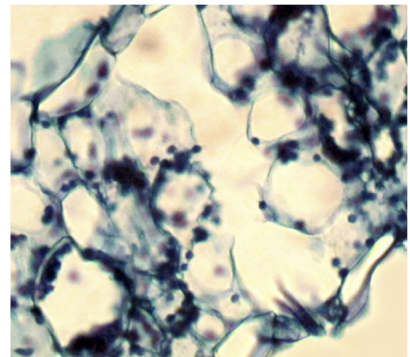
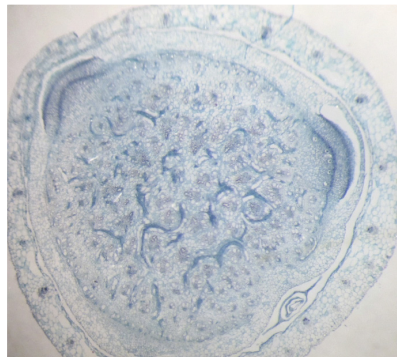
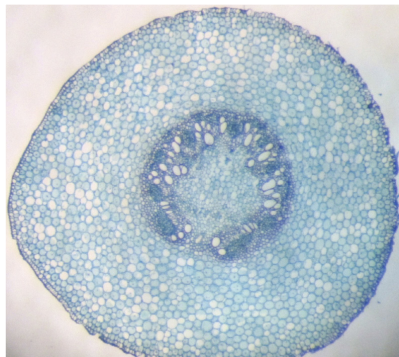
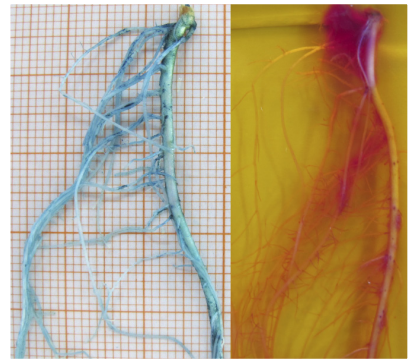
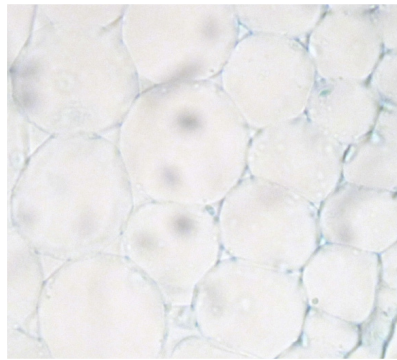
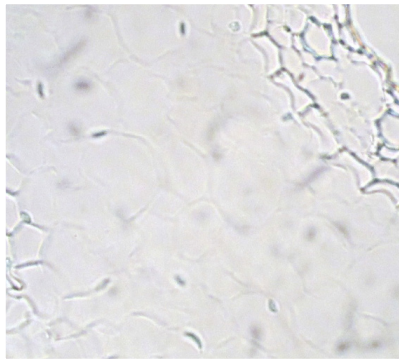


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Η ομοιόσταση του σιδήρου σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσονται υπό συνθήκες έλλειψης θείου



Φιλίππα Σ. Μανιού

Διδακτορική Διατριβή

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτριος Μπουράνης

Διδακτορική διατριβή

Η ομοιόσταση του σιδήρου σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσονται
υπό συνθήκες έλλειψης θείου

Φιλίππα Σ. Μανιού

Επιβλέπων: Καθηγητής Δημήτριος Μπουράνης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μπουράνης Δημήτριος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Χωριανοπούλου Στυλιανή, Λέκτορας Γ.Π.Α.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μπουράνης Δημήτριος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Καραμπουρνιώτης Γεώργιος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αϊβαλάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Σάββας Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Λιακόπουλος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Χωριανοπούλου Στυλιανή, Λέκτορας Γ.Π.Α.

Περίληψη

Η ομοιόσταση του θείου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ομοιόσταση του σιδήρου, αφενός, επειδή πρωτεϊνικά συστήματα τόσο της φωτοσύνθεσης όσο και της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων περιέχουν σύμπλοκα Fe-S και αφετέρου, επειδή ο αραβόσιτος, ως αγρωστώδες, ακολουθεί την στρατηγική II για την απορρόφηση του Fe. Η στρατηγική αυτή περιλαμβάνει τη βιοσύνθεση φυτοσιδηροφόρων τα οποία θα συμπλοκοποιήσουν τον σίδηρο με σκοπό την μεταφορά του μέσα στο φυτό. Η πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση αυτή είναι ένα θειούχο αμινοξύ, η μεθειονίνη. Με την παρούσα εργασία μελετήσαμε την κατανομή του σιδήρου και την ανακατανομή του μέσα στο φυτό καθώς και τις μορφολογικές και ανατομικές αλλαγές που παρατηρούνται σε όλα τα φυτικά όργανα υπό συνθήκες έλλειψης θείου, προκειμένου να μελετήσουμε τις επιπτώσεις της μεταχείρισης στα αποθέματα αποπ्लाσμικού σιδήρου. Για τη μελέτη αυτή φυτά αραβοσίτου αναπτύχθηκαν σε υδροπονική καλλιέργεια σε πειράματα μικρής (10 ημερών) και μεγάλης διάρκειας (26 ημερών). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα: σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε διάλυμα ελλειμματικό σε θειικά.

Αρχικά εξετάστηκε η κινητική της συσσώρευσης και της συγκέντρωσης του σιδήρου, του θείου και των θειικών στο φυτό και η κατανομή τους στο υπέργειο μέρος και στο ριζικό σύστημα στο χρονικό διάστημα των 26 ημερών. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών χάνουν σίδηρο από τη ρίζα κατά το δεύτερο δεκαήμερο, συνεχίζουν να συσσωρεύουν ολικό θείο σε μικρές ποσότητες τόσο σε υπέργειο όσο και σε ριζικό καθ' όλη την διάρκεια του πειραματικού και συνεχίζουν να αυξάνουν την ποσότητα θειικών σε μικρό ποσοστό στο υπέργειο όπου παραμένουν υπό την μορφή θειικών ιόντων. Η συσσώρευση του θείου στα φυτά της μεταχείρισης εξηγείται από το γεγονός ότι τα άλατα που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές θρεπτικών ιόντων, αν και αναλυτικής καθαρότητας, εντούτοις περιείχαν προσμίξεις θειικών, τα οποία απορροφήθηκαν από τα φυτά της μεταχείρισης.

Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη τη συνθετότητα της αρχιτεκτονικής του ριζικού συστήματος του αραβοσίτου σε συνδυασμό με τα παραπάνω ευρήματα μελετήθηκε η κινητική της κατανομής σιδήρου σε κάθε τύπο ρίζας υπό συνθήκες έλλειψης θειικών και το πως η τροφοπενία επηρέασε τον κάθε τύπο ρίζας από μορφομετική άποψη, εστιάζοντας στην 1^η ομάδα βλαστογενών ριζών γιατί αυτός ο τύπος ριζών εκπύσσεται κατά την ημέρα έναρξης της μεταχείρισης και αντιμετωπίζει από την αρχή την έλλειψη θειικών.

Από τα αποτελέσματα αποκαλύφθηκε ότι τα τροφοπενικά φυτά συσσωρεύουν σίδηρο σε όλους τους τύπους ριζών κατά το πρώτο δεκαήμερο και εμφανίζουν απώλεια σιδήρου από όλους τους τύπους ριζών κατά το δεύτερο δεκαήμερο της έλλειψης θειικών. Από την ποσότητα ολικού θείου που αυξάνεται στη ρίζα, αυτή κατανέμεται κυρίως στο εμβρυακό ριζικό σύστημα, ενώ ανά μονάδα ξηρής μάζας το ολικό θείο συσσωρεύεται εξίσου σε όλους τους τύπους ριζών. Η ποσότητα θειικών αυξάνεται κατά το πρώτο δεκαήμερο σε όλους τους τύπους ριζών ενώ μειώνεται το δεύτερο δεκαήμερο και κατανέμεται εξίσου σε όλους τους τύπους ριζών. Η έλλειψη θειικών επηρέασε αρνητικά τη ξηρή μάζα των βλαστογενών ριζών. Υπήρξαν γραμμικές συσχετίσεις ανάμεσα στην ξηρή μάζα, στο οργανικό θείο και στον ολικό σίδηρο που επενδύθηκαν στους διάφορους τύπους ριζών, με έμφαση στο εμβρυακό ριζικό σύστημα, ιδιαιτέρως κατά το 1^ο δεκαήμερο. Αντίθετα, κατά το 2^ο δεκαήμερο ο σίδηρος μειώθηκε δραματικά και ομοιόμορφα σε όλους τους τύπους ρίζας εκτός από την πρωτογενή, στην οποία η μείωση υπολείπετο κατά 8%.

Η αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος ενισχύθηκε σε διάφορα επίπεδα προκειμένου να αντιμετωπιστεί η σοβαρή έλλειψη θειικών. Αυτά περιελάμβαναν τροποποιήσεις στον αριθμό των ριζικών αξόνων των ομάδων ριζών, στο συνολικό μήκος τους, στην ξηρή μάζα που κατανεμήθηκε σε αυτές, στα τμήματα που

έφεραν τις πλάγιες ρίζες, στον αριθμό και στο μήκος των πλαγίων ριζών, στη δημιουργία αερεγχύματος για να υποστηριχθούν από πλευράς θρέψης αυτές οι πλάγιες και στην ενίσχυση του αγγειακού συστήματος για αποτελεσματικότερη μεταφορά.

Τα αποτελέσματα της ανίχνευσης και χαρτογράφησης των αποθέσεων σιδήρου στην επιφάνεια κάθε τύπου ρίζας έδειξαν ότι υπάρχουν αποθέσεις σιδήρου στην επιφάνεια της ρίζας, η κατανομή των αποθέσεων σιδήρου κατά μήκος του άξονα της ρίζας δεν είναι ομοιόμορφη, η κατανομή διαφέρει σε κάθε τύπο ρίζας και υπό συνθήκες έλλειψης θειικών περισσότερες αποθέσεις βρέθηκαν στο τμήμα της ρίζας που φέρει τις πλάγιες ρίζες. Η ξηρή μάζα των αποθέσεων μεταβάλλεται σε κάθε τύπο ρίζας κατά την διάρκεια του πειράματος και διαφοροποιείται από τον τύπο της ρίζας και από την τροφοπενία.

Από την απεικόνιση της μεταβολής του pH στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος η χρώση των διαφόρων τύπων ρίζας με το δείκτη pH bromocresol purple έδειξε ότι στις περισσότερες περιπτώσεις το τμήμα της ρίζας που ανιχνεύεται σίδηρος στην επιφάνεια του, έχει και μεγαλύτερο pH ($pH > 6$).

Η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου σιδήρου, του εξωτερικού (αποθέσεις σιδήρου) και στις περισσότερες περιπτώσεις του αποπλασμικού εκχυλίσμου σιδήρου σε κάθε τύπο ρίζας των φυτών -S είναι μικρότερη από την αντίστοιχη των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Στα φυτά -S, η ποσότητα του εσωτερικού σιδήρου, που προκύπτει από τη διαφορά του εξωτερικού και του αποπλασμικού από τον ολικό σίδηρο, αυξάνεται σε κάθε τύπο ρίζας το πρώτο δεκαήμερο ενώ μειώνεται το δεύτερο δεκαήμερο από όλους τους τύπους ριζών. Ο εσωτερικός σίδηρος είναι περισσότερος από τον συνολικό εκχυλίσμο σίδηρο (αποθέσεις και αποπλασμικός σίδηρος) στην πρωτογενή ρίζα στις δευτερογενείς ρίζες και στις ρίζες του μεσοκοτυλίου και λιγότερος στις βλαστογενείς ρίζες την 10^η ημέρα της μεταχείρισης και είναι περισσότερος μόνο στην πρωτογενή ρίζα και λιγότερος στους άλλους τύπους ριζών την 19^η ημέρα της μεταχείρισης.

Η μελέτη των κατανομών των ποσοτήτων σιδήρου, ολικού θείου και θειικών του συστήματος σπόρος-μεσοκοτύλιο-κόμβος αποκάλυψε ότι, υπό συνθήκες έλλειψης θειικών, τα φυτά συσσωρεύουν ολικό σίδηρο στο σπόρο, στο μεσοκοτύλιο και τον κόμβο κατά το πρώτο δεκαήμερο, ενώ εμφανίζουν απώλεια σιδήρου κατά το δεύτερο δεκαήμερο της έλλειψης θειικών. Στο σπόρο μειώνεται η ποσότητα ολικού θείου και θειικών ενώ στο μεσοκοτύλιο και το κόμβο αυξάνεται παρά την έλλειψη θειικών. Η έλλειψη θειικών επηρέασε αρνητικά τη ξηρή μάζα και το φαινότυπο του σπόρου-μεσοκοτυλίου-κόμβου.

Ως προς τα ανατομικά χαρακτηριστικά του μεσοκοτυλίου των φυτών -S, εντοπίστηκε αερέγχυμα σε τομές κοντά στο σπόρο, η επιφάνεια του οποίου αυξήθηκε κατά το δεύτερο δεκαήμερο και διαφοροποιήθηκε έναντι των φυτών-μαρτύρων καταλαμβάνοντας λιγότερη επιφάνεια αερεγχύματος την 17^η ημέρα και περισσότερη την 26^η ημέρα.

Από τα αποτελέσματα των κατανομών των ποσοτήτων σιδήρου, ολικού θείου και θειικών του φυλλώματος διαπιστώνεται ότι υπό συνθήκες έλλειψης θειικών τα φυτά συνεχίζουν να συσσωρεύουν σίδηρο στα φύλλα κατά τη διάρκεια του πειράματος, με περισσότερο σίδηρο να συσσωρεύεται στα κατώτερα φύλλα. Τα φυτά -S συνεχίζουν να συσσωρεύουν ολικό θείο το πρώτο δεκαήμερο, ενώ μειώνεται η ποσότητα ολικού θείου το δεύτερο δεκαήμερο και συνεχίζει να συσσωρεύεται μόνο στο 4^ο και 5^ο φύλλο. Η ποσότητα ολικού θείου φαίνεται να κατανέμεται κυρίως στα ανώτερα φύλλα το πρώτο δεκαήμερο, ενώ ανά g ξηρής μάζας κατανέμεται σχεδόν εξίσου σε όλα τα φύλλα. Η ποσότητα θειικών αυξάνεται στα κατώτερα φύλλα το πρώτο και μειώνεται το δεύτερο δεκαήμερο.

Ο ρυθμός διαπνοής των φυτών -S είναι μεγαλύτερος την 10^η ημέρα της μεταχείρισης και μικρότερος την 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες. Η ξηρή μάζα των ανώτερων φύλλων (ελασμάτων και κολεών) επηρεάζεται περισσότερο από την έλλειψη θειικών καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και το μήκος των ανώτερων φύλλων το δεύτερο δεκαήμερο. Η

φυλλική επιφάνεια τόσο των ελασμάτων όσο και των κολεών των φυτών -S είναι μεγαλύτερη την 10^η ημέρα της έλλειψης και μικρότερη την 19^η ημέρα της έλλειψης σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες.

Η συσχέτιση της ξηρής μάζας με την αντίστοιχη επιφάνεια των φύλλων έδειξε ότι το ίδιο ποσό ξηρής μάζας φύλλου αντιστοιχούσε σε υψηλότερη επιφάνεια στα φύλλα -S. Υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας του οργανικού θείου που επενδύθηκε ανά φύλλο και της ειδικής επιφάνειας αυτού του φύλλου.

Ένα από τα σημαντικά ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι ο εντοπισμός αερεγχύματος στο έλασμα του 2^{ου} φύλλου των φυτών -S, δεδομένου ότι μέχρι τώρα ο σχηματισμός αερεγχύματος υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων έχει αναφερθεί μόνο σε βλαστογενείς ρίζες αραβοσίτου με τη λύση των κυττάρων του φλοιώδους παρεγχύματος. Το αερέγχυμα εμφανίστηκε κυρίως στο μέσο του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου των ελλειμματικών σε θειικά φυτών την 10^η ημέρα και περιορίστηκε σημαντικά την 19^η ημέρα. Την ημ10 διαπιστώθηκε ότι η έλλειψη θεικών για 10 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία αερεγχύματος στο έλασμα του 2^{ου} φύλλου. Η ειδική επιφάνεια του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου των φυτών -S είναι μικρότερη σε σχέση με των φυτών μαρτύρων, ενώ ο ρυθμός διαπνοής του υπέργειου μέρους των φυτών -S είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες. Την ημ19 της μεταχείρισης διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό αερεγχύματος ανά συνολική επιφάνεια τομής μειώνεται σε σχέση με το ποσοστό που μετρήθηκε την ημ10. Το ξηρό βάρος του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου στα φυτά -S είναι μεγαλύτερο συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες. Η ειδική επιφάνεια του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου στα φυτά -S δεν διαφέρει από εκείνη των φυτών μαρτύρων, ενώ ο ρυθμός διαπνοής του υπέργειου μέρους των φυτών -S είναι λιγότερος σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες.

Τα αποτελέσματα από την ανίχνευση του αποπλασμικού σιδήρου σε τομές που πραγματοποιήθηκαν στην 1^η ομάδα βλαστογενών ριζών, στο μεσοκοτύλιο, το κόμβο, το έλασμα και το κολεό του 2^{ου} φύλλου των φυτών -S έδειξαν ότι εντοπίζεται λιγότερος σίδηρος στους αποπλασμικούς χώρους την 10^η ημέρα ενώ δεν παρατηρείται διαφορά την 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες.

Abstract

Sulfur homeostasis is closely related to that of iron, not only because important parts of photosynthesis machinery and respiration electron transfer chain include Fe-S clusters, but also because maize as a member of the Poaceae family utilizes the strategy II for iron uptake. This strategy includes phytochelatins biosynthesis, which complex and transfer iron into the plant cells. The precursor for biosynthesis is a sulfur amino acid, methionine. Thus, with the present study we want to study the iron distribution and redistribution among the various organs as well as the morphological and anatomical changes that are addressed in all organs under sulfur deficiency.

To this end, young maize plants were grown in hydroponic culture in short term experiments (10 days) and long term ones (26 days). Plants were grown in two different nutrient solutions: a full one and an sulfate depleted nutrient solution.

It was firstly examined the kinetics of accumulation and concentration of iron, sulfur and sulfate in the plant and their distribution in shoot and root in a long term experiment. The S-deprived plants lose iron from the root during the second ten days, whilst they continue to accumulate total sulfur in both shoot and root and increase the amount of sulfate in small quantities in shoot, which it remains sulfate and is not reduced. In -S plants, the sulfur accumulation can be explained by the fact that salts used as sources of nutrient ions though analytical purity contained sulfate impurities.

Thereafter, taking into account both the complexity of the root system architecture and the findings which have been just mentioned above, the kinetics of iron distribution was studied in each root type and how the deficiency affect them morphometrically, focusing on the 1st group of crown roots because this root type faces the sulfate deprivation from the first day of its appearance. The results revealed that the sulfur-deprived plants accumulate iron in all root types during the first ten days, whereas they exhibit iron loss of all root types during the second ten days. The amount of the total sulfur increased in the root is mainly distributed to the embryonic root system whilst the total sulfur concentration is allocated equally in all root types. The amount of sulfate is increased in all root types during the first ten days and decreased the second ones. Sulfate deprivation negatively affects the dry mass of the 1st group of the crown roots. There were linear correlations among the dry mass, the reduced sulfur and total iron invested in the various root types, focusing on the embryonic root system, particularly during the first ten days. In contrast, iron was dramatically reduced in all root types except for the primary root in which the reduction fell short by 8% during the second ten days.

The root system architecture was strengthened in various levels in order to address the serious sulfate deprivation. These included changes to the number of root axes, their total length, the dry mass allocated to them, the parts carrying the lateral roots, the number and length of the lateral roots, creation of the aerenchymatous area to support the lateral roots with nutrients and strengthen the vascular system for increased water and nutrients transport.

The results of the detection and visualization of the iron depositions on the surface area of maize roots revealed that there were iron depositions onto the root surface, the allocation of the depositions along root axis was not uniform, the allocation differed in each root type, and the deprivation affected the allocation of iron depositions, which were mainly located in the root sector that carries lateral and emerging lateral roots. The dry mass of the depositions varies in each root type during the experiment, differs from the root type and the deficiency.

The depiction of pH change along root axis with bromocresol purple, a pH indicator, showed that in most cases, the root sector which iron was detected has higher pH (pH>6).

The concentration of the total extractable iron, the external iron (iron depositions) and in most cases of the apoplastic extractable iron in S-deprived plants are less compared with the control.

In -S plants, the amount of the internal iron (the difference between total iron of the root and total extractable iron) is increased in each root type the first ten days whilst decreased the second ones. The internal iron is more than the total extractable iron (depositions and apoplastic iron) in the primary root, seminal roots and mesototyl roots and less in the nodal roots at day 10 under the deprivation. The internal iron is more than total extractable iron only in the primary root and less in other root types at day 19 under the deprivation.

The study of iron, total sulfur and sulfate allocations in seed-mesocotyl-crown revealed that under sulfur deprivation plants accumulate iron to the seed, mesocotyl and crown at the first ten days, while exhibiting iron loss during the second ten days. The amount of the total sulfur and the sulfate is decreased to the seed and increased to the mesocotyl and crown. The dry mass and the phenotype of the mesocotyl and crown are adversely affected under sulfate deprivation. As for anatomical traits the results show the formation of the aerenchyma in mesocotyl cross sections which made near the seed of the S-deprived plants. The surface of the aerenchyma increased during the second ten days and differed from the control since it was less at day 17 and more at day 26.

Corresponding distributions of iron, total sulfur and sulfate in leaves show that S-deprived plants continue to accumulate iron in all leaves during the experiment and it is distributed to the lower leaves. The S-deprived plants continue to accumulate total sulfur during the first ten days and reduce the amount of total sulfur in the second ten days, except for the 4th and 5th leaf that continue to accumulate total sulfur. On the one hand, the amount of the total sulphur seems to be distributed in the upper leaves the first ten days, on the other hand, the total sulphur concentration is allocated equally in all leaves. The amount of sulfate increased in lower leaves the first ten days and decreased the second ones.

In -S plants, the transpiration rate of the shoot is more at day 10 under the deprivation and less at day 19 under the deprivation than control plants. The dry mass of the upper leaves (laminae and sheaths) affected more under sulfate deprivation during the experiment and the length of the upper leaves only during the second ten days. Moreover, the leaf surface of both lamina and sheath are larger at day 10 and smaller at day 19 under the deprivation compared with the control.

In S-deprived plants, the correlation of the dry mass with the corresponding leaf surface showed that the same amount of the dry mass corresponded to greater leaf surface. Additionally, there is a strong positive correlation between the amount of reduced sulfur invested per leaf and the specific surface area of this leaf.

Aerenchyma formation of the 2nd leaf lamina under sulfate deprivation is a finding which presented in this study, since aerenchyma formation under nutrient deficiencies and especially under nitrogen or phosphorus or sulfur deficiency has been reported only in the crown roots of maize by lysis of cortical cells so far.

In S-deprived plants aerenchyma formation was found in the 2nd leaf. The lamina of this leaf showed enlarged gas spaces between the intermediate and small vascular bundles by lysis of mesophyll cells and to a greater extent on the d10 compared to d19. Aerenchymatous spaces were mainly distributed along the middle region of leaf axis. The sulfate deprivation for 10 days resulted in the formation of the aerenchyma on the lamina of the 2nd leaf. The lamina's specific surface area was smaller compared to control plants and the transpiration rate of the shoot was more than control plants. At day 19 under sulfate deprivation the percentage of the aerenchyma per total surface section was decreased compared to the percentage estimated on the d10, the lamina's dry mass was larger

compared to control plants, the lamina's specific surface area was as in control and the transpiration rate of the shoot was less than control plants.

Last but not least, the results of the detection of apoplastic iron in cross sections made among the 1st group of the crown roots, the mesocotyl, the crown and lamina and sheath of the 2nd leaf revealed that less iron is located in the apoplastic space at d10 under the deprivation, whilst no differences regarding the colour intensity at d26 under the deprivation compared with the control.

Το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής εγκρίθηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας [Συνεδρία 2^η/2-11-2011]

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μπουράνης Δημήτριος, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων)

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Μέλος)

Χωριανοπούλου Στυλιανή, Λέκτορας Γ.Π.Α. (Μέλος)

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή ορίστηκε κατά τη συνεδρία 20-06-2014 της Γενικής Συνέλευσης του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής με την εξής σύνθεση:

Μπουράνης Δημήτριος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Καραμπουρνιώτης Γεώργιος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αϊβαλάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Σάββας Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Λιακόπουλος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Χωριανοπούλου Στυλιανή, Λέκτορας Γ.Π.Α.

Αντί Προλόγου

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την άμεση επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δ. Μπουράνη.

Ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή Δημήτριο Μπουράνη για την ανάθεση της μελέτης, για το ενδιαφέρον και την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αυτής. Οι εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις που εισηγήθηκε διαβάζοντας αυτή την μελέτη συνέβαλαν ουσιαστικά στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου.

Ιδιαίτερα, θέλω να ευχαριστήσω την Λέκτορα κα Σ. Χωριανοπούλου για την καθοδήγηση και την συνεργασία της.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γ. Λιακόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής αυτής.

Θερμές ευχαριστίες αρμόζουν επίσης στον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κατινάκη, τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Καραμπουρνιώτη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Σάββα για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή, δίνοντας μου τη δυνατότητα να υλοποιήσω ένα όνειρο ζωής που είναι η παρούσα διδακτορική διατριβή.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση τους στην προσπάθειά μου όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Ο αραβόσιτος	2
1.1.1 Κλιματικές και εδαφικές απαιτήσεις	2
1.1.2 Αύξηση και ανάπτυξη	2
1.1.3 Θρεπτικές απαιτήσεις	3
1.2 Η φυσιολογία του σιδήρου στο φυτό	4
1.2.1 Γενικά	4
1.2.2 Η πρόσληψη του σιδήρου από τα φυτά που ακολουθούν τη στρατηγική II	6
1.2.3 Μετακίνηση του σιδήρου μέσα στο φυτό	12
1.2.4 Ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση και κυτταρική ομοιόσταση του σιδήρου.	14
1.2.5 Η ρύθμιση των αποκρίσεων σιδήρου	16
1.2.6 Η σηματοδότηση της έλλειψης Fe σε μεγάλη απόσταση μέσα στα φυτά	17
1.2.7 Σήματα από χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια για ρύθμιση της ομοιόστασης του Fe	18
1.3 Η φυσιολογία του θείου στο φυτό	22
1.3.1 Γενικά	22
1.3.2 Πρόσληψη θειικών, αφομοίωση και αναγωγή	22
1.3.3 Οι μεταβολικές λειτουργίες του S	24
1.3.4 Ο εφοδιασμός με θείο, η αύξηση και η σύσταση των φυτών	27
1.4 Η σχέση του σιδήρου με το θείο στον αραβόσιτο	29

Κεφάλαιο 2: Η επίδραση της έλλειψης θειικών στην κατανομή σιδήρου και θείου σε ριζικό σύστημα και υπέργειο μέρος

2.1 Εισαγωγή	34
2.2 Υλικά και μέθοδοι	34
2.2.1 Φυτικό υλικό και ανάπτυξη φυταρίων σε υδροπονική καλλιέργεια	34
2.2.2 Μεταχειρίσεις	35
2.2.3 Δειγματοληψίες	35
2.2.4 Παραλαβή δειγμάτων	35
2.2.5 Προσδιορισμοί	36
2.2.5.1 Προσδιορισμός ολικού σιδήρου	36
2.2.5.2 Προσδιορισμός θειικών	37
2.2.5.3 Προσδιορισμός ολικού θείου	37
2.3 Αποτελέσματα	39
2.3.1 Ολόκληρο φυτό	39
2.3.2 Υπέργειο μέρος	40
2.3.3 Ριζικό σύστημα	42
2.4 Συζήτηση	42
2.5 Συμπεράσματα	44

Κεφάλαιο 3: Η κινητική της κατανομής του σιδήρου στο ριζικό σύστημα του αραβοσίτου υπό συνθήκες έλλειψης θειικών

3.1 Εισαγωγή	46
3.1.1. Η αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος του αραβοσίτου	46
3.1.2. Τα ανατομικά χαρακτηριστικά των ριζών του αραβοσίτου	46
3.1.3 Αποκρίσεις του ριζικού συστήματος στην έλλειψη θειικών	47
3.1.4 Σκοπός του κεφαλαίου	48
3.2 Υλικά και μέθοδοι	48
3.2.1 Κατανομές ξηρής μάζας, νερού, σιδήρου και θείου ριζικού συστήματος	49
3.2.2 Μορφομετρική ανάλυση του ριζικού συστήματος	49

3.2.3 Ανατομία της 1 ^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών	49
3.3 Αποτελέσματα	51
3.4 Συζήτηση	68
3.5 Συμπεράσματα	70

Κεφάλαιο 4: Ανάλυση της ομοιόστασης του σιδήρου στο ριζικό σύστημα

4.1 Εισαγωγή	74
4.1.1 Αποπλασμική συσσώρευση σιδήρου στην επιδερμίδα της ρίζας	74
4.1.2 Οι ρυθμιζόμενες οξειδοαναγωγικές διεργασίες στη πλασματική μεμβράνη κυττάρων της ρίζας και οι λειτουργίες τους στην πρόσληψη σιδήρου	76
4.1.3 Ο σκοπός του κεφαλαίου	77
4.2 Υλικά και μέθοδοι	78
4.2.1 Δειγματοληψίες	78
4.2.2 Μεταβολές στο θρεπτικό διάλυμα	78
4.2.3 Αποθέσεις στην επιφάνεια της ρίζας	78
4.2.3.1 Αρχή της μεθόδου	79
4.2.3.2 Πειραματική διαδικασία	79
4.2.4 Η μεταβολή του pH στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος	79
4.2.5 Δυναμική αποπλασμικού σιδήρου	79
4.2.5.1 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας του συνολικού εκχυλίσμου σιδήρου της ρίζας (TEi)	80
4.2.5.1.1 Αρχή της μεθόδου (μέθοδος Bienfait)	80
4.2.5.1.2 Πειραματική διαδικασία	80
4.2.5.2 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας του αποπλασμικού σιδήρου της ρίζας μετά από χειρισμό με DCB (Ai)	81
4.2.6 Ανίχνευση σιδήρου σε τομές της 1 ^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών	81
4.3 Αποτελέσματα	84
4.4 Συζήτηση	103
4.5 Συμπεράσματα	106

Κεφάλαιο 5: Η κινητική του σιδήρου στο σύστημα σπόρου-μεσοκοτυλίου-βλαστού

5.1 Εισαγωγή	110
5.1.1 Η αρχιτεκτονική του συστήματος σπόρος – μεσοκοτύλιο – βλαστός	110
5.1.1.1 Σπόρος	110
5.1.1.2 Μεσοκοτύλιο	110
5.1.1.3 Βλαστός	111
5.1.2 Ανατομία επάκριου μεριστώματος	112
5.1.2.1 Οργάνωση και λειτουργία του κορυφαίου μεριστώματος βλαστού	112
5.1.2.2 Οργάνωση της κορυφής του βλαστού	113
5.1.2.3 Διαφοροποίηση πρωτογενών ιστών	113
5.1.2.4 Διαφοροποίηση αγγειακού στα φύλλα	114
5.1.2.5 Αγγειακές δεσμίδες στον αραβόσιτο	114
5.1.3 Σκοπός του κεφαλαίου	114
5.2 Υλικά και μέθοδοι	115
5.2.1 Κατανομές ξηρής μάζας, νερού, σιδήρου και θείου σπόρου-μεσοκοτυλίου-βλαστού	115
5.2.2 Μορφομετρική ανάλυση μεσοκοτυλίου, κόμβου και επάκριου μεριστώματος	115
5.2.3 Ανατομία μεσοκοτυλίου και κόμβου	115
5.2.4 Ανίχνευση σιδήρου σε τομές του μεσοκοτυλίου και του κόμβου με τη χρωστική Prussian blue	115
5.3 Αποτελέσματα	116

5.4 Συζήτηση	127
5.5 Συμπεράσματα	128

Κεφάλαιο 6: Η κινητική της κατανομής του σιδήρου στο υπέργειο μέρος του αραβοσίτου υπό συνθήκες έλλειψης θειϊκών

6.1 Εισαγωγή	130
6.1.1. Η αρχιτεκτονική του υπέργειου μέρους	130
6.1.2. Ανατομία φύλλου	131
6.1.3 Αποκρίσεις του υπέργειου μέρους φυτού στην έλλειψη θειϊκών	131
6.1.4 Στόχοι του κεφαλαίου 6	132
6.2 Υλικά και μέθοδοι	133
6.2.1 Κατανομές ξηρής μάζας, σιδήρου και θείου φύλλων	133
6.2.2 Μορφομετρική ανάλυση φυλλώματος	133
6.2.3 Ρυθμός διαπνοής φυτού	133
6.2.4 Ανατομία ελάσματος και κολεού του 2 ^{ου} φύλλου	134
6.2.5 Εντοπισμός αερεγχύματος	134
6.2.6 Ανίχνευση της παρουσίας σιδήρου σε τομές του ελάσματος και κολεού του 2 ^{ου} φύλλου με τη χρωστική Prussian blue	134
6.3 Αποτελέσματα	136
6.4 Συζήτηση	151
6.5 Συμπεράσματα	154

Κεφάλαιο 7: Η δυναμική της κατανομής του εσωτερικού σιδήρου και η συνολική εικόνα της στρατηγικής αντιμετώπισης της έλλειψης θειϊκών

7.1 Σκοπός του κεφαλαίου	158
7.2 Η δυναμική του εσωτερικού σιδήρου	158
7.2.1 Ολόκληρο φυτό	158
7.2.2 Υπέργειο μέρος	158
7.2.3 Ριζικό σύστημα	158
7.3 Η συνολική εικόνα	158

Κεφάλαιο 8: Βιβλιογραφία	164
---------------------------------	-----

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1 Ο αραβόσιτος

Ο αραβόσιτος (*Zea mays* L.) είναι μετά το σιτάρι και το ρύζι το τρίτο πιο σημαντικό από τα καλλιεργούμενα σιτηρά σε όλο τον κόσμο. Καλλιεργείται κυρίως για καρπό και δευτερευόντως για παραγωγή χλωρής μάζας και ως πρώτη ύλη σε βιομηχανικές διαδικασίες. Ο καρπός χρησιμοποιείται για κατανάλωση τόσο από τους ανθρώπους όσο και από τα ζώα. Τα βλαστητικά μέρη του φυτού συγκομίζονται πράσινα και αποξηραίνονται ή ενσιρώνονται για την διατροφή των ζώων. Η χημική σύσταση του σπόρου αποτελείται από άμυλο 77%, σάκχαρα 2%, πρωτεΐνη 9%, λιπαρές ουσίες 5%, πεντοζάνη 5% και τέφρα 2% (Jones 1985, Purseglove 1985, Maddonni et al. 2006).

1.1.1 Κλιματικές και εδαφικές απαιτήσεις

Ο αραβόσιτος είναι καλλιεργούμενο φυτό θερμών κλιμάτων με επαρκή υγρασία. Το υδατικό ισοζύγιο της καλλιέργειας καθορίζεται από την εξατμισοδιαπνοή, την βροχόπτωση και τα χαρακτηριστικά του εδάφους (Musick and Dusek 1980, Eck 1984). Η έλλειψη νερού μειώνει την απόδοση της καλλιέργειας. Η βέλτιστη θερμοκρασία εδάφους για την βλάστηση και την ανάπτυξη των νεαρών φυτών είναι 26°-30°C. Ο αραβόσιτος καλλιεργείται σε μεγάλη ποικιλία εδαφών, αλλά αποδίδει καλύτερα σε καλά αεριζόμενα βαθιά εδάφη που περιέχουν αρκετή οργανική ύλη και διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά. Επιπλέον, μπορεί να καλλιεργείται σε εδάφη με pH από 5 έως 8, αλλά είναι φυτό αρκετά ευαίσθητο στην αλατότητα (Jones 1985).

1.1.2 Αύξηση και ανάπτυξη

Με ευνοϊκό περιβάλλον, το ριζίδιο εμφανίζεται σε 2-3 ημέρες μετά την σπορά και το πτερίδιο, μέσα στο κολεόπτιλο, διαπερνά το περίβλημα του σπόρου 1-2 ημέρες αργότερα. Οι δευτερογενείς εμβρυακές ρίζες ακολουθούν μετά (συνήθως τρεις στον αριθμό). Το μήκος του μεσοκοτυλίου εξαρτάται από το βάθος της φύτευσης και μέσα σε λίγες ημέρες επιμηκύνεται 3 cm μέχρι την επιφάνεια του εδάφους. Στις περισσότερες ποικιλίες, το μέγιστο μήκος του είναι 12.5-15 cm. Εάν ο σπόρος φυτεύεται σε μεγαλύτερο βάθος από αυτό, ή οι συνθήκες καλλιέργειας είναι δυσμενείς, η επιμήκυνση σταματά και το σπορόφυτο δεν καταφέρνει να αναδυθεί (Purseglove 1985).

Τα φυτά αραβοσίτου παράγουν αρχικά ένα μικρό εμβρυακό ριζικό σύστημα που γρήγορα αντικαθίσταται από ένα μεγάλο που προέρχεται από τους κατώτερους κόμβους του βλαστού (nodal roots) και θα αποτελέσει το κύριο ριζικό σύστημα του φυτού. Το ριζίδιο μεγαλώνει από το σπόρο και παράγει την πρωτογενή εμβρυακή ρίζα (primary root), μετά την οποία τρεις ή περισσότερες δευτερογενείς εμβρυακές ρίζες (seminal roots) αναπτύσσονται έξω και πλαγίως ως προς το έμβρυο. Οι εμβρυακές ρίζες καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της θρέψης του φυτού κατά την διάρκεια των πρώτων δύο εβδομάδων μετά την βλάστηση και παραμένουν λειτουργικές για κάποιο χρονικό διάστημα (Purseglove 1985). Γρήγορα όμως η σημασία τους περιορίζεται και το νεαρό φυτό υποστηρίζεται και τρέφεται από το κύριο ριζικό σύστημα το οποίο συνεχίζει να αναπτύσσεται προς τα κάτω και να διακλαδίζεται και πρόσθετες ρίζες παράγονται σε διαδοχικούς κόμβους του βλαστού, που βρίσκονται κάτω από την επιφάνεια του εδάφους. Σε βαθιά εδάφη, το βάθος του ριζικού συστήματος αυξάνει γραμμικά με τον χρόνο μέχρι την εμφάνιση της αρσενικής ταξιανθίας (που ονομάζεται φόβη, tassel). Από την εμφάνιση της φόβης μέχρι την έναρξη του γεμίσματος του σπόρου, αναπτύσσονται οι εναέριες ρίζες (brace roots) από κόμβους κοντά στην βάση του βλαστού και επάνω από την επιφάνεια του εδάφους για να στηρίζουν τον βλαστό (Larson and Hanway 1977). Κατά την διάρκεια του γεμίσματος του σπόρου, το μήκος και το ξηρό βάρος του κάθε ριζικού άξονα δεν αυξάνει και ίσως μειώνεται πριν την

ωρίμανση του σπόρου (Mengel and Barber 1974). Η ανάπτυξη και διαμόρφωση του ριζικού συστήματος εξαρτάται από το νερό του εδάφους, την θερμοκρασία, τον αερισμό, τα θρεπτικά στοιχεία, τις τοξικές χημικές ουσίες και την αντίσταση του εδάφους.

Τα περισσότερα υβρίδια αραβοσίτου έχουν ύψος 2.5-3.5 m, οι καθαρές σειρές και ο σακχαρώδης αραβόσιτος έχουν μικρότερο ύψος. Το στέλεχος του αραβοσίτου αποτελείται από ελάσματα φύλλου, κολεούς φύλλου, κόμβους και μεσογονάτια. Τα φύλλα αναπτύσσονται κατ' εναλλαγή σε κάθε πλευρά του στελέχους στους κόμβους. Κάθε φύλλο αποτελείται από ένα λεπτό, επίπεδο έλασμα με ανεπτυγμένο κεντρικό νεύρο και ένα παχύτερο, περισσότερο άκαμπτο κολεό με μικρότερο κεντρικό νεύρο. Η κλίση του φύλλου ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των γονότυπων, από σχεδόν οριζόντια έως σχεδόν κάθετα (Duncan 1975). Ο αριθμός των φύλλων ανά φυτό ποικίλλει από επτά για ποικιλίες μικρού βιολογικού κύκλου έως περισσότερα από 30 για ορισμένες τροπικές ποικιλίες, ο αριθμός των φύλλων για υβρίδια ευκράτων κλιμάτων κυμαίνεται από 16 έως 23 (Tollenaar and Dwyer 1998).

Ο κύκλος ζωής του αραβοσίτου κατά τους Tollenaar and Dwyer (1998) διακρίνεται σε τέσσερις διακριτές φάσεις οι οποίες είναι: (1) η φάση ανάπτυξης των φύλλων, μία περίοδος βλαστητικής ανάπτυξης, (2) η περίοδος ανθοφορίας που περιλαμβάνει την εμφάνιση της φόβης, την άνθηση, την επικονίαση και γονιμοποίηση, (3) η περίοδος γεμίσματος του σπόρου και (4) η περίοδος ξήρανσης του σπόρου, η τελική φάση του κύκλου ζωής. Η διάρκεια κάθε μιας από αυτές τις φάσεις, η διάρκεια του κύκλου ζωής επηρεάζεται από τους κλιματικούς παράγοντες, το γονότυπο και τις πρακτικές καλλιέργειας.

Ο αραβόσιτος χρησιμοποιεί τη φωτοσυνθετική πορεία C4 με αποτέλεσμα, να παρουσιάζει υψηλούς φωτοσυνθετικούς ρυθμούς, χαμηλά σημεία αντιστάθμισης CO₂ και απουσία του φωτοσυνθετικού κορεσμού μέχρι την πλήρη ηλιοφάνεια. Έτσι, ο φωτοσυνθετικός μεταβολισμός του διαφέρει από εκείνον του ρυζιού και του σιταριού (Hatch and Slack 1970). Οι Mock και Pearce (1975) ανέφεραν ότι ο φωτοσυνθετικός ρυθμός των φυτών C4 είναι διπλάσιος εκείνων που χρησιμοποιούν τη φωτοσυνθετική πορεία C3. Στα υβρίδια αραβοσίτου μικρής περιόδου, το 50% περίπου της συνολικής ξηρής μάζας συσσωρεύεται κατά την ανθοφορία, με το υπόλοιπο 50% να συσσωρεύεται κατά την διάρκεια του γεμίσματος του σπόρου (Tollenaar et al. 2004). Επιπλέον, το 50% περίπου της ξηρής μάζας διατίθεται στο σπόρο και το υπόλοιπο στο στέλεχος (Tollenaar et al. 2004). Σχεδόν το σύνολο της ξηρής μάζας που κατανέμεται στο σπόρο είναι σταθερό κατά τη διάρκεια της περιόδου γεμίσματος του σπόρου και υπάρχει ελάχιστη ή καθόλου επανακινητοποίηση της ξηρής μάζας που συσσωρεύεται νωρίτερα στο φυτό (Cluquet et al. 1990, Lee and Tollenaar 2007).

1.1.3 Θρεπτικές απαιτήσεις

Ο αραβόσιτος, λόγω της υψηλής παραγωγικότητας σε βιομάζα και καρπό, απορροφά μεγάλες ποσότητες ανόργανων θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος το οποίο και εξαντλεί. Ενδεικτικά, περίπου 24 kg N, 3 kg P, 23 kg K, 5 kg Ca και 4 kg Mg μετακινήθηκαν σε καρπό και σε άχυρα από τον αγρό για την παραγωγή ενός τόνου καρπών (Fageria 2001). Η διατήρηση της παραγωγικότητας της καλλιέργειας σε υψηλά επίπεδα προϋποθέτει τον επαρκή εφοδιασμό του εδάφους σε θρεπτικά στοιχεία. Για την σωστή κατάρτιση ενός προγράμματος λίπανσης λαμβάνουμε υπόψη: 1) τις ανάγκες της καλλιέργειας, 2) τα εδαφικά αποθέματα στα διάφορα θρεπτικά στοιχεία, 3) το ρυθμό απορρόφησης των θρεπτικών στοιχείων στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των φυτών, 4) τους παράγοντες του περιβάλλοντος (υγρασία, αερισμό και θερμοκρασία εδάφους, ρυθμό εξάτμισης), 5) το γονότυπο, 6) τις αλληλεπιδράσεις θρεπτικών στοιχείων και 7) την πυκνότητα των φυτών.

Το άζωτο (N) είναι ένα από τα θρεπτικά στοιχεία που περιορίζει την απόδοση και την ποιότητα του αραβοσίτου σε διάφορα μέρη του κόσμου (Miao et

al. 2007). Η επαρκής ποσότητα N εξαρτάται επίσης κατά πόσο ο αραβόσιτος καλλιεργείται ως μονοκαλλιέργεια ή σε αμειψισπορά. Η χρήση των N-αποδοτικών γονότυπων είναι μία άλλη στρατηγική για την βελτίωση των αποδόσεων αραβοσίτου και για την μείωση του κόστους παραγωγής. Η αποδοτικότητα είναι η ικανότητα ενός γονότυπου να μετατρέπει τις εισροές ή τα θρεπτικά σε επιθυμητά αποτελέσματα ή να ελαχιστοποιεί την μετατροπή εισροών σε άχρηστα (Lynch 1998).

Η έλλειψη φωσφόρου (P) είναι κύριος περιοριστικός παράγοντας απόδοσης για ετήσια παραγωγή καλλιεργειών σε όξινα εδάφη των εύκρατων και τροπικών περιοχών. Η χρησιμοποίηση των P-αποδοτικών γονότυπων για αύξηση ή και σταθεροποίηση της παραγωγής της καλλιέργειας έχει γίνει ελκυστική τα τελευταία χρόνια, λόγω του υψηλού κόστους του λιπάσματος και των προβλημάτων ρύπανσης.

Η έλλειψη καλίου (K) δεν είναι τόσο κοινή όσο του N και του P σε περιοχές παραγωγής αραβοσίτου. Όμως, αυτό το θρεπτικό στοιχείο μπορεί να γίνει ανεπαρκές εάν απομακρυνθεί σε μεγάλες ποσότητες από τους αγρούς χωρίς να αντικατασταθεί με λιπάσματα.

1.2 Η φυσιολογία του σιδήρου στο φυτό

1.2.1 Γενικά

Ο σίδηρος είναι σημαντικό ιχνοστοιχείο για όλα τα ανώτερα φυτά και αποτελεί ένα από τα πιο ασταθή μέταλλα στην βιολογία. Οι λειτουργίες του κυρίως βασίζονται στην αμφίδρομη οξειδοαναγωγική αντίδραση των ιόντων του, Fe^{2+} και Fe^{3+} , την ικανότητα του να σχηματίζει οκταεδρικά σύμπλοκα με διάφορες ενώσεις και να αλλάζει το οξειδοαναγωγικό του δυναμικό ως απόκριση σε διαφορετικά περιβάλλοντα συναρμογής. Αυτή η ιδιότητα καθιστά αυτό το μέταλλο μετάπτωσης κατάλληλο για αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και πράγματι οι κύριες αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων της ζωής, αυτή της αναπνοής και της φωτοσύνθεσης βασίζονται στις συναρμογές σιδήρου-θείου του τύπου $2Fe-2S$ ή $4Fe-4S$ που βρίσκονται στα φωτοσυνθετικά κέντρα αντίδρασης και στις φερεδοξίνες (Guerinot 2001).

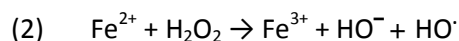
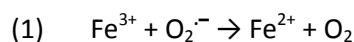
Η ανεπαρκής πρόσληψη του σιδήρου οδηγεί στα συμπτώματα της έλλειψης σιδήρου όπως π.χ. στην μεσονεύρια χλώρωση των φύλλων και στη μείωση της απόδοσης των καλλιεργειών. Τα φυτά χρειάζονται σίδηρο σε συγκεντρώσεις 10^{-9} - 10^{-4} M για την επίτευξη βέλτιστης ανάπτυξης, αλλά η απόκτηση του σιδήρου αποτελεί σημαντική πρόκληση λόγω της χαμηλής διαλυτότητας του σιδήρου στο εδαφικό διάλυμα (Guerinot and Yi 1994). Αν και ο σίδηρος είναι το τέταρτο πιο άφθονο στοιχείο στο φλοιό της γης, εντούτοις δεν είναι άμεσα διαθέσιμο στα φυτά. Σε καλά αεριζόμενα εδάφη και σε φυσιολογικά pH, οι συγκεντρώσεις του ελεύθερου Fe^{3+} και Fe^{2+} είναι λιγότερες από 10^{-15} M, μία τιμή πολύ κάτω από την απαιτούμενη για βέλτιστη ανάπτυξη (Marschner 1995). Έτσι, η έλλειψη σιδήρου συχνά περιορίζει την ανάπτυξη των φυτών προκαλώντας προβλήματα στην γεωργία. Στην πραγματικότητα το 1/3 των καλλιεργούμενων εδαφών παγκοσμίως είναι ασβεστούχα και γι' αυτό τα αλκαλικά εδάφη θεωρούνται ελλειμματικά σε σίδηρο (Mori 1999). Αυτός ο περιορισμός δεν μπορεί εύκολα να ξεπεραστεί χρησιμοποιώντας λιπάσματα που περιέχουν σίδηρο, γιατί η διαθεσιμότητα του σιδήρου είναι ένα πρόβλημα της διαλυτότητας και όχι της αφθονίας (Guerinot 2001).

Εκτός από τη χαμηλή διαλυτότητα, οι ιδιότητες του σιδήρου αναγκάζουν τα φυτικά κύτταρα να θέσουν περιορισμούς σχετικά με την συσσώρευση του. Οι ίδιες φυσικές ιδιότητες που επιτρέπουν να δρα ο σίδηρος ως ένας αποτελεσματικός συμπαραγοντας και καταλύτης σε ελεγχόμενη οξειδοαναγωγική χημεία, επιτρέπουν επίσης να δρα ο σίδηρος ως μία ισχυρή τοξίνη όταν δεν προστατεύεται από ευπαθή βιομόρια. Πολλές ενδοκυτταρικές αντιδράσεις χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο ως

αποδέκτη ηλεκτρονίου παράγοντας σουπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\cdot-}$) ή υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Αυτά δεν είναι τόσο επιβλαβή, αλλά συμβάλλουν στον σχηματισμό της εξαιρετικά δραστικής ρίζας υδροξυλίου (HO^{\cdot}). Ο σχηματισμός της καταλύεται από τον σίδηρο στην ονομαζόμενη αντίδραση Fenton (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1

Η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου από τον οξειδωμένο σίδηρο



Η αντίδραση Haber Weiss είναι το άθροισμα των δύο αντιδράσεων, δηλαδή της αναγωγής του Fe^{3+} από το σουπεροξειδικό ανιόν (1) και της γνωστής αντίδρασης Fenton (2) (Guerinot and Yi 1994).

Η ρίζα υδροξυλίου είναι μη επιλεκτική και αντιδρά σχεδόν με κάθε μόριο που βρίσκεται σε ζωντανά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου του DNA, πρωτεϊνών, λιπιδίων και σακχάρων. Γι' αυτό ένα κύτταρο θα πρέπει να κρατά τον σίδηρο συνεχώς δεσμευμένο σε οργανική μορφή για να αποφευχθεί η καταβύθιση λόγω του κυτταρικού pH, καθώς και να προστατέψει τον σίδηρο από το οξυγόνο για να εμποδιστεί η οξειδωτική καταπόνηση. Τα φυτά είναι οξυγονικοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που βρίσκονται αντιμέτωποι με μία διπλή πρόκληση: να αποκτήσουν σίδηρο από ένα ανόργανο περιβάλλον και να τον καταστήσουν διαθέσιμο σε δεσμευμένη οργανική μορφή για τις θεμελιώδεις διαδικασίες της ζωής (Hell and Stephan 2003).

Ενώ τα ανώτερα φυτά έχουν ενιαία στρατηγική για την μετακίνηση του Fe μέσα στο φυτικό σώμα, έχουν διαφορετικές στρατηγικές για την πρόσληψη του Fe από το έδαφος (Koike et al. 2004). Το κύριο εμπόδιο που πρέπει να ξεπεραστεί σχετικά με τη θρέψη με Fe, σχετίζεται με την χαμηλή διαθεσιμότητά του στο έδαφος. Σε καλά αεριζόμενα εδάφη ο Fe βρίσκεται με τη μορφή δυσδιάλυτων οξειδίων και οξυ-υδροξειδίων του $Fe(III)$ και γι' αυτό δεν είναι διαθέσιμος για πρόσληψή του από τα φυτά. Για να ξεπεραστεί αυτή η κατάσταση, τα φυτά έχουν αναπτύξει αποτελεσματικούς μηχανισμούς για να αποκτήσουν Fe από το έδαφος.

Τα δικότυλα και τα μη-αγγρωστώδη μονοκότυλα φυτά ανέπτυξαν το μηχανισμό που ονομάστηκε «στρατηγική I», κατά τον οποίο η απόκτηση Fe πραγματοποιείται μέσω μηχανισμού που βασίζεται στην αναγωγή: η αναγωγή της χηλικής ένωσης $Fe(III)$ μετατρέπει τις χηλικές ενώσεις $Fe(III)$ σε ελεύθερο Fe^{2+} και στη συνέχεια ένας μεταφορέας Fe^{2+} (IRT1, IRON REGULATED TRANSPORTER 1) διακινεί το Fe από την πλασματική μεμβράνη μέσα στο κύτταρο. Επιπρόσθετα, υπάρχει μία αύξηση της δραστηριότητας μιας H^+ -ATPάσης της πλασματικής μεμβράνης η οποία εξάγει πρωτόνια. Εξωκυτταρικά, τα πρωτόνια με τη σειρά τους είναι αναγκαία τόσο για τη μείωση του pH της ριζόσφαιρας και τη συνακόλουθη διαλυτοποίηση του $Fe(III)$ όσο και για τη δημιουργία ηλεκτροχημικής διαβάθμισης πρωτονίου για να οδηγήσει στην πρόσληψη Fe.

Αντιθέτως, στα αγγρωστώδη φυτά που ακολουθούν τη «στρατηγική II» και αποτελούν μία ομάδα που περιλαμβάνει τις περισσότερες από τις βασικές καλλιέργειες σιτηρών παγκοσμίως, έχει αναπτυχθεί ένας ξεχωριστός μηχανισμός. Αυτά τα φυτά παράγουν μόρια της οικογένειας των μουγινειϊκών οξέων (MA) που ονομάζονται φυτοσιδηροφόρα (PS). Τα PS εκκρίνονται στην ριζόσφαιρα, σχηματίζουν χηλική ένωση και βοηθούν στην διαλυτοποίηση του $Fe(III)$. Το σύμπλοκο $Fe(III)$ -PS παραλαμβάνεται στη συνέχεια από τα κύτταρα της ρίζας μέσω της δράσης των πρωτεϊνών YELLOW STRIPE 1 (Σχήμα 1.1) (Vigani et al. 2013).

Η πρόσληψη του σιδήρου στα φυτά ρυθμίζεται σε υψηλό βαθμό για να τα εφοδιάσει με ποσότητες επαρκείς για βέλτιστη ανάπτυξη, ενώ παράλληλα εμποδίζει την υπερβολική συσσώρευση. Η μεταφορά του σιδήρου μέσα στα φυτά ελέγχεται

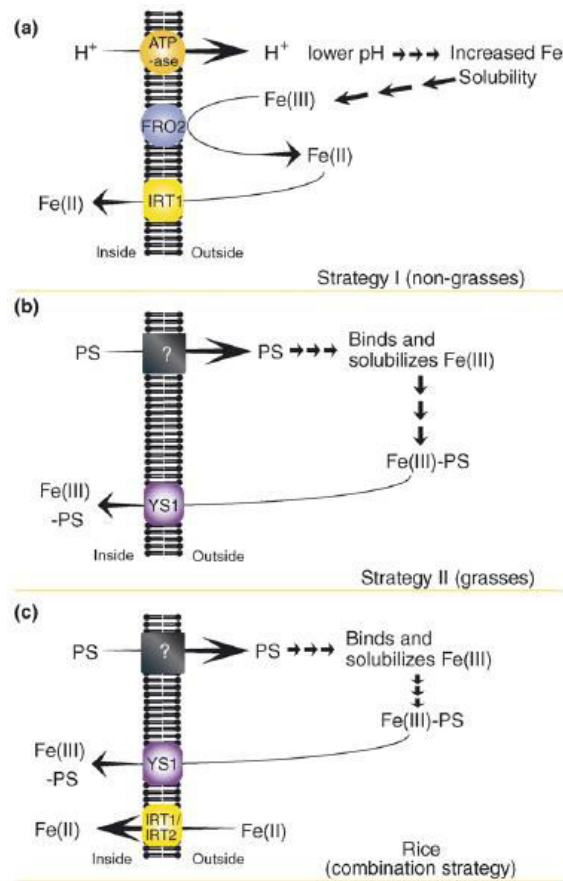
απόλυτα. Η ομοιόσταση του σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο είναι πολύ καλά ρυθμισμένη και τα φυτά μπορούν να αναπτύξουν είτε έλλειψη σιδήρου, είτε τοξικότητα σιδήρου σε φυσιολογικά εδάφη ανάλογα με το σημείο όπου ο έλεγχος είναι ανεπαρκής (Kim and Guerinot 2007).

1.2.2 Η πρόσληψη του σιδήρου από τα φυτά που ακολουθούν στρατηγική II

Η διαδικασία της απόκτησης Fe από τα φυτά της στρατηγικής II μπορεί να διακριθεί σε τέσσερα βήματα:

Η βιοσύνθεση των μουγινεϊκών οξέων

Η βιοσύνθεση των MA στις ρίζες, ελέγχεται από ένα σύστημα on-off που λειτουργεί υπό τον έλεγχο της ζήτησης του Fe στο φυτό και συνδέεται με την πορεία ανακύκλωσης της μεθειονίνης που λειτουργεί δυναμικά στις ρίζες για να καλύψει την αυξημένη ζήτηση για μεθειονίνη στην σύνθεση των MA και ονομάζεται κύκλος μεθειονίνης ή κύκλος του Yang (Ma and Nomoto 1996). Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί εννέα παράγωγα των MA και μοιράζονται την ίδια βιοσυνθετική πορεία από την L-μεθειονίνη στο 2'-δεοξυμουγινεϊκό οξύ (DMA). Συγκεκριμένα, η μεθειονίνη μετατρέπεται σε S-αδενοσυλ-μεθειονίνη (SAM) από την συνθετάση της SAM, και η δραστηριότητα του ενζύμου δεν επηρεάζεται από την έλλειψη ή επάρκεια του σιδήρου σε ρίζες κριθαριού. Η συνθάση της νικοτιαναμίνης (NAS) συνδέει τρία μόρια της SAM για να σχηματιστεί ένα μόριο της νικοτιαναμίνης (NA). Οι NAS του κριθαριού, του ρυζιού, ή του αραβοσίτου επάγονται στις ρίζες σε μεταγραφικό επίπεδο ως απόκριση στη χαμηλή διαθέσιμη ποσότητα σιδήρου. Τα κρίσιμα ένζυμα για την σύνθεση των MA είναι η αμινοτρανσφεράση της νικοτιαναμίνης (NAAT), που μετατρέπει την NA στο ενδιάμεσο 3'-κετο DMA, ακολουθούμενη από την συνθάση του DMA (DMAs), με αποτέλεσμα την παραγωγή του 2'-δεοξυμουγινεϊκού οξέος, που είναι το πρόδρομο μόριο όλων των άλλων μουγινεϊκών οξέων (Σχήμα 1.2). Η δραστηριότητα των NAAT και DMAS υποκινείται από την έλλειψη σιδήρου στις ρίζες και αντιπροσωπεύουν ένα περιοριστικό βήμα στην παραγωγή των μουγινεϊκών οξέων. Το DMA μετά υδροξυλιώνεται από την πρωτεΐνη IDS3 για να σχηματίσει το MA. Τα MA και DMA υδροξυλιώνονται από την πρωτεΐνη IDS2 για να σχηματίσουν και άλλα παράγωγα MA (Hell and Stephan 2003, Kobayashi et al. 2010, Briat 2011).

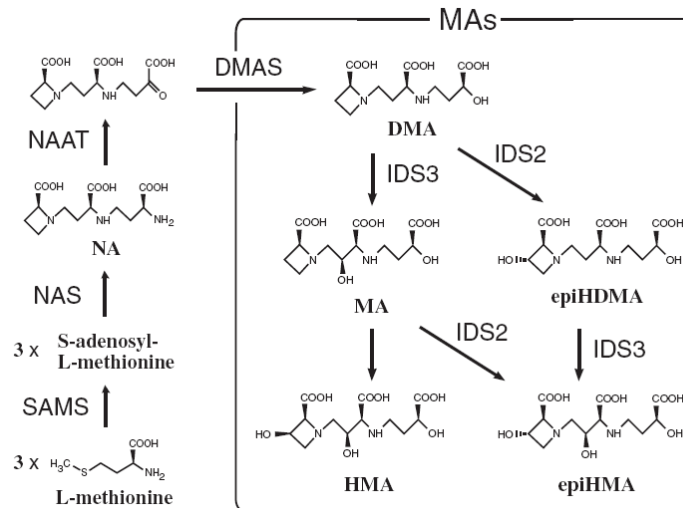


Σχήμα 1.1

Στρατηγικές για την πρόσληψη Fe από το έδαφος. (a) Στρατηγική I: Η οξύνιση της ριζόσφαιρας για να διαλυτοποιηθεί ο Fe(III) παρέχει το υπόστρωμα για το ένζυμο της αναγωγάσης χηλικής ένωσης Fe(III) (FRO2), το οποίο με τη σειρά του παρέχει Fe(II) για την μεταφορά εντός του κυττάρου από την πρωτεΐνη IRT1. (b) Στρατηγική II: Τα φυτοσιδηροφόρα (PS) παράγονται από τα κύτταρα της ρίζας, και απελευθερώνονται στην ριζόσφαιρα από τον μεταφορέα TOM1. Τα PS δεσμεύουν τον Fe(III) στο έδαφος και το σύμπλοκο Fe(III)-PS που προκύπτει εισέρχεται μέσα στα κύτταρα της ρίζας από τον μεταφορέα YS1. (c) Το ρύζι χρησιμοποιεί το τυπικό μηχανισμό Στρατηγικής II των αγρωστωδών, αλλά μπορεί επίσης να προσλάβει Fe(II) άμεσα μέσω των OsIRT1 και OsIRT2 (Walker and Connolly 2008).

Ορισμένα κυστίδια που παρατηρήθηκαν σε κύτταρα του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας του ελλειμματικού σε Fe κριθαριού και θεωρείται ότι προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο, είναι διογκωμένα νωρίς το πρωί μέχρι την έναρξη της έκκρισης των MA και συρρικνώνονται στο τέλος της έκκρισης. Το ένζυμο NAS εντοπίζεται στην μεμβράνη αυτών των κυστιδίων, ενώ η NAAT βρίσκεται μέσα στα κυστίδια, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα κυστίδια αποτελούν το χώρο της βιοσύνθεσης των MA (Kobayashi and Nishizawa 2012). Πολική μεταφορά αυτών των κυστιδίων εμπλέκεται στην έκκριση των MA, αφού τα κυστίδια συσσωρεύονται στα επιδερμικά κύτταρα στην περιφέρεια των κυττάρων που βλέπουν προς την ριζόσφαιρα λίγο πριν την ανατολή (Negishi et al. 2002).

Υψηλά επίπεδα καλίου έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή PS, επειδή το κάλιο είναι συμπαράγοντας του ενζύμου αδενοσυλμεταφοράση, που είναι απαραίτητο για την ρύθμιση της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης. Επίσης, το κάλιο εμπλέκεται σε ενζυματικές διαδικασίες ρύθμισης που σχετίζονται με την μετατροπή της μεθειονίνης σε μουγινεϊκό και αβενικό οξύ (Hugles et al. 1992).



Σχήμα 1.2

Η βιοσυνθετική πορεία των μουγινεϊκών οξέων (MA) στα αγρωστώδη φυτά. SAMS: συνθέταση S-αδενοσυλμεθειονίνη, NAS: συνθάση νικοτιαναμίνης, NAAT: αμινοτρανσφεράση νικοτιαναμίνης, DMAS: συνθάση του δεοξυμουγινεϊκού οξέος, IDS2: iron-deficiency-specific clone 2, IDS3: iron-deficiency-specific clone 3, NA: νικοτιαναμίνη, DMA: 2'-δεοξυμουγινεϊκό οξύ, MA: μουγινεϊκό οξύ, HMA: 3-υδροξυ-μουγινεϊκό οξύ, epiHMA: 3-επιυδροξυ-2'-δεοξυμουγινεϊκό οξύ, epiHMA: 3-επιυδροξυ-μουγινεϊκό οξύ. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί άλλα τέσσερα μουγινεϊκά οξέα (Kobayashi et al. 2010).

Η απελευθέρωση των PS

Η απελευθέρωση των PS στην ριζόσφαιρα ελέγχεται από τη θερμοκρασία και τη φωτοπερίοδο και έχει ξεχωριστό ημερήσιο ρυθμό, με το μέγιστο της απελευθέρωσης να παρατηρείται λίγες ώρες μετά την έναρξη της φωτεινής περιόδου (Marschner et al. 1986). Η σύνθεση των MA τουλάχιστον κατά ένα μέρος ελέγχεται από τους ημερήσιους ρυθμούς έκκρισης (Negishi et al. 2002). Η ποσότητα που εκκρίνεται σχετίζεται με την ικανότητα των φυτών να αντέχουν στην έλλειψη Fe και ακολουθεί την σειρά: κριθάρι, σιτάρι > βρώμη, σίκαλη > αραβόσιτος, σόργο > ρύζι (Ma and Nomoto 1996). Υψηλότερα αποθέματα του σπόρου σε Fe μπορεί να καθυστερήσουν την αυξημένη απελευθέρωση PS λόγω έλλειψης Fe και την παρεμπόδιση της ανάπτυξης της ρίζας υπό σοβαρή έλλειψη Fe (Roemheld and Marschner 1990).

Η χημική φύση των MA διαφέρει μεταξύ ειδών ακόμη και ποικιλιών. Συνήθως σε κάθε γονότυπο κυριαρχεί ένα PS (Marschner et al. 1989). Το ρύζι, το σόργο και ο αραβόσιτος εκκρίνουν μόνο DMA σε σχετικά χαμηλές ποσότητες και συνεπώς είναι ευπαθή στην χαμηλή διαθεσιμότητα του σιδήρου. Το κριθάρι εκκρίνει μεγάλες ποσότητες πολλών τύπων PS, όπως το MA, HMA και epi-HMA και είναι επομένως πιο ανθεκτικό στην χαμηλή διαθεσιμότητα του σιδήρου (Kim and Guerinot 2007). Οι επάκριες ζώνες της ρίζας είναι οι προνομιακές θέσεις παραγωγής και απελευθέρωσης PS (Roemheld and Marschner 1986).

Ο ρυθμός απελευθέρωσης PS μπορεί να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις σε Fe των ανθεκτικών στην χλώρωση αγρωστωδών (π.χ. κριθάρι, σιτάρι), λαμβάνοντας υπόψη την μικροβιακή αποδόμηση των PS στην ριζόσφαιρα. Σε αντίθεση με τα θρεπτικά διαλύματα και με καλές συνθήκες για ταχεία αποδόμηση των PS, σε φυτά που αναπτύσσονται στο έδαφος μπορεί να λάβει χώρα πολύ χαμηλότερος ρυθμός αποδόμησης PS λόγω του χωρικού διαχωρισμού απελευθέρωσης PS και μικροβιακής δραστηριότητας στην επιφάνεια της ρίζας και στην ριζόσφαιρα. Γενικά, μόνο ένα μικρό ποσοστό της επιφάνειας της ρίζας καταλαμβάνεται από μικροβιακές αποικίες (Schonwitz and Ziegler 1989). Επιπλέον, η απελευθέρωση των PS είναι ιδιαίτερα υψηλή στις επάκριες ζώνες της ρίζας και χαμηλή στη βάση της ρίζας (Marschner et al. 1987), ενώ παρατηρήθηκε μία αντίθετη διαβάθμιση ως προς τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας (Uren and Reisenauer 1988). Επιπρόσθετα, η συγκέντρωση των PS μειώνεται απότομα από

την επιφάνεια της ρίζας προς τον κύριο όγκο του εδάφους, ενώ η μέγιστη δραστηριότητα των μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας συνήθως εντοπίζεται όχι στην επιφάνεια της ρίζας αλλά σε μία απόσταση από αυτήν (Roemheld 1991).

Σε σύγκριση με τα PS, τα μικροβιακά σιδηροφόρα είναι γενικά μικρότερης σημασίας για την θρέψη σε Fe. Στον αραβόσιτο, ως μέτρια ανθεκτικό στη χλώρωση, ο ρυθμός απελευθέρωσης των PS είναι ενδιάμεσος μεταξύ του υψηλού ρυθμού στο κριθάρι και στο σιτάρι και του χαμηλού ρυθμού στο σόργο (Roemheld 1991). Οι χαμηλοί ρυθμοί απελευθέρωσης PS στα C4 αγρωστώδη, όπου η απελευθέρωση PS μειώνεται με τη σειρά κριθάρι (100) > αραβόσιτος (10) > σόργο (1), δεν αντικατοπτρίζουν κατ' ανάγκη μία πολύ χαμηλή εγγενή ικανότητα ή διαφορές στην παραγωγή κι απελευθέρωση PS, αλλά οφείλονται στην μικροβιακή αποδόμηση τους από μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούν τα PS ως πηγή άνθρακα. Η μεγαλύτερη μείωση της απελευθέρωσης PS στον αραβόσιτο ή στο σόργο σε σχέση με το κριθάρι αποδίδεται στους υψηλότερους ρυθμούς αποσύνθεσης των PS. Η μικροβιακή αποδόμηση διαφέρει μεταξύ των διαφόρων PS. Το MA και το DMA αποδομούνται γρηγορότερα από ότι το HMA και το DMA είναι το κύριο PS στον αραβόσιτο και στο σόργο, ενώ το HMA στο κριθάρι (Marschner and Roemheld 1994). Η περίσσεια βιοσύνθεσης και έκκρισης MA επιτρέπει στα φυτά να αποκτήσουν τις αναγκαίες ποσότητες Fe ακόμη και αν αποδομείται μεγάλο ποσοστό των MA από τους μικροοργανισμούς ή σχηματίζουν σύμπλοκα με άλλα μέταλλα (Ma and Nomoto 1996). Τα παράγωγα του MA εκκρίνονται ως μονοσθενές ανιόν μέσω διαύλων ανιόντος χρησιμοποιώντας την διαβάθμιση του καλίου μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του εξωτερικού του κυττάρου (Curie 2003, Murata 2006). Τα υπεύθυνα γονίδια για την έκκριση των παραγώγων του MA ήταν το κομμάτι που έλειπε από τον μηχανισμό της στρατηγικής II. Μόλις πρόσφατα, οι Nozoye et al. (2011) προσδιόρισαν τον μεταφορέα TOM1 της οικογένειας των μουγινεϊκών οξέων του ρυζιού και HnTOM1 του κριθαριού, αποκαλύπτοντας το τελευταίο κομμάτι στον μηχανισμό (Kobayashi and Nishizawa 2012).

Η κινητοποίηση του Fe(III)

Η κινητοποίηση του δυσδιάλυτου ανόργανου Fe(III) από τα PS γίνεται με συμπλοκοποίηση του Fe(III) και σχηματισμό Fe(III)-PS. Τα PS κινητοποιούν τον Fe(III) (α) από πρόσφατα ιζήματα υδροξειδίου του Fe(III) με σχηματισμό χηλικής ένωσης Fe(III) και χωρίς την συμμετοχή οξειδοαναγωγικής διαδικασίας, (β) από οξειδία Fe(III), (γ) από κρυσταλλικούς σχηματισμούς γκαϊτίτη και (δ) από συμπλέγματα Fe₄-φυτικού, αλλά σε μικρότερο βαθμό. Εκτός από Fe, τα PS κινητοποιούν και Zn, Mn, Cu (Marschner et al. 1986). Η κινητοποίηση του Fe από τα PS στην ριζόσφαιρα δεν επηρεάζεται από την παρουσία άλλων μικροστοιχείων (Zn, Mn, Cu) (Roemheld 1991). Η κινητοποίηση ολοκληρώνεται σε λιγότερο από 30 min. Εκτός από το ισομουγινεϊκό οξύ, τα διάφορα PS είναι εξίσου αποτελεσματικά στην κινητοποίηση του Fe (Marschner et al. 1989). Από τα υψηλά επίπεδα του εξωκυτταρικού ανόργανου Fe(III) που βρίσκεται στην επιφάνεια της ρίζας ή στον ελεύθερο χώρο του φλοιώδους παρεγχύματος είναι προφανές το υψηλό ποσοστό πρόσληψης του Fe και από χηλικές ενώσεις με χαμηλή σταθερότητα. Αυτή η πηγή του Fe(III) μπορεί να κινητοποιηθεί από τα PS και να προσληφθεί ως Fe-PS.

Η στρατηγική II πλεονεκτεί έναντι της στρατηγικής I στην καλύτερη ικανότητα να κινητοποιεί τον δυσδιάλυτο Fe(III) στην ριζόσφαιρα και στην χαμηλότερη ευαισθησία στο υψηλό pH του υποστρώματος (Marschner et al. 1986). Οι υψηλές συγκεντρώσεις του Ca²⁺ και Mg²⁺ που είναι συνήθεις σε ασβεστούχα εδάφη δεν έχουν παρεμποδιστική επίδραση στην διαλυτοποίηση του Fe(III) από τα PS. Σύμφωνα με αυτό, τα αγρωστώδη σε υγρά ασβεστούχα εδάφη είναι λιγότερο ευαίσθητα στην χλώρωση που προκαλείται από έλλειψη Fe, από ότι τα δίκωτυλα (Roemheld and Marschner 1986).

Η αποτελεσματικότητα των PS στην κινητοποίηση Fe(III) από το έδαφος αναστέλλεται από τα φωσφορικά, προφανώς λόγω της απορρόφησης των

φωσφορικών στις επιφάνειες των υδροξειδίων του Fe. Είναι γνωστό ότι η χρησιμοποίηση του Fe(III) από τα αγρωστώδη όπως ο αραβόσιτος σε υδροπονική καλλιέργεια περιορίζεται έντονα στις υψηλές συγκεντρώσεις φωσφορικών, ενώ απουσία φωσφορικών ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις φωσφορικών η ίδια πηγή Fe είναι διαθέσιμη άμεσα, ακόμη και σε υψηλό pH διαλύματος. Η ανασταλτική επίδραση των φωσφορικών στην κινητοποίηση του Fe από τα PS σε θρεπτικά διαλύματα ή *in vitro* είναι πολύ λιγότερο διακριτή στην ριζόσφαιρα. Ως αποτέλεσμα της απότομης μείωσης της συγκέντρωσης φωσφορικών στην ριζόσφαιρα, η απορρόφηση φωσφορικών μπορεί να θεωρηθεί ως μία αντίστοιχη αύξηση της προσβασιμότητας σε Fe(III). Ο ανόργανος Fe(III) είναι μία κατάλληλη πηγή Fe για φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσονται σε εδαφικό υπόστρωμα, ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις φωσφορικών.

Η αποτελεσματικότητα των PS στην κινητοποίηση του Fe(III) μειώνεται σημαντικά από υψηλές συγκεντρώσεις NaCl. Μπορεί να υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ Na και Fe³⁺ για τις θέσεις σύνδεσης στα PS. Από την άλλη πλευρά, αυξημένες συγκεντρώσεις NaCl είναι αρκετά αποτελεσματικές στην διαλυτοποίηση του Fe(III) από το ασβεστούχο έδαφος, γεγονός που πιθανά να οφείλεται σε εκρόφηση. Έτσι, σε καλά αεριζόμενα αλκαλικά εδάφη με μέτρια επίπεδα αλατότητας μια μείωση της αποτελεσματικότητας των PS στην κινητοποίηση του Fe(III) στην ριζόσφαιρα μπορεί να αντισταθμιστεί, τουλάχιστον κατά ένα μέρος από μία αύξηση στην διαλυτοποίηση επιφέροντας έτσι την κινητοποίηση του Fe(III). Η συσσώρευση αλάτων στην ριζόσφαιρα συγκριτικά με τον όγκο του εδάφους μπορεί να επιτείνει αυτό το αντισταθμιστικό αποτέλεσμα (Awad et al. 1988).

Η πρόσληψη του Fe

Η πρόσληψη του συμπλόκου Fe-PS ρυθμίζεται από ένα πολύ συγκεκριμένο σύστημα που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων της ρίζας και υπάρχει πάντα στις ρίζες των αγρωστωδών φυτών, είτε σε συνθήκες έλλειψης Fe είτε σε συνθήκες επάρκειας Fe. Η κινητοποίηση και ο ρυθμός απορρόφησης του Fe σε φυτά ελλειμματικά σε Fe είναι πολύ υψηλότερη από ότι σε φυτά επαρκή σε Fe (Marschner et al. 1986). Το σύμπλοκο Fe(III)-PS προσλαμβάνεται με μεγάλους ρυθμούς ως ολόκληρο χηλικό μόριο από τις ρίζες των αγρωστωδών ειδών. Το σύστημα πρόσληψης είναι πολύ επιλεκτικό για Fe(III)-PS. Δεν αναγνωρίζει ούτε συνθετικές ούτε μικροβιακές χηλικές ενώσεις σιδήρου (Roemheld 1987). Οι ρυθμοί πρόσληψης Fe(III)-PS είναι 100-1000 φορές υψηλότεροι από τους ρυθμούς πρόσληψης συνθετικών ή μικροβιακών χηλικών ενώσεων Fe, ενώ οι ρυθμοί πρόσληψης Zn ή Mn είναι παρόμοιοι, όταν παρέχονται είτε ως ανόργανα άλατα είτε ως συνθετικές χηλικές ενώσεις είτε ως χηλικές ενώσεις PS (Marschner et al. 1989). Ο ρυθμός πρόσληψης των διαφόρων Fe-PS είναι παρόμοιος εντός ενός είδους, αλλά διαφέρει κατά ένα παράγοντα μέχρι 4 μεταξύ των ειδών. Οι διαφορές αυτές μεταξύ των ειδών σχετίζονται με τις διαφορές στην μορφολογία της ρίζας. Οι υψηλότεροι ρυθμοί πρόσληψης ανά μονάδα ξηρού βάρους βρέθηκαν σε ελλειμματικά σε Fe φυτά ρυζιού και σόργου που χαρακτηρίζονται από ένα λεπτό, πολύ διακλαδιζόμενο ριζικό σύστημα. Οι χαμηλότεροι ρυθμοί πρόσληψης βρέθηκαν στον αραβόσιτο που έχει σχετικά παχιές ρίζες (Roemheld and Marschner 1990). Συνοψίζοντας, ο μηχανισμός για την απόκτηση του Fe στα αγρωστώδη χαρακτηρίζεται από δύο κύριες συνιστώσες: (1) από την αύξηση της απελευθέρωσης των PS από την έλλειψη Fe και (2) από ένα πολύ αποδοτικό σύστημα πρόσληψης για Fe(III)-PS, το οποίο ενεργοποιείται περαιτέρω με την έλλειψη Fe. Και οι δύο συνιστώσες αυτού του μηχανισμού εντοπίζονται στις ακραίες ζώνες της ρίζας. Γι' αυτό, όχι μόνο ο βαθμός της έλλειψης Fe, αλλά επίσης και ο ρυθμός ανάπτυξης της ρίζας συμβάλλει στην απόκτηση του Fe (Roemheld 1990). Η απελευθέρωση των PS και η μετέπειτα πρόσληψη του Fe-PS είναι υπό διαφορετικό γενετικό έλεγχο με βάση τα παρακάτω αποτελέσματα: απαιτούνται (1) χαμηλότερη θρεπτική κατάσταση του φυτού σε Fe για να επάγει αυξημένη απελευθέρωση PS από ότι απαιτείται για να επάγει αυξημένη ικανότητα πρόσληψης

Fe-PS, (2) διαφορετικός ρυθμός μείωσης τόσο στην απελευθέρωση PS όσο και στην ικανότητα πρόσληψης Fe-PS με την ηλικία του φυτού στο κριθάρι και σόργο και (3) αντίστροφη σχέση μεταξύ ρυθμού πρόσληψης Fe-PS και απελευθέρωσης PS σε σχέση με την ευαισθησία στη χλώρωση των διαφορετικών φυτικών ειδών (ένα ευαίσθητο στη χλώρωση είδος π.χ. το ρύζι παρουσιάζει υψηλούς ρυθμούς πρόσληψης Fe-PS και μικρή απελευθέρωση PS). Συνεπώς για επαρκή απόκτηση του Fe από ασβεστούχα εδάφη ο ρυθμός απελευθέρωσης PS παρά ο ρυθμός πρόσληψης Fe-PS είναι ο σχετικός παράγοντας (Roemheld and Marschner 1990).

Το σύμπλοκο Fe(III)-PS προσλαμβάνεται από τον μεταφορέα της μεμβράνης YS1 στον αραβόσιτο. Το γονίδιο YS1 ρυθμίζεται από την έλλειψη Fe σε ρίζες και βλαστούς. Ο μεταφορέας της μεμβράνης λειτουργεί και στα υπέργεια τμήματα του φυτού (Hell and Stephan 2003). Το γεγονός ότι ο YS1 εκφράζεται στους βλαστούς υποδηλώνει έναν ρόλο του στην ενδοκυτταρική μεταφορά του σιδήρου στους βλαστούς του φυτού (Kim and Guerinet 2007). Ο ZmYS1 μεταφέρει σύμπλοκα μετάλλου-DMA και σύμπλοκα μετάλλου-NA. Τα πρώτα θεωρούνται περισσότερο ευνοούμενα υποστρώματα σε σχέση με τα σύμπλοκα μετάλλου-NA (Koike et al. 2004). Το γονιδίωμα του αραβόσιτου κωδικοποιεί τουλάχιστον τέσσερα YSLs εκτός του γονιδίου YS1. Η λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών είναι πιθανόν η μεταφορά συμπλόκων μετάλλου-NA και κατά πάσα πιθανότητα οι πρωτεΐνες YSL θα είναι υπεύθυνες για την μεταφορά Fe-NA υπό συνθήκες έλλειψης Fe όταν απουσιάζει ο YS1 από τα φύλλα (Roberts et al. 2004). Ένας πιθανός φυσιολογικός ρόλος για τον YS1, εκτός από την κύρια πρόσληψη του Fe από το έδαφος, είναι στην πρόσληψη ή και μετακίνηση άλλων μετάλλων μετάπτωσης (μπορεί να μετακινήσει χαλκό ως σύμπλοκα Cu-PS, αλλά αυτή η δραστηριότητα μπορεί να είναι περιορισμένης σημασίας για την κύρια πρόσληψη του χαλκού από το καλαμπόκι, δεν μεταφέρει ψευδάργυρο και η μεταφορά Zn-PS μπορεί να συμβαίνει μέσω ενός άλλου μορίου μεταφορέα, π.χ. ένα από τα άλλα μέλη της οικογένειας YSL στο καλαμπόκι. Εκτός από το ρόλο του στα φύλλα για την μεταφορά των συμπλόκων Fe(III)-PS και Fe(II)-NA, ο YS1 μεταφέρει μέσω των PS και τοξικά μέταλλα, έτσι ο YS1 φαίνεται να μπορεί να μεταφέρει το κοβάλτιο (Roberts et al. 2004). Αντίθετα, ο σχηματισμός χηλικής ένωσης του Cd(II)-DMA είναι πολύ ασθενέστερος από εκείνο του Fe(III)-DMA και Zn(II)-DMA, και έτσι το DMA δεν θα πρέπει να λειτουργεί στην πρόσληψη αυτού του επιβλαβούς μετάλλου (Kobayashi and Nishizawa 2012). Ο YS1 εντοπίζεται στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας και η έκφρασή του στον αραβόσιτο δεν εμφανίζει σαφείς ημερήσιες διακυμάνσεις (Kobayashi et al. 2010).

Ο HnYS1 είναι ειδικός μεταφορέας για Fe(III)-PS που εμπλέκεται στην απόκτηση του Fe από το έδαφος στις ρίζες κριθαριού, εκφράζεται στις ρίζες υπό συνθήκες έλλειψης Fe. Η έκφρασή του μεταβάλλεται καθημερινά, ενδεχομένως έτσι ώστε η πρόσληψη Fe να μπορεί να συντονίζεται με την ημερήσια έκκριση των παραγώγων MA (Kobayashi et al. 2010). Οι διαφορές HnYS1 και ZmYS1 είναι: (1) ο HnYS1 εκφράζεται μόνο στην ρίζα κριθαριού, ενώ ο ZmYS1 εκφράζεται τόσο στις ρίζες όσο και στα φύλλα αραβόσιτου και (2) ο HnYS1 είναι υπεύθυνος για την πρόσληψη του Fe-PS σε ρίζες κριθαριού, ενώ ο ZmYS1 μπορεί επίσης να εμπλέκεται στην εσωτερική μεταφορά του Fe (Murata et al. 2006).

Η πρόσληψη του Fe από τα φυτά ρυζιού πραγματοποιείται ως Fe³⁺-PS και ως Fe²⁺ (Σχήμα 1.2). Το ρύζι προσαρμόζεται καλά υπό συνθήκες κατάκλυσης, όπου ο Fe²⁺ είναι πιό άφθονος από ότι ο Fe³⁺ και έχει ένα μοναδικό σύστημα πρόσληψης Fe, να απορροφά άμεσα Fe²⁺, στερείται όμως αποτελεσματικών Fe(III)-χηλικών αναγωγασών (FRO). Στο ρύζι ο Fe²⁺ μεταφέρεται από τους μεταφορείς OsIRT1 και OsIRT2 που εκφράζονται κυρίως στις ρίζες, επάγονται υπό συνθήκες έλλειψης Fe, εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και είναι περισσότερο επιλεκτικοί για απορρόφηση Fe από ότι για άλλα δισθενή κατιόντα. Ο μεταφορέας OsIRT1 εκφράζεται στα φύλλα και στους βλαστούς. Ο Fe²⁺ μεταφέρεται μέσα στα κύτταρα από τον OsIRT1 και συμπλοκοποιείται από την NA. Το ρύζι είναι φυτό της στρατηγικής II και συνθέτει DMA, η ποσότητα του DMA που εκκρίνεται είναι πολύ μικρότερη από εκείνη που εκκρίνεται από τα άλλα είδη

αγρωστωδών. Το σύμπλοκο Fe^{3+} -DMA απορροφάται πιο γρήγορα από ότι ο Fe^{2+} (Ishimaru et al. 2006). Το αντίστοιχο γονίδιο για την πρόσληψη του συμπλόκου Fe^{3+} -DMA στο ρύζι είναι το OsYSL15 και η έκφρασή του μεταβάλλεται καθημερινά, έτσι ώστε η πρόσληψη Fe να μπορεί να συντονίζεται με την ημερήσια έκκριση του DMA (Kobayashi et al. 2010).

1.2.3 Μετακίνηση του σιδήρου μέσα στο φυτό

Λόγω της κακής διαλυτότητας και υψηλής δραστηριότητας του Fe, η μετακίνησή του μέσα στο φυτό θα πρέπει να συνδέεται με κατάλληλα μόρια χηλικών ενώσεων και κατάλληλο έλεγχο των καταστάσεων οξειδοαναγωγής μεταξύ της δισθενούς και τρισθενούς μορφής. Η μετακίνηση του Fe στα φυτά περιλαμβάνει διάφορα βήματα, στα οποία συμπεριλαμβάνεται η ακτινική μεταφορά σε όλους τους ιστούς της ρίζας, η οποία πρέπει να περιλαμβάνει συμπλασμική μεταφορά για να περάσει μέσα από την λωρίδα του Caspary, εισαγωγή στο ξύλο, μεταφορά και εξαγωγή, εισαγωγή στον ηθμό, μεταφορά και εξαγωγή, συμπλασμική μετακίνηση προς τα σημεία ζήτησης, και επαναμετακίνηση από τον ιστό-πάροχο ή από γερασμένο ιστό (Σχήμα 1.3). Οι κύριοι χηλικοί παράγοντες μέσα στο φυτό είναι το κιτρικό, η νικοτιαναμίνη (NA) και τα μουγινεικά οξέα (MA) (Kobayashi and Nishizawa 2012).

