμμένες με το ποσοστιαίο άβαφο μέρος να μην ξεπερνάει το 18% του μήκους της ρίζας. Ίδια συμπεριφορά παρουσιάζουν και οι βλαστογενείς ρίζες, που έχουν προλάβει τα παρουσιαστούν μέχρι την 21^η μέρα.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι εναποθέσεις σιδήρου τείνει να εμφανίζεται στα παλαιότερα μέρη του φυτού και όχι ενεργά ακρορίζια και ριζικά τριχίδια (Chen et al. 1980). Μάλιστα, αναφέρεται (Zucchi et al. 2011) ότι τα φυτοσιδηροφόρα εκκρίνονται από το ακρορίζιο και από εκεί απελευθερώνονται στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας. Με βάση αυτές τις διαπιστώσεις και τα παραπάνω δεδομένα, μπορεί να θεωρηθεί ότι οι περιοχές με prussian blue αποτελούν περιοχές που υπάρχουν εναποθέσεις σιδήρου και χαρτογραφούν την κατανομή της. Τα ακρορίζια, τα οποία δεν εμφανίζουν χρώση, είναι πιθανό να μην αφήνουν τον σίδηρο να σχηματίσει εναποθέσεις, αλλά να τον δεσμεύουν άμεσα και να τον μεταφέρουν στο εσωτερικό

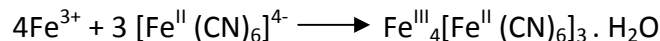
της ρίζας, μέσω των YSL μεταφορέων, αφήνοντας την επιφάνεια των επιδερμικών κυττάρων του ακροριζίου καθαρή από εναποθέσεις σιδήρου.

Παράλληλα, το γεγονός ότι η χρώση παρατηρείται από την 9^η μέρα και μετά, εγείρει υποψίες ότι οι εναποθέσεις σιδήρου αρχίζουν να σχηματίζονται μετά την εφαρμογή του σιδήρου στο θρεπτικό διάλυμα και όταν αυτός βρίσκεται σε περίσσεια.

Δ.4 Χρώση ολόκληρου του ριζικού συστήματος σε σχέση με το διαφορετικό θρεπτικό περιεχόμενο των χειρισμών.

Μια προσέγγιση της παρουσίας εναποθέσεων σιδήρου στη ρίζα είναι και η συνολική χρώση του ριζικού συστήματος. Ενώ, ο περιεχόμενος σίδηρος που μετράται από την ατομική απορρόφηση δείχνει υπεροχή του ενός χειρισμού σε σχέση με τον άλλο, αυτό δε συμβαίνει και με την ιστοχημική χρώση Perl.

Γενικά είναι γνωστό ότι η χρωστική αντιδρά κατά προτίμηση με τρισθενή σίδηρο (Fe^{3+}) αλλά είναι δυνατό να αντιδρά και με δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) (Roschztardt et al. 2009). Τα ιόντα Fe^{3+} με σιδηροκυανιούχα ιόντα παρέχουν ίζημα με βαθύ κυανό χρώμα, το σιδηροκυανιούχο σίδηρο, $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, γνωστό ως "κυανού του Βερολίνου" (prussian blue):



Τα ιόντα Fe^{2+} με το ίδιο αντιδραστήριο δηλ. τα ιόντα $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, παρέχουν μόνο λευκό ίζημα ή ελαφρώς γαλάζιο, λόγω της αναπόφευκτης παρουσίας μικρών ποσοτήτων ιόντων Fe^{3+} στο διάλυμα των ιόντων Fe^{2+} . Αυτή είναι μια χαρακτηριστική διαφορά μεταξύ των ιόντων Fe^{2+} και Fe^{3+} .

Δ.5 Στερεοσκοπική παρατήρηση των εναποθέσεων σιδήρου στην επιφάνεια της ρίζας.

Η στερεοσκοπική παρατήρηση έδωσε ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες οπτικές στο θέμα των εναποθέσεων σιδήρου στο περιβάλλον της ρίζας φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε περιβάλλον υδροπονίας. Οι εναποθέσεις συναντώνται στη ρίζα και εμφανίζονται ως εναιωρήματα, βλέννες και λεπτά «φύλλα» σιδήρου πάνω στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας, καθώς επίσης και ως διακριτές μορφές «δικτύου» πάνω στην επιφάνεια του σπόρου, του μεσοκοτυλίου και της βάσης του βλαστού.

Τα «φύλλα» που εμφανίζονται πάνω στις φυτικές επιφάνειες, φαίνεται πως αποτελούν απλές εναποθέσεις. Συγκεκριμένα, σε κάποιες περιοχές που έχει απομακρυνθεί το «φύλλο» των εναποθέσεων του σιδήρου, είναι δυνατόν να

εμφανιστούν τα επιδερμικά κύτταρα χωρίς να έχουν υποστεί κάποιον τραυματισμό. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τη δομή της πλάκας σιδήρου (Hansel et al. 2001) και ενισχύει την άποψη ότι το περιβάλλον της ριζόσφαιρας είναι πιθανόν να υποστηρίζει τέτοιες δομές. Μάλιστα, αναφέρεται και η *in vitro* επαγωγή της πλάκας σιδήρου που γίνεται με EDTA-Fe, χημική ένωση που περιλαμβάνεται στα χημικά που απαρτίζουν τα θρεπτικά της υδροπονίας (Chen et al. 2006).

Παράλληλα, τα ριζικά τριχίδια σε πολλές περιπτώσεις είναι ιδιαίτερα βαμμένα, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία Fe^{3+} στην επιφάνειά τους. Μελέτες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης έδειξαν ότι η ανάπτυξη των ριζικών τριχιδίων είναι άριστη για το *Phragmites australis* ενώ παρατηρήθηκε ότι αυτά ήταν καλυμμένα με εναποθέσεις σιδήρου (Batty et al. 2002). Οι φωτογραφίες της στερεοσκοπικής παρατήρησης της παρούσας μελέτης ενισχύουν αυτά τα δεδομένα, στον βαθμό που μπορούν να συγκριθούν οι δύο τεχνικές, και στηρίζουν την άποψη που υποστηρίζει την παρουσία πλάκας σιδήρου στις ρίζες του αραβοσίτου σε υδροπονική καλλιέργεια.