Ο Fe εισέρχεται στον αποπλάστη των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας και διαχέεται. Μέρος του Fe οξειδώνεται και καθιζάνει ως υδροξείδιο ή φωσφορικό άλας σχηματίζοντας μία αποπλασμική δεξαμενή Fe. Όταν ο Fe εισέρχεται στον συμπλάστη της ρίζας μέσω συστημάτων μεταφοράς των μεμβρανών, πρέπει να προστατευτεί από το οξυγόνο για να εμποδιστεί η καθίζηση κι η δημιουργία ριζών υδροξυλίου. Η NA σχηματίζει χηλική ένωση με τον Fe και μάλιστα σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα και με τις δύο μορφές Fe σε ουδέτερα και ελαφρώς αλκαλικά pH. Αν και η σταθερά συγγένειας της NA για τον Fe^{3+} είναι 20,6 και μόνο 12,8 για τον Fe^{2+} , το σύμπλοκο Fe^{2+} -NA κατέχει μία ασυνήθιστη κινητική σταθερότητα, που εξηγεί γιατί η NA συμπλοκοποιείται με Fe^{2+} και όχι με Fe^{3+} (Curie and Briat 2003, Briat 2011). Η ακτινική μεταφορά Fe από την επιδερμίδα της ρίζας στα αγγεία του ξύλου πραγματοποιείται ως σύμπλοκο NA-Fe(II) συμπλασμικά. Η NA μεταφέρει Fe, Cu και άλλα μικροστοιχεία τόσο μεταξύ των κυττάρων όσο και στον ηθμό (Hell and Stephan 2003).

Εκτός από την NA, εμπλέκονται και πεπτιδία ή πρωτεΐνες στη μεταφορά του Fe και άλλων μικροστοιχείων στον ηθμό. Μία πρωτεΐνη μεταφοράς σιδήρου (ITP) στον ηθμό του *Ricinus communis* σχηματίζει χηλικές ενώσεις με Fe^{3+} και άλλα μέταλλα όπως Cu^{2+} , Zn^{2+} και Mn^{2+} (Krueger et al. 2002). Αφού υπάρχει χαμηλή αλλά σημαντική και σταθερή κατάσταση συγκέντρωσης του Fe^{2+} στον ηθμό και αφού το μεγαλύτερο μέρος του Fe στον ηθμό σχηματίζει χηλική ένωση στην μορφή Fe^{3+} από την ITP, εικάζεται ότι η NA συμμετέχει στη μεταφορά συμπλοκοποιώντας Fe^{2+} από τον ITP-δεσμευμένο Fe^{3+} κατά την διάρκεια φόρτωσης και εκφόρτωσης του ηθμού. Αυτή η υπόθεση έχει δύο συνέπειες. Πρώτον, ειδικοί μεταφορείς Fe^{2+} -NA πρέπει να βρίσκονται για την φόρτωση και εκφόρτωση στον ηθμό, όπου οι μεταφορείς YSL αντιπροσωπεύουν τους πιθανότερους υποψήφιους για να πραγματοποιήσουν αυτό το έργο. Δεύτερον, ένα οξειδοαναγωγικό σύστημα πρέπει να λειτουργεί μέσα στον ηθμό που (α) οξειδώνει το Fe από Fe^{2+} -NA και έτσι παράγεται Fe^{3+} για να δεσμευτεί με την ITP, και (β) ανάγει το Fe από Fe^{3+} -ITP παράγοντας Fe^{2+} , την προτιμητέα μορφή Fe για να δεσμευτεί με την NA. Δεν υπάρχει κανένα υποψήφιο συμπλεκτικό μόριο για την δραστηριότητα αυτή, αν και η πρωτεΐνη ITP θα μπορούσε να υποστηρίξει μία τέτοια δραστηριότητα (Curie and Briat 2003, Briat 2011).

Εκτός από τη συμμετοχή της στην βιοσύνθεση PS, η NA είναι το κύριο συμπλεκτικό μόριο του ελεύθερου Fe στα κύτταρα και μία προσωρινή δεξαμενή αποθήκευσης Fe. Έτσι, τα σύμπλοκα NA-σιδήρου είναι αδύναμα αντιδραστήρια Fenton (Πίνακας 1) (Hell and Stephan 2003). Στην NA έχει αποδοθεί ρόλος στην ομοιοστάση των μετάλλων σε διαφορετικά επίπεδα, όπως μεταφορά σε μεγάλη απόσταση, διαμερισματοποίηση, ή σήμα της κατάστασης του μετάλλου (Curie and

Briat 2003). Οι συγκεντρώσεις NA αυξάνονται στα ακρορριζία, στις περιοχές πρόσληψης του Fe και ακτινικής μεταφοράς. Ο Fe οξειδώνεται όταν ελευθερώνεται μέσα στα αγγεία του ξύλου και μεταφέρεται ως σύμπλοκο Fe(III)-κιτρικό (σε pH 5.5-6 ο Fe μεταφέρεται από την NA στο κιτρικό) (Hell and Stephan 2003).

Οι μεταφορείς εκροής είναι πρωτεΐνες που μεταφέρουν συγκεκριμένες ουσίες από το κυτταρόπλασμα έξω από το κύτταρο μέσω της μεμβράνης περιορισμού ή σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Οι μεταφορείς εισροής είναι πρωτεΐνες που μεταφέρουν συγκεκριμένες ουσίες μέσω της μεμβράνης περιορισμού από εξωκυτταρικά ή ενδοκυτταρικά διαμερίσματα στο κυτταρόπλασμα. Έτσι, η εισαγωγή στο ξύλο θεωρείται ότι απαιτεί μεταφορείς εκροής, ενώ η εισαγωγή στον ηθμό θα απαιτήσει μεταφορείς εισροής. Μεταξύ των μεταφορέων εισροής, μέλη της οικογένειας YSL εμπλέκονται ευρέως στην μετακίνηση του Fe και βρίσκονται και σε μη-αγρωστώδη φυτά, τα οποία δεν συνθέτουν παράγωγα MA. Οι μεταφορείς YSL στα μη αγρωστώδη φυτά εμπλέκονται στην μετακίνηση των μετάλλων που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με NA (Kobayashi and Nishizawa 2012). Ένα κοινό χαρακτηριστικό των γονιδίων YSL είναι ότι η έκφρασή τους περιορίζεται στο αγγειακό σύστημα. Ο ακριβής εντοπισμός της έκφρασής τους σε ένα τύπο αγγείου δεν έχει συστηματικά αναφερθεί, εκτός από το AtYSL1 (παρέγχυμα ξύλου) και OsYSL2 (συνοδά κύτταρα ηθμού). Σε άλλες περιπτώσεις, η έκφραση φαίνεται να εξαπλώνεται γύρω από ή μεταξύ του ηθμού και του ξύλου. Οι πρωτεΐνες YSL θα μπορούσαν να συμμετέχουν στην μεταφορά των μετάλλων από το χυμό του ξύλου μέσω της πρόσληψης από τα παρεγχυματικά κύτταρα του ξύλου και στην τοποθέτηση στον ηθμό μέσω της πρόσληψης από τα συνοδά κύτταρα του ηθμού. Επιπρόσθετα, η λειτουργία τους στην ανταλλαγή ξύλου-ηθμού θα μπορούσε να είναι σημαντική σε όλους τους υποστηρικτικούς ιστούς, όπως τους μίσχους και τα στελέχη για την λεπτή ισορροπία της NA-μετάλλου, και επίσης σε νεαρά όργανα ή όπου το ξύλο δεν έχει ακόμη διαφοροποιηθεί ή διακόπτεται (Briat 2011). Το ρύζι, φυτό της στρατηγικής II, διαθέτει 18 μέλη YSL (OsYSL1-18). Η έκφραση του OsYSL2 επάγεται έντονα σε ελλειμματικά σε Fe φύλλα και μεταφέρει σε μεγάλες αποστάσεις Fe(II)-NA και Mn(II)-NA αλλά όχι Fe(III)-Παράγωγα MA, εκφράζεται στα συνοδά κύτταρα της ρίζας και στα κύτταρα του ηθμού των φύλλων. Τα παράγωγα MA παίζουν ένα ρόλο στην εσωτερική κατανομή του Fe στα αγρωστώδη φυτά. Ενδογενή παράγωγα MA ανιχνεύθηκαν στους βλαστούς του κριθαριού και ρυζιού και η ποσότητα των παραγώγων MA αυξήθηκε δραματικά υπό συνθήκες έλλειψης Fe. Το DMA επίσης ανιχνεύθηκε στον ηθμό και στο ξύλο του ρυζιού. Τα γονίδια που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση του DMA στο ρύζι, OsNAS1-3, OsNAAT1 και OsDMAS1 συνεκφράζονται στα συνοδά κύτταρα του ηθμού στις ρίζες και στα φύλλα. Το γονίδιο του μεταφορέα OsYSL15, ο οποίος μεταφέρει Fe(III)-DMA, πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνο τόσο για την απορρόφηση του Fe στην ρίζα όσο και για την εσωτερική μετακίνηση του Fe για μεταφορά σε μεγάλες αποστάσεις και εκφράζεται στα συνοδά κύτταρα του ηθμού των ριζών και φύλλων, καθώς και στα αναπαραγωγικά όργανα. Ένα άλλο γονίδιο μεταφορέα του Fe(III)-DMA, το OsYSL18 εκφράζεται σε περιορισμένα φυτικά μέρη, συμπεριλαμβανομένων των αναπαραγωγικών ιστών (γύρη και γυρεοσωλήνες) και στον ηθμό των ενώσεων ελάσματος, γεγονός που υποδηλώνει κάποιο ρόλο στην μεταφορά του Fe στον ηθμό (Kobayashi et al. 2010, Kobayashi and Nishizawa 2012).

Τα οργανικά οξέα είναι επίσης συμπλοκοποιητικά μόρια μετάλλων μέσα στο φυτό. Ειδικότερα, το σύμπλοκο Fe(III)-κιτρικό είναι η κυρίαρχη μορφή του Fe στο χυμό του ξύλου. Το γονίδιο OsFRDL1, που εκφράζεται στα κύτταρα του περικυκλίου της ρίζας δίπλα στα πρωτοξυλικά και μεταξυλικά αγγεία λειτουργεί ως μεταφορέας εκροής κιτρικού μέσα στο ξύλο για την αποτελεσματική μετακίνηση του Fe.

Ο μεταφορέας TOM1 εκροής του DMA και ο μεταφορέας δισθενούς σιδήρου OsIRT1 εκφράζονται επίσης στους αγγειακούς ιστούς στο ρύζι, γεγονός που σημαίνει την εμπλοκή αυτών των μεταφορέων όχι μόνο στην πρόσληψη του Fe αλλά επίσης στην μετακίνηση του Fe μέσα στο φυτό. Οι μεταφορείς εκροής της NA

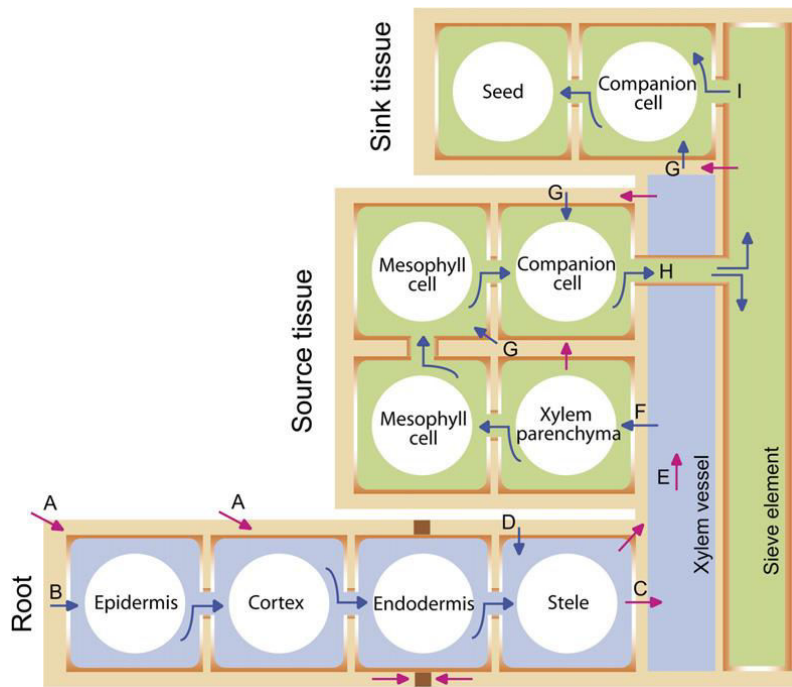
στο ρύζι ENA1 και ENA2, καθώς και τα ορθόλογά τους στα μη-αγρωστώδη, θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην μεταφορά της NA μέσα στο φυτό (Kobayashi et al. 2010, Kobayashi and Nishizawa 2012).

Όταν ο Fe εφαρμόστηκε στα φύλλα, αρχικά μετακινήθηκε μέσω της συμπλασμικής διαδρομής και στην συνέχεια μέσω του ηθμού. Όταν ο Fe τροφοδοτείται μέσω του ξύλου η ποσότητα που καταλήγει στα ανώτερα σημεία του φυτού υπολείπεται της αρχικής. Τα δύο στάδια κατανομής του Fe πρώτα από το ξύλο και στην συνέχεια από τον ηθμό οφείλονται στην αναποτελεσματικότητα των αναπτυσσόμενων οργάνων να λαμβάνουν το νερό μέσω της δραστηριότητας της διαπνοής λόγω των ατελών δομών του ξύλου. Η μεταφορά μέσω του ηθμού είναι ιδιαίτερα σημαντική (Hell and Stephan 2003). Η επανακινητοποίηση του σιδήρου από τα παλαιότερα στα νεαρότερα φύλλα πραγματοποιείται κυρίως διαμέσου του ηθμού. Δεδομένου ότι το pH του χυμού του ηθμού είναι >7, ο σίδηρος πρέπει να συνδέεται με χηλικές ενώσεις προκειμένου να παραμένει διαλυτός. Η NA λειτουργεί στην μεταφορά του σιδήρου στον ηθμό, με βάση την πανταχού παρουσία της στους φυτικούς ιστούς και την ικανότητά της να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με Fe^{2+} σε ουδέτερο και ελαφρώς αλκαλικό pH (Kim and Guerinot 2007). Η κινητοποίηση του Fe στα αναπτυσσόμενα όργανα γίνεται από την συμπλασμική διαδρομή και οι λόγοι γι' αυτήν την υπόθεση είναι: (α) ότι η αποπλασμική κίνηση συνεπάγεται αποπλασμικές δεξαμενές Fe αναποτελεσματικές για την μεταφορά του και (β) ότι οι νεαροί ιστοί και τα μεριστώματα έχουν υψηλή πυκνότητα πλασμοδεσμών και παρέχουν γρήγορη διανομή των μικρών μορίων. Η συμπλασμική διαδρομή πραγματοποιείται με το σύμπλοκο NA- Fe (Hell and Stephan 2003).

1.2.4 Ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση και κυτταρική ομοιόσταση του σιδήρου.

Μόλις ο Fe εισέλθει στο φυτικό κύτταρο, μπορεί είτε να ενσωματωθεί στις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος, είτε να προωθηθεί σε κατάλληλα διαμερίσματα για χρησιμοποίηση στην κυτταρική λειτουργία και για να αποτραπεί η συσσώρευσή του σε περίσσεια, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταροτοξικότητα (Kobayashi and Nishizawa 2012). Τα χυμοτόπια είναι πιθανόν να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και ομοιόσταση του σιδήρου και να λειτουργούν ως μία δεξαμενή μετάλλου για να αποφευχθεί η τοξικότητα. Μεταφορείς των συμπλόκων Fe-NA πρέπει να βρίσκονται στους τονοπλάστες. Στον αραβόσιτο, μια αναγωγή του κυτοχρώματος b_5 με μία δραστηριότητα αναγωγής χηλικής ένωσης τρισθενούς Fe *in vitro* είναι προσαρτημένη στον τονοπλάστη μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής που βρίσκεται στο N-άκρο της, γεγονός που την καθιστά ένα καλό υποψήφιο μόριο για την μεταφορά Fe προς ή από τα χυμοτόπια του φυτού (Curie and Briat 2003).

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν πρωτεΐνες σιδήρου σημαντικές για την αναπνοή, και φιλοξενούν μία μηχανή βιογένεσης συμπλέγματος σιδήρου-θείου που σχετίζεται στενά με την ρύθμιση της ομοιόστασης του Fe, γι' αυτό ο σίδηρος πρέπει να εισάγεται σ' αυτό το οργανίδιο (Briat 2011). Ο μεταφορέας του μιτοχονδριακού Fe (MIT) προσδιορίστηκε πρόσφατα. Η έκφραση του MIT επάγεται από περίσσεια Fe και καταστέλλεται υπό έλλειψη Fe (Kobayashi and Nishizawa 2012).



Σχήμα 1.3

Μεταφορά Fe από το έδαφος στον σπόρο. Τα κόκκινα βέλη αντιπροσωπεύουν υποθετική ροή του αποπλασμικού Fe, τα μπλε βέλη δείχνουν την κίνηση του Fe μέσα στον συμπλασμικό χώρο. Μετά την αρχική διάχυση από το έδαφος (A), ο Fe εισέρχεται μέσα στα επιδερμικά κύτταρα ή στα κύτταρα του φλοιώδους παρεγχύματος (B). Μόλις εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, ο Fe κινείται συμπλασμικά στον κεντρικό κύλινδρο και μετά εξέρχεται στο αγγείο του ξύλου (C). Η αποπλασμική ροή παρεμποδίζεται από την λωρίδα του Caspary (απεικονίζεται με καφέ κουτιά). Ο Fe του αποπλασμικού χώρου της ρίζας επαναπορροφάται υπό συνθήκες έλλειψης Fe (D). Ο Fe μεταφέρεται στον βλαστό μέσω του ρεύματος της διαπνοής (E) και εισέρχεται μέσα στο κυτταρόπλασμα του φύλλου (F). Ο Fe του αποπλασμικού χώρου του βλαστού κινητοποιείται με βάση την ζήτηση των νεαρότερων ιστών (ιστοί αποδέκτες) (G). Ο Fe κινείται συμπλασμικά από έναν ώριμο ιστό σε ένα νεαρό ιστό μέσω της εισαγωγής του στον ηθμό (H) και της εξαγωγής από τον ηθμό (I) (Kim and Guerinot 2007).

Το μεγαλύτερο μέρος του σιδήρου στα φύλλα βρίσκεται μέσα στους χλωροπλάστες, στους οποίους διεξάγεται η φωτοσυνθετική λειτουργία. Ο χλωροπλάστης είναι η μεγαλύτερη δεξαμενή Fe στα φυτικά κύτταρα συσσωρεύοντας περίπου το 80% - 90% του κυτταρικού Fe. Υπάρχει μεγάλη ζήτηση για Fe από την φωτοσυνθετική συσκευή και για το λόγο αυτό η έλλειψη Fe εμποδίζει την μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων, οδηγώντας σε φωτοοξειδωτικές βλάβες (Kobayashi and Nishizawa 2012). Η μεταφορά του σιδήρου μέσα στα πλαστίδια είναι επομένως πρωταρχικής σημασίας για τη φυσιολογία του φυτού, αλλά αυτή η υποκυτταρική διαδικασία μεταφοράς του σιδήρου δεν είναι επαρκώς τεκμηριωμένη. Το φως φαίνεται να είναι απαραίτητο για την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς του σιδήρου από τις νευρώσεις του φύλλου στα κύτταρα του μεσοφύλλου. Μελέτες για την πρόσληψη σιδήρου με απομονωμένους χλωροπλάστες στο κριθάρι έδειξαν ότι αυτή η διαδικασία εξαρτάται από το φως και απαιτεί την δραστηριότητα αναγωγής χηλικής ένωσης Fe(III). Άμεση μεταφορά Fe(II) προς τα μέσα διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης του χλωροπλάστη πραγματοποιείται από ένα δυναμικό-διεγερόμενο μηχανισμό (Curie and Briat 2003, Briat 2011). Τα πλαστίδια και τα μιτοχόνδρια είναι διαμερίσματα όχι μόνο για ενζυμικές αντιδράσεις με την μεσολάβηση του Fe και για μεταφορά ηλεκτρονίων, αλλά επίσης και για την βιογένεση συμπλόκων Fe-S που σχετίζονται στενά με την ρύθμιση της ομοιόστασης του Fe (Kobayashi and Nishizawa 2012).

Η κυτταρική ομοιόσταση του σιδήρου δεν εξαρτάται μόνο από τις δραστηριότητες των μεταφορέων που είναι υπεύθυνοι για την κατάλληλη κατανομή του σιδήρου μέσα στα διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα.

Τουλάχιστον δύο είδη διαλυτών πρωτεϊνών, οι φερριτίνες και η φραταξίνη, παίζουν βασικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό του σιδήρου, και συγκεκριμένα μέσα στα πλαστίδια και μιτοχόνδρια. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες εμπλέκονται στην αποθήκευση και στην ρύθμιση της δράσης του σιδήρου. Οι φερριτίνες βρίσκονται κυρίως μέσα στα πλαστίδια (χλωροπλάστες και μη πράσινα πλαστίδια), αλλά μπορούν επίσης να ανιχνευθούν στα μιτοχόνδρια, ενώ η φραταξίνη είναι αποκλειστικά μία μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, η οποία πρόσφατα εντοπίστηκε σε φυτά και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση των μιτοχονδρίων και στη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης του σιδήρου, πιθανόν μέσω ενός ρόλου στην βιοσύνθεση του συμπλόκου σιδήρου-θείου. Αυτά τα διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα πιθανόν να συνεργάζονται για την δημιουργία της ομοιόστασης του σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο (Briat 2011).

Η σημασία των φερριτινών στην κυτταρική ομοιόσταση του Fe οφείλεται στην ικανότητά τους να αποθηκεύουν μέχρι 4.500 άτομα Fe στην κεντρική τους κοιλότητα σε μία διαλυτή, βιοδιαθέσιμη, μη τοξική μορφή. Οι φερριτίνες δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένες στα διάφορα όργανα του φυτού κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής του. Σε κανονικές συνθήκες θρέψης με Fe οι φερριτίνες δεν είναι ανιχνεύσιμες στα βλαστητικά όργανα (ρίζες και φύλλα), αλλά συσσωρεύονται στους σπόρους κατά την διάρκεια της ωρίμανσης και αποδομούνται από τον άξονα του εμβρύου και τις κοτυληδόνες κατά την διάρκεια των πρώτων ημερών βλάστησης. Εκτός από αυτόν τον αναπτυξιακό έλεγχο, έχει αποδειχθεί ότι οι φερριτίνες επάγονται 40-50 φορές με την υπερφόρτωση του Fe. Η συσσώρευση φερριτίνης σταματά, παρόλο που η συγκέντρωση του ολικού Fe συνεχίζει να αυξάνει. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι (α) ο αριθμός των ατόμων του Fe ανά μόριο φερριτίνης μπορεί να ποικίλλει και να αυξάνεται με το χρόνο μετά την εφαρμογή Fe, (β) ο Fe της φερριτίνης αντιπροσωπεύει μόνο ένα μέρος της συγκέντρωσης του ολικού Fe σε ρίζες και φύλλα, (γ) τα χυμοτόπια θα μπορούσαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση του Fe στα φυτά και (δ) μέρος του Fe που προσλαμβάνεται διανέμεται στις μεταβολικές πορείες που αφορούν ένζυμα του Fe (Lobreaux et al. 1992).

Ένα μεγάλο μέρος της επαγόμενης από την περίσσεια Fe βιοσύνθεσης της φερριτίνης επιτυγχάνεται μέσω μιας πορείας που εμπλέκει μία αύξηση στο επίπεδο της ορμόνης αμπισισικού οξέος (ABA) του φυτού. Εξωγενές ABA επάγει συσσώρευση φερριτίνης αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι παρατηρείται μετά την μεταχείριση με περίσσεια Fe. Επειδή τόσο ο Fe όσο και το ABA επάγουν τη συσσώρευση φερριτίνης, είναι πιθανόν οι μηχανισμοί απόκρισης του φυτού στο Fe και το ABA να είναι κοινοί. Το μεγαλύτερο μέρος του ABA στα φυτά βρίσκεται μέσα στα πλαστίδια, οι φερριτίνες βρίσκονται επίσης μέσα στα πλαστίδια. Σε περίσσεια Fe, αυξάνεται η πρόσληψη Fe από τα πλαστίδια, οδηγώντας σε οξειδωτική καταπόνηση που αυξάνει την συγκέντρωση του ABA μέσω φωτοχημικής ή και ενζυμικής διάσπασης των ξανθοφυλλών. Κατά συνέπεια, το ABA μέσω μιας πορείας μεταγωγής θα μπορούσε να ενεργοποιήσει την έκφραση του γονιδίου της φερριτίνης και στη συνέχεια την σύνθεση της φερριτίνης στα πλαστίδια με σκοπό να αποθηκεύσει την περίσσεια Fe (Lobreaux et al. 1993). Η οξειδωτική καταπόνηση ως απόκριση στην τοξικότητα του Fe οδηγεί στην συσσώρευση της φερριτίνης (Lobreaux et al. 1995).

1.2.5 Η ρύθμιση των αποκρίσεων σιδήρου

Τα φυτά επάγουν ή καταστέλλουν διάφορα γονίδια που σχετίζονται με την ομοιόσταση του Fe ως απόκριση στην έλλειψη ή την περίσσεια του στοιχείου. Τα πρώτα ταυτοποιημένα στοιχεία που σχετίζονται με την έλλειψη των ιχνοστοιχείων στα φυτά είναι τα IDE1 και IDE2 (iron-deficiency-responsive element 1 και 2). Οι μηχανισμοί ρύθμισης γονιδίων που περιλαμβάνουν IDEs βρίσκονται τόσο στα αγρωστώδη όσο και στα μη-αγρωστώδη είδη. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο μεταγραφικοί παράγοντες ρυθιού, ο IDE-δεσμευτικός παράγοντας 1 (IDEF1) και IDEF2, οι οποίοι συνδέονται ειδικά στα IDE1 και IDE2, αντίστοιχα. Οι IDEF1 και

IDEF2 εκφράζονται συνεχώς σε βλαστητικούς και αναπαραγωγικούς ιστούς χωρίς την επαγωγή από την έλλειψη Fe, γεγονός που υποδηλώνει την άμεση σχέση τους στην αντίληψη του σήματος της έλλειψης Fe. Ο IDEF1 ρυθμίζει θετικά την πλειονότητα των γνωστών γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη/χρησιμοποίηση του Fe υπό συνθήκες επάρκειας Fe και στα πρώτα στάδια της έλλειψης Fe, ενώ μπορεί να οδηγήσει σε τροποποίηση της έκφρασης των γονιδίων στο επόμενο στάδιο έλλειψης Fe. Αντίθετα, ο IDEF2 μπορεί να μην αλλάζει τα γονίδια κατά την διάρκεια της έλλειψης Fe. Ο παράγοντας αυτός ρυθμίζει θετικά το γονίδιο *OsYSL2*, επιτρέποντας την κατάλληλη κατανομή του Fe στα φυτά ρυζιού. Οι πορείες ρύθμισης γονιδίων με την μεσολάβηση των μεταγραφικών παραγόντων IDEF1 και IDEF2 επικαλύπτονται μερικώς, αφού εκφράζονται σε πολλά φυτικά μέρη, όπως σε ηθμαγγειώδεις δεσμίδες ρίζας, πλάγιες ρίζες και ελάσματα φύλλου, καθώς επίσης και σε αναπαραγωγικούς ιστούς όπως στη γύρη, υποδηλώνοντας τον ευρύ ρόλο τους.

Μεταξύ των ρυθμιστών που επάγονται στην έλλειψη Fe των ριζών και των βλαστών αγρωστώδων είναι τα γονίδια τύπου bHLH *OsIRO2* (iron-related transcription factor 2) και *OsIRO3* στο ρύζι. Η έκφραση του *OsIRO2* ρυθμίζεται θετικά από το IDEF1. Το *OsIRO2* ρυθμίζει θετικά διάφορα γονίδια που σχετίζονται με την στρατηγική II (*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAAT1*, *OsDMAS1*, *TOM1* και *OsYSL15*) και γονίδια που εμπλέκονται στο κύκλο της μεθειονίνης. Το *OsIRO2* επίσης επηρεάζει την έκφραση ορισμένων, επαγόμενων από την έλλειψη Fe, μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι μπορεί να εμπλέκονται στην έμμεση ρύθμιση των μεταγενέστερων γονιδίων *OsIRO2*. Το *OsIRO3* φαίνεται να παίζει κατασταλακτικό ρόλο σε διάφορα επαγόμενα από την έλλειψη Fe γονίδια.

Αρκετά κοινά μόρια σηματοδότησης επηρεάζουν την απόκριση στην έλλειψη Fe. Το μονοξειδίο του αζώτου (NO), ένα βιοενεργό μόριο που εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, βελτιώνει την διαθεσιμότητα του Fe μέσα στα αγρωστώδη και στα μη-αγρωστώδη φυτά. Το αιθυλένιο είναι ορμόνη που συσσωρεύεται υπό συνθήκες έλλειψης Fe στα αγρωστώδη και μη αγρωστώδη φυτά, όπου δρα θετικά στην επαγωγή των διαφόρων γονιδίων. Η απόκριση στην έλλειψη Fe επίσης επηρεάζεται από μία περίσσεια ή ανεπάρκεια των άλλων στοιχείων, κυρίως λόγω του ανταγωνισμού μεταξύ του Fe και των άλλων στοιχείων σε διάφορες μοριακές διεργασίες, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η μεταφορά, ο σχηματισμός χηλικής ένωσης και η σύνδεση με πρωτεΐνες. Οι αποκρίσεις στην έλλειψη Fe στις ρίζες φαίνεται ότι ρυθμίζονται από σήματα του βλαστού που μεταδίδονται σε μεγάλες αποστάσεις και από τον Fe στην ριζόσφαιρα ή από την ίδια την ρίζα.

Ως απόκριση στην περίσσεια Fe τα φυτά επάγουν ένα υποσύνολο γονιδίων που σχετίζονται με την ομοίωση του Fe, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που κωδικοποιούν την φερριτίνη, μία πανταχού παρούσα πρωτεΐνη για την αποθήκευση του Fe. Το NO ρυθμίζει δύο αντίθετες αποκρίσεις στην διαθεσιμότητα του Fe, την έλλειψη Fe και την περίσσεια Fe (Kobayashi et al. 2010, Kobayashi and Nishizawa 2012).

1.2.6 Η σηματοδότηση της έλλειψης Fe σε μεγάλη απόσταση μέσα στα φυτά

Στους μηχανισμούς ρύθμισης της πρόσληψης Fe συμπεριλαμβάνεται η σηματοδότηση σε μεγάλη απόσταση από τους βλαστούς στις ρίζες. Η σηματοδότηση του μηχανισμού απορρόφησης Fe στις ρίζες συμβαίνει όταν μειώνεται η συγκέντρωση του Fe στο κυτταρόπλασμα των βλαστών, αλλά η πορεία του σήματος είναι άγνωστη. Για να κατανοήσουμε το σύστημα της ομοίωσης Fe των φυτών, θα πρέπει να αποκαλυφθούν τα γονίδια που σχετίζονται με τους αισθητήρες της κατάστασης του Fe σε κυτταρικό επίπεδο, το σύστημα μεταγωγής

σήματος που φέρει τις πληροφορίες της κατάστασης του Fe και τον ίδιο τον μηχανισμό πρόσληψης Fe από το έδαφος (Enomoto and Goto 2013).

Σήματα μεγάλων αποστάσεων που σχετίζονται με την ρύθμιση της πρόσληψης Fe - Έχουν προταθεί δύο μοντέλα σηματοδότησης που σχετίζονται με την απορρόφηση του Fe: το προαγωγικό και το κατασταλτικό μοντέλο (Vert et al. 2003). Στο προαγωγικό μοντέλο τα σήματα μεταφέρονται από τα ελλειμματικά σε Fe φύλλα στις ρίζες και εκφράζονται τα γονίδια που εμπλέκονται στην απορρόφηση του Fe, ενώ δεν μεταφέρονται σήματα από τα επαρκή σε Fe φύλλα. Στο κατασταλτικό μοντέλο, σήματα μεταφέρονται από τα επαρκή σε Fe φύλλα στις ρίζες και καταστέλλονται οι εκφράσεις γονιδίων. Οι Enomoto et al. (2007) υποστήριξαν το προαγωγικό μοντέλο το οποίο ήταν καλύτερο για να εξηγήσει την μεταγωγή σήματος της έλλειψης Fe στα φύλλα. Επίσης, υπάρχει ένας κοινός μηχανισμός της μεταγωγής του σήματος μεγάλης απόστασης μεταξύ των φυτών της στρατηγικής I και II (Enomoto et al. 2009). Τελευταία προτάθηκε ότι στο σήμα της έλλειψης Fe εμπλέκονται η αυξίνη και το αιθυλένιο (Chen et al. 2010). Το NO λειτουργεί ως μία ουσία μετάδοσης σήματος στα επόμενα στάδια της πορείας σήματος της αυξίνης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο μηχανισμός ασφαλείας λειτουργεί για να αποτραπούν οι υπερβολικές διαταραχές του Fe.

Μοντέλα της μεταγωγής σήματος μεγάλης απόστασης για την πρόσληψη Fe - Στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται τρία μοντέλα μεταγωγής σήματος από τον βλαστό προς τη ρίζα που σχετίζονται με την έλλειψη Fe:

α) Το μοντέλο της αυξίνης: Η σύνθεση του ινδολοξεικού οξέος (IAA) ενισχύεται στο μερίστωμα ως απόκριση στην έλλειψη Fe και το IAA στέλνεται στις ρίζες. Το IAA λειτουργεί ως προωθητικό σήμα έτσι ώστε τα γονίδια που εμπλέκονται στην απορρόφηση Fe εκφράζονται μέσω της πορείας μεταγωγής σήματος NO.

β) Το μοντέλο IDEF1: Ο IDEF1 εκφράζεται τόσο στους βλαστούς όσο και στις ρίζες ως απόκριση στην έλλειψη Fe (Kobayashi et al. 2007), κινείται μεταξύ των ιστών με αποτέλεσμα την μετάδοση της πληροφορίας της κατάστασης Fe, και ελέγχει την έκφραση των μεταγενέστερων γονιδίων που σχετίζονται με την απορρόφηση του Fe υπό συνθήκες έλλειψης Fe. Όταν αρκετός Fe εφοδιάζεται, τότε συνδέεται με τον IDEF1 και το Fe-IDEF1 δεν επάγει τις εκφράσεις γονιδίων (Kobayashi et al. 2007, Kobayashi and Nishizawa 2012).

γ) Το μοντέλο της NA: Η NA έχει προταθεί ως ένα μόριο αισθητήρας για την συγκέντρωση του Fe σε ένα κύτταρο, είναι αποτοξινωτής της περίσσειας Fe ή ένα ουσιώδες μόριο για την μεταφορά Fe μεταξύ των ιστών (Pich et al. 2001). Θεωρείται ότι είναι ένα μόριο μεταγωγής σήματος σε μεγάλες αποστάσεις (Curie και Briat 2003). Η παρουσία της NA επιβεβαιώνεται τόσο στο ξύλο όσο και στον ηθμό (Takahashi et al. 2003, Kakei et al. 2012). Το σύμπλοκο Fe-NA καταστέλλει την απορρόφηση Fe από τις ρίζες υπό συνθήκες επάρκειας Fe. Υπό συνθήκες έλλειψης Fe αυξάνεται η ελεύθερη NA και το σύμπλοκο Fe-NA αντικαθίσταται με ελεύθερη NA, συνεπώς Fe απορροφάται από τις ρίζες (Enomoto and Goto 2013).

1.2.7 Σήματα από χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια για ρύθμιση της ομοιόστασης του Fe

Ευθεία και ανάδρομη σηματοδότηση πορειών - Ως απόκριση στα ενδογενή και περιβαλλοντικά ερεθίσματα που γίνονται αντιληπτά από τον πυρήνα, ένας ευθύς μηχανισμός μεταδίδει σήματα προς τα οργανίδια με σκοπό την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων των οργανιδίων κυρίως γίνεται μέσω μετα-μεταγραφικού μηχανισμού και αφορά πρωτεΐνες κωδικοποιούμενες από τον πυρήνα που ενεργούν ως ρυθμιστές. Αντίθετα, οι ανάδρομοι μηχανισμοί μεταφέρουν σήματα που προέρχονται από τα οργανίδια για να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων του πυρήνα, τα οποία μπορούν μετά να αλλάξουν τον ευθύ έλεγχο. Αυτοί οι μηχανισμοί επιτρέπουν την επικοινωνία της

λειτουργικής και αναπτυξιακής κατάστασης των οργανιδίων στον πυρήνα, οι οποίοι μπορούν έτσι να ρυθμίσουν τον κυτταρικό μεταβολισμό (Leister 2012). Στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, αυτή η ρύθμιση είναι πιο περίπλοκη λόγω των αλληλοπαρεμβολών μεταξύ μιτοχονδρίων και χλωροπλαστών. Η στενή συνεργασία μεταξύ του πυρήνα και των οργανιδίων είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των ευκαρυωτικών κυττάρων: οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια δεν έχουν μόνο μεγάλη ενεργειακή σημασία, αλλά συνθέτουν και πολλούς, διαφορετικούς μεταβολίτες, όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα, ισοπρενοειδή, νουκλεοτίδια, βιταμίνες και πορφυρίνες. Στη βιβλιογραφία επίσης εξετάζονται οι πιθανοί ρόλοι των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών ως κυτταρικών θέσεων ανίχνευσης και σηματοδότησης Fe, προσφέροντας μία νέα προοπτική για την ολοκληρωμένη ρύθμιση της ομοιόστασης του Fe και της αλληλεπίδρασης της με τον κυτταρικό μεταβολισμό.

Η μεταβολική προσαρμογή ενός φυτού στην κατάσταση σε Fe - O Fe είναι απαραίτητος σε ζωτικές μεταβολικές αντιδράσεις στα οργανίδια, όπως οι αναπνευστικές και φωτοσυνθετικές αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα η ανισορροπία του να επηρεάζει τον κυτταρικό μεταβολισμό. Τα φυτά αντιδρούν στις αλλαγές της διαθεσιμότητας Fe στο περιβάλλον για βέλτιστη αποτελεσματική απόκτηση, διανομή και χρησιμοποίηση του Fe, με την προσαρμογή του μεταβολισμού τους και την ρύθμιση της ομοιόστασης του Fe. Ως απόκριση στην έλλειψη Fe, τα φυτά ξεκινούν διάφορες μεταβολικές αλλαγές για να επιφέρουν αυξημένη ικανότητα απόκτησης Fe (Zocchi 2006, Viganì et al. 2012, Briat et al. 2003). Ενώ η χαμηλή περιεκτικότητα Fe οδηγεί σε υψηλή ζήτηση ενέργειας για να διατηρηθεί ο αυξημένος ρυθμός της απόκτησης Fe, περιορίζει την λειτουργία των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών τα οποία είναι οργανίδια που παράγουν ενέργεια και εξαρτώνται από το Fe. Για να αντιμετωπίσουν αυτή την ενεργειακή ζήτηση, τα κύτταρα πρέπει να αυξήσουν τον ρυθμό των εναλλακτικών διεργασιών αύξησης της ενέργειας. Τέτοιες αυξήσεις έχουν παρατηρηθεί στα φυτά και των δύο στρατηγικών (Lopez-Millan et al. 2000, Lopez-Millan et al. 2012, Li et al. 2008, Viganì and Zocchi 2009, Rellan-Alvarez et al. 2010, Donnini et al. 2010). Επειδή η φωτοσυνθετική συσκευή επηρεάζεται έντονα από την έλλειψη Fe, παρατηρείται ροή άνθρακα από την ρίζα στο φύλλο με την μορφή των καρβοξυλίων σε φυτά ελλειμματικά σε Fe (Abadia et al. 2002, 2011). Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός υπό έλλειψη Fe συσχετίζεται με την λειτουργική μεταβολή των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών. Οργανωσιακές διαδικασίες θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην ανίχνευση Fe. Μεταξύ αυτών είναι σημαντική η κατανομή Fe μεταξύ των διαφόρων υποκυτταρικών διαμερισμάτων και ελέγχεται από οργανωσιακούς μεταφορείς Fe (Bashir et al. 2010, Kobayashi and Nishizawa 2012, Conte and Walker 2011).

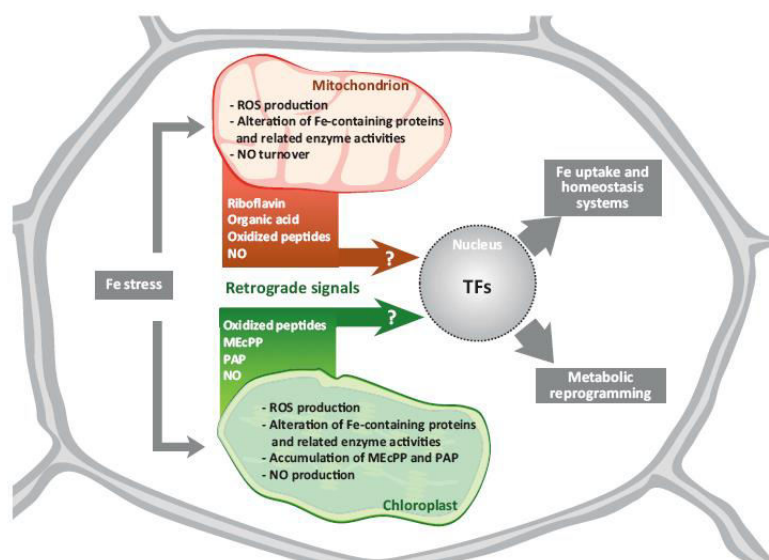
Οι επαγόμενες από έλλειψη Fe αλλαγές στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες - Τα μιτοχόνδρια είναι ένα σημαντικό υποκυτταρικό διαμέρισμα για το μεταβολισμό του Fe, επειδή ο Fe είναι σημαντικός συμπαράγοντας για αρκετές πρωτεΐνες που ανήκουν στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και στο κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων. Ακόμη, μέρος του συμπλέγματος Fe-S και βιοσύνθεσης της αίμης εδράζεται στα μιτοχόνδρια και συνδέεται με την ομοιόσταση του Fe. Συνεπώς, η μεταβολή της κυτταρικής κατάστασης του Fe επηρεάζει δραματικά την μιτοχονδριακή λειτουργία και έτσι τον κυτταρικό μεταβολισμό (Balk and Pilon 2011, Zocchi 2006, Viganì et al. 2012, Busi et al. 2006, Maliandi et al. 2011, Bashir et al. 2011). Η έλλειψη Fe μειώνει την δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Viganì and Zocchi 2009). Όμως ρίζες *Arabidopsis* ελλειμματικές σε Fe δείχνουν συσσώρευση ορισμένων αναπνευστικών μεταγραφημάτων και πρωτεϊνών (Thimm et al. 2001, Lan et al. 2011), υποδηλώνοντας την ύπαρξη αντισταθμιστικών συστημάτων ρύθμισης υπό έλλειψη Fe. Επίσης, υπό έλλειψη Fe, η επαγωγή της δραστηριότητας του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων οδηγεί στην έντονη παραγωγή των οργανικών οξέων, που

είναι ενδιάμεσα προϊόντα αυτού του κύκλου (Vigani et al. 2012). Επειδή η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού και η ακονιτάση είναι πρωτεΐνες Fe-S, υπό συνθήκες έλλειψης Fe, ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων θα μπορούσε να μεταπέσει σε γραμμικό τρόπο λειτουργίας, παρακάμπτοντας τα επηρεαζόμενα ένζυμα (Vigani et al. 2012). Επίσης η ακονιτάση επηρεάζεται από βλάβη επαγόμενη από μέταλλα (Tan et al. 2010) και η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της από τις ROS οδηγεί στην εξαγωγή του κιτρικού από το μιτοχόνδριο (Morgan et al. 2008).

Οι χλωροπλάστες έχουν αρκετές πρωτεΐνες που περιέχουν Fe οι οποίες εντοπίζονται σε όλα τα πλαστιδιακά υποδιαμερίσματα, με την πιο σημαντική λειτουργία τους στην φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Briat et al. 2003). Η έλλειψη Fe προκαλεί μείωση στην περιεκτικότητα σε χρωστικές (χλωροφύλλες και καροτενοειδή) και σε πρωτεΐνες που ανήκουν στην φωτοσυνθετική συσκευή. Αποτέλεσμα αυτού είναι ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης να μειώνεται καθώς και η ποσότητα των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων του PSII, τα οποία εμφανίζουν μία μεταβαλλόμενη συσσωμάτωση ταυτόχρονα με μία μείωση της περιεκτικότητας σε ξανθοφύλλες (Marschner 1995, Merchant et al. 2007, Timperio et al. 2007, Donnini et al. 2009, Andaluz et al. 2006). Μειώνονται επίσης και άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την φωτοσύνθεση όπως εξαρτήματα της αφομοίωσης ανόργανου άνθρακα, η πλαστοκυανίνη, πρωτεΐνες που σχετίζονται με φωτεινές αντιδράσεις και ένζυμα που ανήκουν στον κύκλο του Calvin (Hsieh et al. 2013), υποδηλώνοντας ότι η έλλειψη Fe επηρεάζει την αφθονία των πρωτεϊνών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού τόσο στα θυλακοειδή όσο και στο στρώμα και στο εσωτερικό των θυλακοειδών (Naumann et al. 2007, Terauchi et al. 2010).

Η παραγωγή σήματος από τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες κατά τη εξαρτώμενη από Fe οξειδωτική καταπόνηση και ο έλεγχος της ομοιόστασης του Fe με τη μεσολάβηση του μονοξειδίου του αζώτου - Η ανισορροπία Fe επάγει οξειδωτική καταπόνηση στα κύτταρα με την προώθηση της παραγωγής και συσσώρευσης των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), προκαλώντας οξειδωση των κυτταρικών συστατικών, εμποδίζοντας τις μεταβολικές δραστηριότητες και επηρεάζοντας την ακεραιότητα του οργανιδίου (Suzuki et al. 2012). Ο Fe είναι συμπράγοντας πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση, υπεροξειδάσες, υπεροξειδάση του ασκορβικού και Fe-SOD. Αυτά τα ένζυμα επηρεάζονται έντονα από την έλλειψη Fe, οδηγώντας σε συνεχή ανισορροπία τις διεργασίες αποτοξίνωσης στα φυτά, με συνέπεια τη συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (Halliwell and Gutteridge 1984, Vigani et al. 2012). Ο Fe είναι επίσης ένας προ-οξειδωτικός παράγοντας που μπορεί να καταλύει την παραγωγή ελεύθερων ριζών με την παρουσία αναγωγικών και υπεροξειδίων. Ειδικότερα, η παραγωγή ROS με τη μεσολάβηση του Fe εμπλέκεται στην μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της φερριτίνης, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του χλωροπλάστη αποθήκευσης Fe όταν είναι σε περίσσεια (Briat et al. 2010). Οι δραστηριότητες της φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων καθορίζουν τις οξειδοαναγωγικές καταστάσεις των αντίστοιχων οργανιδίων, που σχετίζονται με τη μείωση της ισχύος ή της ενέργειας που μεταφέρουν οι μεταβολίτες, όπως το NAD(P)H και το ATP (Couee et al. 2006, Rhoads and Subbaiah 2007, Hausler et al. 2009). Η οργανιδιακή οξειδοαναγωγική κατάσταση μπορεί να παρακολουθείται από την παραγωγή των ROS, η οποία με την σειρά τους σχετίζεται με τις αλλαγές στην έκφραση γονιδίων του πυρήνα (Apel and Hirt 2004). Ο ρόλος των ROS ως ανόδρομων σημάτων έχει αμφισβητηθεί, επειδή τα μόρια αυτά έχουν πιθανώς πολύ μικρή διάρκεια ζωής ώστε να μπορέσουν να φτάσουν στον πυρήνα και ενδεχομένως να ενεργούν μη-ειδικά ως μεταφορείς πληροφοριών. Όμως, οι ROS θα μπορούσαν να δράσουν έμμεσα με τη παραγωγή ειδικών πεπτιδίων από την πρωτεολυτική διάσπαση των οξειδωμένων πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να λειτουργούν ως σήματα, συμβάλλοντας στην σηματοδότηση και γονιδιακή ρύθμιση, όπως έχει παρατηρηθεί σε μιτοχόνδρια (Moller and Sweetlove 2010). Επίσης, υπό έλλειψη Fe, η τροποποιημένη

αναπνευστική και φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπερπαραγωγή των ROS και έτσι, στην οξείδωση των πρωτεϊνών (Σχήμα 1.4) (Moller et al. 2007, Sweetlove and Moller 2009, Foyer and Noctor 2003). Η τροποποίηση της διάταξης των πρωτεϊνικών συμπλόκων της αναπνευστικής και φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων υπό έλλειψη Fe θα μπορούσε να παράξει πεπτίδια που περιέχουν Fe-S συμπλέγματα, τα οποία θα μπορούσαν να είναι οξειδωμένα ή ανηγμένα και στη συνέχεια να λειτουργούν ως σήματα. Ένα σημαντικό μόριο σήμα που εμπλέκεται στην δημιουργία της ομοιόστασης του Fe στα φυτά είναι το NO. Η κυτταρική παραγωγή NO εμπλέκει τόσο τα μιτοχόνδρια όσο και τους χλωροπλάστες.



Σχήμα 1.4

Υποθετικά ανάδρομα σήματα παραγόμενα από τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες υπό συνθήκες έλλειψης Fe και η πιθανή συσχέτισή τους στα συστήματα ανίχνευσης Fe και σηματοδότησης στα φυτά. Οι συνθήκες έλλειψης Fe επηρεάζουν τόσο την αναπνευστική όσο και την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες αντίστοιχα. Αυτές οι συνθήκες οδηγούν στην παραγωγή ROS, που με την σειρά τους θα μπορούσαν να οξειδώσουν πεπτίδια. Αυτά τα οξειδωμένα πεπτίδια θα μπορούσαν να λειτουργούν ως ειδικά ανάδρομα σήματα. Και στα δύο οργανίδια, οι πρωτεΐνες που περιέχουν Fe και τα ένζυμα μπορούν να επηρεαστούν από την έλλειψη Fe. Επιπλέον πιθανή συσσώρευση του methylerythritol cyclodiphosphate (MEcPP) και 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate (PAP) στους χλωροπλάστες, και εξαγωγή των ριβοφλαβινών και οργανικών οξέων στα μιτοχόνδρια θα μπορούσε να συμβεί ως απόκριση στην έλλειψη Fe. Το NO αποτελεί ένα άλλο σημαντικό μόριο σήμα που εμπλέκεται στην ομοιόσταση του Fe. Στους χλωροπλάστες, η περίσσεια Fe προάγει την παραγωγή NO, ενώ στα μιτοχόνδρια, το NO είναι πιο πιθανόν να εμπλέκεται στην ρύθμιση. Επιπλέον, τα μεταβολικά συμβάντα στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες μπορούν να δράσουν άμεσα ως κυτταρικοί ανιχνευτές Fe μέσω τροποποίησης των ενζύμων. Συνεπώς, θα μπορούσαν να παράγουν ανάδρομα σήματα υπεύθυνα για την πρόσληψη ή και ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων υπεύθυνων για την ρύθμιση των συστημάτων της πρόσληψης Fe και της ομοιόστασης καθώς και για την ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού (Vigani et al. 2013).

Τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν στη δραστηριότητα του NO με την ενδομετατροπή νιτρώδους και NO και τα πλαστίδια είναι σημαντικοί παράγοντες στην ρύθμιση των επιπέδων NO στα φυτικά κύτταρα (Gas et al. 2009). Η περίσσεια Fe επάγει την παραγωγή NO μέσα στους χλωροπλάστες πριν από την επαναρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της φερριτίνης (Vigani et al. 2012, Lopez-Millan et al. 2000, Touraine et al. 2012), έτσι η ανάδρομη σηματοδότηση από οργανίδια θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ομοιόστασης του Fe (Σχήμα 1.4).

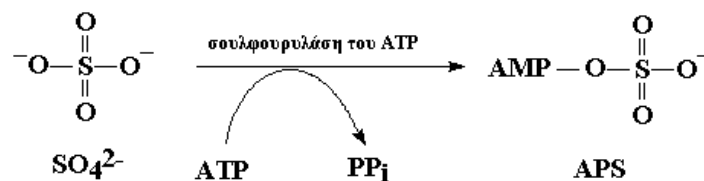
1.3 Η φυσιολογία του θείου στο φυτό

1.3.1 Γενικά

Η πιο σημαντική πηγή του S είναι τα θειικά ιόντα που παραλαμβάνονται από τις ρίζες. Επίσης, το ατμοσφαιρικό SO₂ παραλαμβάνεται και χρησιμοποιείται από τα υπέργεια τμήματα των ανώτερων φυτών. Σε φυσιολογικό εύρος pH, το δισθενές θειικό ανιόν (SO₄²⁻) παραλαμβάνεται από τα κύτταρα της ρίζας και στην συνέχεια μεταφέρεται στο ξύλο και στον ηθμό από μία οικογένεια μεταφορέων θειικών (Hawkesford 2003). Η αφομοίωση του θείου έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με την αφομοίωση των νιτρικών. Για παράδειγμα, η αναγωγή των θειικών είναι αναγκαία για την ενσωμάτωση του θείου στα αμινοξέα, τις πρωτεΐνες και τα συνένζυμα και ο αναγωγικός παράγοντας για τα θειικά είναι η φερρεδοξίνη των πράσινων οργάνων του φυτού. Σε αντίθεση με τα νιτρικά, όμως, τα θειικά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν χωρίς αναγωγή και να ενσωματωθούν σε βασικές οργανικές δομές όπως σουλφολιπίδια μεμβρανών ή πολυσακχαρίτες. Επιπλέον, σε αντίθεση με το N, το ανηγμένο S μπορεί να επανοξειδωθεί στα φυτά. Σε αυτή την αντίδραση οξειδωσης το ανηγμένο S της κυστεΐνης μετατρέπεται σε θειικό (Sekiya et al. 1982a), η ασφαλέστερη μορφή αποθήκευσης του S στα φυτά.

1.3.2 Πρόσληψη θειικών, αφομοίωση και αναγωγή

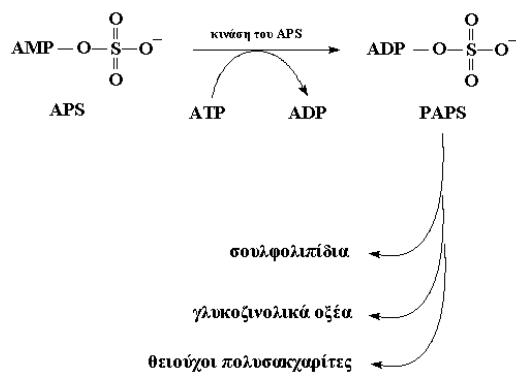
Η πρόσληψη θειικών στα κύτταρα της ρίζας πραγματοποιείται με συμμεταφορά H⁺ και την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων που επάγονται έντονα από έλλειψη S. Μεταφορείς χαμηλότερης συγγένειας από την ίδια οικογένεια γονιδίων εμπλέκονται στην κατανομή των θειικών από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των πλασματικών μεμβρανών, καθώς και στην αποθήκευση και επανακινητοποίηση από τα χυμοτόπια μέσω του τονοπλάστη. Οι μεταφορείς για την μεταφορά των θειικών στους χλωροπλάστες, καθώς και η περιοχή της ενεργοποίησης και αναγωγής, παραμένουν άγνωστοι. Το πρώτο βήμα της αφομοίωσης του θείου στα ανώτερα φυτά είναι η ενεργοποίηση του θειικού ιόντος από το ATP. Σ' αυτή την αντίδραση, το ένζυμο σουλφουρυλάση του ATP καταλύει την αντικατάσταση δύο φωσφορικών ομάδων του ATP από την σουλφουρυλική ομάδα και σχηματίζεται φωσφοθειική αδενοσίνη (APS) και πυροφωσφορικό (Σχήμα 1.5). Το ένζυμο σουλφουρυλάση του ATP ρυθμίζεται από διάφορους εξωτερικούς και εσωτερικούς παράγοντες. Στους εξωτερικούς παράγοντες συγκαταλέγεται το φως, ενώ στους εσωτερικούς οι ανηγμένες θειούχες ενώσεις. Το ενεργοποιημένο θειικό, φωσφοθειική αδενοσίνη (APS), χρησιμεύει ως υπόστρωμα για την σύνθεση θειικών εστέρων ή την αναγωγή των θειικών.



Σχήμα 1.5

Η ενεργοποίηση του θειικού ιόντος από το ATP

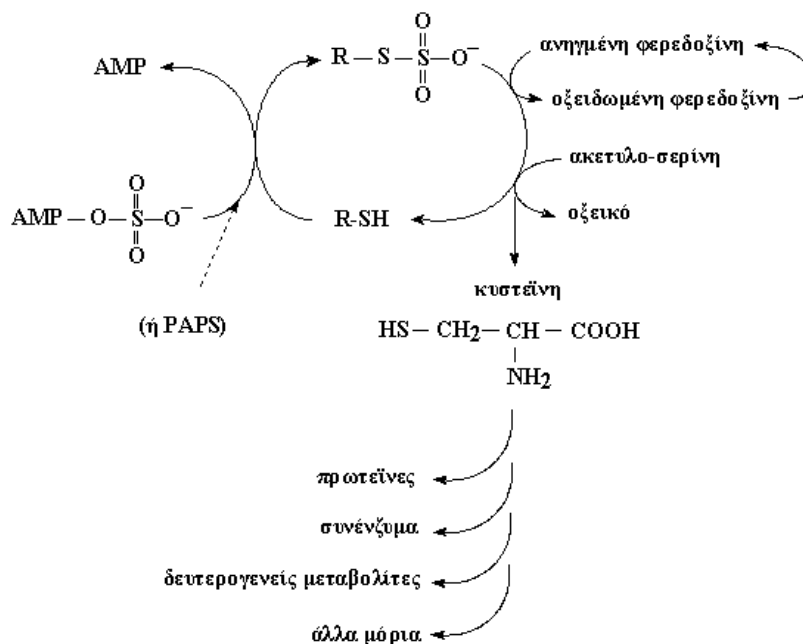
Για την σύνθεση των θειικών εστέρων απαιτείται το ένζυμο κινάση της APS, το οποίο καταλύει τον σχηματισμό φωσφοθειικής φωσφοαδενοσίνης (PAPS) με την βοήθεια του ATP. Το ενεργοποιημένο θειικό της PAPS μεταφέρεται σε μία υδροξυλική ομάδα και σχηματίζεται ο θειικός εστέρας. Στους θειικούς εστέρες περιλαμβάνονται τα σουλφολιπίδια, τα γλυκοζινολικά οξέα και πολυσακχαρίτες (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6

Η σύνθεση θειικών εστέρων από ενεργοποιημένο θειικό.

Για την αναγωγή του θειικού, το ενεργοποιημένο θειικό της APS (Σχήμα 1.7) ανάγεται σε θειώδες (SO_3^{2-}) από την αναγωγή της APS απαιτώντας δύο ηλεκτρόνια, που εφοδιάζεται από τη γλουταθειόνη. Στη συνέχεια, απαιτούνται έξι ηλεκτρόνια από την φερρεδοξίνη για την παραγωγή σουλφιδίου (S^{2-}), αντίδραση που καταλύεται από την αναγωγή του θειώδους. Το νέο σχηματισμένο σουλφίδιο μεταφέρεται στην ακετυλο-σερίνη, από το ένζυμο θειολολυάση της ακετυλο-σερίνης και παράγεται κυστεΐνη, το πρώτο σταθερό προϊόν της αφομοιωτικής αναγωγής του SO_4^{2-} , που δρα ως πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση όλων των άλλων οργανικών ενώσεων που περιέχουν ανηγμένο S μεταξύ των οποίων η γλουταθειόνη και η μεθειονίνη (Nikiforova et al. 2004), καθώς και για άλλες βιοσυνθετικές πορείες όπως ο σχηματισμός του αιθυλενίου (Miyazaki and Yang 1987).



Σχήμα 1.7

Η μετατροπή του ενεργοποιημένου θειικού σε σουλφιδρυλομάδα (-SH) της κυστεΐνης.

Η πρόσληψη και αφομοιωτική αναγωγή των θειικών ρυθμίζεται σε διάφορα επίπεδα (Stulen and DeKok 1993, Vauclaire et al. 2002, Hawkesford and DeKok 2006) από: (1) την ρύθμιση της έκφρασης των μεταφορών θειικών, (2) τη τροποποίηση της δράσης της σουλφουρυλάσης του ATP, (3) την διαθεσιμότητα του θειικού ως υπόστρωματος για την σουλφουρυλάση του ATP, καθώς και (4) την αλλαγή στο επίπεδο της έκφρασης και δραστηριότητας της ρεδοκτάσης της APS.

Τα ένζυμα της αφομοιωτικής αναγωγής του θειικού βρίσκονται σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα (Kopriva 2006), τόσο στα φύλλα όσο και στις ρίζες. Σε πολλά, αλλά όχι σε όλα τα φυτά C₄ (Kopriva and Koprivona 2005), οι χλωροπλάστες των κυττάρων του δεσμικού κολεού είναι οι κύριες θέσεις της αφομοίωσης του θειικού (Schmutz and Brunold 1984), ενώ οι χλωροπλάστες των κυττάρων του μεσόφυλλου είναι οι θέσεις αφομοίωσης των νιτρικών. Οι χλωροπλάστες των κυττάρων του μεσόφυλλου, όμως περιέχουν τουλάχιστον μια αναγωγάση του θειώδους και μία συνθάση της κυστεΐνης (Schmidt 1986). Η βιοσύνθεση της γλουταθειόνης πραγματοποιείται και στους δύο τύπους κυττάρων.

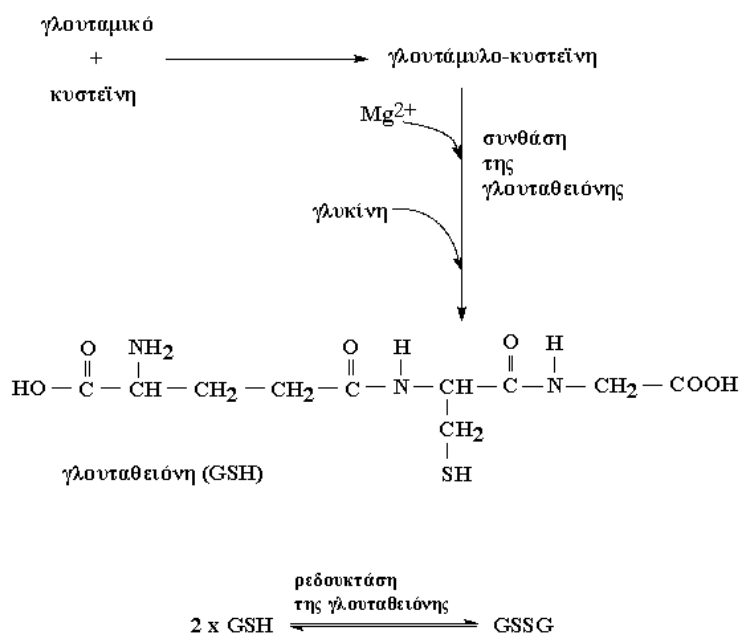
Γενικά, η αναγωγή του θειικού είναι πολλές φορές υψηλότερη στα πράσινα μέρη από ότι στις ρίζες, και στα φύλλα η αντίδραση διεγείρεται έντονα από το φως (Willenbrink 1964, Fankhauser and Brunold 1978). Αυτή η ενίσχυση του φωτός είναι αναμενόμενη λόγω της απαίτησης για γλουταθειόνη και φερρεδοξίνη ως αναγωγικών για APS και θειώδες αντίστοιχα. Επιπλέον, η έκφραση αρκετών γονιδίων που θα δώσει ένζυμα της πορείας της αναγωγικής αφομοίωσης φαίνεται να ρυθμίζονται από το φως. Η διέγερση της αναγωγής του θειικού από το φως μπορεί επίσης να σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα της σερίνης που συντίθεται κατά την διάρκεια της φωτοαναπνοής. Οι ανηγμένες ενώσεις θείου, κυρίως γλουταθειόνη, εξέρχονται από τα φύλλα μέσω του ηθμού (Rennenberg 1989) σε θέσεις ζήτησης για σύνθεση πρωτεΐνης (π.χ. στην κορυφή των βλαστών, καρπούς, αλλά επίσης και στις ρίζες) και μπορεί επίσης να εμπλέκονται στην ρύθμιση πρόσληψης θειικού από τις ρίζες. Κατά την διάρκεια ανάπτυξης των φύλλων το πρότυπο της αναγωγής θειικού είναι παρόμοιο με το πρότυπο της αναγωγής νιτρικών, δηλαδή είναι μέγιστη κατά την διάρκεια επέκτασης του φύλλου, αλλά μειώνεται ραγδαία αμέσως μετά την ωρίμανση του φύλλου (Schmutz and Brunold 1982). Η αναγωγή των θειικών φαίνεται να είναι κάτω από αυστηρό έλεγχο με αρνητική ανατροφοδότηση, γιατί δεν παρατηρείται μεγάλη συσσώρευση ανηγμένων θειούχων ενώσεων. Οι δευτερογενείς θειούχοι μεταβολίτες αποτελούν εξαίρεση.

1.3.3 Οι μεταβολικές λειτουργίες του S

Το θείο είναι συστατικό των αμινοξέων κυστεΐνης και μεθειονίνης 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 είναι είτε ένα δομικό συστατικό αυτών των ενώσεων (π.χ. R₁-C-S-C-R₂) είτε δρα ως λειτουργική ομάδα (π.χ. R-SH) που εμπλέκεται άμεσα σε μεταβολικές αντιδράσεις. Περίπου το 2% του οργανικά ανηγμένου S στα φυτά υπάρχει ως υδατοδιαλυτό θειολικό κλάσμα (R-SH) και υπό κανονικές συνθήκες το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 90% αυτού του κλάσματος (DeKok and Stulen 1993). Η σύνθεση της γλουταθειόνης πραγματοποιείται σε δύο στάδια (Σχήμα 1.8). Στο πρώτο στάδιο, παράγεται γλουταμυλο-κυστεΐνη από το γλουταμικό οξύ και την κυστεΐνη. Στο δεύτερο στάδιο, η γλυκίνη ενσωματώνεται στην γλουταμυλο-κυστεΐνη με την βοήθεια της συνθάσης της γλουταθειόνης, ένα ένζυμο που χρειάζεται Mg για να δράσει (Hell and Bergmann 1988). Σε μερικά ψυχανθή, προτιμάται η αλανίνη στο δεύτερο στάδιο αντί της γλυκίνης και χρησιμοποιείται από τη συνθάση της γλουταθειόνης για να σχηματίσει ομο-γλουταθειόνη. Η ομο-γλουταθειόνη δρα ανάλογα με την γλουταθειόνη (Rennenberg and Lamoureux 1990).

Η περιεκτικότητα σε γλουταθειόνη είναι συνήθως υψηλότερη στα φύλλα παρά στις ρίζες. Πάνω από το 50% της γλουταθειόνης των φύλλων εντοπίζεται στους χλωροπλάστες (Rennenberg and Lamoureux 1990). Στα επάκρια μεριστώματα των ριζών (π.χ. του αραβοσίτου) η γλουταθειόνη είναι η κύρια θειολική ένωση με χαμηλό μοριακό βάρος. Η περιεκτικότητά της είναι της τάξης των 0.7 mmol.kg⁻¹ νωπής μάζας, περίπου τέσσερις φορές υψηλότερη από αυτή της κυστεΐνης (Niето-Sotelo and Ho 1986). Η γλουταθειόνη διαλύεται εύκολα στο

νερό και είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό για το φυτό. Πιθανώς να είναι πολύ πιο σημαντική από το οξειδοαναγωγικό σύστημα της κυστεΐνης-κυστίνης. Ιδιαίτερα στους χλωροπλάστες, η γλουταθειόνη και το ασκορβικό οξύ κατέχουν θέση-κλειδί ως αντιοξειδωτικά για την αποτοξίνωση από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, όπως για παράδειγμα στον κύκλο της υπεροξειδάσης του ασκορβικού και ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης. Η γλουταθειόνη στα κύτταρα διατηρείται κυρίως σε ανηγμένη μορφή με τη βοήθεια του ενζύμου ρεδοκτάση της γλουταθειόνης. Ο αντιοξειδωτικός ρόλος της γλουταθειόνης φαίνεται για παράδειγμα στα φυτά που έχουν έλλειψη σε μαγνήσιο από την αύξηση της δραστηριότητας της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης όταν υποβάλλονται σε υψηλές εντάσεις φωτισμού (Cakmak and Marschner 1992). Φαίνεται επίσης και ως ανταπόκριση σε άλλου τύπου οξειδωτικές καταπονήσεις, όπως οι υψηλές συγκεντρώσεις όζοντος ή διοξειδίου του θείου (Smith et al. 1990b). Η σύζευξη της ανηγμένης γλουταθειόνης με ορισμένα αγροχημικά (όπως η ατραζίνη που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ζιζανίων), είναι επίσης μηχανισμός αποτοξίνωσης που καθιστά ορισμένα φυτικά είδη ανθεκτικά σε συγκεκριμένα ξενοβιοτικά (Schröder et al. 1990, Labrou et al. 2005).



Σχήμα 1.8

Η πορεία της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης.

Η γλουταθειόνη μπορεί να δράσει και ως πρόσκαιρη αποθηκευτική μορφή του ανηγμένου θείου (Schütz et al. 1991) και έτσι διατηρείται μία ορισμένη συγκέντρωση κυστεΐνης στα κύτταρα (Schmidt and Jäger 1992). Όταν ο φυτικός ιστός εκτίθεται σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων όπως του Cu, Cd και Zn, τα κύτταρα αντιδρούν συνθέτοντας πολυπεπίδια με υψηλή περιεκτικότητα σε κυστεΐνη. Αυτά τα μεταλλοδεσμευτικά πεπτίδια ονομάζονται φυτοχελατίνες (Rausser 1990). Η πρόδρομη των φυτοχελατινών είναι η γλουταθειόνη (Grill et al. 1987, Rausser 1990, Cobbett and Goldsbrough 2002).

Οι φυτοχελατίνες αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες γλουταμυλο-κυστεΐνης (μεταξύ 2 και 10) που τερματίζονται με γλυκίνη. Αυτές συντίθενται με αποδόμηση της γλουταθειόνης από μία καρβοξυ-πεπτιδάση. Οι φυτοχελατίνες μπορούν να συγκρατούν κατιόντα βαρέων μετάλλων με συναρμογή των βαρέων μετάλλων στις θειολικές ομάδες, οπότε αυτά παύουν να έχουν τοξική συμπεριφορά (Grill et al. 1987). Η σύνθεση των φυτοχελατινών στις ρίζες ενεργοποιείται από κάδμιο, λιγότερο από ψευδάργυρο και χαλκό και ελάχιστα από

νικέλιο (Tuckendorf and Rauser 1990). Οι διαφορές μεταξύ των οικοτύπων του *Silene vulgaris* στην ανθεκτικότητα του φυτού αυτού στο κάδμιο φαίνεται ότι σχετίζεται με την διαφορετική ικανότητά τους να συνθέσουν φυτοχελατίνη (Verkleij et al. 1990). Είναι όμως αμφισβητούμενος ο ρόλος των φυτοχελατινών ως γενικευμένου μηχανισμού ανοχής των φυτών στις υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, για παράδειγμα στην ανθεκτικότητα στον ψευδάργυρο, (Rauser 1990).

Οι θειορεδοξίνες είναι μία άλλη σημαντική οικογένεια θειολών στα ανώτερα φυτά, εκτός από την γλουταθειόνη και τις σχετικές ενώσεις. Οι θειορεδοξίνες είναι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους περίπου 12 kDa, με δύο τμήματα κυστεΐνης που σχηματίζουν μία οξειδοαναγωγικά ενεργή διαμοριακή δισουλφιδική γέφυρα. Τα φυτικά κύτταρα περιέχουν δύο διαφορετικά συστήματα που μπορούν να ανάγουν τις θειορεδοξίνες: το σύστημα της φερρεδοξίνης/θειορεδοξίνης στους χλωροπλάστες και το σύστημα NADP/θειορεδοξίνης στο κυτταρόπλασμα (Schürmann 1993). Στους χλωροπλάστες, οι θειορεδοξίνες λειτουργούν κυρίως ως ρυθμιστικές πρωτεΐνες στο μεταβολισμό του άνθρακα. Για παράδειγμα, στην ανηγμένη μορφή οι θειορεδοξίνες ενεργοποιούν την φρουκτόζη-1,6-διφωσφατάση και αρκετά ένζυμα του κύκλου του Calvin και δρουν έτσι ως ρυθμιστικός σύνδεσμος μεταξύ της παροχής των αναγωγικών ισοδυνάμων (PSII) και της αφομοίωσης του CO₂.

Το ανηγμένο θείο είναι δομικό συστατικό αρκετών συνενζύμων και προσθετικών ομάδων, όπως η φερρεδοξίνη, η βιοτίνη (βιταμίνη H) και η πυροφωσφορική θειαμίνη (βιταμίνη B₁). Σε πολλά ένζυμα και συνένζυμα όπως η ουρεάση, οι σουλφοτρανσφεράσες και το συνένζυμο A, οι θειολικές ομάδες δρουν ως λειτουργικές ομάδες στην ενζυμική αντίδραση. Για παράδειγμα, η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού και ο σχηματισμός του ακετυλο-συνενζύμου A στη γλυκολυτική πορεία καταλύονται από ένα πολυενζυμικό σύμπλοκο που περιλαμβάνει τρία συνένζυμα που περιέχουν θείο: την πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP), το σουλφιδρυλο-δισουλφιδικό οξειδοαναγωγικό σύστημα του λιποϊκού οξέος και την σουλφιδρυλική ομάδα του συνενζύμου A.

Η ακετυλο-ομάδα (-CO-CH₃) του συνενζύμου A μεταφέρεται στη συνέχεια στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων ή στην πορεία της σύνθεσης των λιπαρών οξέων. Η σύζευξη των μονάδων C₂ στη σύνθεση λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας απαιτεί μεταβατική καρβοξυλίωση, η οποία υποβοηθείται από τη βιοτίνη, η οποία περιέχει θείο και ενεργοποιείται από μαγγάνιο.

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 διασύνδεση 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 σουλφιδρυλικών ομάδων και αυτή η μετάπτωση σχετίζεται με συσσωμάτωση και αποδόμηση πρωτεϊνών (Tomati and Galli 1979). Η προστασία των σουλφιδρυλικών ομάδων στις πρωτεΐνες από το σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών θεωρείται ότι έχει μεγάλη σημασία στην παροχή κυτταρικής ανθεκτικότητας στην αφυδάτωση (που προκαλείται από την ξηρασία και την θερμότητα) και στην καταστροφή από ψύξη (Levitt 1980).

Οι πιο σημαντικές ενώσεις που περιέχουν θείο στον δευτερογενή μεταβολισμό είναι οι αλλιίνες και τα γλυκοζινολικά (Schnug 1993, Jones et al. 2004c). Αλλιίνες είναι το κοινό όνομα των S-αλκενυλο-κυστεΐνο-σουλφοξειδίων ενώσεων χαρακτηριστικών του γένους *Allium*. Περισσότερο από 80% του ολικού θείου στα είδη *Allium* μπορεί να βρεθεί σε τέτοιες ενώσεις. Η ενζυμική διάσπαση των αλλιινών γίνεται με την αλλιινάση. Απώλεια της κυτταρικής διαμερισματοποίησης από μηχανική καταστροφή του ιστού προάγει πολύ την ενζυμική

δραστηριότητα λόγω της αυξημένης διαθεσιμότητας του υποστρώματος και οδηγεί στο σχηματισμό αλλισινών που είναι οι πρόδρομες ενώσεις ενός μεγάλου αριθμού πτητικών συστατικών, όπως τα μονο- και δι-σουλφίδια με χαρακτηριστική οσμή.

Τα γλυκοζινολικά αποθηκεύονται σε χυμοτόπια και η υδρόλυση τους καταλύεται από το ενζυμο μυροσινάση, το οποίο βρίσκεται μόνο σε πολύ μικρό αριθμό κυττάρων σε δεδομένο όργανο, όπως φύλλα ή σπέρματα (Höglund et al. 1991, Wink 1993, McCully et al. 2008). Η υδρόλυση οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκόζης, θειικών και πτητικών ενώσεων όπως ισο-θειοκυανικών στο *Brassica napus*. Όπως και στην περίπτωση της αλλινάσης, η δραστηριότητα της μυροσινάσης στα κύτταρα προάγεται πολύ από τη μηχανική ζημιά των κυττάρων.

Ο ρόλος των θειούχων δευτερογενών μεταβολιτών δεν είναι πλήρως γνωστός. Φαίνεται ότι δρουν ως αμυντικές ενώσεις αν και η σημασία αυτού του μηχανισμού άμυνας πιθανώς να είχε υπερεκτιμηθεί στο παρελθόν (Ernst 1993). Αυτό είναι σίγουρα αληθές για τα γλυκοζινολικά, τα οποία παρέχουν σημαντική λειτουργία ως αποθήκη θείου για τα φυτά. Κατά τη διάρκεια περιόδων με χαμηλή παροχή θείου στις ρίζες και υψηλών απαιτήσεων από το φυτό (π.χ. γρήγορη βλαστική αύξηση ή σχηματισμός σπερμάτων), τα γλυκοζινολικά αποδομούνται από τη μυροσινάση και τα μόρια που περιέχουν θείο επαναχρησιμοποιούνται μέσα από την κανονική αφομοιωτική πορεία του θείου (Schnug 1993).

Το θείο στην μη-ανηγμένη του μορφή, π.χ. ως θειϊκός εστέρας, είναι συστατικό των σουλφολιπιδίων και επομένως ένα δομικό συστατικό όλων των βιολογικών μεμβρανών. Στα σουλφολιπίδια η σουλφο-ομάδα είναι συζευγμένη μέσω εστερικού δεσμού με ένα σάκχαρο C6, για παράδειγμα γλυκόζη. Τα σουλφολιπίδια είναι ιδιαίτερα άφθονα στις μεμβράνες των θυλακοειδών των χλωροπλαστών, όπου περίπου 5% των λιπιδίων των χλωροπλαστών είναι σουλφολιπίδια (Schmidt 1986). Τα σουλφολιπίδια μπορεί επίσης να εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταφοράς ιόντων μέσα από τις βιομεμβράνες. Τα επίπεδα των σουλφολιπιδίων στις ρίζες έχει δειχθεί ότι συσχετίζονται θετικά με την αντοχή του φυτού στα άλατα (Erdei et al. 1980, Stuiver et al. 1981).

1.3.4 Ο εφοδιασμός με θείο, η αύξηση και η σύσταση των φυτών

Οι απαιτήσεις σε θείο για βέλτιστη αύξηση κυμαίνεται από 0.1% ως 0.5% του ξηρού βάρους των φυτών. Τα καλλιεργούμενα φυτά της οικογένειας Gramineae έχουν χαμηλότερες απαιτήσεις από τα καλλιεργούμενα φυτά της οικογένειας Leguminosae και αυτά από τα καλλιεργούμενα φυτά της οικογένειας Cruciferae. Αυτή η διαβάθμιση αντανάκλαται και σε αντίστοιχες διαφορές στην περιεκτικότητα σε θείο των σπερμάτων τους 0.18-0.19%, 0.25-0.30% και 1.1-1.7% της ξηρής μάζας για τα Gramineae, Leguminosae και Cruciferae αντίστοιχα (Deloch 1960). 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 van Wijk 1967).

Υπό έλλειψη θείου, η αύξηση του βλαστού είναι πιο περιορισμένη από την αύξηση της ρίζας οδηγώντας, για παράδειγμα, στην τομάτα σε μείωση του λόγου του ξηρού βάρους του βλαστού προς το ξηρό βάρος της ρίζας από 4.4 στα επαρκή σε S φυτά σε 2.0 στα ελλειμματικά σε θείο φυτά (Edelbauer 1980). Η διακοπή του εφοδιασμού του φυτού με θείο μειώνει μέσα σε λίγες μέρες την υδραυλική αγωγιμότητα της ρίζας, το άνοιγμα των στοματίων και την καθαρή φωτοσύνθεση (Karmoker et al. 1991, Bouranis et al. *in press*). Η μειωμένη επιφάνεια φύλλων στα ελλειμματικά σε θείο φυτά είναι το αποτέλεσμα τόσο του μικρότερου μεγέθους του φύλλου, όσο και του μικρότερου αριθμού των κυττάρων του φύλλου (Burke et al. 1986). Ο αριθμός των χλωροπλαστών ανά κύτταρο στο μεσόφυλλο

μπορεί να επηρεάζεται ή όχι. Για παράδειγμα στο σιτάρι δεν παρατηρείται επίδραση (Burke et al. 1986), ενώ στο σπανάκι μειώνεται (Dietz 1989).

Ένα τυπικό χαρακτηριστικό της έλλειψης θείου είναι η δραστική μείωση της συγκέντρωσης των φύλλων σε χλωροφύλλη και πρωτεΐνη (Burke et al. 1986, Dietz 1989, Gilbert et al. 1997). Αυτό αναμένεται, γιατί ένα μεγάλο ποσοστό των πρωτεϊνών των φύλλων εντοπίζεται στους χλωροπλάστες. Υπό έλλειψη θείου, περιορίζονται τα αμινοξέα που περιέχουν θείο, κυστεΐνη και μεθειονίνη, παρεμποδίζεται η σύνθεση των πρωτεϊνών και μειώνεται η περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη. Το άμυλο μπορεί να συσσωρεύεται, είτε γιατί εξασθενεί ο μεταβολισμός των υδατανθράκων στα σημεία παραγωγής, είτε γιατί υπάρχει χαμηλή ζήτηση στα σημεία της ζήτησης λόγω εμπόδισης της αύξησης.

Στα ελλειμματικά σε θείο φυτά, η παρεμπόδιση της σύνθεσης των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση διαλυτού οργανικού αζώτου και νιτρικών. Στο κλάσμα του διαλυτού αζώτου τα αμίδια βρίσκονται συνήθως σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις και αναλογίες (Freney et al. 1978, Karnoker et al. 1991). Η περιεκτικότητα σε θείο είναι πολύ χαμηλή στα ελλειμματικά φυτά και αυξάνει αξιοσημείωτα όταν ο εφοδιασμός με θειικά είναι επαρκής για άριστη ανάπτυξη. Έτσι, η περιεκτικότητα του φυτού σε θειικά είναι ένας ευαίσθητος δείκτης, σε σχέση με την περιεκτικότητα σε ολικό θείο. Ο καλύτερος δείκτης της θρεπτικής κατάστασης του φυτού σε θείο φαίνεται να είναι η αναλογία του θείου των θειικών (SO_4-S) προς την ολική περιεκτικότητα σε θείο (Freney et al. 1978), ή η αναλογία θειικών προς μηλικό (το οποίο επίσης συσσωρεύεται υπό συνθήκες έλλειψης θείου) (Blake-Kalff et al. 2000).

Η χλώρωση είναι χαρακτηριστικό της έλλειψης του S και του N. Αντίθετα με το N, όμως, το θείο κατανέμεται σχεδόν ομοιόμορφα μεταξύ των παλαιών και των νέων φύλλων και η περιεκτικότητά του επηρεάζεται από τη στάθμη του εφοδιασμού σε θειικά κατά παρόμοιο τρόπο τόσο στα παλιά όσο και στα νέα φύλλα (Freney et al. 1978). Η κατανομή του θείου στα ελλειμματικά σε θείο φυτά επηρεάζεται επίσης και από τον εφοδιασμό τους σε άζωτο. Τα συμπτώματα της έλλειψης θείου μπορεί να εμφανιστούν τόσο στα νεαρά φύλλα όπου υπάρχει πολύ άζωτο, όσο και στα παλιά φύλλα όπου υπάρχει λίγο άζωτο (Robson and Pitman 1983). Το παραπάνω δείχνει ότι η έκταση της επανακινητοποίησης και μετακίνησης του θείου από τα παλαιότερα φύλλα εξαρτάται από τον ρυθμό της γήρανσης των φύλλων που επάγεται από την έλλειψη του αζώτου, μία σχέση η οποία επίσης βρέθηκε για τα ιχνοστοιχεία Cu και Zn. Η έλλειψη θείου στα ψυχανθή κατά την διάρκεια των πρώτων σταδίων έχει μεγαλύτερη επίπτωση στη δραστικότητα της νιτρογενάσης στα φυμάτια της ρίζας από ότι στη φωτοσύνθεση (DeBoer and Duke 1982). Έτσι, τα συμπτώματα της έλλειψης θείου στα συμβιωτικά αναπτυσσόμενα ψυχανθή δεν ξεχωρίζουν από τα συμπτώματα της έλλειψης αζώτου (Anderson and Spencer 1950). Όμως, τα βακτήρια στα φυμάτια της ρίζας των ελλειμματικών σε θείο ψυχανθών εξακολουθούν να εφοδιάζονται καλά με θείο (O'Hara et al. 1987). Η υψηλή ευαισθησία της δραστηριότητας της νιτρογενάσης στην έλλειψη θείου επομένως αντανακλά είτε στην διαταραχή του μεταβολισμού των βακτηρίων του φυτού, είτε στην άμεση επίδραση στην δραστηριότητα της νιτρογενάσης.

Στα ελλειμματικά σε θείο φυτά μειώνεται όχι μόνο η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, αλλά και η περιεκτικότητα των αποθηκευτικών πρωτεϊνών σε θείο, γιατί συντίθενται πρωτεΐνες με χαμηλότερη αναλογία σε μεθειονίνη και κυστεΐνη και υψηλότερες αναλογίες σε άλλα αμινοξέα όπως η αργινίνη και η ασπαραγίνη. Η μείωση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες πλούσιες σε θείο κάτω από έλλειψη θείου έχει βρεθεί σε διάφορους σπόρους δημητριακών και ψυχανθών (Randall and Wrigley 1986). Κάτω από έλλειψη θείου, στο σιτάρι, μειώνεται ένα πολυπεπτιδικό κλάσμα χαμηλού μοριακού βάρους πλούσιο σε θείο (Castle and Randall 1987) και στον αραβόσιτο η αναλογία της κύριας αποθηκευτικής πρωτεΐνης ζεΐνης, η οποία έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο αυξάνεται περίπου 30%, ενώ η γλουτελίνη που είναι πλούσια σε θείο μειώνεται από 36 έως 71%

(Baudet et al. 1986). Η χαμηλή περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε θείο επηρεάζει σημαντικά την θρεπτική ποιότητα: η μεθειονίνη είναι ένα βασικό αμινοξύ για την ανθρώπινη θρέψη και συχνά ένας περιοριστικός παράγοντας στις δίαιτες στις οποίες οι σπόροι είναι η κύρια πηγή πρωτεϊνών (Arora and Luchra 1970). Επιπλέον, η μείωση της περιεκτικότητας σε κυστεΐνη στους σπόρους των σιτηρών μειώνει την ποιότητα του αλεύρου κατά το ψήσιμο, γιατί ο σχηματισμός δισουλφιδικών γεφυρών κατά την ετοιμασία της ζύμης έχει σαν αποτέλεσμα τον πολυμερισμό του κλάσματος της γλουτελίνης (Ewart 1978).

Στην οικογένεια Cruciferae, η περιεκτικότητα σε γλυκοζινολικά και στους πτητικούς μεταβολίτες σχετίζεται στενά με τον εφοδιασμό τους σε θειικά. Η περιεκτικότητα αυτών των θειούχων ενώσεων σ' αυτά τα φυτά μπορεί να αυξηθεί πέρα από το σημείο στο οποίο ο εφοδιασμός σε θειικά επηρεάζει την αύξηση. Αυτή η αύξηση μπορεί να θεωρηθεί επιθυμητή από ποιοτική άποψη (επειδή για παράδειγμα εντίνει την γεύση των λαχανικών κάνοντάς τα πιο πικάντικα), ή ανεπιθύμητη (επειδή μειώνεται η καταλληλότητά τους ως τροφή των ζώων).

Σε έντονα βιομηχανοποιημένες περιοχές η απαίτηση σε θείο των φυτών συχνά καλύπτεται πλήρως ή σε μεγάλο βαθμό από την ατμοσφαιρική ρύπανση με SO₂. Όμως, οι εκπομπές βιομηχανικού SO₂ στη βόρεια Ευρώπη έχουν μειωθεί δραστικά στο τέλος του 20^{ου} αιώνα. Έτσι, έλλειψη θείου εμφανίζεται στην νότια Ευρώπη σε αγροτικές περιοχές, επηρεάζοντας τόσο την παραγωγή όσο και την ποιότητα (Schnug 1993, Zhao et al. 1999a). Η εφαρμογή λιπασμάτων θείου είναι αποτελεσματική στη αποκατάσταση αυτού του προβλήματος. Η έλλειψη θείου στην καλλιεργούμενη παραγωγή είναι αρκετά κοινή σε αγροτικές περιοχές, ιδιαίτερα με υψηλή βροχόπτωση και στα εύκρατα κλίματα (Murphy and Boggan 1988) και σε εδάφη που εμφανίζουν έντονη απόπλυση. Σε τέτοιες συνθήκες, η εφαρμογή λιπασμάτων αζώτου είναι αναποτελεσματική εάν δεν εφαρμοστεί ταυτόχρονα λίπανση με θείο (Wang et al. 1976).

1.4 Η σχέση του σιδήρου με το θείο στον αραβόσιτο

Τόσο από την ύπαρξη και την λειτουργικότητα συμπλεγμάτων Fe-S, όσο και από το γεγονός ότι η πρόδρομη ένωση για την παραγωγή των φυτοσιδηροφόρων είναι θειούχος ένωση, αναδεικνύεται σαφώς η στενή σχέση του σιδήρου με το θείο. Η βιοσύνθεση των φυτοσιδηροφόρων στα αγρωστώδη απαιτεί μεθειονίνη και η βιοσύνθεση της μεθειονίνης απαιτεί θείο. Ο Fe είναι απαραίτητο συστατικό των ενζύμων που εμπλέκονται στην μεταφορά ηλεκτρονίων όπως π.χ. τα κυτοχρώματα. Η χαμηλή κινητικότητα του Fe από τα παλαιότερα στα νεαρότερα φύλλα οφείλεται στην καθίζηση του Fe ως αδιάλυτα οξειδία, ή φωσφορικά ή στον σχηματισμό συμπλόκων με φυτοφερριτίνη στα παλαιότερα φύλλα. Η καθίζηση του Fe μειώνει στην συνέχεια την κινητοποίηση του μετάλλου στον ηθμό για την μετακίνηση σε μεγάλες αποστάσεις. Το θείο είναι βασικό θρεπτικό στοιχείο των φυτών, αφού εκτός από την μεθειονίνη είναι ένα συστατικό της κυστεΐνης, κυστίνης, λιποϊκού οξέος, συνενζύμου A, πυροφωσφορικής θειαμίνης, γλουταθειόνης, βιοτίνης, αδενοσίνη-5'-φωσφοθειικού, 3-φωσφοαδενοσίνης και πρωτεϊνών, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Οι γονότυποι των φυτών διαφέρουν στην ικανότητά τους να χειρίζονται τον Fe και αυτή η διαδικασία φαίνεται να ρυθμίζεται γενετικά. Ο Fe είναι μοναδικός μεταξύ των μικροστοιχείων αφού η διαθεσιμότητα και η πρόσληψη του μπορεί να επηρεαστεί από το ίδιο το φυτό, με τα φυτά μέσα σε ένα είδος να είναι είτε αποτελεσματικά είτε μη-αποτελεσματικά στη διαχείριση του Fe. Η χλώρωση από την έλλειψη S ξεκινά στα νεαρά φύλλα όπως και η χλώρωση από την έλλειψη Fe, ενώ η χλώρωση από την έλλειψη N ξεκινά στα ώριμα φύλλα. Σε φυτά αραβοσίτου μη-αποτελεσματικά στη διαχείριση του Fe η έλλειψη S προκάλεσε έλλειψη Fe και έλλειψη N (Bouranis et al. 2003). Η έλλειψη S επηρεάζει την δεξαμενή της μεθειονίνης και αυτό μπορεί να είναι ένας λόγος για τα πρώτα αποτελέσματα της έλλειψης S σχετικά με την συγκέντρωση του Fe. Η πρόσληψη και ο μεταβολισμός

του S και του N είναι στενά συνδεδεμένοι. Στο φύλλο, ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης βρίσκεται στους χλωροπλάστες. Οι πρωτεΐνες του χλωροπλάστη είναι πλούσιες σε S και τα φυτά που στερούνται S συνθέτουν πρωτεΐνες με χαμηλή περιεκτικότητα σε S, οι οποίες βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του φύλλου. Η μείωση της περιεκτικότητας των φωτοσυνθετικών χρωστικών που παρατηρήθηκε στα ελλειμματικά σε S φυτά, είναι το αποτέλεσμα της μειωμένης σύνθεσης πρωτεϊνών και στις επακόλουθες αλλαγές στην δομή των χλωροπλάστων.

Η Astolfi και οι συνεργάτες της (2003) διερεύνησαν τον ρόλο που διαδραματίζει η πορεία αφομοίωσης του θείου στην απόκριση φυτών αραβοσίτου υπό έλλειψη σιδήρου. Η περιεκτικότητα του σιδήρου στα φύλλα ήταν χαμηλότερη σε φυτά που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θείου σε σύγκριση με εκείνα που αναπτύχθηκαν παρουσία του μακροστοιχείου. Η έλλειψη σιδήρου προκάλεσε αύξηση του επιπέδου των θειολικών ενώσεων και στις δύο θρεπτικές συνθήκες (πλήρη θρέψη και -S). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν σχέση μεταξύ της θρεπτικής κατάστασης σε S και της πρόσληψης Fe. Γι' αυτό το λόγο διερεύνησαν την επίδραση της διαθεσιμότητας Fe στο μεταβολισμό S μέσω της εκτίμησης των αλλαγών της δραστηριότητας των ATPs και OASs, το πρώτο και τελευταίο ένζυμο της πορείας της αφομοίωσης του S αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έλλειψη S αύξησε την δραστηριότητα και των δύο ενζύμων, αλλά αυτή η επίδραση εξαφανίστηκε σε φυτά υπό συνθήκες έλλειψης Fe υποδηλώνοντας ότι ο μεταβολισμός του S είναι ευαίσθητος στη διαθεσιμότητα του Fe. Στο σύνολό τους αυτά τα αποδεικτικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι ο μεταβολισμός του S είναι ευαίσθητος στη διαθεσιμότητα του Fe στο έδαφος για την θρέψη των φυτών και υποστηρίζουν την υπόθεση της συμμετοχής του S στην απόκριση του φυτού στην έλλειψη Fe.

Η έλλειψη του S για 10 ημέρες δεν είχε σημαντική επίδραση στους ρυθμούς ανάπτυξης είτε των βλαστών είτε των ριζών όπως μετρήθηκε από τα νωπά και ξηρά βάρη. Όμως, υπό έλλειψη S ήταν εμφανής μία ξεκάθαρη τάση της κατανομής περισσότερης ξηρής μάζας στο ριζικό. Αυτή η ισχυρότερη καταστολή της αύξησης του βλαστού από την αύξηση της ρίζας, που οδηγεί σε μία μείωση του λόγου της ξηρής μάζας υπέργειου προς την ξηρή μάζα ριζικού, είναι ένα τυπικό σύμπτωμα της έλλειψης του συγκεκριμένου στοιχείου. Τα φύλλα αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν υπό έλλειψη S παρουσίασαν χαμηλότερη περιεκτικότητα Fe (-30%) σε σχέση με εκείνα που αναπτύχθηκαν παρουσία S. Τα φύλλα των ελλειμματικών σε S φυτών έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη από τα φυτά επαρκή σε S. Όπως αναμένεται, η περιεκτικότητα ολικού S στα φύλλα ήταν πολύ χαμηλότερη στα ελλειμματικά σε S φυτά από ότι τα επαρκή σε S φυτά. Η μείωση της περιεκτικότητας ολικού S στα φυτά-μάρτυρες που παρατηρήθηκε θα μπορούσε να οφείλεται στην μετακίνηση του θρεπτικού. Ακόμη και αν το S θεωρείται ως ένα σχετικά ακίνητο στοιχείο στα φυτά, έχει δείχθει ότι το ενδογενές S αναδιανέμεται από ώριμα φύλλα πολλών φυτών επαρκή σε S (Herschbath and Rennenberg 1994). Μετά από 24 ώρες έλλειψης Fe, τα επαρκή σε S φυτά εμφάνισαν υψηλότερη περιεκτικότητα S (+30%) από τα φυτά μάρτυρες (+S/+Fe). Αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να εξηγηθεί υποδηλώνοντας ότι η έλλειψη Fe με κάποιο τρόπο επηρεάζει την αναδιανομή του θρεπτικού πιθανώς σε σχέση με την αυξημένη ζήτηση των μη πρωτεϊνικών θειολικών ενώσεων σε αυτά τα φυτά. Οιθειόλες, Cys, γGluCys και γλουταθειόνη (GSH) είναι μορφές του οργανικού S σε αφθονία σε φυτικούς ιστούς και υπό κανονικές συνθήκες, η GSH είναι η κυρίαρχη μορφή της μετακίνησης S από τα φύλλα στις ρίζες. Δεδομένου ότι οι θειολικές ομάδες απαιτούνται για τη σύνθεση της μεθειονίνης, της πρόδρομης ένωσης των MA, μπορεί να υποθεθεί ότι η ενισχυμένη παραγωγή θειολικών ενώσεων στα φύλλα σε απόκριση της έλλειψης Fe σχετίζεται με τη σύνθεση PS στις ρίζες. Ο Nakanishi (1999) έδειξε ότι η μεθειονίνη από το πάνω μέρος του φυτού δεν χρησιμοποιείται για τη σύνθεση MA στις ρίζες, αλλά δεν υπάρχει βεβαιότητα οι θειολικές ενώσεις που παράγονται στο πάνω μέρος του φυτού να μεταφέρονται από το βλαστό στη ρίζα και να χρησιμοποιούνται ως πηγή ανηγμένου σουλφιδίου

για τη σύνθεση της μεθειονίνης και των παραγώγων της στη ρίζα. Όμως, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι η έλλειψη Fe με κάποιο τρόπο, θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά την χρησιμοποίηση των μη πρωτεϊνικών θειολικών ενώσεων στα φύλλα ή στην μετακίνησή τους στις ρίζες, οδηγώντας σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά των ενώσεων στα φύλλα.

Δεδομένου ότι η βιοσύνθεση των MA από τη μεθειονίνη πραγματοποιείται στις ρίζες των φυτών, έχουν διερευνηθεί διάφορες πλευρές του ερωτήματος πως η διαθεσιμότητα Fe επηρεάζει το μεταβολισμό S σε επίπεδο ρίζας. Στη πραγματικότητα, αν και οι χλωροπλάστες θεωρούνται η κύρια περιοχή της αναγωγικής αφομοίωσης θειικών, έχει αποδειχθεί ότι η αφομοίωση θειικών συμβαίνει σε διαφορετικούς φυτικούς ιστούς και τύπους κυττάρων. Η μεγαλύτερη διαθεσιμότητα των ανηγμένων ενώσεων S στα φύλλα αραβοσίτου είναι ένα σημαντικό γεγονός σε απόκριση της έλλειψης Fe.

Επίσης, έχει μελετηθεί η επίδραση της έλλειψης σιδήρου στην ικανότητα των ριζών αραβοσίτου να προσλαμβάνουν και να μεταβολίζουν το θείο (Astolfi et al. 2004). Φυτά αραβοσίτου αναπτύχθηκαν για 10 ημέρες σε θρεπτικό διάλυμα με (+S) ή χωρίς (-S) θειικά και προστέθηκε Fe ως Fe(III)-EDTA 80μM. Μετά από την απομάκρυνση της δεξαμενής Fe από τον ελεύθερο χώρο της ρίζας, μισά από τα φυτά κάθε μεταχείρισης (+S και -S) μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε Fe. Οι ρίζες συλλέχθηκαν 4 και 24 ώρες από την έναρξη της έλλειψης Fe. Η έλλειψη Fe αύξησε ελαφρά τη περιεκτικότητα των ριζών σε θειόλες και στις δύο θρεπτικές συνθήκες (+S και -S). Η δραστηριότητα της σουλφουρυλάσης του ATP (ATPs) αυξήθηκε από την έλλειψη S αλλά περιορίστηκε σε μεγάλο βαθμό όταν απουσίαζαν Fe και S από το θρεπτικό διάλυμα. Η δραστηριότητα θειολυάσης της Ο-ακετυλο-σερίνης (OASs) επίσης αυξήθηκε από την έλλειψη S, αυτή η δραστηριότητα αυξήθηκε από την έλλειψη Fe στα +S φυτά, ενώ δεν επηρεάστηκε από την θρεπτική κατάσταση σιδήρου στα -S φυτά.

Η έλλειψη S αύξησε το ρυθμό πρόσληψης $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ και επιπλέον, η έλλειψη Fe αύξησε τους ρυθμούς πρόσληψης $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ κατά 11% και 55% σε φυτά +S και -S αντίστοιχα. Η έλλειψη Fe στον αραβόσιτο οδηγεί σε μία μεγαλύτερη ικανότητα πρόσληψης θειικών, ενώ περιορίζει το πρώτο βήμα αφομοίωσης του S στα ελλειμματικά σε S φυτά. Ο σίδηρος εμπλέκεται στην αναγωγική πορεία αφομοίωσης του θείου λόγω της απαίτησης της φερρεδοξίνης ως αναγωγικού. Η διαφορετική συμπεριφορά της δραστηριότητας OASs σε σχέση με τη δραστηριότητα ATPs μπορεί να εξηγηθεί κατά ένα μέρος λαμβάνοντας υπόψη τη λειτουργία των δύο ενζύμων. Στη πραγματικότητα, το ένζυμο σουλφουρυλάση του ATP το οποίο καταλύει το πρώτο στάδιο της αφομοίωσης του θείου, εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των θειικών για τη δραστηριότητά του, ενώ το ένζυμο OASs καταλύει το σχηματισμό της κυστεΐνης από τη Ο-ακετυλο-σερίνη και ανόργανο σουλφίδιο. Με αυτόν τον τρόπο, το ένζυμο OASs, που άμεσα εμπλέκεται στη σύνθεση της κυστεΐνης, μπορεί να αφομοιώσει εκ νέου σουλφίδιο από άλλες πηγές εκτός της πορείας αφομοίωσης S (Lunn et al. 1990). Έτσι, η παρατηρούμενη αύξηση της δραστηριότητας της OASs θα μπορούσε να αντισταθμίσει τη μείωση της ATPs, προκειμένου να δημιουργήσει και να διατηρήσει επαρκείς κυτταρικές δεξαμενές του ανηγμένου S για κυτταρικές λειτουργίες. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της θρέψης S και Fe μπορεί να συμβεί με γρήγορες προσαρμογές του ρυθμού πρόσληψης θειικών και αφομοίωσης οι οποίες οδηγούν σε αναδιανομή της δεξαμενής ανηγμένου S. Αυτές οι τροποποιήσεις θα μπορούσαν να σχετίζονται με την ανάγκη για αυξημένη σύνθεση PS υπό συνθήκες έλλειψης Fe. Στο πλαίσιο αυτό η διαθεσιμότητα του Fe μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα σήμα ικανό να ρυθμίζει την παραγωγή και χρησιμοποίηση θειολών σε επίπεδο ρίζας, όπου συντίθενται αποτελεσματικά τα PS.

Κεφάλαιο 2

**Η επίδραση της έλλειψης θεικών στην κατανομή σιδήρου και
θείου σε ριζικό σύστημα και υπέργειο μέρος**

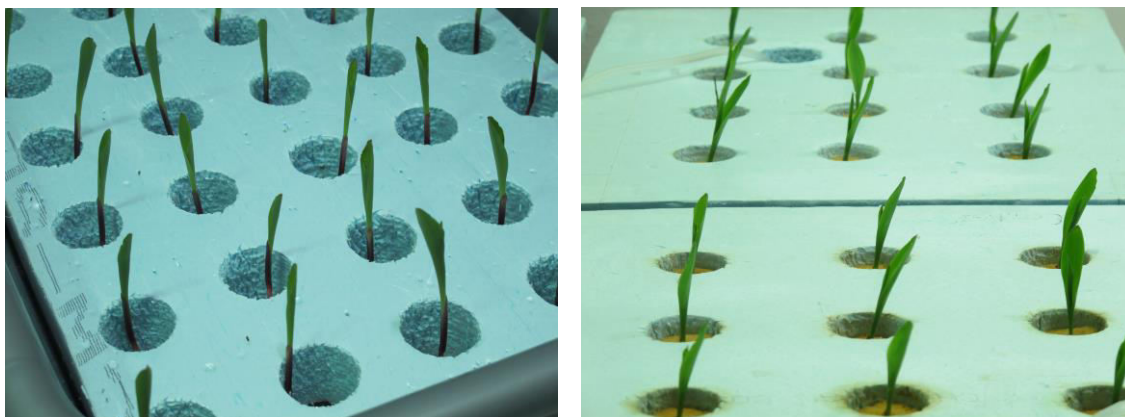
2.1 Εισαγωγή

Οι μελέτες σχετικά με την επίδραση της έλλειψης θειικών στην κατανομή του θείου και του σιδήρου στα φυτά, όπως παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 1, εστιάζουν σε βραχυπρόθεσμες πειραματικές προσεγγίσεις. Στο Κεφάλαιο αυτό φυτά αραβοσίτου αναπτύχθηκαν σε υδροπονικό σύστημα και η έλλειψη θειικών επιβλήθηκε άμεσα, δηλαδή από την πρώτη ημέρα που τα φυτά τοποθετήθηκαν στο θρεπτικό διάλυμα (7^η ημέρα από τη σπορά, ημέρα κατά την οποία ξεκινά να εκπτύσσεται η 1^η ομάδα βλαστογενών ριζών) και το πειραματικό επεκτάθηκε πέραν των 10 ημερών υπό συνθήκες τροφопενίας. Οι στόχοι ήταν (1) να δούμε σε επίπεδο ολόκληρου φυτού για πόσο χρονικό διάστημα θα μπορούσαν να αντέξουν τα φυτά, με δεδομένο ότι η μόνη διαθέσιμη ποσότητα θείου ήταν αυτή που κινητοποιείται από το σπόρο αφού δεν υπήρχαν εισροές θείου και (2) να μελετήσουμε την κατανομή του σιδήρου και του θείου στο ριζικό σύστημα και στο υπέργειο μέρος. Με βάση την γενική εικόνα των φυτών και τις προκαταρκτικές ανατομικές παρατηρήσεις, η διάρκεια του μακροπρόθεσμου πειραματικού καθορίστηκε στις 26 ημέρες. Τα φυτά αραβοσίτου αναπτύχθηκαν σε υδροπονικό σύστημα και σε διάφορες πειραματικές παρτίδες για 26 ημέρες, τόσο υπό συνθήκες πλήρους θρέψης όσο και υπό συνθήκες έλλειψης θειικών στο θρεπτικό διάλυμα και προσδιορίστηκε ο σίδηρος που απορρόφησε το φυτό κατά την 10^η και την 19^η ημέρα των μεταχειρίσεων, καθώς και πως κατανεμήθηκε αυτή η ποσότητα σιδήρου στο ριζικό σύστημα και στο υπέργειο μέρος του φυτού. Η μελέτη της κατανομής του σιδήρου συνδυάστηκε με την αντίστοιχη των θειικών, του ολικού θείου και του οργανικού θείου. Επειδή η ξηρή μάζα που συσσωρεύεται και κατανέμεται επηρεάζεται από τη μεταχείριση, εξετάστηκαν και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Επομένως, σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται η κινητική της συσσώρευσης και της συγκέντρωσης των ποσοτήτων σιδήρου, ολικού θείου, θειικών και οργανικού θείου σε ολόκληρο το φυτό, στο ριζικό σύστημα και στο υπέργειο μέρος του φυτού κατά τις ημέρες δειγματοληψίας. Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η δυναμική των κατανομών αυτών των ποσοτήτων με τη βοήθεια των μοριακών λόγων (1) θειικών προς ολικό θείο, (2) ολικού θείου προς σίδηρο και (3) οργανικού θείου προς σίδηρο, ως πιθανών δεικτών της απόκρισης του φυτού κάτω από τις συγκεκριμένες μεταχειρίσεις.

2.2. Υλικά και μέθοδοι

2.2.1 Φυτικό υλικό και ανάπτυξη φυταρίων σε υδροπονική καλλιέργεια

Σπόροι αραβοσίτου (*Zea mays*, L) υβριδίου CISKO τοποθετήθηκαν σε δίσκους με διηθητικό χαρτί και διαβράχθηκαν με απιονισμένο νερό. Οι σπόροι καλύφθηκαν με μαύρο πλαστικό και παρέμειναν στο σκοτάδι για τέσσερις ημέρες. Την τέταρτη ημέρα πραγματοποιήθηκε η πρώτη μεταφύτευση σε παλέτες βλάστησης (30 θέσεις/παλέτα, 1 σπορόφυτο/θέση) και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε λεκάνες με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε οι παλέτες να επιπλέουν. Στις λεκάνες τοποθετήθηκαν αντλίες αέρα για οξυγόνωση του νερού. Οι λεκάνες τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης, σε φωτοπερίοδο 14h φως/10h σκοτάδι, ένταση φωτισμού 250 μmol φωτονίων m⁻² s⁻¹, θερμοκρασία 25°C και υγρασία 65%. Τα φυτά παρέμειναν στις παλέτες βλάστησης για τρεις ημέρες. Την έβδομη ημέρα από την σπορά, επιλέχθηκαν τα πιο ομοιόμορφα φυτά, πραγματοποιήθηκε η 1^η δειγματοληψία, τοποθετήθηκαν σε παλέτες ανάπτυξης (**Εικόνα 2.1**) και διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες με διαφορετική μεταχείριση. Τα φυτά της μίας ομάδας αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (Control, C), ενώ τα φυτά της άλλης ομάδας, αναπτύχθηκαν σε διάλυμα ελλειμματικό σε θειικά (-S).



Εικόνα 2.1

Φυτά την 7^η ημέρα από τη σπορά. Αριστερά παλέτα βλάστησης και δεξιά παλέτα ανάπτυξης.

2.2.2 Μεταχειρίσεις

Η σύσταση του πλήρους θρεπτικού διαλύματος ήταν: 5 mM KNO₃, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM Mg(NO₃)₂, 2.5 mM CaSO₄, 1 mM MgSO₄, 0.07 mM FeNaEDTA, 4 mM Ca(NO₃)₂, 0.9 μM ZnCl₂, 30 μM H₃BO₃, 0.9 μM CuCl₂, 0.5 μM MoO₃ 85% και 20 μM MnCl₂. Η σύσταση του ελλειμματικού σε θειικά (-S) θρεπτικού διαλύματος ήταν: 5 mM KNO₃, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM Mg(NO₃)₂, 0.07 mM EDTAFeNa, 4 mM Ca(NO₃)₂, 0.86 mM CaCl₂, 0.9 μM ZnCl₂, 30 μM H₃BO₃, 0.9 μM CuCl₂, 0.5 μM MoO₃ 85% και 20 μM MnCl₂. Τα θρεπτικά διαλύματα ανανεώνονταν κάθε τρεις ημέρες. Αυτή η διαδικασία εφαρμόστηκε μέχρι την ημέρα 19 από τον διαχωρισμό των φυτών στα δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα.

2.2.3 Δειγματοληψίες

Με βάση τα προηγούμενα πραγματοποιήθηκαν 3 δειγματοληψίες φυτών. Η πρώτη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε την 7^η ημέρα από την σπορά και πριν το διαχωρισμό των φυτών στα δύο διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα. Η δεύτερη δειγματοληψία έγινε την ημέρα 17 από την σπορά (ημέρα 10 από τον διαχωρισμό των φυτών στα δύο διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα) και η τρίτη δειγματοληψία την ημέρα 26 από την σπορά (ημέρα 19 από τον διαχωρισμό τους). Οι δύο τελευταίες δειγματοληψίες έγιναν μία μέρα μετά την αλλαγή θρεπτικού διαλύματος (**Εικόνα 2.2**).

2.2.4 Παραλαβή δειγμάτων

Από την υδροπονική εγκατάσταση παραλήφθηκε ένας αριθμός φυτών για ανάλυση και απομακρύνθηκε το νερό που είχε απομείνει στις ρίζες με απορροφητικό χαρτί. Έπειτα διαχωρίστηκαν τα μελετώμενα μέρη του φυτού και ακολούθησε ζύγιση και καταγραφή του νωπού βάρους ανά φυτό ή ανά μέρος φυτού (ριζικό και υπέργειο σύστημα). Ακολούθησε ξήρανση των δειγμάτων για 4 ημέρες σε κλίβανο στους 80°C, καταγραφή του ξηρού βάρους, λειοτρίβιση των δειγμάτων και φύλαξη της ξηρής μάζας.

ΗΜΕΡΕΣ ΑΠΟ ΤΗ ΣΠΟΡΑ	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
ΑΛΛΑΓΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ								✓			✓			✓			✓	
ΗΜΕΡΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ								✓										✓
ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	βλάστηση σε διηθητικό χαρτί			απιονισμένο H ₂ O				Control και -S										

ΗΜΕΡΕΣ ΑΠΟ ΤΗ ΣΠΟΡΑ
ΑΛΛΑΓΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ
ΗΜΕΡΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ
ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

18	19	20	21	22	23	24	25	26
	✓			✓			✓	
								✓
Control και -S								

Εικόνα 2.2

Σχεδιάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό ολικού σιδήρου, ολικού θείου και θειικών

2.2.5 Προσδιορισμοί

Προσδιορίστηκε η νωπή και η ξηρή μάζα των φυτών που αναπτύχθηκαν στα δύο διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα και η περιεκτικότητα της ξηρής μάζας σε ολικό σίδηρο, ολικό θείο και θειικά. Για τον προσδιορισμό του ολικού σιδήρου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φασματοφωτομετρίας ατομικής απορρόφησης. Για τον προσδιορισμό του ολικού θείου και των θειικών χρησιμοποιήθηκε η θολωσιμετρική μέθοδος. Με αφαίρεση της ποσότητας των θειικών από την ποσότητα του ολικού θείου υπολογίστηκε η ποσότητα του οργανικού θείου.

2.2.5.1 Προσδιορισμός ολικού σιδήρου

Ζυγίστηκαν 500 mg ξηρής ουσίας κάθε δείγματος, τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν 5 mL HNO₃. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενη πλάκα και η καύση συνεχίστηκε με την διαδοχική προσθήκη H₂O₂ μέχρι το δείγμα να γίνει διαυγές. Ακολουθούσε διήθηση και αραίωση του δείγματος σε γνωστό όγκο με νερό. Από πυκνό διάλυμα σιδήρου συγκέντρωσης 1000 ppm, παρασκευάζονταν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης. Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης GBC Avanta P με φλόγα ασετυλίνη-αέρα. Η παροχή της ασετυλίνης καθορίστηκε στα 1,05 L/min και του αέρα στα 20.1 L/min. Η λάμπα που χρησιμοποιήθηκε λειτουργούσε στα 7.0 mA και το μήκος κύματος για τη μέτρηση του σιδήρου ήταν 248,3 nm. Ως σύστημα βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων που διέρχεται από το μηδέν. Το δείγμα μετρήθηκε 3 φορές με 3 επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης από το σύστημα. Ο χρόνος μέτρησης 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 οι συγκεντρώσεις σιδήρου για κάθε δείγμα.

2.2.5.2 Προσδιορισμός θειικών

Τα θειικά ιόντα που βρίσκονται στο δείγμα καταβυθίζονται με ιόντα βαρίου. Η αιώρηση του ιζήματος δημιουργεί θόλωμα, η πυκνότητα του οποίου μετρείται φωτομετρικά. Για να διατηρηθεί η αιώρηση του ιζήματος μέσα στο διάλυμα αντίδρασης, χρησιμοποιείται το πολυμερές της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), η οποία παρεμποδίζει την άμεση κατακρήμνισή του ιζήματος. Για το λόγο αυτό οφείλεται να τηρηθεί ο χρόνος μέτρησης (5min) του θολώματος, που ορίζεται από τη μέθοδο (Sorbo 1987).

Σε 10 mL CH_3COOH 2% (v/v) προστέθηκε ορισμένη ποσότητα ξηρής μάζας δείγματος και παρέμεινε για 15 min. Το μείγμα διηθήθηκε και συμπληρώθηκε με εκχυλιστικό μέχρι τα 10mL. Την ημέρα που θα χρησιμοποιηθούν παρασκευάζονται τα διαλύματα: HCl 500mM, Na_2SO_4 50 mM και Ba-PEG (0,977 g $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15 g PEG 6000 και 200 μL Na_2SO_4 50 mM στα 100 mL με νερό), διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (STD10, STD20, STD30, STD40, STD50) και το δοχείο του δείγματος. Στο δοχείο αναφοράς προστίθεται 1000 μL νερού, 1000 μL HCl , 1000 μL διαλύματος Ba-PEG και 2000 μL νερού. Στο δοχείο γνωστής συγκέντρωσης προστίθεται με την σειρά 1000 μL νερού, 1000 μL HCl , 1000 μL διαλύματος Ba-PEG, 10 μL Na_2SO_4 και 1990 μL νερού. Ανάλογα παρασκευάζονται και τα επόμενα STD με 20, 30, 40 και 50 μL Na_2SO_4 αντίστοιχα, με συνολικό όγκο του κάθε δοχείου 5000 μL . Παρασκευάζεται το κάθε διάλυμα ξεχωριστά, αναδεύεται σε vortex για 15 sec, μεταφέρεται σε κυψελίδα, σκεπάζεται με καπάκι και στη συνέχεια τοποθετείται για 5min σε φωτόμετρο ρυθμισμένο στα 660 nm και καταγράφεται η μέτρηση.

2.2.5.3 Προσδιορισμός ολικού θείου

Το κάθε δείγμα τοποθετείται σε δοχείο πορσελάνης και προστίθενται 10 mL $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7% (w/v). Τα δοχεία πορσελάνης τοποθετούνται σε θερμαντική πλάκα ώστε να εξατμιστεί πλήρως το διάλυμα και στη συνέχεια μεταφέρονται σε πυριαντήριο για 6 ώρες στους 600 °C. Το αποτεφρωμένο δείγμα σε κάθε δοχείο πορσελάνης αφού διαλυθεί σε 10 mL CH_3COOH 2% (v/v), μεταφέρεται σε άλλο δοχείο, ξεπλένεται το δοχείο πορσελάνης με 10 mL CH_3COOH 2%(v/v) και τα ξεπλύματα μεταφέρονται στο δοχείο με το δείγμα. Το κάθε δείγμα παραμένει στο δοχείο για 15 min. Το μείγμα διηθείται και αραιώνεται με CH_3COOH μέχρι τα 10 mL. Στη συνέχεια εφαρμόζεται η διαδικασία προσδιορισμού των θειικών.

Συντομογραφίες

Hμ0 = ημέρα έναρξης της μεταχείρισης ή ημέρα 7 του πειράματος

Hμ10 = η 10^η ημέρα της μεταχείρισης ή η 17^η ημέρα του πειράματος

Hμ19 = η 19^η ημέρα της μεταχείρισης ή η 26^η ημέρα του πειράματος

ΞM = ξηρή μάζα (σε mg)

ΞM / ΞM₀ = ο λόγος της ξηρής μάζας του φυτού ή του φυτικού μέρους ως προς την αντίστοιχη ξηρή μάζα την ημ0.

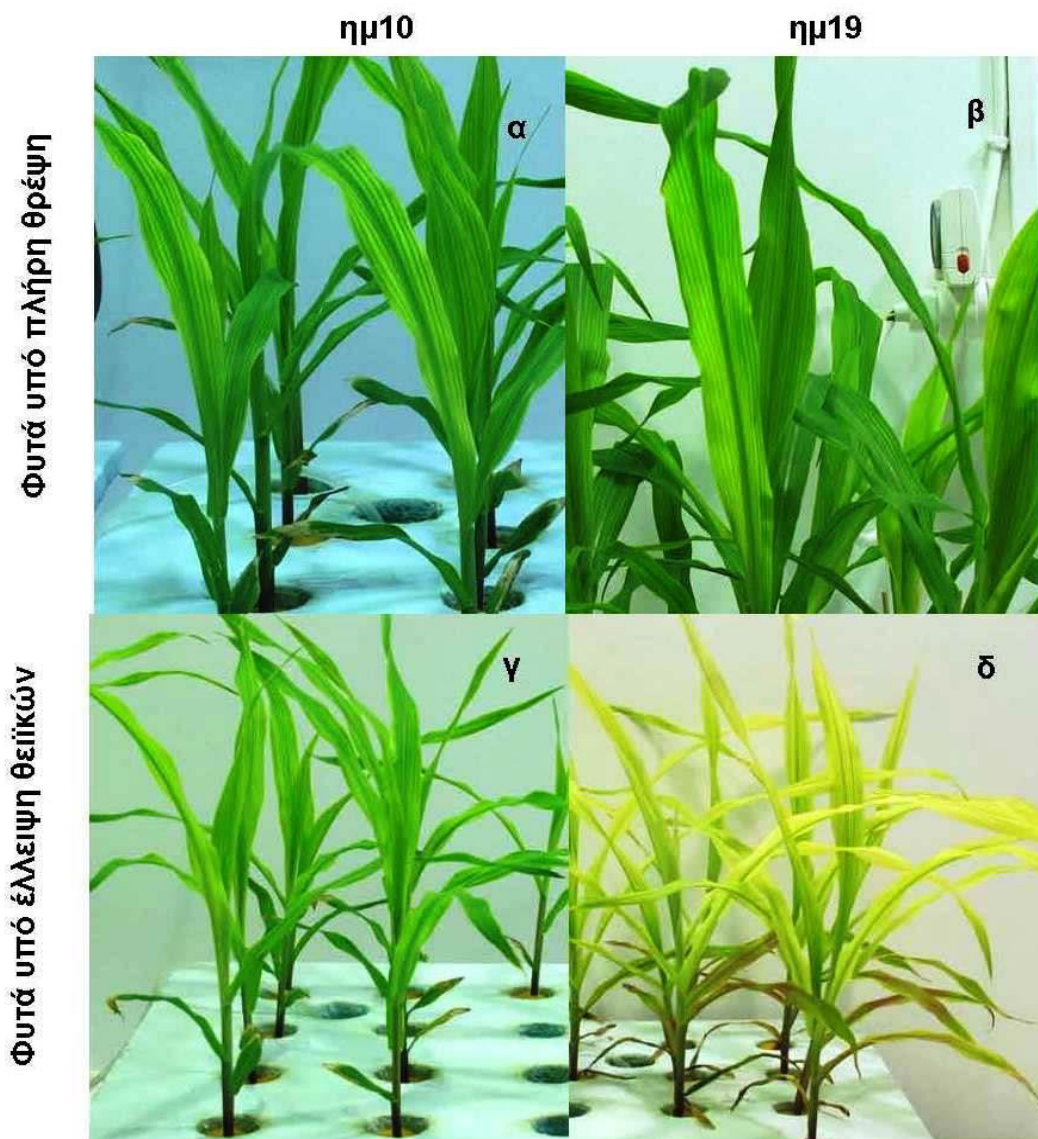
Fe = η ποσότητα ολικού σιδήρου ανά φυτό ή φυτικό μέρος (σε μmol)

[Fe] = η συγκέντρωση του ολικού σιδήρου (σε $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$)

Fe / Fe₀ = ο λόγος του ολικού σιδήρου του φυτού ή του φυτικού μέρους ως προς την αντίστοιχη ποσότητα την ημ0.

Stot = η ποσότητα του ολικού θείου ανά φυτό ή φυτικό μέρος (σε μmol)

[Stot] = η συγκέντρωση του ολικού θείου (σε $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}^{-1}$)



Εικόνα 2.3

Η εμφάνιση των φυτών την ημ10 και την ημ19 της κάθε μεταχείρισης.

Stot / Stot₀ = ο λόγος του ολικού θείου του φυτού ή του φυτικού μέρους ως προς την αντίστοιχη ποσότητα την ημ0.

SO₄ = η ποσότητα των θειικών ανά φυτό ή φυτικό μέρος (σε μmol)

[SO₄] = η συγκέντρωση των θειικών (σε μmol g⁻¹ ΞΜ)

SO₄ / SO₄₀ = ο λόγος των θειικών του φυτού ή του φυτικού μέρους ως προς την αντίστοιχη ποσότητα την ημ0.

Sorg = η ποσότητα του οργανικού θείου ανά φυτό ή φυτικό μέρος (σε μmol)

[Sorg] = η συγκέντρωση του οργανικού θείου (σε μmol g⁻¹ ΞΜ)

Sorg / Sorg₀ = ο λόγος του οργανικού θείου του φυτού ή του φυτικού μέρους ως προς την αντίστοιχη ποσότητα την ημ0.

-S = η ανάπτυξη των φυτών σε θρεπτικό διάλυμα το οποίο δεν προστέθηκαν θειικά άλατα.

C = η ανάπτυξη των φυτών σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (φυτά μάρτυρες ή control).

Πίνακας 2.1

Η κινητική της συσσώρευσης της ξηρής μάζας στα φυτά των δύο μεταχειρίσεων συγκριτικά με τις αντίστοιχες συσσωρεύσεις (ανά φυτό) ή συγκεντρώσεις (ανά μονάδα ξηρής μάζας) του ολικού σιδήρου, του ολικού θείου, των θειϊκών και του οργανικού θείου αντίστοιχα. Παράλληλα δίνονται και οι μοριακοί λόγοι θειϊκών προς ολικό θείο, ολικού θείου προς σίδηρο και οργανικού θείου προς σίδηρο.

Ολόκληρο φυτό		ημ0	C		-S	
			ημ10	ημ19	ημ10	ημ19
ΞM	mg	192	313	1725	364	863
$\Xi\text{M} / \Xi\text{M}_0$		1	1.6	9.0	1.9	4.5
Fe	μmol	0.089	2.648	9.133	1.836	0.610
Fe / Fe ₀		1	29.6	102.2	20.5	6.8
[Fe]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	0.5	8.5	5.3	5.0	0.7
Stot	μmol	5.3	32.6	143.2	13.2	16.0
Stot / Stot ₀		1	6.2	27.3	2.5	3.0
[Stot]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	27.3	104.0	83.0	36.3	18.5
SO4	μmol	1.4	16.8	48.3	2.6	4.3
SO4 / SO4 ₀		1	11.8	33.9	1.8	3.0
[SO4]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	7.4	53.6	28.0	7.1	5.0
Sorg	μmol	3.8	15.8	94.9	10.6	11.7
Sorg / Sorg ₀		1	4.1	24.8	2.8	3.1
[Sorg]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	19.9	50.4	55.0	29.2	13.5
SO4:Stot		0.272	0.515	0.337	0.194	0.269
Stot:Fe		58.8	12.3	15.7	7.2	26.2
Sorg:Fe		42.8	6.0	10.4	5.8	19.1

2.3 Αποτελέσματα

2.3.1 Ολόκληρο φυτό

Η εμφάνιση των φυτών κατά τη διάρκεια του πειράματος έδειξε ότι η έλλειψη θειϊκών από το θρεπτικό διάλυμα συνοδεύτηκε από αναμενόμενες χλωρώσεις και καθυστέρηση της αύξησης (Εικόνα 2.3 γ, δ), ενώ στα φυτά μάρτυρες υπήρχε ελαφρά μεσονεύρια χλωρώση (Εικόνα 2.3 α, β). Η ξηρή μάζα των φυτών υπό πλήρη θρέψη κατά την ημ19 ήταν 9 φορές περισσότερη από αυτή της ημ0, ενώ η αντίστοιχη υπό -S περιορίστηκε στις 4.5 φορές (Πίνακας 2.1). Η κατανομή του σιδήρου που απορροφήθηκε από το φυτό ήταν μεταξύ 5 και 8 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ στα φυτά μάρτυρες, ενώ μειώθηκε δραματικά στα 0.7 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ κατά την ημ19 υπό -S που ισοδυναμούσε με συσσώρευση σιδήρου ανά φυτό κατά 6.8 φορές έναντι αυτής κατά 102 φορές στα φυτά μάρτυρες. Επομένως κατά το 2^ο δεκαήμερο της μεταχείρισης -S η παρουσία του σιδήρου υστερούσε δραματικά με όποιο τρόπο και αν εκφραζόταν ποσοτικά. Η συσσώρευση ολικού θείου κατά την ημ19 ήταν κατά 27 φορές υψηλότερη από αυτή της ημ0 υπό πλήρη θρέψη και κατά 3 φορές υπό -S. Η αντίστοιχη αύξηση για τα θειϊκά ήταν 34 φορές έναντι 3 και για το οργανικό θείο ήταν 25 φορές έναντι 3.

Πίνακας 2.2

Η κινητική της συσσώρευσης της ξηρής μάζας στο υπέργειο μέρος των φυτών κατά τις δύο μεταχειρίσεις συγκριτικά με τις αντίστοιχες συσσωρεύσεις (ανά φυτό) ή συγκεντρώσεις (ανά μονάδα ξηρής μάζας) του ολικού σιδήρου, του ολικού θείου, των θειϊκών και του οργανικού θείου αντίστοιχα. Παράλληλα δίνονται και οι μοριακοί λόγοι θειϊκών προς ολικό θείο, ολικού θείου προς σίδηρο και οργανικού θείου προς σίδηρο.

		Υπέργειο μέρος				
		ημ0	C		-S	
			ημ10	ημ19	ημ10	ημ19
ΞM	mg	27	197	1471	236	595
$\Xi M / \Xi M_0$		1	7.3	54.5	8.7	22.0
% $\Xi M_{\text{φυτού}}$		17.2	65.8	86.3	67.6	71.0
Fe	μmol	0.025	0.162	0.489	0.110	0.301
Fe / Fe ₀		1	6.5	19.6	4.4	12.1
% Fe _{φυτού}		30.0	6.8	8.3	6.8	50.4
[Fe]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	0.9	0.8	0.3	0.5	0.5
Stot	μmol	1.24	14.57	100.31	8.34	9.64
Stot / Stot ₀		1	11.7	80.8	6.7	7.8
% Stot _{φυτού}		23.7	44.7	70.1	63.1	60.1
[Stot]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	46.0	73.9	68.2	35.3	16.2
SO4	μmol	0.37	5.48	17.28	1.23	3.35
SO4 / SO4 ₀		1	14.9	46.9	3.3	9.1
% SO4 _{φυτού}		25.8	32.7	35.8	48.0	77.7
[SO4]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	13.6	27.8	11.7	5.2	5.6
Sorg	μmol	0.87	9.08	83.04	7.11	6.29
Sorg / Sorg ₀		1	10.4	95.0	8.1	7.2
% Sorg _{φυτού}		22.8	57.5	87.5	66.8	53.8
[Sorg]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	32.4	46.1	56.4	30.1	10.6
SO4:Stot		0.296	0.376	0.172	0.148	0.348
Stot:Fe		49.8	89.8	205.3	76.1	32.0
Sorg:Fe		35.0	56.0	169.9	64.8	20.9

Το οργανικό θείο υπολογίστηκε από την διαφορά ολικού θείου μείον τα θειϊκά. Οι συγκεντρώσεις του ολικού θείου, των θειϊκών και του οργανικού θείου στα φυτά -S κατά την ημ19 ήταν 18.5, 5 και 13.5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ΞM αντίστοιχα. Επομένως, αν και η μεταχείριση δεν είχε εισροή θείου, εντούτοις συσσωρευόταν θείο σε αυτά. Η συσχέτιση των συσσωρεύσεων οργανικού θείου και ξηρής μάζας σε επίπεδο ολόκληρου φυτού ήταν γραμμική ($R^2 = 0.9975$, Εικόνα 2.4). Υπό -S αυτή η γραμμική σχέση έπαψε να υφίσταται, δηλαδή διαταράχθηκε, ιδιαίτερα κατά το 2^ο δεκαήμερο της μεταχείρισης. Ένα άλλο σημείο το οποίο αναδείχθηκε από αυτά τα δεδομένα ήταν ότι κατά την ημ19 υπήρχαν θειϊκά, τα οποία δεν ανάχθηκαν σε οργανικό θείο γεγονός που υποδηλώνει σοβαρή έλλειψη αναγωγικής ισχύος για την πραγματοποίηση της μετατροπής.

2.3.2 Υπέργειο μέρος

Η συσσώρευση ξηρής μάζας στο υπέργειο την ημ19 ανήλθε στις 54.5 φορές υπό πλήρη θρέψη έναντι 22 υπό -S. Η σχέση συσσωρευμένου σιδήρου προς την συσσωρευμένη ξηρή μάζα έδειξε να κυμαίνεται σε συγκρίσιμα επίπεδα μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων (Πίνακας 2.2, Εικόνα 2.4). Το ολικό θείο συσσωρεύτηκε κατά 81 φορές έναντι 8 υπό -S. Η αντίστοιχη συσσώρευση των θειϊκών ανήλθε σε 47 φορές έναντι 9 και του οργανικού θείου σε 95 φορές έναντι 7.

Πίνακας 2.3

Η κινητική της συσσώρευσης της ξηρής μάζας στο συνολικό ριζικό σύστημα των φυτών κατά τις δύο μεταχειρίσεις συγκριτικά με τις αντίστοιχες συσσωρεύσεις (ανά φυτό) ή συγκεντρώσεις (ανά μονάδα ξηρής μάζας) του ολικού σιδήρου, του ολικού θείου, των θειϊκών και του οργανικού θείου αντίστοιχα. Παράλληλα δίνονται και οι μοριακοί λόγοι θειϊκών προς ολικό θείο, ολικού θείου προς σίδηρο και οργανικού θείου προς σίδηρο.

		Ριζικό σύστημα				
		ημ0	C		-S	
			ημ10	ημ19	ημ10	ημ19
ΞM	mg	29	76	216	87	226
$\Xi M / \Xi M_0$		1	2.6	7.4	3.0	7.8
% $\Xi M_{\text{φυτού}}$		15.1	24.3	12.5	23.9	26.2
Fe	μmol	0.009	2.251	7.491	1.647	0.301
Fe / Fe ₀		1	261.8	871.0	191.5	35.0
% Fe _{φυτού}		9.6	85.0	82.0	89.7	49.3
[Fe]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	0.3	29.6	34.7	18.9	1.3
Stot	μmol	0.86	15.67	39.82	3.68	5.21
Stot / Stot ₀		1	18.2	46.3	4.3	6.1
% Stot _{φυτού}		16.4	48.1	27.8	27.9	32.6
[Stot]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	29.6	206.2	184.4	42.3	23.1
SO4	μmol	0.21	9.89	29.36	1.11	0.82
SO4 / SO4 ₀		1	48.1	142.8	5.4	4.0
% SO4 _{φυτού}		14.4	59.0	60.8	43.4	19.0
[SO4]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	7.1	130.2	135.9	12.8	3.6
Sorg	μmol	0.65	5.78	10.46	2.57	4.39
Sorg / Sorg ₀		1	8.8	16.0	3.9	6.7
% Sorg _{φυτού}		17.1	36.6	11.0	24.1	37.6
[Sorg]	$\mu\text{mol gDM}^{-1}$	22.5	76.1	48.4	29.5	19.4
SO4:Stot		0.239	0.631	0.737	0.303	0.157
Stot:Fe		99.9	7.0	5.3	2.2	17.3
Sorg:Fe		76.0	2.6	1.4	1.6	14.6

Είναι προφανές ότι στα φυτά μάρτυρες συσσωρευόταν περίσσεια θειϊκών κατά 17.2% (μοριακός λόγος SO4:Stot) έναντι 34.8% υπό -S. Η μοριακή αναλογία ολικού θείου προς ολικό σίδηρο ήταν 205:1 έναντι 32:1 υπό -S ή κατ' αντιστοιχία η αναλογία οργανικού θείου προς ολικό σίδηρο ήταν 170:1 έναντι 21:1 υπό -S. Επομένως σίδηρος παρέμενε στο υπέργειο μέρος, αλλά μειωνόταν δραματικά η αναλογία του προς το οργανικό θείο, ενώ σημαντικό μέρος από την ελάχιστη ποσότητα συσσωρευμένων θειϊκών παρέμενε αναξιοποίητη. Η πολύ υψηλή γραμμική σχέση μεταξύ οργανικού θείου και ξηρής μάζας εξακολουθούσε να υφίσταται ($R^2=0.9997$) στο υπέργειο μέρος των φυτών υπό πλήρη θρέψη και διαταρασσόταν υπό -S.

Η ξηρή μάζα του υπέργειου των φυτών -S αντιστοιχούσε στο 71% της ξηρής μάζας του ολόκληρου φυτού (έναντι 86% υπό πλήρη θρέψη), η οποία φιλοξενούσε το 50% του σιδήρου (έναντι 8%), το 60% του ολικού θείου (έναντι 70%), το 78% των θειϊκών (έναντι 36%) και το 54% του οργανικού θείου (έναντι 88%). Είναι αξιοσημείωτη η υψηλή αναλογία του ολικού σιδήρου που παρευρίσκεται στο υπέργειο υπό συνθήκες -S, καθώς και η υψηλή αναλογία θειϊκών (Εικόνα 2.4).

2.3.3 Ριζικό σύστημα

Η κινητική της συσσώρευσης της ξηρής μάζας στο ριζικό σύστημα έδειξε ότι αυτή δεν επηρεάστηκε από την μεταχείριση και επειδή η αντίστοιχη του υπέργειου επηρεάστηκε σημαντικά από την μεταχείριση -S, η ποσοστιαία κατανομή της ξηρής μάζας κατά την ημ19 βρέθηκε περίπου διπλάσια (26.2%) έναντι αυτής των φυτών μαρτύρων (12.5%) (Πίνακας 2.3, Εικόνα 2.4). Η κατανομή του σιδήρου στο ριζικό σύστημα υπό -S υστέρησε δραματικά κατά την ημ19 με την συγκέντρωσή του να διαμορφώνεται στα 1.3 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM}$. Αυτό σημαίνει ότι υπήρξε καθαρή απώλεια σιδήρου από το ριζικό σύστημα κατά το 2^ο δεκαήμερο της μεταχείρισης. Το ολικό θείο εμφάνισε πολύ περιορισμένη αύξηση, με έντονο το φαινόμενο αραίωσης επειδή η ξηρή μάζα αυξήθηκε αναλογικά πολύ περισσότερο κατά την ημ19 υπό -S. Θεϊκά υπήρχαν, αλλά παρά την ισχυρή έλλειψη θείου παρέμεναν συσσωρευμένα με συγκέντρωση 3.6 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM}$. Το οργανικό θείο αυξήθηκε στα φυτά -S κατά 6.7 φορές έναντι 16 στα φυτά μάρτυρες κατά την ημ19, ενώ η κατανομή του οργανικού θείου στο ριζικό διαμορφώθηκε στο 37.6% στα φυτά -S έναντι 11% στα φυτά μάρτυρες. Ως αποτέλεσμα αυτών των μεταβολών, ο μοριακός λόγος θείου προς σίδηρο ήταν αυξημένος στα φυτά -S κατά την ημέρα 19 (17.3 : 1 έναντι 5.3 : 1 στην περίπτωση ολικού θείου προς σίδηρο ή 14.6 : 1 έναντι 1.4 : 1 στην περίπτωση οργανικού θείου προς σίδηρο) (Πίνακας 2.3). Η συσχέτιση ξηρής μάζας προς οργανικό θείο ήταν επίσης γραμμική και στην περίπτωση του ριζικού συστήματος (Εικόνα 2.4).

2.4 Συζήτηση

Τα προηγούμενα αποτελέσματα αναδεικνύουν έναν αριθμό ευρημάτων τα οποία σχολιάζονται στη συνέχεια και αναλύονται διεξοδικά στα επόμενα κεφάλαια. Ξεκινώντας από τα φυτά που αναπτύσσονται υπό καθεστώς πλήρους θρέψης παρατηρούμε ότι η κινητική της συσσώρευσης των ποσοτήτων ξηρής μάζας, ολικού σιδήρου, ολικού θείου και θειικών ανά φυτό ακολουθεί το πρότυπο της εκθετικής αύξησης κατά το αναμενόμενο. Η εξέταση του λόγου ριζικού προς υπέργειο παρέχει ως βασική πληροφορία ότι ενώ ο λόγος βαίνει μειούμενος γεγονός που δηλώνει ότι η κατανομή υλικών είναι υπέρ του υπέργειου για την ξηρή μάζα, το ολικό θείο και τα θειικά, εντούτοις συμβαίνει το αντίθετο στην περίπτωση του ολικού σιδήρου, τονίζοντας ότι η κατανομή είναι υπέρ του ριζικού. Είναι προφανές ότι περισσότερος σίδηρος συσσωρεύεται στο ριζικό υπό συνθήκες πλήρους θρέψης.

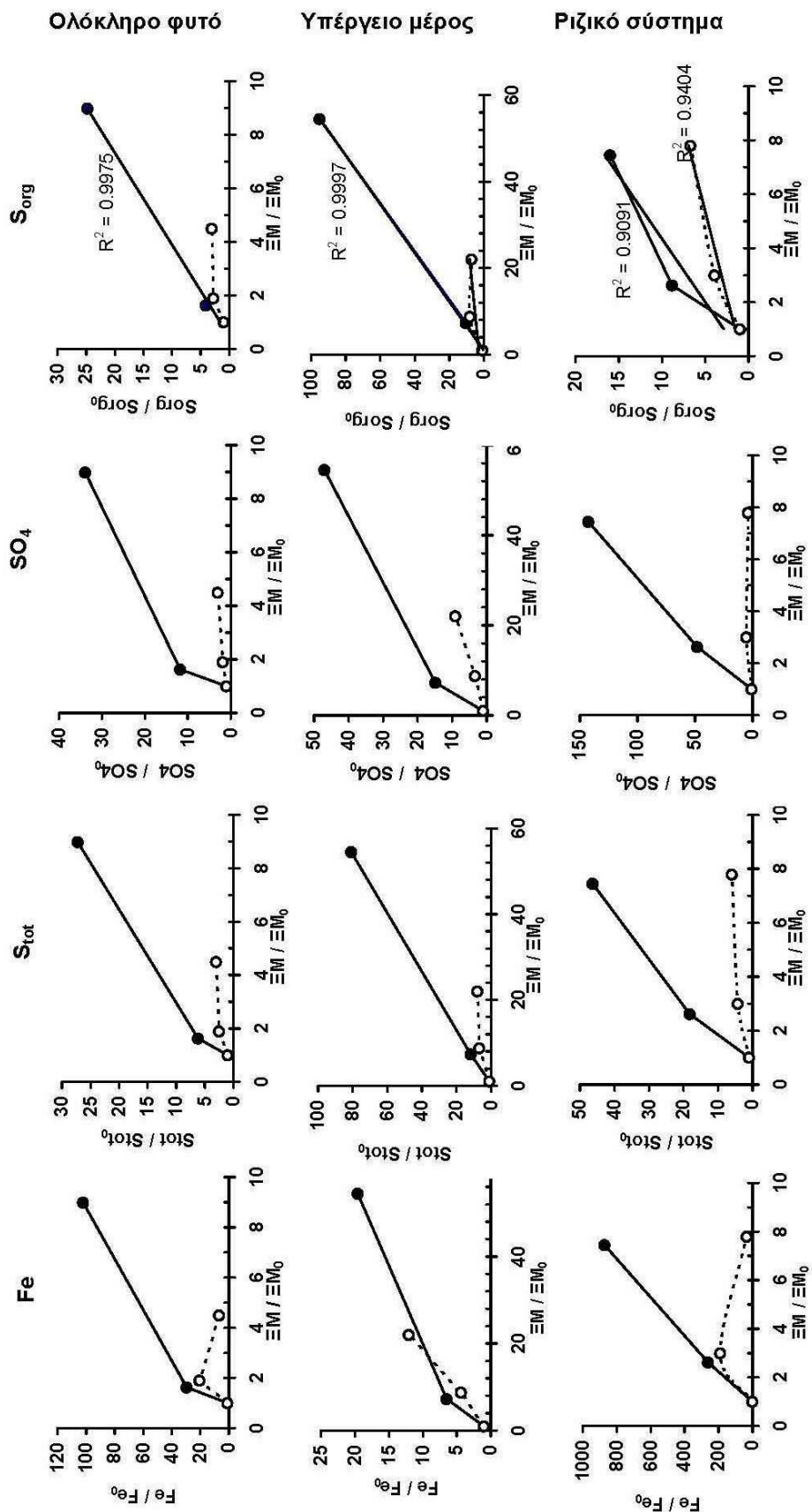
Η απουσία θειικών από το θρεπτικό διάλυμα έδειξε μερικές πολύ ενδιαφέρουσες πτυχές της τροφοπενίας.

(1) Ενώ η ξηρή μάζα συσσωρευόταν στο υπέργειο με μειωμένο ρυθμό, η κατανομή ξηρής μάζας στο ριζικό παρέμενε ανεπηρέαστη.

(2) Αν και ο αποκλεισμός των θειικών ήταν το βασικό χαρακτηριστικό της μεταχείρισης, εντούτοις τα φυτά της μεταχείρισης συσσωρεύαν θείο. Αυτό προφανώς σημαίνει (α) ότι τα άλατα που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές θρεπτικών ιόντων αν και αναλυτικής καθαρότητας εντούτοις περιείχαν προσμίξεις θειικών, και (β) ότι τα θειικά αυτά απορροφήθηκαν από τα φυτά της μεταχείρισης.

Εικόνα 2.4

Η συσχέτιση της σχετικής μεταβολής της ξηρής μάζας με τη σχετική μεταβολή του ολικού σιδήρου, του ολικού θείου, των θειικών και του οργανικού θείου συγκριτικά στο επίπεδο του ολόκληρου φυτού, του υπέργειου μέρους και του ριζικού συστήματος υπό έλλειψη θειικών σε αντιδιαστολή με την αντίστοιχη συσχέτιση υπό πλήρη θρέψη. Γεμάτοι κύκλοι και συνεχής γραμμή: πλήρης θρέψη, άδειοι κύκλοι και διακεκομμένη γραμμή: έλλειψη θειικών από το θρεπτικό διάλυμα.



Για να ελέγξουμε τον συλλογισμό, από τις ετικέτες των συσκευασιών των αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή θρεπτικού διαλύματος ελλειμματικού σε θείο διαπιστώθηκε ότι περιείχαν πρόσμιξη θεικών ως εξής: $\text{KNO}_3 \leq 0,003\%$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

max 0,02%, $ZnCl_2$ 0,002%, H_3BO_3 0,0005%, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,005%, MoO_3 85% 0,02%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,01%. Λαμβάνοντας υπόψη τις συγκεντρώσεις των αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν (5mM KNO_3 , 4mM $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0.9 μM $ZnCl_2$, 30 μM H_3BO_3 , 0.9 μM $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.5 μM MoO_3 85%, 0.86 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$), κατά την παρασκευή 12 L θρεπτικού διαλύματος ελλειμματικού σε θειικά προστίθενται λόγω προσμίξεων οι εξής ποσότητες θειικών: 1,8 μmol από το KNO_3 , 20,8 μmol από το $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0,0003 μmol από το $ZnCl_2$, 0,001 μmol από το H_3BO_3 , 0,001 μmol από το $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,002 μmol από το MoO_3 και 1,8 μmol από το $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, το άθροισμα των οποίων είναι 24,4 μmol θειικών. Δηλαδή σε μία λεκάνη που περιέχει 12 L θρεπτικού διαλύματος χωρίς προσθήκη θειικών αλάτων, εντούτοις από τις προσμίξεις προστίθενται μέχρι 24,4 μmol θειικών και επομένως για κάθε φυτό της λεκάνης αντιστοιχούν 2,03 μmol θειικών. Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν συνολικά 7 αλλαγές θρεπτικού διαλύματος που σημαίνει ότι σε κάθε φυτό της κάθε λεκάνης η μέγιστη εκτιμώμενη εισροή θειικών ήταν 14,21 (7 x 2,03) μmol . Η ποσότητα ολικού θείου ενός φυτού κατά την 7^η ημέρα ήταν 5,25 μmol . Στα φυτά -S την ημ10 η ποσότητα ολικού θείου του φυτού αυξήθηκε στα 13,19 μmol και την ημ19 στα 16,01 μmol . Δηλαδή, το κάθε φυτό που αναπτύχθηκε σε ελλειμματικό σε θειικά θρεπτικό διάλυμα αύξησε την ποσότητα θείου από την ημ0 στην ημ19 κατά 10,76 μmol . Επομένως, το φυτό απορρόφησε τα θειικά που προστέθηκαν ως προσμίξεις κατά την διάρκεια του πειράματος.

(3) Από αυτά τα θειικά που απορροφήθηκαν, ένα μέρος παρέμεινε ως θειικά, τα οποία καταμελήθηκαν στο υπέργειο. Πιθανή εξήγηση είναι ότι δεν υπήρχε η απαιτούμενη αναγωγική ισχύς για να αναχθούν σε οργανικό θείο και ίσως αυτή η συσσώρευση θειικών να λειτουργεί ως σήμα της έλλειψης S (ή και Fe).

(4) Κατά το δεύτερο δεκαήμερο της έλλειψης θειικών, τα φυτά -S εμφάνισαν απώλεια σιδήρου, η οποία εστιάστηκε στο ριζικό.

2.5 Συμπεράσματα

Τα φυτά -S χάνουν σίδηρο από την ρίζα κατά το δεύτερο δεκαήμερο, συνεχίζουν να συσσωρεύουν θείο σε μικρές ποσότητες τόσο σε υπέργειο όσο και σε ριζικό καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος παρά το γεγονός ότι αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο αξιοποιώντας τις προσμίξεις θειικών από τα άλατα της υδροπονίας και συνεχίζουν να αυξάνουν σε μικρό ποσοστό την ποσότητα θειικών στο υπέργειο όπου παραμένουν θειικά χωρίς να ανάγονται.

Κεφάλαιο 3

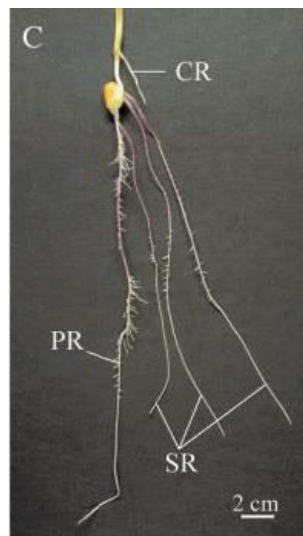
**Η κινητική της κατανομής του σιδήρου στο ριζικό σύστημα
του αραβοσίτου υπό συνθήκες έλλειψης θειικών**

3.1 Εισαγωγή

3.1.1. Η αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος του αραβοσίτου

Το ριζικό σύστημα του αραβοσίτου διακρίνεται σε εμβρυακό και μετεμβρυακό (Abbe and Stein 1954). Το εμβρυακό ριζικό σύστημα περιλαμβάνει μία πρωτογενή εμβρυακή ρίζα και έναν αριθμό δευτερογενών ριζών, ενώ το μετεμβρυακό ριζικό σύστημα αποτελείται από ρίζες που εκπτύσσονται από το βλαστό: τις υπόγειες βλαστογενείς ρίζες που σχηματίζονται από διαδοχικούς κόμβους του φυτού κάτω από το έδαφος και τις εναέριες βλαστογενείς ρίζες που σχηματίζονται από διαδοχικούς κόμβους του βλαστού πάνω από το έδαφος. Οι πλάγιες ρίζες, οι οποίες εκπτύσσονται από όλους τους κύριους τύπους ριζών, κατατάσσονται στο μετεμβρυακό ριζικό σύστημα. Στη αναπτυξιακή πορεία του φυτού το μετεμβρυακό ριζικό σύστημα γίνεται κυρίαρχο και είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη νερού και θρεπτικών στοιχείων (Εικόνα 3.1).

Εκτός από τους κύριους τύπους ριζών οι οποίοι καθορίζονται από το ενδογενές αναπτυξιακό πρόγραμμα, ο αραβόσιτος μπορεί να αναπτύξει άλλες ρίζες οι οποίες σχηματίζονται κάτω από διάφορες συνθήκες, όπως ο τραυματισμός, η εφαρμογή ορμονών ή άλλη εξωγενής διέγερση, σε άλλα μέρη του φυτού, όπως το μεσοκοτύλιο. Στον αραβόσιτο αυτές οι ρίζες συνήθως αναφέρονται ως περιστασιακές ρίζες (Hochholdinger et al. 2004). Αν και οι ανατομικές δομές των διαφόρων τύπων ρίζας είναι παρόμοιες, ξεκινούν από διαφορετικούς ιστούς κατά την διάρκεια της εμβρυακής και μετεμβρυακής ανάπτυξης (Hochholdinger et al. 2004).



Εικόνα 3.1

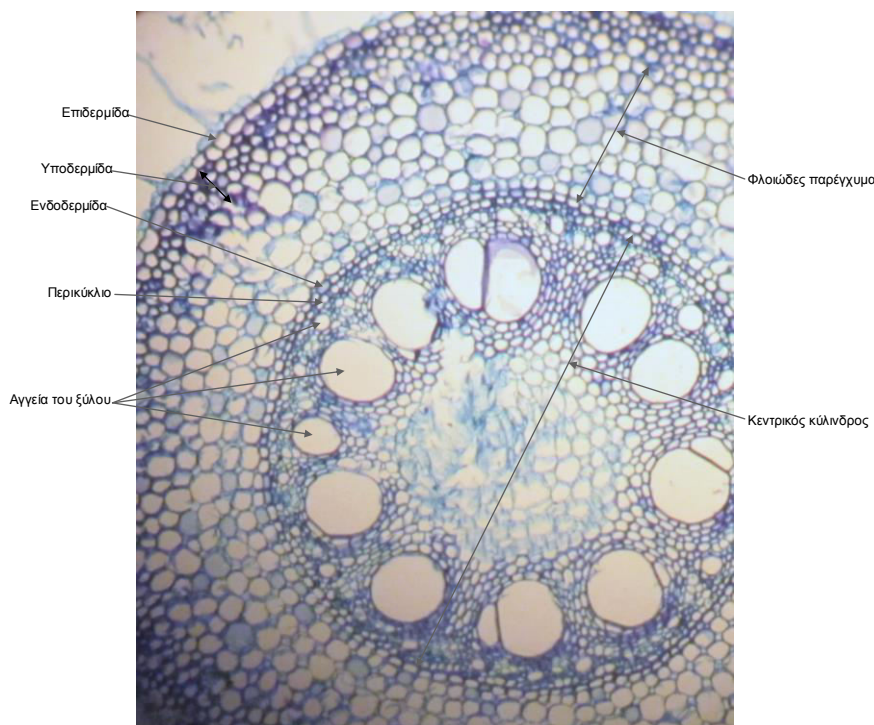
Οι κύριοι τύποι ριζών αραβοσίτου (PR: πρωτογενής ρίζα, SR: δευτερογενείς ρίζες, CR: υπόγειες βλαστογενείς ρίζες).

3.1.2. Τα ανατομικά χαρακτηριστικά των ριζών του αραβοσίτου

Η ανατομία της ρίζας αραβοσίτου είναι χαρακτηριστική ενός μονοκότυλου φυτού. Η ώριμη πρωτογενής ρίζα και οι δευτερογενείς ρίζες, καθώς επίσης και οι ρίζες που εκπτύσσονται από το βλαστό εμφανίζουν ένα κεντρικό κύλινδρο με τα στοιχεία του ηθμώδους και ξυλώδους αγγειακού συστήματος. Το περικύκλιο σχηματίζει το εξωτερικό στρώμα του κεντρικού κυλίνδρου. Ο θεμελιώδης ιστός αποτελείται από μία στρώση ενδοδερμικού ιστού με τη σουβερινοποιημένη και λιγνινοποιημένη λωρίδα του Caspari και πολλές στρώσεις του ιστού του φλοιώδους παρεγχύματος. Το εξωτερικό στρώμα κυττάρων σχηματίζεται από την επιδερμίδα (ριζοδερμίδα), η

οποία αποτελείται από κύτταρα κάποια από τα οποία σχηματίζουν ριζικά τριχίδια και λέγονται τριχοβλάστες. Σε παλαιότερες ρίζες η επιδερμίδα αντικαθίσταται από μία λιγνινοποιημένη ή και σουβερινοποιημένη εξωδερμίδα, η οποία αναπτύσσεται από τα εξωτερικά κύτταρα του φλοιώδους παρεγχύματος και σχηματίζει μία επιπρόσθετη λωρίδα του Caspary (Εικόνα 3.2). Στις εναέριες βλαστογενείς ρίζες η επιδερμίδα εξακολουθεί να υφίσταται και σχηματίζει μία προστατευτική εφυμενίδα. Οι ρίζες αραβοσίτου δεν παρουσιάζουν δευτερογενή αύξηση (Hochholdinger et al. 2004).

Η επιμήκης δομή της ρίζας αραβοσίτου περιλαμβάνει διάφορες μερικώς επικαλυπτόμενες εξειδικευμένες ζώνες ανάπτυξης συμπεριλαμβανομένου της καλύπτρας, του ακραίου μεριστώματος της ρίζας, της ζώνης επιμήκυνσης και τη ζώνη ωρίμανσης (Ishikawa and Evans 1995).



Εικόνα 3.2

Εγκάρσια τομή βλαστογενούς ρίζας αραβοσίτου, από το τμήμα της βάσης 26 ημέρες μετά τη σπορά.

3.1.3 Αποκρίσεις του ριζικού συστήματος στην έλλειψη θεικών

Η έλλειψη του θείου οδηγεί σε μία μετατόπιση του προγράμματος κατανομής της ξηρής μάζας προς τη ρίζα, μειώνοντας σημαντικά την ανάπτυξη του υπέργειου και ενισχύοντας την ανάπτυξη του ριζικού. Αυτός ο ισχυρότερος περιορισμός της αύξησης του βλαστού σε σχέση με την αύξηση του ριζικού συστήματος, που οδηγεί σε μία μείωση του λόγου της ξηρής μάζας υπέργειου προς τη ξηρή μάζα ριζικού, είναι ένα τυπικό σύμπτωμα της έλλειψης θειικών (Astolfi et al. 2003 και 2006a, Bouranis et al. 2006). Σε συνθήκες επαρκούς οξυγόνωσης, η έλλειψη θείου προκαλεί το σχηματισμό αερεγχύματος σε ρίζες αραβοσίτου, παρόμοια με την έλλειψη αζώτου και φωσφόρου. Το αερέγχυμα σχηματίζεται με τη λύση των κυττάρων του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας και οι πρώτοι αερεγχυματικοί χώροι δημιουργούνται στη μέση του φλοιώδους παρεγχύματος των ελλειμματικών σε θείο ριζών (Bouranis et al. 2003b). Η υποδερμίδα και η ενδοδερμίδα δεν επηρεάζονται από την διαδικασία της λύσης των κυττάρων. Το αερέγχυμα καλύπτει το τμήμα που φέρει τις εμφανιζόμενες πλάγιες ρίζες και μέρος του γειτονικού τμήματος. Τα τμήματα της βάσης και του άκρου της ρίζας δεν παρουσιάζουν αερέγχυμα (Bouranis et al. 2006).

Η λειτουργική σημασία του σχηματισμού αερεγχύματος υπό συνθήκες έλλειψης θείου είναι άγνωστη και μπορεί να περιλαμβάνει την αναδιανομή των ανεπαρκών πηγών για την υποστήριξη επιλεγμένων δομών. Επιπλέον, μπορεί να είναι μέρος ενός προσαρμοστικού προγράμματος, το οποίο περιλαμβάνει ενεργοποίηση των προσαρμοστικών μηχανισμών και επένδυση σε άλλες δομές και σε εναλλακτικούς μηχανισμούς.

Ακόμη, η έλλειψη θειικών επάγει την διαδικασία της λιγνινοποίησης στις ρίζες αραβοσίτου (Bouranis et al. 2003b). Λιγνινοποιημένα επιδερμικά στρώματα εντοπίζονται στα τμήματα της βάσης, σε μία περιορισμένη επέκταση των λιγνινοποιημένων στρωμάτων προς το γειτονικό τμήμα που φέρει τις πλάγιες ρίζες (Bouranis et al. 2006). Η αύξηση του πάχους του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να αυξήσει την μηχανική στήριξη των ριζών που στερούνται θείου. Όπως διαπιστώθηκε και για άλλα θρεπτικά στοιχεία, η αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος επηρεάζεται από τη θρέψη του θείου (Bouranis et al. 2006, Hopkins et al. 2004, Kutz et al. 2002). Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί αύξηση των πλάγιων ριζών στο *Arabidopsis* υπό απόκριση της έλλειψης θείου (Kutz et al. 2002). Σε αεροπονικό σύστημα ανάπτυξης αραβοσίτου, εμφανίστηκε αυξημένο μήκος πλάγιων ριζών όσο και αυξημένος αριθμός πλάγιων ριζών κοντά στο άκρο της κύριας ρίζας κατά την διάρκεια της έλλειψης θείου (Hopkins et al. 2004). Επιπλέον, σε υδροπονική καλλιέργεια, η έλλειψη θείου κατέδειξε κοντύτερες πλάγιες ρίζες στα τμήματα πλησίον της βάσης της ρίζας. Ο πολλαπλασιασμός των πλάγιων ριζών συνδέεται με το σχηματισμό αερεγχύματος. Το αερέγχυμα, που παρουσιάζεται στο φλοιώδες παρέγχυμα κατά μήκος της ρίζας, εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή που εμφανίζονται οι πλάγιες ρίζες. Τα τμήματα της βάσης και του άκρου της ρίζας δεν αναπτύσσουν αερέγχυμα και δεν φαίνεται να υπάρχει σύνδεση αερεγχύματος με το βλαστό (Bouranis et al. 2006).

3.1.4 Σκοπός του κεφαλαίου

Η συνθετότητα της αρχιτεκτονικής του ριζικού συστήματος εγείρει το ερώτημα αν ο σίδηρος κατανέμεται ομοιόμορφα μέσα στους διαφόρους τύπους ριζών υπό πλήρη θρέψη. Το κεφάλαιο αυτό εστιάζει στην απόκριση του ριζικού συστήματος και ο κάθε τύπος ριζών μελετήθηκε λεπτομερώς από μορφομετρική άποψη. Από πλευράς ανατομίας επικεντρώθηκε το ενδιαφέρον στην 1^η ομάδα βλαστογενών ριζών επειδή αυτός ο τύπος ρίζας ξεκινάει να εκπύσσεται την 7^η ημέρα, κατά την οποία ξεκινάει και η μεταχείριση της ανάπτυξης φυτών υπό καθεστώς σοβαρής έλλειψης θειικών από το θρεπτικό διάλυμα. Με δεδομένο ότι το θείο είναι αυτό του σπόρου ελαφρά προσαυξημένο λόγω των θειικών που υπάρχουν ως προσμίξεις στα προστιθέμενα άλατα τις υδροπονίας όπως εξηγήθηκε, καθώς επίσης ότι ο σίδηρος του ριζικού συστήματος μειώνεται δραστικά κατά το δεύτερο δεκαήμερο υπό αυτό το καθεστώς θείου, το δεύτερο ερώτημα εργασίας ήταν πως επηρεάστηκε η κατανομή του σιδήρου μέσα στους διάφορους τύπους ριζών κατά το 1^ο και το 2^ο δεκαήμερο της έλλειψης θειικών από το θρεπτικό διάλυμα.

3.2. Υλικά και μέθοδοι

Σε αυτή την πειραματική ενότητα διενεργήθηκαν πειράματα χρονικής διάρκειας 26 ημερών. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, όπως το φυτικό υλικό και οι συνθήκες ανάπτυξης των φυταρίων στην υδροπονία, το θρεπτικό διάλυμα, οι μεταχειρίσεις και οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν την 7^η, 17^η και 26^η ημέρα από την σπορά παρέμειναν ίδιες με εκείνες που περιγράφονται διεξοδικά στην ενότητα «Υλικά και μέθοδοι» του Κεφαλαίου 2.

3.2.1 Κατανομές ξηρής μάζας, νερού, σιδήρου και θείου ριζικού συστήματος

Μετρήθηκαν οι παράμετροι του νωπού βάρους κάθε τύπου ρίζας και του αντίστοιχου ξηρού βάρους τους. Ο προσδιορισμός του ολικού σιδήρου, του ολικού θείου και των θειικών περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα «Υλικά και μέθοδοι» του Κεφαλαίου 2.

3.2.2 Μορφομετρική ανάλυση του ριζικού συστήματος

Μετρήθηκαν το μήκος κάθε τύπου ρίζας, το μήκος των επιμέρους τμημάτων σε κάθε τύπο ρίζας, ο αριθμός ριζών σε κάθε τύπο ρίζας, καθώς και ο αριθμός και το μήκος των πλάγιων ριζών σε κάθε τύπο ρίζας. Για τον προσδιορισμό του μήκους κάθε τύπου ρίζας και των τμημάτων της ελήφθησαν φωτογραφίες των παραπάνω φυτικών οργάνων, τα οποία είχαν τοποθετηθεί πάνω σε βαθμονομημένο χαρτί και χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα επεξεργασίας ImageJ.

3.2.3 Ανατομία της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών

Για τη μελέτη της ανατομίας σε αυτό το τύπο της ρίζας, ελήφθησαν δείγματα από το νωπό φυτικό υλικό και με την διαδικασία την προσήλωσης και εγκλεισμού τους σε παραφίνη δημιουργήθηκαν μόνιμα παρασκευάσματα. Οι τομές έγιναν στις περιοχές 200μm, 400μm, 600μm, 800μm και 1000μm του ακρορριζίου, στο τμήμα του άκρου (Α), στο τμήμα που φέρει τις πρωτοεμφανιζόμενες πλάγιες ρίζες (ΑπλΡ), στο τμήμα που φέρει τις πλάγιες ρίζες (πλΡ) και στο τμήμα της βάσης (Β) της ρίζας. Μετά την λήψη φωτογραφιών των τομών αυτών στο οπτικό μικροσκόπιο μετρήθηκαν το εμβαδόν της τομής της ρίζας, το εμβαδόν της επιδερμίδας και υποδερμίδας μαζί, το εμβαδόν του φλοιώδους παρεγχύματος, το εμβαδόν του αερεγχύματος, το εμβαδόν της τομής του κεντρικού κυλίνδρου, καθώς και ο αριθμός και η επιφάνεια των μεταξυλικών αγγείων. Για τον προσδιορισμό των παραπάνω ανατομικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα επεξεργασίας ImageJ.

Διαδικασία προσήλωσης και εγκλεισμού δειγμάτων σε παραφίνη

Προσήλωση

Οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε δοχεία με προσηλωτικό διάλυμα για 2 ημέρες τουλάχιστον. Για την παρασκευή 500 mL προσηλωτικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν 50 mL διαλύματος φορμαλδεΰδης 37%, 1,25mL γλουταραλδεΰδης 0,25% v/v και συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό (Ruzin, 1999). Για την καλύτερη διείσδυση του προσηλωτικού στον ιστό αφαιρέθηκε ο αέρας με ακετόνη. Συγκεκριμένα, ο κάθε φυτικός ιστός τοποθετήθηκε σε ύαλο ωρολογίου που περιείχε ακετόνη και παρέμεινε για 5 λεπτά και μετά τοποθετήθηκε στο προσηλωτικό διάλυμα.

Αφυδάτωση

Στη συνέχεια έγινε σταδιακή αφυδάτωση των ιστών σε μείγματα αλκοολών επειδή θα ακολουθήσει εγκλεισμός σε παραφίνη, η οποία είναι αδιάλυτη στο νερό, για την πραγματοποίηση τομών στο μικροτόμο. Τα μείγματα αλκοολών που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής: 50:40:10 (απεσταγμένο νερό: αιθανόλη 95%: βουτανόλη-1), για 2 ώρες τουλάχιστον, 30:50:20 (απεσταγμένο νερό: αιθανόλη 95%: βουτανόλη-1), για 2 ώρες τουλάχιστον, 15:50:35 (απεσταγμένο νερό: αιθανόλη 95%: βουτανόλη-1), για 2 ώρες τουλάχιστον, 45:55 (αιθανόλη 95%: βουτανόλη-1), για 2 ώρες τουλάχιστον, 25:75 (απόλυτη αιθανόλη:βουτανόλη-1), για 2 ώρες τουλάχιστον, 100% βουτανόλη-1, για 6 ώρες τουλάχιστον (2 ώρες x 3 φορές).

Εμποτισμός σε ενδιάμεσο διαλύτη

Ως ενδιάμεσος διαλύτης για τον εμποτισμό των ιστών σε παραφίνη, χρησιμοποιήθηκε το ξυλένιο. Οι ιστοί τοποθετήθηκαν διαδοχικά στα εξής διαλύματα (Ruzin 1999, με τροποποιήσεις): 75:25 (βουτανόλη-1:ξυλένιο) για 1 ώρα τουλάχιστον, 50:50 (βουτανόλη-1:ξυλένιο) για 1 ώρα τουλάχιστον, 25:75 (βουτανόλη-1:ξυλένιο) για 1 ώρα τουλάχιστον, 100% ξυλένιο για 3 ώρες τουλάχιστον (1 ώρα x 3 φορές).

Βαθμιαίος εμποτισμός με παραφίνη

Για τον βαθμιαίο εμποτισμό των ιστών με παραφίνη, έγινε σταδιακή προσθήκη κόκκων παραφίνης στα φιαλίδια με τους ιστούς μέχρι το διάλυμα ξυλένιου να κορεστεί και η παραφίνη να αρχίσει να συσσωρεύεται αδιάλυτη. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε φούρνο στους 42°C, θερμοκρασία χαμηλότερη από το σημείο τήξης της παραφίνης (56-58°C). Στη συνέχεια τα φιαλίδια με τους ιστούς τοποθετήθηκαν σε φούρνο θερμοκρασίας 60°C για να υγροποιηθεί η αδιάλυτη παραφίνη. Το διάλυμα αυτό αντικαταστάθηκε με καθαρή, υγρή παραφίνη και οι ιστοί παρέμειναν για 2 ώρες στο φούρνο. Ακολούθησε νέα αντικατάσταση της παραφίνης και η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε δύο φορές ακόμα. Οι ιστοί παρέμειναν στην τελευταία παραφίνη για 24 ώρες, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο πλήρης εμποτισμός τους. Μετά την πάροδο των 24 ωρών τα δείγματα βγήκαν από τον φούρνο και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (Ruzin, 1999, με τροποποιήσεις).

Προετοιμασία δειγμάτων για παραλαβή τομών με τον μικροτόμο

Για την παραλαβή τομών με τον μικροτόμο οι ιστοί εγκλωβίστηκαν πρώτα σε κύβους παραφίνης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μεταλλικό «καλούπι» στο οποίο προστέθηκε υγρή παραφίνη και ολόκληρο το σύστημα τοποθετήθηκε σε δοχείο με νερό. Στην συνέχεια τοποθετήθηκε ο ιστός στο κέντρο του καλουπιού με τέτοιο τρόπο ώστε ή να είναι παράλληλος με την ελεύθερη επιφάνεια της παραφίνης ή να είναι κάθετος, ανάλογα με το φυτικό ιστό κάθε φορά. Στη συνέχεια με τη βοήθεια θερμής ανατομικής βελόνας τήκεται συνεχώς η παραφίνη γύρω από το δείγμα καθώς και η επιφάνεια της παραφίνης ώστε να είναι αυτή η τελευταία που θα στερεοποιηθεί. Αφού στερεοποιηθεί η παραφίνη, απομακρύνεται το καλούπι και οι κύβοι διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Παραλαβή τομών από το μικροτόμο – σταθεροποίηση τομών σε αντικειμενοφόρο

Μετά την πάροδο τουλάχιστον μίας ημέρας, ο κύβος παραφίνης που περιέχει τον ιστό τοποθετήθηκε σε μικροτόμο (Leica Jung 2025), όπου πραγματοποιήθηκαν τομές πάχους 16 μm. Στη συνέχεια, οι τομές τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο, που είχε εμβαπτιστεί σε διάλυμα πολυ-L-λυσίνης, πάνω σε σταγόνα απεσταγμένου νερού. Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα (42°C) για 48 ώρες, έτσι ώστε να εξατμισθεί το νερό και να σταθεροποιηθούν οι τομές στην αντικειμενοφόρο. Για την εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων στο διάλυμα πολυ-L-λυσίνης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται με εμβάπτιση σε διάλυμα οξιμισμένης αλκοόλης (1% HCl σε αιθανόλη 70%) και τοποθετούνται στους 40°C για να στεγνώσουν. Στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε διάλυμα πολυ-L-λυσίνης (100 μg/mL), όπου παραμένουν για 30 λεπτά και ξανατοποθετούνται στους 40°C για να στεγνώσουν (Ruzin, 1999). Αυτές οι αντικειμενοφόροι μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

Απομάκρυνση παραφίνης και ενυδάτωση τομών

Για την απομάκρυνση της παραφίνης από τις τομές ακολουθείται διαδοχική εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων στα παρακάτω διαλύματα: Ξυλένιο 100% για 10 λεπτά, ξυλένιο 100% για 5 λεπτά, 50:50 (ξυλένιο : απόλυτη αιθανόλη) για 15 λεπτά. Για την ενυδάτωση των τομών πραγματοποιούνται διαδοχικές εμβάπτισεις

των αντικειμενοφόρων στα παρακάτω διαλύματα: Διάλυμα απόλυτης αιθανόλης για 5 λεπτά, διάλυμα αιθανόλης 95% για 5 λεπτά, διάλυμα αιθανόλης 70% για 5 λεπτά, διάλυμα αιθανόλης 50% για 5 λεπτά.

Χρώση των τομών

Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε διάλυμα σαφρανίνης (0,5% Safranin O σε EtOH 50%) για 24 ώρες. Για την απομάκρυνση της περίσσειας της σαφρανίνης οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται διαδοχικά στα παρακάτω διαλύματα: Απιονισμένο νερό (2 λεπτά X 3 φορές), οξυνισμένη αιθανόλη 70% για 10 s (η οξύνιση έγινε με την προσθήκη λίγων σταγόνων πυκνού οξεικού οξέος), αιθανόλη 95% για 2 s, αιθανόλη 95% για 2 s, αιθανόλη 100% για 2 s. Το επόμενο βήμα περιελάμβανε χρώση των τομών σε διάλυμα 0,1% Fast Green FCF σε γαρυφαλέλαιο/απόλυτη αιθανόλη (1:1) για 10-20s. Ακολουθήθηκε η διαφοροποίηση της χρώσης με τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων στο διάλυμα διαφοροποίησης (γαρυφαλέλαιο : απόλυτη αιθανόλη : ξυλένιο, 50:25:25) για 15 λεπτά. Για την παρασκευή μόνιμων παρασκευασμάτων οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε ξυλένιο 100% για 15 λεπτά. Στη συνέχεια οι τομές καλύπτονται με DPX-Mountant (συνθετική ρητίνη), τοποθετούνται καλυπτρίδες και παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο.

Συνομογραφίες

ΠΡ	Πρωτογενής ρίζα
ΔΡ	Δευτερογενής ρίζες
ΡΜ	Ρίζες μεσοκοτυλίου
ΒΡ	Βλαστογενείς ρίζες
ΒΡ1	1 ^η ομάδα βλαστογενών ριζών
ΒΡ2	2 ^η ομάδα βλαστογενών ριζών
ΒΡ3	3 ^η ομάδα βλαστογενών ριζών
πΛΡ	Τμήμα ρίζας που φέρει τις πλάγιες ρίζες
ΑπΛΡ	Τμήμα ρίζας που φέρει τις αναδυόμενες πλάγιες ρίζες
Β	Βάση της ρίζας (δεν φέρει πλάγιες)
Α	Το τμήμα της ρίζας από το άκρο μέχρι την έναρξη του ΑπΛΡ
Μ	Το μέσο της ρίζας

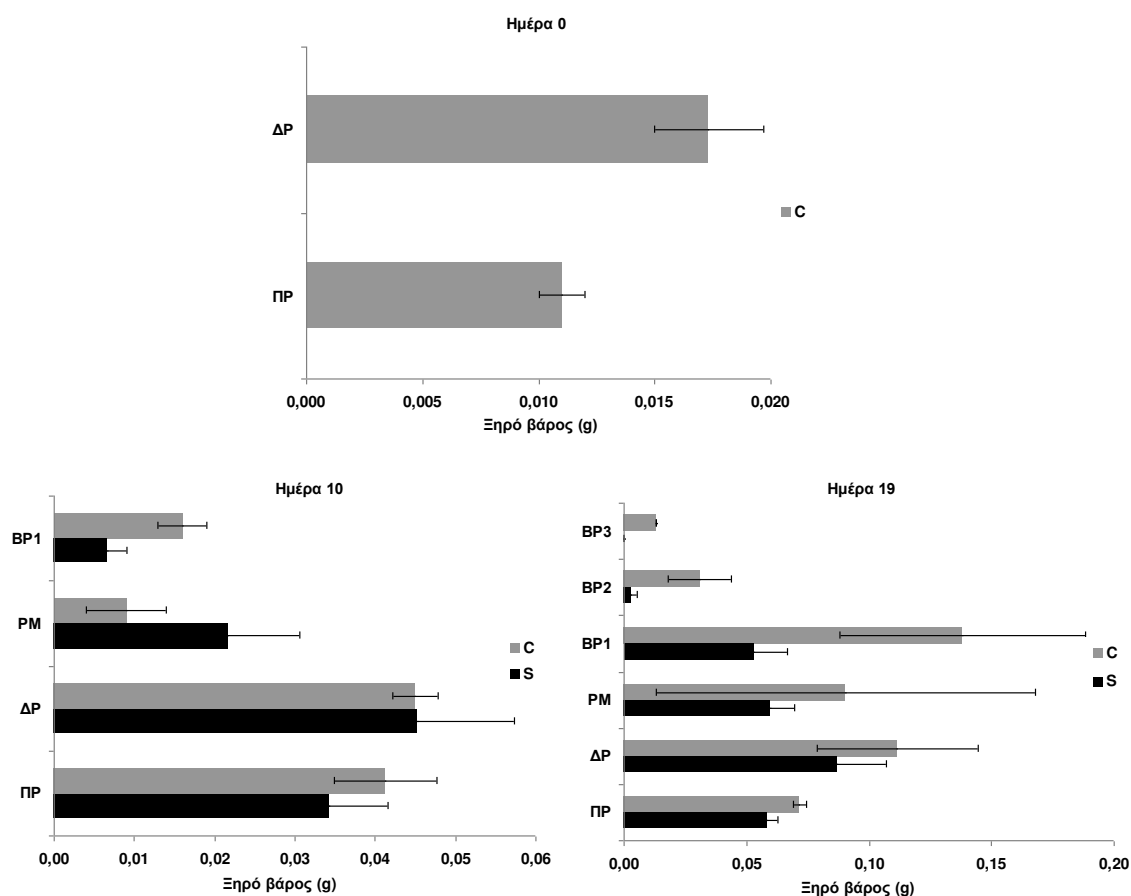
3.3 Αποτελέσματα

Κατά την έναρξη της μεταχείρισης

Την ημ0 υπήρχε μόνο το εμβρυακό ριζικό σύστημα, που αποτελείτο από 5 ριζικούς άξονες: μία πρωτογενή ρίζα (ΠΡ) και τέσσερις δευτερογενείς ρίζες (ΔΡ). Σε αυτό, οι ΔΡ καταλάμβαναν το 59% της ξηρής μάζας (Εικόνα 3.3). Το μήκος της ΠΡ ήταν 24 cm, το μέσο μήκος των τεσσάρων ΔΡ 17,4 cm και το συνολικό μήκος 68 cm (Εικόνα 3.4). Η ΠΡ είχε διαμορφώσει επιμέρους τμήματα (Β, πΛΡ, ΑπΛΡ και Α), με 33 πλάγιες ρίζες που είχαν μέσο μήκος 2,1 cm. Στις ΔΡ δεν είχαν διαμορφωθεί ακόμη τμήματα (Εικόνες 3.5 και 3.9). Οι ΔΡ εμφάνισαν μικρότερη πυκνότητα μάζας (0.25 mg cm^{-1}) σε σχέση με την ΠΡ ($0,5 \text{ mg cm}^{-1}$), με σταθμική μέση πυκνότητα μάζας ριζικού τα $0,31 \text{ mg cm}^{-1}$ (Εικόνα 3.10).