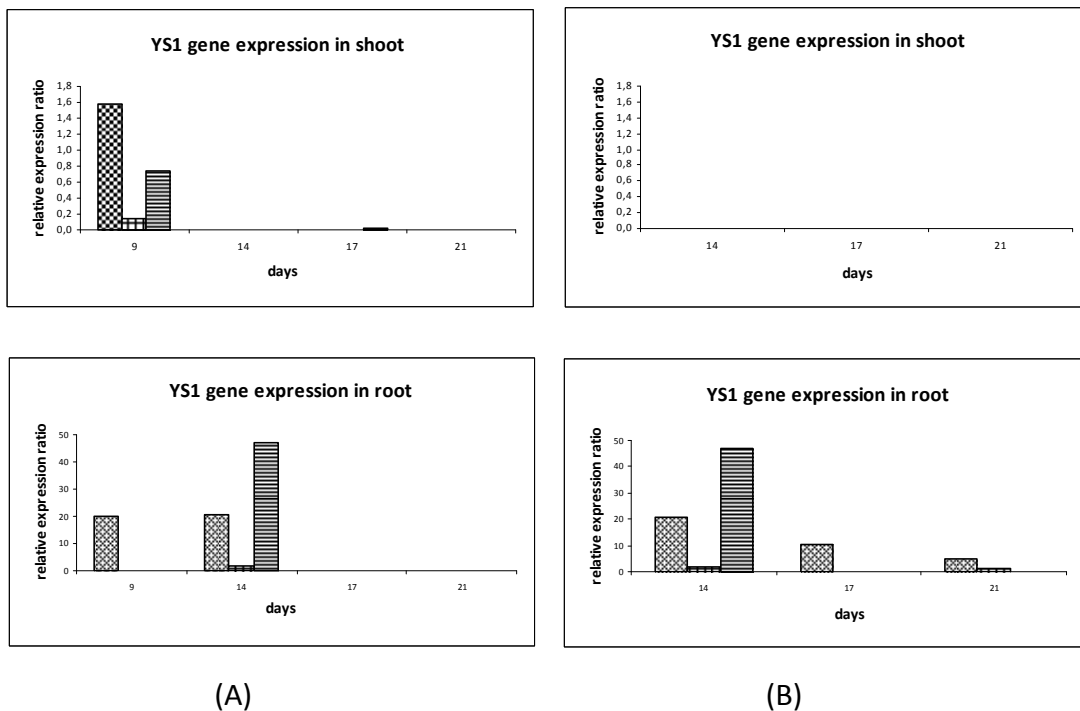
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση της χρώσης της βλέννας του ακροριζίου στην οποία αποδίδονται και άλλες λειτουργίες εκτός από τον εφοδιασμό της ρίζας με θρεπτικά. Το δίκτυο που εμφανίζουν οι εναποθέσεις σιδήρου ενισχύει την άποψη που θέλει τις εναποθέσεις ως όριο και φραγμό για την προστασία της ρίζας από ισχυρά οξειδωτικά μόρια ή βαρέα μέταλλα (Chen et al. 2006, Providisa et al. 2009).

Δ.6 Μελέτη της έκφρασης του YS1 στον αραβόσιτο.

Δ.6.1 Μελέτη της έκφρασης του μεταφορέας σε φυτά καλαμποκιού που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Σε αυτή την ενότητα διερευνήθηκε ο τρόπος με τον οποίο εκφράζεται ο μεταφορέας Fe-PS με την ονομασία YS1 σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Για τις ρίζες των φυτών που έχουν αναπτυχθεί σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα η έκφραση του μεταφορέα φαίνεται να είναι ισχυρή μόνο για τις πρώτες μέρες της εφαρμογής του θρεπτικού διαλύματος. Συγκεκριμένα, έκφραση ανιχνεύεται στην 9^η και 14^η μέρα, δηλαδή κατά τις μέρες στις οποίες η έκπτυξη νέων φύλλων και η αύξηση της βιομάζας του φυτού είναι εμφανής. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα δεδομένα ότι η έκφραση του μεταφορέα επάγεται όταν υπάρχει ανάγκη μεταφοράς του σιδήρου στους ιστούς (Curie et al. 2001, Koike et al. 2004, Murata et al. 2006).



Εικόνα Δ.6.1: Σχετική γονιδιακή έκφραση για το υπέργειο και ριζικό φυτών αραβοσίτου που έχουν αναπτυχθεί σε (A) πλήρες θρεπτικό διάλυμα και (B) σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Λαμβάνοντας υπόψη το αναπτυξιακό στάδιο μπορούμε να πούμε ότι νωρίτερα από την 14^η μέρα, οι ιστοί του υπέργειου εμφανίζουν έντονη ζήτηση σε Fe με αποτέλεσμα να ζητείται η παραγωγή μεταγραφημάτων που θα καλύψουν τις ανάγκες σε μεταφορά Fe-PS.

Όταν οι ανάγκες αυτές καλυφθούν δεν παρατηρείται άλλη έκφραση και φαίνεται να καταστέλλεται η παραγωγή των mRNA του μεταφορέα στη ρίζα. Η κατασταλαμένη έκφραση δε σημαίνει ότι παύει να λειτουργεί ο μεταφορέας, αλλά ότι το φυτό δεν παράγει μεταγραφήματα για την παραγωγή καινούριων μεταφορέων.