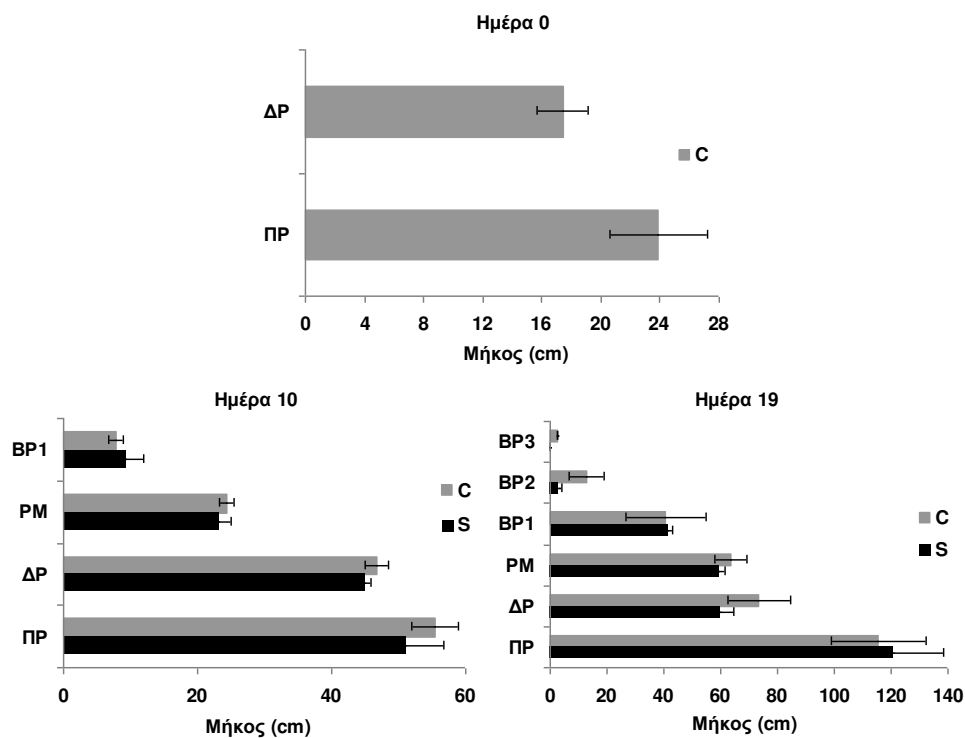
Από την ποσότητα του ολικού σιδήρου του ριζικού συστήματος το 65% κατανεμήθηκε στις ΔΡ. Η συγκέντρωση του σιδήρου ήταν $0.29 \mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ στις ΔΡ και $0.25 \mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ στην ΠΡ (Εικόνα 3.14). Από την ποσότητα του ολικού θείου του ριζικού συστήματος το 58.1% κατανεμήθηκε στις ΔΡ. Η συγκέντρωση του ολικού θείου ήταν $29.4 \mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ στις ΔΡ και $30 \mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ στην ΠΡ (Εικόνα 3.15). Από την ποσότητα των θειϊκών του ριζικού συστήματος το 70% κατανεμήθηκε στις ΔΡ. Η συγκέντρωση των θειϊκών ήταν $8.2 \mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ στις ΔΡ και $5 \mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ στην ΠΡ (Εικόνα 3.16). Επομένως, το οργανικό θείο κατανεμήθηκε κατά 54.5% στις ΔΡ και η συγκέντρωσή του ήταν $22.5 \mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$

στις ΔΡ και 25 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ΞΜ στην ΠΡ. Τα προηγούμενα διαμόρφωσαν αναλογία $\text{SO}_4^{2-}:\text{S}$ στη ΠΡ 17% και στις ΔΡ 28%, ενώ η αναλογία $\text{S}_{\text{tot}}:\text{Fe}$ στη ΠΡ ήταν 120:1 και στις ΔΡ 100:1 (Εικόνα 3.17).



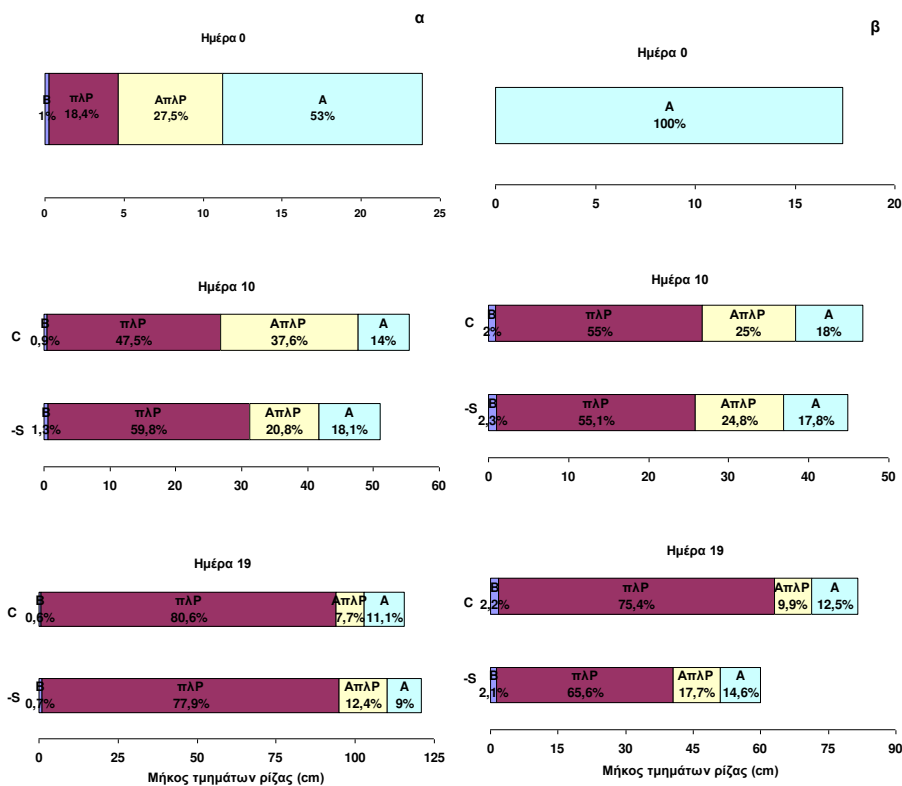
Εικόνα 3.3

Κατανομή της ξηρής μάζας των φυτικών οργάνων την ημέρα 0, 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θεικών (S, μαύρες στήλες). ΠΡ πρωτογενή ρίζα, ΔΡ δευτερογενείς ρίζες, PM ρίζες μεσοκοτυλίου, BP1, BP2, BP3 η 1^η, 2^η, 3^η ομάδα βλαστογενών ριζών αντίστοιχα.



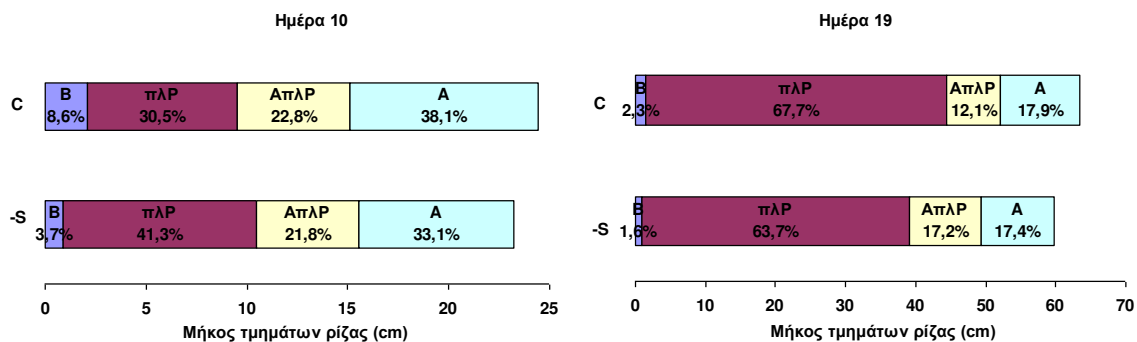
Εικόνα 3.4

Μήκος κάθε τύπου ρίζας την ημέρα 0, 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



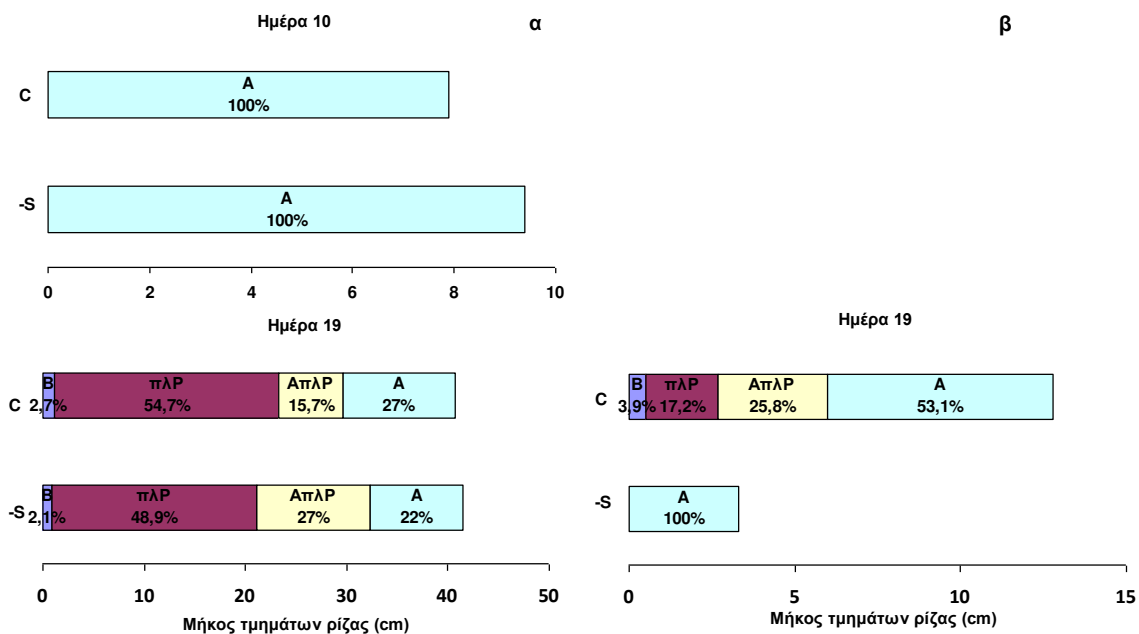
Εικόνα 3.5

Μήκη τμημάτων με τα ποσοστά επί του συνολικού μήκους της πρωτογενούς ρίζας (α) και των δευτερογενών ριζών (β) την ημέρα 0, 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S).



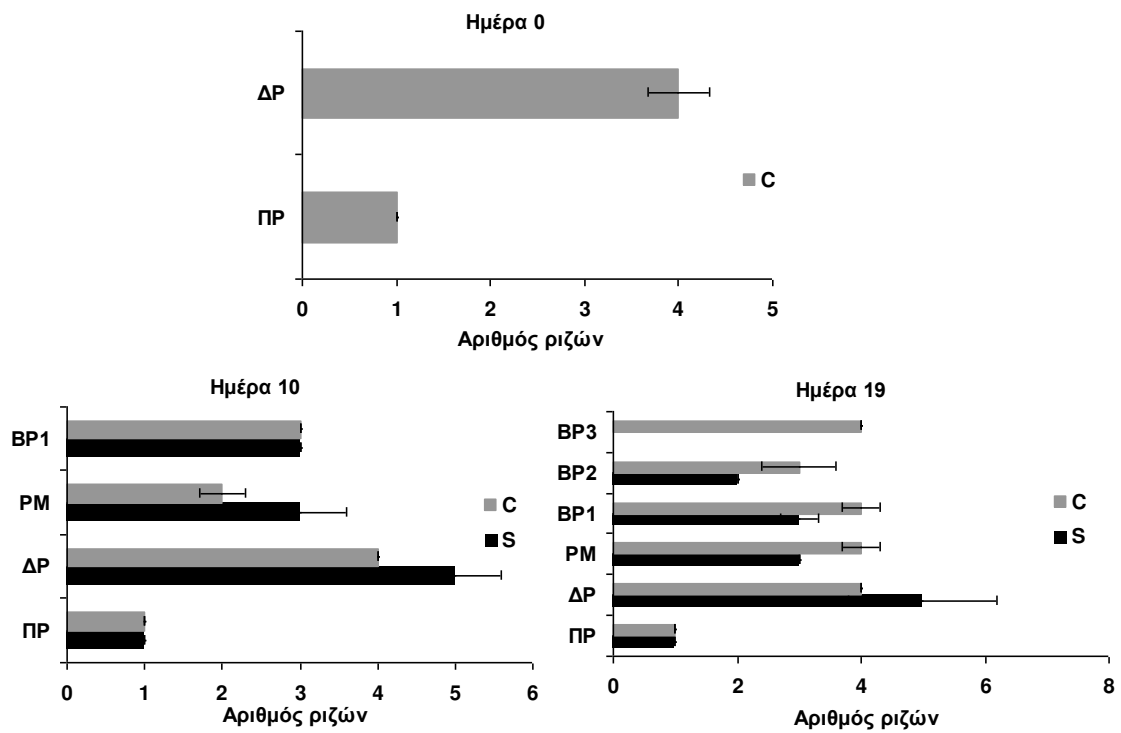
Εικόνα 3.6

Μήκος των τμημάτων με το αντίστοιχο ποσοστό επί του συνολικού μήκους των ριζών του μεσοκοτυλίου την ημέρα 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S).



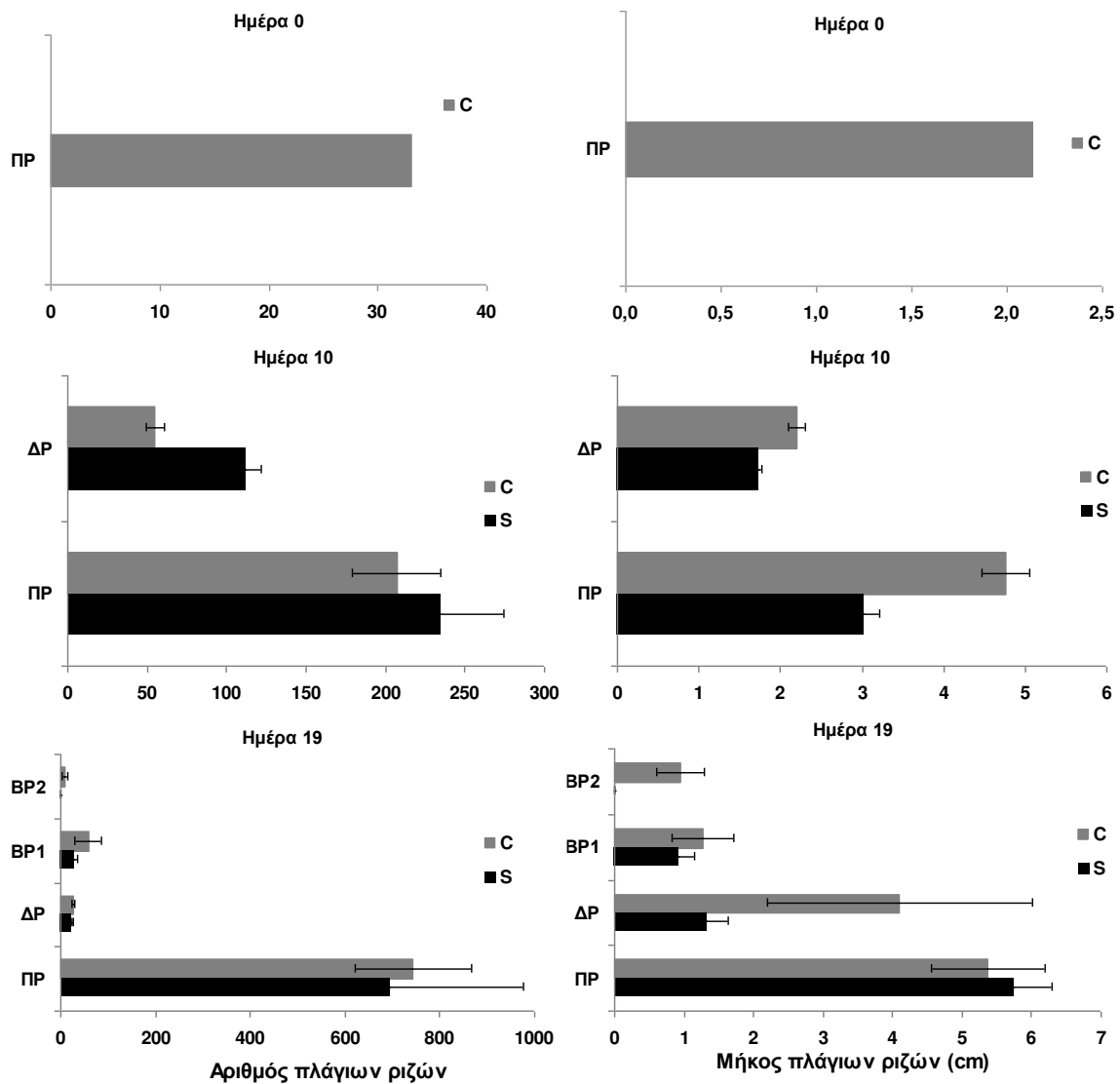
Εικόνα 3.7

Μήκη τμημάτων της 1^{ης} (α) και 2^{ης} (β) ομάδας βλαστογενών ριζών την ημέρα 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S).



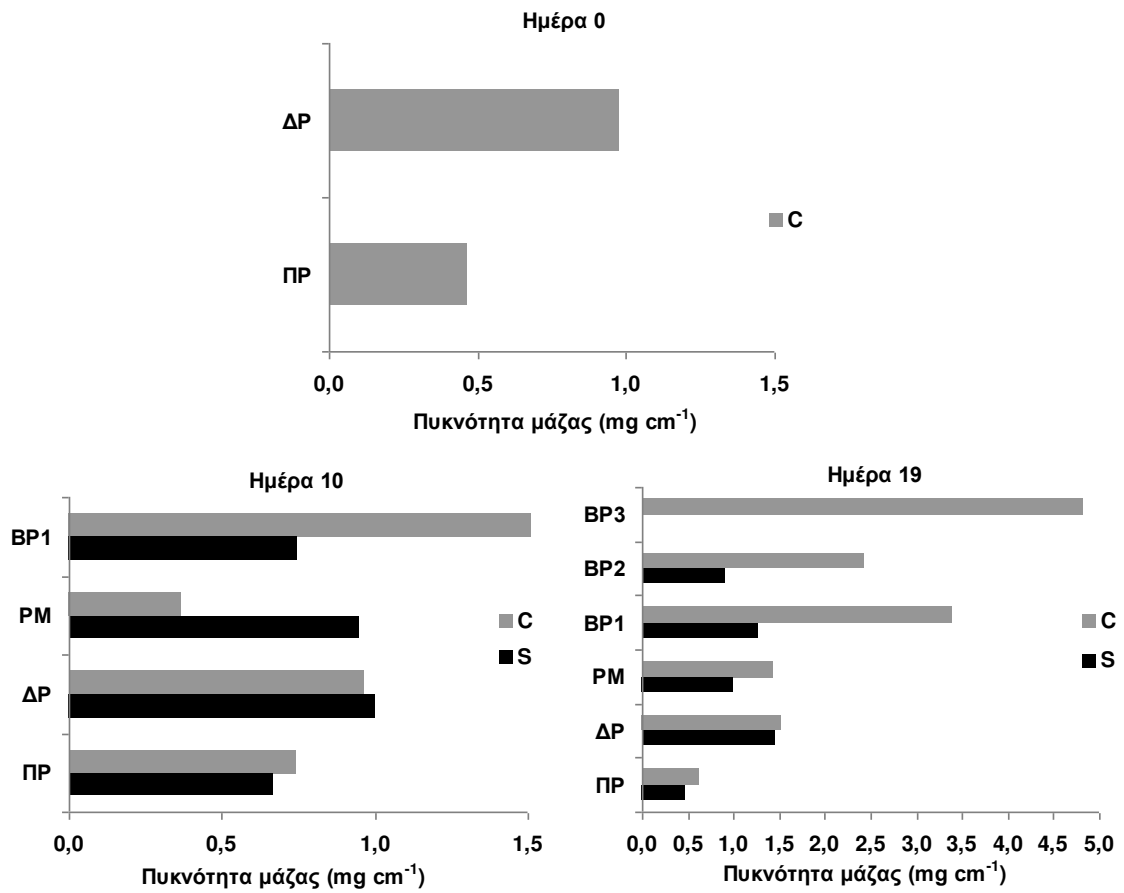
Εικόνα 3.8

Αριθμός ριζών σε κάθε τύπο ρίζας την ημέρα 0, 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θεικών (S, μαύρες στήλες).



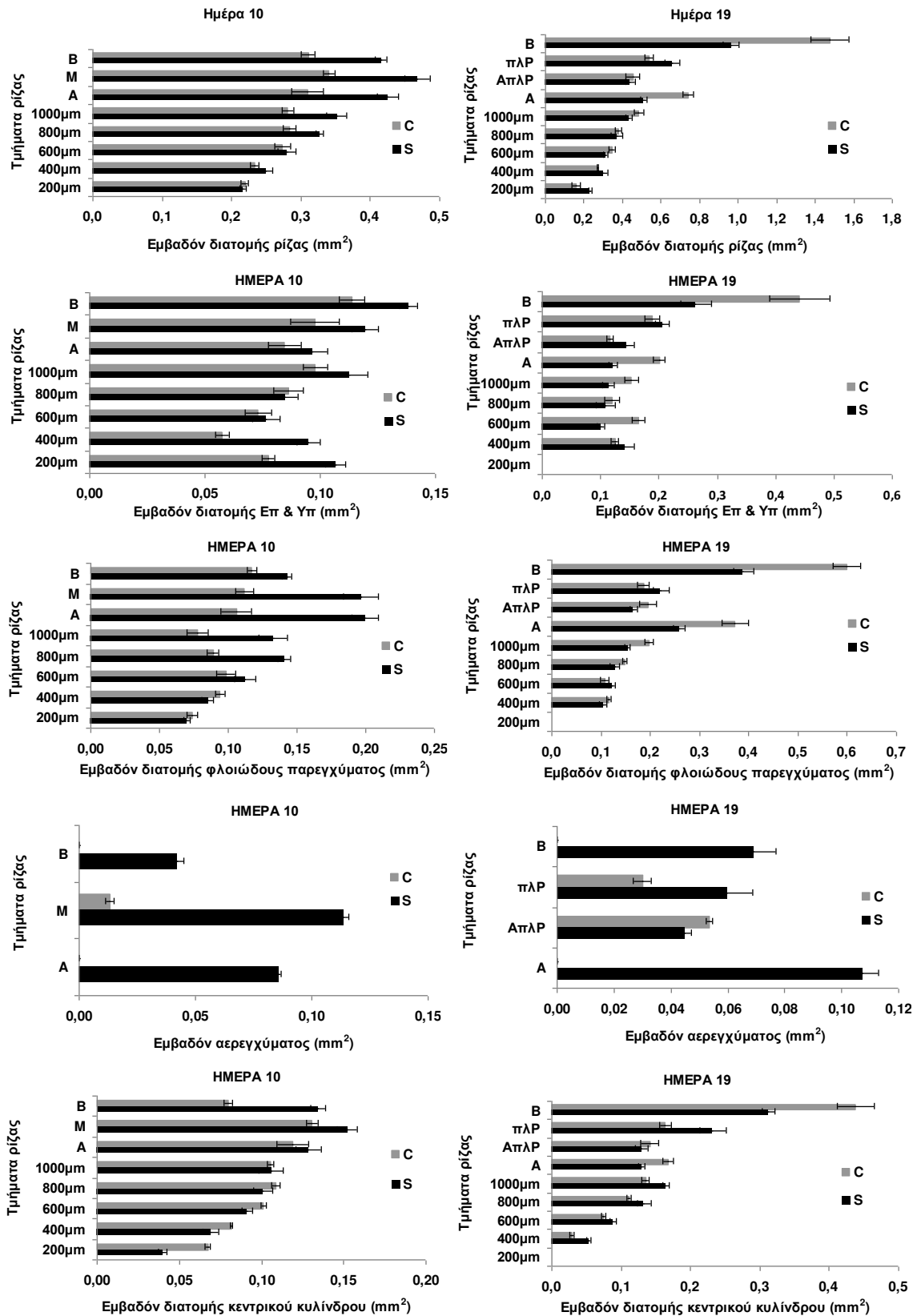
Εικόνα 3.9

Αριθμός και μήκος πλάγιων ριζών σε κάθε τύπο ρίζας την ημέρα 0, 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



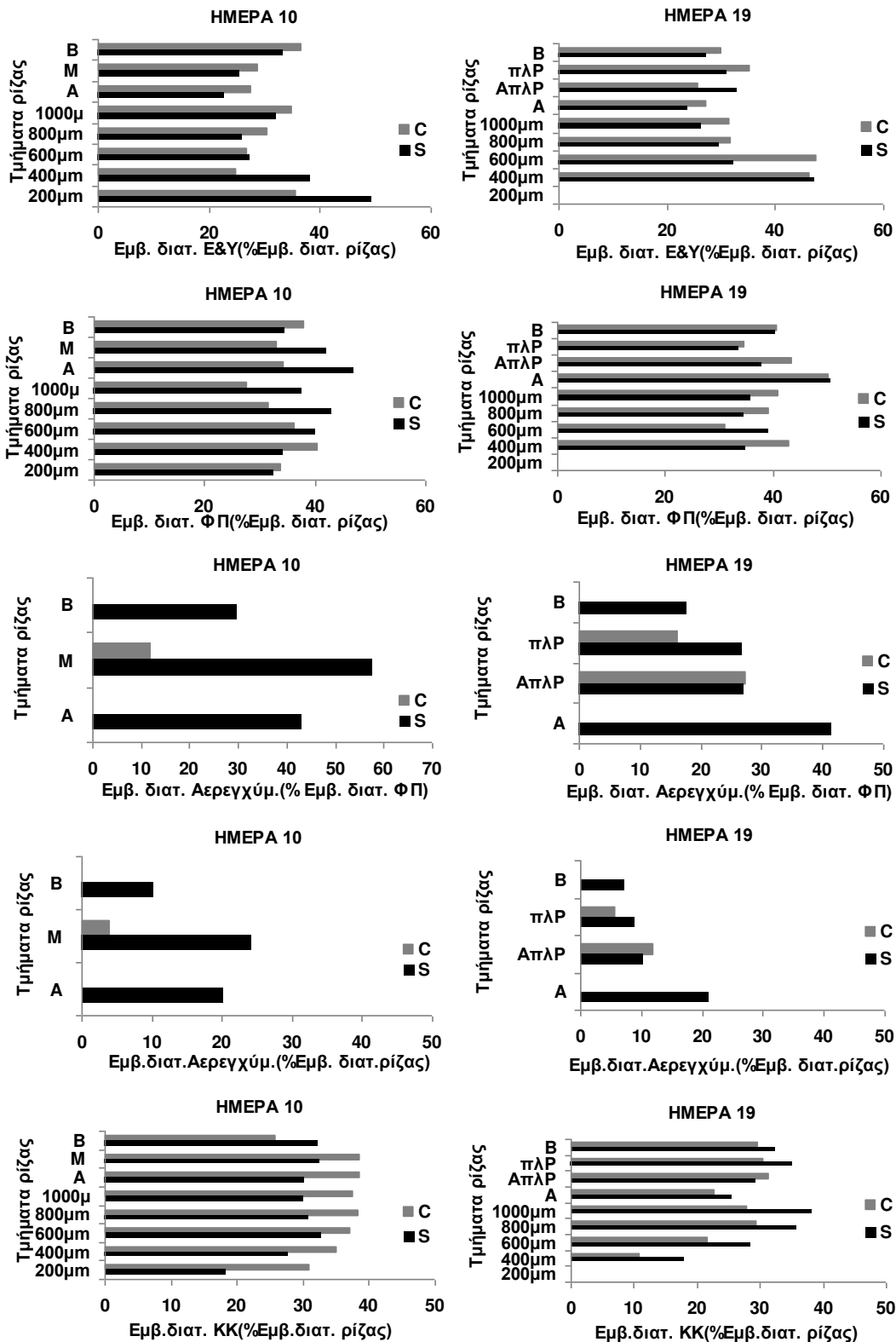
Εικόνα 3.10

Πυκνότητα μάζας σε κάθε τύπο ρίζας την ημέρα 0, 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



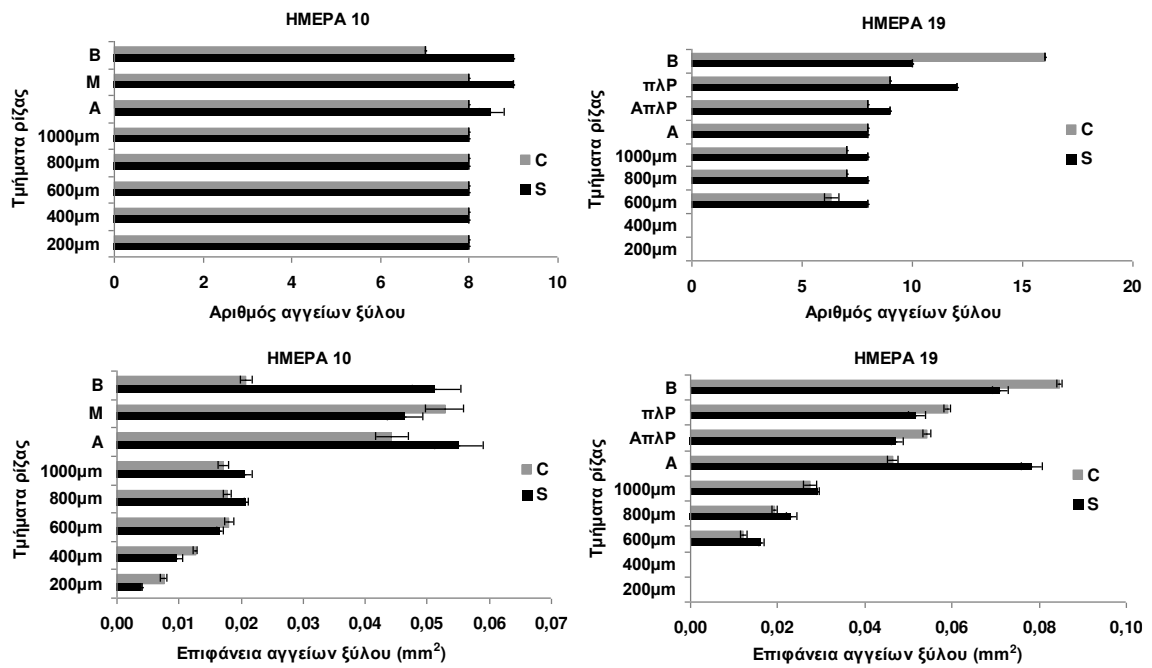
Εικόνα 3.11

Εμβαδόν διατομής ρίζας, επιδερμίδας & υποδερμίδας, φλοιώδους παρεγχύματος, αερεγχύματος και κεντρικού κυλίνδρου των τμημάτων βλαστογενούς ρίζας την ημέρα 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



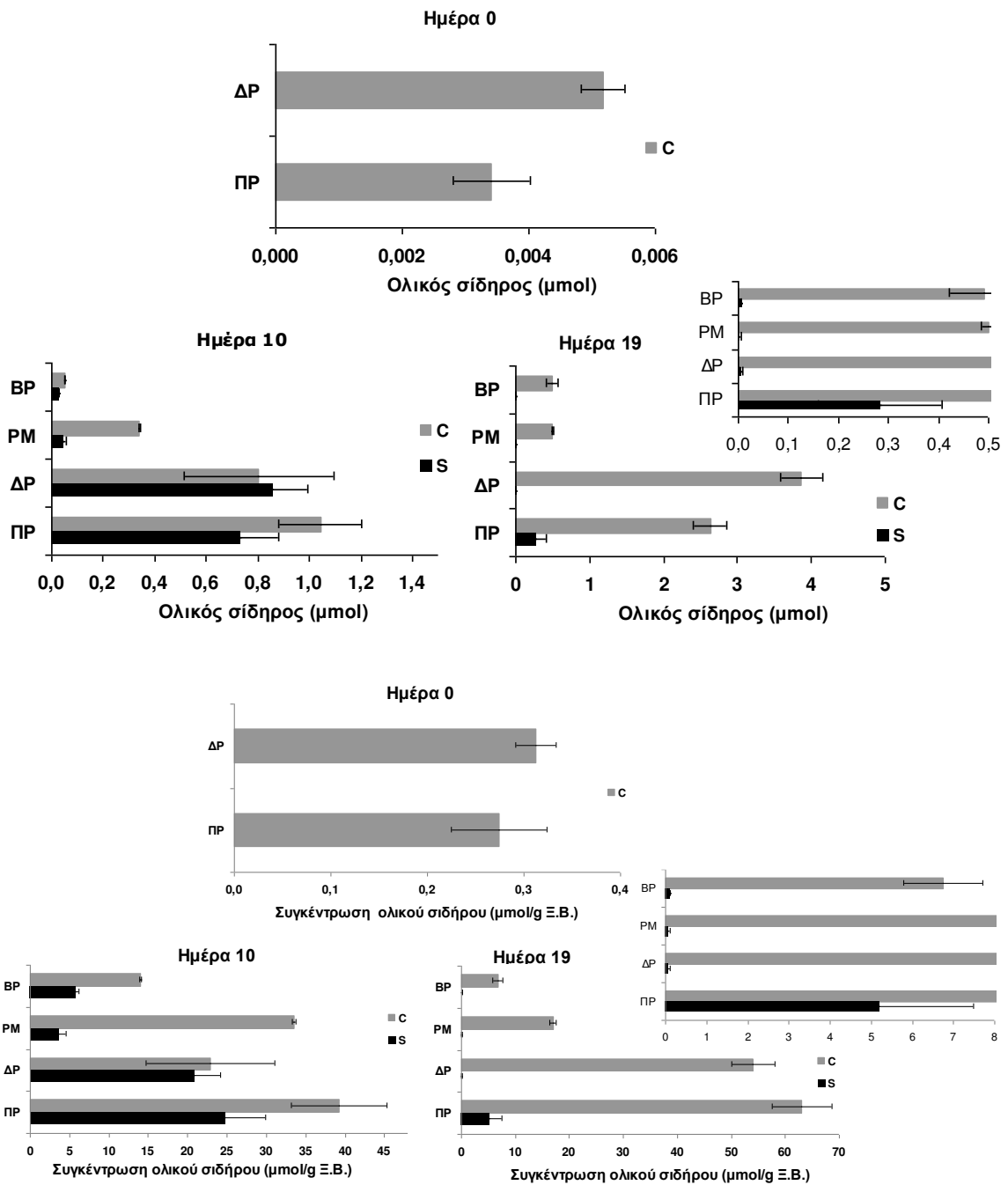
Εικόνα 3.12

Τα ποσοστά συμμετοχής του εμβαδού διατομής της επιδερμίδας και υποδερμίδας, του φλοιώδους παρεγχύματος και του κεντρικού κυλίνδρου στο εμβαδόν διατομής της ρίζας και το ποσοστό του εμβαδού αερεγχύματος στο εμβαδόν διατομής του φλοιώδους παρεγχύματος και στο εμβαδόν διατομής της ρίζας την ημέρα 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θεικών (S, μαύρες στήλες).



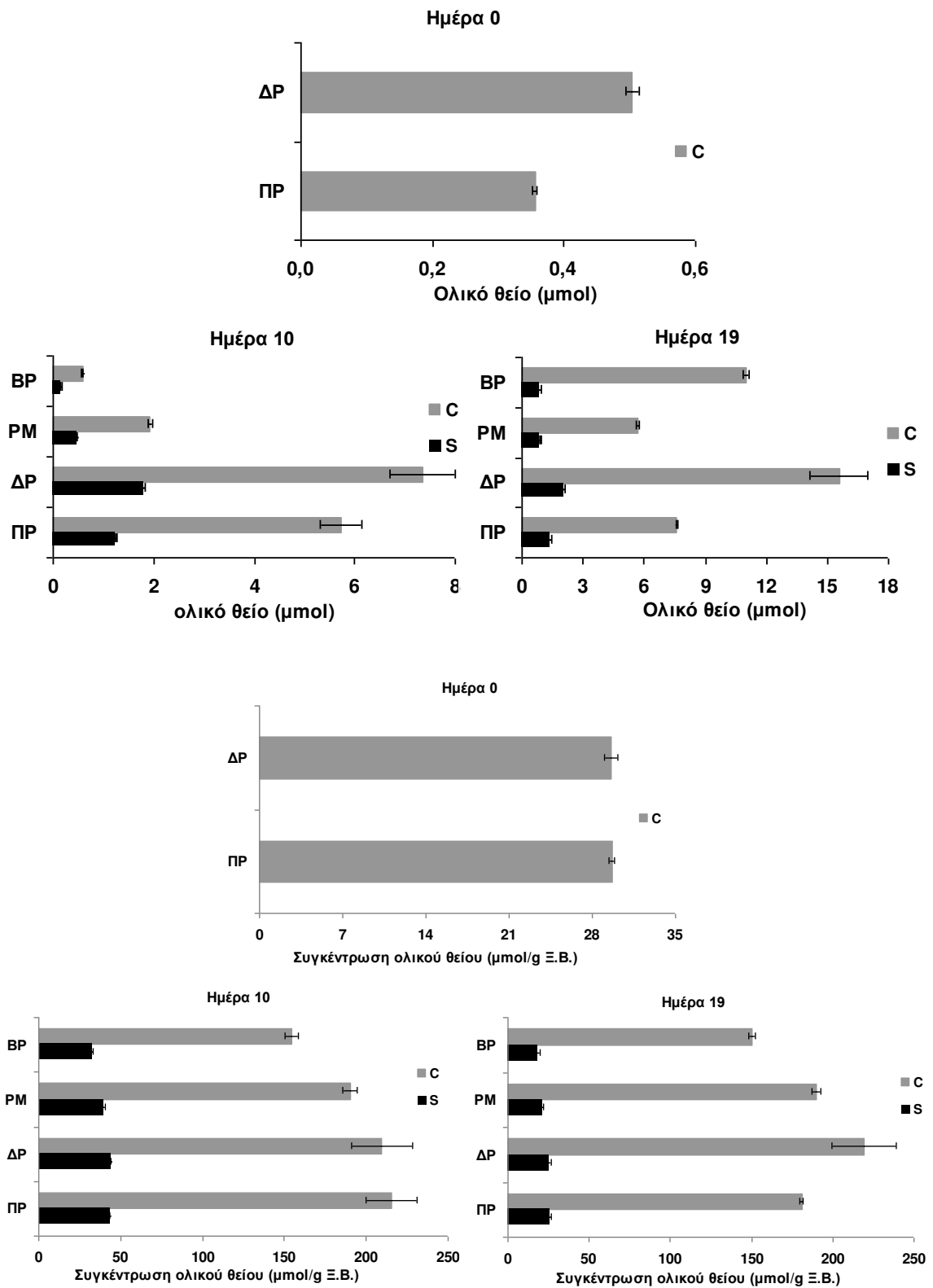
Εικόνα 3.13

Αριθμός αγγείων ξύλου (επάνω) και επιφάνεια αγγείων ξύλου (κάτω) των τμημάτων βλαστογενούς ρίζας την ημέρα 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



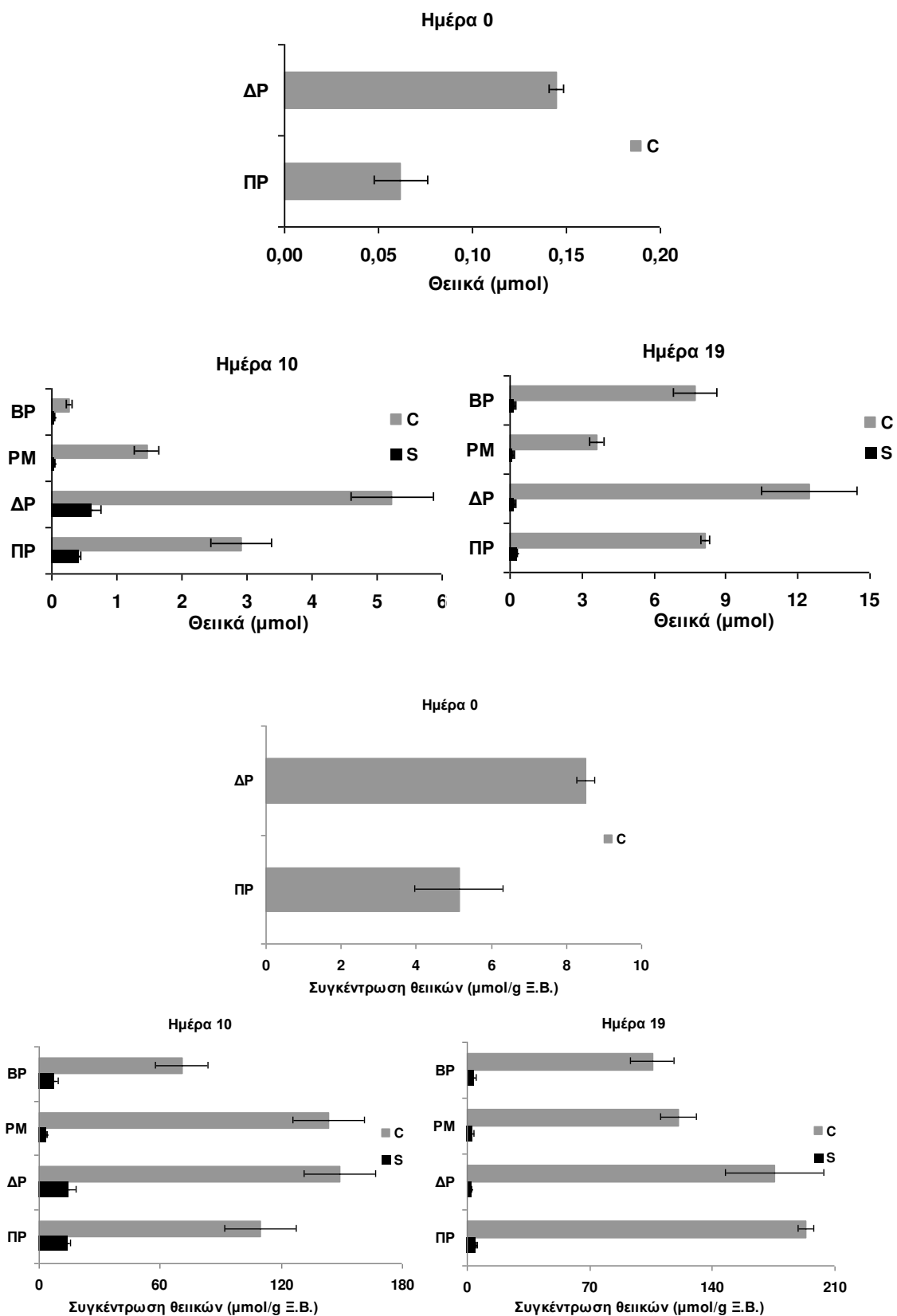
Εικόνα 3.14

Κατανομή της ποσότητας και της συγκέντρωσης του ολικού σιδήρου των φυτικών οργάνων την ημέρα 0, 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



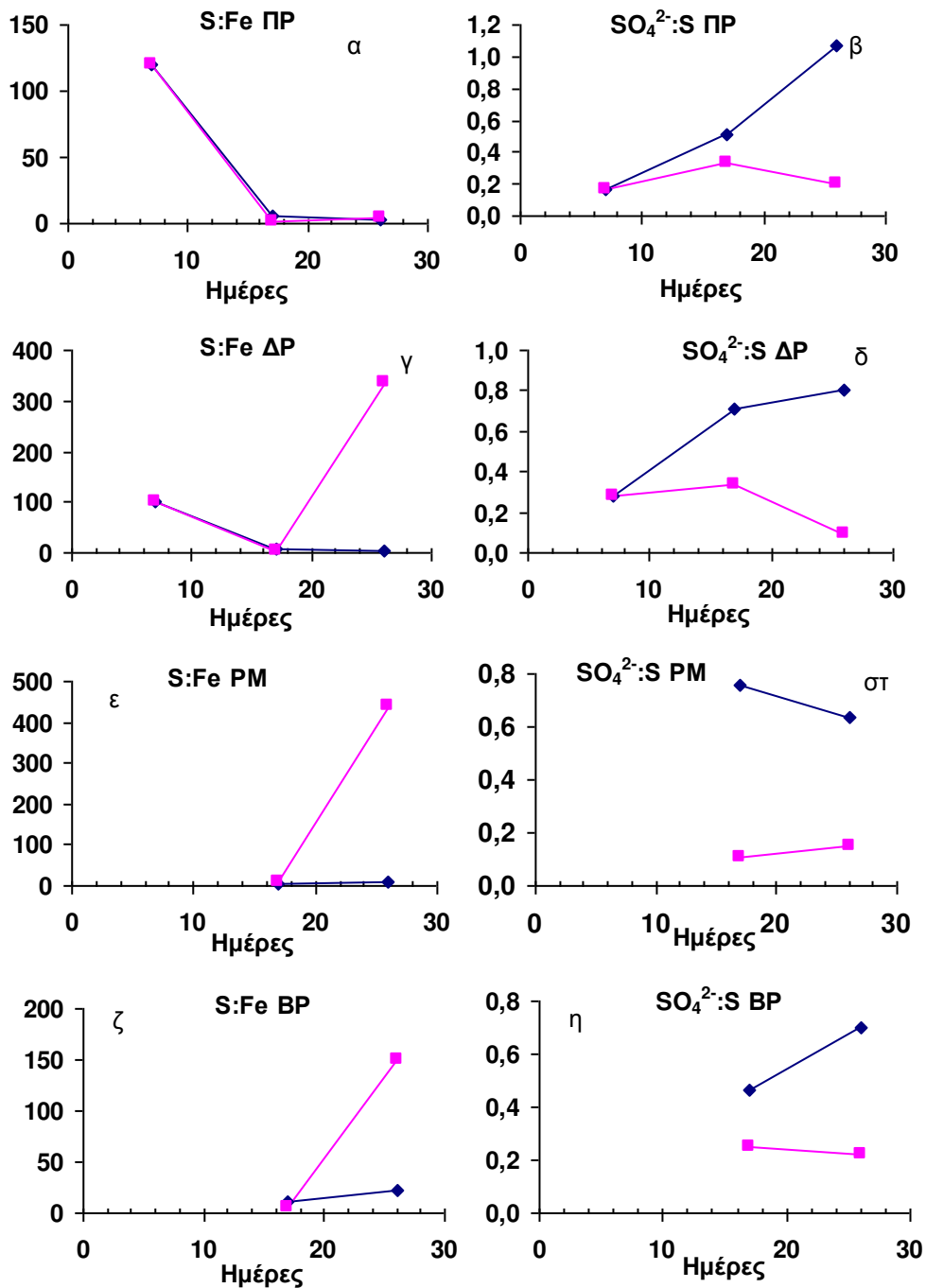
Εικόνα 3.15

Κατανομή της ποσότητας και της συγκέντρωσης του ολικού θείου των φυτικών οργάνων την ημέρα 0, 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



Εικόνα 3.16

Κατανομή της ποσότητας και της συγκέντρωσης των θειικών των φυτικών οργάνων την ημέρα 0, 10 και 19 της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



Εικόνα 3.17

Οι λόγοι S:Fe, SO₄²⁻:S στη πρωτογενή ρίζα (α, β), στις δευτερογενείς ρίζες (γ, δ), στις ρίζες μεσοκοτυλίου (ε, στ) και στις βλαστογενείς ρίζες (ζ, η) των φυτών αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, μπλε γραμμή) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θεικών (-S, κόκκινη γραμμή).

Την 10^η ημέρα της μεταχείρισης

Στα φυτά που αναπτύχθηκαν υπό πλήρη θρέψη, εκτός από το εμβρυακό ριζικό σύστημα υπήρχαν και άλλοι δύο τύποι ριζών, οι ρίζες μεσοκοτυλίου (PM) και η 1^η σειρά βλαστογενών ριζών (BP1), και συνολικά 10 ριζικοί άξονες (1 πρωτογενής, 4 δευτερογενείς, 2 ρίζες μεσοκοτυλίου και 3 ρίζες BP1). Το εμβρυακό ριζικό σύστημα καταλάμβανε το 81.6% της συνολικής ξηρής μάζας του ριζικού συστήματος (Εικόνα 3.3). Το μέσο μήκος των διαφόρων τύπων ριζών ήταν στις ΠΡ 55, στις ΔΡ 46, στις ΡΜ 24, και στις ΒΡ18 cm (Εικόνα 3.4). Τα μήκη των τμημάτων Β, πΛΡ και ΑπΛΡ της ΠΡ και των ΔΡ αυξήθηκαν με αντίστοιχη μείωση του μήκους του άκρου και στους δύο τύπους ριζών (Εικόνα 3.5). Οι ΡΜ είχαν διαμορφώσει τα επιμέρους τμήματά τους, ενώ τα τμήματα των ΒΡ1 δεν είχαν διαμορφωθεί ακόμη (Εικόνα 3.6 και Εικόνα 3.7). Ο αριθμός των πλάγιων ριζών και το μέσο μήκος τους συνέχιζε να αυξάνει: στην ΠΡ υπήρχαν 207 πλάγιες ρίζες με μέσο μήκος 5 cm, ενώ οι ΔΡ είχαν κατά μέσον όρο 55 πλάγιες με μέσο μήκος 2,2 cm (Εικόνα 3.9). Οι πλάγιες των ΡΜ ήταν πολύ λεπτές και δεν κατέστη δυνατόν να καταμετρηθούν και να προσδιοριστεί το μέσο μήκος τους. Ως εκ τούτου δεν έχουμε στοιχεία για αυτές. Οι ΔΡ διατηρούσαν την ίδια πυκνότητα μάζας με αυτή της ημ0, ενώ η πυκνότητα μάζας της ΠΡ αυξήθηκε (0.7 mg cm^{-1}). Η πυκνότητα μάζας διαμορφώθηκε σε 0.49 στη ΠΡ, 0.19 στις ΔΡ, 0.21 στις ΡΜ και 0.17 mg cm^{-1} στις ΒΡ1, με μέση πυκνότητα μάζας ριζικού τα 0.24 mg cm^{-1} (Εικόνα 3.10).

Η μελέτη της ανατομίας της ΒΡ1 έδειξε ότι το εμβαδόν διατομής της ρίζας αυξήθηκε σταδιακά από την περιοχή του ακρορριζίου μέχρι τη βάση της ρίζας. Το εμβαδόν διατομής της επιδερμίδας και της υποδερμίδας μεταβλήθηκε κυρίως στο ακρορριζίο και εμφάνιζε μία σταδιακή αύξηση από το άκρο προς τη βάση της ρίζας. Παρόμοιο πρότυπο μεταβολής εμφάνισε και το εμβαδόν διατομής του φλοιώδους παρεγχύματος. Το εμβαδόν διατομής του κεντρικού κυλίνδρου αυξήθηκε από την περιοχή των 200 μm μέχρι τη μέση της ρίζας και μειώθηκε στη βάση της ρίζας (Εικόνα 3.11). Ο αριθμός των αγγείων του ξύλου φαίνεται να διατηρείται σταθερός κατά μήκος της ρίζας και μειώθηκε στη βάση της, ενώ η επιφάνεια των αγγείων του ξύλου αυξήθηκε από το ακρορριζίο μέχρι τη μέση της ρίζας και μειώθηκε στη βάση της ρίζας (Εικόνα 3.13). Αερέγχυμα εντοπίστηκε στο μέσο της ρίζας (Εικόνα 3.11).

Η συγκέντρωση σιδήρου ανά τύπο ρίζας διαμορφώθηκε ως εξής: 39 (ΠΡ), 23 (ΔΡ), 34 (ΡΜ) και 14 (ΒΡ1) $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Εικόνα 3.14). Η συγκέντρωση ολικού θείου ανά τύπο ρίζας ήταν: 216 (ΠΡ), 210 (ΔΡ), 190 (ΡΜ) και 154 (ΒΡ1) $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Εικόνα 3.15). Η συγκέντρωση των θειϊκών ανά τύπο ρίζας ήταν: 110 (ΠΡ), 149 (ΔΡ), 144 (ΡΜ) και 71 (ΒΡ1) $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Εικόνα 3.16), οπότε κατά συνέπεια η συγκέντρωση οργανικού θείου ανά τύπο ρίζας διαμορφώθηκε ως εξής: 106 (ΠΡ), 61 (ΔΡ), 47 (ΡΜ) και 84 (ΒΡ1) $\mu\text{mol g}^{-1}$. Η αναλογία $\text{SO}_4^{2-}:\text{S}$ ήταν στη ΠΡ 1:2, στις ΔΡ 1:1,4, στις ΡΜ 1:1,3 και στις ΒΡ 1:2. Η αναλογία $\text{S}:\text{Fe}$ διαμορφώθηκε στη ΠΡ 5,5:1, στις ΔΡ 9,2:1, στις ΡΜ 5,7:1 και στις ΒΡ 10,9:1 (Εικόνα 3.17).

Υπό συνθήκες έλλειψης θειϊκών, το ριζικό σύστημα αποτελείτο από το εμβρυακό ριζικό σύστημα, τις ΡΜ και την ΒΡ1. Ο μέσος αριθμός των ΔΡ ήταν 5 και των ΡΜ 3 (Εικόνα 3.8). Επομένως, βλέπουμε ότι οι ριζικοί άξονες αυξήθηκαν κατά 2, από ένας επιπλέον στις ΔΡ και στις ΡΜ. Η ξηρή μάζα του ριζικού συστήματος αυξήθηκε σε όλους τους τύπους ριζών (ΠΡ 7%, ΔΡ 17%, ΡΜ 20%, ΒΡ1 25%, με συνολική αύξηση κατά 14%) (Εικόνα 3.3). Τα μέσα μήκη των διαφόρων τύπων ριζών ήταν συγκρίσιμα με τα φυτά μάρτυρες, αλλά επειδή αυξήθηκαν οι ριζικοί άξονες, το συνολικό μήκος βρέθηκε αυξημένο κατά 20,6% (Εικόνα 3.4). Η πυκνότητα μάζας διαμορφώθηκε σε $0,57$ στη ΠΡ, $0,18$ στις ΔΡ, $0,17$ στις ΡΜ και $0,17 \text{ mg cm}^{-1}$ στις ΒΡ1, με μέση πυκνότητα μάζας ριζικού τα $0,23 \text{ mg cm}^{-1}$. Δηλαδή, αυξήθηκε στην ΠΡ (16%), περιορίστηκε λίγο στις ΔΡ (5%) και αρκετά στις ΡΜ (19%), αλλά κατά μέσον όρο παρέμεινε η ίδια (Εικόνα 3.10). Σχετικά με το μήκος των τμημάτων του

κάθε τύπου ρίζας έναντι των φυτών μαρτύρων, η ΠΡ αύξησε το τμήμα πλΡ από 48% σε 60%, ενώ μείωσε το τμήμα ΑπλΡ από 38% σε 21% (Εικόνα 3.5). Οι ΔΡ δεν εμφάνισαν διαφοροποίηση, οι ΡΜ αύξησαν το τμήμα πλΡ από 31% σε 42% (Εικόνα 3.6), ενώ στη ΒΡ1 δεν είχαν ακόμη διαμορφωθεί τμήματα (Εικόνα 3.7). Η ΠΡ και οι ΔΡ είχαν περισσότερες πλάγιες ρίζες με μικρότερο μήκος σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες (Εικόνα 3.9).

Στα φυτά -S το τμήμα της βάσης της ρίζας είχε μεγαλύτερη επιφάνεια τομής της ρίζας, του κεντρικού κυλίνδρου, του φλοιώδους παρεγχύματος, της επιδερμίδας και υποδερμίδας, αριθμό και επιφάνεια αγγείων του ξύλου. Το τμήμα της μέσης της ρίζας είχε μεγαλύτερη επιφάνεια τομής ρίζας, φλοιώδους παρεγχύματος, επιδερμίδας και υποδερμίδας και αερεγχύματος. Τα τμήματα του άκρου και της περιοχής των 1000 μm έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια τομής ρίζας, φλοιώδους παρεγχύματος και αγγείων του ξύλου. Η περιοχή των 800 μm είχε μεγαλύτερη επιφάνεια φλοιώδους παρεγχύματος και επιφάνεια αγγείων του ξύλου, η περιοχή των 600μm δεν διαφοροποιήθηκε μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων ως προς τις παραπάνω παραμέτρους που μελετήθηκαν, η περιοχή των 400 μm είχε μεγαλύτερη επιφάνεια επιδερμίδας και υποδερμίδας και μικρότερη επιφάνεια αγγείων του ξύλου και η περιοχή των 200 μm είχε μεγαλύτερη επιφάνεια επιδερμίδας και υποδερμίδας και μικρότερη επιφάνεια κεντρικού κυλίνδρου και επιφάνεια αγγείων του ξύλου (Εικόνα 3.11 και Εικόνα 3.13).

Η συγκέντρωση του σιδήρου μειώθηκε δραστικά σε κάθε τύπο ρίζας: στην ΠΡ κατά 59%, στις ΔΡ κατά 9%, στις ΡΜ κατά 89% και στις ΒΡ1 κατά 59% (Εικόνα 3.14). Είναι αξιοσημείωτο ότι οι ΔΡ υπέστησαν την μικρότερη μείωση ενώ οι ΡΜ την μεγαλύτερη, αν και χωροταξικά εκφύονται από το scutellum ή βρίσκονται κοντά σε αυτό αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του ολικού θείου μειώθηκε ομοιόμορφα σε όλους τους τύπους ρίζας κατά 79% (Εικόνα 3.15). Η συγκέντρωση των θειϊκών μειώθηκε ακόμη περισσότερο: στην ΠΡ κατά 88%, στις ΔΡ κατά 90%, στις ΡΜ κατά 97% και στις ΒΡ1 κατά 89% (Εικόνα 3.16). Και πάλι οι ΡΜ υπέστησαν την μεγαλύτερη μείωση έναντι των υπολοίπων τύπων στους οποίους η μείωση ήταν συγκρίσιμη. Επομένως, η μείωση που υπέστη το οργανικό θείο σε κάθε τύπο ρίζας διαμορφώθηκε ως εξής: στην ΠΡ κατά 73%, στις ΔΡ κατά 53%, στις ΡΜ κατά 23% και στις ΒΡ1 κατά 70%. Η χαμηλότερη μείωση εντοπίστηκε στις ρίζες του μεσοκοτυλίου ακολουθούμενη από τις δευτερογενείς ρίζες. Η αναλογία $SO_4^{2-}:S$ ήταν 1:3 στη ΠΡ, 1:2,9 στις ΔΡ, 1:9,4 στις ΡΜ και 1:4 στις ΒΡ. Σε όλους τους τύπους ριζών ο λόγος $SO_4^{2-}:S$ ήταν σημαντικά μικρότερος από τον αντίστοιχο των φυτών-μαρτύρων. Ο λόγος S:Fe ήταν στη ΠΡ 1,7:1, στις ΔΡ 2,1:1, στις ΡΜ 10,9:1 και στις ΒΡ 5,7:1 (Εικόνα 3.17).

Την 19^η ημέρα της μεταχείρισης

Υπό πλήρη θρέψη, στο ριζικό σύστημα είχαν προστεθεί η 2^η και 3^η ομάδα βλαστογενών ριζών (ΒΡ2, ΒΡ3) και υπήρχαν συνολικά 20 ριζικοί άξονες (1 ΠΡ, 4 ΔΡ, 4 ΡΜ, 4 ΒΡ1, 3 ΒΡ2, 4 ΒΡ3) (Εικόνα 3.8). Το εμβρυακό ριζικό σύστημα καταλάμβανε το 52.3% (44%) της συνολικής ξηρής μάζας του ριζικού συστήματος (Εικόνα 3.3). Οι ριζικοί άξονες είχαν συνολικό μήκος 875 cm και σταθμικά μέση πυκνότητα μάζας 0.29 mg cm⁻¹ ή 4.3 cm mg⁻¹ (Εικόνα 3.4 και Εικόνα 3.10). Το μήκος του τμήματος ΑπλΡ περιορίστηκε στη ΠΡ και στις ΔΡ σε σχέση με την ημ10, ενώ τα άλλα τμήματα τους αυξήθηκαν (Εικόνα 3.5). Το μήκος του τμήματος Β των ριζών του μεσοκοτυλίου μειώθηκε, ενώ αυξήθηκαν τα άλλα τμήματά τους όπως επίσης αυξήθηκαν όλα τα επιμέρους τμήματα της ΒΡ1. Η ΒΡ2 είχε διαμορφώσει τα επιμέρους τμήματά της, ενώ η ΒΡ3 όχι ακόμη (Εικόνα 3.6 και Εικόνα 3.7). Ο αριθμός και το μήκος των πλάγιων ριζών της ΠΡ ήταν 743 πλάγιες με μέσο μήκος 5 cm, ενώ ο μέσος αριθμός και το μέσο μήκος στις ΔΡ ήταν 27 πλάγιες και 4 cm. Ο αριθμός και το μήκος των πλάγιων ριζών της ΒΡ1 ήταν 58 πλάγιες 1 cm και η ΒΡ2 είχε 10 πλάγιες ρίζες με μέσο μήκος 1 cm επίσης (Εικόνα 3.9). Η πυκνότητα μάζας ήταν ΠΡ=2.9, ΔΡ=8.4, ΡΜ=4.1, ΒΡ=2.8 και η μέση σταθμική υπολογίστηκε στα 4.3 mg cm⁻¹ (Εικόνα 3.10)

Η επιφάνεια τομής της ρίζας, της επιδερμίδας και υποδερμίδας, του φλοιώδους παρεγχύματος, του αερεγχύματος, του κεντρικού κυλίνδρου και των αγγείων του ξύλου αυξήθηκε κυρίως στα τμήματα Β, πλΡ, ΑπλΡ και Α της ρίζας και λιγότερο ή και καθόλου στις περιοχές του ακρορριζίου (Εικόνα 3.11). Ο αριθμός των αγγείων του ξύλου αυξήθηκε κυρίως στη βάση της ρίζας και λιγότερο ή και καθόλου στα άλλα τμήματα της ρίζας (Εικόνα 3.13). Όσον αφορά τις παραπάνω παραμέτρους μελέτης κατά μήκος της ρίζας, ο τρόπος μεταβολής δεν διαφοροποιείται από εκείνο που παρατηρήθηκε την ημ10.

Η συγκέντρωση σιδήρου ανά τύπο ρίζας διαμορφώθηκε ως εξής: 63 (ΠΡ), 54 (ΔΡ), 17 (ΡΜ) και 7 (ΒΡ) $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Εικόνα 3.14). Η συγκέντρωση ολικού θείου ανά τύπο ρίζας ήταν: 181 (ΠΡ), 219 (ΔΡ), 189 (ΡΜ) και 150 (ΒΡ1) $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Εικόνα 3.15). Η συγκέντρωση των θειϊκών ανά τύπο ρίζας ήταν: 132 (ΠΡ), 176 (ΔΡ), 121 (ΡΜ) και 106 (ΒΡ1) $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Εικόνα 3.16), οπότε η συγκέντρωση οργανικού θείου ανά τύπο ρίζας διαμορφώθηκε ως εξής: 49 (ΠΡ), 44 (ΔΡ), 69 (ΡΜ) και 45 (ΒΡ1) $\mu\text{mol g}^{-1}$. Η αναλογία $\text{SO}_4^{2-}:\text{S}$ στη ΠΡ ήταν 1:0,9, στις ΔΡ 1:1,2, στις ΡΜ 1:1,6 και στις ΒΡ 1:1,4. Ο λόγος S:Fe ήταν στη ΠΡ 2,9:1, στις ΔΡ 4:1, στις ΡΜ 11,4:1 και στις ΒΡ 22,3:1 (Εικόνα 3.17).

Υπό συνθήκες έλλειψης θειϊκών, στο ριζικό σύστημα είχε προστεθεί η ΒΡ2 με αριθμό ριζών 2 και υπήρχαν συνολικά 14 ριζικοί άξονες (1 ΠΡ, 5 ΔΡ, 3 ΡΜ, 3 ΒΡ1, 2 ΒΡ2) (Εικόνα 3.8). Το εμβρυακό ριζικό σύστημα καταλάμβανε το 60% της συνολικής ξηρής μάζας του ριζικού συστήματος (Εικόνα 3.3). Οι ριζικοί άξονες είχαν συνολικό μήκος 733 cm μειωμένο κατά 16% και σταθμική μέση πυκνότητα μάζας 0.31 mg cm^{-1} ή ειδικό μήκος ριζών 3.4 cm mg^{-1} (Εικόνα 3.4 και Εικόνα 3.10). Σχετικά με το μήκος των τμημάτων κάθε τύπου ρίζας σε σχέση με των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα παρατηρήθηκε ότι το τμήμα πλΡ δεν διαφοροποιήθηκε σε μήκος στη ΠΡ και στη ΒΡ1, ενώ ήταν μικρότερο στις ΔΡ και στις ΡΜ (Εικόνα 3.5, Εικόνα 3.6 και Εικόνα 3.7). Το τμήμα ΑπλΡ είχε μεγαλύτερο μήκος σε όλους τους τύπους ριζών και το τμήμα Α μικρότερο μήκος σε όλους τους τύπους ριζών. Στη ΠΡ ο αριθμός των πλάγιων ριζών ήταν ελαφρά μικρότερος (695) με λίγο μεγαλύτερο μήκος (6 cm). Στις ΔΡ ο αριθμός παρέμεινε ο ίδιος (25), ενώ το μέσο μήκος τους ήταν στο 1 cm. Η ΒΡ1 εμφάνισε κατά μέσον όρο 57 πλάγιες και η ΒΡ2 10 με ίδιο μέσο μήκος περί το 1 cm (Εικόνα 3.9).

Το τμήμα της βάσης είχε μικρότερη επιφάνεια τομής ρίζας, κεντρικού κυλίνδρου, φλοιώδους παρεγχύματος, επιδερμίδας και υποδερμίδας και αριθμό αγγείων του ξύλου. Το τμήμα πλΡ εμφάνισε μεγαλύτερη επιφάνεια τομής ρίζας, κεντρικού κυλίνδρου, φλοιώδους παρεγχύματος, αερεγχύματος και αριθμό αγγείων του ξύλου, το τμήμα ΑπλΡ είχε μεγαλύτερη επιφάνεια τομής επιδερμίδας και υποδερμίδας, ενώ το τμήμα Α είχε μεγαλύτερη επιφάνεια αγγείων του ξύλου και μικρότερη επιφάνεια τομής ρίζας, κεντρικού κυλίνδρου, φλοιώδους παρεγχύματος, επιδερμίδας και υποδερμίδας. Η περιοχή των 1000 μm είχε μεγαλύτερη επιφάνεια τομής κεντρικού κυλίνδρου και μικρότερη επιφάνεια τομής φλοιώδους παρεγχύματος, η περιοχή των 800 μm είχε μεγαλύτερη επιφάνεια τομής κεντρικού κυλίνδρου και επιφάνεια αγγείων του ξύλου, η περιοχή των 600 μm παρουσίασε μεγαλύτερη επιφάνεια τομής κεντρικού κυλίνδρου και αριθμό και επιφάνεια αγγείων του ξύλου, ενώ είχε μικρότερη επιφάνεια επιδερμίδας και υποδερμίδας. Η περιοχή των 400 μm είχε μεγαλύτερη επιφάνεια τομής κεντρικού κυλίνδρου και η περιοχή των 200 μm έχει μεγαλύτερη επιφάνεια τομής ρίζας (Εικόνα 3.11).

Η συγκέντρωση του σιδήρου μειώθηκε δραματικά σε όλους τους τύπους ριζών κατά 91% (ΠΡ), 99% (ΔΡ), 99% (ΡΜ) και 98% (ΒΡ) της αντίστοιχης των φυτών μαρτύρων (Εικόνα 3.14). Αντίστοιχα, η συγκέντρωση του ολικού θείου μειώθηκε σε όλους τους τύπους ριζών κατά 91% (ΠΡ), 99% (ΔΡ), 99% (ΡΜ) και 98% (ΒΡ) και η συγκέντρωση των θειϊκών κατά 96% (ΠΡ), 99% (ΔΡ), 97% (ΡΜ) και 96% (ΒΡ) της αντίστοιχης των φυτών μαρτύρων, οπότε κατά συνέπεια η συγκέντρωση οργανικού θείου ανά τύπο ρίζας διαμορφώθηκε στο 58 (ΠΡ), 47

(ΔΡ), 75 (ΡΜ) και 68 (ΒΡ1) % της αντίστοιχης των φυτών μαρτύρων (Εικόνα 3.15 και Εικόνα 3.16). Ο λόγος $\text{SO}_4^{2-}:\text{S}$ ήταν στη ΠΡ 1:4,9, στις ΔΡ 1:11, στις ΡΜ 1:6,9 και στις ΒΡ 1:4,5. Σε όλους τους τύπους ριζών ο λόγος $\text{SO}_4^{2-}:\text{S}$ στα φυτά -S ήταν μικρότερος σε σχέση με αυτόν των φυτών-μαρτύρων. Ο λόγος S:Fe ήταν στη ΠΡ 5:1, στις ΔΡ 336,7:1, στις ΡΜ 440:1 και στις ΒΡ 150:1. Σε όλους τους τύπους ριζών ο λόγος S:Fe στα φυτά -S ήταν μεγαλύτερος από αυτόν των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 3.17).

3.4 Συζήτηση

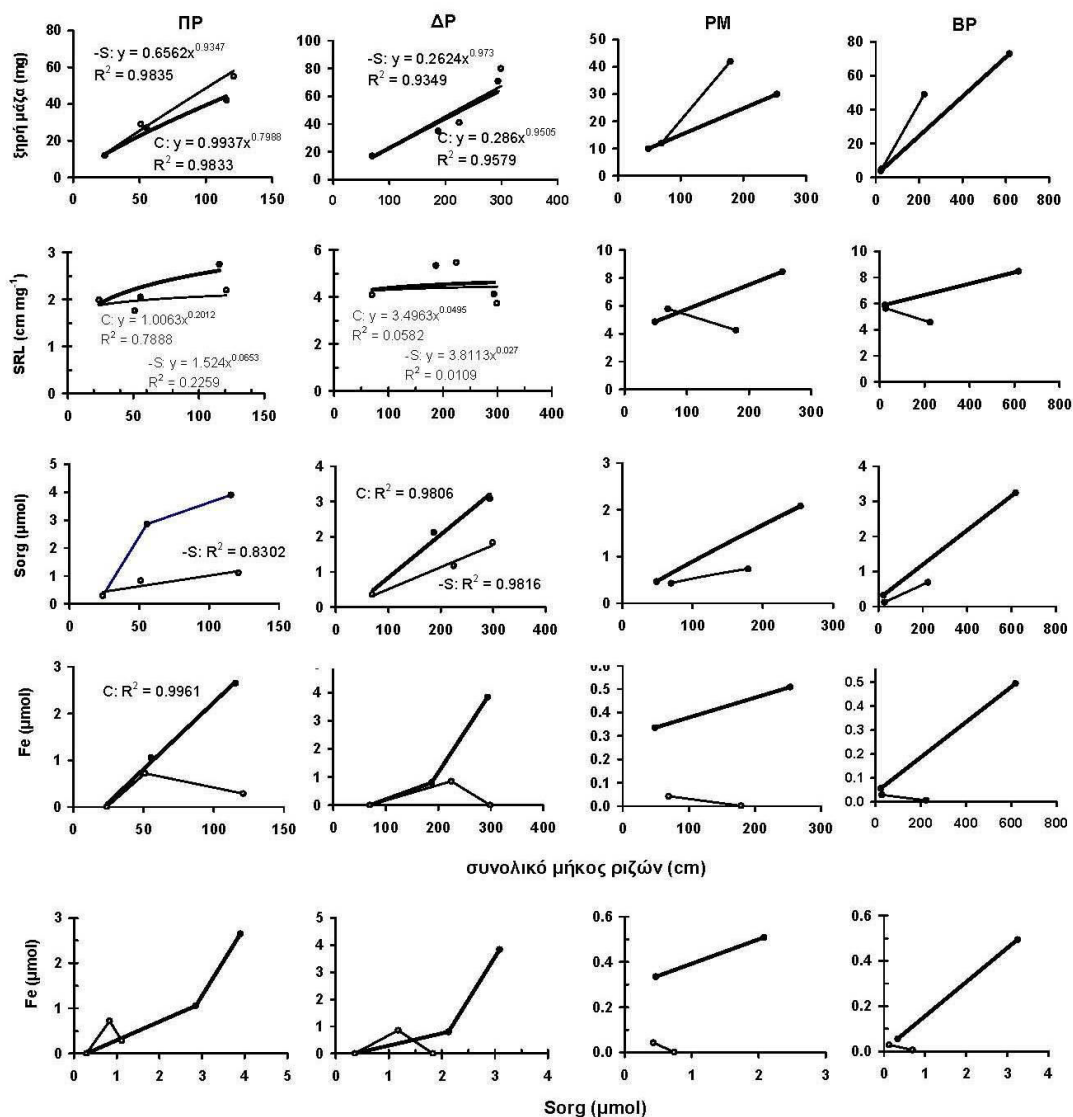
Τα ερωτήματα που θέσαμε σε αυτό το κεφάλαιο ήταν (1) αν ο σίδηρος κατανέμεται ομοιόμορφα μέσα στους διαφόρους τύπους ριζών υπό πλήρη θρέψη και (2) αν επηρεάστηκε και με ποιο τρόπο η κατανομή του σιδήρου μέσα στους διάφορους τύπους ριζών κατά το 1^ο και το 2^ο δεκαήμερο της έλλειψης θειικών από το θρεπτικό διάλυμα. Για να απαντηθούν αυτά τα ερωτήματα χαρτογραφήθηκε η στρατηγική που ακολουθεί ο αραβόσιτος για να διαμορφώσει το ριζικό σύστημα του ώστε να αντιμετωπίσει τη σοβαρή έλλειψη θειικών. Αυτή η στρατηγική εμφάνισε αρκετές πτυχές. Το 1^ο δεκαήμερο οι συνολικοί άξονες ήταν περισσότεροι κατά 2 σε ΔΡ και ΡΜ ενώ το 2^ο δεκαήμερο υπολείποντο κατά 6. Αυτό το έλλειμμα εντοπίστηκε στις βλαστογενείς ρίζες, αφού η κάθε σειρά βλαστογενών ριζών εμφάνισε έλλειμμα κατά 1 άξονα και δεν εμφανίστηκε η ΒΡ3. Επομένως η ενίσχυση εστιάστηκε στις οριζόντιες ρίζες του scutellum (ΔΡ) ή δίπλα σε αυτό (ΡΜ).

Το συνολικό μήκος του κάθε τύπου ρίζας συσχετίστηκε με την ξηρή μάζα που επενδύθηκε σε αυτό (Εικόνα 3.18). Η συσχέτιση έδειξε ότι αποτίθεται περισσότερη ξηρή μάζα σε κάθε τύπο ρίζας, με εξαίρεση τις δευτερογενείς εμβρυακές οι οποίες δεν έδειξαν διαφοροποίηση. Η κινητική της κατανομής της ξηρής μάζας αυξανόμενου του συνολικού μήκους περιγράφηκε με συνάρτηση δύναμης για το εμβρυακό σύστημα, ενώ η αντίστοιχη για τις ΡΜ και τις ΒΡ με την κλίση ευθυγράμμου τμήματος (διότι δεν υπήρχαν την ημ0). Εξετάζοντας το ειδικό μήκος του κάθε τύπου ρίζας, δηλαδή τα εκατοστά μήκους που αντιστοιχούν στην μονάδα ξηρή μάζας, σε συνάρτηση με το συνολικό μήκος των ριζών του κάθε τύπου ρίζας (Εικόνα 3.18) διαπιστώσαμε ότι υπό συνθήκες -S διαμορφώνεται μικρότερο μήκος ανά μονάδα επενδύμενης μάζας, με εξαίρεση τις ΔΡ. Λιγότερο ήταν και το οργανικό θείο το οποίο συσσωρεύεται αυξανόμενου του συνολικού μήκους σε όλους τους τύπους ριζών. Αυτή η συσχέτιση περιγράφηκε επίσης με συνάρτηση δύναμης και η μεταβολή στον εκθέτη είναι ένας δείκτης αυτής της επίδρασης. Ο σίδηρος εμφάνισε δραματική μείωση το 2^ο δεκαήμερο, με την πρωτογενή να έχει κατά 8% λιγότερη μείωση έναντι όλων των υπολοίπων τύπων ριζών. Είναι αξιοσημείωτο ότι κατά το 2^ο δεκαήμερο το οργανικό θείο συνέχιζε να αυξάνεται αυξανόμενου του μήκους σε όλους τους τύπους ριζών, ενώ ο σίδηρος μειωνόταν αυξανόμενου του μήκους σε όλους τους τύπους ριζών. Αυτό αναδεικνύεται και από την άμεση συσχέτιση μεταξύ των ποσοτήτων οργανικού θείου και ολικού σιδήρου που επενδύθηκαν σε κάθε τύπο ρίζας τις τρεις επιλεγμένες ημέρες δειγματοληψιών (Εικόνα 3.18). Απαντήθηκε όμως ότι δεν ήταν ομοιόμορφη η συγκέντρωση του ολικού σιδήρου μέσα σε κάθε τύπο ρίζας ούτε υπό πλήρη θρέψη, ούτε υπό αυτό το καθεστώς της σοβαρής έλλειψης θειικών ιδιαίτερα το 1^ο δεκαήμερο, ενώ το 2^ο δεκαήμερο διαφοροποιήθηκε η πρωτογενής ρίζα έναντι των υπολοίπων.

Ένα άλλο εύρημα αυτού του κεφαλαίου είναι ότι στις περισσότερες περιπτώσεις βρέθηκε γραμμική σχέση μεταξύ συνολικού μήκους και αποτιθέμενης ξηρής μάζας, καθώς επίσης και μεταξύ συνολικού μήκους και αποτιθέμενου οργανικού θείου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απόθεση ξηρής μάζας και οργανικού θείου μέσα σε αυτή γίνεται με συγχρονισμένο τρόπο, ακόμη και υπό

συνθήκες σοβαρής έλλειψης θειϊκών διάρκειας 19 ημερών. Άρα, η διανομή του υπάρχοντος θείου και του ελάχιστου προστιθέμενου γίνεται με συντονισμένο τρόπο στο επίπεδο του ριζικού συστήματος που μελετάται σε αυτό το κεφάλαιο.

Τα αγρωστώδη φυτά όπως ο αραβόσιτος χρησιμοποιούν την στρατηγική II για την πρόσληψη του σιδήρου με έκκριση των φυτοσιδηροφόρων από τις ρίζες στην ριζόσφαιρα για την απόκτηση του Fe. Η βιοσύνθεση των φυτοσιδηροφόρων απαιτεί μεθειονίνη (Mori and Nishizawa 1987) και η βιοσύνθεση της μεθειονίνης απαιτεί θείο. Έτσι, μείωση της διαθεσιμότητας του θείου οδηγεί σε μειωμένη δεξαμενή μεθειονίνης και συνεπώς μειωμένη παραγωγή φυτοσιδηροφόρων και πρόσληψη του συμπλόκου Fe(III)-PS (Astolfi et al. 2003, 2006a, 2010).



Εικόνα 3.18

Συσχέτιση τη ξηρής μάζας των ριζών, του ειδικού μήκους των ριζών, της συσσωρευόμενης ποσότητας οργανικού θείου και της συσσωρευμένης ποσότητας ολικού σιδήρου ανά τύπο ρίζας με το αντίστοιχο συνολικό μήκος του κάθε τύπου ρίζας. Επίσης η συσχέτιση του συσσωρευμένου οργανικού θείου με τον συσσωρευμένο ολικό σίδηρο ανά τύπο ρίζας. ΠΡ: πρωτογενής, ΔΡ: δευτερογενείς, ΡΜ: ρίζες μεσοκοτυλίου, ΒΡ: βλαστογενείς ρίζες. Η ξηρή μάζα και το οργανικό θείο έχουν εκφραστεί ανά όργανο. Γεμάτοι κύκλοι και έντονη γραμμή δηλώνουν πλήρη θρέψη, ενώ άδειοι κύκλοι και ασθενής γραμμής δηλώνουν την μεταχείριση έλλειψης θείου.

Τα ελλειμματικά φυτά σε θειικά ενισχύουν το ριζικό σύστημα ως προς το μήκος του κάθε τύπου ρίζας τόσο το 1^ο όσο και το 2^ο δεκαήμερο και μάλιστα είχαν μεγαλύτερο μήκος βλαστογενών ριζών και μεγαλύτερη διάμετρο ρίζας την ημ10. Μακρύτερες ρίζες και περισσότεροι ριζικοί άξονες (όπως είναι η εικόνα στο 1^ο δεκαήμερο) συμβάλουν στη δέσμευση των θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος από τον αραβόσιτο (Ribaut et al. 2009, Zhu et al. 2010). Ένα ευρύ ριζικό σύστημα βλαστογενών ριζών, που θα αποτελέσει και το κύριο ριζικό σύστημα του αραβόσιτου, δείχνει μία σχετικά ευρεία περιοχή της εξερεύνησης του υποστρώματος επιτρέποντας την αυξημένη πρόσβαση σε θρεπτικά στοιχεία του εδάφους. Έτσι, η έλλειψη θειικών προκάλεσε αύξηση του μήκους της ρίζας προφανώς για αναζήτηση του στοιχείου που λείπει από το θρεπτικό διάλυμα.

Παραπέρα, η 1^η ομάδα βλαστογενών ριζών εμφάνισε ανατομικές διαφορές σε όλες τις παραμέτρους των τομών που μελετήθηκαν κυρίως την ημέρα 10. Μεγαλύτερος αριθμός και επιφάνεια των αγγείων του ξύλου στα φυτά -S κατά την διάρκεια της έλλειψης θειικών δείχνει την προσαρμοστική διαμόρφωση ενός καλύτερα εξοπλισμένου αγγειακού συστήματος για αποτελεσματικότερη μεταφορά των θρεπτικών από το ριζικό σύστημα για να υποστηρίξει το υπέργειο μέρος του φυτού. Τα φυτά -S είχαν μεγαλύτερη επιφάνεια κεντρικού κυλίνδρου την ημ10 και ημ19 σε σύγκριση με τα φυτά-μάρτυρες και μεγαλύτερο ποσοστό επιφάνειας τομής κεντρικού κυλίνδρου ως προς την επιφάνεια τομής της ρίζας την ημ19. Η αναλογία της επιφάνειας τομής του κεντρικού κυλίνδρου ως προς την επιφάνεια της τομής της ρίζας είναι πιθανόν να επηρεάζει την λειτουργία του ριζικού συστήματος. Επιπλέον, μεγαλύτερη επιφάνεια κεντρικού κυλίνδρου στα φυτά -S μπορεί να περιέχει μεγαλύτερα αγγεία του ξύλου για αυξημένη μεταφορά νερού και ανόργανων στοιχείων.

Η 1^η ομάδα βλαστογενών ριζών εμφάνισε αερέγχυμα στο φλοιώδες παρέγχυμα την ημ10. Ειδικότερα, την ημ10 τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα εμφάνισαν αερέγχυμα μόνο στο μέσο της ρίζας ενώ τα φυτά -S εμφάνισαν αερέγχυμα σε όλα τα τμήματα της ρίζας εκτός από το ακρορριζίο. Η επιφάνεια του αερεγγύματος στη μέση της ρίζας ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα ελλειμματικά σε θείο φυτά σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα. Την ημ19 της μεταχείρισης το αερέγχυμα είχε εμφανιστεί στα τμήματα πλΡ και ΑπλΡ των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα ενώ στα φυτά -S σε όλα τα τμήματα της ρίζας εκτός του ακρορριζίου.

Μέχρι σήμερα, ο σχηματισμός αερεγγύματος έχει αναφερθεί σε βλαστογενείς ρίζες αραβόσιτου με λύση των κυττάρων του φλοιώδους παρεγγύματος υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων και ιδιαίτερα αζώτου ή φωσφόρου ή θείου (Konings and Verschuren 1980, Drew et al. 1989, Fan et al. 2003, Bouranis et al. 2003). Ο εντοπισμός αερεγγύματος στις βλαστογενείς ρίζες των φυτών που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα έχει επίσης διαπιστωθεί και σε άλλες μελέτες (Ray et al. 1999, Σιγιάννης 2003).

3.5 Συμπεράσματα

Η αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος ενισχύθηκε σε διάφορα επίπεδα προκειμένου να αντιμετωπιστεί η σοβαρή έλλειψη θειικών. Αυτά περιλάμβαναν τροποποιήσεις στον αριθμό των ριζικών αξόνων των ομάδων ριζών, στο συνολικό μήκος τους, στην ξηρή μάζα που κατανεμήθηκε σε αυτές, στα τμήματα που έφεραν τις πλάγιες ρίζες, στον αριθμό και στο μήκος των πλαγίων ριζών, στη δημιουργία αερεγγύματος για να υποστηριχθούν από πλευράς θρέψης αυτές οι πλάγιες (αφού το αερέγχυμα είναι προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, μηχανισμός ο οποίος περιλαμβάνει και αναδιανομή υλικών), και στην ενίσχυση του αγγειακού συστήματος για αποτελεσματικότερη μεταφορά. Οι διάφοροι τύποι ριζών εμφάνισαν διαφοροποιήσεις, γεγονός που υπέδειξε αναπτυξιακή διαφοροποίηση των προτεραιοτήτων μέσα στο εικοσαήμερο έλλειψης θειικών που επιβλήθηκε

κατά την αρχική αναπτυξιακή φάση των νεαρών φυτών αραβοσίτου. Υπήρξαν γραμμικές συσχετίσεις ανάμεσα στην ξηρή μάζα, στο οργανικό θείο και στον ολικό σίδηρο που επενδύθηκαν στους διάφορους τύπους ριζών, με έμφαση στο εμβρυακό ριζικό σύστημα, ιδιαιτέρως κατά το 1^ο δεκαήμερο. Αντίθετα, κατά το 2^ο δεκαήμερο ο σίδηρος μειώθηκε δραματικά και ομοιόμορφα σε όλους τους τύπους ρίζας εκτός από την πρωτογενή, στην οποία η μείωση υπολείπετο κατά 8%, ποσοστό όχι αμελητέο δεδομένων των συνθηκών. Θεϊικά εξακολουθούσαν να υπάρχουν παρά την σοβαρή έλλειψη εισροών θειϊκών, γεγονός το οποίο ερμηνεύτηκε από το γεγονός ότι η επενδεδυμένη ξηρή μάζα καθορίζει πόσο οργανικό θείο απαιτείται. Παρ' όλα αυτά όμως εξακολουθεί να παραμένει το ερώτημα, που να οφείλεται αυτή η δραματική μείωση του σιδήρου κατά το 2^ο δεκαήμερο.

Κεφάλαιο 4

Ανάλυση της ομοιόστασης του σιδήρου στο ριζικό σύστημα

4.1 Εισαγωγή

4.1.1 Αποπλασμική συσσώρευση σιδήρου στην επιδερμίδα της ρίζας

Σε αλκαλικές συνθήκες μεγάλες ποσότητες Fe παγιδεύονται στον αποπλάστη της επιδερμίδας της ρίζας (αποπλασμικός απενεργοποιημένος Fe) πιθανόν λόγω του υψηλού αποπλασμικού pH και έτσι περιορίζεται η μετακίνηση προς τον κεντρικό κύλινδρο της ρίζας και προς το επάνω φυτικά τμήματα. Σε όξινες συνθήκες ο Fe εμφανίζεται ομοιόμορφα κατανεμημένος σε χαμηλές συγκεντρώσεις στον ιστό της ρίζας, που σημαίνει ότι ο Fe προσλαμβάνεται και μετακινείται προς τον κεντρικό κύλινδρο και μετά προς τα άνω μέρη του φυτού (Kosegarten and Koyro 2001). Σε αλκαλικές συνθήκες, τόσο σε θρεπτικά διαλύματα (Mengel and Geurtzen 1988, Fox et al. 1996, Kosegarten et al. 1998) όσο και σε ασβεστούχα εδάφη (Mengel 1994, Masalha et al. 2000) οι συγκεντρώσεις σιδήρου της ρίζας βρέθηκαν να είναι πολύ υψηλότερες από ότι σε όξινες συνθήκες. Τα ασβεστούχα εδάφη χαρακτηρίζονται από υψηλό pH εδάφους, συχνά μεταξύ pH 7 και 8,5 (Loerppert and Hallmark 1985). Γενικά, ο ολικός σίδηρος στα εδάφη είναι σημαντικά υψηλότερος από ότι ο διαλυτός σίδηρος που απαιτείται για βέλτιστη ανάπτυξη, που είναι περίπου 10^{-8} M στο εδαφικό διάλυμα (Lindsay 1995). Όμως, η διαθεσιμότητα του ελεύθερου Fe(III) στα εδάφη είναι βασικά χαμηλή και εξαρτάται κυρίως από το pH και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό και αυξάνει με χαμηλό pH εδάφους και χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Έτσι, σε όξινα εδάφη, η διαθεσιμότητα του ελεύθερου Fe(III) είναι μεγαλύτερη από ότι σε ασβεστούχα εδάφη, αλλά ακόμη και σε όξινα εδάφη είναι συνήθως πολύ χαμηλή για να καλύψει τις απαιτήσεις του φυτού για σίδηρο (Lindsay and Schwab 1982). Στα ασβεστούχα εδάφη η συγκέντρωση του ελεύθερου Fe(III) είναι εξαιρετικά χαμηλή (περίπου 10^{-10} M, Lindsay 1995) και ως εκ τούτου πολύ χαμηλή για να διατηρήσει τη βέλτιστη ανάπτυξη του φυτού.

Παρά τη χαμηλή διαθεσιμότητα του ελεύθερου Fe(III) σε ασβεστούχα εδάφη, χηλικές ενώσεις που παράγονται από μικροοργανισμούς (σιδηροφόρα) αυξάνουν τη διαλυτότητα του Fe(III) στη ριζόσφαιρα (Powell et al. 1982, Crowley 2001). Έχει αποδειχθεί ότι τα μικροβιακά σιδηροφόρα παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην απόκτηση του Fe από τα ανώτερα φυτά (Crowley et al. 1992, Crowley 2001 και Masalha et al. 2000). Στα αγρωστώδη τα φυτοσιδηροφόρα που απελευθερώνονται από τις ρίζες αυτών των ειδών συμπλοκοποιούν το σίδηρο για την παροχή άλλης πηγής για απόκτηση σιδήρου (Romheld and Marschner 1986b). Λόγω της ταχείας μικροβιακής αποδόμησης των φυτοσιδηροφόρων στο έδαφος (von Wiren et al. 1993) η μικροβιακή παραγωγή των σιδηροφόρων μπορεί να είναι υψίστης σημασίας επίσης για την απόκτηση του σιδήρου από τα αγρωστώδη (Masalha et al. 2000). Ο Mengel (1994) θεώρησε ότι, αν και σε ασβεστούχα εδάφη ο εφοδιασμός του σιδήρου από το έδαφος στον αποπλάστη της ρίζας είναι επαρκής, η πρόσληψη από τον αποπλάστη στο συμπλάστη μειώνεται. Πρότεινε ότι η αναγωγή του Fe(III) μπορεί να μπλοκάρεται (απενεργοποίηση Fe στον αποπλάστη της ρίζας) σε υψηλό pH του αποπλάστη της ρίζας (όπως προκαλείται από θρέψη $\text{NO}_3^-/\text{HCO}_3^-$) (Kosegarten et al. 1999b). Είναι γνωστό ότι η διαθεσιμότητα του σιδήρου της ρίζας σχετίζεται με τη εξαρτώμενη από το pH αναγωγή του Fe(III) στον αποπλάστη, η οποία μπλοκάρεται με υψηλό pH στο εξωτερικό διάλυμα (Toulon et al. 1992, Susin et al. 1996). Το σύμπλοκο Fe(III)-σιδηροφόρα μεταφέρονται προς τον αποπλάστη της ρίζας. Οι υψηλές συγκεντρώσεις HCO_3^- και η πρόσληψη νιτρικών ως μοναδική πηγή N στο εδαφικό διάλυμα των ασβεστούχων εδαφών ως συνέπεια της αυξημένης νιτροποίησης και εξάτμισης της NH_3 (Mengel 1994) είναι οι κύριοι λόγοι για το υψηλό αποπλασμικό pH (Kosegarten et al. 1999b). Κατά συνέπεια, σε υψηλό αποπλασμικό pH, η αναγωγή Fe(III)-σιδηροφόρων μπορεί να ανασταλεί και έτσι υψηλές ποσότητες σιδήρου μπορεί να παγιδευτούν οδηγώντας σε υψηλές συγκεντρώσεις σιδήρου στον αποπλάστη της ρίζας.

Ο εφοδιασμός των ριζών με τεχνητές πηγές Fe(III) σε υδροπονικά συστήματα σε υψηλό pH μπορεί να μην είναι άμεσα συγκρίσιμος με τον εφοδιασμό με φυσικές ενώσεις σιδήρου στο εδαφικό διάλυμα των ασβεστούχων εδαφών. Πρώτον, οι χηλικές ενώσεις σιδήρου στο θρεπτικό διάλυμα συνήθως εφοδιάζονται σε περισσότερες από 10 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις από ότι στο εδαφικό διάλυμα των καλά αεριζόμενων εδαφών (Romheld and Marschner 1986a). Δεύτερον, οι ρίζες που αναπτύσσονται στο έδαφος μπορεί να παρουσιάζουν σημαντικές εδαφικές προσμίξεις Fe στην επιφάνεια του εδάφους ακόμη και μετά από πλύσιμο (Stasser et al. 1999). Σε μελέτες, οι ρίζες πλύθηκαν προσεκτικά με νερό και στην συνέχεια με διάλυμα CaCl₂ για να απομακρυνθούν σωματίδια εδάφους που είναι προσκολλημένα με το σίδηρο από τον αποπλάστη της ρίζας (Mengel 1994, Masalha et al. 2000).

Ο αραβόσιτος υποφέρει από την έλλειψη Fe σε αλκαλικά εδάφη παρά τις υψηλές συγκεντρώσεις Fe στην ρίζα. Εκτός από την ανάπτυξη της χλωρώσεως, η περιορισμένη ανάπτυξη των φύλλων είναι σημαντικός δείκτης της έλλειψης Fe. Η εξωτερική εφαρμογή Fe αποκαθιστά την ανάπτυξη των φύλλων. Οι συγκεντρώσεις Fe στη ρίζα των ελλειμματικών σε Fe φυτών είναι υψηλές, συχνά πολλές φορές υψηλότερες από ότι στα φύλλα (Mengel 1994, Masalha et al. 2000). Αυτό δείχνει ότι δεν επηρεάζεται η απόκτηση του Fe από τις ρίζες στα ασβεστούχα εδάφη αλλά μάλλον επηρεάζεται αρνητικά η μετακίνηση του Fe από τη ρίζα στο συμπλάστη του φύλλου ως αποτέλεσμα του υψηλού αποπλασμικού pH, το οποίο οδηγεί σε υψηλές συγκεντρώσεις Fe στον αποπλάστη της ρίζας (Mengel 1994). Ο ακριβής κυτταρικός εντοπισμός των υψηλών συγκεντρώσεων Fe στις ρίζες είναι καίριας σημασίας. Σε πολλές μελέτες με φυτά που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά διαλύματα (Bienfait et al. 1985, Longnecker and Welch 1990) έχει υποτεθεί ότι ο αποπλάστης της ρίζας περιέχει σημαντικές ποσότητες Fe οι οποίες μπορεί να κινητοποιηθούν για να μεταφερθούν στο βλαστό, ιδίως υπό συνθήκες έλλειψης Fe. Ο Masalha (2000) έδειξε ότι περίπου το 50% του Fe που συσσωρεύεται στις ρίζες αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν στο έδαφος απελευθερώνεται μέσω χημικής αναγωγής με διθειονώδες νάτριο. Σύμφωνα με τον Bienfait (1985), ο ανηγμένος Fe ορίζεται ως αποπλασμικός Fe της ρίζας. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι περίπου το 65% της συγκέντρωσης Fe στις ρίζες αραβοσίτου απελευθερώθηκε με χημική αναγωγή (Kosegarten and Koyro 2001). Σε άλλες μελέτες έχει υποτεθεί ότι ο αποπλασμικός Fe υπερεκτιμήθηκε σε ρίζες φυτών που αναπτύχθηκαν στο έδαφος λόγω των εδαφικών προσμίξεων του Fe στην επιφάνεια της ρίζας (Strasser et al. 1999).

Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει μία απότομη αποπλασμική διαβάθμιση της κατανομής του Fe προς τα μέσα (Kosegarten and Koyro 2001, Strasser et al. 1999). Μία αποπλασμική συγκέντρωση 2000 μg Fe g⁻¹ ΞΜ σύμφωνα με το Bienfait (1985) σε ασβεστούχα εδάφη εξηγείται κυρίως από συγκεντρώσεις Fe επιπέδου mM στο ακτινικό επιδερμικό τοίχωμα και με ενδεχομένως ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο εφαπτομενικό κυτταρικό τοίχωμα. Ο Fe στον αποπλάστη μπορεί να απορροφάται στις ανιονικές θέσεις του κυτταρικού τοιχώματος ή να καθιζάνει ως οξειδία και υδροξειδία Fe(III) (Lazlo 1987, Longnecker and Welch 1990).

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα φύλλα μπορεί να εμφανίσουν συμπτώματα έλλειψης Fe (χλωρώσεις) ακόμη και όταν οι συγκεντρώσεις Fe σε αυτά είναι υψηλότερες από ότι στα πράσινα φύλλα (Carter 1980, Mengel and Malissionas 1981, Sahu et al. 1987). Υπάρχει σχέση μεταξύ του αποπλασμικού pH και της μορφής που παρέχεται το άζωτο (Hoffmann et al. 1992). Με εφοδιασμό NH₄⁺ το pH στον αποπλάστη του φύλλου ήταν χαμηλό, ενώ με NO₃⁻ είχε ως αποτέλεσμα υψηλό αποπλασμικό pH. Υπάρχει αντίστροφη σχέση μεταξύ συγκέντρωσης χλωροφύλλης και αποπλασμικού pH του φύλλου (Mengel 1994, Kosegarten and English 1994). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι το υψηλό αποπλασμικό pH του φύλλου παρεμποδίζει την μεταφορά του Fe μέσα στο κύτταρο (Mengel 1995). Το υψηλό pH στον αποπλάστη του φύλλου εμπόδισε την αναγωγή Fe³⁺-κιτρικού, η αναγωγή του Fe³⁺ είναι προϋπόθεση για την μεταφορά του Fe²⁺ μέσα από την

πλασματική μεμβράνη (Chaney et al. 1972, Fox et al. 1996). Μερικοί ερευνητές βρήκαν ότι pH 6,8 είναι βέλτιστο για την αναγωγή του Fe^{3+} (Bruggemann and Moog 1989), άλλοι θεωρούν κατάλληλο pH 6,5 για αυτή την αναγωγή (Holden et al. 1991). Το pH αυτό πιθανώς σχετίζεται με την κυτταροπλασματική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης που εντοπίζεται η αναγωγή Fe^{3+} (Bruggemann et al. 1993, Rombola et al. 1999). Το βέλτιστο pH για την αποπλασματική περιοχή της αναγωγής Fe^{3+} φαίνεται να είναι χαμηλότερο (Mengel 1995). Εάν αυτή η αποπλασματική κατάσταση δεν πληρείται, σημαντικές ποσότητες Fe παραμένουν στον αποπλάστη και δεν μεταφέρονται στο συμπλάστη όπου απαιτείται Fe για τις κυτταρικές διεργασίες. Το ξύλο άθικτων φύλλων ηλίανθου εμφάνισε μία εξαρτώμενη από το pH αναγωγή του Fe^{3+} με μέγιστο ρυθμό σε αποπλασμικό pH 5 και κάτω (Kosegarten et al. 1999).

Θεωρείται ότι φυτά που αναπτύσσονται σε ασβεστούχα εδάφη υποφέρουν από φυσιολογική έλλειψη Fe και μία σημαντική ποσότητα Fe πιθανώς να παγιδεύεται στον αποπλάστη των φύλλων και των ριζών. Ο εφοδιασμός με Fe έχει να ξεπεράσει δύο κρίσιμα βήματα: (1) το υψηλό pH του αποπλάστη του φύλλου, το οποίο εμποδίζει την αναγωγή Fe^{3+} -κιτρικού και (2) το υψηλό pH στον αποπλάστη της ρίζας που μπορεί να εμποδίζει αντίστοιχη αναγωγή ένωσης Fe^{3+} (π.χ. Fe^{3+} -σιδηροφόρα).

4.1.2 Οι ρυθμιζόμενες οξειδοαναγωγικές διεργασίες στη πλασματική μεμβράνη κυττάρων της ρίζας και οι λειτουργίες τους στην πρόσληψη σιδήρου

Μείωση του pH

Η ικανότητα των φυτών να μειώνουν το pH έξω από τη ρίζα είναι γνωστή. Η έκκριση πρωτονίων σε ανταλλαγή για ιόντα K^+ και NH_4^+ που παραλαμβάνονται είναι γνωστό φαινόμενο. Έτσι ένας τρόπος αποκατάστασης της έλλειψης Fe στον αγρό είναι να δοθούν μεγάλες ποσότητες αλάτων αμμωνίου ή καλίου, έτσι ώστε το pH γύρω από τις ρίζες να μειωθεί και τα άλατα σιδήρου να μπορούν να διαλυτοποιηθούν πιο εύκολα (Barak and Chen 1983). Όμως, η μείωση του pH, η οποία προκαλείται από έλλειψη σιδήρου λαμβάνει χώρα κάτω από συνθήκες όπου φυτά επαρκή σε σίδηρο αυξάνουν το pH, κυρίως ως συνέπεια της πρόσληψης NO_3^- τα οποία ανταλλάσσονται με OH^- . Έτσι, πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός με τον οποίο η έλλειψη σιδήρου προκαλεί έκκριση πρωτονίων σε υψηλούς ρυθμούς. Η σειρά με την οποία αυξάνεται η απελευθέρωση πρωτονίων είναι έλλειψη $Fe > NH_4^+ > K^+ > fusisoccin$ (Romheld et al. 1984). Η ικανότητα των ελλειμματικών σε σίδηρο φυτών να μειώνουν το pH στη ριζόσφαιρα δεν είναι ένα γενικό φαινόμενο π.χ. τα μη αγρωστώδη δεν έχουν βρεθεί ακόμη ότι παρουσιάζουν αυτή την απόκριση.

Αναγωγή τρισθενούς σιδήρου

Το σιδηροκυανιούχο ανιόν φαίνεται να είναι καλό υπόστρωμα όσον αφορά το ρυθμό αναγωγής των χηλικών ενώσεων τρισθενούς σιδήρου (Brown et al. 1961). Το σιδηροκυανιούχο ανιόν επίσης ανάγεται από τις ρίζες αραβοσίτου (Federico and Giartosio 1983), αλλά οι χηλικές ενώσεις τρισθενούς σιδήρου όχι (Brown 1978). Η ύπαρξη ενός διαμεμβρανικού συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων έχει ήδη αποδειχθεί. Ως δότες ηλεκτρονίων για διαμεμβρανικό αναγωγικό σύστημα με σιδηροκυανιούχο έχουν προταθεί τόσο το NADH (Craig and Crane 1982, Federico and Giartosio 1983) όσο και το NADPH (Sijmons et al. 1984a). Η οξειδοαναγωγική κατάσταση του NADP σε ρίζες αραβοσίτου δεν επηρεάζεται από τη θρεπτική κατάσταση του φυτού σε σίδηρο. Η θετική συσχέτιση μεταξύ της αναγωγικής ικανότητας της τρισθενούς χηλικής ένωσης και των επιπέδων NADPH (Sijmons et al. 1984b) υποδηλώνει ότι η συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού NADPH, αντί η ποσότητα των συστημάτων μεταφοράς ηλεκτρονίων στη πλασματική μεμβράνη, είναι ο συντελεστής προσδιορισμού για την επαγόμενη ικανότητα και είναι η σχετική παράμετρος η οποία ρυθμίζεται από τη θρεπτική κατάσταση του φυτού σε

σίδηρο. Η αναγωγή των εξωκυτταρικών αλάτων σιδήρου έχει μία αποπολωτική επίδραση στο δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης της ρίζας (Sijmons et al. 1984c). Αυτό μπορεί να εξηγήσει την αυξημένη εκροή των πρωτονίων που συνοδεύει την αναγωγή του σιδηροκυανιούχου. Η τιμή 0,31 του λόγου H^+/e^- έχει αναφερθεί σε ρίζες αραβοσίτου. Ένα σύστημα στις ρίζες αραβοσίτου ικανό να ανάγει εξωκυτταρικό NADH επίσης θα μπορούσε να επιτευχθεί σε διαλυτή μορφή (Lin 1984). Ένας άλλος μηχανισμός ο οποίος μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην αναγωγή του εξωκυτταρικού σιδήρου είναι η φωτοχημική διάσπαση των χηλικών ενώσεων τρισθενούς σιδήρου (Frahn 1958).

Δύο αναγωγικά συστήματα

Λειτουργούν δύο συστήματα διαμεμβρανικής μεταφοράς ηλεκτρονίων: ένα σταθερό και ένα ελεγχόμενο από την θρεπτική κατάσταση του φυτού σε σίδηρο. Το σταθερό ή πρότυπο (standard) πιστεύεται ότι βρίσκεται σε όλα τα φυτικά κύτταρα. Αυτό ανάγει το σιδηροκυανιούχο αλλά όχι χηλικές ενώσεις τρισθενούς σιδήρου όπως Fe-FDPA και η δραστηριότητα του δεν επηρεάζεται από τη θρεπτική κατάσταση του φυτού σε σίδηρο. Η συγγένεια του για το δότη ηλεκτρονίων, NADH ή NADPH, υποτίθεται ότι είναι υψηλή. Το επαγωγίμο ή «turbo» σύστημα είναι ενεργό μόνο στα δίκτυλα και μη αγρωστώδη μονοκότυλα. Είναι σε θέση να ανάγει μία μεγάλη ποικιλία χηλικών ενώσεων τρισθενούς σιδήρου συμπεριλαμβανομένου του σιδηροκυανιούχου και η ικανότητά του αυξάνεται έντονα κατά την διάρκεια έλλειψης σιδήρου. Ο προτεινόμενος δότης ηλεκτρονίων είναι το NADPH (Sijmons et al. 1984a). Η συγγένεια του NADPH πιστεύεται ότι είναι χαμηλή. Το σύστημα είναι ενεργό στα επιδερμικά κύτταρα νεαρών ριζών (Ambler et al. 1971, Brown and Ambler 1974a, Marschner et al. 1982). Δεδομένου ότι τα αγρωστώδη προσλαμβάνουν σίδηρο συμπλοκοποιημένο με τα εκκρινόμενα φυτοσιδηροφόρα, και δεδομένου ότι οι αποκρίσεις των αγρωστωδών στην έλλειψη σιδήρου υποτίθεται ότι είναι μία αύξηση στην έκκριση αυτών των συμπλεκτών, τα ερωτήματα που υπάρχουν είναι: ποια είναι η λειτουργία του προτύπου συστήματος και ποιος είναι ο φυσικός αποδέκτης ηλεκτρονίων του. Η λειτουργία της οξειδοαναγωγικής αλυσίδας στη πλασματική μεμβράνη είναι να εξάγει πρωτόνια προκειμένου να δημιουργήσει διαμεμβρανικό δυναμικό και ο φυσικός αποδέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο.

4.1.3 Ο σκοπός του κεφαλαίου

Πόση από την ποσότητα του σιδήρου κάθε ριζικού άξονα είναι εσωτερικός σίδηρος και πόση αποπλαστικός σίδηρος ή εξωτερικός σίδηρος; Πως κατανέμεται ο εξωτερικός σίδηρος κατά μήκος του άξονα της κάθε ρίζας; Διαφοροποιείται από τον τύπο της ρίζας ή από την τροφопενία;

Για να απαντηθούν αυτά τα ερωτήματα αναπτύχθηκαν οι επόμενες ενότητες προσεγγίσεων της δυναμικής του συστήματος: (1) μελετήθηκαν οι μεταβολές της συγκέντρωσης του σιδήρου και των πρωτονίων στα θρεπτικά διαλύματα, (2) ανιχνεύθηκαν και χαρτογραφήθηκαν οι αποθέσεις του σιδήρου στην εξωτερική επιφάνεια του κάθε τύπου ρίζας, (3) απομακρύνθηκαν οι αποθέσεις και μετρήθηκε η μάζα τους, (4) ανιχνεύθηκε και χαρτογραφήθηκε η συγκέντρωση πρωτονίων στην εξωτερική επιφάνεια του κάθε τύπου ρίζας, (5) προσδιορίστηκε ο συνολικός εκχυλίσμος σιδήρου και διακρίθηκε σε εξωτερικό και αποπλαστικό σε κάθε τύπο ρίζας, (6) μελετήθηκε η δυναμική του συνολικού εκχυλίσμου σιδήρου και του αποπλαστικού σιδήρου τις πρώτες ώρες και τις πρώτες ημέρες της κάθε μεταχείρισης, (7) υπολογίστηκαν οι αποθέσεις σε κάθε τύπο ρίζας και μελετήθηκε η κινητική τους, (8) ανιχνεύθηκε ο αποπλαστικός σίδηρος σε τομές, (9) υπολογίστηκε ο εσωτερικός σίδηρος σε κάθε τύπο ρίζας.

4.2. Υλικά και μέθοδοι

4.2.1 Δειγματοληψίες

Σε αυτό το κεφάλαιο διενεργήθηκαν δύο τύποι πειραμάτων: (1) πειράματα διάρκειας 26 ημερών και (2) μικρής χρονικής διάρκειας (τις πρώτες 6 ώρες από την έναρξη της μεταχείρισης και ανά ημέρα από την 7^η μέχρι τη 10^η ημέρα). Το πείραμα μεγάλης χρονικής διάρκειας έχει περιγραφεί αναλυτικά στα «Υλικά και μέθοδοι του Κεφαλαίου 2. Σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας επιλέχτηκαν 3 φυτά control και 3 φυτά ελλειμματικά σε θείο (Εικόνα 2.2).

Στο πείραμα μικρής χρονικής διάρκειας, 10 ημερών, διενεργήθηκαν 9 δειγματοληψίες. Η 1^η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε την 7^η ημέρα και λίγο πριν την μεταφορά των φυτών στα δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, όταν ακόμη βρίσκονταν στο απιονισμένο νερό. Η 2^η δειγματοληψία έγινε μισή ώρα μετά την μεταφορά τους στα δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, η 3^η δειγματοληψία μία ώρα μετά, η 4^η δειγματοληψία δύο ώρες μετά, η 5^η δειγματοληψία τρεις ώρες μετά, η 6^η δειγματοληψία έξι ώρες μετά, η 7^η δειγματοληψία μία ημέρα μετά, η 8^η δειγματοληψία δύο ημέρες μετά και τέλος η 9^η δειγματοληψία τρεις ημέρες μετά την μεταφορά τους. Σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις (Εικόνα 4.1).

Συνολικά διενεργήθηκαν 5 πειραματικά μεγάλης και μικρής χρονικής διάρκειας με τις επαναλήψεις τους. Πιο συγκεκριμένα στο 1^ο πείραμα μικρής και μεγάλης χρονικής διάρκειας μελετήθηκαν οι μεταβολές της συγκέντρωσης του σιδήρου και των πρωτονίων στα δύο διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα. Στο 2^ο πείραμα μικρής και μεγάλης χρονικής διάρκειας ανιχνεύτηκαν και χαρτογραφήθηκαν οι αποθέσεις του σιδήρου στην εξωτερική επιφάνεια του κάθε τύπου ρίζας και ο αποπλασμικός σίδηρος σε τομές της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών. Στο 3^ο πείραμα μικρής και μεγάλης χρονικής διάρκειας ανιχνεύτηκε και χαρτογραφήθηκε η συγκέντρωση πρωτονίων στην εξωτερική επιφάνεια του κάθε τύπου ρίζας. Στο 4^ο πείραμα μικρής και μεγάλης χρονικής διάρκειας προσδιορίστηκε ο συνολικός εκχυλισμός σιδήρου σε κάθε τύπο ρίζας και τέλος στο 5^ο πείραμα προσδιορίστηκε ο αποπλασμικός σίδηρος μετά το χειρισμό με διάλυμα DCB σε κάθε τύπο ρίζας.

4.2.2 Μεταβολές στο θρεπτικό διάλυμα

Σε αυτή την πειραματική διαδικασία μελετήθηκαν:

1) οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις του σιδήρου στα δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα σε μικρής και μεγάλης χρονικής διάρκειας πείραμα. Κάθε ημέρα δειγματοληψίας ελήφθησαν τρία δείγματα από το κάθε θρεπτικό διάλυμα και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση σιδήρου με την μέθοδο της φλογοφωτομετρίας ατομικής απορρόφησης και

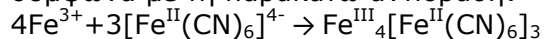
2) οι μεταβολές του pH στα δύο θρεπτικά υποστρώματα και στους δύο τύπους πειραμάτων με τη συσκευή του πεχαμέτρου.

4.2.3 Αποθέσεις στην επιφάνεια της ρίζας

Σε αυτή την πειραματική διαδικασία απεικονίστηκε η παρουσία του σιδήρου κατά μήκος κάθε τύπου ρίζας των φυτών αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και σε διάλυμα ελλειμματικό σε θείο. Για την απεικόνιση της παρουσίας σιδήρου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Perl's Prussian Blue (PPB) (Cvitanich 2010, Roschztardt 2009, Stacey 2008).

4.2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Perls χρησιμοποιείται για την χρώση με μπλε των εναποθέσεων σιδήρου στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος. Το σιδηροκυανιούχο κάλιο, το αντιδραστήριο της μεθόδου Perls, μπορεί να αντιδράσει με τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{3+}) για να σχηματίσει αδιάλυτη χρωστική ουσία γνωστή ως Prussian blue σύμφωνα με τη παρακάτω αντίδραση:



4.2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Για την απεικόνιση της παρουσίας σιδήρου κατά μήκος της ρίζας πραγματοποιήθηκε πείραμα μικρής και μεγάλης χρονικής διάρκειας. Για την παρασκευή 100 mL διαλύματος χρωστικής Prussian blue, διαλύθηκαν 2g σιδηροκυανιούχου καλίου σε 80 mL περίπου απιονισμένου νερού. Προστέθηκαν 2 mL διαλύματος HCl 37% και συμπληρώθηκαν με απιονισμένο νερό μέχρι τα 100 mL. Το διάλυμα παρασκευαζόταν μικρό χρονικό διάστημα πριν τη χρήση του επειδή είναι ευαίσθητο στις οξειδωτικές δράσεις φωτός και θερμοκρασίας.

Σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1) ξεπλύθηκε το ριζικό σύστημα ενός άθικτου φυτού με απιονισμένο νερό, 2) εμβαπτίστηκε πλήρως το ριζικό σύστημα στο διάλυμα της χρωστικής για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) και 3) το δείγμα ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο νερό.

Μετά το πέρας της διαδικασίας της χρώσης έγινε παρατήρηση του δείγματος μακροσκοπικά. Χαρτογραφήθηκε η παρουσία του σιδήρου σε όλο το μήκος της πρωτογενούς ρίζας, των δευτερογενών ριζών, των ριζών του μεσοκοτυλίου και των βλαστογενών ριζών μέσω φωτογραφιών που ελήφθησαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Τα φυτά φωτογραφήθηκαν πάνω σε βαθμονομημένο χαρτί.

4.2.4 Η μεταβολή του pH στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος

Σε αυτή τη πειραματική διαδικασία μελετήθηκε η μεταβολή του pH στην επιφάνεια κάθε τύπου ρίζας των φυτών που αναπτύχθηκαν στα δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα και στους δύο τύπους πειραμάτων (μικρής και μεγάλης χρονικής διάρκειας πείραμα). Τις ημέρες των δειγματοληψιών ο κάθε τύπος ρίζας τοποθετήθηκε σε plexiglass, που είχε ως υπόστρωμα απιονισμένο νερό, 1% agar και $0,4\text{gL}^{-1}$ (0.71mM) bromocresol purple (Weisenseel 1979, Mulkey και Evans 1981, με τροποποιήσεις). Μετά την τοποθέτηση των ριζών ολόκληρη η επιφάνεια του υποστρώματος που περιείχε τις ρίζες καλύφθηκε με καπάκι από plexiglass έτσι ώστε η διάμετρος της ρίζας να εμβαπτίζεται πλήρως μέσα στο υπόστρωμα. Ο δείκτης pH bromocresol purple δείχνει τις μεταβολές του pH σε ένα εύρος 5,2 (κίτρινος χρωματισμός) – 6,8 (μωβ χρωματισμός). Μετά την πάροδο 5-10min ελήφθησαν φωτογραφίες με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

4.2.5 Δυναμική αποπλαστικού σιδήρου

Ο αποπλαστικός σίδηρος είναι ο σίδηρος που εντοπίζεται μέσα στο χώρο που ορίζεται από τις πλασματικές μεμβράνες και την επιφάνεια του φυτού. Σε αυτόν δεν συμπεριλαμβάνονται οι αποθέσεις του σιδήρου πάνω στην επιφάνεια της ρίζας. Ο συνολικός εκχυλίσσιμος σίδηρος περιλαμβάνει τον αποπλαστικό σίδηρο και τις αποθέσεις του σιδήρου που συνδέονται στην επιφάνεια της ρίζας. Προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του συνολικού εκχυλίσσιμου σιδήρου (TEi: total extractable iron), του αποπλαστικού σιδήρου (Ai: apoplast extractable iron) και υπολογίστηκαν οι αποθέσεις του σιδήρου (Di: iron depositions) ως η διαφορά μεταξύ του συνολικού εκχυλίσσιμου σιδήρου και του αποπλαστικού σιδήρου σε κάθε τύπο ρίζας.

4.2.5.1 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας του συνολικού εκχυλίσμου σιδήρου της ρίζας (ΤΕί)

4.2.5.1.1 Αρχή της μεθόδου (μέθοδος Bienfait)

Στη χρωματομετρική ανάλυση πολλά εξαιρετικά έγχρωμα σύμπλοκα μπορούν να σχηματιστούν από ιόντα μετάλλου και οργανικούς ή ανόργανους παράγοντες συμπλοκοποίησης. Γενικά τα οργανικά χρωματομετρικά αντιδραστήρια είναι σημαντικά, πιο ευαίσθητα από τα ανόργανα. Δίνουν πιο έντονα χρώματα και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται συχνά για αναλύσεις ιχνοστοιχείων. Με πολλά οργανικά αντιδραστήρια είναι δυνατόν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις σε επίπεδο ppm. Το 2,2 διπυριδύλιο (2,2'-bipyridyl) σχηματίζει ένα έντονα ερυθρό χρώμα με τον δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων σιδήρου σε ένα εύρος ppm. Η αντίδραση είναι: $3bipy + Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe(bipy)_3^{2+}$. Η μοριακή απορρόφηση του συμπλόκου Fe-bipyridyl είναι 8650L/mol/cm στο μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης. Το σύμπλοκο σχηματίζεται γρήγορα, είναι σταθερό σε ένα εύρος pH από 3 έως 9 και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης δισθενούς σιδήρου από 0,5 έως 8 ppm. Ο τρισθενής σίδηρος πρέπει να αναχθεί σε δισθενή σίδηρο. Ένα κατάλληλο αντιδραστήριο είναι το διθειονώδες νάτριο (Sodium dithionite: $Na_2S_2O_4$), η αντίδραση αναγωγής φαίνεται παρακάτω:

$$S_2O_4^{2-} + 2Fe^{3+} + 2H_2O \rightarrow 2SO_3^{2-} + 2Fe^{2+} + 4H^+$$

Οι ρίζες απελευθερώνουν το σίδηρο όταν εμβαπτίζονται, υπό αναερόβιες συνθήκες, σε διθειονώδες νάτριο με την παρουσία του 2,2' διπυριδύλιου. Η γρήγορη φάση της απελευθέρωσης πραγματοποιείται μέσα σε 1 με 2 min, ακολουθεί η αργή φάση από 10 με 20 min η οποία μπορεί να συνεχιστεί για ώρες. Ο υψηλός ρυθμός της απελευθέρωσης του σιδήρου στην πρώτη φάση υποθέτει ότι ο σίδηρος που απελευθερώνεται στην γρήγορη φάση βρίσκεται στον ελεύθερο χώρο (αποπλάστη). Η απελευθέρωση του K^+ από τις ρίζες κατά την διάρκεια της εμβάπτισης αυτών με το διθειονώδες νάτριο παρακολουθείται ως ένδειξη της κυτταρικής διαρροής. Η απελευθέρωση K^+ αρχίζει μετά από 10min από την προσθήκη του διθειονώδους νατρίου, που σημαίνει ότι τα κύτταρα της ρίζας παραμένουν άθικτα στα πρώτα 10 min της επώασης, και ότι μόνο τα ιόντα του αποπλασμικού σιδήρου απελευθερώνονται.

Από πιθανές μορφές του σιδήρου που εναποτίθεται στον αποπλασμικό χώρο εκτός από τα ιόντα τρισθενούς σιδήρου που δεσμεύονται σε θέσεις ανταλλαγής κατιόντων, είναι τα υδροξείδια του τρισθενούς σιδήρου και ο φωσφορικός σίδηρος. Και οι δύο αυτές ενώσεις του τρισθενούς σιδήρου ανάγονται από το διθειονώδες νάτριο μέσα σε 1 min υπό αυτές τις συνθήκες. Ο σίδηρος που απελευθερώνεται από την μεταχείριση με διθειονώδες νάτριο και διπυριδύλιο μέσα σε 1 με 2 min αντιπροσωπεύουν τον σίδηρο που αρχικά εναποτίθεται ως τρισθενές αλάτι ή υδροξείδια στον ελεύθερο χώρο των ριζών (Bienfait 1985).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης σιδήρου πραγματοποιείται μέσω καμπύλης αναφοράς. Για την κατασκευή της προετοιμάζεται ένα πρότυπο διάλυμα και συγκρίνεται η απορρόφηση του δείγματος και του προτύπου διαλύματος. Η τεχνική αυτή ελαχιστοποιεί τις επιδράσεις του οργάνου και της διακύμανσης του διαλύματος. Στις περισσότερες φασματοφωτομετρικές μεθόδους μια ακρίβεια $\pm 1\%$ σε επίπεδα συγκέντρωσης των μερών ανά εκατομμύριο είναι αρκετά επαρκής. Ο εναμμώνιος θειικός σίδηρος [Ferrous Ammonium Sulfate (FAS): $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$] που χρησιμοποιείται στη διαδικασία δεν θεωρείται κύριο πρότυπο, όμως είναι διαθέσιμο σε καθαρότητα μεγαλύτερη από 99% και επομένως ήταν κατάλληλο για το σκοπό μας.

4.2.5.1.2 Πειραματική διαδικασία

Ο συνολικός εκχυλίσμος σιδήρου περιλαμβάνει τον αποπλασμικό σίδηρο και τις εναποθέσεις του σιδήρου στην επιφάνεια της ρίζας. Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου σιδήρου σε κάθε τύπο ρίζας

διενεργήθηκε πείραμα μικρής και μεγάλης χρονικής διάρκειας. Σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- 1) κάθε τύπος ριζών μεταφέρθηκε από το θρεπτικό διάλυμα σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιέχει 150mL 0,5mM CaSO₄ υπό έντονο αερισμό για 15 min.
- 2) οι ρίζες, στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε ένα falcon 50 mL με 21 mL 10 mM Mes, 0,5 mM Ca(NO₃)₂ και 1,5 mM 2,2'-διπυριδύλιο.
- 3) διοχετεύτηκε άζωτο στο διάλυμα για 5 min και το falcon καλύφθηκε για να αποφευχθεί η είσοδος οξυγόνου.
- 4) προστέθηκε 1mL διαλύματος Na₂S₂O₄ 250mM με μία σύριγγα.
- 5) μετά από 5 min ελήφθηκε δείγμα από το διάλυμα και μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος στα 520nm.
- 6) μεταφορά των ριζών στο ποτήρι ζέσεως που περιείχε 150mL CaSO₄ 0,5mM.
- 7) οι ρίζες αυτές ζυγίστηκαν πριν και μετά την ξήρανση στο φούρνο για να πάρουμε το νωπό και ξηρό βάρος.

4.2.5.2 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας του αποπλασμικού σιδήρου της ρίζας μετά από χειρισμό με DCB (A_i)

Ο αποπλασμικός σίδηρος είναι ο σίδηρος που βρίσκεται στη περιοχή που ορίζεται από τις πλασματικές μεμβράνες και την επιφάνεια του φυτού, σε αυτόν δεν συμπεριλαμβάνονται οι εναποθέσεις του σιδήρου πάνω στην επιφάνεια της ρίζας. Προκειμένου να απομακρυνθούν οι εναποθέσεις του σιδήρου από την επιφάνεια της ρίζας πραγματοποιήθηκε ο χειρισμός με dithionite-citrate-bicarbonate (DCB) (Taylor και Crowder 1983b, Otte et al. 1991, Liu 2004).

Σύμφωνα με την μέθοδο, κατά τη συγκομιδή, ολόκληρο το ριζικό σύστημα κάθε φυτού εμβάπτιστηκε, για 60min σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C), σε 40mL ενός διαλύματος που περιέχει 0,03M κιτρικό νάτριο, 0,125M όξινο ανθρακικό νάτριο και την προσθήκη 0,6 g διθειονώδες νατρίου. Το Na₂S₂O₄ είναι ένα ισχυρό αναγωγικό σε διάλυμα NaHCO₃, το οποίο ανάγει τον Fe³⁺ σε Fe²⁺, ενώ το κιτρικό του Na₃C₆H₅O₇·2H₂O μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκο με Fe²⁺. Έτσι απομακρύνθηκε ο σίδηρος από την επιφάνεια της ρίζας. Μετά ολόκληρο το ριζικό σύστημα του κάθε φυτού ξεπλύθηκε τρεις φορές με απιονισμένο νερό και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του αποπλασμικού σιδήρου σε κάθε τύπο ρίζας με την μέθοδο Bienfait (1985).

4.2.6 Ανίχνευση σιδήρου σε τομές της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών

Σε αυτή την πειραματική διαδικασία ανιχνεύτηκε η παρουσία του σιδήρου σε τομές με μικροτόμο στα τμήματα της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών με τη μέθοδο Perl's Prussian Blue (PPB) (Cvitanich 2010, Roschztardt 2009, Stacey 2008).

Για την ανίχνευση της παρουσίας σιδήρου σε τομές της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών πραγματοποιήθηκε πείραμα μεγάλης χρονικής διάρκειας. Κατά την διάρκεια του πειράματος και τις αντίστοιχες ημέρες των δειγματοληψιών ελήφθησαν δείγματα από τα παραπάνω φυτομερή και με την διαδικασία την προσήλωσης και εγκλεισμού τους σε παραφίνη δημιουργήθηκαν μόνιμα παρασκευάσματα (όπως περιγράφεται αναλυτικά στα υλικά και μέθοδοι του Κεφαλαίου 3). Οι τομές ελήφθησαν από όλα τα τμήματα της ρίζας (B, πλP, ΑπλP και A) και από τις περιοχές 200μm, 400μm, 600μm, 800μm και 1000μm από το ακρορρίζιο.

Η χρώση των τομών αυτών έγινε με την ίδια χρωστική που χρησιμοποιήθηκε και για την απεικόνιση της παρουσίας σιδήρου στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Prussian blue που παρασκευάστηκε αναμειγνύοντας ίσα μέρη υδροχλωρικού οξέος 20% και σιδηροκυανιούχου καλίου 10% για 20min.

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας και της λήψης μόνιμων παρασκευασμάτων οι τομές παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο.

Πραγματοποιήθηκε και χειρισμός με DCB για να αποδειχθεί ότι αυτά που βλέπουμε με την χρώση δεν είναι artifacts.

ΗΜΕΡΕΣ ΑΠΟ ΤΗ ΣΠΟΡΑ	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ΑΛΛΑΓΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ								✓			✓
ΗΜΕΡΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ								✓*	✓	✓	✓
ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	βλάστηση σε διηθητικό χαρτί				απιονισμένο H ₂ O		Control και -S				

*: λίγο πριν από την αλλαγή του θρεπτικού διαλύματος και 0.5, 1, 2, 3 και 6 ώρες μετά την αλλαγή.

Εικόνα 4.1

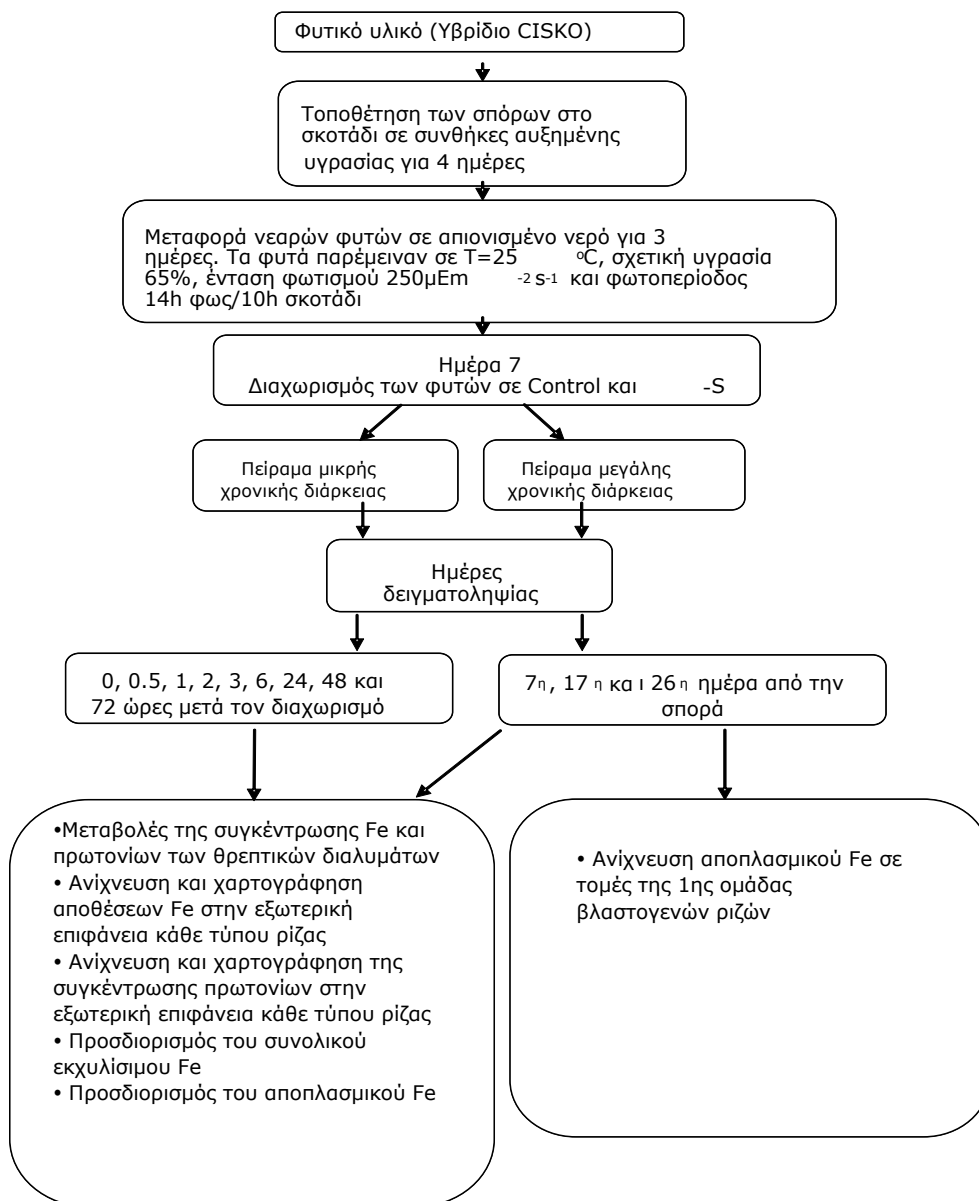
Σχεδιάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας μικρής χρονικής διάρκειας για τον προσδιορισμό του συνολικού εκχυλίσμου και αποπλαστικού σιδήρου.

Συνομογραφίες

TEi	Συνολικός εκχυλίσμος σίδηρος
Ai	Αποπλαστικός εκχυλίσμος σίδηρος
Di	Αποθέσεις σιδήρου (εξωτερικός σίδηρος)
INTi	Εσωτερικός σίδηρος
ROOTi	Ολικός σίδηρος
B	Βάση της ρίζας (δεν φέρει πλάγιες)
M	Το μέσο της ρίζας
πΛΡ	Τμήμα ρίζας που φέρει τις πλάγιες ρίζες
ΑπΛΡ	Τμήμα ρίζας που φέρει τις αναδυόμενες πλάγιες ρίζες
A	Το τμήμα της ρίζας από το άκρο μέχρι την έναρξη του ΑπΛΡ
1000μm	} Περιοχή από το ακρορριζίο
800μm	
600μm	
400μm	
200μm	

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

Ε



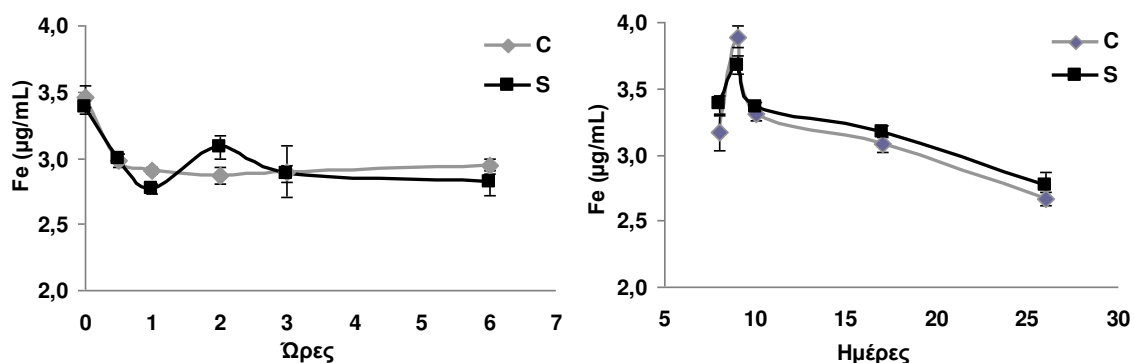
Εικόνα 4.2

Διάγραμμα ροής εργασιών του πειραματικού μέρους

4.3 Αποτελέσματα

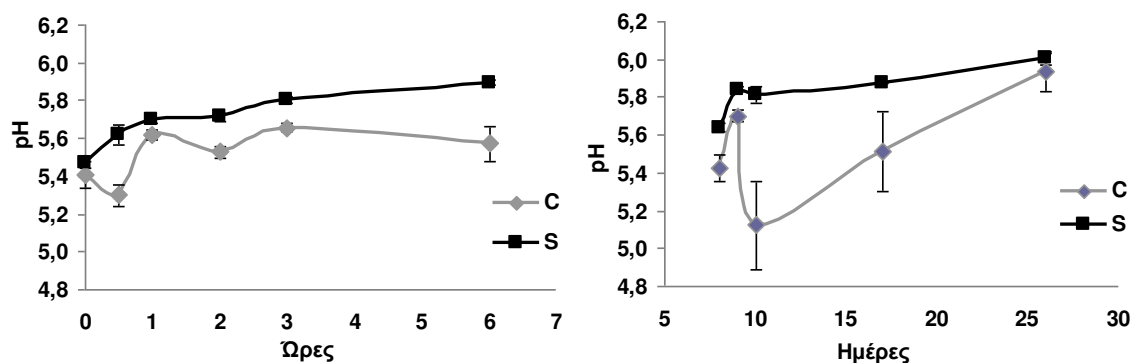
Η δυναμική των παραμέτρων που προσδιορίστηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θεικών έδωσαν την επόμενη εικόνα ανά ημέρα δειγματοληψίας.

Ημέρα 0 - Η συγκέντρωση Fe του θρεπτικού διαλύματος κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα με του πλήρους θρεπτικού διαλύματος (Εικόνα 4.3). Το pH του θρεπτικού διαλύματος ήταν υψηλότερο μέχρι και 6% από του πλήρους θρεπτικού διαλύματος ($5,7 \pm 0,19$) (Εικόνα 4.4). Η χαρτογράφηση των αποθέσεων Fe στην εξωτερική επιφάνεια κάθε τύπου ρίζας αποκάλυψε ότι χρωματίζονται από την 1^η ώρα και εντονότερα βάφονται τα τμήματα πλΡ και ΑπλΡ της ΠΡ και από την 2^η ώρα και λιγότερο έντονα το άκρο των ΔΡ συγκριτικά με των φυτών μαρτύρων (Εικόνα 4.5). Η ξηρή μάζα αποθέσεων της ΠΡ αυξήθηκε κατά 2,5 mg και δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά από των φυτών-μαρτύρων, ενώ των ΔΡ μειώθηκε κατά 8,3 mg και ήταν μικρότερη από των φυτών-μαρτύρων κατά 62% (Εικόνα 4.8). Το pH στην επιφάνεια των τμημάτων της Β, πλΡ και ΑπλΡ της ΠΡ αυξήθηκε ($pH > 6$) (Εικόνα 4.10). Η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου Fe αυξήθηκε και στους δύο τύπους ριζών και διαφοροποιήθηκε από των φυτών-μαρτύρων έχοντας μεγαλύτερη συγκέντρωση την 3^η ώρα κατά 21% (ΠΡ) και 86% (ΔΡ) και μικρότερη συγκέντρωση την 0.5 ώρα κατά 51% (ΠΡ) και 39% (ΔΡ) και την 6^η ώρα κατά 44% (ΠΡ) και 56% (ΔΡ) (Εικόνα 4.12). Η συγκέντρωση του αποπλασμικού εκχυλίσμου Fe της ΠΡ μειώθηκε έχοντας μηδενική τιμή την 6^η ώρα και ήταν μικρότερη κατά 97%, 100%, 75% και 100% την 0.5, 2^η, 3^η και 6^η ώρα αντίστοιχα από των φυτών-μαρτύρων, ενώ των ΔΡ αυξήθηκε και διαφοροποιήθηκε από των φυτών-μαρτύρων την 0.5 ώρα που ήταν μεγαλύτερη κατά 100% και την 1^η, 2^η και 3^η ώρα που ήταν μικρότερη κατά 17%, 50% και 75% αντίστοιχα (Εικόνα 4.13).



Εικόνα 4.3

Η συγκέντρωση σιδήρου των δύο θρεπτικών διαλυμάτων (C-γκρι γραμμή, -S μαύρη γραμμή) ανάπτυξης των φυτών την 7^η (0, 0.5, 1, 2, 3 και 6 ώρες μετά το διαχωρισμό), 8^η, 9^η, 10^η, 17^η και 26^η ημέρα από τη σπορά.



Εικόνα 4.4

Το pH των δύο θρεπτικών διαλυμάτων (C-γκρι γραμμή, -S μαύρη γραμμή) ανάπτυξης των φυτών την 7^η (0, 0.5, 1, 2, 3 και 6 ώρες μετά το διαχωρισμό), 8^η, 9^η, 10^η, 17^η και 26^η ημέρα από τη σπορά.

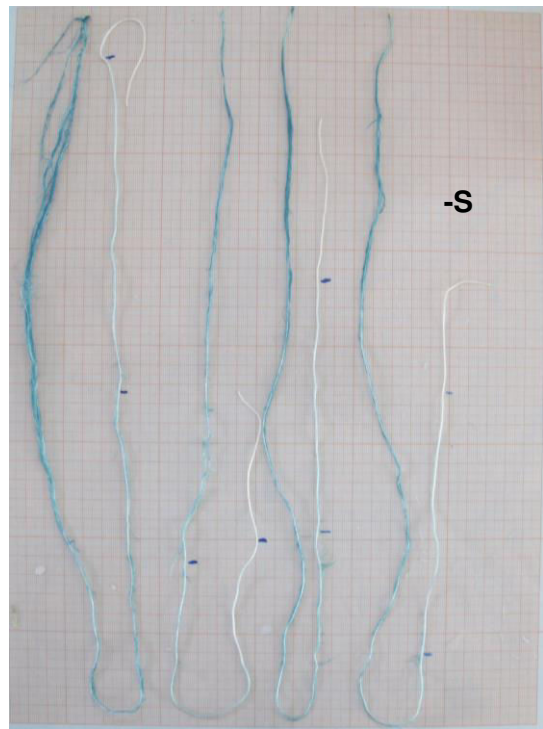
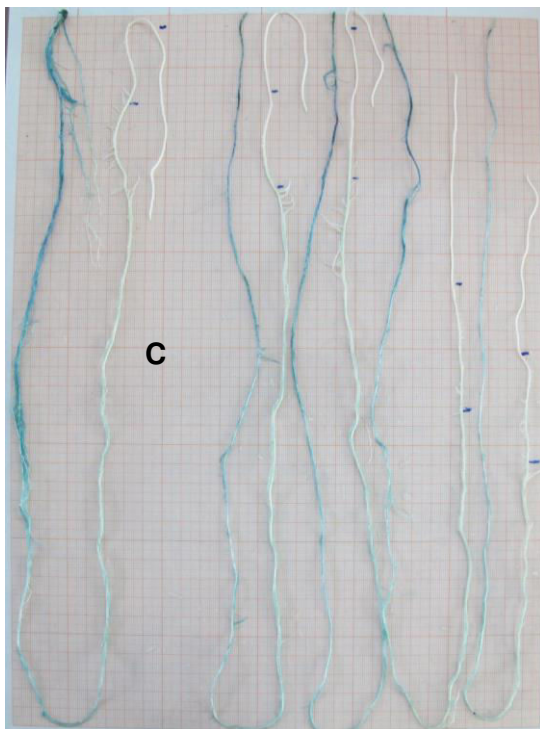
C																	
ΗΜΕΡΕΣ		ΠΡ			ΔΡ			BP1			BP2			PM			
		B	πΛΡ	ΑπΛΡ	A	B	πΛΡ	ΑπΛΡ	A	B	πΛΡ	ΑπΛΡ	A	B	πΛΡ	ΑπΛΡ	A
ΗΜΕΡΑ 7	ΠΔ*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.5h μετά	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1h μετά	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2h μετά	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3h μετά	-	1	1	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	6h μετά	-	1	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ΗΜΕΡΑ 8	-	2	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ΗΜΕΡΑ 9	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ΗΜΕΡΑ 10	-	2	1	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
ΗΜΕΡΑ 17	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ΗΜΕΡΑ 26	-	2	2	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
-S																	
ΗΜΕΡΕΣ		ΠΡ			ΔΡ			BP1			BP2			PM			
		B	πΛΡ	ΑπΛΡ	A	B	πΛΡ	ΑπΛΡ	A	B	πΛΡ	ΑπΛΡ	A	B	πΛΡ	ΑπΛΡ	A
ΗΜΕΡΑ 7	ΠΔ*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.5h μετά	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1h μετά	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2h μετά	-	1	2	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	3h μετά	-	1	2	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	6h μετά	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ΗΜΕΡΑ 8	-	2	3	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ΗΜΕΡΑ 9	-	2	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ΗΜΕΡΑ 10	-	3	1	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
ΗΜΕΡΑ 17	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ΗΜΕΡΑ 26	-	3	1	-	-	-	2	3	1	-	-	-	-	-	-	-	

*: πριν τον διαχωρισμό
- : δεν βάφει
1: βάφει γαλάζιο
2: βάφει μπλε
3: βάφει σκούρο μπλε

ΠΡ: Πρωτογενής εμβρυακή ρίζα
ΔΡ: Δευτερογενείς εμβρυακές ρίζες
BP: Βλαστογενείς ρίζες
PM: Ρίζες μεσοκοτυλίου
B: Βάση της ρίζας
πΛΡ: Τμήμα της ρίζας που φέρει πλάγιες ρίζες
ΑπΛΡ: Τμήμα της ρίζας που φέρει τις αναδυόμενες πλάγιες ρίζες
A: Το τμήμα της ρίζας από το άκρο μέχρι την έναρξη του ΑπΛΡ

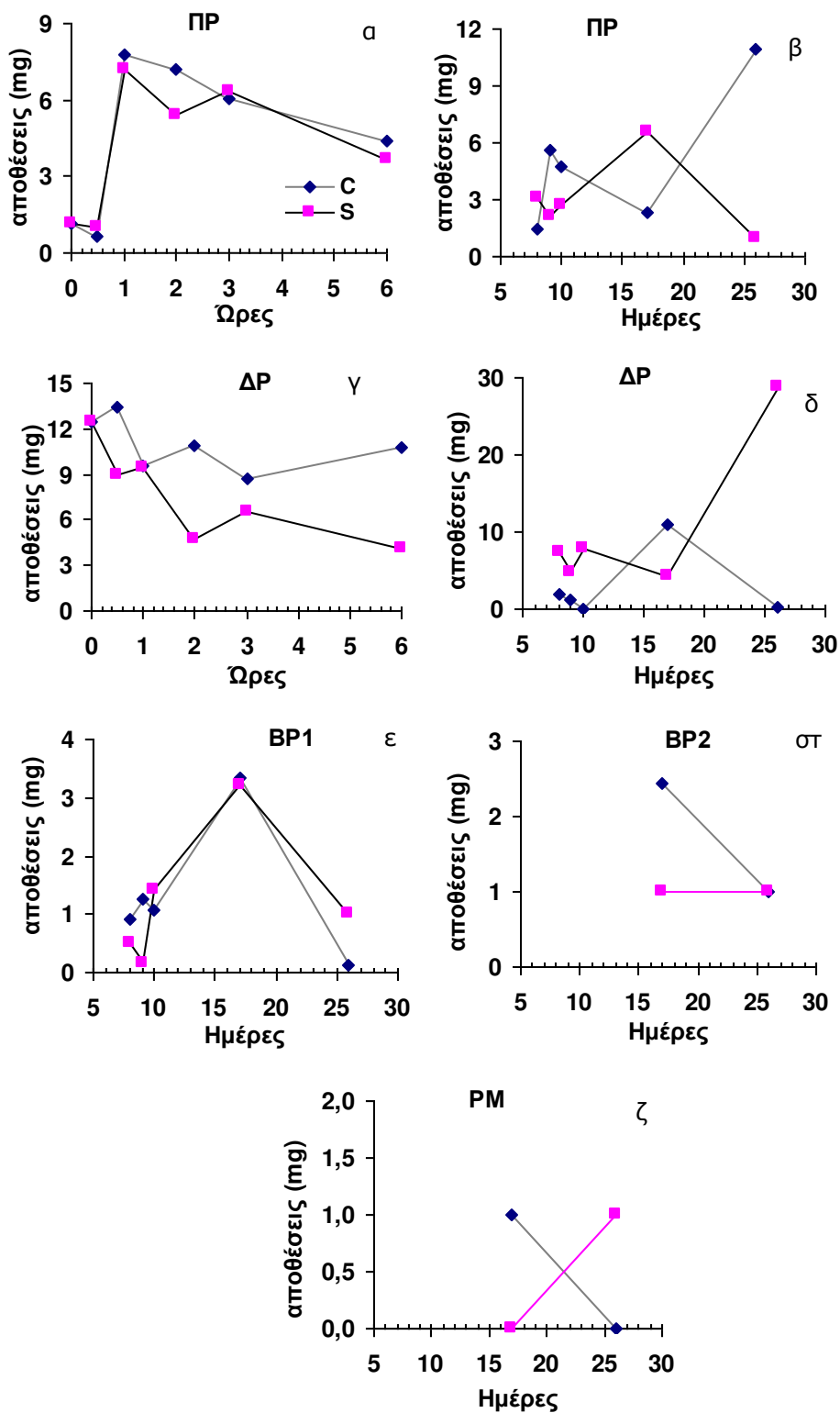
Εικόνα 4.5

Κατανομή του σιδήρου σε ολόκληρη την επιφάνεια κάθε τύπου ρίζας και κάθε τμήματος κάθε τύπου ρίζας τις αντίστοιχες ημέρες δειγματοληψιών του πειράματος σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (-S).



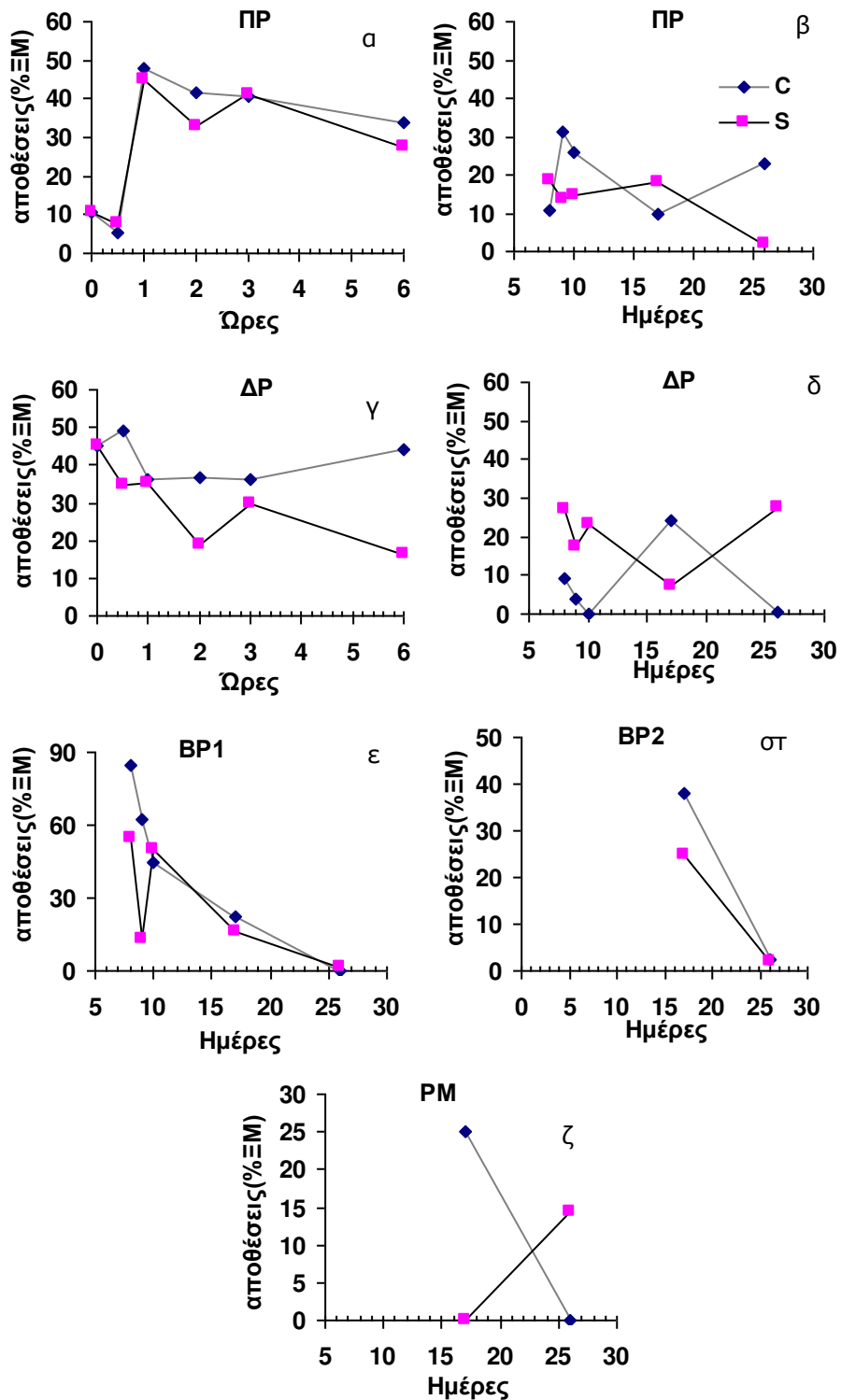
Εικόνα 4.6

Αποθέσεις σιδήρου στην επιφάνεια των εμβρυακών ριζών (πρωτογενή ρίζα και δευτερογενείς ρίζες) την 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (-S).



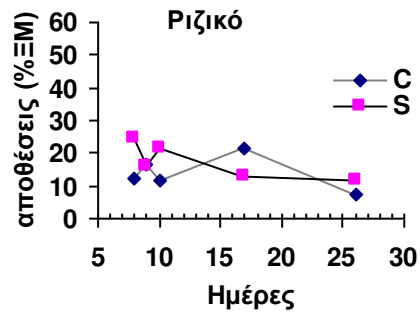
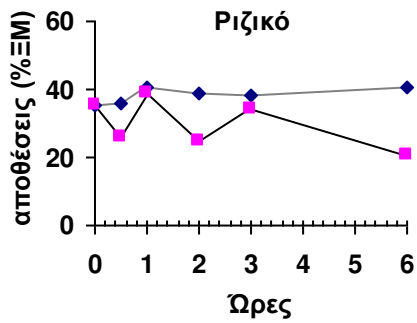
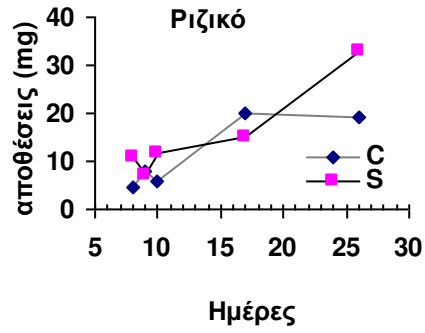
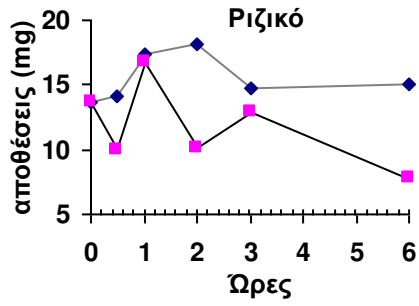
Εικόνα 4.7

Η ξηρή μάζα των αποθέσεων της πρωτογενούς ρίζας (α, β), των δευτερογενών ριζών (γ, δ), της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών (ε), της 2^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών (στ) και των ριζών του μεσοκοτυλίου (ζ) των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, μπλε γραμμή) και των φυτών ελλειμματικών σε θείο (-S, κόκκινη γραμμή) την 7^η (0, 0.5, 1, 2, 3 και 6 ώρες μετά το διαχωρισμό), 8^η, 9^η, 10^η, 17^η και 26^η ημέρα από τη σπορά.



Εικόνα 4.8

Το ποσοστό της ξηρής μάζας των αποθέσεων της πρωτογενούς ρίζας (α, β), των δευτερογενών ριζών (γ, δ), της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών (ε), της 2^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών (στ) και των ριζών του μεσοκοτυλίου (ζ) στη ξηρή μάζα κάθε τύπου ρίζας των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, μπλε γραμμή) και των φυτών ελλειμματικών σε θείο (-S, κόκκινη γραμμή) την 7^η (0, 0.5, 1, 2, 3 και 6 ώρες μετά το διαχωρισμό), 8^η, 9^η, 10^η, 17^η και 26^η ημέρα από τη σπορά.



Εικόνα 4.9

Η ξηρή μάζα των αποθέσεων του ριζικού (πάνω) και το ποσοστό συμμετοχής της ως προς την ξηρή μάζα του ριζικού (κάτω) των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, μπλε γραμμή) και των φυτών ελλειμματικών σε θείο (-S, κόκκινη γραμμή) την 7^η (0, 0.5, 1, 2, 3 και 6 ώρες μετά το διαχωρισμό), 8^η, 9^η, 10^η, 17^η και 26^η ημέρα από τη σπορά.

		C																				
ΗΜΕΡΕΣ		ΠΡ				ΔΡ				ΒΡ1				ΒΡ2				ΡΜ				
		Β	πΛΡ	ΑπΛΡ	Α	Β	πΛΡ	ΑπΛΡ	Α	Β	πΛΡ	ΑπΛΡ	Α	Β	πΛΡ	ΑπΛΡ	Α	Β	πΛΡ	ΑπΛΡ	Α	
ΗΜΕΡΑ 7	ΠΔ*	1		1	1	1	2	1														
	0.5h μετά	1		1	1	1	1	1														
	1h μετά	1	1	1	1	1	1	1														
	2h μετά	1	1	1	1	1	1	1														
	3h μετά	1	1	1	1	1	1	1														
	6h μετά	1	1	1	1	1	1	1														
ΗΜΕΡΑ 8		1	1	1	1	1	1	1			1											
ΗΜΕΡΑ 9		1	2	1	1	1	2	1	1			1										
ΗΜΕΡΑ 10		1	2	2	1	1	2	1	1			1										
ΗΜΕΡΑ 17		2	2	1	1	2	2	1	1			1				1					#	
ΗΜΕΡΑ 26		2	2	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

		-S																				
ΗΜΕΡΕΣ		ΠΡ				ΔΡ				ΒΡ1				ΒΡ2				ΡΜ				
		Β	πΛΡ	ΑπΛΡ	Α	Β	πΛΡ	ΑπΛΡ	Α	Β	πΛΡ	ΑπΛΡ	Α	Β	πΛΡ	ΑπΛΡ	Α	Β	πΛΡ	ΑπΛΡ	Α	
ΗΜΕΡΑ 7	ΠΔ*	1		1	1	1	2	1														
	0.5h μετά	1	1	1	1	1	1	1														
	1h μετά	1	1	1	1	1	1	1														
	2h μετά	1	2	2	1	1	1	1														
	3h μετά	1	1	1	1	1	1	1														
	6h μετά	2	2	1	1	1	1	1														
ΗΜΕΡΑ 8		1	1	1	1	1	1	1			1											
ΗΜΕΡΑ 9		1	2	1	1	1	2	1	1			1										
ΗΜΕΡΑ 10		1	1	1	1	1	1	1	1			1										
ΗΜΕΡΑ 17		2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1				#				1	
ΗΜΕΡΑ 26		2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*: πριν τον διαχωρισμό

1: βάφει κίτρινο (pH<6)

2: βάφει μωβ (pH>6)

#: δεν υπήρχε δείγμα

ΠΡ: Πρωτογενής εμβρυακή ρίζα

ΔΡ: Δευτερογενείς εμβρυακές ρίζες

ΒΡ: Βλαστογενείς ρίζες

ΡΜ: Ρίζες μεσοκοτυλίου

Β: Βάση της ρίζας

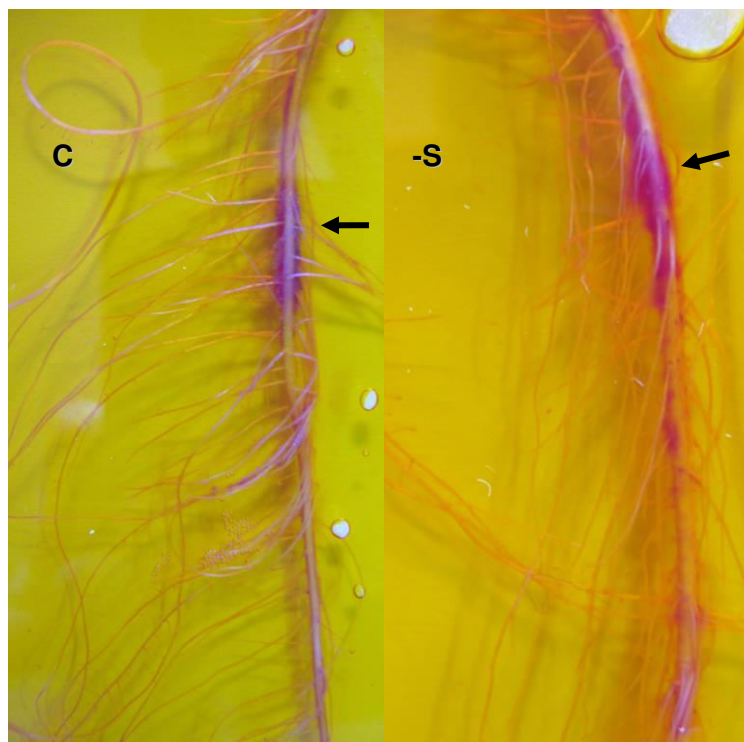
πΛΡ: Τμήμα της ρίζας που φέρει πλάγιες ρίζες

ΑπΛΡ: Τμήμα της ρίζας που φέρει τις αναδιδόμενες πλάγιες ρίζες

Α: Το τμήμα της ρίζας από το άκρο μέχρι την έναρξη του ΑπΛΡ

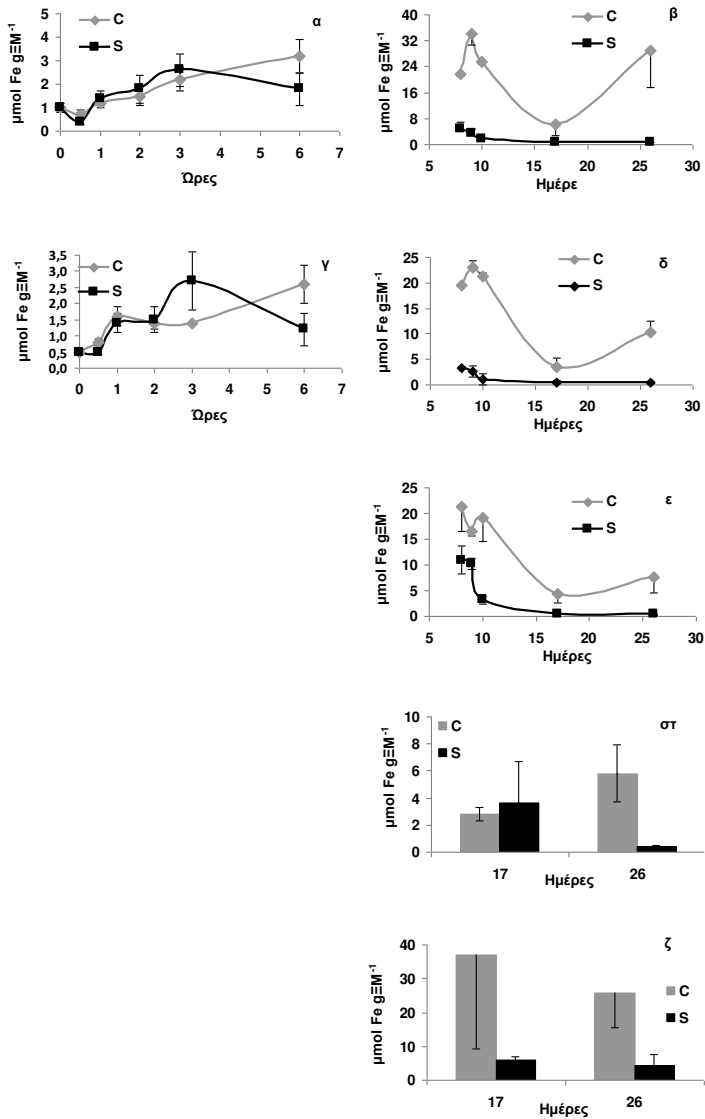
Εικόνα 4.10:

Μεταβολές του pH σε ολόκληρη την επιφάνεια κάθε τύπου ρίζας και κάθε τμήματος κάθε τύπου ρίζας τις αντίστοιχες ημέρες δειγματοληψιών του πειράματος σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (-S).



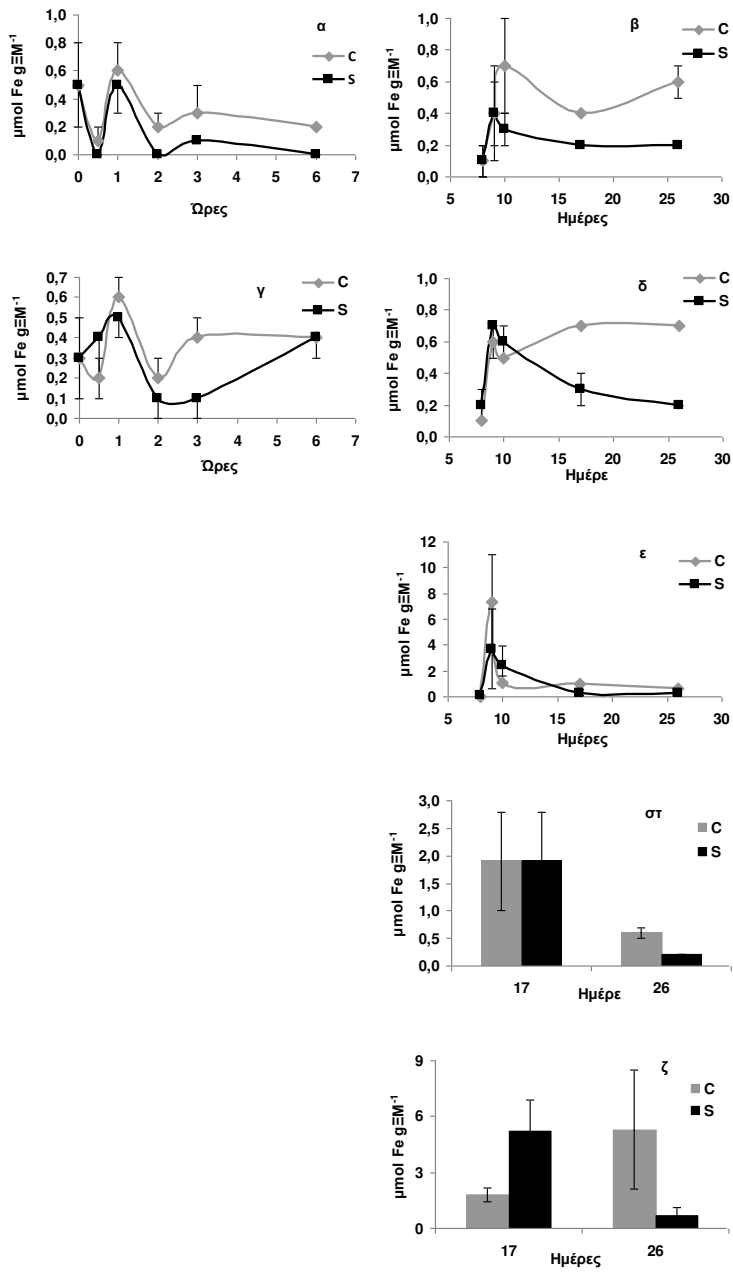
Εικόνα 4.11

Μεταβολή του pH στην επιφάνεια του τμήματος της πρωτογενούς ρίζας που φέρει πλάγιες ρίζες (πΛΡ) την 17^η ημέρα από την σπορά (μαύρα βέλη) σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (-S).



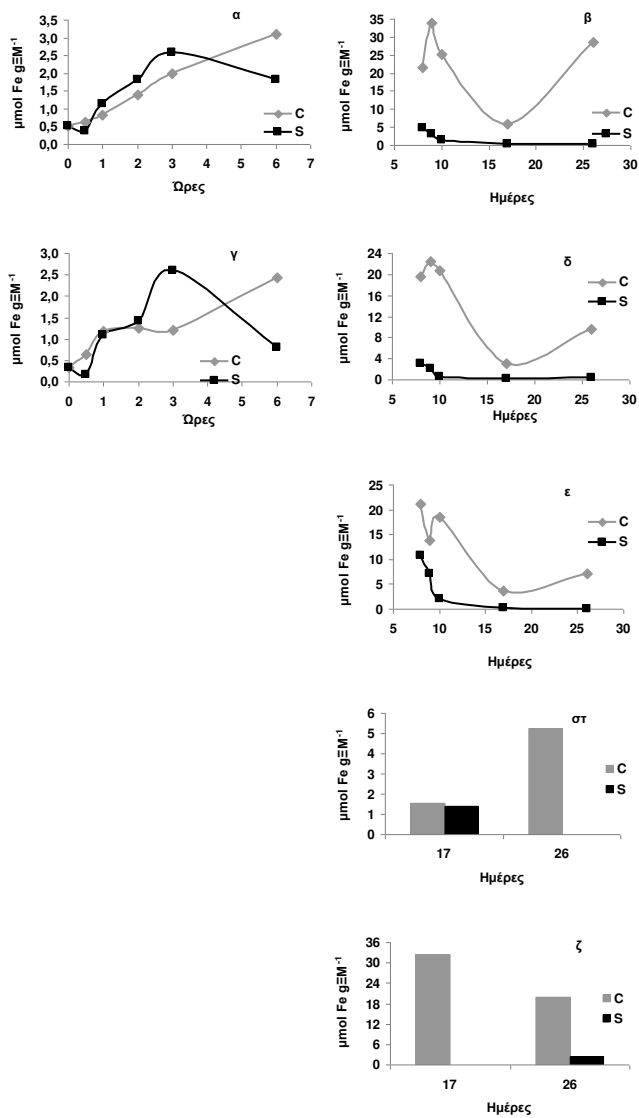
Εικόνα 4.12

Η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου Fe της πρωτογενούς ρίζας (α, β), των δευτερογενών ριζών (γ, δ), της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών (ε), της 2^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών (στ) και των ριζών του μεσοκοτυλίου (ζ) την 7^η (0, 0.5, 1, 2, 3 και 6 ώρες μετά το διαχωρισμό), 8^η, 9^η, 10^η, 17^η και 26^η ημέρα από τη σπορά.



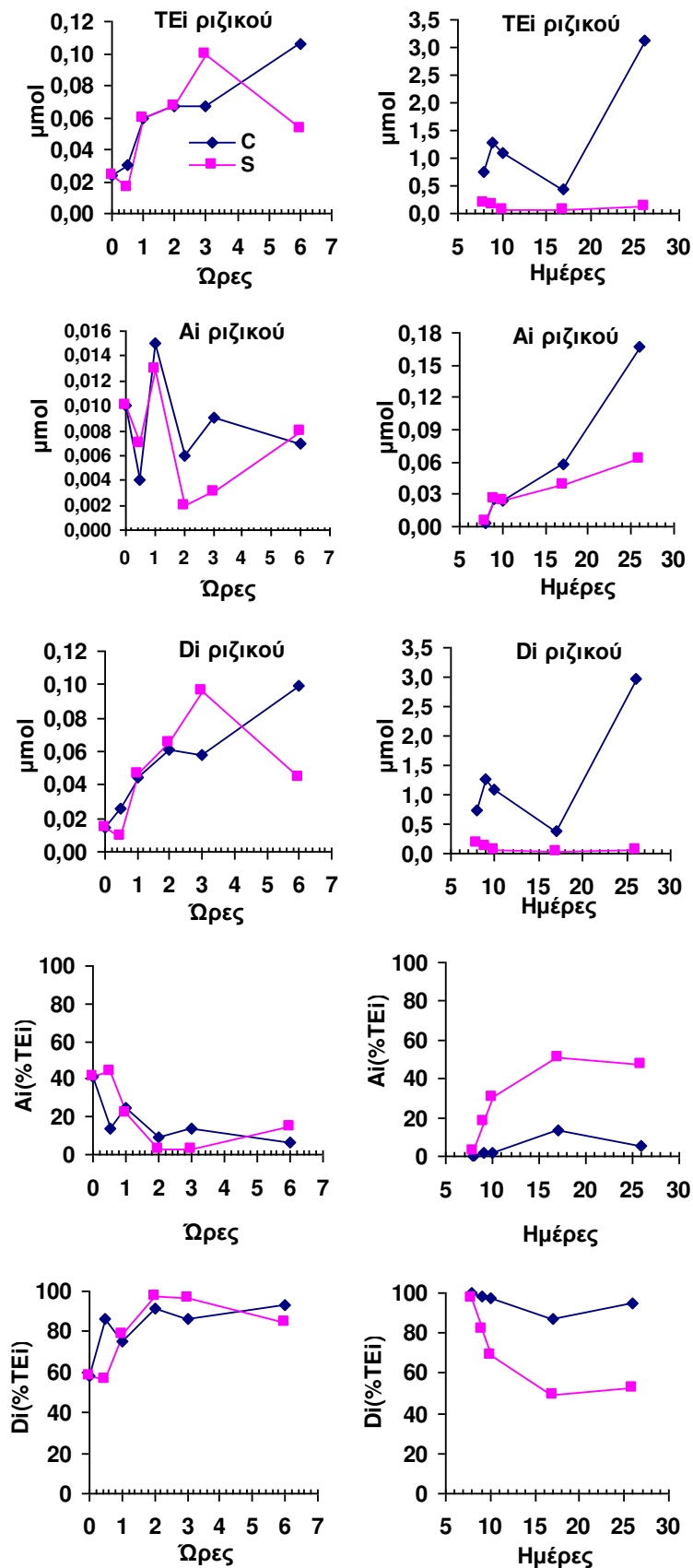
Εικόνα 4.13

Η συγκέντρωση του αποπλασμικού εκχυλίσματος σιδήρου της πρωτογενούς ρίζας (α, β), των δευτερογενών ριζών (γ, δ), της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών (ε), της 2^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών (στ) και των ριζών του μεσοκοτυλίου (ζ) την 7^η (0, 0.5, 1, 2, 3 και 6 ώρες μετά το διαχωρισμό), 8^η, 9^η, 10^η, 17^η και 26^η ημέρα από τη σπορά.



Εικόνα 4.14

Η συγκέντρωση των αποθέσεων σιδήρου της πρωτογενούς ρίζας (α, β), των δευτερογενών ριζών (γ, δ), της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών (ε), της 2^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών (στ) και των ριζών του μεσοκοτυλίου (ζ) την 7^η (0, 0.5, 1, 2, 3 και 6 ώρες μετά το διαχωρισμό), 8^η, 9^η, 10^η, 17^η και 26^η ημέρα από τη σπορά.



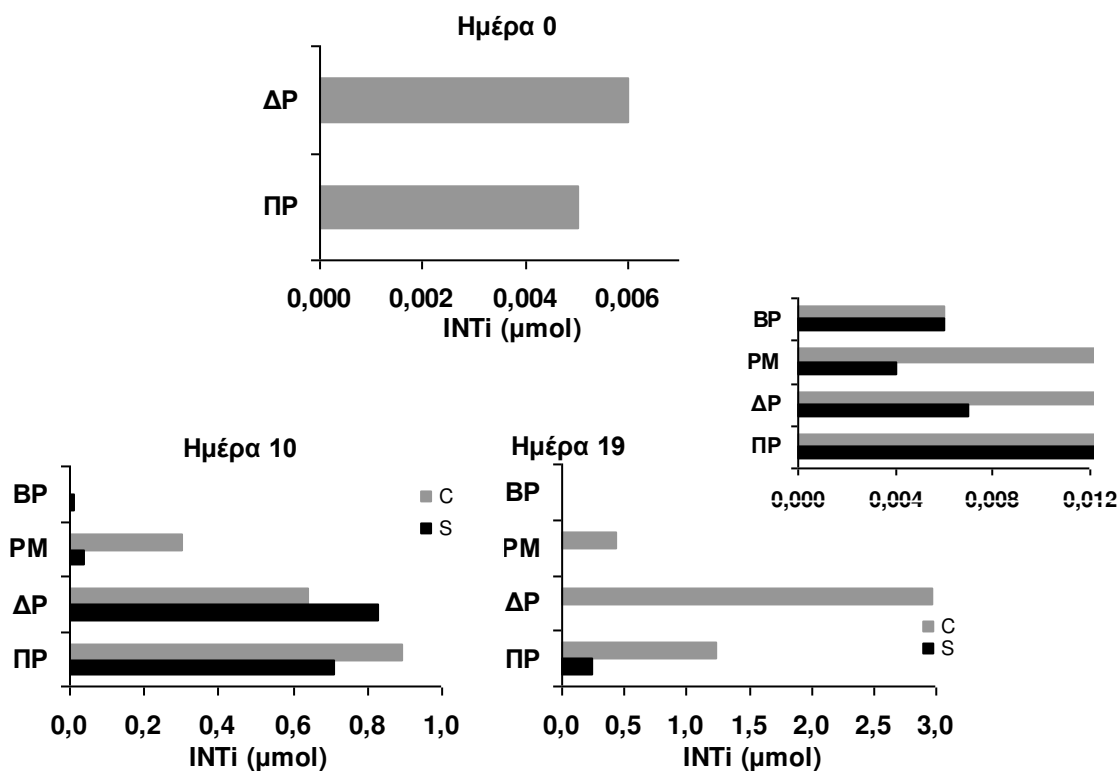
Εικόνα 4.15

Η ποσότητα του συνολικού εκχυλίσμου σιδήρου (TEi), αποπλασμικού εκχυλίσμου σιδήρου (Ai), των αποθέσεων σιδήρου (Di) του ριζικού και τα ποσοστά συμμετοχής του αποπλασμικού εκχυλίσμου και αποθέσεων σιδήρου ως προς τον συνολικό εκχυλίσμο σιδήρου σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, μπλε γραμμή) και φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θειικών (-S, κόκκινη γραμμή) την 7^η (0, 0.5, 1, 2, 3 και 6 ώρες μετά το διαχωρισμό), 8^η, 9^η, 10^η, 17^η και 26^η ημέρα από τη σπορά.