Στο υπέργειο έκφραση ανιχνεύεται μόνο την 9^η μέρα δηλαδή πολύ νωρίς μόλις 2 ημέρες μετά την εφαρμογή του θρεπτικού διαλύματος. Φαίνεται πως το φυτό επάγει την έκφραση του YS1 με αποτέλεσμα να παράγονται οι απαραίτητοι μεταφορείς. Αφού παραχθούν οι μεταφορείς που χρειάζεται το φυτό, δεν φαίνεται να παράγονται πάλι mRNA του μεταφορέα, που σημαίνει ότι τη δεδομένη στιγμή δεν χρειάζεται καινούριους μεταφορείς.

Για τα φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο δεν ανιχνεύεται έκφραση στο υπέργειο. Αντίθετα, η έκφραση του μεταφορέα για τα -S φυτά, σε σχέση με τα control φυτά, είναι σαφώς διαφοροποιημένη. Η μηδενική

έκφραση για το μεταφορέα τις μέρες 17 και 21 στο control αντικαθίσταται στα –S φυτά από μια έκφραση της τάξης των 10,52 μονάδων για την 17^η μέρα και των 2,06 μονάδων για την 21η μέρα. Αυτό το γεγονός ενισχύει την άποψη ότι η τροφопενία θείου επάγει την μεταγραφή του μεταφορέα YS1 για να καλύψει τις ανάγκες σε Fe στο υπέργειο των φυτών.

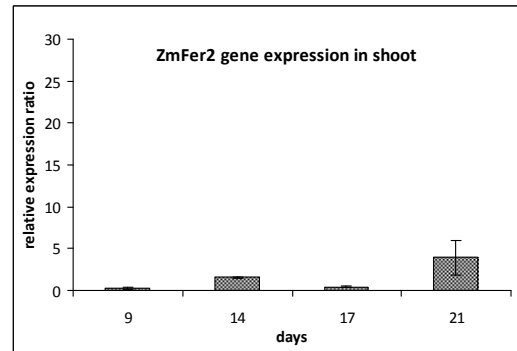
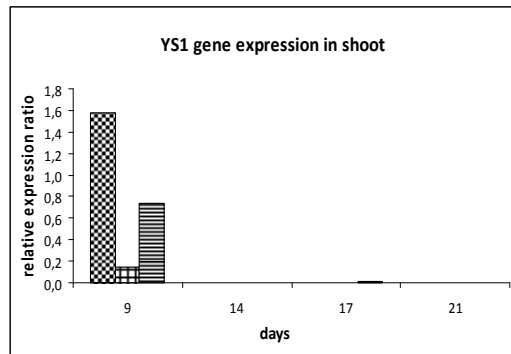
Δ.6.2 Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης του μεταφορέα YS1 και της γονιδιακής έκφρασης των φερριτινών στον αραβόσιτο.

Οι φερριτίνες είναι πρωτεΐνες που προστατεύουν οξειδωτικά το κύτταρο από την οξείδωση του σιδήρου μέσω της αντίδρασης Fenton, όταν αυτός συσσωρεύεται σε μεγάλη ποσότητα. Βασικό ρόλο σε αυτή τη διεύθυνση φαίνεται να έχει η ZmFer1 η οποία εκφράζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα φύλλα (Chorianopoulou et al. 2011).

Σε φυτά αραβοσίτου που έχουν αναπτυχθεί σε υδροπονική καλλιέργεια πλήρους θρεπτικού διαλύματος παρατηρείται ότι στη χρονοσειρά των γεγονότων, το φυτό προκαλεί την παραγωγή του μεταφορέα YS1 και μετά την πρωτεϊνοσύνθεση οι μεταφορείς μπορούν να φέρουν μέσα στο κύτταρο το σύμπλοκο Fe-NA ή Fe-PS. Η δραστηριότητα αυτή, καθώς δεν υπάρχουν ακόμα δεδομένα για έλεγχο λειτουργίας του μεταφορέα κάτω από διάφορες συνθήκες, συσσωρεύει σίδηρο στο κύτταρο του ιστού με αποτέλεσμα να σχηματίζει φερριτίνες.

Παρατηρείται επίσης ότι υπάρχει έκφραση για τον μεταφορέα YS1 μόνο την 9^η μέρα, ενώ τις επόμενες μέρες 14, 17, 21 δεν ανιχνεύεται κάποιο σήμα των μεταγραφημάτων. Αντίθετα, το mRNA της ZmFer1 εκφράζεται ασθενώς την 9^η μέρα με εναλλασσόμενο ασθενές και ισχυρό σήμα τις 14^η, 17^η και 21^η μέρα.

Η συνεχής έκφραση και των δύο τύπων φερριτινών υποδηλώνει τη συνεχή λειτουργία του μεταφορέα. Έτσι, συνεχής μεταφορά σιδήρου στο κυτταρόπλασμα συνεπάγεται συνεχή παραγωγή mRNA φερριτινών. Παρατηρείται ακόμα, ότι τα επίπεδα των μεταγραφημάτων του μεταφορέα είναι πολύ πιο χαμηλά από τα επίπεδα μεταγραφής κυρίως της ZmFer1 αλλά σε περιπτώσεις και της ZmFer2. Αυτό ίσως να ερμηνεύεται από το γεγονός ότι ο μεταφορέας αποτελείται από περίπου 12-14 διαμεμβρανικά domains που συγκροτούνται σε 2 υπομονάδες ενώ οι φερριτίνες αποτελούνται από 24 υπομονάδες. Έτσι, η ποσότητα των mRNA που απαιτείται για τη δημιουργία μίας φερριτίνης είναι πολύ περισσότερη από αυτήν που απαιτείται για τον μεταφορέα.