Ημέρες	Ώρες	ΠΡ	ΔΡ	ΒΡ1	ΒΡ2	ΡΜ	ΒΡ3	ΠΡ	ΔΡ	ΒΡ1	ΒΡ2	ΡΜ	ΒΡ3
		%ΤΕi						%Αi					
C	0	42	58					50	50				
	0,5	30	70					25	75				
	1	32	68					33	67				
	2	39	61					33	67				
	3	48	52					33	67				
	6	40	60					29	71				
	8		40	57	3			33	67	0			
	9		48	50	3			19	60	21			
	10		42	54	4			37	57	6			
	17		35	37	15	4	8	16	42	20	14	9	
26		44	29	16	8	2	1	13	36	23	16	10	3
S	0,5	25	75					0	100				
	1	38	62					31	69				
	2	45	55					0	100				
	3	40	60					33	67				
	6	45	55					0	100				
	8		45	49	6			20	79	1			
	9		39	52	9			23	62	15			
	10		41	47	12			21	64	15			
	17		28	40	13	12	7	16	42	13	13	16	
26		28	40	17	6	8	18	24	34	16	8		

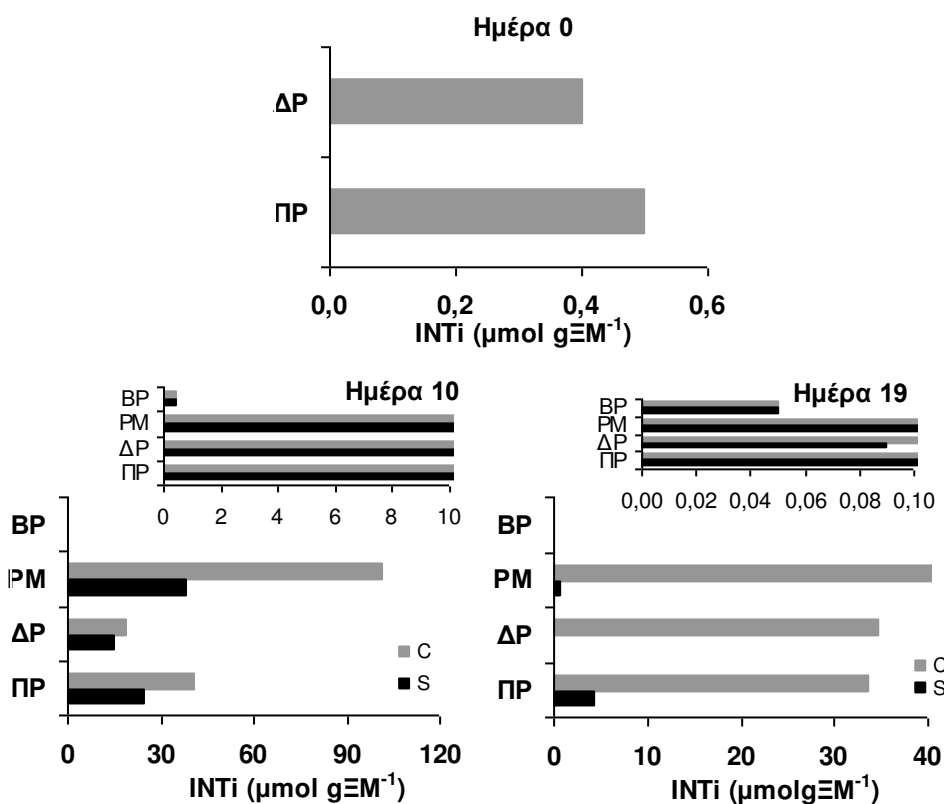
Εικόνα 4.16

Ποσοστιαία συνεισφορά του κάθε τύπου ρίζας στο συνολικό εκχυλίσμο σίδηρο (ΤΕi) και στον αποπλασμικό εκχυλίσμο σίδηρο (Αi) του ριζικού σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) και σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θειικών (-S) την 7^η (0, 0.5, 1, 2, 3 και 6 ώρες μετά το διαχωρισμό), 8^η, 9^η, 10^η, 17^η και 26^η ημέρα από τη σπορά.



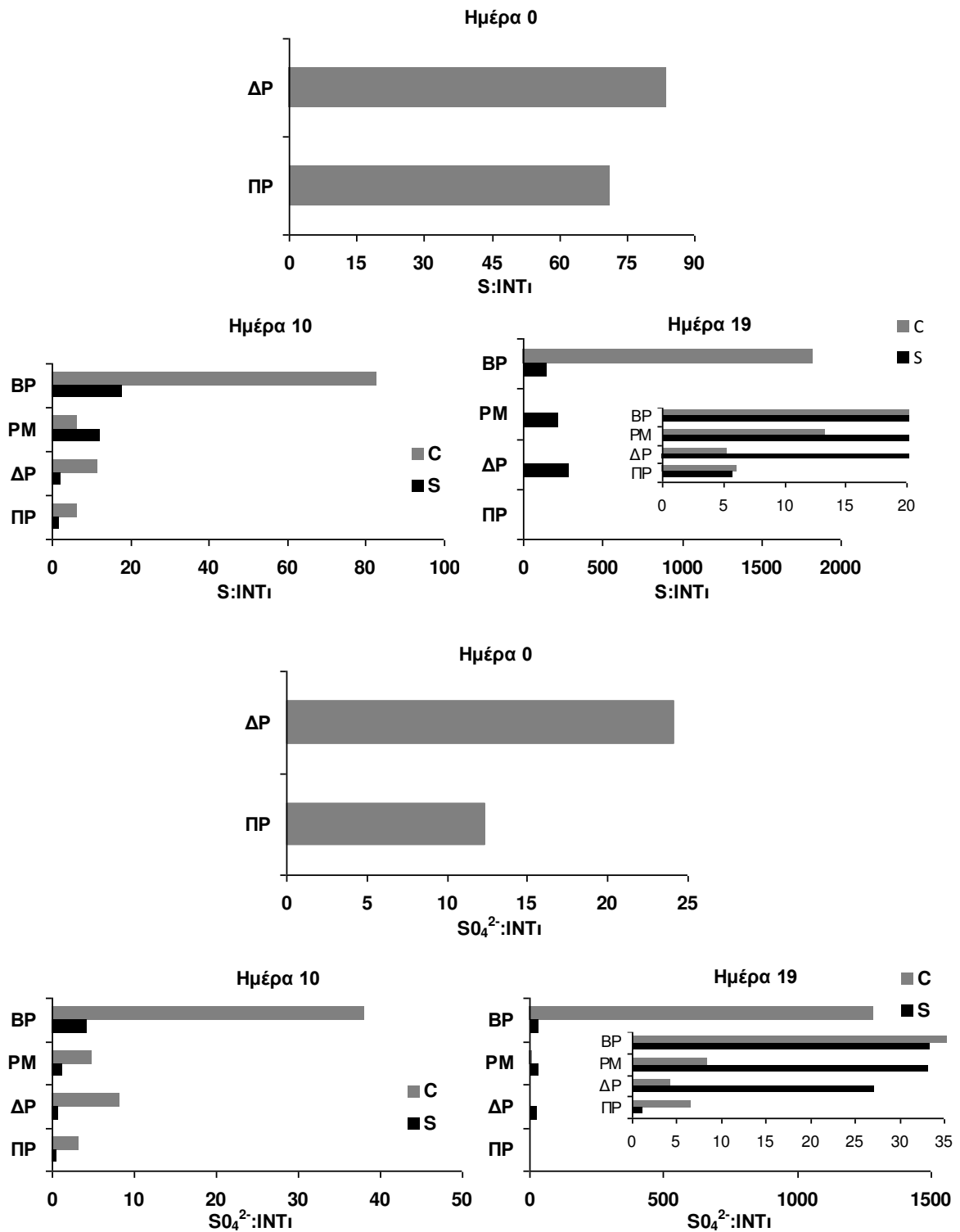
Εικόνα 4.17

Η ποσότητα του εσωτερικού σιδήρου (INTi) της πρωτογενούς ρίζας (ΠΡ), των δευτερογενών ριζών (ΔΡ), των βλαστογενών ριζών (ΒΡ) και των ριζών του μεσοκοτυλίου (ΡΜ) σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θεικών (-S) την ημέρα 0, 10^η, και 19^η της μεταχείρισης.



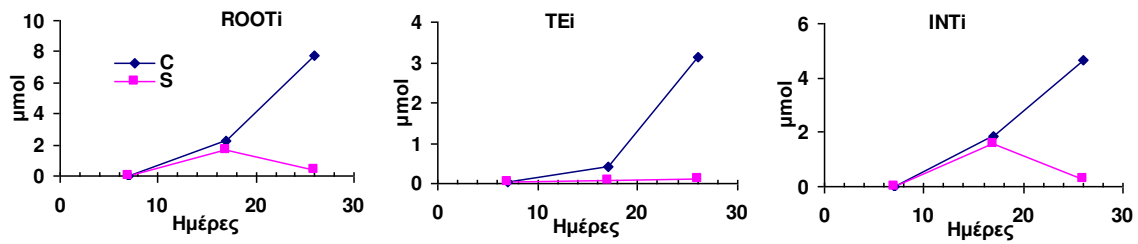
Εικόνα 4.18

Η συγκέντρωση του εσωτερικού σιδήρου (INTi) της πρωτογενούς ρίζας (ΠΡ), των δευτερογενών ριζών (ΔΡ), των βλαστογενών ριζών (ΒΡ) και των ριζών του μεσοκοτυλίου (ΡΜ) σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θεικών (-S) την ημέρα 0, 10^η, και 19^η της μεταχείρισης.



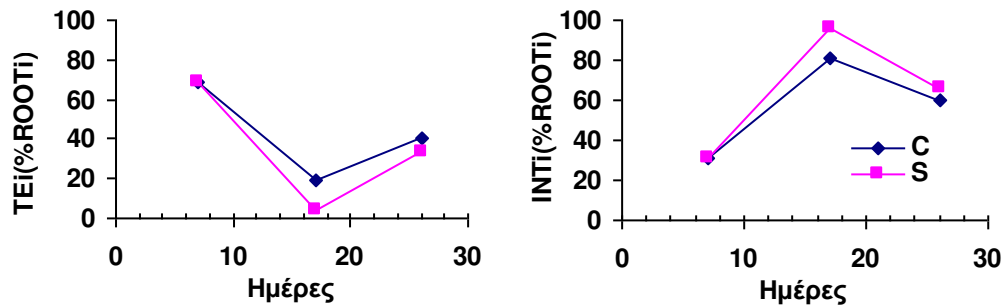
Εικόνα 4.19

Οι λόγοι $S:INT_i$ και $SO_4^{2-}:INT_i$ στη πρωτογενή ρίζα (ΠΡ), στις δευτερογενείς ρίζες (ΔΡ), στις ρίζες μεσοκοτυλίου (PM) και στις βλαστογενείς ρίζες (BP) των φυτών αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλη) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θεικών (-S, μαύρη στήλη).



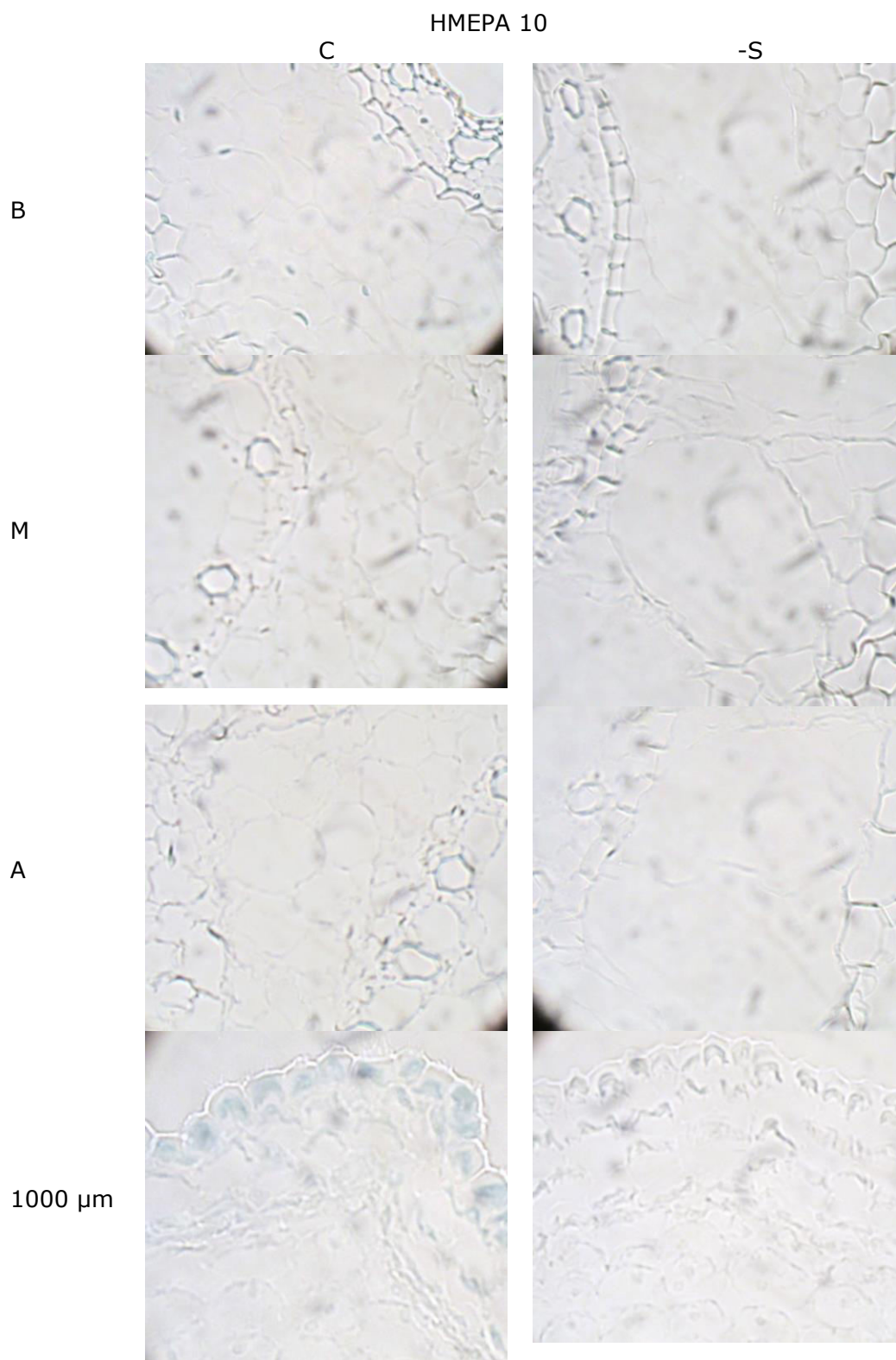
Εικόνα 4.20

Η ποσότητα του ολικού σιδήρου (ROOTi), του συνολικού εκχυλίσμου σιδήρου (TEi) και εσωτερικού σιδήρου (INTi) του ριζικού σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, μπλε γραμμή) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (-S, κόκκινη γραμμή) την ημέρα 0, 10^η και 19^η της μεταχείρισης.



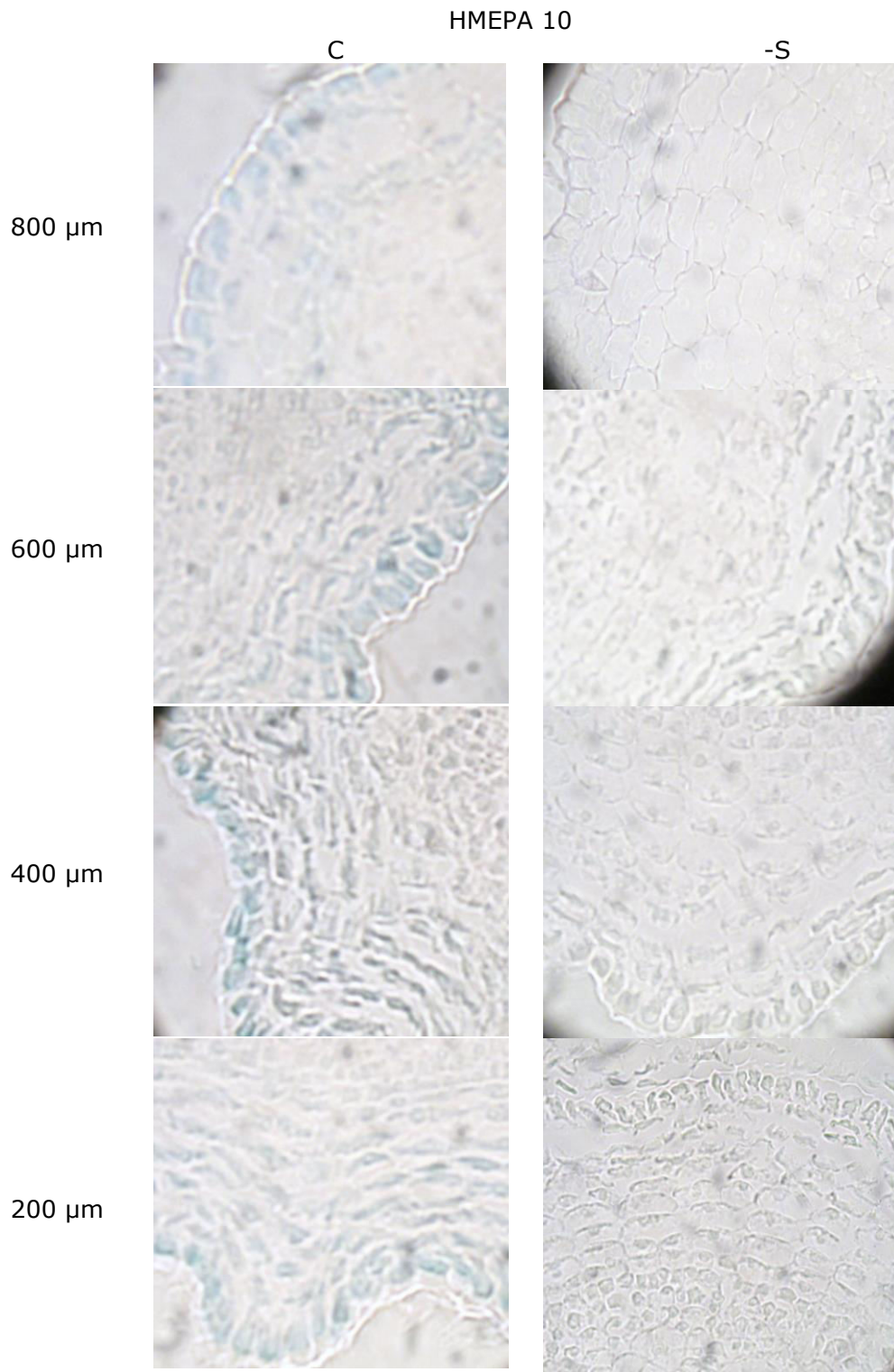
Εικόνα 4.21

Το ποσοστό συμμετοχής του συνολικού εκχυλίσμου σιδήρου (TEi) και εσωτερικού σιδήρου (INTi) ως προς τον ολικό σίδηρο του ριζικού των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, μπλε γραμμή) έναντι των φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θειικών (-S, κόκκινη γραμμή) την ημέρα 0, 10^η και 19^η της μεταχείρισης.



Εικόνα 4.22

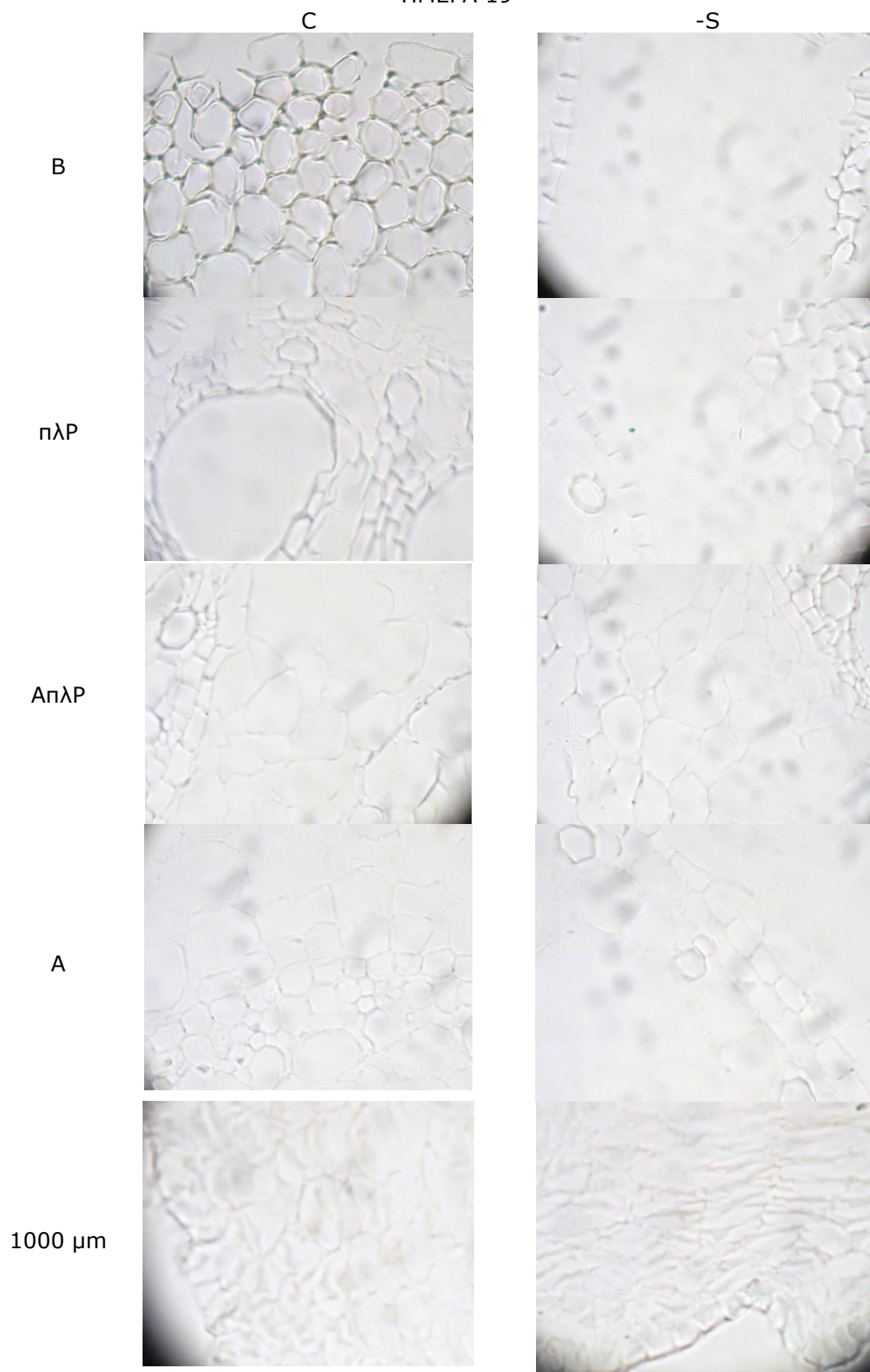
Παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο τομών 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών στα τμήματα της βάσης (B), της μέσης (M), του άκρου (A) και της περιοχής των 1000 μm του ακρορριζίου σε Control και -S φυτά την 10^η ημέρα της μεταχείρισης μετά από χρώση με Prussian blue. Οι περιοχές που ανιχνεύεται σίδηρος βάφονται μπλε.



Εικόνα 4.23

Παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο τομών 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών στη περιοχή των 800 μm , 600 μm , 400 μm και 200 μm του ακρορριζίου σε Control και -S φυτά την 10^η ημέρα της μεταχείρισης μετά από χρώση με Prussian blue. Οι περιοχές που ανιχνεύεται σίδηρος βάφονται μπλε.

ΗΜΕΡΑ 19



Εικόνα 4.24

Παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο τομών 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών στα τμήματα της Β, πλΡ, ΑπλΡ, Α και στη περιοχή των 1000 μm του ακρορριζίου σε Control και -S φυτά την 19^η ημέρα της μεταχείρισης μετά από χρώση με Prussian blue. Οι περιοχές που ανιχνεύεται σίδηρος βάφονται μπλε.

Η συγκέντρωση των αποθέσεων Fe αυξήθηκε και στους δύο τύπους ριζών και διαφοροποιήθηκε από των φυτών-μαρτύρων έχοντας μεγαλύτερη συγκέντρωση κυρίως την 3^η ώρα κατά 29% (ΠΡ) και 116% (ΔΡ) και μικρότερη την 0.5 και 6^η ώρα κατά 42% (ΠΡ) και 70% (ΔΡ) (Εικόνα 4.14). Η αναλογία $SO_4^{2-}:INTi$ στη ΠΡ ήταν 12:1 και στις ΔΡ 24:1, ενώ η αναλογία $S_{tot}:INTi$ στη ΠΡ ήταν 71:1 και στις ΔΡ 84:1 (Εικόνα 4.19).

Ημέρα 1 - Η συγκέντρωση Fe του θρεπτικού διαλύματος αυξήθηκε κατά 6,7% ($3,38 \mu g mL^{-1}$) (Εικόνα 4.3). Το pH του θρεπτικού διαλύματος μειώθηκε κατά 4% από του πλήρους θρεπτικού διαλύματος (Εικόνα 4.4). Από αυτή την ημέρα βάφονται εντονότερα, με τη χρωστική Prussian blue, τα τμήματα πΛΡ και ΑπΛΡ της ΠΡ και το τμήμα ΑπΛΡ των ΔΡ συγκριτικά τόσο με την προηγούμενη ημέρα της ίδιας μεταχείρισης όσο και με των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.5). Η ξηρή μάζα των αποθέσεων της ΠΡ μειώθηκε κατά 0,6 mg, ενώ των ΔΡ αυξήθηκε κατά 3,2 mg αλλά και για τους δύο τύπους ριζών ήταν μεγαλύτερη κατά 106% (ΠΡ) και 267% (ΔΡ) από των φυτών-μαρτύρων. Η ξηρή μάζα αποθέσεων της ΒΡ1 ήταν μικρότερη κατά 46% από των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.7). Όπως και στα φυτά υπό συνθήκες πλήρους θρέψης το pH στην επιφάνεια όλων των τύπων ριζών δεν παρουσίασε μεταβολή (Εικόνα 4.10). Η συγκέντρωση τόσο του συνολικού εκχυλίσμου Fe όσο και των αποθέσεων Fe στη ΠΡ και στις ΔΡ ήταν μικρότερη κατά 77% (ΠΡ) και 84% (ΔΡ) από των φυτών-μαρτύρων. Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ΒΡ1 ήταν μικρότερες κατά 49% συγκριτικά με των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.12 και Εικόνα 4.14). Η συγκέντρωση του αποπλασμικού εκχυλίσμου Fe της ΠΡ δεν διαφοροποιήθηκε, ενώ των ΔΡ ήταν μεγαλύτερη κατά 100% από των φυτών-μαρτύρων. Η συγκέντρωση του αποπλασμικού εκχυλίσμου Fe των ΒΡ1 ήταν επίσης μεγαλύτερη κατά 100% από των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.13).

Ημέρα 2 - Η συγκέντρωση Fe μειώθηκε κατά 5,4% και το pH του θρεπτικού διαλύματος αυξήθηκε κατά 2,5% από του πλήρους θρεπτικού διαλύματος (Εικόνα 4.3 και Εικόνα 4.4). Τα ίδια τμήματα της ΠΡ και των ΔΡ βάφονται λιγότερο έντονα με τη χρωστική Prussian blue, σε σχέση με την 8^η ημέρα μέσα στην ίδια μεταχείριση αλλά εντονότερα όταν συγκριθούν με των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.5). Η ξηρή μάζα των αποθέσεων σε όλους τους τύπους ριζών μειώθηκε (ΠΡ: κατά 0,9 mg, ΔΡ: κατά 2,5 mg, ΒΡ1: κατά 0,3 mg). Η ξηρή μάζα αποθέσεων της ΠΡ και των ΒΡ1 ήταν μικρότερη κατά 61% και 87% και των ΔΡ μεγαλύτερη κατά 346% από την αντίστοιχη των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.7). Το pH στην επιφάνεια του τμήματος πΛΡ της ΠΡ και των ΔΡ αυξήθηκε ($pH > 6$) χωρίς να παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων (Εικόνα 4.10). Η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου Fe μειώθηκε σε κάθε τύπο ρίζας: στην ΠΡ κατά 90%, στις ΔΡ κατά 88% και στις ΒΡ1 κατά 38% από των φυτών μαρτύρων (Εικόνα 4.12). Ομοίως, η συγκέντρωση των αποθέσεων Fe μειώθηκε σε κάθε τύπο ρίζας: στην ΠΡ κατά 90%, στις ΔΡ κατά 90% και στις ΒΡ1 κατά 48% από των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.14). Η συγκέντρωση του αποπλασμικού εκχυλίσμου Fe δεν διαφοροποιήθηκε στην ΠΡ, αυξήθηκε κατά 17% στις ΔΡ και μειώθηκε κατά 49% στις ΒΡ1 σε σχέση με των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.13).

Ημέρα 3 - Η συγκέντρωση Fe του θρεπτικού διαλύματος διατηρήθηκε σχεδόν σταθερή και το pH αυξήθηκε κατά 13,5% από του πλήρους θρεπτικού διαλύματος (Εικόνα 4.3 και Εικόνα 4.4). Με τη χρωστική Prussian blue, το τμήμα πΛΡ της ΠΡ και των ΔΡ βάφονται εντονότερα σε σχέση τόσο με την 9^η ημέρα της ίδιας μεταχείρισης όσο και με την αντίστοιχη ημέρα των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.5). Η ξηρή μάζα των αποθέσεων σε όλους τους τύπους ριζών αυξήθηκε (ΠΡ: κατά 0,5 mg, ΔΡ: κατά 3 mg, ΒΡ1: κατά 1,2 mg) και σε σχέση με τα φυτά υπό πλήρους θρέψης η ξηρή μάζα των αποθέσεων της ΠΡ ήταν μικρότερη κατά 43% ενώ των ΒΡ1 ήταν μεγαλύτερη κατά 31% (Εικόνα 4.7). Η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου Fe μειώθηκε σε κάθε τύπο ρίζας: στην ΠΡ κατά 93%, στις ΔΡ κατά

95% και στις BP1 κατά 83% από των φυτών μαρτύρων (Εικόνα 4.12). Ομοίως, η συγκέντρωση των αποθέσεων Fe μειώθηκε σε κάθε τύπο ρίζας: στην ΠΡ κατά 94%, στις ΔΡ κατά 97% και στις BP1 κατά 89% από των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.14). Συγκρίνοντας με τα φυτά πλήρους θρέψης η συγκέντρωση του αποπλασμικού εκχυλίσμου Fe της ΠΡ ήταν μικρότερη κατά 57%, ενώ των ΔΡ και των BP1 ήταν μεγαλύτερη κατά 20% και 118% αντίστοιχα (Εικόνα 4.13).

Ημέρα 10 - Η συγκέντρωση Fe του θρεπτικού διαλύματος αυξήθηκε κατά 2,9% και το pH του θρεπτικού διαλύματος αυξήθηκε κατά 6,6% από του πλήρους θρεπτικού διαλύματος (Εικόνα 4.3 και Εικόνα 4.4). Το τμήμα πΛΡ της ΠΡ βάφεται εντονότερα σε σχέση με των φυτών-μαρτύρων με τη χρωστική Prussian blue, ενώ δεν διαφοροποιείται η ένταση χρώσης στους υπόλοιπους τύπους ριζών από των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.5). Η ξηρή μάζα αποθέσεων της ΠΡ και των BP1 αυξήθηκε κατά 3,9 mg και 1,8 mg αντίστοιχα, ενώ των ΔΡ μειώθηκε κατά 3,5 mg. Η ξηρή μάζα αποθέσεων της ΠΡ ήταν μεγαλύτερη κατά 180%, ενώ των ΔΡ, της BP2 και PM ήταν μικρότερη κατά 61%, 59% και 100% αντίστοιχα σε σχέση με των φυτών μαρτύρων (Εικόνα 4.7). Το pH αυξήθηκε στην επιφάνεια των τμημάτων της Β και των πΛΡ της ΠΡ και μόνο στο τμήμα ΑπΛΡ των ΔΡ (Εικόνα 4.10). Συγκρίνοντας με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα, η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου Fe μειώθηκε στην ΠΡ κατά 91%, στις ΔΡ κατά 87%, στις BP1 κατά 89% και στις PM κατά 84% ενώ αυξήθηκε στις BP2 κατά 26% (Εικόνα 4.12). Η συγκέντρωση των αποθέσεων Fe μειώθηκε σε κάθε τύπο ρίζας: στην ΠΡ και στις ΔΡ κατά 94%, στις BP1 κατά 93%, στις BP2 κατά 11% και στις PM κατά 100% (Εικόνα 4.14). Η συγκέντρωση του αποπλασμικού εκχυλίσμου Fe μειώθηκε στην ΠΡ κατά 44%, στις ΔΡ κατά 57% και στις BP1 κατά 70%, δεν διαφοροποιήθηκε στις BP2, ενώ αυξήθηκε στις PM κατά 189% σε σχέση με των φυτών μαρτύρων (Εικόνα 4.13). Σε εγκάρσιες τομές των BP1 φαίνεται να βάφονται λιγότερο έντονα η υποδερμίδα, η ενδοδερμίδα και τα πρωτοξυλικά αγγεία στη βάση, μέση και άκρο της ρίζας, ενώ δεν ανιχνεύτηκε Fe σε περιοχές του ακρορριζίου (Εικόνα 4.22 και Εικόνα 4.23). Η ποσότητα του εσωτερικού σιδήρου αυξήθηκε στις ΔΡ και στις BP1 κατά 29%, ενώ μειώθηκε στην ΠΡ κατά 20% και στις PM κατά 88% σε σχέση με των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.17). Η συγκέντρωση του εσωτερικού σιδήρου μειώθηκε στην ΠΡ κατά 40%, στις ΔΡ κατά 20% και στις PM κατά 62%, ενώ δεν διαφοροποιήθηκε στις BP σε σχέση με των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.18). Η αναλογία $SO_4^{2-}:INTi$ ήταν 0,6:1 στη ΠΡ, 0,7:1 στις ΔΡ, 1,2:1 στις PM και 4:1 στις BP. Σε όλους τους τύπους ριζών ο λόγος $SO_4^{2-}:INTi$ ήταν σημαντικά μικρότερος από τον αντίστοιχο των φυτών-μαρτύρων. Ο λόγος $S:INTi$ ήταν στη ΠΡ 1,8:1, στις ΔΡ 2,2:1, στις PM 12,4:1 και στις BP 17,8:1. Ο λόγος $S:INTi$ στην ΠΡ, στις ΔΡ και στις BP είναι σημαντικά μικρότερος, ενώ στις PM είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.19).

Ημέρα 19 - Η συγκέντρωση Fe του θρεπτικού διαλύματος αυξήθηκε κατά 3,8% και το pH του θρεπτικού διαλύματος αυξήθηκε κατά 1,2% από του πλήρους θρεπτικού διαλύματος (Εικόνα 4.3 και Εικόνα 4.4). Τα τμήματα των πΛΡ και των ΑπΛΡ της ΠΡ, των ΔΡ, των BP1 και των BP2 βάφονται εντονότερα με τη χρωστική Prussian blue, από των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα και μόνο το τμήμα της Β των PM εμφάνισε μικρότερης έντασης χρώση (Εικόνα 4.5). Η ξηρή μάζα των αποθέσεων της ΠΡ και των BP1 μειώθηκε κατά 5,6 mg και 2,2 mg αντίστοιχα, ενώ των ΔΡ και των PM αυξήθηκε κατά 24,5 mg και 1 mg αντίστοιχα. Σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες η ξηρή μάζα των αποθέσεων μόνο της ΠΡ ήταν μικρότερη κατά 91% και στους άλλους τύπους ριζών μεγαλύτερη (Εικόνα 4.7). Αύξηση παρατηρήθηκε στο pH της επιφάνειας της ρίζας στα τμήματα της Β και των πΛΡ της ΠΡ και των ΔΡ (Εικόνα 4.10). Η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου Fe μειώθηκε σε κάθε τύπο ρίζας: στην ΠΡ κατά 98%, στις ΔΡ κατά 95%, στις BP1 κατά 89%, στις BP2 κατά 94% και στις PM κατά 84% από την αντίστοιχη των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.12). Η συγκέντρωση του αποπλασμικού εκχυλίσμου

Fe μειώθηκε σε κάθε τύπο ρίζας: στην ΠΡ κατά 64%, στις ΔΡ κατά 71%, στις ΒΡ1 κατά 50%, στις ΒΡ2 κατά 67% και στις ΡΜ κατά 87% σε σχέση με των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.13). Η συγκέντρωση των αποθέσεων Fe μειώθηκε σε κάθε τύπο ρίζας: στην ΠΡ, στις ΒΡ1 και στις ΒΡ2 κατά 99%, στις ΔΡ κατά 97% και στις ΡΜ κατά 87% από των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.14).

Όσον αφορά την παρουσία Fe σε εγκάρσιες τομές των ΒΡ1 δεν παρατηρήθηκαν ουσιαστικές διαφορές από των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (Εικόνα 4.24).

Η ποσότητα του εσωτερικού σιδήρου μειώθηκε στην ΠΡ κατά 80%, στις ΔΡ και στις ΡΜ κατά 99%, ενώ δεν διαφοροποιήθηκε στις ΒΡ από των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.17). Ομοίως και η συγκέντρωση του εσωτερικού σιδήρου μειώθηκε στην ΠΡ κατά 87%, στις ΔΡ και στις ΡΜ κατά 99,5% και δεν διαφοροποιήθηκε στις ΒΡ από των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.18).

Ο λόγος $SO_4^{2-}:INTi$ ήταν στη ΠΡ 1,2:1, στις ΔΡ 27:1, στις ΡΜ και στις ΒΡ 33:1. Ο λόγος $SO_4^{2-}:INTi$ ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στις ΔΡ και στις ΡΜ ενώ μικρότερος στην ΠΡ και στις ΒΡ σε σχέση με αυτόν των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.19). Ο λόγος S:INTi ήταν στη ΠΡ 6:1, στις ΔΡ 288,6:1, στις ΡΜ 220:1 και στις ΒΡ 150:1. Ο λόγος S:INTi στα φυτά -S ήταν μεγαλύτερος στις ΔΡ και στις ΡΜ ενώ ήταν μικρότερος στις ΒΡ από αυτόν των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.19).

4.4 Συζήτηση

Από την μελέτη της παρουσίας σιδήρου στην εξωτερική επιφάνεια κάθε τύπου ρίζας διαπιστώνεται ότι: 1) Οι αποθέσεις σιδήρου στην επιφάνεια της πρωτογενούς ρίζας, των δευτερογενών ριζών, της 1^{ης} και 2^{ης} σειράς βλαστογενών ριζών, εμφανίζονται κυρίως στις ώριμες περιοχές (πΛΡ, ΑπΛΡ) γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται με την χρώση Perls, τόσο στην παρούσα εργασία όσο και σε άλλες μελέτες (Clarkson and Sanderson 1978, Chen et al. 1980). 2) Δεν παρατηρήθηκε χρώση στο άκρο της ρίζας σε όλους τους τύπους ριζών που μελετήθηκαν, υποδηλώνοντας ότι το επίπεδο σιδήρου στη περιοχή αυτή αν υπάρχει είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης με την χρώση Perls. Είναι ήδη γνωστό ότι οι ακραίες ζώνες της ρίζας είναι οι κύριες θέσεις τόσο της απελευθέρωσης των φυτοσιδηροφόρων (PSs) όσο και της πρόσληψης του συμπλόκου Fe-PS από την ρίζα (Roemheld and Marschner 1986, Marschner et al. 1987, 1989). Αυτό εξηγεί και την απουσία του σιδήρου από το άκρο της ρίζας. 3) Αυτή η ιστοχημική ανάλυση του σιδήρου στους παραπάνω τύπους ριζών του αραβοσίτου δείχνει μία χρονική και χωρική απόθεση του σιδήρου στην επιφάνειά τους.

Από τη μελέτη της ξηρής μάζας των αποθέσεων σε κάθε τύπο ρίζας, που υπολογίστηκε ως η ξηρή μάζα πριν και μετά από το χειρισμό με το διάλυμα DCB διαπιστώνεται ότι: Η ξηρή μάζα των αποθέσεων μεταβάλλεται σε κάθε τύπο ρίζας κατά την διάρκεια του πειράματος. Η ξηρή μάζα των αποθέσεων διαφοροποιείται από τον τύπο της ρίζας. Η ξηρή μάζα των αποθέσεων διαφοροποιείται επίσης λόγω της τροφοπενίας. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η ξηρή μάζα αποθέσεων της πρωτογενούς ρίζας στα φυτά -S ήταν λιγότερη από των φυτών-μαρτύρων εκτός από την μισή ώρα, 8^η και 17^η ημέρα. Στις δευτερογενείς ρίζες των φυτών -S ήταν λιγότερη εκτός από την 8^η, 9^η, 10^η και 26^η ημέρα. Στην 1^η ομάδα βλαστογενών ριζών η ξηρή μάζα των αποθέσεων των φυτών -S ήταν μεγαλύτερη μόνο την 10^η ημέρα και στις ρίζες του μεσοκοτυλίου την 26^η ημέρα.

Από τη μελέτη της μεταβολής του pH στην επιφάνεια κάθε τύπου ρίζας διαπιστώνεται ότι το pH αυξήθηκε στην επιφάνεια των τμημάτων της Β, των πΛΡ και των ΑπΛΡ της πρωτογενούς ρίζας, των δευτερογενών ριζών και στο τμήμα των πΛΡ της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών χωρίς να υπάρχει εμφανή διαφορά μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων. Οι υπόλοιποι τύποι ριζών δεν παρουσίασαν μεταβολή του pH κατά μήκος της επιφάνειάς τους.

Η προσπάθεια συσχέτισης του σιδήρου που επικάθεται στην εξωτερική επιφάνεια της ρίζας και της μεταβολής του pH έδωσε αξιόλογα αποτελέσματα. Έτσι, στα τμήματα της ρίζας που ανιχνεύεται σίδηρος με τη χρωστική Prussian blue, παρατηρήθηκε ότι το pH είναι μεγαλύτερο του 6 ενώ τα τμήματα που δεν βάζονται με την χρωστική και συνεπώς δεν ανιχνεύεται σίδηρος έχουν pH μικρότερο του 6. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία που αναφέρει ότι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα του σιδήρου σε εδάφη και συνεπώς την διαθεσιμότητα του από την ρίζα είναι το pH (Marschner et al. 1989). Η διαλυτότητα του Fe(III) στην ριζόσφαιρα αυξάνει με χαμηλό pH ενώ ο σίδηρος καθιζάνει ως οξειδία (Fe_3O_4 , Fe_2O_3) και υδροξειδία του Fe(III) σε υψηλό pH (Kosegarten and Koyro 2001). Στα πειράματα που διενεργήθηκαν στην παρούσα εργασία παρά το γεγονός ότι το pH των δύο θρεπτικών διαλυμάτων (πλήρες και ελλειμματικό σε θειικά) δεν ήταν μεγαλύτερο από 6 τις αντίστοιχες ώρες και ημέρες των δειγματοληψιών, καθώς επίσης τα θρεπτικά διαλύματα ήταν προστατευμένα από το φως και οι αλλαγές των διαλυμάτων γίνονταν κάθε τρεις ημέρες, το pH σε αυτά τα θρεπτικά διαλύματα βασιζόμενα στα νιτρικά, ως μοναδική πηγή αζώτου, μπορεί να αυξήθηκε για σύντομες περιόδους. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο αραβόσιτος αναπτύχθηκε σε θρεπτικό διάλυμα με Fe-EDTA ως πηγή Fe που εύκολα μπορεί να διασπαστεί από φωτοαναγωγή και να γίνει ασταθής ένωση σε pH μεγαλύτερο του 7, συμπεραίνεται ότι ο Fe ενδεχομένως απελευθερώθηκε από τη συνθετική χημική ένωση Fe-EDTA κατά την διάρκεια αυτών των σύντομων περιόδων και επικάθισε στην επιφάνεια της ρίζας με πιθανές μορφές οξειδίων, υδροξειδίων τρισθενούς σιδήρου και φωσφορικού σιδήρου. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η χημική ένωση Fe-EDTA δεν είναι σταθερή και όταν ο σίδηρος απελευθερώνεται καθιζάνει στον αποπλάστη της ρίζας με την μορφή ένυδρου οξειδίου του Fe(III) σε συνθήκες υψηλού pH. Επιπλέον τα NO_3^- ως μοναδική πηγή αζώτου οδηγούν σε απελευθέρωση OH^- από τις ρίζες, συσσώρευση οργανικών ανιόντων στο φυτό, αύξηση του pH του θρεπτικού διαλύματος και σε ένα υψηλό pH στον αποπλάστη της ρίζας (Kashirad et al. 1973, Mengel and Geurtzen 1988, von Wiren et al. 1994, Briat et al. 1995).

Από τη μελέτη της συγκέντρωσης του συνολικού, αποπλάσμιου και εσωτερικού σιδήρου σε συνδυασμό με τον ολικό σίδηρο σε κάθε τύπο ρίζας διαπιστώνεται ότι υπό πλήρη θρέψη: ο εξωτερικός Fe (αποθέσεις Fe) είναι περισσότερος από τον αποπλάσμιου σίδηρο σε κάθε τύπο ρίζας. Στην πρωτογενή ρίζα ο εσωτερικός Fe αποτελεί το 86% του ολικού σιδήρου της ρίζας την 17^η ημέρα και το 47% την 26^η ημέρα. Στις δευτερογενείς ρίζες αποτελεί το 80% και 77% τις αντίστοιχες ημέρες. Στις βλαστογενείς ρίζες ο εσωτερικός σίδηρος είναι πολύ λιγότερος αφού το ποσοστό επί του ολικού σιδήρου είναι 8% την 17^η ημέρα και 1% την 26^η ημέρα. Στις ρίζες του μεσοκοτυλίου φαίνεται ότι ο περισσότερος σίδηρος είναι εσωτερικός αφού αποτελεί το 89% την 17^η ημέρα και το 86% την 26^η ημέρα. Ο συνολικός εκχυλίσμος Fe της πρωτογενούς ρίζας αντιπροσωπεύει το 14% του ολικού Fe την 17^η ημέρα και το 53% την 26^η ημέρα. Στις δευτερογενείς ρίζες αντιπροσωπεύει το 20% και 23% του ολικού Fe την 17^η και 26^η ημέρα αντίστοιχα. Στις βλαστογενείς ρίζες ο συνολικός εκχυλίσμος Fe καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό του ολικού Fe (92% την 17^η ημέρα και 99% την 26^η ημέρα). Στις ρίζες μεσοκοτυλίου τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 11% και 14%.

Σε αντίστοιχες μελέτες με φυτά που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά διαλύματα (Bienfait et al. 1985, Longnecker and Welch 1990) έχει υποτεθεί ότι ο αποπλάστης της ρίζας εμπλουτίζεται σημαντικά με Fe. Επίσης, σε φυτά που αναπτύσσονται στο έδαφος ο αποπλάστης βρέθηκε να είναι ένα σημαντικό μέρος συγκέντρωσης Fe και μία πηγή κινητοποίησης Fe (Zhang et al. 1991). Ο Masalha (2000) έχει παρουσιάσει ότι περίπου το 50% του συσσωρευμένου Fe στις ρίζες αραβοσίτου που αναπτύχθηκε στο έδαφος απελευθερώθηκε μέσω χημικής αναγωγής με

dithionite. Σύμφωνα με τον Bienfait (1985), αυτός ο ανηγμένος σίδηρος (Fe^{2+}) ορίζεται ως αποπλασμικός σίδηρος της ρίζας. Ο Kosegarten (2001) θεωρεί ότι περίπου το 65% της συγκέντρωσης του Fe στις ρίζες αραβοσίτου απελευθερώθηκε με χημική αναγωγή. Άλλες μελέτες συμπεραίνουν ότι ο αποπλασμικός Fe έχει υπερεκτιμηθεί στις ρίζες των φυτών που αναπτύχθηκαν στο έδαφος λόγω των εναποθέσεων του Fe στην επιφάνεια της ρίζας και ο αποπλασμικός Fe αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 40% του ολικού Fe της ρίζας (Strasser et al. 1999). Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώνεται ότι ο σίδηρος που απελευθερώθηκε με χημική αναγωγή με dithionite από κάθε τύπο ρίζας (ο συνολικός εκχυλίσμος Fe) είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αποπλασμικό εκχυλίσμο Fe μετά την απομάκρυνση των αποθέσεων Fe από τη ρίζα με διάλυμα DCB.

Υπό συνθήκες έλλειψης θειικών ο εξωτερικός Fe είναι περισσότερος από τον αποπλασμικό εκχυλίσμο Fe στη πρωτογενή ρίζα. Ο εξωτερικός Fe στις δευτερογενείς ρίζες ήταν περισσότερος από τον αποπλασμικό εκχυλίσμο Fe εκτός την μισή ώρα και την 17^η ημέρα που ήταν λιγότερος. Παρόμοια ο εξωτερικός Fe στην 1^η ομάδα βλαστογενών ήταν περισσότερος από τον αποπλασμικό εκχυλίσμο Fe εκτός από την 26^η ημέρα και στην 2^η ομάδα βλαστογενών ριζών και ριζών μεσοκοτυλίου που ήταν λιγότερος την 17^η ημέρα. Η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου Fe της πρωτογενούς ρίζας ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτή των φυτών μαρτύρων εκτός από την 1^η, 2^η και 3^η ώρα. Η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου Fe των δευτερογενών ριζών ήταν μικρότερη από αυτή των φυτών-μαρτύρων εκτός από την 3^η ώρα. Στην 1^η ομάδα βλαστογενών ριζών και στις ρίζες του μεσοκοτυλίου ήταν μικρότερη από αυτή των φυτών-μαρτύρων. Στην 2^η ομάδα βλαστογενών ριζών ήταν μεγαλύτερη την 17^η ημέρα και μικρότερη την 26^η ημέρα. Η συγκέντρωση των αποθέσεων Fe παρουσιάζει το ίδιο πρότυπο μεταβολής με του συνολικού εκχυλίσμου σιδήρου και ήταν μικρότερη από των φυτών-μαρτύρων εκτός των περιπτώσεων που αναφέρονται και για το συνολικό εκχυλίσμο Fe.

Η συγκέντρωση του αποπλασμικού εκχυλίσμου Fe της πρωτογενούς ρίζας ήταν μικρότερη από αυτή των φυτών-μαρτύρων. Στις δευτερογενείς ρίζες η συγκέντρωση του αποπλασμικού εκχυλίσμου Fe ήταν μεγαλύτερη την μισή ώρα, 8^η, 9^η και 10^η ημέρα σε σχέση με αυτή των φυτών-μαρτύρων. Στην 1^η ομάδα βλαστογενών ριζών ήταν μεγαλύτερη μόνο την 10^η ημέρα και των ριζών του μεσοκοτυλίου την 17^η ημέρα σε σχέση με αυτή των φυτών-μαρτύρων. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι είτε ο συνολικός εκχυλίσμος Fe, είτε ο αποπλασμικός εκχυλίσμος Fe της ρίζας των φυτών -S είναι *κατά κανόνα* λιγότερος από των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα. Η έλλειψη S προκάλεσε δευτερογενή έλλειψη Fe σε όλους τους τύπους ριζών όπου επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία (Bouranis et al. 2003, Astolfi et al. 2003, 2006a, 2010). Στις περιπτώσεις που ο περιεχόμενος Fe είτε συνολικός είτε αποπλασμικός είτε εξωτερικός είναι περισσότερος στα φυτά -S σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες, πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι μία παροδική απόκριση στην καταπόνηση λόγω της έλλειψης. Επιπλέον, υψηλότερη συγκέντρωση Fe μπορεί να είναι το αποτέλεσμα του εφοδιασμού της συνθετικής χηλικής ένωσης Fe (Fe-EDTA) σε τεχνητά υψηλές συγκεντρώσεις μόλις τα φυτά αντιληφθούν την έλλειψη θειικών από το θρεπτικό διάλυμα. Ο εσωτερικός Fe στην πρωτογενή ρίζα αποτελεί το 97% του ολικού σιδήρου της ρίζας την 17^η ημέρα και το 86% την 26^η ημέρα. Στις δευτερογενείς ρίζες αποτελεί το 97% και 12% τις αντίστοιχες ημέρες. Στις βλαστογενείς ρίζες ο εσωτερικός σίδηρος αποτελεί το 32% την 17^η ημέρα και το 18% την 26^η ημέρα. Στις ρίζες του μεσοκοτυλίου ο εσωτερικός Fe αποτελεί το 88% την 17^η ημέρα και το 27% την 26^η ημέρα του ολικού Fe των ριζών αυτών. Ο συνολικός εκχυλίσμος Fe της πρωτογενούς ρίζας αντιπροσωπεύει το 3% του ολικού Fe την 17^η ημέρα και το 14% την 26^η ημέρα συνεπώς ο περισσότερος Fe είναι εσωτερικός Fe. Στις δευτερογενείς ρίζες αντιπροσωπεύει το 3% και 88% του ολικού Fe την 17^η και 26^η ημέρα αντίστοιχα συνεπώς την 17^η ημέρα ο περισσότερος Fe είναι εσωτερικός ενώ την 26^η ημέρα ο περισσότερος Fe είναι αποπλασμικός. Στις βλαστογενείς ρίζες ο συνολικός εκχυλίσμος Fe καταλαμβάνει

το 68% του ολικού Fe την 17^η ημέρα και το 82% του ολικού Fe την 26^η ημέρα. Στις ρίζες μεσοκοτυλίου τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 12% και 73%.

Η ιστοχημική ανάλυση σιδήρου εφαρμόστηκε και σε εγκάρσιες τομές σε όλα τα τμήματα της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών που αναπτύχθηκαν στα δύο διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα. Όπως διαπιστώνεται από τις εικόνες 4.22-4.24, κυρίως την 17^η ημέρα και λιγότερο την 26^η ημέρα στα φυτά -S τα επίπεδα σιδήρου στους ιστούς της ρίζας και σε όλα τα τμήματα της ρίζας που πραγματοποιήθηκαν τομές είναι αρκετά χαμηλά ώστε να εμφανίζεται λίγος μπλε χρωματισμός ή καθόλου χρωματισμός στους ιστούς με την χρωστική Perl's. Η έλλειψη S προκάλεσε έλλειψη Fe. Αυτό επιβεβαιώνεται τόσο από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όσον αφορά την συγκέντρωση Fe σε αυτόν τον τύπο της ρίζας που ήταν μικρότερη από των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα όσο και από την βιβλιογραφία (Bouranis et al. 2003, Astolfi et al. 2003, 2006a, 2010).

Συσχετίζοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου Perl's Prussian Blue στην επιφάνεια της ρίζας και σε εγκάρσιες τομές στην 1^η ομάδα βλαστογενών ριζών αποκαλύπτεται ότι υπό συνθήκες έλλειψης θειικών οι αποθέσεις σιδήρου στην επιφάνεια κάθε τύπου ρίζας ήταν περισσότερες και παράλληλα λιγότερος σίδηρος εντοπίστηκε στον αποπλαστικό χώρο της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών. Από την άλλη πλευρά η μέθοδος Bienfait αποκάλυψε ότι υπό συνθήκες έλλειψης θειικών οι αποθέσεις σιδήρου (Di) άλλοτε είναι περισσότερες (π.χ. πρωτογενή ρίζα) και άλλοτε λιγότερες από τον αποπλαστικό σίδηρο (Ai) (17^η ημέρα στις δευτερογενείς ρίζες, στην 2^η ομάδα βλαστογενών ριζών και στις ρίζες του μεσοκοτυλίου και την 26^η ημέρα στην 1^η και 2^η ομάδα βλαστογενών ριζών). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψη ότι με την πρώτη μέθοδο η χρωστική Prussian blue ανιχνεύει τη παρουσία σιδήρου αν υπάρχει χωρίς να μπορεί να προσδιορίζει ποσοτικά τον σίδηρο (Meguro et al. 2007) όπως κάνει η μέθοδος Bienfait.

4.5 Συμπεράσματα

Υπό συνθήκες έλλειψης θειικών η παρουσία του τρισθενή σιδήρου με την χρώση Perl's εντοπίζεται στην επιφάνεια των τμημάτων των πλΡ και των ΑπλΡ σε όλους τους τύπους της ρίζας. Η ένταση της χρώσης αυξάνει με την πάροδο του χρόνου. Η ένταση της χρώσης ήταν μεγαλύτερη σε όλους τους τύπους ριζών των φυτών -S σε σχέση με των φυτών-μαρτύρων. Το τμήμα του άκρου παρέμεινε άβαφο σε όλους τους τύπους της ρίζας. Η παρουσία του τρισθενή σιδήρου σε τομές σε όλα τα τμήματα της 1^{ης} ομάδας βλαστογενών ριζών των φυτών -S ήταν ασθενέστερη σε σύγκριση με των φυτών μαρτύρων. Το pH αυξάνει στην επιφάνεια των τμημάτων των πλΡ και των ΑπλΡ της πρωτογενούς ρίζας και δευτερογενών ριζών (pH>6). Η ξηρή μάζα των αποθέσεων μεταβάλλεται σε κάθε τύπο ρίζας κατά την διάρκεια του πειράματος και διαφοροποιείται τόσο από τον τύπο της ρίζας όσο και από την έλλειψη θειικών. Η έλλειψη θείου επηρέασε αρνητικά την συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου σιδήρου σε όλους τους τύπους ριζών. Η έλλειψη θείου επηρέασε αρνητικά την συγκέντρωση των αποθέσεων σιδήρου σε όλους τους τύπους ριζών. Η συγκέντρωση του αποπλαστικού εκχυλίσμου σιδήρου διαφοροποιήθηκε μεταξύ των τύπων ριζών. Η συγκέντρωση του αποπλαστικού εκχυλίσμου σιδήρου της πρωτογενούς ρίζας ήταν μικρότερη από των φυτών-μαρτύρων όλες τις ημέρες δειγματοληψιών. Στις δευτερογενείς ρίζες η συγκέντρωση του αποπλαστικού εκχυλίσμου σιδήρου ήταν μεγαλύτερη 0.5 ώρα μετά τη τοποθέτηση των φυτών σε ελλειμματικό σε θειικά θρεπτικό διάλυμα και την 8^η, 9^η και 10^η ημέρα. Στην 1^η ομάδα βλαστογενών ριζών ήταν μεγαλύτερη την 10^η ημέρα και στις ρίζες του μεσοκοτυλίου την 17^η ημέρα σε σχέση με των φυτών-μαρτύρων. Την 17^η ημέρα, ο εσωτερικός σίδηρος είναι περισσότερος από τον

συνολικό εκχυλίσιμο σίδηρο (αποθέσεις και αποπλασμικός σίδηρος) στην πρωτογενή ρίζα στις δευτερογενείς ρίζες και στις ρίζες του μεσοκοτυλίου και λιγότερος στις βλαστογενείς ρίζες. Την 26^η ημέρα, ο εσωτερικός σίδηρος είναι περισσότερος μόνο στην πρωτογενή ρίζα και λιγότερος στους άλλους τύπους ριζών.

Κεφάλαιο 5

**Η κινητική του σιδήρου
στο σύστημα σπόρου-μεσοκοτυλίου-βλαστού**

5.1 Εισαγωγή

5.1.1 Η αρχιτεκτονική του συστήματος σπόρος – μεσοκοτύλιο – βλαστός

5.1.1.1 Σπόρος

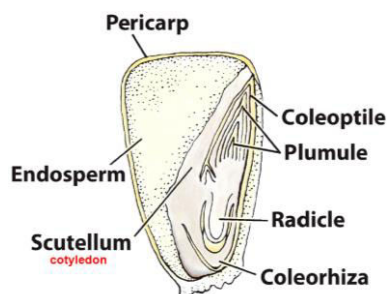
Ο καρπός του αραβόσιτου είναι καρύοψη, είναι δηλαδή είδος ξηρού καρπού, μονόσπερμου με πολύ λεπτό περικάρπιο που περιβάλλει στενά το σπόρο. Αποτελείται από τέσσερα τμήματα: το περικάρπιο, το ενδοσπέρμιο, το έμβρυο και τον ποδίσκο. Το περικάρπιο αποτελείται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνες και έχει ρόλο να προστατεύει το σπέρμα από εχθρούς, μολύνσεις και την είσοδο του νερού (Smith 2004). Μόλις χαλαρώσει το περικάρπιο, το νερό εισέρχεται στο σπέρμα και ξεκινά η βλάστηση. Το ενδοσπέρμιο προέρχεται από την συγχώνευση ενός από τους δύο σπερματικούς πυρήνες του γυρεόκοκκου με τους δύο πολικούς πυρήνες του εμβρυόσακκου, συνεπώς είναι τριπλοειδές. Αποτελείται από κύτταρα με λεπτά κυτταρικά τοιχώματα, τα οποία είναι γεμάτα με αμυλόκοκκους. Αποτελεί το 83% του καρπού και περιέχει υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και μικρές ποσότητες ανόργανων αλάτων και ελαίων. Χωρίζεται με βάση την υφή του σε υαλώδες και αλευρώδες ενδοσπέρμιο. Ο τρόπος που κατανέμονται τα δύο αυτά είδη στον καρπό επηρεάζει το σχήμα και την σκληρότητά του. Οι εξωτερικές στρώσεις κυττάρων του ενδοσπερμίου διαθέτουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα και συγκροτούν ένα διαφοροποιημένο ιστό που ονομάζεται αλευρώνη. Η αλευρώνη περιέχει μεγάλες πρωτεϊνικές δομές, τα πρωτεϊνικά σώματα, τα οποία περικλείονται σε μεμβράνες (Salisbury and Ross, 1991). Το ενδοσπέρμιο είναι η βασική πηγή ενέργειας και τροφοδοσίας του αρτίβλαστου, καθώς είναι εξοπλισμένο με όλα τα απαραίτητα υλικά για την διαδικασία της βλάστησης, μέχρι το νεαρό φυτό να γίνει αυτότροφο.

Το έμβρυο είναι μια μικρογραφία του φυτού και φέρει τις καταβολές των πρώτων οργάνων του. Είναι το αποτέλεσμα της ένωσης του δεύτερου σπερματικού πυρήνα του γυρεόκοκκου με το ωοκύτταρο. Αποτελείται από τον εμβρυακό άξονα και το ασπίδιο. Στον εμβρυακό άξονα διακρίνουμε το πτερίδιο, το μεσοκοτύλιο και το ριζίδιο. Το πτερίδιο φέρει το σημείο αύξησης και τις διαφοροποιημένες καταβολές των πρώτων πέντε φύλλων του φυτού. Καλύπτεται από το κολεόπτιλο, έναν προστατευτικό ιστό που λόγω του ατρακτοειδούς σχήματος βοηθάει στην ανάδυση του φυταρίου από το έδαφος. Το μεσοκοτύλιο είναι το όργανο που στηρίζει το φυτό και συνδέει το ριζικό με το υπέργειο μέρος. Επίσης φέρει τις καταβολές των δευτερογενών εμβρυακών ριζών και συμβάλει ουσιαστικά με την επιμήκυνση του στην ανάδυση του φυταρίου. Το ριζίδιο θα εξελιχθεί στην πρωτογενή εμβρυακή ρίζα και καλύπτεται από την κολεόρριζα, που έχει και αυτή προστατευτικό χαρακτήρα. Το ασπίδιο ή κοτύλη διαθέτει εξειδικευμένα κύτταρα που υδρολύουν το άμυλο του ενδοσπερμίου και μεταφέρουν τα προϊόντα στον εμβρυακό άξονα. Το έμβρυο στο σύνολό του έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε έλαια και πρωτεΐνες καθώς και το μεγαλύτερο ποσοστό των ανόργανων θρεπτικών του καρπού. Τέλος ο ποδίσκος είναι το όργανο με το οποίο στηρίζεται ο καρπός πάνω στον σπάδικα και μεταφέρει υλικά από το μητρικό φυτό κατά το γέμισμα του καρπού.

5.1.1.2 Μεσοκοτύλιο

Το μεσοκοτύλιο είναι μεσογονάτιο που βρίσκεται μεταξύ του σημείου πρόσφυσης του σπόρου (scutellar node) και του λαιμού του φυτού (coleoptilar node) και παίζει συνήθως το σπουδαιότερο ρόλο στην ανάδυση του φυταρίου (Εικόνα 5.2). Το μεσοκοτύλιο διανύει συνήθως τη μισή απόσταση από τον σπόρο μέχρι την επιφάνεια του εδάφους όταν ο σπόρος σπαρθεί σε βάθος 5-7.5 cm. Οι δυνατότητες επιμήκυνσης του μεσοκοτυλίου μπορούν να φθάσουν κατά μέσο όρο τα 12.5-15 cm με ένα ανώτατο όριο 20-30 cm σε μερικούς σπάνιους γονότυπους, αλλά εξαρτώνται και από τις εδαφικές συνθήκες σε σημαντικό βαθμό. Η επιμήκυνση αυτή του μεσοκοτυλίου επιτρέπει τη σπορά του αραβόσιτου σε βάθη μεγαλύτερα

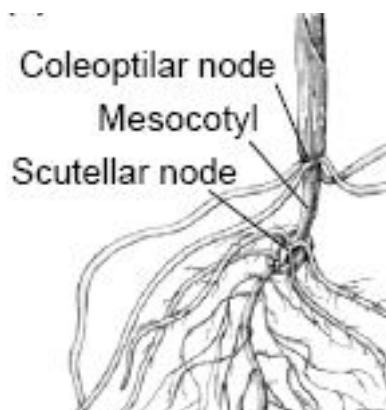
από τα άλλα σιτηρά, εάν παραστεί ανάγκη. Το επιμηκυνόμενο κολεόπτιλο διανύει την υπόλοιπη απόσταση μέχρι την επιφάνεια του εδάφους. Η μορφολογία και η υφή του υποβοηθά τη διείσδυσή του ανάμεσα στα εδαφικά στρώματα και την έξοδό του στην επιφάνεια.



Εικόνα 5.1

Σχηματική απεικόνιση επιμήκου τομής του σπόρου αραβοσίτου (www.hobart.k12.in.us)

Οι μεταβάσεις από το σκοτάδι στο φως επηρεάζουν δραματικά την αρχιτεκτονική των οργάνων και το ρυθμό ανάπτυξης κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του φυτού. Ειδικότερα, για ένα νεαρό σπορόφυτο που βρίσκεται κάτω από την επιφάνεια του εδάφους, πραγματοποιείται μία γρήγορη επέκταση της ανάπτυξης των οργάνων στο σκοτάδι για να φτάσουν στο φως. Ο ρόλος του μεσοκοτυλίου είναι η πραγματοποίηση αυτής της λειτουργίας στον αραβόσιτο και στα άλλα αγρωστώδη. Η ανάπτυξη του μεσοκοτυλίου διεγείρεται έντονα στο σκοτάδι, ενώ αναστέλλεται από το φως μόλις το κολεόπτιλο εμφανιστεί από την επιφάνεια του εδάφους. Αυτή η διαδικασία προκαλεί μία αύξηση της έντασης στον ιστό, η οποία περιορίζει την ανάπτυξη όλου του οργάνου, με μεγαλύτερη δύναμη εφελκισμού επί των εξωτερικών τοιχωμάτων των επιδερμικών κυττάρων (Masuda and Yamamoto 1972, Kutschera and Briggs 1987, Bret-Harte 1991, Kutschera 1992).



Εικόνα 5.2

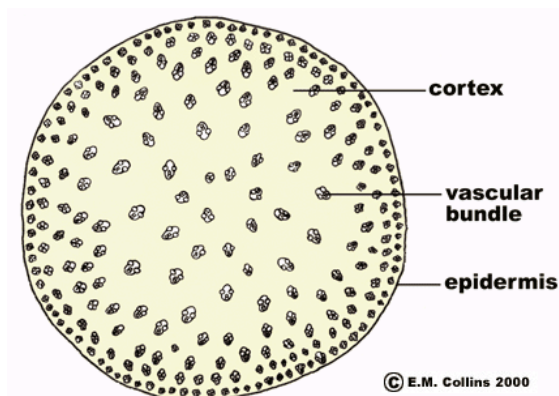
Μεσοκοτύλιο φυτού αραβοσίτου (Hochholdinger 2004).

5.1.1.3 Βλαστός

Ο βλαστός, που είναι μέρος του υπέργειου τμήματος, είναι κυλινδρικός με διατομή γύρω στα 3-4 cm με πλάγια επιμήκη αύλακα, κοίλος εσωτερικά και συμπαγής κατά τους κόμβους (γόνατα). Συνήθως φέρει 8-21 μεσογονάτια από τα οποία τα μεσογονάτια της βάσης είναι βραχύτερα από αυτά της κορυφής. Κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του φυτού ο βλαστός αποτελείται από το κορυφαίο μερίστωμα, το οποίο παίζει σπουδαίο ρόλο στη δημιουργία νέων οργάνων του υπέργειου, και τους κόμβους οι οποίοι διαφοροποιούνται με γρήγορο ρυθμό, αλλά τα μεσογονάτια διαστήματα δεν επιμηκύνονται πριν ολοκληρωθεί ο σχηματισμός

όλων των οργάνων του υπέργειου μέρους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο βλαστός να μένει βραχύς και να καλύπτεται από τους κολεούς των φύλλων. Καθώς όμως το φυτό αναπτύσσεται και ολοκληρωθεί πλέον η διαδικασία σχηματισμού των φύλλων τα κορυφαία μεριστώματα μεταπίπτει σε αναπαραγωγική καταβολή η οποία θα εξελιχθεί σε φόβη.

Όσον αφορά την ανατομία σε ένα νεαρό βλαστό μονοκότυλου παρατηρείται εξωτερικά η επιδερμίδα, η οποία φέρει συνήθως στόματα και κάτω από την επιδερμίδα υπάρχει συνήθως σκληροεχθυματικός δακτύλιος, δηλαδή, μια ζώνη στηρικτικού ιστού από σκληροεχθυματικά κύτταρα. Στο εσωτερικό αυτού του σκληροεχθυματικού δακτυλίου και μέχρι το κέντρο του βλαστού υπάρχει θεμελιώδες παρέγχυμα το οποίο διακρίνεται σε αφομοιωτικό ή χλωροφυλλούχο παρέγχυμα προς την εξωτερική πλευρά και σε αποταμιευτικό παρέγχυμα προς το εσωτερικό του βλαστού. Μέσα σ' αυτό το θεμελιώδες παρέγχυμα και μέχρι το κέντρο του βλαστού βρίσκονται οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες κατανεμημένες διάσπαρτα (ατακτοστήλη) σε όλη την έκταση του βλαστού. Οι αγγειακές δεσμίδες έχουν μία κλίση προς το κέντρο του βλαστού, αλλά κατά τακτά διαστήματα λυγίζουν απότομα προς το φύλλο. Καθώς λυγίζουν, διαιρούνται, το ένα μέρος εισέρχεται στο φύλλο και παρέχει ένα μέσο ακτινικής μεταφοράς και το άλλο τμήμα συνεχίζει στην περιφέρεια του βλαστού ως αξονική δέσμη. Καθώς οι γειτονικές δέσμες εκτείνονται μέσω του άξονα, διασυνδέονται με μεγάλες και μικρές γέφυρες δέσμης (Dickison 2000). Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των μονοκότυλων είναι κατά γενικό κανόνα κλειστές, δηλαδή, μεταξύ του ηθμού και του ξύλου δεν υπάρχουν μεριστωματικά κύτταρα (κάμβιο) (Esau 1965) (Εικόνα 5.3). Η δομή αυτή προσδίδει αντοχή στο βλαστό του αραβόσιτου, πράγμα αναγκαίο ώστε να αποτρέπεται το πλάγιασμα αφού πολλές ποικιλίες αραβοσίτου φτάνουν τα 2,5 m ύψος ή σπανιότερα τα 4 m.



Εικόνα 5.3

Διάσπαρτες αγγειακές δεσμίδες σε εγκάρσια τομή βλαστού αραβοσίτου (waynesword.palomar.edu)

5.1.2 Ανατομία επάκριου μεριστώματος

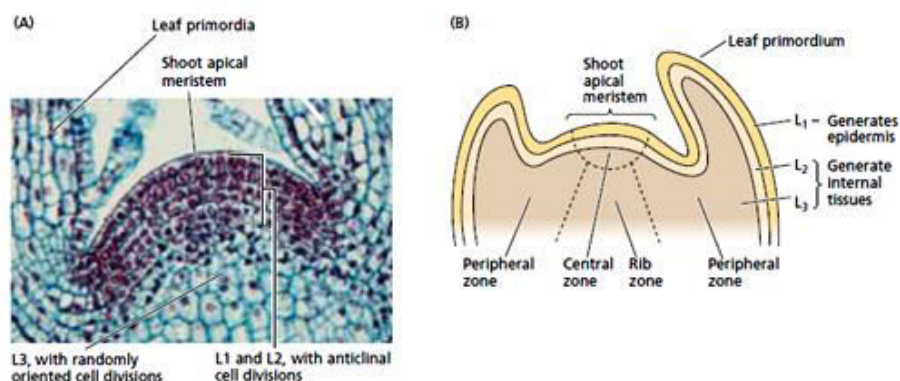
5.1.2.1 Οργάνωση και λειτουργία του κορυφαίου μεριστώματος βλαστού

Το κορυφαίο μεριστώμα του βλαστού είναι μία δεξαμενή εμβρυακών κυττάρων σε σχήμα θόλου. Έχει την ικανότητα για απεριόριστη αύξηση. Με τον όρο κορυφή του βλαστού (shoot apex) συμπεριλαμβάνεται το κορυφαίο μεριστώμα όπως επίσης και η υποκορυφαία ζώνη, όπου έχουν αρχίσει οι καταβολές του φύλλου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η κορυφή του βλαστού είναι σε μεγάλο βαθμό αυτόνομη. Δίνοντας μία ικανοποιητική ποσότητα θρεπτικών στοιχείων, αυτή η περιοχή του φυτού είναι ικανή για συνεχή αύξηση. Η αυτορυθμιζόμενη ικανότητα του κορυφαίου μεριστώματος του βλαστού μπορεί να αποδειχθεί αν προκληθεί τραυματισμός σε κάποιο τμήμα της δομής του. Με την καταστροφή κάποιου τμήματος, τα υπόλοιπα

κύτταρα διαιρούνται και επιτυγχάνεται ανασύσταση του μεριστώματος σε κανονικό μέγεθος, οργάνωση και λειτουργία.

5.1.2.2 Οργάνωση της κορυφής του βλαστού

Μία πρόσφατη ερμηνεία της οργάνωσης της κορυφής του βλαστού αναφέρεται ως κυτταροϊστολογικός διαχωρισμός σε ζώνες (cytological zonation) (Εικόνα 5.4). Με βάση το διαχωρισμό αυτό διακρίνονται τρεις ζώνες. Η κεντρική ζώνη που αποτελείται από μία εμφανή ομάδα μεγάλων αρχικών κυττάρων που βρίσκονται στην κορυφή του βλαστού. Αυτά τα κύτταρα υποβάλλονται σε συχνή κυτταρική διαίρεση, έχουν πυρήνες και μεγάλα χυμοτόπια. Λειτουργεί ως μία πηγή όλων των άλλων κυττάρων της κορυφής και κατ' επέκταση, όλου του αρχικού βλαστού. Η περιφερειακή ζώνη βρίσκεται στο πλάι και κάτω από την κεντρική ζώνη. Τα κύτταρα της περιφερειακής ζώνης είναι μικρότερα και μιτωτικά πιο ενεργά και έχουν πυκνότερα κυτοπλάσματα. Αυτά αποτελούν τις περιοχές προέλευσης του φλοιού και καταβολής των φύλλων που προκύπτουν διαδοχικά σε διάταξη βάση οντογενετικών προτύπων. Η τρίτη ζώνη ορίζεται η ζώνη μετάβασης (rib zone) και βρίσκεται στη βάση του κορυφαίου μεριστώματος και αποτελεί το όριο μεταξύ μεριστώματος και του υπόλοιπου φυτού. Τα προϊόντα της ζώνης μετάβασης σχηματίζουν την κεντρική εντερώνη του βλαστού όπου τα κύτταρα υποβάλλονται σε σημαντική επιμήκυνση έτσι ώστε να επεκτείνεται η μεσογονάτια περιοχή. Αυτή η περιοχή ίσως επίσης εξυπηρετεί την σημαντική λειτουργία να παρέχει το μοναπάτι μετάδοσης σήματος της μεσολαβούμενης ορμόνης στο υπόλοιπο φυτό. Φυτά που στερούνται τη ζώνη μετάβασης έχουν κοντύτερα μεσογονάτια και φύλλα σε ροζέτες.



Εικόνα 5.4

Το κορυφαίο μεριστώμα βλαστού δημιουργεί τα εναέρια όργανα του φυτού. (A): Η εμφάνιση του κορυφαίου μεριστώματος του βλαστού με στρώσεις κυττάρων, (B): Οι κυτταροϊστολογικές ζώνες του κορυφαίου μεριστώματος του βλαστού (πηγή Taiz L., Zeiger E., 2002)

5.1.2.3 Διαφοροποίηση πρωτογενών ιστών

Παρόμοια με το αναπτυσσόμενο έμβρυο, αναγνωρίζονται τρεις κατηγορίες των λεγόμενων πρωτογενών μεριστωματικών ιστών στην μη διαφοροποιημένη περιοχή του κορυφαίου μεριστώματος. Στο εξωτερικό, μονό στρώμα κυττάρων της κορυφής είναι το πρωτόδερμα που θα ωριμάσει σε επιδερμίδα του πρωτογενούς φυτού. Το προκάμβιο, επίσης ονομάζεται προ-αγγειακός ιστός, χαρακτηρίζεται ως λωρίδες επιμήκυνσης κυττάρων που συνδέονται με τον ώριμο αγγειακό ιστό του φυτού και διαφοροποιείται σε πρωτογενείς αγγειακούς ιστούς δηλαδή σε πρωτογενές ξύλο και σε πρωτογενές ηθμό. Ορισμένες από τις λωρίδες του προκαμβίου εκτείνονται μέσα στις αναπτυσσόμενες καταβολές του φύλλου. Σε ακόμα μεγαλύτερα φύλλα, το μεγαλύτερο μέρος του προκαμβίου ωριμάζει μέσα στο πρωτογενές ξύλο και στον πρωτογενή ηθμό των νευρώσεων του φύλλου. Τα

εναπομείναντα κύτταρα μέσα στην κορυφή αποτελούν το θεμελειώδες μερίστωμα. Βρίσκονται μεταξύ του πρωτοδέρματος και των λωρίδων του προκαμβίου και συμπληρώνουν το κέντρο της νεαρής κορυφής. Αυτό το μερίστωμα ωριμάζει σε φλοιό και εντεριώνη της κορυφής του φυτού στην οντογενετική ακολουθία από την κορυφή στον ιστό του ώριμου βλαστού.

5.1.2.4 Διαφοροποίηση αγγειακού στα φύλλα

Η νεύρωση του φύλλου στα μονοκότυλα ξεκινά να αναπτύσσεται με το σχηματισμό της λωρίδας του προκαμβίου ακροπεταλικά στην καταβολή του φύλλου. Οι μεγάλες πλάγιες δεσμίδες προκύπτουν διαδοχικά από την μεσαία νεύρωση προς τα έξω. Η κατεύθυνση της διαφοροποίησης του προκαμβίου στις μεγάλες παράλληλες δεσμίδες προχωρά ακροπεταλικά μέσα στην αναπτυσσόμενη καταβολή του φύλλου και βασιπέταλα μέσα στο βλαστό μέχρι να επιτευχθεί σύνδεση με μία προκαμβιακή λωρίδα του βλαστού. Παράλληλες δεσμίδες μεσαίου μεγέθους διαφοροποιούνται σε μία βασιπέταλη κατεύθυνση μετά την περίοδο της επέκτασης του φύλλου. Η τελευταία αγγειακή διαφοροποίηση είναι η δημιουργία εγκάρσιων νευρώσεων που συνδέουν τις επιμήκειες παράλληλες λωρίδες. Αυτή η διαδικασία γίνεται από την περιοχή της κορυφής του φύλλου προς τη βάση.

Η περίοδο της αύξησης της καταβολής του φύλλου στα μονοκότυλα ακολουθείται από τη δημιουργία ενός βασικού μεριστώματος του φύλλου. Αυτό το μερίστωμα λειτουργεί για μόνο μία σύντομη περίοδο αλλά συνοδεύεται από την γενική διεύρυνση των κυττάρων. Η ωρίμανση των κυττάρων των φύλλων στα μονοκότυλα πραγματοποιείται από την κορυφή του φύλλου προς τη βάση.

5.1.2.5 Αγγειακές δεσμίδες στον αραβόσιτο

Το αγγειακό σύστημα του βλαστού και του φύλλου συνδέεται στις περιοχές του κόμβου. Μία αγγειακή δέσμη στο βλαστό που αναγνωρίζεται ως συνέχεια μιας αγγειακής δέσμης της βάσης του φύλλου ονομάζεται ίχνος φύλλου. Στο επίπεδο όπου το ίχνος του φύλλου κατευθύνεται προς το φύλλο μία παρεγχυματική περιοχή διαφοροποιείται στο αγγειακό σύστημα. Η περιοχή της διακοπής του αγγειακού ιστού ονομάζεται φυλλικό κενό (leaf gap).

5.1.3 Σκοπός του κεφαλαίου

Το εμβρυακό ριζικό σύστημα συνδέεται με το σύστημα του σπόρου-μεσοκοτυλίου-κόμβου. Παράλληλα ο κόμβος παράγει και ριζικό σύστημα οπότε το μεσοκοκοτύλιο είναι ο σύνδεσμος μεταξύ εμβρυακού ριζικού (μέσω του scutellum ή του εμβρυακού κόμβου) και του συστήματος των βλαστογενών ριζών. Πόση ποσότητα σιδήρου κατανέμεται σε αυτό το σύστημα σύνδεσμο; Ποια είναι η σχέση σιδήρου και θείου; Ποια είναι η επίδραση της τροφοπενίας στη κατανομή και στη σχέση σιδήρου και θείου; Σε αυτό το κεφάλαιο εκτός από τις απαντήσεις σε αυτά τα ερωτήματα παρατίθεται και τα μορφομετρικά και τα ανατομικά δεδομένα του μεσοκοτυλίου και του κόμβου καθώς και τα αποτελέσματα της ανίχνευσης του αποπ्लाσμικού σιδήρου στο σύστημα-σύνδεσμο.

5.2. Υλικά και μέθοδοι

Σε αυτή την πειραματική ενότητα διενεργήθηκαν πειράματα χρονικής διάρκειας 26 ημερών.

5.2.1 Κατανομές ξηρής μάζας, νερού, σιδήρου και θείου σπόρου-μεσοκοτυλίου-βλαστού

Μετρήθηκαν οι παράμετροι του νωπού βάρους του σπόρου, του μεσοκοτυλίου, του κόμβου και του επάκριου μεριστώματος και του ξηρού βάρους τους. Η ποσότητα του νερού των παραπάνω φυτικών οργάνων υπολογίστηκε ως η διαφορά του νωπού και ξηρού βάρους. Ο προσδιορισμός του ολικού σιδήρου, του ολικού θείου και των θειικών περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» του Κεφαλαίου 2.

5.2.2 Μορφομετρική ανάλυση μεσοκοτυλίου, κόμβου και επάκριου μεριστώματος

Μετρήθηκαν (α) το μήκος κάθε φυτικού οργάνου και (β) η διάμετρος του κόμβου και του επάκριου μεριστώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους και της διαμέτρου ελήφθησαν φωτογραφίες των παραπάνω φυτικών οργάνων, τα οποία είχαν τοποθετηθεί σε βαθμονομημένο χαρτί και χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας ImageJ.

5.2.3 Ανατομία μεσοκοτυλίου και κόμβου

Για τη μελέτη της ανατομίας του μεσοκοτυλίου και του κόμβου, ελήφθησαν δείγματα από το νωπό φυτικό υλικό και με την διαδικασία την προσήλωσης και εγκλεισμού τους σε παραφίνη δημιουργήθηκαν μόνιμα παρασκευάσματα του μεσοκοτυλίου και του κόμβου. Στο μεσοκοτύλιο πραγματοποιήθηκαν τομές με μικροτόμο στα δύο άκρα του, τόσο κοντά στο κόμβο όσο και κοντά στο σπόρο. Όσον αφορά το κόμβο οι τομές έγιναν στο άκρο και τη μέση του κόμβου. Μετά την λήψη φωτογραφιών των τομών αυτών στο οπτικό μικροσκόπιο, μετρήθηκαν (α) οι επιφάνειες τομής του μεσοκοτυλίου κοντά στο κόμβο και κοντά στο σπόρο, (β) η επιφάνεια αερεγχύματος του φλοιώδους παρεγχύματος του μεσοκοτυλίου κοντά στο σπόρο και (γ) οι επιφάνειες τομής του κεντρικού κυλίνδρου του μεσοκοτυλίου κοντά στο κόμβο και κοντά στο σπόρο. Για τον προσδιορισμό των παραπάνω ανατομικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα επεξεργασίας ImageJ. Η διαδικασία προσήλωσης και εγκλεισμού δειγμάτων σε παραφίνη, η παραλαβή των τομών και η χρώση με safranin/fast green περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» του Κεφαλαίου 3.

5.2.4 Ανίχνευση σιδήρου σε τομές του μεσοκοτυλίου και του κόμβου με τη χρωστική Prussian blue

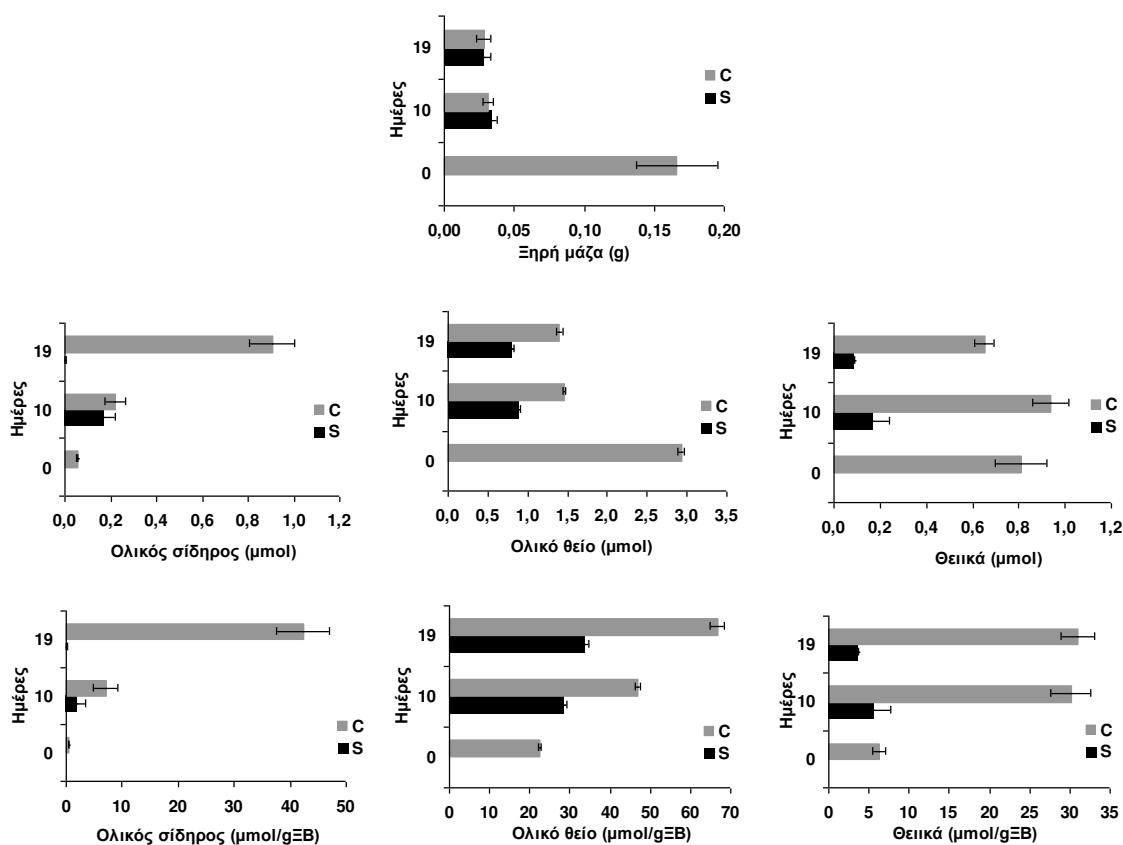
Για την ανίχνευση της παρουσίας του σιδήρου σε τομές του μεσοκοτυλίου και του κόμβου, ελήφθησαν δείγματα από το νωπό φυτικό υλικό και με την διαδικασία της προσήλωσης και εγκλεισμού τους σε παραφίνη δημιουργήθηκαν μόνιμα παρασκευάσματα των παραπάνω φυτικών οργάνων. Οι τομές ελήφθησαν με μικροτόμο από το μεσοκοτύλιο και το κόμβο. Η χρώση των τομών αυτών έγινε με την χρωστική Prussian blue. Τόσο η αρχή της μεθόδου όσο και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» του Κεφαλαίου 4.

5.3 Αποτελέσματα

Κατά την έναρξη της μεταχείρισης

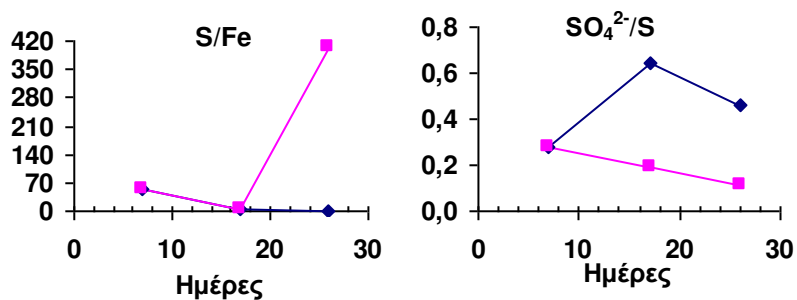
Η ξηρή μάζα του σπόρου (ΣΠ) ήταν κατά μέσον όρο 130 mg, ενώ του μεσοκοτυλίου και του κόμβου (Μ/Κ) 6 mg. Οι συγκεντρώσεις ολικού Fe ήταν στο ΣΠ 0,42 και στο Μ/Κ 0,31 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{ΞΜ}$, του ολικού θείου στο ΣΠ 22,5 και στο Μ/Κ 37,3 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{ΞΜ}$, των θειικών στο ΣΠ 6,3 και στο Μ/Κ επίσης 6,3 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{ΞΜ}$ και του οργανικού θείου στο ΣΠ 16,2 και στο Μ/Κ 31 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{ΞΜ}$ (Εικόνα 5.5 & Εικόνα 5.8). Ο λόγος S:Fe ήταν στο ΣΠ 54,3:1 και στο Μ/Κ 115:1, ενώ ο λόγος SO_4^{2-} :S ήταν 3:10 στο ΣΠ και 1:6 στο Μ/Κ (Εικόνα 5.6 & Εικόνα 5.9).

Το μήκος του μεσοκοτυλίου ήταν κατά μέσον όρο 2,6 cm (Εικόνα 5.10). Ο κόμβος είχε μήκος 0,23 cm και διάμετρο 0,3 cm (Εικόνα 5.16), ενώ το επάκριο μερίστωμα διάμετρο 0,15 cm (Εικόνα 5.20). Με τη χρωστική Prussian blue ανιχνεύτηκε σίδηρος σε τομές στο άκρο του κόμβου και συγκεκριμένα στα κυτταρικά τοιχώματα της επιδερμίδας, υποδερμίδας, ενδοδερμίδας, αγγείων του ξύλου και ξυλώδους παρεγχύματος (Εικόνα 5.17).



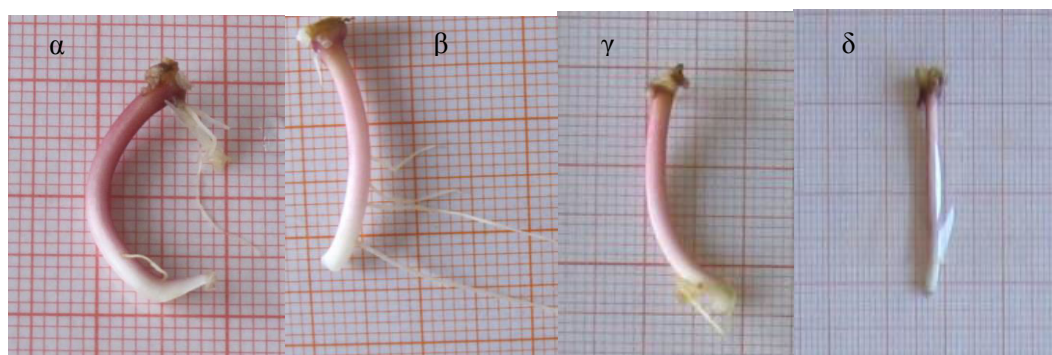
Εικόνα 5.5

Κατανομές της ποσότητας του ξηρού βάρους, ολικού σιδήρου, ολικού θείου και θειικών και της συγκέντρωσης ολικού σιδήρου, ολικού θείου και θειικών του σπόρου σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θειικών (-S, μαύρες στήλες).



Εικόνα 5.6

Οι λόγοι $S:Fe$ και $SO_4^{2-}:S$ στο σπόρο φυτών αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, μπλε γραμμή) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θειικών (-S, κόκκινη γραμμή).

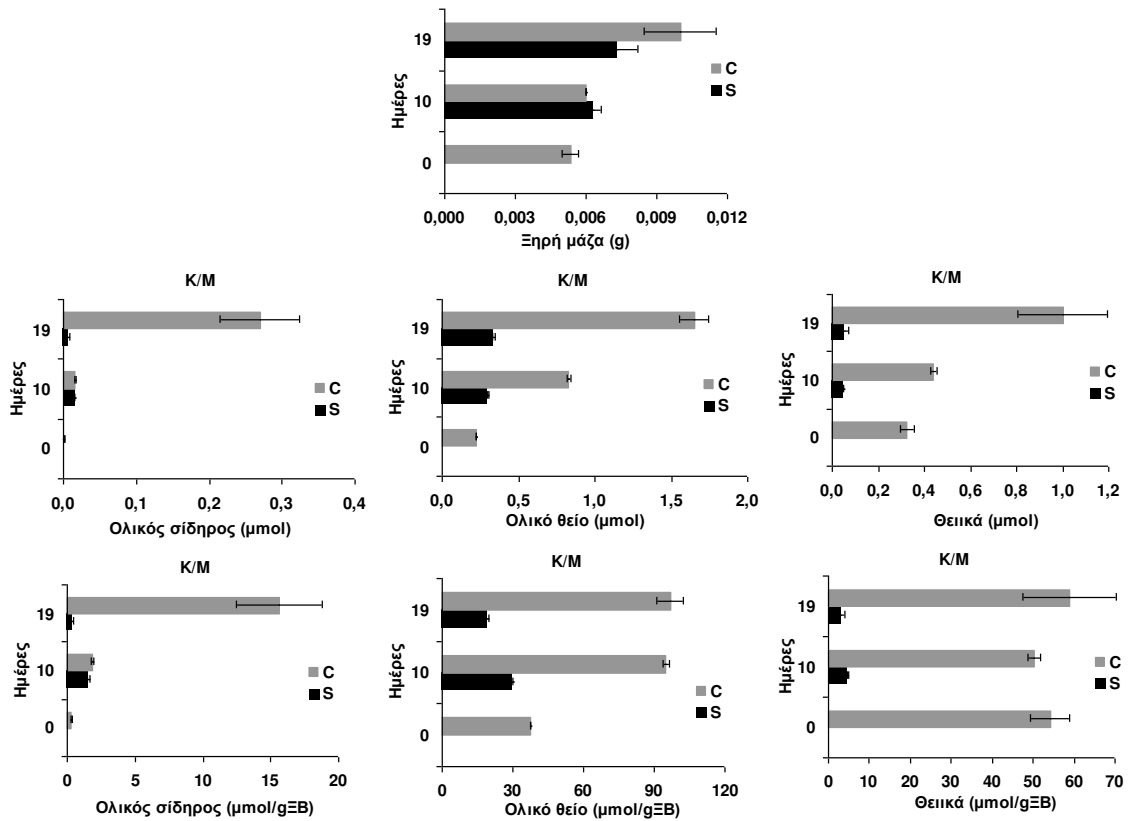


Εικόνα 5.7

Μεσοκοτύλιο την 10^η (α, β) και 19^η ημέρα της μεταχείρισης (γ, δ) σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες (α, γ) και ελλειμματικό σε θείο (β, δ) θρεπτικό διάλυμα.

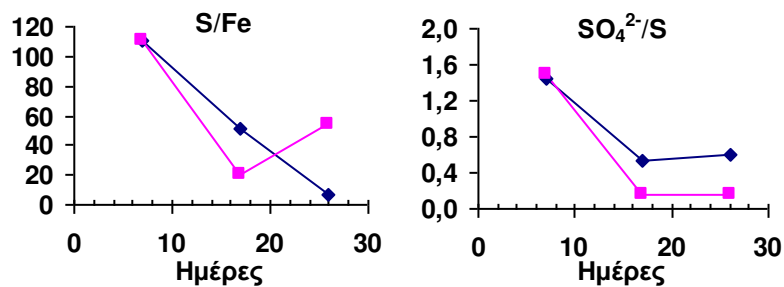
Συντομογραφίες

ΣΠ	Σπόρος
Μ/Κ	Μεσοκοτύλιο και κόμβος
Μ_κ ή Μ_κ	Μεσοκοτύλιο κοντά στο κόμβο
Μ_σ ή Μ_σ	Μεσοκοτύλιο κοντά στο σπόρο
Επ	Επιδερμίδα
Υ	Υποδερμίδα
Φ	Περιοχές κυττάρων φλοιώδους παρεγχύματος
Η	Ηθμός
ΑΞ	Αγγεία του ξύλου
ΞΠ	Ξυλώδες παρέγχυμα
ΜΕΚΠ	Μη ειδικά κύτταρα παρεγχύματος



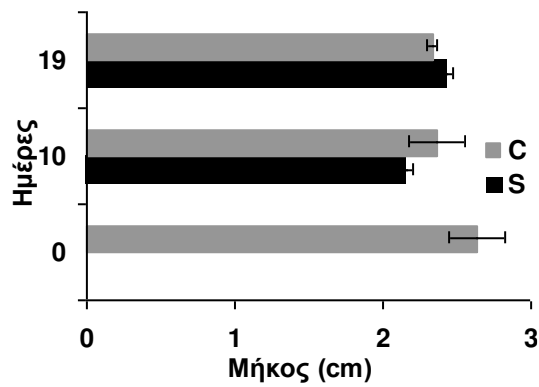
Εικόνα 5.8

Κατανομή της ποσότητας του ξηρού βάρους του μεσοκοτυλίου και κατανομές της ποσότητας και συγκέντρωσης ολικού σιδήρου, ολικού θείου και θειικών του μεσοκοτυλίου και του κόμβου μαζί, σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θειικών (-S, μαύρες στήλες).



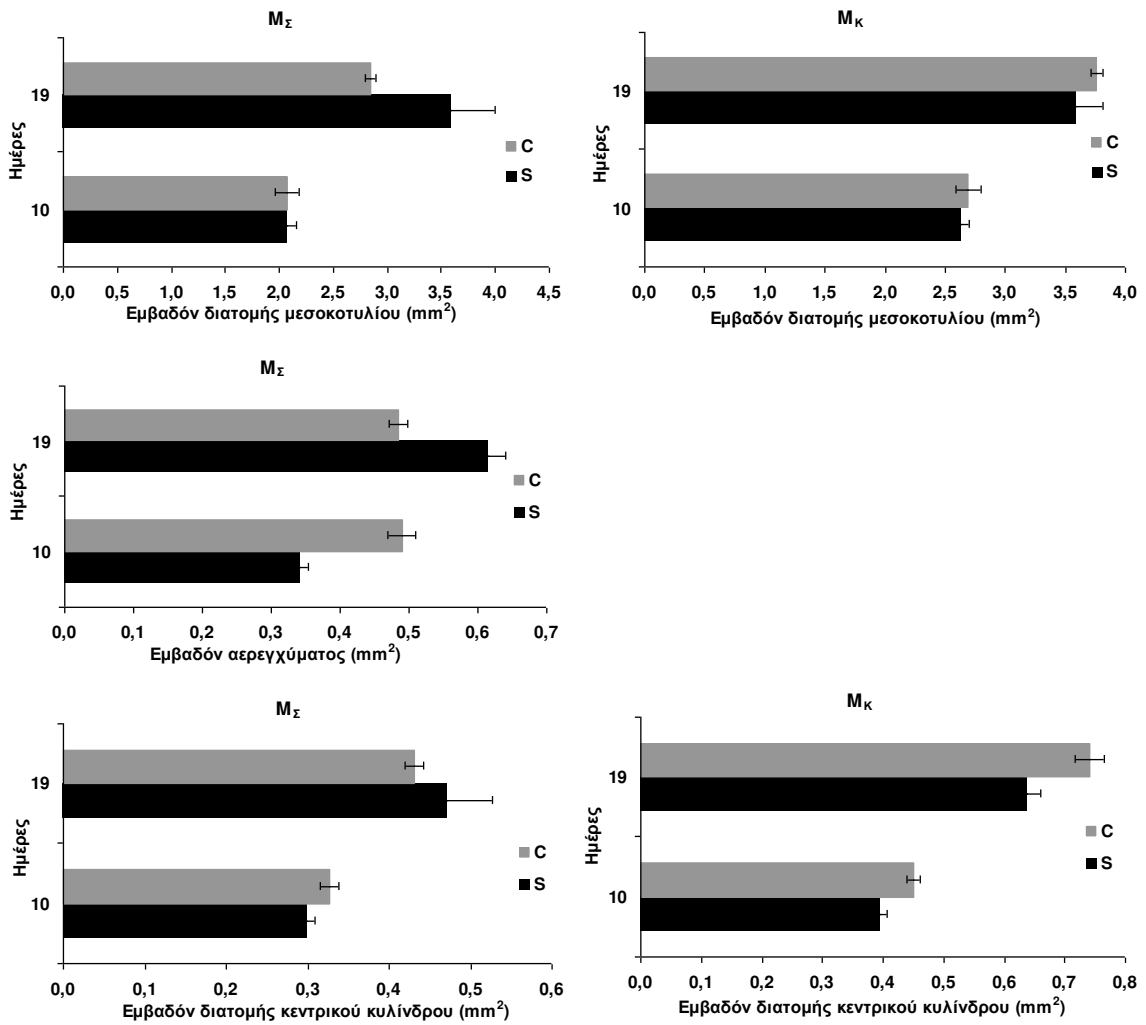
Εικόνα 5.9

Οι λόγοι S:Fe και SO₄²⁻:S στο μεσοκοτύλιο και κόμβο σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, μπλε γραμμή) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θειικών (-S, κόκκινη γραμμή).



Εικόνα 5.10

Μήκος του μεσοκοτυλίου την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



Εικόνα 5.11

Εμβαδόν διατομής μεσοκοτυλίου, αερεγχύματος και κεντρικού κυλίνδρου του μεσοκοτυλίου κοντά στο κόμβο (M_Κ) και κοντά στο σπόρο (M_Σ) φυτών αραβοσίτου την 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).

Control							
Ημέρα 10							
Περιοχή	Επ	Υ	Φ	Η	ΑΞ	ΞΠ	ΜΕΚΠ
M _κ							
M _σ							

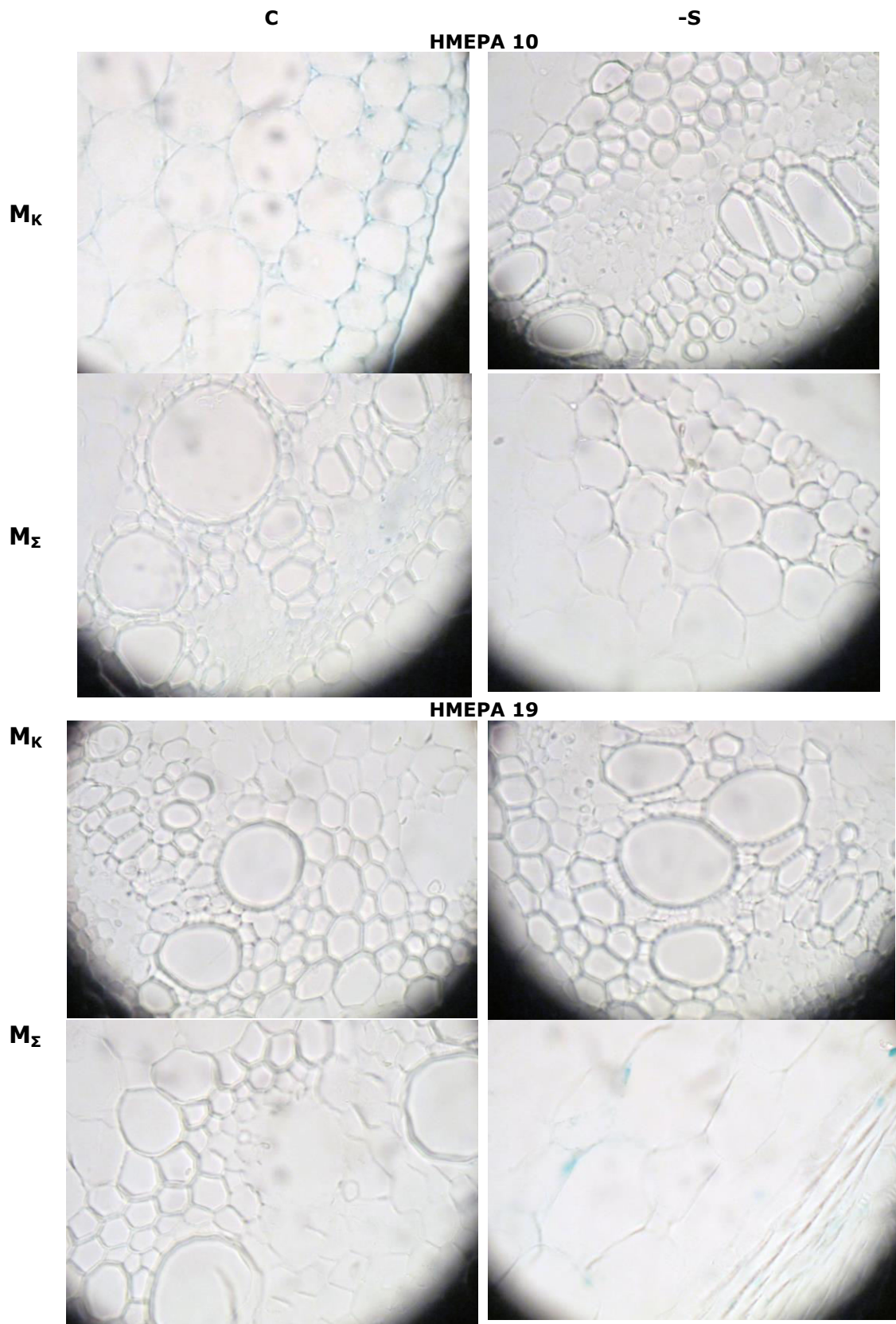
Control							
Ημέρα 19							
Περιοχή	Επ	Υ	Φ	Η	ΑΞ	ΞΠ	ΜΕΚΠ
M _κ							
M _σ							

-S							
Ημέρα 10							
Περιοχή	Επ	Υ	Φ	Η	ΑΞ	ΞΠ	ΜΕΚΠ
M _κ							
M _σ							

-S							
Ημέρα 19							
Περιοχή	Επ	Υ	Φ	Η	ΑΞ	ΞΠ	ΜΕΚΠ
M _κ							
M _σ							

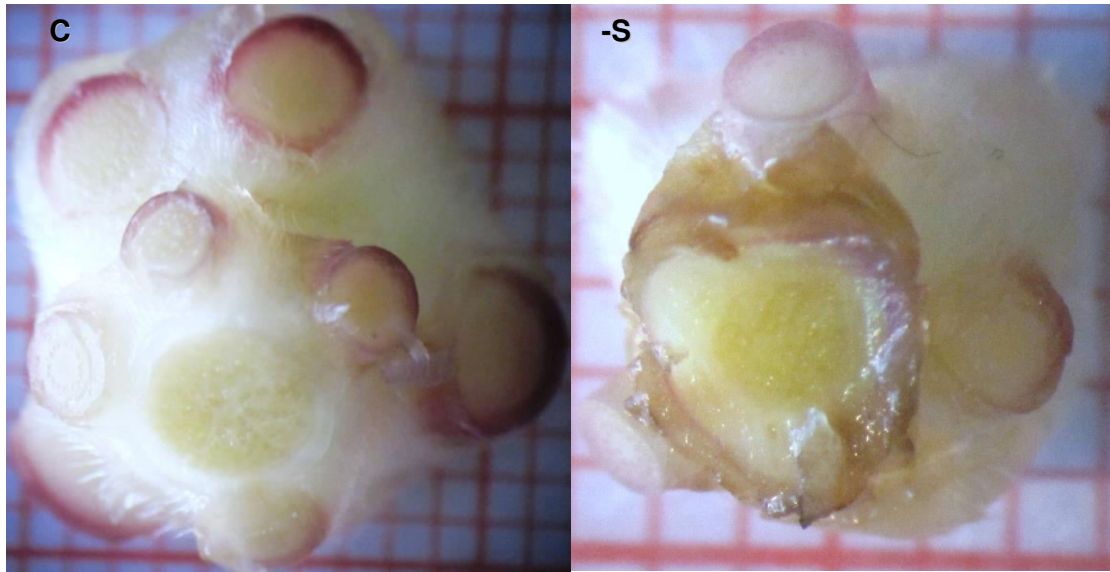
Εικόνα 5.12

Σχηματική απεικόνιση των περιοχών που βάφονται με την χρωστική Prussian blue σε τομές του μεσοκοτυλίου κοντά στο κόμβο (M_κ) και κοντά στο σπόρο (M_σ) την 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (Control) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θεικών (-S). Επ: επιδερμίδα, Υ: υποδερμίδα, Φ: περιοχές κυττάρων του φλοιώδους παρεγχύματος, Η: ηθμός, ΑΞ: αγγεία του ξύλου, ΞΠ: ξυλώδες παρέγχυμα και ΜΕΚΠ: μη ειδικά κύτταρα παρεγχύματος.



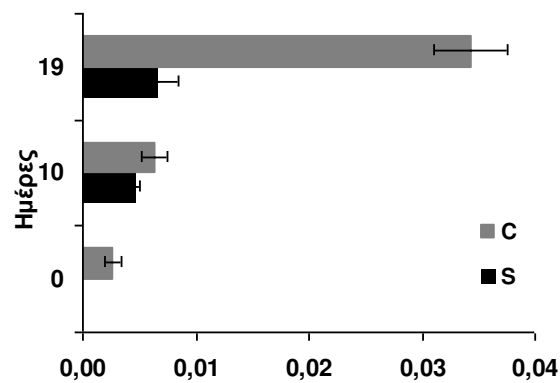
Εικόνα 5.13

Παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο τομών του μεσοκτυλίου κοντά στο κόμβο (M_κ) και κοντά στο σπόρο (M_σ) την 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης μετά από χρώση με Prussian blue. Οι περιοχές που ανιχνεύεται σίδηρος βάφονται μπλε.



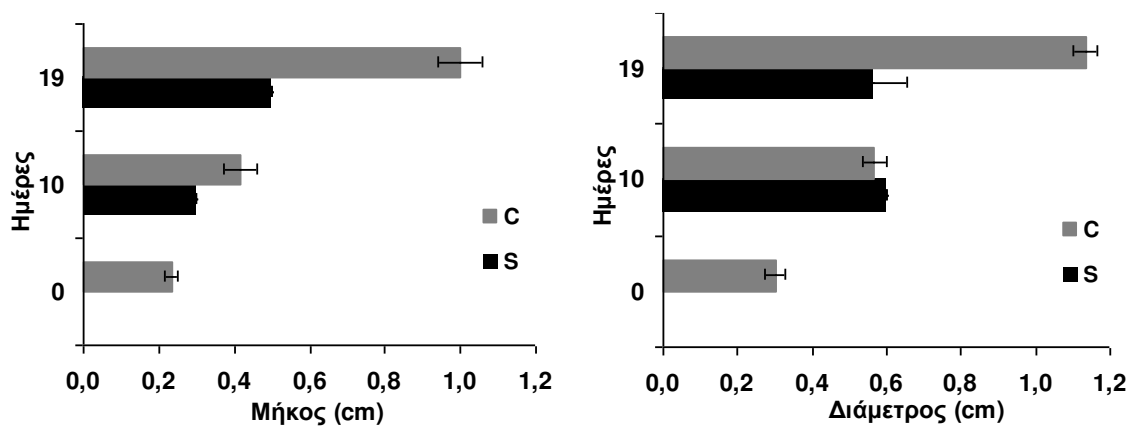
Εικόνα 5.14

Συγκριτική εικόνα του κόμβου την 19^η ημέρα της μεταχείρισης των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θεικίων (-S).



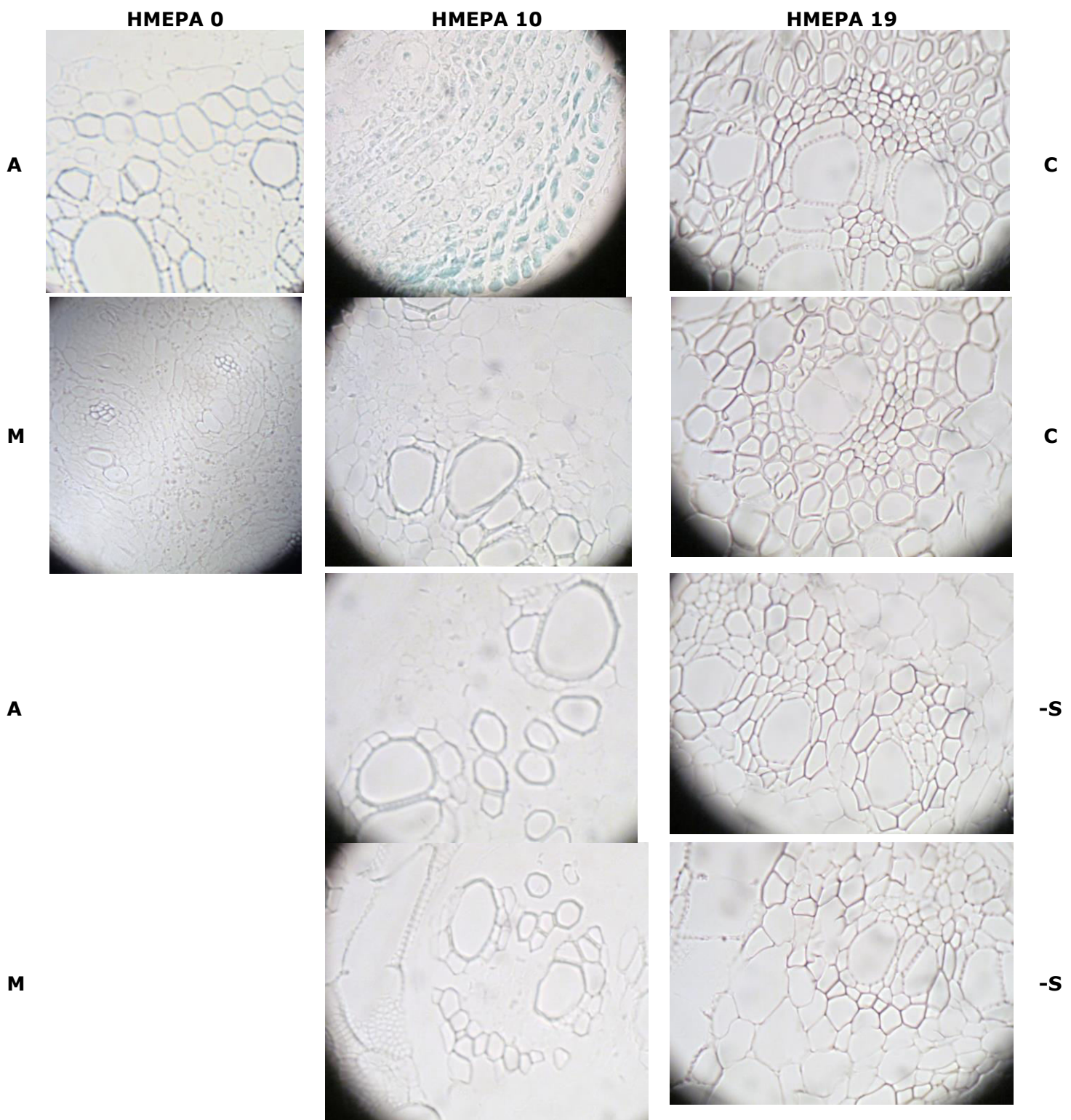
Εικόνα 5.15

Κατανομή της ποσότητας του ξηρού βάρους του κόμβου την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θεικίων (-S, μαύρες στήλες).



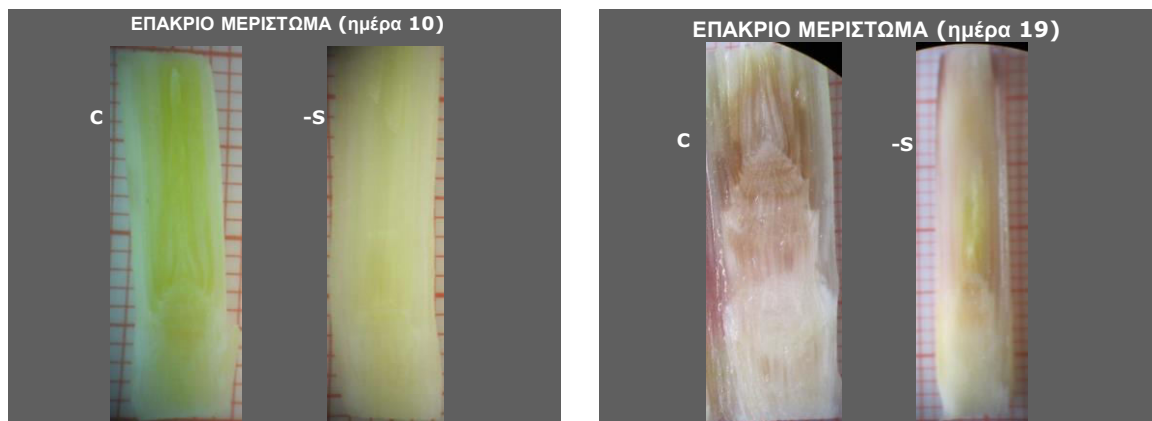
Εικόνα 5.16

Μήκος και διάμετρος του κόμβου την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θεικίων (S, μαύρες στήλες).



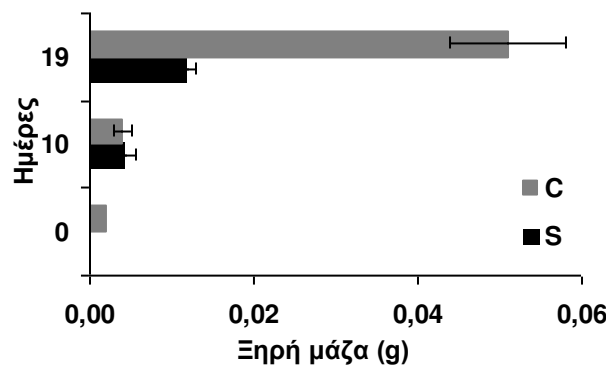
Εικόνα 5.17

Παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο τομών του κόμβου την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης μετά από χρώση με Prussian blue. Οι περιοχές που ανιχνεύεται σίδηρος βάφονται μπλε.



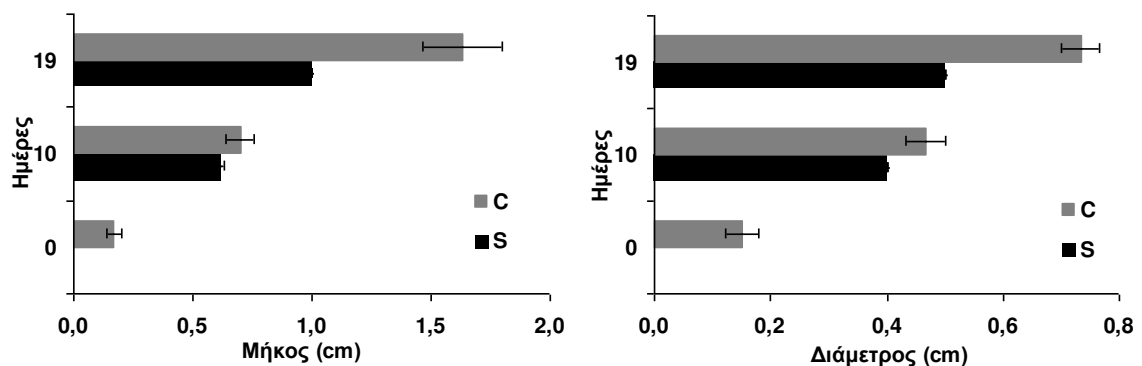
Εικόνα 5.18

Επιμήκειες τομές του επάκριου μεριστώματος την 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (-S).

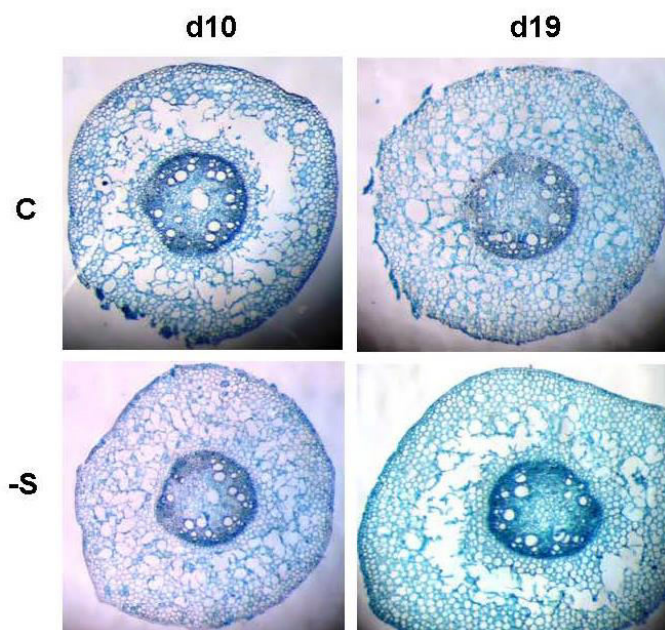


Εικόνα 5.19

Κατανομή της ποσότητας της ξηρής μάζας του επάκριου μεριστώματος την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θειικών (-S, μαύρες στήλες).



Εικόνα 5.20: Μήκος και διάμετρος του επάκριου μεριστώματος την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



Εικόνα 5.21

Σχηματισμός αερεγχύματος στο μεσοκοτύλιο δίπλα στον εμβρυακό κόμβο κατά την ημ10 και την ημ19 υπό πλήρη θρέψη (C) και υπό έλλειψη θειϊκών (-S).

Πίνακας 5.1

Το μέσο εμβαδόν των τομών του μεσοκοτυλίου δίπλα στον κόμβο (Mc) και δίπλα στο σπόρο (Ms) με τα αντίστοιχα εμβαδά του αερεγχύματος, του φλοιώδους παρεγχύματος και του κεντρικού κυλίνδρου τις ημ10 και 19 των μεταχειρίσεων.

		C εμβαδόν				-S εμβαδόν			
		τομής	ΚΚ	ΑΕΡ	ΦΠ	τομής	ΚΚ	ΑΕΡ	ΦΠ
		d10							
Mc	mm ²	2.46	0.45	0	2.01	2.63	0.4	0	2.23
	%	100.0	18.3	0.0	81.7	100.0	15.2	0.0	84.8
Ms	mm ²	2.07	0.33	0.49	1.25	2.08	0.3	0.34	1.44
	%	100.0	15.9	23.7	60.4	100.0	14.4	16.3	69.2
		d19				d19			
Mc	mm ²	3.76	0.74	0	3.02	3.6	0.64	0	2.96
	%	100.0	19.7	0.0	80.3	100.0	17.8	0.0	82.2
Ms	mm ²	2.85	0.43	0.49	1.93	3.59	0.47	0.62	2.5
	%	100.0	15.1	17.2	67.7	100.0	13.1	17.3	69.6

Τη 10^η ημέρα της μεταχείρισης

Υπό πλήρη θρέψη, η ξηρή μάζα του σπόρου (ΣΠ) ήταν κατά μέσον όρο 31 mg, ενώ του μεσοκοτυλίου και του κόμβου (Μ/Κ) 9 mg. Οι συγκεντρώσεις ολικού Fe ήταν στο ΣΠ 7.03 και στο Μ/Κ 1.87 μmol g⁻¹ ΞΜ, του ολικού θείου στο ΣΠ 47.0 και στο Μ/Κ 95.1 μmol g⁻¹ ΞΜ, των θειϊκών στο ΣΠ 30.2 και στο Μ/Κ 50.3 μmol g⁻¹ ΞΜ και του οργανικού θείου στο ΣΠ 16.8 και στο Μ/Κ 44.8 μmol g⁻¹ ΞΜ (Εικόνα 5.5 & 5.8)). Ο λόγος S:Fe ήταν στο ΣΠ 6.7:1 και στο Μ/Κ 50.6:1, ενώ ο λόγος SO₄²⁻:S ήταν 64.4% στο ΣΠ και 52.3 στο Μ/Κ (Εικόνα 5.6 & 5.9).

Το μήκος του μεσοκοτυλίου παρέμεινε στατιστικά το ίδιο (Εικόνα 5.10). Ο κόμβος είχε μήκος 0,30 cm και διάμετρο 0,57 cm, ενώ το επάκριο μερίστωμα διάμετρο 0,47 cm (Εικόνα 5.16 & Εικόνα 5.20). Στις τομές του μεσοκοτυλίου κοντά στο κόμβο και με χρώση με Prussian blue εντοπίστηκε σίδηρος στα κυτταρικά τοιχώματα της επιδερμίδας, υποδερμίδας, αγγείων του ξύλου και

ξυλώδους παρεγχύματος, ενώ στις τομές κοντά στο σπόρο στα κυτταρικά τοιχώματα των αγγείων του ξύλου και του ξυλώδους παρεγχύματος. Σίδηρος ανιχνεύτηκε μόνο σε τομές του άκρου του κόμβου (Εικόνα 5.12 & Εικόνα 5.13).

Υπό συνθήκες έλλειψης θειικών, η ξηρή μάζα του σπόρου δεν μεταβλήθηκε. Οι συγκεντρώσεις μειώθηκαν του ολικού σιδήρου κατά 71%, του ολικού θείου κατά 39%, των θειικών κατά 81.5% (Εικόνα 5.5). Λόγω της αναλογικά πολύ μεγαλύτερης μείωσης των θειικών έναντι του συνολικού θείου η συγκέντρωση του οργανικού θείου αυξήθηκε κατά 37.5%. Ο λόγος S:Fe αυξήθηκε στο 13.9:1, ενώ ο λόγος $SO_4^{2-}:S$ ήταν μικρότερος από αυτόν των φυτών-μαρτύρων κατά 45.3% (Εικόνα 5.6).

Στο μεσοκοτύλιο η ξηρή μάζα αυξήθηκε κατά 11%. Η συγκέντρωση ολικού σιδήρου μειώθηκε κατά 17.2%, του ολικού θείου κατά 68.8%, των θειικών κατά 90.5% και του οργανικού θείου κατά 44.4% (Εικόνα 5.8). Ο λόγος S:Fe μειώθηκε στο 19:1, ενώ ο λόγος $SO_4^{2-}:S$ μειώθηκε κατά 35.6% (Εικόνα 5.9). Το μήκος του μεσοκοτυλίου ήταν στατιστικά ίδιο με αυτό των φυτών μαρτύρων (Εικόνα 5.10). Η επιφάνεια τομής του μεσοκοτυλίου προς το κόμβο (M_K) και προς τον σπόρο (M_S) δεν διαφοροποιήθηκαν από τις αντίστοιχες των φυτών-μαρτύρων. Η επιφάνεια αερεγχύματος και η επιφάνεια τομής του κεντρικού κυλίνδρου του M_K ήταν μικρότερες από αυτές των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 5.11 & 5.21). Με τη χρωστική Prussian blue φαίνεται να ανιχνεύτηκε λιγότερος σίδηρος στα κυτταρικά τοιχώματα των αγγείων του ξύλου και του ξυλώδους παρεγχύματος των τομών του M_K , ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά των τομών του M_S σε σχέση με των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 5.12 & Εικόνα 5.13).

Το μήκος του κόμβου ήταν μικρότερο κατά 28.6% και η διάμετρος του κατά 29.8% (Εικόνα 5.16). Την ημέρα αυτή δεν ανιχνεύτηκε σίδηρος με την χρώση Prussian blue (Εικόνα 5.17). Το μέσο μήκος του επάκριου μεριστώματος υπολειπόταν του μάρτυρα κατά 11.4%, ενώ η διάμετρος ήταν μεγαλύτερη κατά 27.7% (Εικόνα 5.20).

Κατά την 19^η ημέρα της μεταχείρισης

Υπό πλήρη θρέψη, στο σπόρο η ξηρή μάζα παρέμεινε σταθερή. Η συγκέντρωση ολικού σιδήρου ήταν 42.3, του ολικού θείου 66.7, των θειικών 31 και του οργανικού θείου 35.7 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM}$ (Εικόνα 5.5) Ο λόγος S:Fe διαμορφώθηκε στο 1,5:1 και ο λόγος $SO_4^{2-}:S$ στο 46.4% (Εικόνα 5.6).

Στο μεσοκοτύλιο και κόμβο μαζί η συγκέντρωση ολικού σιδήρου ήταν 15.6, του ολικού θείου 96.8, των θειικών 58.9 και του οργανικού θείου 37.9 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM}$ (Εικόνα 5.8) Ο λόγος S:Fe μειώθηκε (6,1:1), ενώ ο λόγος $SO_4^{2-}:S$ αυξήθηκε (στο 60.6%) (Εικόνα 5.9). Στο μεσοκοτύλιο η ξηρή μάζα αυξήθηκε στα 17 mg και το μήκος του παρέμεινε στατιστικά το ίδιο (Εικόνα 5.8 & 5.10). Όσον αφορά τα ανατομικά χαρακτηριστικά, τόσο η επιφάνεια τομής του μεσοκοτυλίου όσο και η επιφάνεια τομής του κεντρικού κυλίνδρου προς τον κόμβο και προς το σπόρο αυξήθηκε, ενώ η επιφάνεια αερεγχύματος παρέμεινε σταθερή σε σύγκριση με την ημ10 (Εικόνα 5.11). Ανιχνεύτηκε λιγότερος σίδηρος στα κυτταρικά τοιχώματα των αγγείων του ξύλου και του ξυλώδους παρεγχύματος σε τομές του M_K και του M_S (Εικόνα 5.12 & 5.13). Το μήκος του κόμβου διαμορφώθηκε στο 1 cm και η διάμετρος του στο 1.1 cm (Εικόνα 5.16). Αντίστοιχα, το μήκος του επάκριου μεριστώματος διαμορφώθηκε στο 1.6 cm και η διάμετρος του στα 0.7 cm (Εικόνα 5.20).

Υπό συνθήκες έλλειψης θειικών, η ξηρή μάζα του σπόρου βρέθηκε αυξημένη κατά 14.3%. Οι συγκεντρώσεις μειώθηκαν του ολικού σιδήρου κατά 99.8%, του ολικού θείου κατά 49.3%, των θειικών κατά 88.4% και του οργανικού θείου κατά 15.3% (Εικόνα 5.5). Ο λόγος S:Fe αυξήθηκε στο 405:1, ενώ ο λόγος $SO_4^{2-}:S$ ήταν μικρότερος από αυτόν των φυτών-μαρτύρων κατά 35.3% (Εικόνα 5.6). Στο μεσοκοτύλιο η ξηρή μάζα αυξήθηκε κατά 5.9%. Η συγκέντρωση ολικού σιδήρου μειώθηκε κατά 97.7%, του ολικού θείου κατά 80.3%, των θειικών κατά 94.7% και

του οργανικού θείου κατά 57.9% (Εικόνα 5.8). Ο λόγος S:Fe μειώθηκε στο 0.34:1, ενώ ο λόγος SO_4^{2-} :S μειώθηκε κατά 43% (Εικόνα 5.9). Το μήκος του μεσοκοτυλίου ήταν στατιστικά ίδιο με αυτό των φυτών μαρτύρων αλλά μεγαλύτερο αυτού των φυτών -S της ημ10 (Εικόνα 5.10). Το μήκος του κόμβου ήταν μικρότερο κατά 50% και η διάμετρός του κατά 49.6% (Εικόνα 5.16). Το μέσο μήκος του επάκριου μεριστώματος υπολειπόταν του μάρτυρα κατά 37.5%, ενώ η διάμετρός του κατά 31.5% (Εικόνα 5.20). Το εμβαδόν διατομής του μεσοκοτυλίου προς το κόμβο (M_K) και προς τον σπόρο (M_S) αυξήθηκε και διαφοροποιήθηκε το εμβαδόν διατομής του M_S που ήταν μεγαλύτερο από αυτό των φυτών-μαρτύρων. Η επιφάνεια του αερεγχύματος αυξήθηκε και ήταν μεγαλύτερη από αυτή των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 5.11 & 5.21). Αυτή την ημέρα, η παρουσία του σιδήρου ανιχνεύτηκε στις ίδιες περιοχές του μεσοκοτυλίου χωρίς να παρατηρείται σημαντική διαφορά τόσο με την ημ10 της ίδιας μεταχείρισης όσο και με αυτή των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 5.12 & 5.13). Στο κόμβο δεν ανιχνεύτηκε σίδηρος την ημέρα αυτή (Εικόνα 5.17).

5.4 Συζήτηση

Τα ερωτήματα που τέθηκαν προς απάντηση σε αυτό το κεφάλαιο εστίασαν στην ποσότητα του σιδήρου που κατανέμεται στο σύστημα σύνδεσμο «σπόρος-μεσοκοτύλιο-κόμβος», στη σχέση σιδήρου και θείου, στην επίδραση της τροφopenίας στη κατανομή και στη σχέση σιδήρου και θείου, στα μορφομετρικά και ανατομικά δεδομένα του μεσοκοτυλίου και του κόμβου και στα αποτελέσματα της ανίχνευσης του αποπλασμικού σιδήρου στο σύστημα-σύνδεσμο.

Πρώτα απ' όλα διαπιστώθηκε ότι υπό συνθήκες -S η συγκέντρωση του σιδήρου μειώθηκε δραματικά στο σπόρο ήδη από την ημ10, ενώ την ημ19 ο σπόρος ήταν πρακτικά εξαντλημένος από σίδηρο. Αντίθετα με τον σίδηρο, το οργανικό θείο αυξήθηκε την ημ10 (+37.5%), ενώ εμφάνισε μάλλον περιορισμένη μείωση την ημ19 (-15.3%). Η μείωση της συγκέντρωσης του σιδήρου στο μεσοκοτύλιο-κόμβο ήταν μάλλον ήπια την ημ10 (-17.2%) και δραματική την ημ19 (-97.7%). Η αντίστοιχη μείωση του οργανικού θείου ήταν -44.4% την ημ10 και -57.9% την ημ19. Η ιστοχημική ανάλυση σιδήρου που εφαρμόστηκε σε εγκάρσιες τομές των δύο άκρων του μεσοκοτυλίου που αναπτύχθηκαν στα δύο διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα έδειξε ότι στα φυτά -S κυρίως την ημ10 κοντά στο κόμβο και λιγότερο την ημ19 τόσο κοντά στο κόμβο, όσο και κοντά στο σπόρο, τα επίπεδα σιδήρου στους ιστούς του μεσοκοτυλίου είναι πολύ χαμηλά ώστε να εμφανίζεται ελάχιστος μπλε χρωματισμός ή καθόλου χρωματισμός στους ιστούς με την χρωστική Perl's. Το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε χρώση υποδηλώνει ότι το επίπεδο του αποπλασμικού σιδήρου στους ιστούς του μεσοκοτυλίου των φυτών -S είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης με την χρώση Perl's. Συμπεραίνεται ότι η έλλειψη θειικών από το θρεπτικό διάλυμα προκάλεσε και σε αυτό το σύστημα έλλειψη σιδήρου.

Τα μορφομετρικά δεδομένα έδειξαν ότι οι ρίζες του μεσοκοτυλίου βρίσκονται κοντά στο σπόρο, άρα κοντά στον εμβρυακό κόμβο. Ως προς τα ανατομικά χαρακτηριστικά παρατηρήθηκε ότι η επιφάνεια τομής του μεσοκοτυλίου και του κεντρικού κυλίνδρου κοντά στο κόμβο δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα, ενώ η περιοχή του μεσοκοτυλίου κοντά στο σπόρο εμφάνισε σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες. Συγκεκριμένα, τόσο η επιφάνεια τομής του μεσοκοτυλίου όσο και η επιφάνεια του αερεγχύματος ήταν σημαντικά μεγαλύτερες το δεύτερο δεκαήμερο σε σχέση με αυτές των φυτών-μαρτύρων. Αυτές οι διαφορές ως προς τα αρχιτεκτονικά και ανατομικά χαρακτηριστικά του μεσοκοτυλίου φαίνεται ότι σχετίζονται με την απόκτηση του νερού και των θρεπτικών στοιχείων. Τις πρώτες 10 ημέρες της έλλειψης θειικών το μεσοκοτύλιο συναγωνίζεται τα φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα, συνεχίζοντας το αναπτυξιακό του πρόγραμμα. Μετά από 19 ημέρες έλλειψης θειικών το ξηρό βάρος παρέμεινε σταθερό και σημαντικά μικρότερο από αυτό των φυτών μαρτύρων.

Σχετικά με τις ανατομικές διαφορές που παρατηρούνται στο μεσοκοτύλιο κοντά στο σπόρο και σχετίζονται με την απόκριση του φυτού στη τροφопενία, στα φυτά -S η επιφάνεια τομής του μεσοκοτυλίου κοντά στο σπόρο αυξήθηκε πολύ περισσότερο το δεύτερο δεκαήμερο έναντι των φυτών μαρτύρων, ενώ η επιφάνεια τομής του κεντρικού κυλίνδρου αυξάνεται το δεύτερο δεκαήμερο χωρίς να διαφοροποιείται από αυτή των φυτών μαρτύρων. Συγκρίνοντας το ποσοστό που καταλαμβάνει η επιφάνεια του κεντρικού κυλίνδρου ως προς την επιφάνεια του μεσοκοτυλίου διαπιστώνεται ότι ο κεντρικός κύλινδρος καταλαμβάνει περίπου το 15% της επιφάνειας του μεσοκοτυλίου όλες τις ημέρες των δειγματοληψιών και στους δύο χειρισμούς.

Ο εντοπισμός αερεγχύματος στο μεσοκοτύλιο υπό συνθήκες υποξίας, είναι γνωστός από την βιβλιογραφία. Ο υποξικός σχηματισμός αερεγχύματος δημιουργεί ένα εσωτερικό κανάλι ανταλλαγής αερίων από τον αερόβιο βλαστό στις υποξικές ρίζες, όταν υπάρχουν συνθήκες υποξίας στο υπόστρωμα. Ο αέρας εισέρχεται διαμέσου των στομάτων των φύλλων και περνά μέσα από το δίκτυο καναλιών αερεγχύματος στις ρίζες. Η κατανάλωση οξυγόνου στις ρίζες δημιουργεί μία αρνητική διαβάθμιση πίεσης που αντλεί αέρα μέσω μαζικής ροής στις ρίζες. Ένα τυπικό σύμπτωμα των κατακλυσμένων σποροφύτων αραβοσίτου είναι μία υπερτροφική ανάπτυξη του μεσοκοτυλίου (Pourabdai et al. 2008). Αυτό το είδος της ανάπτυξης που εμφανίζεται ως μία διόγκωση στην περιοχή μεταξύ της βάσης του βλαστού και των ριζών είναι σημαντικό λόγω του ρόλου του μεσοκοτυλίου να μεταφέρει οξυγόνο από τους βλαστούς στις ρίζες. Θεωρείται ότι είναι ένας προσαρμοστικός μηχανισμός που προκαλεί αυξημένη διάχυση αέρα από τους βλαστούς στις ρίζες (Visser and Voeselek 2004).

Το διαφορετικό που παρατηρήθηκε στη παρούσα μελέτη είναι ο εντοπισμός αερεγχύματος μόνο κοντά στο σπόρο, ενώ δεν εμφανίζεται σε τομές που έγιναν κοντά στο κόμβο, επομένως πρόκειται για εντοπισμένο αερέγχυμα. Επιπλέον φαίνεται ότι στα φυτά -S η επιφάνεια του αερεγχύματος είναι μικρότερη την 17^η ημέρα, ενώ είναι μεγαλύτερη την 26^η ημέρα σε σχέση με αυτή των φυτών μαρτύρων. Παραπέρα, μετά από 19 ημέρες έλλειψης θειικών, αυξάνεται η επιφάνεια τομής του μεσοκοτυλίου κοντά στο σπόρο, χωρίς ανάλογη αύξηση του κεντρικού κυλίνδρου και αυξάνεται η επιφάνεια του αερεγχύματος. Αυτή η διαφορετική συμπεριφορά σχετίζεται με την απόκριση του φυτού στη έλλειψη θείου αφού το αερέγχυμα δεν προορίζεται να διακινήσει αέρα από το υπέργειο στις ρίζες.

5.5 Συμπεράσματα

Τα νέα στοιχεία που προστέθηκαν στην ανάλυση της ομοιόστασης του σιδήρου στον αραβόσιτο υπό συνθήκες έλλειψης θειικών περιλαμβάνουν την δραματική μείωση του σιδήρου, χωρίς ανάλογη δραματική μείωση του οργανικού θείου στο σύστημα του σπόρου-μεσοκοτυλίου-κόμβου και δεν ανιχνεύτηκε αποπλαστικός σίδηρος. Ως νέο ανατομικό εύρημα αναδεικνύεται ο εντοπισμός αερεγχύματος στο μεσοκοτύλιο δίπλα στο σπόρο, χωρίς να υπάρχει δίπλα στον κόμβο. Επομένως, όπως και στην περίπτωση των ριζών, το αερέγχυμα που βρέθηκε είναι εντοπισμένο αερέγχυμα, το οποίο δεν χρησιμεύει για διακίνηση αερίων από το υπέργειο μέρος προς το ριζικό σύστημα.

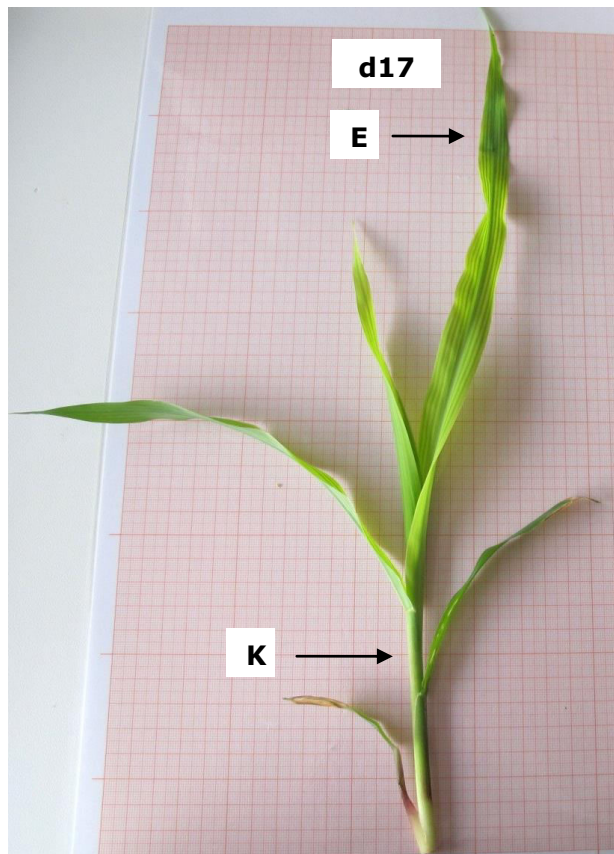
Κεφάλαιο 6

**Η κινητική της κατανομής του σιδήρου στο υπέργειο μέρος
του αραβοσίτου υπό συνθήκες έλλειψης θειϊκών**

6.1 Εισαγωγή

6.1.1. Η αρχιτεκτονική του υπέργειου μέρους

Το υπέργειο μέρος του φυτού αραβοσίτου αποτελείται από επαναλαμβανόμενες στοιχειώδεις μονάδες, τα φυτομερή. Κάθε ένα από αυτά τα φυτομερή αποτελείται από ένα φύλλο, το μεσογονάτιο κάτω από αυτό και το κόμβο με την καταβολή του οφθαλμού στη βάση του μεσογονάτιου. Τα φύλλα εκφύονται κατ' εναλλαγή από το βλαστό. Κάθε φύλλο περιλαμβάνει το έλασμα και τον κολεό (Εικόνα 6.1). Το έλασμα ξετυλίγεται σταδιακά ενώ ο κολεός παραμένει τυλιγμένος. Κάθε νέο φυτομερές εκφύεται μέσα από το φυτομερές που έχει εκπτυχθεί νωρίτερα (Morrison et al. 1994).



Εικόνα 6.1

Υπέργειο μέρος φυτού αραβοσίτου 17 ημέρες από τη σπορά

Τα φύλλα ξεκινούν ως πλευρικές προεξοχές από την γρήγορη διαίρεση των κυττάρων στην περιφερειακή ζώνη του κορυφαίου μεριστώματος του βλαστού. Ως αποτέλεσμα της επιμήκυνσης των πολύ νεαρών καταβολών, νεαρά φύλλα εκτείνονται προς τα πάνω. Η πρώιμη περίοδος της ανάπτυξης ακολουθείται από διαιρέσεις στις πλευρικές περιοχές (intercalary meristem) για να σχηματιστούν τα κύρια μέρη των φύλλων. Στα μονοκότυλα τα φύλλα είναι συχνά γραμμικά, αυτά περιβάλλουν το βλαστό στο σημείο σύνδεσής τους. Μία μικρή γλωσσίδα (ligule) βρίσκεται στην ένωση κολεού με τον βλαστό (Dickison 2000).

Όσον αφορά τη δομή του ελάσματος του φύλλου, τα εξωτερικά στρώματα και των δύο επιφανειών απαρτίζουν την άνω (adaxial) και κάτω (abaxial) επιδερμίδα. Το εξωτερικό τοίχωμα των επιδερμικών κυττάρων είναι συχνά παχύτερο από το εσωτερικό τοίχωμα, και τα κύτταρα παράγουν ένα κηρώδες μη κυτταρικό στρώμα, την εφυμενίδα (cuticle) και στην άνω και στη κάτω επιφάνεια του ελάσματος. Η ανταλλαγή αερίων γίνεται μέσω των στομάτων, στην επιδερμίδα. Κάθε στόμα αποτελείται από ένα πόρο και ένα ζεύγος προστατευτικών

κυττάρων. Στόματα απουσιάζουν πάνω από τις νευρώσεις των φύλλων. Τα καταφρακτικά κύτταρα έχουν χλωροπλάστες (Dickison 2000) (Εικόνα 6.2).

Η νευρώση του φύλλου χαρακτηρίζεται από μία σειρά από επιμήκεις νευρώσεις που εκτείνονται παράλληλα και ισαπέχουν κατά μήκος του ελάσματος. Είναι διαφορετικές σε μέγεθος και συγκλίνουν και ενώνονται στην κορυφή του ελάσματος (midvein, large, intermediate and small vascular bundles). Τέλος, υπάρχουν και οι εγκάρσιες νευρώσεις που συνδέουν τις επιμήκεις παράλληλες νευρώσεις.

6.1.2. Ανατομία φύλλου

Το φύλλο του αραβοσίτου χαρακτηρίζεται από την ανατομία τύπου Kranz με ένα στρώμα κυττάρων δεσμικού κολεού (ή παρεγχυματικού κολεού) που περιλαμβάνει ομόκεντρα στρώματα κυττάρων που έχουν ένα έντονο πράσινο χρώμα και αμέσως, γύρω τα κύτταρα του μεσόφυλλου που συνδέονται πιο χαλαρά μεταξύ τους.

Το CO₂ δεσμεύεται και σχηματίζεται το μηλικό στα κύτταρα του μεσόφυλλου το οποίο μεταφέρεται στα κύτταρα του δεσμικού κολεού όπου πραγματοποιείται ο σχηματισμός του γλυκερινικού 3P (Black 1973).

Ο χωροταξικός διαχωρισμός της φωσφορο-ενολο-πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης και καρβοξυλάσης οξυγονάσης της διφωσφορο-ριβουλόζης επιτυγχάνεται από την ανατομική διαφοροποίηση των κυττάρων του μεσόφυλλου και των κυττάρων του δεσμικού κολεού και από τον ειδικό κυτταρικό εντοπισμό των ενζύμων. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην δέσμευση του CO₂ και το σχηματισμό του μηλικού ή ασπαρτικού οξέος εντοπίζονται κυρίως στα κύτταρα του μεσόφυλλου, ενώ το NAD(P)-εξαρτώμενο μηλικό ένζυμο, η rubisco και μερικά ένζυμα του κύκλου του Calvin βρίσκονται αποκλειστικά στα κύτταρα του δεσμικού κολεού (Sheen 1999, Edwards et al. 2001). Οι χλωροπλάστες των κυττάρων του δεσμικού κολεού στερούνται του φωτοσυστήματος II και ως εκ τούτου εμφανίζουν πολύ μικρή έκλυση οξυγόνου (Hatch and Osmond 1976). Κατά συνέπεια, η μη κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων και η ικανότητα για σχηματισμό NADPH περιορίζονται στους χλωροπλάστες των κυττάρων του δεσμικού κολεού.

Η αναγωγή των νιτρικών πραγματοποιείται αποκλειστικά στα κύτταρα του μεσόφυλλου (Moore and Black 1979).

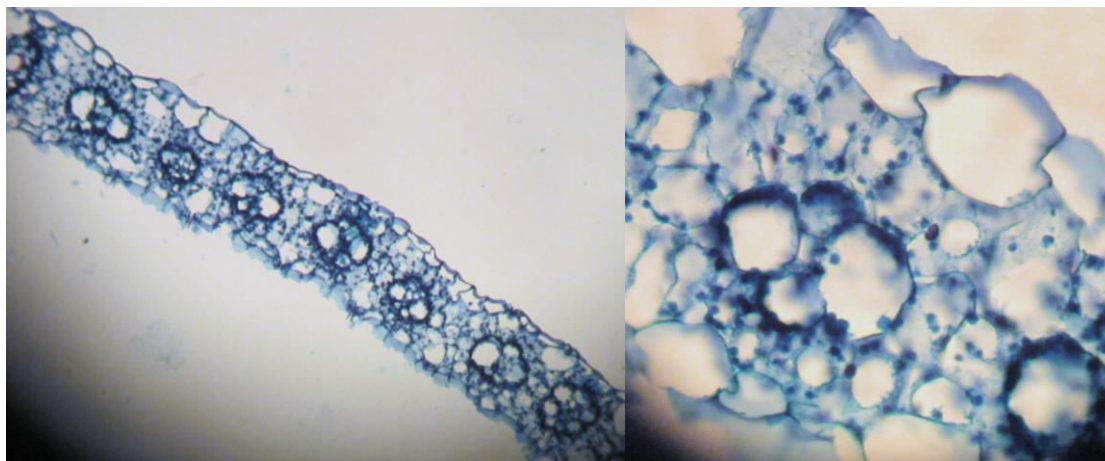
Αυτός ο συνδυασμός ανατομίας και φυσιολογίας και ο επακόλουθος καταμερισμός των εργασιών είναι ένας πρωταρχικός παράγοντας που συμβάλλει στους υψηλούς ρυθμούς της αφομοίωσης του άνθρακα (Black 1973) και της αποτελεσματικής χρησιμοποίησης αζώτου στα C4 φυτά (Brown 1978).

Ο αραβόσιτος που καλλιεργείται σε συνθήκες με υψηλές θερμοκρασίες, υψηλή ένταση φωτός και χαμηλή διαθεσιμότητα νερού, μπορεί να χρησιμοποιήσει το CO₂ πιο αποτελεσματικά από ότι τα C3 φυτά και μπορεί να διατηρήσει ένα φωτοσυνθετικό ρυθμό συγκρίσιμο με εκείνο των C3 φυτών με μείωση της απώλειας νερού (Press 1999).

6.1.3 Αποκρίσεις του υπέργειου μέρους φυτού στην έλλειψη θειικών

Η έλλειψη του θείου μειώνει σημαντικά την αύξηση του υπέργειου και ενισχύει την αύξηση του ριζικού (Bouranis 2006). Η έλλειψη θείου επηρεάζει τη λιγνινοποίηση του φύλλου. Ειδικότερα, το έλασμα του πλήρως εκπτυγμένου 2^{ου} φύλλου των ελλειμματικών σε θείο φυτών παρουσίασε περισσότερο ανεπτυγμένο σκληρέγχυμα και μία έντονη λιγνινοποίηση την 6^η ημέρα της έλλειψης σε σχέση με των φυτών επαρκή σε θείο, κυρίως στα επιδερμικά κύτταρα πάνω από το σκληρέγχυμα καθώς επίσης και στις αγγειακές δεσμίδες. Επίσης, στο έλασμα του πλήρως εκπτυγμένου 4^{ου} φύλλου των ελλειμματικών σε θείο φυτών, οι αγγειακές δεσμίδες ήταν πιο ανεπτυγμένες με περισσότερα και μεγαλύτερα αγγεία του ξύλου σε σύγκριση με τα επαρκή σε θείο φυτά (Bouranis et al. 2004). Η λειτουργική σημασία της

λιγνινοποίησης του φύλλου στα ελλειμματικά σε θείο φυτά είναι άγνωστη. Το θείο συμβάλλει σε, τουλάχιστον, δύο βασικούς μετασχηματισμούς της διαδικασίας της λιγνινοποίησης: απαιτείται CoASH για τη μετατροπή του p-κουμαρικού οξέος σε p-κουμαρυλο-S-CoA, ενώ η S-αδενοσυλ-μεθειονίνη (SAM) χρησιμοποιείται για τη διαδικασία της μεθυλίωσης κατά τη διάρκεια βιοσύνθεσης του φερουλικού και συναπικού οξέος.



Εικόνα 6.2

Εγκάρσια τομή από το μέσο του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου φυτού αραβοσίτου 17 ημέρες μετά τη σπορά.

Τα συμπτώματα της έλλειψης θείου μοιάζουν με τα συμπτώματα της έλλειψης αζώτου, επειδή και το θείο συμμετέχει στο σχηματισμό πρωτεϊνών. Σε αντίθεση με το άζωτο, το θείο δεν είναι πολύ ευκίνητο μέσα στο φυτό. Έτσι, τα συμπτώματα της έλλειψης θείου εμφανίζονται πρώτα στα νεαρά φύλλα. Αρχικά τα φύλλα εμφανίζουν ένα κίτρινο-πράσινο χρωματισμό, ο οποίος αργότερα γίνεται κόκκινος ή πορφυρός. Οι βλαστοί γίνονται ξυλώδεις, λεπτότεροι και κοντότεροι (Εικόνα 6.3). Οι καρποί είναι ελαφρά πράσινοι, χωρίς να είναι χυμώδεις. Η παραγωγή τους περιορισμένη και η ωρίμανση τους καθυστερεί.

6.1.4 Στόχοι του κεφαλαίου 6

Σε αυτό το κεφάλαιο συνεχίζουμε με την μελέτη της δυναμικής της κατανομής του σιδήρου στο φύλλωμα του αραβοσίτου, σε σχέση με την αντίστοιχη κατανομή του θείου υπό συνθήκες έλλειψης θειϊκών. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε λεπτομερής μορφομετρική ανάλυση του φυλλώματος και προσδιορισμός του ρυθμού διαπνοής, ενώ ειδικότερα για το 2^ο φύλλο έγινε πλήρης ανατομική μελέτη του ελάσματος και του κολεού, με έμφαση στην ανίχνευση της παρουσίας σιδήρου στους αποπλασματικούς χώρους.



Εικόνα 6.3

Βλαστός (αριστερά) και έλασμα (δεξιά) φυτού αραβοσίτου όπως εμφανίζεται την 19^η ημέρα έλλειψης θειικών.

6.2. Υλικά και μέθοδοι

Σε αυτή την πειραματική ενότητα διενεργήθηκαν πειράματα χρονικής διάρκειας 26 ημερών. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, όπως το φυτικό υλικό και οι συνθήκες ανάπτυξης των φυταρίων στην υδροπονία, το θρεπτικό διάλυμα, οι μεταχειρίσεις και οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν την 7^η, 17^η και 26^η ημέρα από την σπορά παρέμειναν ίδιες με εκείνες που περιγράφονται διεξοδικά στα «Υλικά και μέθοδοι» του Κεφαλαίου 2.

6.2.1 Κατανομές ξηρής μάζας, σιδήρου και θείου φύλλων

Μετρήθηκαν τα ξηρά βάρη κάθε ελάσματος και κολεού των φύλλων και προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα της ξηρής μάζας του κάθε φύλλου των φυτών που αναπτύχθηκαν στα δύο διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα σε ολικό σίδηρο, ολικό θείο και θειικά τις τρεις ημέρες της δειγματοληψίας (7^η, 17^η και 26^η ημέρα). Ο προσδιορισμός του ολικού σιδήρου με τη μέθοδο της ατομικής απορρόφησης και ο προσδιορισμός του ολικού θείου και θειικών με την θολωσιμετρική μέθοδο περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» του Κεφαλαίου 2.

6.2.2 Μορφομετρική ανάλυση φυλλώματος

Μετρήθηκαν οι παράμετροι: α) το μήκος κάθε ελάσματος και κολεού και β) η αντίστοιχη φυλλική επιφάνεια τις τρεις ημέρες των δειγματοληψιών. Για τον προσδιορισμό του μήκους και της φυλλικής επιφάνειας ελήφθησαν φωτογραφίες των παραπάνω φυτικών οργάνων, τα οποία είχαν τοποθετηθεί πάνω σε βαθμονομημένο χαρτί και χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα επεξεργασίας ImageJ.

6.2.3 Ρυθμός διαπνοής φυτού

Για τον υπολογισμό του ρυθμού διαπνοής, χρησιμοποιήθηκαν 8 δοχεία του 1L το καθένα. Σε κάθε δοχείο προστέθηκε θρεπτικό διάλυμα όγκου 1L ως εξής: στο 1^ο δοχείο πλήρες θρεπτικό διάλυμα, στο 2^ο δοχείο θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο, σε τρία δοχεία 3 φυτά σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (ένα φυτό ανά δοχείο) και σε άλλα τρία δοχεία 3 φυτά σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο. Τα δοχεία δημιουργήθηκαν στην τελευταία αλλαγή του θρεπτικού διαλύματος πριν την δειγματοληψία, δηλαδή την 16^η και 25^η ημέρα από την σπορά και ζυγίστηκαν.

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα φυτά και αντλίες αέρα ώστε να πετύχουμε οξυγόνωση και το στόμιο των δοχείων καλύφθηκε. Μετά την πάροδο μιας ημέρας παραμονής των φυτών στα δοχεία, τις ημέρες των δειγματοληψιών 17^η και 26^η, τα φυτά απομακρύνθηκαν και τα δοχεία ζυγίστηκαν ξανά. Η μάζα του νερού που χάθηκε καταγράφηκε.

6.2.4 Ανατομία ελάσματος και κολεού του 2^{ου} φύλλου

Για να γίνουν οι ανατομικές παρατηρήσεις, ελήφθησαν δείγματα από το νωπό φυτικό υλικό και με την διαδικασία την προσήλωσης και εγκλεισμού τους σε παραφίνη δημιουργήθηκαν μόνιμα παρασκευάσματα του ελάσματος και κολεού του 2^{ου} φύλλου. Οι τομές έγιναν με μικροτόμο από το μέσο του ελάσματος και του κολεού. Τέλος μετά την λήψη φωτογραφιών των τομών αυτών στο οπτικό μικροσκόπιο, μετρήθηκαν οι παράμετροι: α) το πάχος του ελάσματος και του κολεού σε τρία διαφορετικά σημεία και συγκεκριμένα στην κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΚΗΔ), σε ενδιάμεσο σημείο που ορίστηκε ως το σημείο μετά από πέντε ηθμαγγειώδεις δεσμίδες από την κεντρική και στο λεπτότερο σημείο που ορίστηκε ως τρεις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες από το άκρο, β) ο αριθμός των ηθμαγγειωδών δεσμίδων της τομής του ελάσματος και του κολεού και γ) το μέγεθος της κεντρικής ηθμαγγειώδους δεσμίδας, μιας ώριμης ηθμαγγειώδους δεσμίδας όπου είναι εμφανής ο ηθμός και τα αγγεία του ξύλου και μιας νέας ηθμαγγειώδους δεσμίδας της τομής του ελάσματος και του κολεού του 2^{ου} φύλλου. Για τον προσδιορισμό των παραπάνω παραμέτρων ανατομίας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα επεξεργασίας ImageJ και για κάθε μετρούμενη παράμετρο πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Η διαδικασία παραλαβής των μόνιμων παρασκευασμάτων και η χρώση των τομών με safranin-fast green αναφέρεται αναλυτικά στα «Υλικά και Μέθοδοι» του Κεφαλαίου 3.

6.2.5 Εντοπισμός αερεγχύματος

Ο εντοπισμός του αερεγχύματος στα προσηλωμένα δείγματα έγινε με παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε μετά από χρώση των τομών με safranin-fast green. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν τομές στο άκρο, στη μέση και στη βάση του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου την 17^η και 26^η ημέρα. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το ποσοστό αερεγχύματος ως προς την συνολική επιφάνεια της κάθε τομής. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα επεξεργασίας ImageJ.

6.2.6 Ανίχνευση της παρουσίας σιδήρου σε τομές του ελάσματος και κολεού του 2^{ου} φύλλου με τη χρωστική Prussian blue

Για την ανίχνευση της παρουσίας του σιδήρου σε τομές του ελάσματος και κολεού του 2^{ου} φύλλου ελήφθησαν δείγματα από το νωπό φυτικό υλικό και με την διαδικασία της προσήλωσης και εγκλεισμού τους σε παραφίνη δημιουργήθηκαν μόνιμα παρασκευάσματα των παραπάνω φυτικών οργάνων. Οι τομές έγιναν με μικροτόμο από το μέσο του ελάσματος και του κολεού. Η χρώση των τομών αυτών έγινε με την χρωστική Prussian blue. Τόσο η αρχή της μεθόδου όσο και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφονται αναλυτικά στα «Υλικά και Μέθοδοι» του Κεφαλαίου 4.

Συντομογραφίες

E	Έλασμα
E0	Έλασμα εμβρυακού φύλλου
E1	Έλασμα 1 ^{ου} φύλλου
E2	Έλασμα 2 ^{ου} φύλλου
E3	Έλασμα 3 ^{ου} φύλλου
E4	Έλασμα 4 ^{ου} φύλλου
E5	Έλασμα 5 ^{ου} φύλλου
E6	Έλασμα 6 ^{ου} φύλλου
E7	Έλασμα 7 ^{ου} φύλλου
E8	Έλασμα 8 ^{ου} φύλλου
K	Κολεός
K0	Κολεός εμβρυακού φύλλου
K1	Κολεός 1 ^{ου} φύλλου
K2	Κολεός 2 ^{ου} φύλλου
K3	Κολεός 3 ^{ου} φύλλου
K4	Κολεός 4 ^{ου} φύλλου
K5	Κολεός 5 ^{ου} φύλλου
Φ	Φύλλο
Φ0	Εμβρυακό φύλλο
Φ1	1 ^ο φύλλο
Φ2	2 ^ο φύλλο
Φ3	3 ^ο φύλλο
Φ4	4 ^ο φύλλο
Φ5	5 ^ο φύλλο
Φ6,7,8	6 ^ο , 7 ^ο και 8 ^ο φύλλο
ΣΦΕ	Συνολική φυλλική επιφάνεια
ΣΕΕ	Συνολική επιφάνεια ελάσματος
ΚΗΔ	Κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα
ΩΗΔ	Ώριμη ηθμαγγειώδη δεσμίδα
ΝΗΔ	Νέα ηθμαγγειώδη δεσμίδα
Επ	Επίδερμιδα
ΚΜ	Κύτταρα μεσόφυλλου
ΚΚ	Κύτταρα κολεού της δέσμης
ΑΞ	Αγγεία του ξύλου

6.3 Αποτελέσματα

Κατά την έναρξη της μεταχείρισης

Την ημ0 το φύλλωμα του φυτού αποτελείτο από το έλασμα και τον κολεό του εμβρυακού φύλλου και τα ελάσματα του 1^{ου} και 2^{ου} φύλλου. Η ολική ξηρή μάζα ήταν 24 mg, στην οποία τα ελάσματα συνολικά καταλάμβαναν το 76.6% της ξηρής μάζας (Εικόνα 6.4). Η συγκέντρωση του σιδήρου ήταν στο κολεόπτιλο 1,8 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ στο εμβρυακό φύλλο 0,9 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ και στο 1^ο και 2^ο φύλλο 0,7 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ (Εικόνα 6.5). Η συγκέντρωση ολικού θείου ήταν στο 1^ο και 2^ο φύλλο 50,5 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$, στο κολεόπτιλο 45,1 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ και στο εμβρυακό 42,4 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ (Εικόνα 6.6). Η συγκέντρωση θειϊκών ήταν στο 1^ο και 2^ο φύλλο 26,8 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$, έναντι του κολεόπτιλου 9,3 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ και του εμβρυακού φύλλου 3,5 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ (Εικόνα 6.7). Κατά συνέπεια, η συγκέντρωση του οργανικού θείου διαμορφώθηκε στα επίπεδα 35.8 στο κολεόπτιλο, 38.9 στο Φ0 και 23.9 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ στο Φ1.

Το συνολικό μήκος ήταν 23.5 cm από το οποίο στα ελάσματα αντιστοιχούσε το 85% (Εικόνα 6.9). Η συνολική επιφάνεια του φυλλώματος ήταν 14.6 cm^2 από την οποία τα ελάσματα καταλάμβαναν το 83% (Εικόνα 6.10). Από την ανατομική μελέτη σε τομές στο μέσο του ελάσματος και του κολεού του Φ2, το πάχος του ελάσματος στη κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα, σε ενδιάμεσο σημείο και σε λεπτότερο σημείο ήταν 92.8, 49.7 και 40.4 μm αντίστοιχα (Εικόνα 6.11). Ο αριθμός των ηθμαγγειωδών δεσμιδών του ελάσματος ανήλθε σε 44 (Εικόνα 6.12).

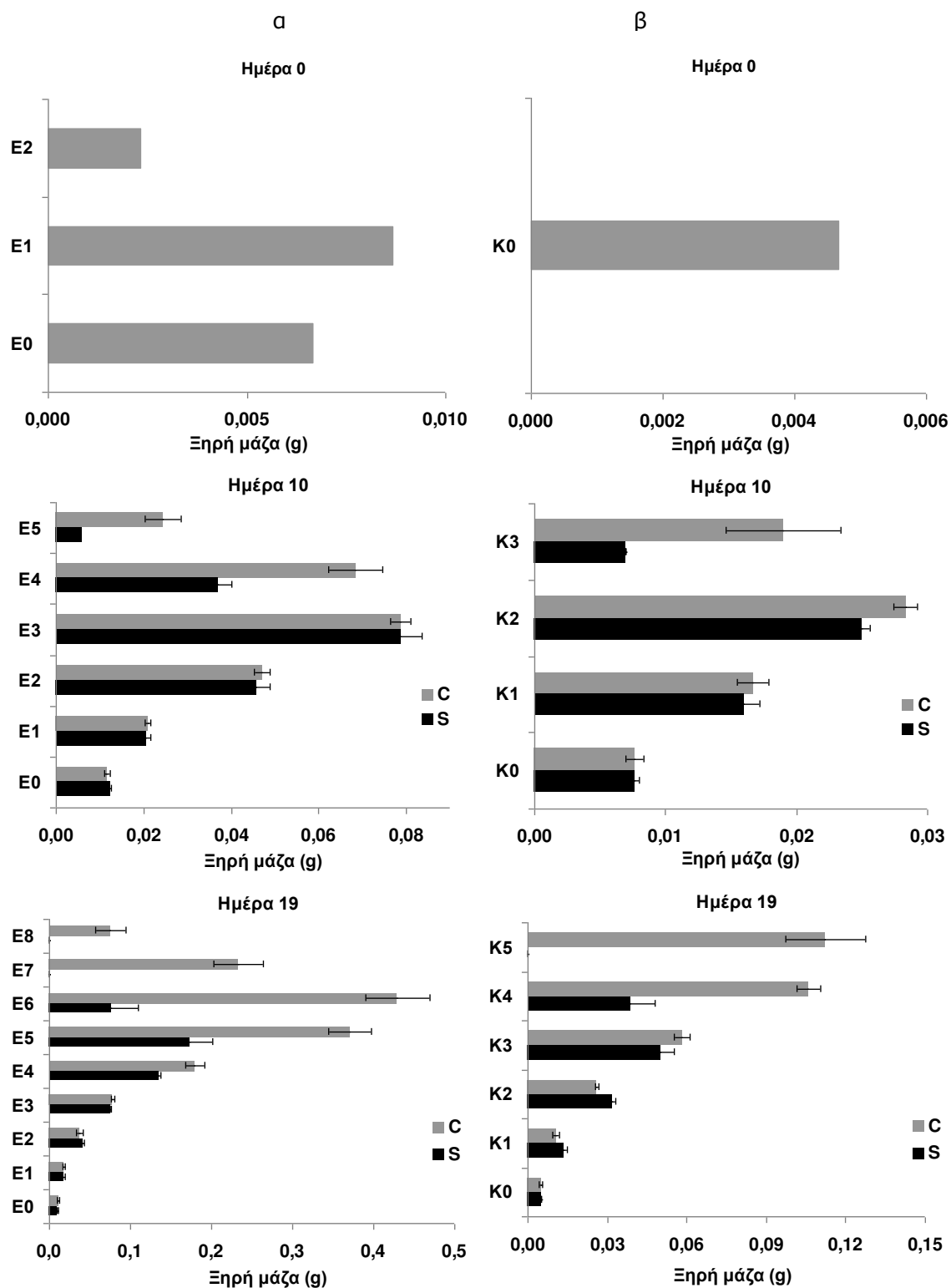
Την 10^η ημέρα της μεταχείρισης

Υπό πλήρη θρέψη, στο υπέργειο προστέθηκαν το έλασμα του 3^{ου}, 4^{ου} και 5^{ου} φύλλου και ο κολεός του 1^{ου}, 2^{ου} και 3^{ου} φύλλου. Η ξηρή μάζα του φυλλώματος ανήλθε στα 323 mg κατανεμημένη κατά 77% στα ελάσματα. Η ποσοστιαία κατανομή της ξηρής μάζας στους κολεούς ήταν 39.7 (K0), 44.2 (K1), 37.6 (K2) και 19.5% (K3), ενώ στα ελάσματα 60.3 (E0), 55.8 (E1), 62.4 (E2), 80.5 (E3), 100 (E4) και 100% (E5) (Εικόνα 6.4).

Η συγκέντρωση του σιδήρου συνολικά σε κάθε φύλλο διαμορφώθηκε στα επίπεδα 0.64 (Φ0), 0.59 (Φ1), 0.54 (Φ2), 1.20 (Φ3) και 0.91 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ (Φ4+Φ5) (Εικόνα 6.5). Η συγκέντρωση του ολικού θείου ανήλθε σε 80.3 στο κολεόπτιλο, 65.7 στο Φ1, 48.3 στο Φ2, 71.9 στο Φ3, 79.4 στο Φ4 και 89.2 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ στο Φ5. Η συγκέντρωση των θειϊκών σε κάθε φύλλο διαμορφώθηκε στα επίπεδα 5.5 (στο κολεόπτιλο), 43.5 (Φ0), 6.4 (Φ1), 19.3 (Φ2), 32.5 (Φ3) και 41.5 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ (Φ4+Φ5) (Εικόνα 6.7). Επομένως η συγκέντρωση του οργανικού θείου ήταν 74.8 (κολεόπτιλο), 22.2 (Φ0), 41.9 (Φ1), 52.6 (Φ2), 47.2 (Φ3) και 47.7 $\mu\text{mol g}^{-1} \Xi\text{M}$ (Φ4+Φ5).

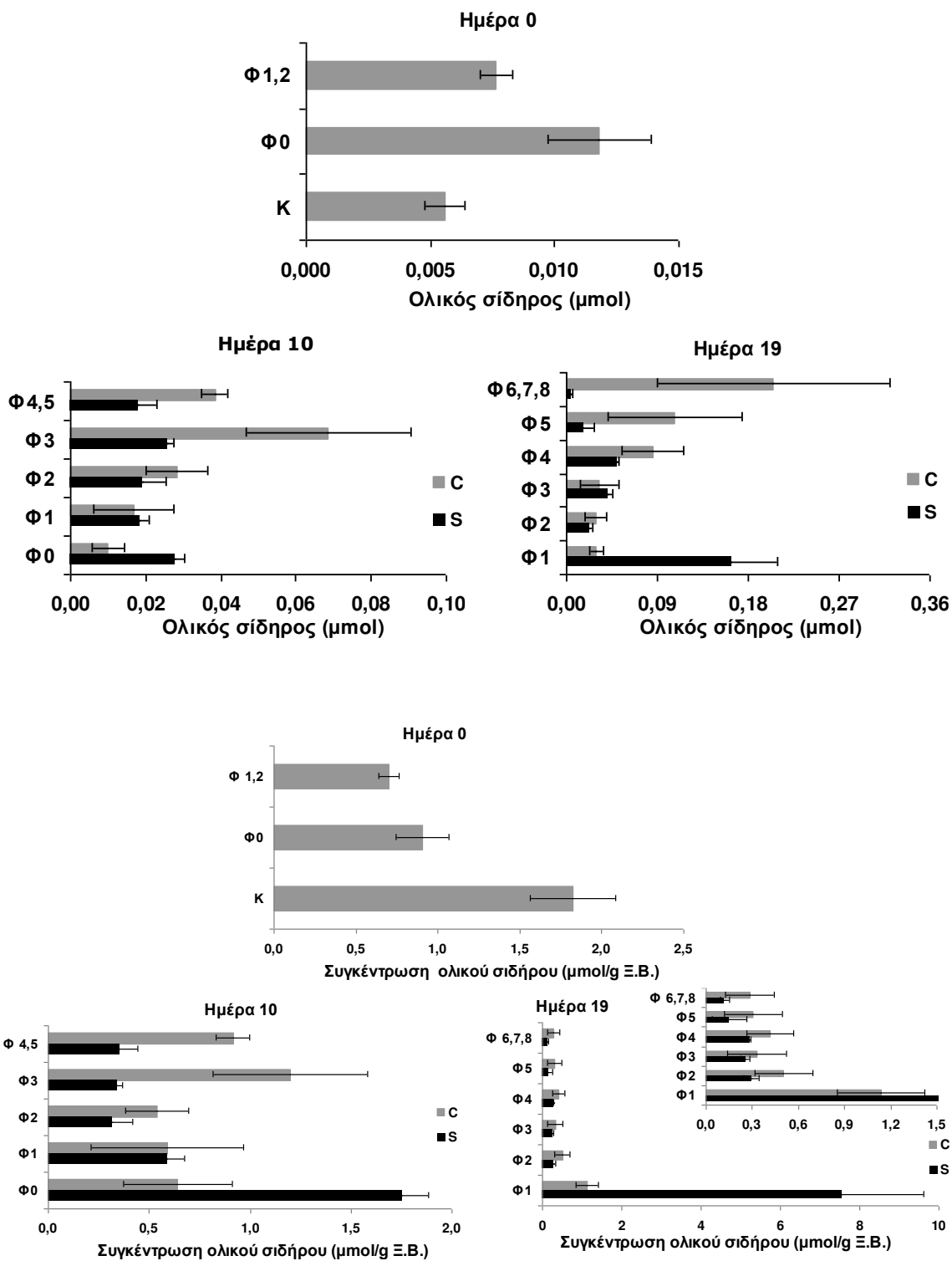
Το συνολικό μήκος των φύλλων διαμορφώθηκε στα 144.2 cm, από το οποίο το 81.1% αντιστοιχούσε στα ελάσματα (Εικόνα 6.9). Η συνολική επιφάνεια ανήλθε στα 177 cm^2 , από την οποία το 83% αντιστοιχούσε στα ελάσματα (Εικόνα 6.10). Ο ρυθμός διαπνοής του φυτού προσδιορίστηκε στα 77,46 $\text{g H}_2\text{O g}^{-1} \Xi\text{BY}^{-1}$ ημέρα⁻¹ (Εικόνα 6.8).

Από τις παραμέτρους μελέτης της ανατομίας του 2^{ου} φύλλου διαπιστώθηκε ότι αυξήθηκε το πάχος του ελάσματος στη κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα, σε ενδιάμεσο σημείο και σε λεπτότερο σημείο (Εικόνα 6.11). Ο αριθμός των ηθμαγγειωδών δεσμιδών αυξήθηκε (Εικόνα 6.12). Παρουσία σιδήρου ανιχνεύθηκε στα κυτταρικά τοιχώματα των αγγείων του ξύλου του ελάσματος και του κολεού και στα κυτταρικά τοιχώματα της επιδερμίδας του κολεού ((Εικόνα 6.16 & Εικόνα 6.17).