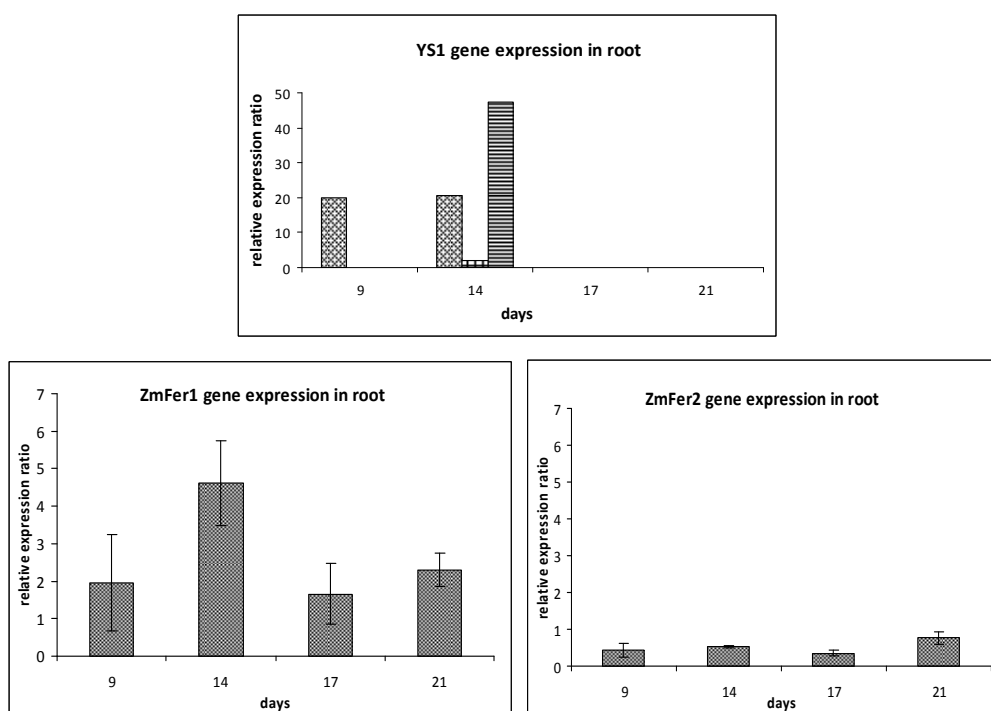


Διάγραμμα : Σχετική γονιδιακή έκφραση του YS1 και η αντίστοιχη έκφραση των ZmFer1 και ZmFer2 (Καζίλα 2010) για το υπέργειο control φυτών αραβοσίτου.

Στη ρίζα η έκφραση του YS1 είναι σχετικά υψηλή κατά την 9^η και 14^η μέρα. Αυτό το γεγονός δείχνει ότι η διάταξη του μεταφορέα στη ρίζα πρέπει να είναι πιο πυκνή, διότι αθροιστικά παρουσιάζονται περισσότερα μεταγραφήματα από τα φύλλα. Η ρίζα συνεχίζει να παράγει μεταγραφήματα και την 14^η μέρα με σχετική έκφραση 23,24 δηλαδή με 96% μεγαλύτερη συχνότητα από τα φύλλα. Έτσι, ο σίδηρος που μπαίνει από ένα μμ² από τη ρίζα είναι περισσότερος από αυτόν που διακινείται ανά μονάδα επιφάνειας στα φύλλα. Όσον αφορά την οξειδωτική προστασία αυτού του σιδήρου με σχηματισμό φερριτινών, φαίνεται πως δεν υπάρχει. Έτσι, εφόσον δεν παρατηρείται ισχυρό οξειδωτικό στρες συμπεραίνεται ότι ο σίδηρος που προσλαμβάνεται μεταφέρεται άμεσα στο υπέργειο. Αυτό ενισχύεται από τα δεδομένα των μεταγραφημάτων των φερριτινών όπου στη ρίζα είναι χαμηλότερα από τα φύλλα, και έτσι διαφαίνεται η τάση του φυτού να κινητοποιεί τον προσλαμβανόμενο σίδηρο προς το υπέργειο, χωρίς να σχηματίζει φερριτινικές δομές στη ρίζα.

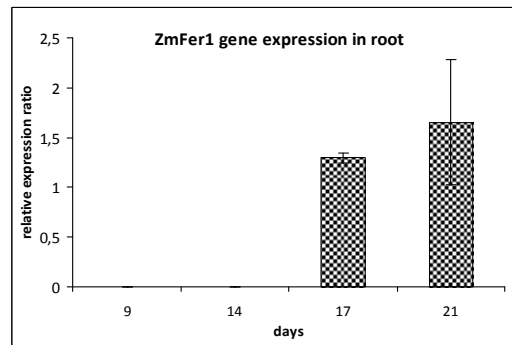
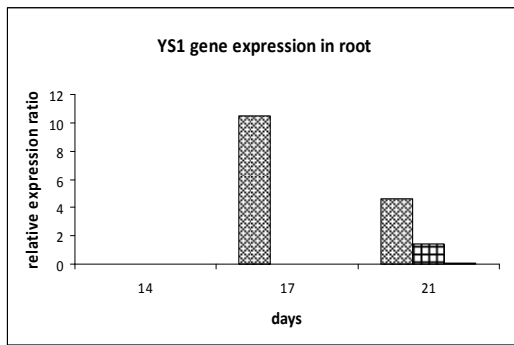
Για το υπέργειο των φυτών που έχουν αναπτυχθεί υπό συνθήκες έλλειψης θεικών δεν ανιχνεύεται έκφραση του ZmYS1 ενώ υπάρχει σημαντική έκφραση και των δύο φερριτινών. Αυτά τα δεδομένα οδηγούν στην υπόθεση ότι απουσία σιδήρου δεν μπορούν να συντεθούν νέα μόρια νικοτιαμίνης που συμπλοκοποιούν τον σίδηρο και τον μεταφέρουν μέσω των μεταφορέων YSL. Επομένως νέα σύνθεση YSL μεταφορέα δεν είναι χρήσιμη. Σε αυτήν την περίπτωση

φαίνεται να λαμβάνει τη σκυτάλη το κιτρικό. Το κιτρικό συμπλοκοποιεί τον σίδηρο και τον μεταφέρει ενδοκυτταρικά χωρίς να χρησιμοποιεί τους YSL μεταφορείς (Curie et al. 2001, Schaaf et al. 2004). Έτσι, ενώ ο σίδηρος διακινείται και η σύνθεση νέων φερριτινών φαίνεται να είναι αναγκαία, δεν υπάρχει έκφραση του ZmYS1.



Διάγραμμα : Σχετική γονιδιακή έκφραση του YS1 και η αντίστοιχη έκφραση των ZmFer1 και ZmFer2 (Καζίλα 2010) για τη ρίζα control φυτών αραβοσίτου.

Αντίθετα, η έκφραση του YS1 στη ρίζα –S φυτών είναι σημαντική. Ενώ τη 14^η μέρα που δεν υπάρχει καμία έλλειψη στο θρεπτικό διάλυμα των φυτών η έκφραση του μεταφορέα είναι μηδενική, τη 2^η μέρα του χειρισμού –S έχει επανεργοποιηθεί ο μηχανισμός παραγωγής mRNA για τον ZmYS1, έκφραση που διαρκεί μέχρι και την 21^η μέρα με μικρότερη όμως συχνότητα. Μελέτες αναφέρουν ότι απόρροια της μείωσης των θεικών στο θρεπτικό διάλυμα είναι η μείωση των φυτοσιδηροφόρων που εκκρίνονται από τη ρίζα για να συμπλοκοποιήσουν τον Fe³⁺ (Zucchi et al. 2011). Επομένως η έκκριση των φυτοσιδηροφόρων είναι μειωμένη. Προκειμένου να είναι εφικτή η μετακίνηση όσο γίνεται περισσότερων φυτοσιδηροφόρων φαίνεται πως η ρίζα προωθεί την σύνθεση περισσότερων YS1 στα επιφανειακά κύτταρά της. Η αύξηση των μεταγραφμάτων των φερριτινών και ιδιαίτερα της ZmFer2 υποδηλώνει επιτυχημένη μεταφορά του συμπλόκου Fe-PS στο εσωτερικό της ρίζας και σύνθεση φερριτινών για αποφυγή οξειδωτικών αντιδράσεων στο κυτταρόπλασμα.



Διάγραμμα : Γονιδιακή έκφραση του YS1 και η αντίστοιχη έκφραση των ZmFer1 και ZmFer2 (Καζίλα 2010) για τη ρίζα φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο.

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ε. Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία οδήγησε στα παρακάτω συμπεράσματα:

Για την κατανομή του σιδήρου:

1. Μέρος του σιδήρου εναποτίθεται στην επιφάνεια της ρίζας και δεν αποτελεί περιεχόμενο των φυτικών ιστών.
2. Το περιεχόμενο σε σίδηρο των φυτών που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο είναι μικρότερο από αυτών που έχουν αναπτυχθεί σε πλήρες.
3. Ο χειρισμός με DCB απομακρύνει ποσότητα σιδήρου από την επιφάνεια της ρίζας.
4. Για τα φυτά που έχουν αναπτυχθεί σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα το περιεχόμενο σε σίδηρο αυξάνεται όσο αυξάνεται και η βιομάζα του φυτού.
5. Για τα φυτά που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο ο περιεχόμενος σίδηρος μειώνεται όσο αυξάνεται η βιομάζα του φυτού.

Για την χρώση Perl:

1. Η περιοχή του ακροριζίου παραμένει άβαφη κατά τη χρώση Perl.
2. Το Prussian blue εμφανίζεται μετά την εφαρμογή σιδήρου στο θρεπτικό διάλυμα.
3. Οι εναποθέσεις σιδήρου αρχίζουν να εμφανίζουν prussian blue μετά τα 60 min από την εφαρμογή του σιδήρου στο θρεπτικό διάλυμα.
4. Η ένταση της χρώσης ενδεχομένως να αντανακλά την έντονη ή ασθενή παρουσία του του Fe^{3+} τοπικά.

Στερεοσκοπική παρατήρηση των εναποθέσεων σιδήρου:

1. Οι εναποθέσεις που ανιχνεύονται στη ρίζα έχουν τη μορφή εναιωρημάτων, βλεννών και λεπτών υμενίων που επικάθονται στα επιδερμικά κύτταρα.
2. Οι εναποθέσεις δεν εισέρχονται μέσα στα επιδερμικά κύτταρα, διότι σε περίπτωση απομάκρυνσής τους φαίνονται τα επιδερμικά κύτταρα.
3. Τα ριζικά τριχίδια βιάφονται έντονα με τη χρώση.

Έκφραση του ZmYS1 στον αραβόσιτο:

1. Έκφραση του μεταφορέα ανιχνεύθηκε μόνο τις πρώτες μέρες της εφαρμογής του θρεπτικού διαλύματος στο υπέργειο για τα control φυτά.

2. Στο υπέργειο των φυτών που εμφανίζουν τροφοπενία θείου δεν συσσωρεύεται καθόλου mRNA του μεταφορέα.
3. Στη ρίζα των control φυτών ο μεταφορέας εκφράζεται μέχρι την 14^η μέρα, ενώ στη ρίζα -S φυτών ο μεταφορέας εκφράζεται και τις 17^η και 21^η μέρα.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ALDRICH S, SCOTT W, LENG E. 1975.** Modern Corn Production. 2nd edition, A. & L. Publications, Illinois.
- ALI N, BERNAL M P, ATER M. 2002.** Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant and Soil* **239**: 103–111.
- ALTSCHUL S, MADDEN T, SCHÄFFER A, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W. LIPMAN D. 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389–3402
- ARMSTRONG W AND BOATMAN D. 1967.** Some field observations relating to growth of bog plants to conditions of soil aeration. *J. Ecol.* **55**: 101-110.
- ASTOLFI S, ZUCHI S, CESCO S, SANITADI TOPPI L, PIRAZZI D, BADIANI M, VARANINI Z, PINTON R. 2006.** Fe deficiency induces S-supply to S-deficient barley plants restored their capability to cope with Fe shortage sulphate uptake and modulates redistribution of reduced sulphur pool in barley plants. *Functional Plant Biology* **33**: 1055–1061.
- ASTOLFI S, ZUCHI S, HUBBERTEN H-M, PINTON R, HOEFGEN R. 2010.** Supply of sulphur to S deficient young barley seedlings restores their capability to cope with iron shortage. *J. Exp. Bot.* (3) **61**: 799–806. doi: 10.1093/jxb/erp346.
- ASTOLFI S, ZUCHI S, PASSERA C, CESCO S. 2003.** Does the sulphur assimilation pathway play a role in the response to Fe deficiency in maize (*Zea mays* L.) plants? *Journal of Plant Nutrition* **26**: 2111–2121. doi: 10.1081/PLN-120024268.
- BARTLETT J. 1961.** Iron Oxidation Proximate To Plant Roots *Soil Sci.*, **92**, 372-379.
- BATTY C, BAKER M, WHEELER D. 2002.** Aluminum and phosphate uptake by *Phragmites australis*: the role of Fe, Mn and Al root plaques. *Annals of Botany* **89**: 443–449.
- BATTY L, BAKER M, WHEELER D, CURTIS D. 2000.** The effect of pH and plaque on the uptake of Cu and Mn in *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel. *Annals of Botany* **86**: 647–653.
- BERGMANN L, RENNENBERG H 1993.** Glutathione metabolism in plants. In ‘Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants’. (L.J. DeKok, I. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold and W.E. Rauser, eds), pp. 109-123, SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands.
- BIENFAIT F. 1985.** Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (2) **17**: 73- 83.
- BORUM J, SAND-JENSEN K, BINZER T, PEDERSEN O, GREVE M. 2006.** Oxygen movement in seagrass. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M. (Eds.), Seagrass:

- BOURANIS D, CHORIANOPOULOU S, PROTONOTARIOS V, SIYANNIS V, HOPKINS L, HAWKESFORD M. 2003.** Leaf response of young iron inefficient maize plants to sulfur deprivation. *Journal of Plant Nutrition* **26**: 1189–1202. doi: 10.1081/PLN-120020364.
- BRIAT JF, CURIE C, GAYMARD F. 2007.** Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**: 276–282.
- BRIAT JF. 2009.** New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals of Botany*. **105**:811-822.
- BRUSSLAN A, TOBIN M. 1992.** Light independent developmental regulation of cab gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7731-7795.
- CHEN C, DIXON B, TURNER T. 1980.** Iron coatings on rice roots: morphology and models of development. *Soil Science Society of American Journal* **44**: 1113–1119.
- CHEN R, SHEN R, GU R, DONG X, DU C, MA J. 2006.** Response of Rice (*Oryza sativa*) with Root Surface Iron Plaque Under Aluminium Stress. *Annals of Botany* **98**: 389–395, 2006 doi:10.1093/aob/mcl110.
- CHORIANOPOULOU S.N., M. DIMOU, C. KAZILA, P. MANIOU, P. KATINAKIS, D.L. BOURANIS (2011),** Expression of ferritins ZmFer1 and ZmFer2 genes in shoots and roots of S-deprived young maize plants. In: Proceedings of the International Plant Sulfur Workshop (De Kok L.J., Rennenberg H. and Hawkesford M.J., Series Editors), vol. “Sulfur Metabolism in Plants: Mechanisms and Application to Food Security, and Responses to Climate Change” (De Kok L.J., Tausz M., Hawkesford M.J., Höfgen R., McManus, M.T., Norton R.M., Rennenberg H., Saito K., Schnug E. and Tabe L., Eds), in press.
- CHRISTENSEN K, ANDERSEN O, JENSEN S. 1997.** Comparison of iron, manganese, and phosphorus retention in freshwater littoral sediment with growth of *Littorella uniflora* and benthic microalgae. *Biogeochemistry* **38**: 149–171.
- CHRISTENSEN K, SAND-JENSEN K, ANDERSEN O, WIGAND C, HOLMER, M. 1998.** Interferences between root plaque formation and phosphorus availability for
- CURIE C, BRIAT JF. 2003.** Iron transport and signalling in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* **54**: 183–206.
- CURIE C, CASSIN G, COUCH D, DIVOL F, HIGUCHI K, LE JEAN M, MISSON J, SCHIKORA A, CZERNIC P AND MARI St. 2009.** Metal movement within the plant: contribution of nico-tianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* **103**: 1–11, doi:10.1093/aob/mcn207.
- CURIE C, PANAVIENE Z, LOULERGUE C, DELLAPORTAS S, BRIAT JF AND WALKER E. 2001.** Maize *yellow stripe 1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*. (409) **18**: 346-349.

- CVITANICH C, PRZYBYŁOWICZ W J, URBANSKI D, AJURKIEWICZ, MESJASZ-PRZYBYŁOWICZ J, BLAIR M, ASTUDILLO C, JENSEN E, STOUGAARD J. 2010.** Iron and ferritin accumulate in separate cellular locations in Phaseolus seeds, *BMC Plant Biology* **10**: 26.
- DEKOK J AND STULEEN. 1993.** Role of glutathione in plants under oxidative stress. In 'Sulphur Nutrition and Assimilation in Higher Plants'. (L.J. DeKok, I. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold and W.E. Rauser, eds), pp. 125-138, SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands.
- DIDONATO R, ROBERTS L, SANDERSON T, EISLEY R, WALKER E. 2004.** Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *The Plant Journal* **39**: 403–414.
- DIJKSHOORN W AND VAN WIJK L. 1967.** The sulphur requirement of plants as evidenced by the sulphur-nitrogen ratio in the organic matter. A review of published data. *Plant and Soil* **26**: 129-157.
- DUNCAN G, HESKETH D. 1968.** Net photosynthetic rates and leaf numbers of 22 races of maize grown at eight temperatures. *Crop Science* **8**: 670-674.
- ERIKSEN J, NIELSEN M, MORTENSEN V, SCHJØRRING K. 2001.** Redistribution of sulphur during generative growth of barley plants with different sulphur and nitrogen status. *Plant Soil* **230**: 239–246.
- ESAU K. 1965** Plant anatomy, 2nd edition. New York: John Wiley and Sons.
- FELDMAN L. 1994.** The maize root. In: Freeling M, Walbot V, eds. The maize handbook. New York: Springer 29-37.
- GREEN M, ETHERINGTON J. 1977.** Oxidation of Ferrous Iron by Rice (*Oryza sativa* L.) Roots: a Mechanism for Waterlogging Tolerance. *Journal of Experimental Botany* (28) **3**: 678-690.
- GREIPSSON S. 1994.** Effects of iron plaque on roots of rice on growth and metal concentration of seeds and plant tissues when cultivated in excess copper. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **25**:2761-2769.
- HANSEL M, FENDORF S, SUTTON S, NEWVILLE M. 2001.** Characterization of Fe plaque and associated metals on the roots of mine-waste impacted aquatic plants. *Environmental Science and Technology* **35**: 3863-3868.
- HARADA E, SUGASE K, NAMBA K, IWASHITA T, MURATA Y. 2007.** Structural element responsible for the Fe(III)-phytosiderophore specific transport by HvYS1 transporter in barley. *FEBS Letters* **581**: 4298–4302.
- HOGARTH T, PETER J. 1999.** Magrovs Biology. Oxford University Press. p.228 ISBN 0198502222.
- HOPPE C, MCCULLY E, WENZEL L. 1986.** The nodal roots of Zea: their development in relation to structural features of the stem. *Canadian Journal of Botany* **64**: 2524-2537.

- HU Z, ZHU Y, LI M, ZHANG L, CAO Z, SMITH F. 2007.** Sulfur (S)-induced enhancement of iron plaque formation in the rhizosphere reduces arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Environmental Pollution* **147**: 387-393.
- isoetids in sediments of oligotrophic lakes. *Biogeochemistry* **43**: 107–128.
- JONES R AND ETHERINGTON R 1973.** Comparative studies of plant growth and distribution in relation to waterlogging. The uptake of phosphorus by dune and dune slack plants. *J. Ecol.* **61**: 109-116.
- JUAREZ T, TWIGG W, TIMMERMANS P. 2004.** Specification of adaxial cell fate during maize leaf development. *Development* **131**: 4533–4544.
- KIESSELBACH A. 1950.** Progressive development and seasonal variations of the corn crop. *Nebraska Agriculture Experiment Station Research Bulletin* **166**: 22-45
- KOCH S, MENDELSSOHN A, 1989.** Sulphide as soil phytotoxin: differential responses in two marsh species. *J. Ecol.* **77**: 565–578.
- KOIKE S, INOUE H, MIZUNO D, TAKAHASHI M, NAKANISHI H, MORI S. 2004.** OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *The Plant Journal* **39**: 415–424.
- LEE B. 1993.** Control of net uptake of nutrients by regulation of influx in barley plants recovering from nutrient deficiency. *Ann. Bot.* **72**: 223-230.
- LEVAN A, RIHA J. 1986.** The precipitation of black oxide coatings on flooded conifer roots of low internal porosity. *Plant and soil* **95**: 33-42.
- LEVITT J. 1980.** Responses of plants to environmental stresses, 2nd ed. Vol.2, Academic Press, New York.
- LIU J, ZHU Y, SMITH A, SMITH E. 2004.** Do phosphorus nutrition and iron plaque alter arsenate (As) uptake by rice seedlings in hydroponic culture? *New Phytologist* **162**: 481–488.
- London, UK, pp 255-265.
- LYNCH M, LINTILHAC M. 1997.** Mechanical signals in plant development! a new method for single cell studies. *Dev Biol* **181**: 246-256.
- MARSCHNER H. 1995.** Mineral nutrition of Higher Plants. 2nd edition. Academic Press, Biology, Ecology and Conservation. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 255–270.
- MASUDA T, GOTO F, YOSHIHARA T. 2001.** A novel plant ferritin subunit from soybean that is related to a mechanism in iron release. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 19575–19579.
- MCCULLY E, CANNY J. 1988.** Pathways and processes of water and nutrient movements in roots. *Plant Soil* **111**: 159-170.
- MILLS A, JONES B. 1996.** Plant analysis handbook II. MicroMacro Publishing Inc., Athens, Georgia, USA, pp 30-35.
- MORI S. 1999.** Iron acquisition in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 250-253.

- MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ELRICH H. 1986.** Specific enzymatic amplification DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51**: 263-273.
- MULLIS K, FALOONA F. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 345-350.
- MURATA Y, MA F, YAMAJI N, UENO D, NOMOTO K, IWASHITA T. 2006.** A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *The Plant Journal* **46**: 563–572.
- OTTE L, DEKKERS J, ROZEMA J, BROEKMAN A. 1991.** Uptake of arsenic by *Aster tripolium* in relation to rhizosphere oxidation. *Can J Bot* **69**: 2670-2677.
- OTTE L, ROZEMA J, KOSTER L, HAARSMA S, BROEKMAN A. 1989.** Iron plaque on roots of *Aster tripolium*, L: interaction with zinc uptake. *New Phytol.* **111**: 309-317.
- PFÄFFL W. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: 45.
- POVIDISA K, DELEFOSSE M, HOLMER M. 2009.** The formation of iron plaques on roots and rhizomes of the seagrass *Cymodocea serrulata* (R. Brown) Ascherson with implications for sulphide intrusion. *Aquatic Botany* **90**: 303–308.
- ROBERTS A, PIERSON J, PANAVIENE Z, WALKER E. 2004.** Yellow stripe1: expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. *Plant Physiology* **135**: 112–120.
- ROSCHZTARTDTZ H, CONEJERO G, CURIE C, MARI S. (2009)** Identification of the Endodermal Vacuole as the Iron Storage Compartment in the Arabidopsis Embryo. *Plant Physiology* **151**: 1329–1338.
- RUIJTER J, RAMAKERS C, HOOGAARS W, KARLEN Y, BAKKER O, VAN DEN HOFF M, MOORMAN A 2009.** Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* **6**: 45.
- SAND-JENSEN K, PEDERSEN O, BINZER T, BORUM J. 2005.** Contrasting oxygen dynamics in the freshwater isoetid *Lobelia dortmanna* and the marine seagrass *Zostera marina*. *Ann. Bot.* **96**: 613–623.
- SASS E. 1955.** Vegetative morphology. In: *Corn Improvement* (G.F. Sprague, ed.). Academic Press, New York 63-87.
- SASS E. 1977.** Morphology. In: Sprague GF, ed. *Corn and corn improvement*. Madison: *American Society of Agronomy Publishers* 89-110.
- SCHAAF G, LUDEWIG U, ERENOGLU E, MORI S, KITAHARA T, VON WIREN N. 2004.** ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 9091–9096.
- SCHAAF G, SCHIKORA A, HABERLE J, VERT GA, LUDEWIG U, BRIAT JF, ET AL. 2005.** A putative function of the Arabidopsis Fe-Phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis. *Plant and Cell Physiology* **46**: 762–774.
- SHAW T. 1955.** Potassium movements in washed erythrocytes. *Journal of Physiology* **129**: 464-475.

- ST.-CYR L, CROWDER A. 1999.** Mn and Cu in the root plaque of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Soil Sci* **149**:191–198.
- STACEY M, PATEL A, McCLAIN W, MATHIEU M, REMLEY M, ROGERS E, GASSMANN W, BLEVINS D, STACEY G. 2008.** The Arabidopsis AtOPT3 Protein Functions in Metal Homeostasis and Movement of Iron to Developing Seeds *Plant Physiology*, **146**: 589–601.
- TANAKA A, LOE R, NAVASERO A. 1966.** Some mechanism in involved in the development of iron toxicity symptoms in the rice plant. *Soil Sci. Plant Nutr.* **12**: 158-164.
- TOMATI U, GALLI E. 1979.** Water stress and -SH-dependent physiological activities in young maize plants. *Journal of Experimental Botany* **30**: 557-563.
- UENO D, YAMAJI N AND MA J. 2009.** Further characterization of ferric—phytosiderophore transporters ZmYS1 and HvYS1 in maize and barley. *Journal of Experimental Botany* (60) **12**: 3513–3520.
- VARNEY G, CANNY M. 1993.** Rates of water uptake into the mature root system of maize plants. *New Phytology* **123**: 775-786
- VON WIREN N, MORI S, MARSCHNER H, ROMHELD V. 1994.** Iron inefficiency in maize mutant *ys1* (*Zea mays* L. cv Yellow-Stripe) is caused by a defect in uptake of iron phytosiderophores. *Plant Physiology* **106**: 71–77.
- WANG L, CANNY J, McCULLY E. 1991.** The water status of the roots of soil-grown maize in relation to the maturity of their xylem. *Physiology Plantarum* **82**: 157-162.
- WANG L, McCULLY E, CANNY J. 1994.** The branch roots of *Zea*. IV. The maturation and openness of xylem conduits in first-order branches of soil-grown roots. *New Phytologist* **126**: 21-29.
- WANG T, PEVERLY H. 1999.** Fe oxidation states on root surfaces of a wetland plant (*Phragmites australis*). *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**: 247–252.
- WATERS M, CHU H, DIDONATO J, ROBERTS A, EISLEY B, LAHNER B, ET AL. 2006.** Mutations in Arabidopsis yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiology* **141**: 1446–1458.
- WATERS M, GRUSAK A. 2008.** Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in Arabidopsis thaliana ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line *ysl1ysl3*. *New Phytology* **177**: 389–405.
- YAMASHITA T, UENO C. 1992.** Embryo und Wurzelentwicklung bei *Coix lacrymajobi* L. (Gramineae). *Flora* **187**: 79-101.
- YAMASHITA T. 1991.** Ist die Primarwurzel bei Samenpflanzen exogen oder endogen? Beitrage. *Biologie der Pflanzen* **66**: 371-391.
- YEN R, TSENG H, SAIER J. 2001.** Maize Yellow Stripe1, an iron phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. *Microbiology* **147**: 2881–2883.

- ZHANG K, ZHANG S AND MAO R. 1996.** Effect of root iron plaque on zinc uptake by rice plant. *Chinese Acta Appl. Ecol.* **7**: 262-266.
- ZHANG X, ZHANG F AND MAO D 1999.** Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): Phosphorus uptake, *Plant and Soil* **209**: 187–192.
- ZOHLEN AND TYLER. 1997.** Effect of root iron plaque on zinc uptake by rice plant. *Chinese Acta Appl. Ecol.* **7**: 262- 266.
- ZUCHI S, CESCO S, ASTOLFI S. 2011.** High S supply improves Fe accumulation in durum wheat plants grown under Fe limitation, *Environmental and Experimental Botany* doi:10.1016/j.envexpbot.
- ΚΑΖΙΛΑ Χ. 2010.** Διερεύνηση του προτύπου έκφρασης των φερριτινών στον αραβόσιτο υπό συνθήκες έλλειψης θεικών, πτυχιακή μελέτη.
- ΚΑΝΕΛΛΟΠΟΥΛΟΣ Π. 2011.** Μελέτη της κατανομής φωσφόρου σε φυτά αραβοσίτου τα οποία αναπτύσσονται σε νερό και σε πλήρες και ελλειμματικό σε θειικά θρεπτικό διάλυμα, πτυχιακή μελέτη.
- ΚΑΡΑΜΑΝΟΣ Α. 1999.** Τα σιτηρά των θερμών κλιμάτων. Αραβόσιτος. Εκδόσεις Παπαζήση, σελ 21-36.