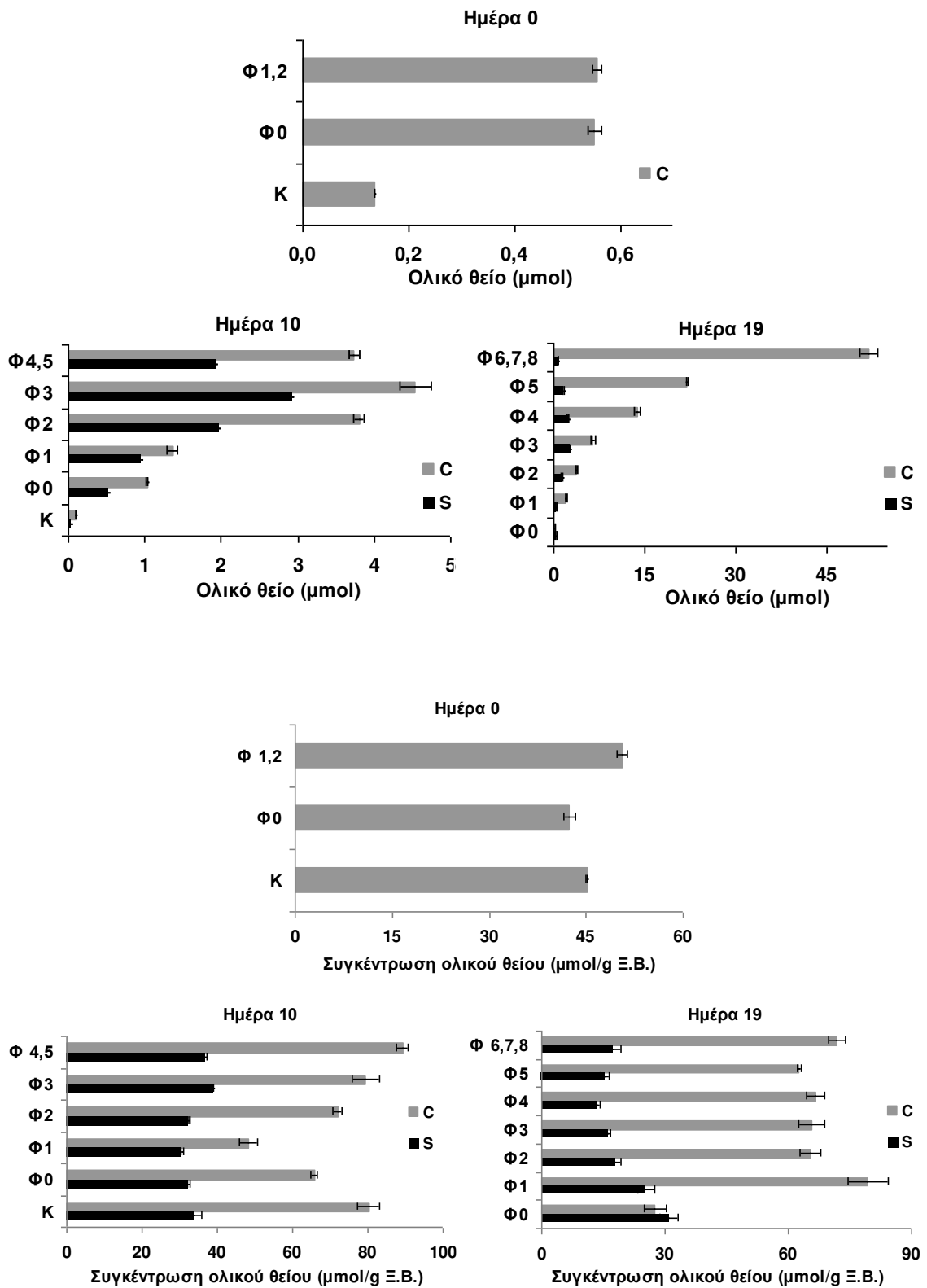
Εικόνα 6.4

Κατανομή της ξηρής μάζας των ελασμάτων (α) και κολεών (β) την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες). Ε.: έλασμα, Κ.: κολεός.



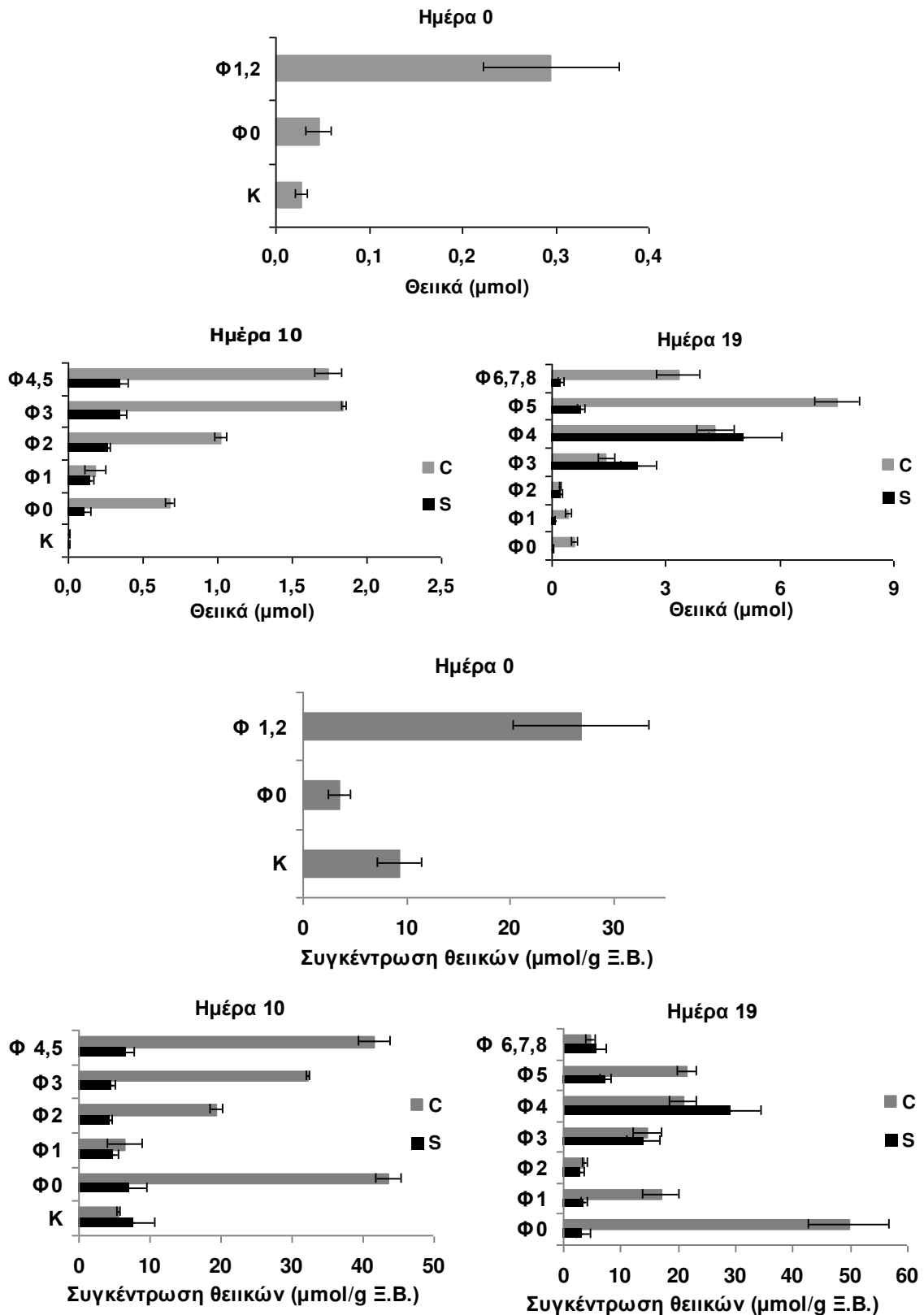
Εικόνα 6.5

Κατανομή της ποσότητας και της συγκέντρωσης του ολικού σιδήρου των φυτικών οργάνων την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



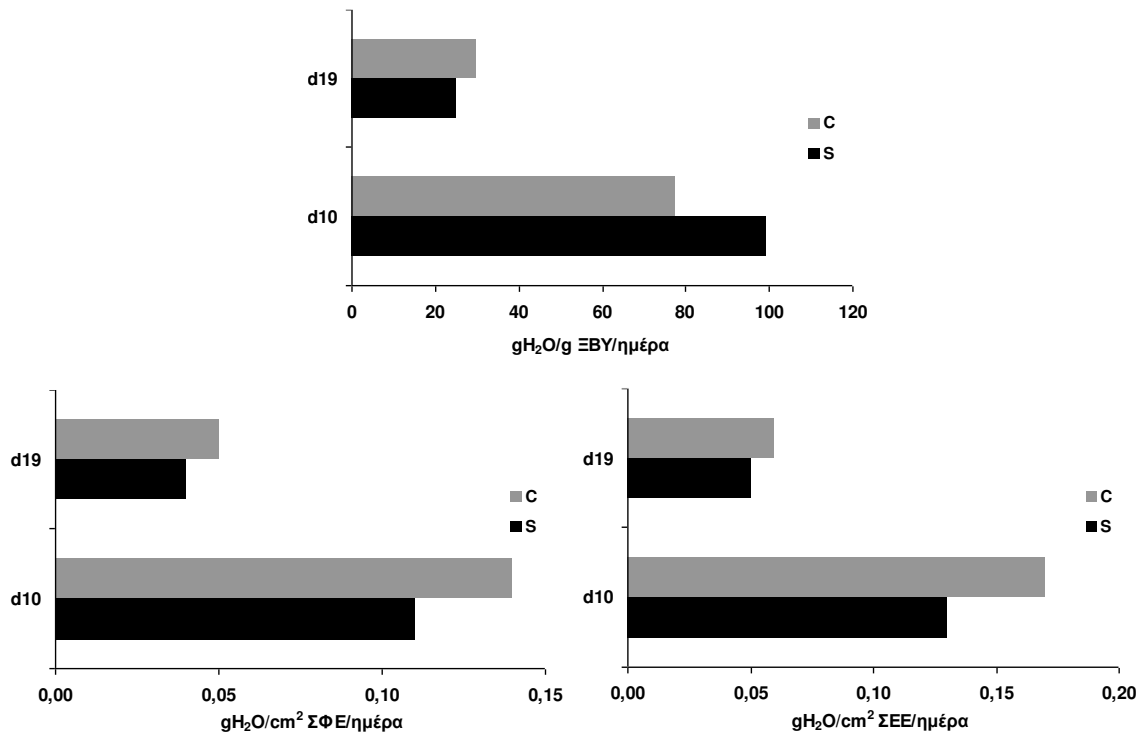
Εικόνα 6.6

Κατανομή της ποσότητας και της συγκέντρωσης του ολικού θείου των φυτικών οργάνων του υπέργειου την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



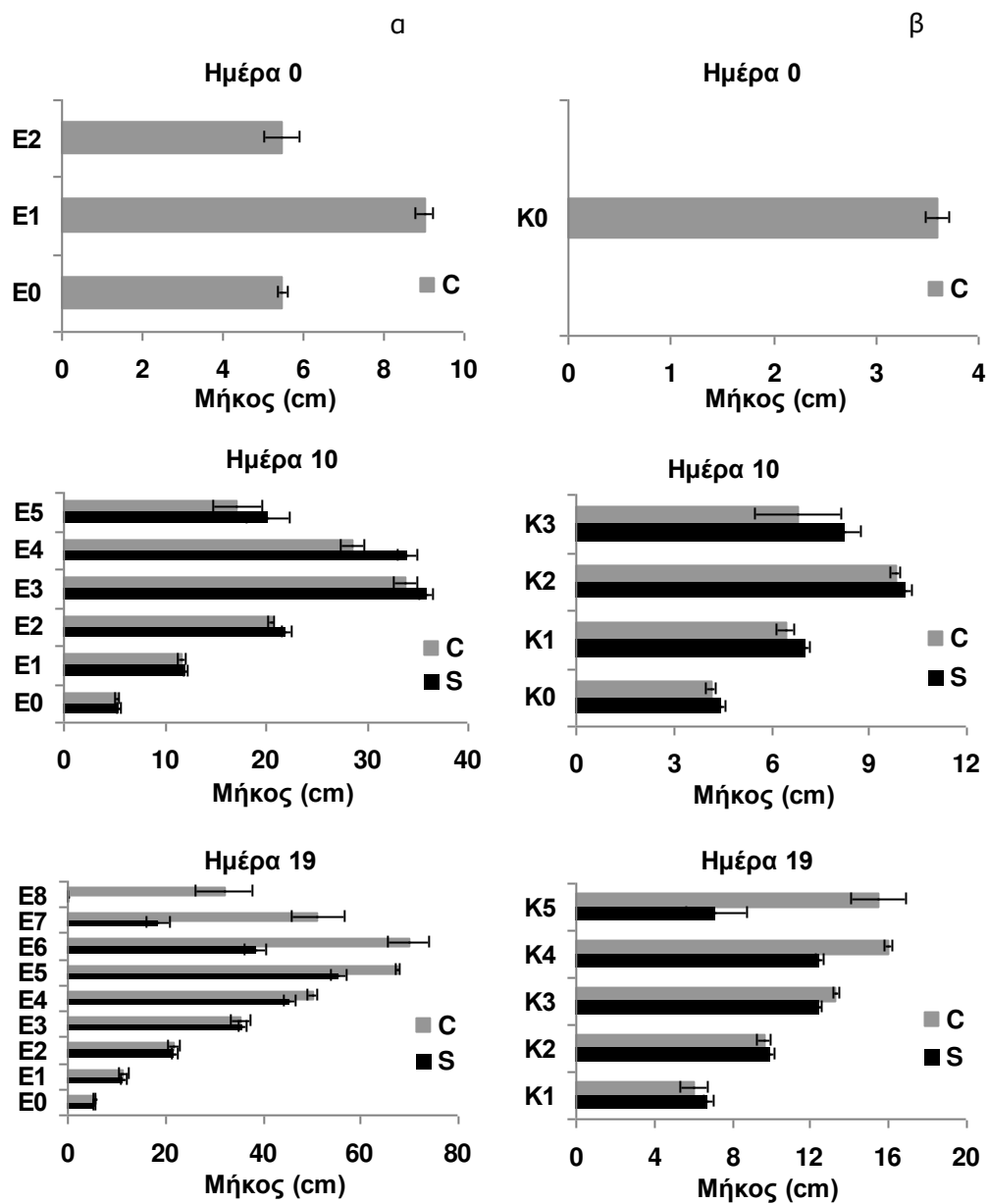
Εικόνα 6.7

Κατανομή της ποσότητας και της συγκέντρωσης των θειικών των φυτικών οργάνων του υπέργειου την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



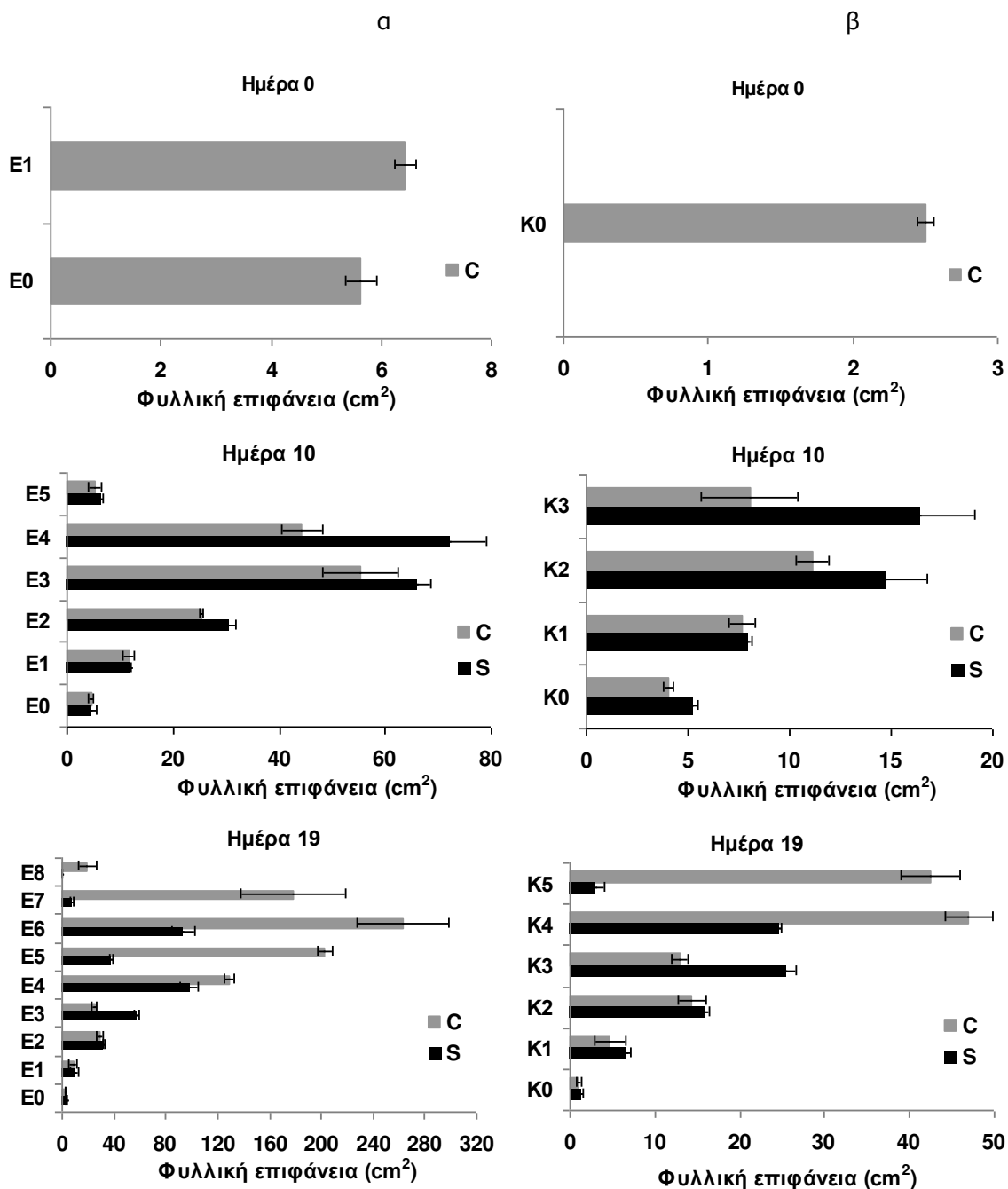
Εικόνα 6.8

Ο ρυθμός διαπνοής σε $\text{g H}_2\text{O/g}$ ξηρού βάρους υπέργειου/ ημέρα, σε $\text{g H}_2\text{O/cm}^2$ συνολικής φυλλικής επιφάνειας/ημέρα και σε $\text{g H}_2\text{O/cm}^2$ συνολικής επιφάνειας ελάσματος/ ημέρα την 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θεικών (S, μαύρες στήλες).



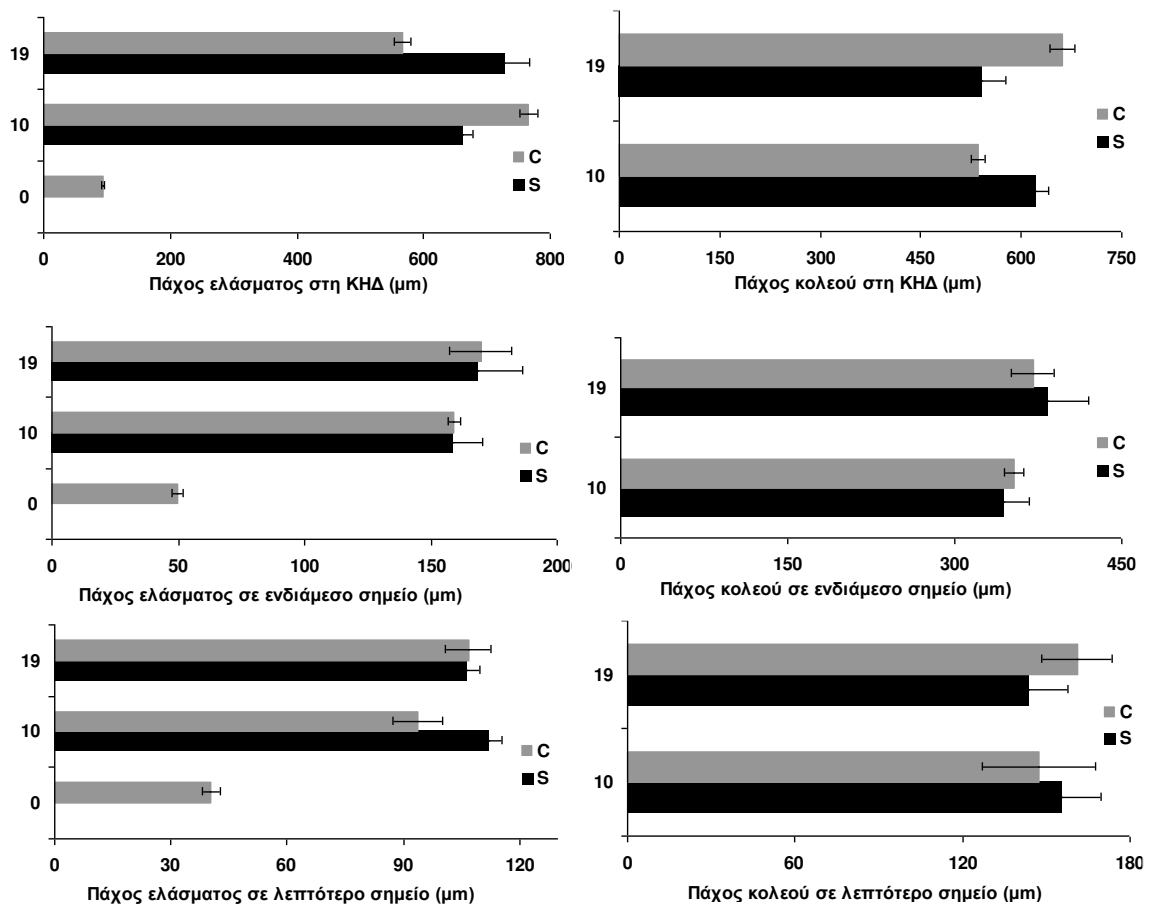
Εικόνα 6.9

Μήκη των ελασμάτων (α) και κολεών (β) την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



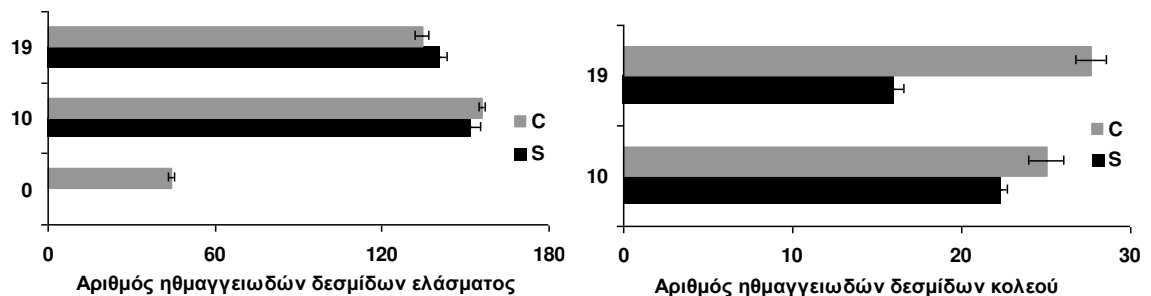
Εικόνα 6.10

Φυλλική επιφάνεια των ελασμάτων (α) και κολεών (β) την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θεικών (S, μαύρες στήλες).



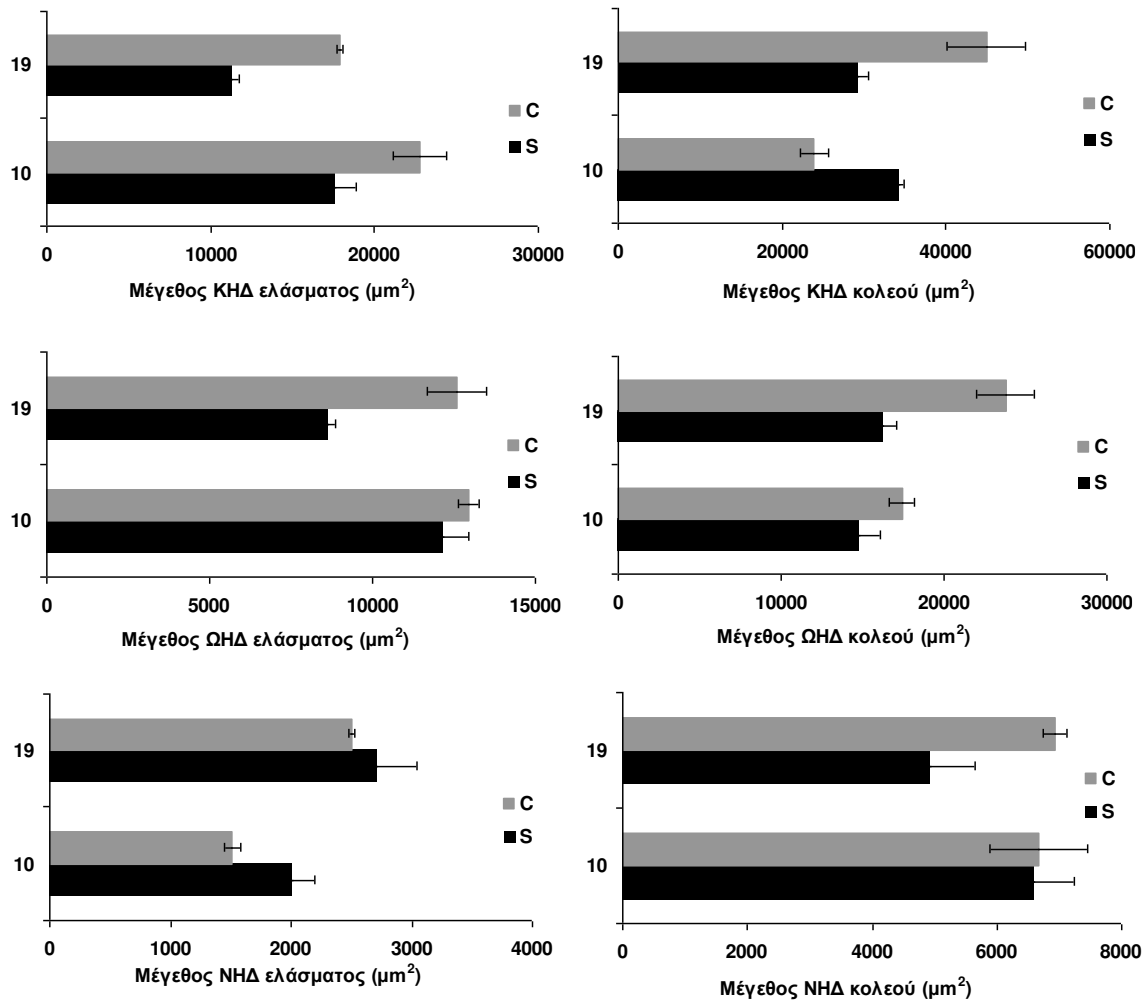
Εικόνα 6.11

Πάχος ελάσματος και κολεού του 2^{ου} φύλλου σε τρία διαφορετικά σημεία της εγκάρσιας τομής: α) στο σημείο της κεντρικής ηθμαγγειώδους δεσμίδας (KHΔ), β) σε ενδιάμεσο σημείο και γ) στο λεπτότερο σημείο την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θεικικών (S, μαύρες στήλες).



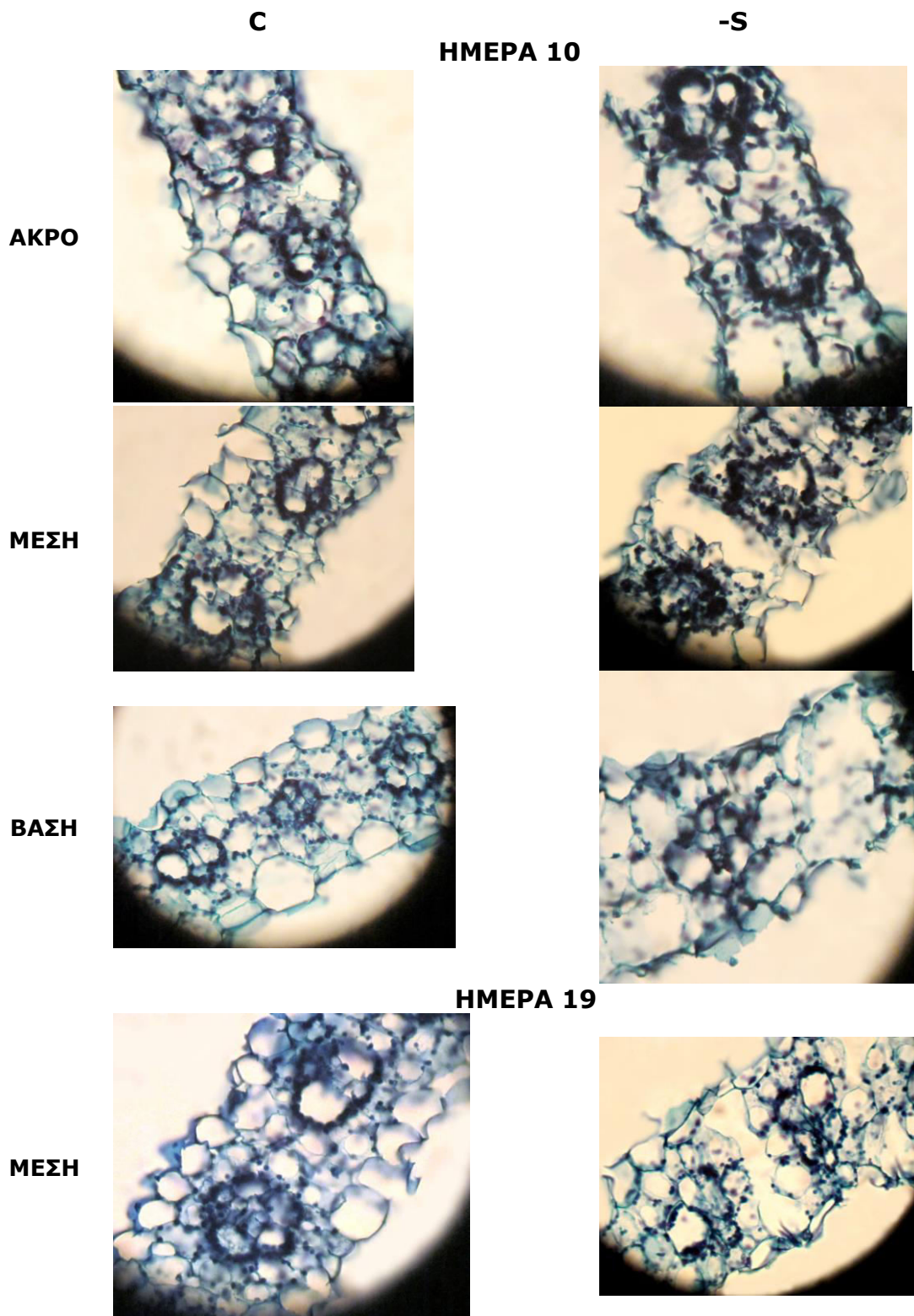
Εικόνα 6.12

Αριθμός ηθμαγγειωδών δεσμίδων του ελάσματος και του κολεού του 2^{ου} φύλλου την 0^η, 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύσσονται υπό συνθήκες έλλειψης θεικικών (S, μαύρες στήλες).



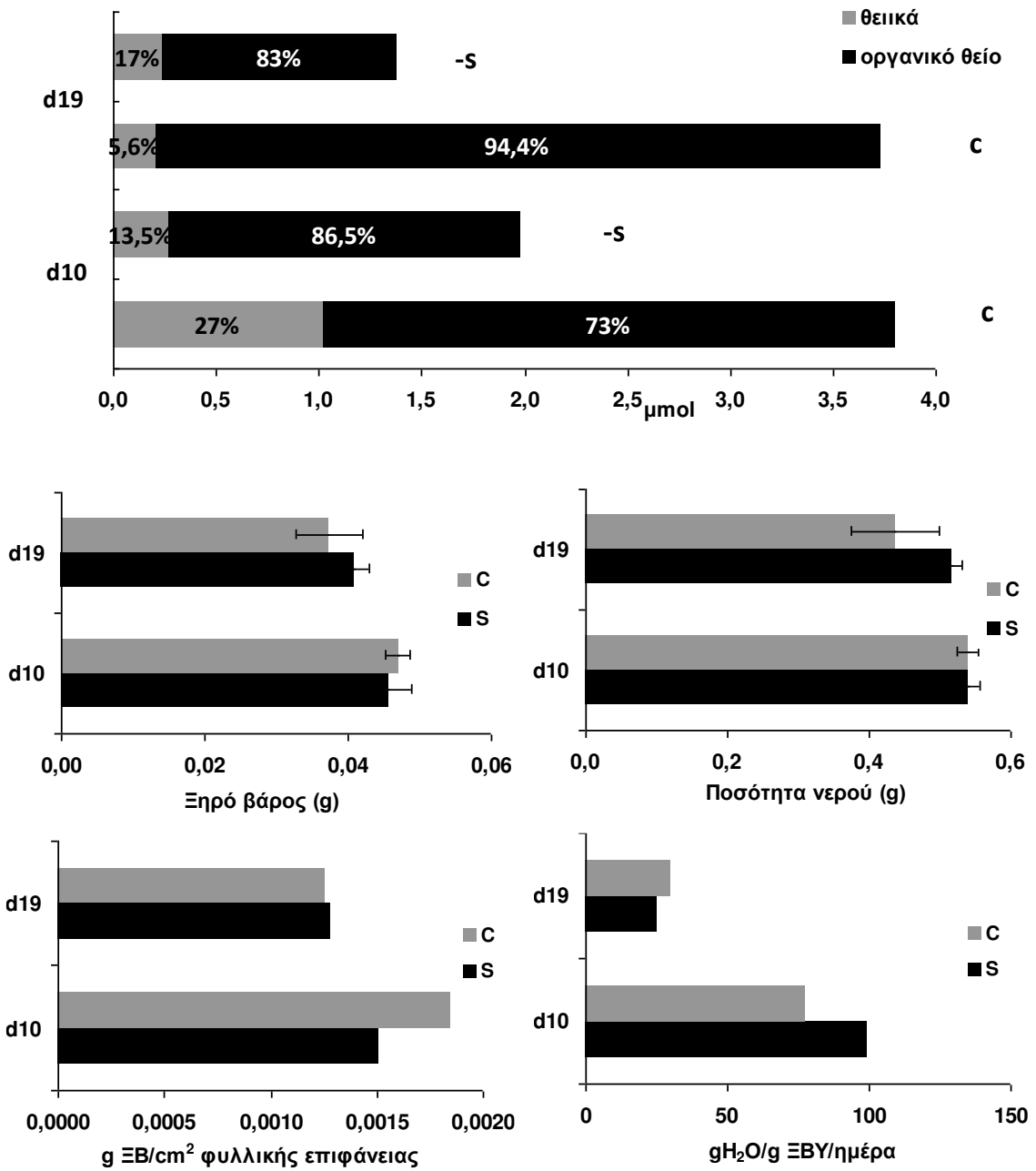
Εικόνα 6.13

Μέγεθος της κεντρικής (ΚΗΔ), της ώριμης (ΩΗΔ) και της νέας ηθμαγγειώδους δεσμίδας (ΝΗΔ) ελάσματος και κολεού του 2^{ου} φύλλου, την 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



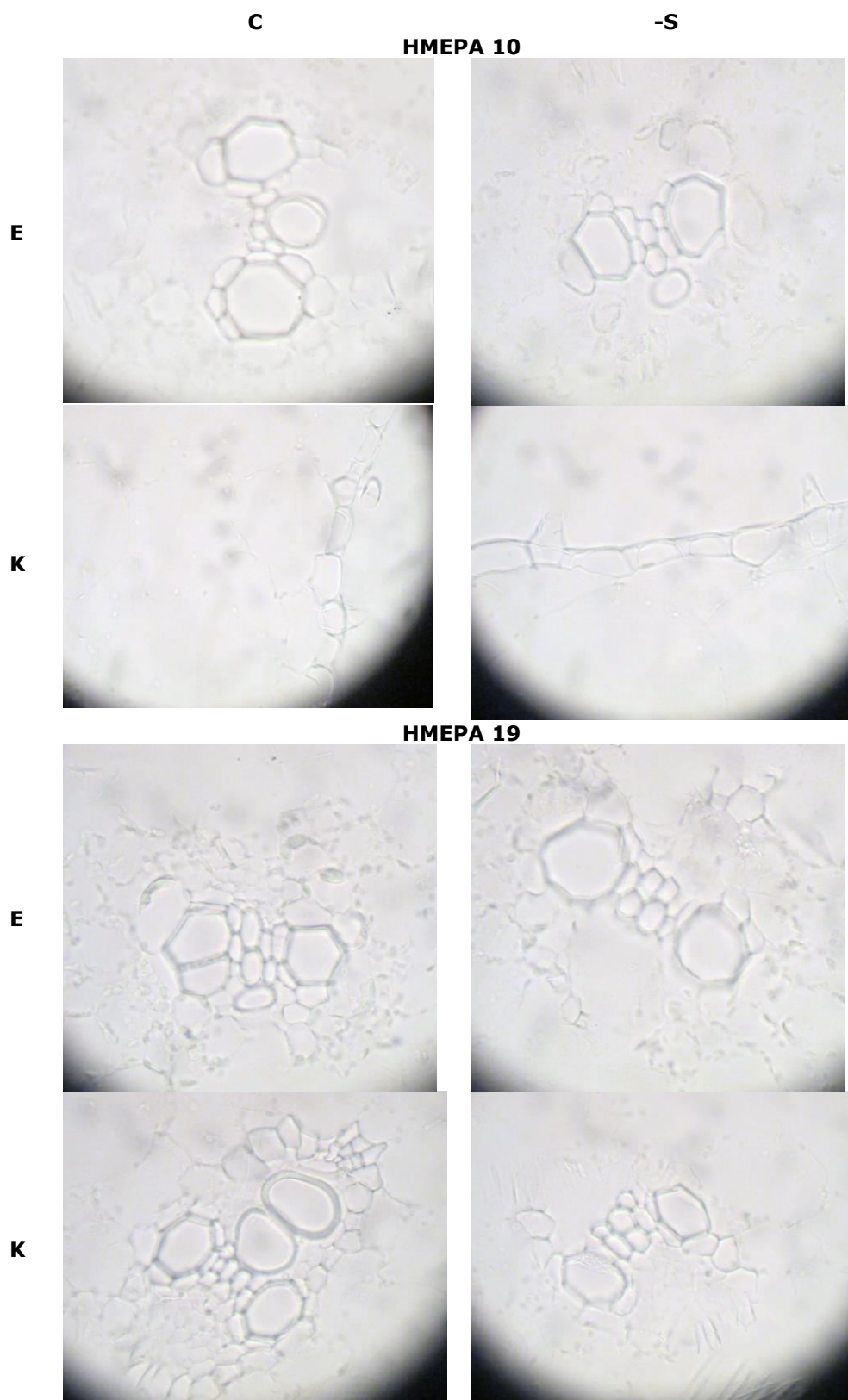
Εικόνα 6.14

Εγκάρσιες τομές του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου, από τις περιοχές του άκρου, της μέσης και της βάσης την 10^η ημέρα της μεταχείρισης και από την περιοχή της μέσης την 19^η ημέρα της μεταχείρισης των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα έναντι των φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών. Η χρώση των τομών έγινε με Safranin-fast green



Εικόνα 6.15

Οι κατανομές θειικών (γκρι στήλες) και οργανικού θείου (μαύρες στήλες) στο 2^ο φύλλο, της Ξηρής μάζας, της ποσότητας νερού και της ειδικής επιφάνειας του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου καθώς επίσης και του ρυθμού διαπνοής του υπέργειου μέρους του φυτού την 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (C, γκρι στήλες) έναντι των φυτών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες έλλειψης θειικών (S, μαύρες στήλες).



Εικόνα 6.16

Παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο τομών από το μέσο του ελάσματος (E) και του κολεού (K) του 2^{ου} φύλλου φυτών αραβοσίτου σε Control και -S φυτά την 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης μετά από χρώση με Prussian blue. Οι περιοχές που ανιχνεύεται σίδηρος βάφονται μπλε.

Control				
Ημέρα 10				
Περιοχή	Επ	ΚΜ	ΚΚ	ΑΞ
Ε				
Κ				

Control				
Ημέρα 19				
Περιοχή	Επ	ΚΜ	ΚΚ	ΑΞ
Ε				
Κ				

-S				
Ημέρα 10				
Περιοχή	Επ	ΚΜ	ΚΚ	ΑΞ
Ε				
Κ				

-S				
Ημέρα 19				
Περιοχή	Επ	ΚΜ	ΚΚ	ΑΞ
Ε				
Κ				

Εικόνα 6.17

Σχηματική απεικόνιση των περιοχών που βάφονται με την χρωστική Prussian blue σε τομές στη μέση του ελάσματος (Ε) και του κολεού (Κ) του 2^{ου} φύλλου την 10^η και 19^η ημέρα της μεταχείρισης σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (Control) έναντι φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θεικών (-S). Επ: επιδερμίδα, ΚΜ: κύτταρα μεσόφυλλου, ΚΚ: κύτταρα κολεού της δέσμης, ΑΞ: αγγεία του ξύλου.

Την ημ10 υπό συνθήκες έλλειψης θεικών, η ξηρή μάζα του φυλλώματος ανήλθε σε 256 mg, μειωμένη κατά 20.7%. Το έλασμα, ο κολεός του εμβρυακού φύλλου, και τα ελάσματα του 1^{ου} και 2^{ου} φύλλου συνέχιζαν να αυξάνονται σε ξηρή μάζα, αλλά υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση έναντι των φυτών-μαρτύρων με λιγότερη ξηρή μάζα στο έλασμα του 4^{ου} (-45.9%) και 5^{ου} (-75.3%) φύλλου και στο κολεό του 3^{ου} φύλλου% (-63.2). Επομένως, η επίδραση της έλλειψης θεικών επηρέασε αρνητικά το ξηρό βάρος των νεαρότερων ελασμάτων και κολεών των φύλλων (Εικόνα 6.4).

Η συγκέντρωση σιδήρου ήταν αυξημένη κατά 173% στο Φ0, δεν επηρεάστηκε στο Φ1 και μειώθηκε στα Φ2 (-41.3%), Φ3 (-71.4%) και Φ4+Φ5 (-61.7%) (Εικόνα 6.5). Η συγκέντρωση του ολικού θείου ήταν μειωμένη σε όλα τα φύλλα: -57.9% στο κολεόπιλο, -50.7% στο Φ0, -36.4% στο Φ1, -54.8% στο Φ2, -50.9% στο Φ3 και -58.4% στο (Φ4+Φ5) (Εικόνα 6.6). Η συγκέντρωση των θειικών βρέθηκε αυξημένη στο κολεόπιλο κατά 40% και μειωμένη σε όλα τα φύλλα κατά 83.7% (Φ0), 25% (Φ1), 77.2% (Φ2), 85.7% (Φ3) και 83.9% (Φ4+Φ5) (Εικόνα 6.7). Αυτές οι μεταβολές σε ολικό θείο και θειικά είχαν ως συνέπεια την διαμόρφωση της εξής εικόνας ως αφορά τις μεταβολές του οργανικού θείου: κολεόπιλο -65.1%, Φ0 14.0%, Φ1 -38.2%, Φ2 -46.6%, Φ3 27.1%, Φ4 36.3%. Κατά συνέπεια το οργανικό θείο αυξήθηκε στο Φ0 και μειώθηκε σε όλα τα υπόλοιπα.

Τα μήκη των φύλλων Φ0, Φ1, Φ2 δεν μεταβλήθηκαν, από το Φ2 αυξήθηκε μόνο το μήκος του κολεού κατά 21%, ενώ τα Φ3 και Φ4 αυξήθηκαν κατά 18.8% και 17.5% αντίστοιχα (Εικόνα 6.9). Η φυλλική επιφάνεια των φυτών -S βρέθηκε να είναι αυξημένη κατά 34% έναντι των φυτών μαρτύρων. Μέσα στο φύλλωμα, η επιφάνεια του Κ0 αυξήθηκε κατά 30%, ενώ δεν επηρεάστηκαν το Ε0 και Φ1. Στο Φ2 αυξήθηκε ο Κ2 κατά 33% και το Ε2 κατά 20%, στο Φ3 αυξήθηκε ο Κ3 κατά 105% και το Ε3 κατά 20%. Ομοίως τα Ε4 και Ε5 αυξήθηκαν κατά 63% και 26% αντίστοιχα (Εικόνα 6.10). Ο ρυθμός διαπνοής του φυτού ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από αυτόν των φυτών μαρτύρων (99,33 gH₂O g⁻¹BY⁻¹ ημέρα⁻¹) (Εικόνα 6.8).

Το πάχος του ελάσματος τόσο στην κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα όσο και σε ενδιάμεσο και σε λεπτότερο σημείο συνέχιζε να αυξάνεται, αλλά σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες το πάχος του ελάσματος στη κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα ήταν μικρότερο, ενώ τόσο το πάχος του ελάσματος στο λεπτότερο σημείο όσο και το πάχος του κολεού στη κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα ήταν μεγαλύτερα (Εικόνα 6.11). Ο αριθμός των ηθμαγγειωδών δεσμιδών του ελάσματος συνέχιζε να αυξάνεται. Σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες ο αριθμός ηθμαγγειωδών δεσμιδών του κολεού των φυτών -S ήταν μικρότερος (Εικόνα 6.12). Συγκρίνοντας τα φυτά -S

με τα φυτά-μάρτυρες ως προς το μέγεθος ηθμαγγειωδών δεσμιδων του ελάσματος διαπιστώθηκε ότι το μέγεθος της κεντρικής ηθμαγγειώδους δεσμιδας ήταν μικρότερο, το μέγεθος μιας ώριμης ηθμαγγειώδους δεσμιδας δεν διαφοροποιήθηκε και το μέγεθος μιας νέας ηθμαγγειώδους δεσμιδας ήταν μεγαλύτερο. Ως προς το μέγεθος ηθμαγγειωδών δεσμιδων του κολεού διαπιστώθηκε ότι το μέγεθος της κεντρικής ηθμαγγειώδους δεσμιδας ήταν μεγαλύτερο, το μέγεθος μια ώριμης ηθμαγγειώδους δεσμιδας ήταν μικρότερο και το μέγεθος μιας νέας ηθμαγγειώδους δεσμιδας δεν διαφοροποιήθηκε (Εικόνα 6.13). Εντοπίστηκε και αερέγχυμα κυρίως σε τομές της μέσης του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου (Εικόνα 6.14) και ανιχνεύτηκε λιγότερος σίδηρος στις ίδιες περιοχές σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες (Εικόνα 6.16 & Εικόνα 6.17).

Την 19^η ημέρα της μεταχείρισης

Υπό πλήρη θρέψη, στο υπέργειο προστέθηκαν το έλασμα του 6^{ου}, 7^{ου} και 8^{ου} φύλλου και ο κολεός του 4^{ου} και 5^{ου} φύλλου. Η ξηρή μάζα του φυλλώματος ανήλθε στα 1753 mg κατανεμημένη κατά 82% στα ελάσματα. Η ποσοστιαία κατανομή της ξηρής μάζας στους κολεούς ήταν 30.6 (K0), 36.8 (K1), 41.1 (K2), 42.7% (K3), 37.1 (K4), 23.3 (K5), ενώ στα ελάσματα 69.4 (E0), 63.2 (E1), 58.9 (E2), 57.3 (E3), 62.9 (E4), 76.7 (E5), και από 100% σε E6, E7 και E8 (Εικόνα 6.4).

Η συγκέντρωση του σιδήρου συνολικά σε κάθε φύλλο διαμορφώθηκε στα επίπεδα 1.14 (Φ1), 0.51 (Φ2), 0.33 (Φ3), 0.42 (Φ4), 0.31 (Φ5) και 0.28 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ΞΜ στα υπόλοιπα (Εικόνα 6.5). Η συγκέντρωση του ολικού θείου ανήλθε σε 49.8 στο Φ0, 79.4 στο Φ1, 65.5 στο Φ2, 65.7 στο Φ3, 66.6 στο Φ4, 62.6 στο Φ5 και 71.8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ΞΜ στο Φ5 (Εικόνα 6.6). Αντίστοιχα, η συγκέντρωση των θειϊκών ανήλθε σε 3.5 στο Φ0, 17 στο Φ1, 3.7 στο Φ2, 14.6 στο Φ3, 20.9 στο Φ4, 21.5 στο Φ5 και 4.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ΞΜ στο Φ5 (Εικόνα 6.7). Άρα η συγκέντρωση του οργανικού θείου διαμορφώθηκε ως εξής: 46.3 (Φ0), 62.4 (Φ1), 61.8 (Φ2), 51.1 (Φ3), 45.7 (Φ4), 41.1 (Φ5), 67.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ΞΜ (Φ6).

Το συνολικό μήκος των φύλλων διαμορφώθηκε στα 260 cm, από το οποίο το 82.3% αντιστοιχούσε στα ελάσματα (Εικόνα 6.9). Η συνολική φυλλική επιφάνεια ήταν 980 cm^2 , της οποίας το 88% καταλάμβανε η επιφάνεια των ελασμάτων (Εικόνα 6.10). Ο ρυθμός διαπνοής του φυτού μειώθηκε κατά το δεύτερο δεκαήμερο (Εικόνα 6.8). Το πάχος του ελάσματος στη κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα μειώθηκε, ενώ σε ενδιάμεσο και σε λεπτότερο σημείο συνέχιζε να αυξάνεται. Ομοίως το πάχος του κολεού τόσο στη κεντρική όσο και σε ενδιάμεσο και σε λεπτότερο σημείο συνέχισε να αυξάνεται (Εικόνα 6.11). Ο αριθμός ηθμαγγειωδών δεσμιδων του ελάσματος μειώθηκε, ενώ του κολεού συνέχισε να αυξάνεται (Εικόνα 6.12). Το μέγεθος της κεντρικής και των ώριμων ηθμαγγειωδών δεσμιδων του ελάσματος μειώθηκε, ενώ των νέων αυξήθηκε. Στο κολεό και οι τρεις τύποι ηθμαγγειωδών δεσμιδων συνέχισαν να αυξάνονται σε μέγεθος (Εικόνα 6.13). Λιγότερος σίδηρος ανιχνεύτηκε στις ίδιες περιοχές του ελάσματος και κολεού του 2^{ου} φύλλου (Εικόνα 6.16 & Εικόνα 6.17).

Υπό συνθήκες έλλειψης θειϊκών, στο υπέργειο είχε προστεθεί το έλασμα του 6^{ου} φύλλου και ο κολεός του 4^{ου} φύλλου. Συνολικά, η μάζα του φυλλώματος ανήλθε σε 670 mg, άρα μειωμένη κατά 62%. Η μείωση ήταν λιγότερη στους κολεούς (-56%) έναντι των ελασμάτων (-63%). Εντός του φυλλώματος, δεν επηρεάστηκαν οι ξηρές μάζες των ελασμάτων E0, E1, E2, E3 και του κολεού K0, ενώ τα ελάσματα E4, E5 και E6 μειώθηκαν κατά 25, 53.1 και 82.1%. Οι κολεοί K1 και K2 εμφάνισαν αυξημένη ξηρή μάζα κατά 28.1 και 23.1%, ενώ οι K3 και K4 μειωμένη κατά 13.7 και 63.5%. Επομένως, η μεταχείριση επηρέασε αρνητικά το ξηρό βάρος των τριών ανώτερων (νεότερων) ελασμάτων και των δύο ανώτερων κολεών και καθυστέρησε την εμφάνιση του ελάσματος του 7^{ου} και 8^{ου} φύλλου και του κολεού του 5^{ου} φύλλου. Αντίθετα ενίσχυσε τους κολεούς των μεσαίων φύλλων και δεν επηρέασε τα υπόλοιπα (κατώτερα ελάσματα) (Εικόνα 6.4).

Η συγκέντρωση του σιδήρου ήταν αυξημένη κατά 564.2% στο Φ0 και μειωμένη στα υπόλοιπα κατά 41.7% στο Φ1, 23.3% στο Φ2, 31.8% στο Φ3, 49.9% στο Φ5 και κατά 57.0% στο Φ6 (Εικόνα 6.5). Η συγκέντρωση του ολικού θείου μειώθηκε προοδευτικά με το ύψος: -30.1% (Φ), -68.1% (Φ1), -72.3% (Φ2), -75.6% (Φ3), -79.6 (Φ4), -75.5% (Φ5) και -76.0% (Φ6) (Εικόνα 6.6). Η συγκέντρωση των θειϊκών ήταν αυξημένη στο νεότερο φύλλο Φ6 κατά 23.9%, δεν μεταβλήθηκε στο Φ0, ενώ ήταν μειωμένη σε όλα τα υπόλοιπα κατά 79.4% (Φ1), 16.2% (Φ2), 66.4% (Φ3), 67.5% (Φ4) και 66.0% (Φ5) (Εικόνα 6.7). Όσον αφορά το οργανικό θείο, βρέθηκε να έχει προοδευτικά όλο και λιγότερη συγκέντρωση κατά ύψος: -40.8% (Φ0), -65.0% (Φ1), -75.7% (Φ2), -78.2% (Φ3), -85.1% (Φ4), -80.4% (Φ5), -82.8% (Φ6).

Το συνολικό μήκος των φύλλων βρέθηκε μειωμένο κατά 37%, το συνολικό των κολεών μειωμένο κατά 29% και των ελασμάτων κατά 38%. Επομένως τα μήκη των ελασμάτων επηρεάστηκαν περισσότερο. Το μήκος των φύλλων Φ0 έως Φ3 δεν μεταβλήθηκε, στο Φ4 μειώθηκε το μήκος του κολεού κατά 22.1%, στο Φ5 μειώθηκε το μήκος του κολεού και του ελάσματος κατά 54% και 18% αντίστοιχα, στο Φ5 και στο Φ6 μειώθηκαν τα μήκη των ελασμάτων κατά 45% και 64% αντίστοιχα (Εικόνα 6.9). Η συνολική επιφάνεια των φύλλων -S ήταν μειωμένη κατά 59%. Περισσότερο επηρεάστηκαν οι επιφάνειες των φύλλων (-61%) έναντι των κολεών (-40%). Η ανάλυση της διαβάθμισης των μεταβολών της επιφάνειας έδειξε μικτό τρόπο. Στο Φ0 αυξήθηκε τόσο η επιφάνεια του κολεού (43%) όσο και του ελάσματος (59%). Των K1 και K2 αυξήθηκαν κατά 44% και 12%, ενώ στο Φ3 αυξήθηκε τόσο η επιφάνεια του K3 (97%) όσο και του E3 (131%). Στις υψηλότερες θέσεις εμφανίστηκαν μόνο μειώσεις: K4: -47%, E4: -24%, K5: -93%, E5: -81%, E6: -64%, E7: -96% (Εικόνα 6.10). Ο ρυθμός διαπνοής των φυτών μειώθηκε και ήταν μικρότερος από τον αντίστοιχο των φυτών μαρτύρων κατά 16% (Εικόνα 6.8).

Το πάχος του ελάσματος στη κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα και σε ενδιάμεσο σημείο συνέχιζε να αυξάνεται και στο λεπτότερο σημείο μειώθηκε και διαφοροποιήθηκε σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες το πάχος του ελάσματος στην κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα που ήταν μεγαλύτερο. Το πάχος του κολεού στη κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα και στο λεπτότερο σημείο μειώθηκε, ενώ σε ενδιάμεσο σημείο συνέχισε να αυξάνεται και διαφοροποιήθηκε το πάχος του κολεού στη κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα και στο λεπτότερο σημείο που ήταν μικρότερο (Εικόνα 6.11). Ο αριθμός των ηθμαγγειωδών δεσμίδων τόσο του ελάσματος όσο και του κολεού μειώθηκε και διαφοροποιήθηκε μόνο ο αριθμός των ηθμαγγειωδών δεσμίδων του κολεού που ήταν μικρότερος (Εικόνα 6.12). Το μέγεθος της κεντρικής και των ώριμων ηθμαγγειωδών δεσμίδων του ελάσματος μειώθηκαν, ενώ των νέων ηθμαγγειωδών δεσμίδων συνέχισε να αυξάνεται με αποτέλεσμα να διαφοροποιηθεί το μέγεθος της κεντρικής και των ώριμων ηθμαγγειωδών δεσμίδων του ελάσματος που ήταν μικρότερο. Το μέγεθος της κεντρικής και των νέων ηθμαγγειωδών δεσμίδων του κολεού μειώθηκε, ενώ των ώριμων ηθμαγγειωδών δεσμίδων συνέχισε να αυξάνεται και διαφοροποιήθηκε το μέγεθος τόσο της κεντρικής όσο και των ώριμων και των νέων ηθμαγγειωδών δεσμίδων που ήταν μικρότερο (Εικόνα 6.13). Το αερέγχυμα μειώθηκε (Εικόνα 6.14) και με τη χρωστική Prussian blue ανιχνεύτηκε λιγότερος σίδηρος, όπως και την 17^η ημέρα και δεν διαφοροποιήθηκε έναντι των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 6.16 & Εικόνα 6.17).

6.4 Συζήτηση

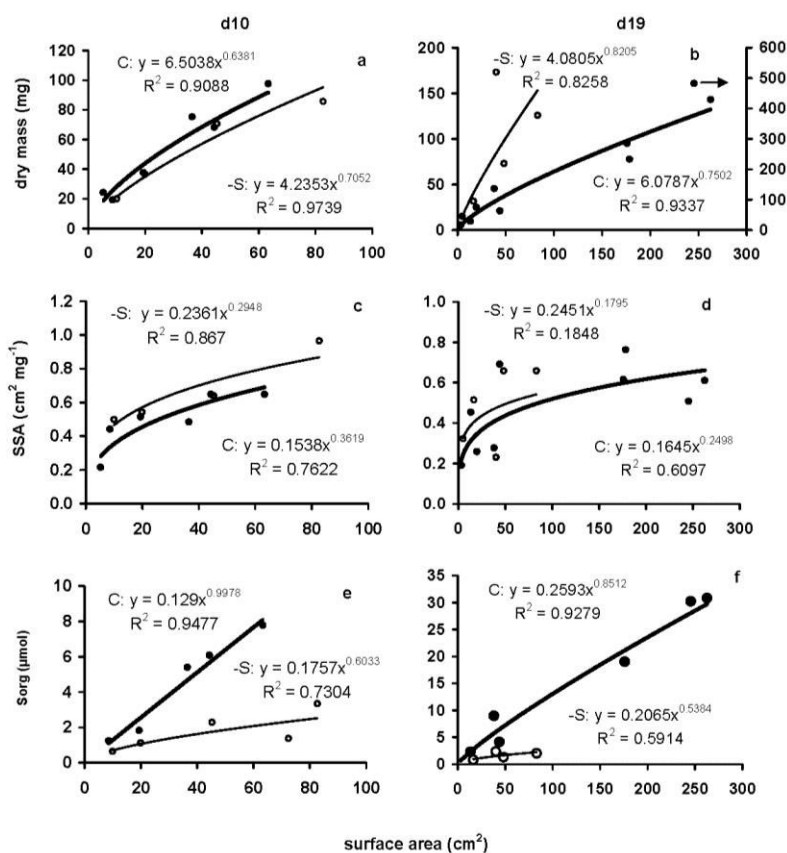
Σε αυτό το κεφάλαιο παραθέσαμε τα αποτελέσματα της δυναμικής της κατανομής του σιδήρου στο φύλλωμα του αραβοσίτου, σε σχέση με την αντίστοιχη κατανομή του θείου υπό συνθήκες έλλειψης θειϊκών. Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι η επίδραση της έλλειψης θείου οδήγησε σε διαφορετική κατανομή σιδήρου του φυλλώματος και σε σημαντική μείωση της ποσότητας σιδήρου στα ανώτερα

(ηλικιακά νεότερα) φύλλα του υπέργειου των φυτών -S. Η έλλειψη θειικών επηρέασε αρνητικά την ποσότητα ολικού θείου και θειικών, κατά το αναμενόμενο. Παρά την έλλειψη, το ολικό θείο και τα θειικά συνέχιζαν να αυξάνονται. Η αύξηση αυτή οφείλεται στις προσμίξεις θειικών που περιείχαν τα άλατα που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές θρεπτικών ιόντων, όπως αναλυτικά περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.

Σε αυτό το κεφάλαιο τέθηκε επίσης ως στόχος η λεπτομερής μορφομετρική ανάλυση του φυλλώματος και ο προσδιορισμός του ρυθμού διαπνοής, ενώ ειδικότερα για το 2^ο φύλλο έγινε πλήρης ανατομική μελέτη του ελάσματος και του κολεού, με έμφαση στην ανίχνευση της παρουσίας σιδήρου στους αποπλασμικούς χώρους. Ο ρυθμός διαπνοής των φυτών -S ήταν μεγαλύτερος την ημ10 (28%) και μικρότερος την ημ19 (16%). Η ξηρή μάζα του υπέργειου των φυτών -S ήταν μικρότερη κατά 28,7%, η ξηρή μάζα του ριζικού συστήματος δεν διαφοροποιήθηκε, η φυλλική τους επιφάνεια ήταν μεγαλύτερη και το πάχος του ελάσματος και του κολεού του κάθε φύλλου δεν διέφερε σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα. Ένας σημαντικός παράγοντας που επιδρά στην διαπνοή του φυτού είναι τα ανατομικά χαρακτηριστικά του φύλλου. Ένα από τα ανατομικά χαρακτηριστικά που διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων είναι ότι τα ελλειμματικά σε θείο φυτά εμφάνισαν αερέγχυμα στο έλασμα του 2^{ου} φύλλου, με το ποσοστό του αερεγγύματος ως προς την συνολική επιφάνεια της τομής να φτάνει το 5%. Το αερέγχυμα εμφανίστηκε μεταξύ των ηθμαγγειωδών δεσμιδων προφανώς με λύση των κυττάρων του μεσόφυλλου. Αυτό σημαίνει ότι μειώθηκε η αντίσταση διάχυσης των υδρατμών που παρεμβάλλεται στην έξοδο του νερού από τα φύλλα και συνεπώς η απώλεια νερού ήταν μεγαλύτερη. Επιπλέον σε συνθήκες έλλειψης θειικών τα χαρακτηριστικά του αγγειακού συστήματος των ριζών τροποποιήθηκαν κατάλληλα με αύξηση της επιφάνειας των αγγείων του ξύλου (δεδομένα κεφαλαίου 3), προφανώς για να επιφέρουν αύξηση της ροής του νερού και των θρεπτικών συστατικών στα φύλλα. Αυτό ενδεχομένως επέφερε και μεγαλύτερη φυλλική επιφάνεια. Το άμεσο επακόλουθο αυτών των αλλαγών ήταν η αύξηση του ρυθμού διαπνοής. Την 19^η ημέρα της μεταχείρισης, η ξηρή μάζα και η φυλλική επιφάνεια του υπέργειου μέρους των φυτών -S ήταν σημαντικά μικρότερη κατά 62,2% και 57,5% αντίστοιχα, η ξηρή μάζα του ριζικού ήταν επίσης μικρότερη κατά 37,8%, ενώ το πάχος του ελάσματος και κολεού δεν διαφοροποιήθηκε και το αερέγχυμα περιορίστηκε σημαντικά αυτήν την ημέρα (0,7%). Αυτά τα αποτελέσματα δικαιολογούν την μείωση του ρυθμού διαπνοής του υπέργειου μέρους του φυτού αραβοσίτου σε απόκριση της έλλειψης θειικών.

Η συσχέτιση της ξηρής μάζας με την αντίστοιχη επιφάνεια των φύλλων (Εικόνα 6.18) έδειξε ότι το ίδιο ποσό ξηρής μάζας φύλλου αντιστοιχούσε σε υψηλότερη επιφάνεια στα φύλλα -S. Αυτή η συσχέτιση προσομοιώθηκε με συνάρτηση δύναμης. Την ημ10 ο εκθέτης της καμπύλης προσομοίωσης -S βρέθηκε μειωμένος κατά 3%, ενώ την ημ19 κατά 19%. Οι συντελεστές συσχέτισης με τη συνάρτηση δύναμης βρέθηκαν πολύ υψηλοί, γεγονός που δηλώνει ικανοποιητική προσέγγιση της συσχέτισης με αυτή τη συνάρτηση. Αυτή η συσχέτιση οδήγησε στο επόμενο βήμα που ήταν ο υπολογισμός της ειδικής επιφάνειας, δηλαδή επιφάνειας ανά μονάδα ξηρής μάζας που επενδύθηκε για τη δημιουργία των φύλλων. Η συσχέτιση ανάμεσα στην επιφάνεια και στην ειδική επιφάνεια έδειξε ότι αυξανόμενης της επιφάνειας αυξάνεται η ειδική επιφάνεια. Στην περίπτωση των φύλλων -S ίδια επιφάνεια αντιστοιχούσε σε υψηλότερη ειδική επιφάνεια, δηλαδή περισσότερη επιφάνεια ανά μονάδα ξηρής μάζας. Η συσχέτιση προσομοιώθηκε με την συνάρτηση δύναμης ικανοποιητικά στην περίπτωση της ημ10, όχι όμως στην περίπτωση της ημ19 όπου στην περίπτωση των φύλλων -S ο συντελεστής συσχέτισης ήταν πολύ χαμηλός λόγω της μεγάλης διασποράς των σημείων. Παρ' όλα αυτά όμως η καμπυλότητα των καμπυλών προσομοίωσης ήταν περίπου ίδια, γεγονός που δείχνει ότι η τάση παρέμεινε η ίδια. Η μέγιστη ειδική επιφάνεια που

προκύπτει από τα διαγράμματα είναι $0.8 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$, ενώ η πιο πιθανή $0.6-0.7 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$.



Εικόνα 6.18

Συσχετίσεις της ξηρής μάζας των φύλλων (a, b), της ειδικής επιφάνειας των φύλλων (SSA, c, d) και της συσσωρευμένης ποσότητας οργανικού θείου (Sorg, e, f) με την αντίστοιχη επιφάνεια. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα φύλλο (κολεό + έλασμα) και κάθε τιμή έχει εκφραστεί ανά φύλλο. Γεμάτοι κύκλοι και έντονη γραμμή δηλώνουν μεταχείριση υπό πλήρη θρέψη. Ανοικτοί κύκλοι και λεπτή γραμμή δηλώνουν μεταχείριση έλλειψης θειικών. Το βέλος δείχνει τον αντίστοιχο άξονα.

Η συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας του οργανικού θείου που επενδύθηκε ανά φύλλο και της ειδικής επιφάνειας αυτού του φύλλου έδειξε ότι υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση, η οποία προσομοιώθηκε πολύ καλά με την συνάρτηση δύναμης. Στην περίπτωση των φυτών μαρτύρων ο εκθέτης δείχνει ότι αυτή η συσχέτιση είναι γραμμική (η τιμή του εκθέτη είναι πολύ κοντά στη μονάδα), ενώ στην περίπτωση των φυτών -S ο εκθέτης είναι υψηλότερος της μονάδας, γεγονός που υποδηλώνει ότι όσο αυξάνει η ποσότητα του οργανικού θείου, η δημιουργία φυλλικής επιφάνειας αποκλίνει από την γραμμικότητα προς την κατεύθυνση δημιουργίας περισσότερης επιφάνειας (εκθέτες μεγαλύτεροι της μονάδας, ημ10=1.27, ημ19=1.1) και μάλιστα την ημ10 αυτή η τάση ήταν ισχυρότερη (μεγαλύτερος εκθέτης μεταξύ των δύο).

Οι μελετούμενες παράμετροι των εγκάρσιων τομών που πραγματοποιήθηκαν στην μέση του ελάσματος και του κολεού του 2^{ου} φύλλου ήταν το πάχος σε τρία επιλεγμένα σημεία, δηλαδή στην κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα, σε ενδιάμεσο σημείο και κοντά στο άκρο, ο αριθμός των ηθμαγγειωδών δεσμιδών του ελάσματος και του κολεού και το μέγεθος των αντιστοίχων τριών ηθμαγγειωδών δεσμιδών της κεντρικής ηθμαγγειώδους δεσμιδας, μιας ώριμης και μιας νέας ηθμαγγειώδους δεσμιδας. Για το έλασμα των φυτών -S διαπιστώθηκε ότι τόσο το πάχος στην κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα όσο και το μέγεθος της ήταν μικρότερο την ημ10, ενώ ήταν μεγαλύτερα την ημ19. Το πάχος σε ενδιάμεσο σημείο και το μέγεθος της ώριμης ηθμαγγειώδους δεσμιδας δεν διαφοροποιήθηκαν

μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων την ημ10 και το πάχος ήταν περίπου το ίδιο, ενώ το μέγεθος της ώριμης ηθμαγγειώδους δεσμίδας μικρότερο την ημ19. Το πάχος κοντά στο άκρο και το μέγεθος της νέας ηθμαγγειώδους δεσμίδας ήταν μεγαλύτερα την ημ10, ενώ δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά την ημ19. Ο αριθμός των ηθμαγγειωδών δεσμίδων δεν διέφερε σημαντικά τις δύο ημέρες των δειγματοληψιών.

Για τον κολεό των φύλλων -S σε σχέση με τα φύλλα μάρτυρες διαπιστώθηκε ότι το πάχος στην κεντρική ηθμαγγειώδη δεσμίδα και το μέγεθος της ήταν μεγαλύτερα την ημ10 και μικρότερα την ημ19. Το πάχος σε ενδιάμεσο σημείο δεν διαφοροποιήθηκε και το μέγεθος της ώριμης ηθμαγγειώδους δεσμίδας ήταν μικρότερο και τις δύο ημέρες των δειγματοληψιών. Το πάχος κοντά στο άκρο και το μέγεθος της νέας ηθμαγγειώδους δεσμίδας δεν διαφοροποιήθηκαν την ημ10, ενώ ήταν μικρότερα την ημ19. Ο αριθμός των ηθμαγγειωδών δεσμίδων ήταν μικρότερος τις δύο ημέρες των δειγματοληψιών.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ανέδειξαν το σημαντικό εύρημα του εντοπισμού αερεγχύματος στο έλασμα του 2^{ου} φύλλου υπό -S. Μέχρι τώρα, ο σχηματισμός αερεγχύματος υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων και συγκεκριμένα του αζώτου, φωσφόρου και θείου έχει αναφερθεί μόνο σε βλαστογενείς ρίζες αραβοσίτου με λύση των κυττάρων του φλοιώδους παρεγχύματος. Στη παρούσα εργασία, σε τομές που πραγματοποιήθηκαν στο μέσο του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου εμφανίστηκαν μεγάλοι κενοί χώροι μεταξύ των ηθμαγγειωδών δεσμίδων με λύση των κυττάρων του μεσόφυλλου και τις δύο ημέρες των δειγματοληψιών. Ακόμη παρατηρήθηκε ότι το αερέγχυμα περιορίζεται σημαντικά την ημ19. Την ημ10 διαπιστώθηκε ότι η έλλειψη θεικών για 10 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία αερεγχύματος στο έλασμα του δεύτερου φύλλου. Η ειδική επιφάνεια του ελάσματος του δεύτερου φύλλου των φυτών -S είναι μικρότερη σε σχέση με των φυτών μαρτύρων, ενώ ο ρυθμός διαπνοής του υπέργειου μέρους των φυτών -S είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες. Την ημ19 από τη σπορά διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό αερεγχύματος ανά συνολική επιφάνεια τομής μειώνεται σε σχέση με το ποσοστό που μετρήθηκε την ημ10. Το ξηρό βάρος του ελάσματος του δεύτερου φύλλου στα φυτά -S είναι μεγαλύτερο συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες. Η ειδική επιφάνεια του ελάσματος του δεύτερου φύλλου στα φυτά -S δεν διαφέρει από εκείνη των φυτών μαρτύρων, ενώ ο ρυθμός διαπνοής του υπέργειου μέρους των φυτών -S είναι λιγότερος σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες.

Η ανίχνευση της παρουσίας σιδήρου στον αποπλασματικό χώρο του ελάσματος και του κολεού του 2^{ου} φύλλου έδειξε ότι κυρίως την ημ10 και λιγότερο την ημ19 τα επίπεδα σιδήρου στον αποπλασματικό χώρο του ελάσματος και του κολεού των φυτών -S ήταν αρκετά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα των φυτών-μαρτύρων.

6.5 Συμπεράσματα

Υπό συνθήκες έλλειψης θεικών η ξηρή μάζα των ανώτερων φύλλων (ελασμάτων και κολεών) επηρεάζεται περισσότερο από την έλλειψη θεικών. Τα φυτά -S συσσωρεύουν ολικό σίδηρο στα φύλλα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Περισσότερος σίδηρος συσσωρεύεται στα κατώτερα φύλλα και λιγότερος στα ανώτερα φύλλα. Τα φυτά -S συνεχίζουν να συσσωρεύουν ολικό θείο το πρώτο δεκαήμερο, ενώ περιορίζεται η ποσότητα ολικού θείου το δεύτερο δεκαήμερο και συνεχίζει να συσσωρεύεται μόνο στο 4^ο και 5^ο φύλλο. Το πρώτο δεκαήμερο η ποσότητα του ολικού θείου του υπέργειου φαίνεται να κατανέμεται κυρίως στα ανώτερα φύλλα, ενώ ανά g ξηρής μάζας το ολικό θείο συσσωρεύεται σχεδόν εξίσου σε όλα τα φύλλα. Η ποσότητα θεικών αυξάνεται κατά το πρώτο δεκαήμερο στο εμβρυακό, 1^ο και 2^ο φύλλο και μειώνεται το δεύτερο δεκαήμερο. Τα φυτά -S φαίνεται να μην διαφοροποιούνται έναντι των φυτών-μαρτύρων ως προς το μήκος του ελάσματος και του κολεού το πρώτο δεκαήμερο. Η μεταχείριση επηρεάζει αρνητικά το μήκος των ανώτερων φύλλων (ελασμάτων και κολεών) το δεύτερο δεκαήμερο. Τα φυτά -S υπερτερούν ως προς την φυλλική επιφάνεια του

ελάσματος και του κολεού έναντι των φυτών μαρτύρων το πρώτο δεκαήμερο. Η φυλλική επιφάνεια των ανώτερων φύλλων (ελασμάτων και κολεών) επηρεάζεται περισσότερο από την έλλειψη θεικών το δεύτερο δεκαήμερο. Ο ρυθμός διαπνοής των φυτών -S είναι μεγαλύτερος το πρώτο δεκαήμερο και μικρότερος το δεύτερο δεκαήμερο σε σχέση με των φυτών-μαρτύρων. Εντοπίστηκε αερέγχυμα στο μέσο του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου των φυτών -S και τα δύο δεκαήμερα με μείωση αερεγχύματος το δεύτερο δεκαήμερο. Πρόκειται για την 3^η περίπτωση εντοπισμένου σχηματισμού αερεγχύματος υπό συνθήκες -S. Λιγότερος σίδηρος ανιχνεύεται στο αποπλασμικό χώρο του ελάσματος και του κολεού σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες.

Κεφάλαιο 7

**Η δυναμική της κατανομής του εσωτερικού σιδήρου
και η συνολική εικόνα της στρατηγικής αντιμετώπισης της
έλλειψης θειϊκών**

7.1 Σκοπός του κεφαλαίου

Λαμβάνοντας υπόψη ότι από τα ευρήματα του 4^{ου} κεφαλαίου υπολογίστηκε η ποσότητα του εσωτερικού σιδήρου, σε αυτό το κεφάλαιο αναπροσαρμόζουμε και συζητάμε την κατανομή του εσωτερικού σιδήρου σε αντιδιαστολή με την κατανομή του ολικού σιδήρου που παρουσιάστηκε στο 2^ο κεφάλαιο, δηλαδή θα εξετάσουμε την κατανομή του εσωτερικού σιδήρου σε ολόκληρο το φυτό, στο ριζικό σύστημα και στο υπέργειο μέρος του φυτού κατά τις ημέρες δειγματοληψίας υπό πλήρη θρέψη και υπό τροφопενία θείου.

Παράλληλα, τα προηγούμενα κεφάλαια ανέδειξαν νέες πλευρές της στρατηγικής αντιμετώπισης της τροφопενίας και στο κεφάλαιο αυτό επιχειρούμε σύνθεση της συνολικής εικόνας της ομοιόστασης του σιδήρου υπό συνθήκες έλλειψης θειικών σε συνάρτηση με την ομοιόσταση του θείου και τις αλλαγές που αυτή επάγει στην αρχιτεκτονική του φυτού του αραβοσίτου.

7.2 Η δυναμική του εσωτερικού σιδήρου

7.2.1 Ολόκληρο φυτό

Η συγκέντρωση του εσωτερικού σιδήρου του φυτού ήταν μεταξύ 3 και 6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ΞM στα φυτά μάρτυρες, ενώ μειώθηκε στα 0.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ΞM κατά την ημ19 υπό -S, συγκέντρωση που αντιστοιχούσε σε συσσώρευση εσωτερικού σιδήρου ανά φυτό κατά 15.5 φορές έναντι αυτής κατά 143 φορές στα φυτά μάρτυρες. Επομένως κατά το 2^ο δεκαήμερο της μεταχείρισης -S η παρουσία του εσωτερικού σιδήρου υστερούσε δραματικά με όποιο τρόπο και αν εκφραζόταν ποσοτικά (Πίνακας 7.1). Η μοριακή αναλογία ολικού θείου προς εσωτερικό σίδηρο ήταν 27,7:1 έναντι 30,8:1 υπό -S ή κατ' αντιστοιχία η αναλογία οργανικού θείου προς εσωτερικό σίδηρο ήταν 18,3:1 έναντι 22,5:1 υπό -S (Πίνακας 7.2).

7.2.2 Υπέργειο μέρος

Ο ολικός σίδηρος του υπέργειου μέρους του φυτού στις δύο μεταχειρίσεις είναι ο εσωτερικός σίδηρος όπου έχει υπολογιστεί και περιγράφεται αναλυτικά στα αποτελέσματα του Κεφαλαίου 2.

7.2.3 Ριζικό σύστημα

Η κατανομή του εσωτερικού σιδήρου στο ριζικό σύστημα υπό -S υστέρησε δραματικά κατά την ημ19 με την συγκέντρωσή του να διαμορφώνεται στα 1.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ΞM . Αυτό σημαίνει ότι υπήρξε καθαρή απώλεια εσωτερικού σιδήρου από το ριζικό σύστημα κατά το 2^ο δεκαήμερο της μεταχείρισης. Ο εσωτερικός σίδηρος αυξήθηκε στα φυτά -S κατά 23.7 φορές έναντι 422 στα φυτά μάρτυρες κατά την ημ19, ενώ η κατανομή του εσωτερικού σιδήρου στο ριζικό διαμορφώθηκε στο 47% στα φυτά -S έναντι 91% στα φυτά μάρτυρες (Πίνακας 7.1). Ως αποτέλεσμα αυτών των μεταβολών, ο μοριακός λόγος θείου προς εσωτερικό σίδηρο ήταν αυξημένος στα φυτά -S κατά την ημέρα 19 (19.3:1 έναντι 8.6:1 στην περίπτωση ολικού θείου προς εσωτερικό σίδηρο ή 16.2:1 έναντι 2.3:1 στην περίπτωση οργανικού θείου προς εσωτερικό σίδηρο) (Πίνακας 7.2).

7.3 Η συνολική εικόνα

Τα φυτά -S χάνουν σίδηρο κυρίως από το ριζικό σύστημα και λιγότερο από το υπέργειο μέρος κατά το δεύτερο δεκαήμερο. Συγκεκριμένα στο ριζικό σύστημα, ο σίδηρος εμφάνισε δραματική μείωση το 2^ο δεκαήμερο, με την πρωτογενή να έχει κατά 8% λιγότερη μείωση έναντι όλων των υπολοίπων τύπων ρίζας. Είναι

αξιοσημείωτο ότι κατά το 2^ο δεκαήμερο ο σίδηρος μειωνόταν αυξανόμενου του μήκους σε όλους τους τύπους ρίζας. Η συγκέντρωση του ολικού σιδήρου μέσα σε κάθε τύπο ρίζας δεν ήταν ομοιόμορφη ούτε υπό πλήρη θρέψη, ούτε υπό το καθεστώς της σοβαρής έλλειψης θειϊκών ιδιαίτερος το 1^ο δεκαήμερο, ενώ το 2^ο δεκαήμερο διαφοροποιήθηκε η πρωτογενής ρίζα έναντι των υπολοίπων. Στο σπόρο υπό συνθήκες -S η συγκέντρωση του σιδήρου μειώθηκε δραματικά ήδη από την ημ10, ενώ την ημ19 ο σπόρος ήταν πρακτικά εξαντλημένος από σίδηρο. Στο μεσοκοτύλιο-κόμβο η μείωση της συγκέντρωσης του σιδήρου ήταν μάλλον ήπια την ημ10 και δραματική την ημ19. Τα φυτά -S συσσωρεύουν σίδηρο στα φύλλα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η επίδραση της έλλειψης θείου οδήγησε σε διαφορετική κατανομή του σιδήρου του φυλλώματος με περισσότερο σίδηρο να συσσωρεύεται στα κατώτερα φύλλα και λιγότερο στα ανώτερα φύλλα.

Πίνακας 7.1

Η κινητική της συσσώρευσης του εσωτερικού σιδήρου σε υπέργειο μέρος, ριζικό σύστημα και ολόκληρο φυτό. Fe: συνολικός σίδηρος, INTi: εσωτερικός σίδηρος.

		ημ0	C		-S	
			ημ10	ημ19	ημ10	ημ19
Ολόκληρο φυτό						
Fe	μmol	0.089	2.648	9.133	1.836	0.610
INTi	μmol	0.036	2.004	5.136	1.694	0.559
INTi/Fe	%	40.4	75.7	56.2	92.3	91.6
INTi / INTi ₀		1	55.7	142.7	47.1	15.5
[INTi]	μmol gDM ⁻¹	0.2	6.4	3.0	4.7	0.6
Υπέργειο μέρος						
INTi	μmol	0.025	0.162	0.489	0.110	0.301
INTi / INTi ₀		1	6.5	19.6	4.4	12.1
% INTi _{φυτού}		69.3	8.1	9.5	6.5	53.8
[INTi]	μmol gDM ⁻¹	0.9	0.8	0.3	0.5	0.5
Ριζικό σύστημα						
INTi	μmol	0.011	1.842	4.647	1.585	0.261
INTi / INTi ₀		1	167.5	422.5	144.1	23.7
% INTi _{φυτού}		30.7	91.9	90.5	93.5	46.2
[INTi]	μmol gDM ⁻¹	0.4	24.2	21.5	18.2	1.2

Η έλλειψη θείου επηρέασε αρνητικά την συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσμου σιδήρου και την συγκέντρωση του εξωτερικού σιδήρου σε όλους τους τύπους ριζών. Η συγκέντρωση του αποπλασμικού σιδήρου διαφοροποιήθηκε μεταξύ των τύπων ριζών: στην ΠΡ ήταν μικρότερη έναντι των φυτών μαρτύρων όλες τις ημέρες των δειγματοληψιών, στις ΔΡ ήταν μεγαλύτερη την 1^η, 2^η και 3^η ημέρα και μικρότερη την ημέρα 0^η, 10^η και 19^η της μεταχείρισης, στις ΒΡ1 ήταν μεγαλύτερη την 1^η και 3^η ημέρα και στις ρίζες του μεσοκοτυλίου την 10^η ημέρα της μεταχείρισης σε σχέση με των φυτών-μαρτύρων. Στα φυτά -S, ο εσωτερικός σίδηρος είναι περισσότερος από τον εξωτερικό και αποπλασμικό στην ΠΡ, στις ΔΡ και στις ΡΜ και λιγότερος στις ΒΡ την 10^η ημέρα, ενώ είναι περισσότερος μόνο στην ΠΡ και λιγότερος στους άλλους τύπους ριζών την 19^η ημέρα.

Πίνακας 7.2

Οι λόγοι ολικού θείου (Stot) προς εσωτερικό σίδηρο και οργανικού θείου (Sorg) προς εσωτερικό σίδηρο (INTi), σε αντιπαραβολή με τους αντίστοιχους του ολικού σιδήρου (Fe).

	ημ0	C		-S	
		ημ10	ημ19	ημ10	ημ19
Ολόκληρο φυτό					
Stot:Fe	58.8	12.3	15.7	7.2	26.2
Sorg:Fe	42.8	6.0	10.4	5.8	19.1
Stot:INTi	136.5	16.3	27.7	7.7	30.8
Sorg:INTi	99.5	7.9	18.3	6.2	22.5
Υπέργειο μέρος					
Stot:Fe	49.8	89.8	205.3	76.1	32.0
Sorg:Fe	35.0	56.0	169.9	64.8	20.9
Stot:INTi	49.8	89.8	205.3	76.1	32.0
Sorg:INTi	35.0	56.0	169.9	64.8	20.9
Ριζικό σύστημα					
Stot:Fe	99.9	7.0	5.3	2.2	17.3
Sorg:Fe	76.0	2.6	1.4	1.6	14.6
Stot:INTi	74.0	8.5	8.6	2.3	19.3
Sorg:INTi	56.3	3.1	2.3	1.6	16.2

Τα φυτά της μεταχείρισης συνεχίζουν να συσσωρεύουν θείο σε μικρές ποσότητες τόσο σε υπέργειο όσο και σε ριζικό καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος παρά το γεγονός ότι αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε θείο και συνεχίζουν να αυξάνουν σε μικρό ποσοστό την ποσότητα θεικών στο υπέργειο όπου παραμένουν θειικά χωρίς να ανάγονται.

Υπάρχει γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στην ξηρή μάζα και στο οργανικό θείο που επενδύθηκε στους διάφορους τύπους ριζών. Συνεπώς η κατανομή του οργανικού θείου ρυθμίζεται από την κατανομή της ξηρής μάζας. Η επενδεδυμένη ξηρή μάζα καθορίζει πόσο οργανικό θείο απαιτείται. Αυτό εξηγεί γιατί υπάρχουν θειικά και υπολογίστηκε ο λόγος θεικών προς ολικό θείο.

Η αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος ενισχύθηκε σε διάφορα επίπεδα προκειμένου να αντιμετωπιστεί η σοβαρή έλλειψη θεικών. Οι διάφοροι τύποι ριζών εμφάνισαν διαφοροποιήσεις στον αριθμό των ριζικών αξόνων των ομάδων ριζών, στο συνολικό μήκος τους, στην ξηρή μάζα που κατανεμήθηκε σε αυτές, στα τμήματα που έφεραν τις πλάγιες ρίζες, στον αριθμό και στο μήκος των πλαγίων ριζών, στη δημιουργία αερεγγύματος και στην ενίσχυση του αγγειακού συστήματος για αποτελεσματικότερη μεταφορά. Το ξηρό βάρος του μεσοκοτυλίου είναι σημαντικά μικρότερο από αυτό των φυτών-μαρτύρων μετά από 19 ημέρες έλλειψης θεικών. Η επιφάνεια τομής του μεσοκοτυλίου όσο και η επιφάνεια του αερεγγύματος σε τομές κοντά στο σπόρο ήταν σημαντικά μεγαλύτερες το δεύτερο δεκαήμερο σε σχέση με αυτές των φυτών-μαρτύρων. Αυτή η διαφορετική συμπεριφορά σχετίζεται με την απόκριση του φυτού στη έλλειψη θείου αφού το αερέγγυμα δεν προορίζεται να διακινήσει αέρα από το υπέργειο μέρος στις ρίζες. Τα φυτά -S δεν διαφοροποιούνται ως προς την ξηρή μάζα και το μήκος των φύλλων (ελασμάτων και κολεών), ενώ υπερτερούν ως προς την φυλλική

επιφάνεια του ελάσματος και του κολεού έναντι των φυτών-μαρτύρων το πρώτο δεκαήμερο. Η ξηρή μάζα, το μήκος και η φυλλική επιφάνεια των ανώτερων φύλλων (ελασμάτων και κολεών) επηρεάζεται περισσότερο από την έλλειψη θεικών το δεύτερο δεκαήμερο.

Ο ρυθμός διαπνοής των φυτών -S είναι μεγαλύτερος το πρώτο δεκαήμερο και μικρότερος το δεύτερο δεκαήμερο σε σχέση με αυτόν των φυτών-μαρτύρων. Στο μέσο του ελάσματος του 2^{ου} φύλλου των φυτών -S εντοπίστηκε αερέγχυμα και τα δύο δεκαήμερα με μείωση της ποσοστιαίας συνεισφοράς του αερεγγύματος το δεύτερο δεκαήμερο. Το αερέγχυμα εμφανίστηκε μεταξύ των ηθμαγγειωδών δεσμίδων προφανώς με λύση των κυττάρων του μεσόφυλλου. Αυτό σημαίνει ότι μειώθηκε η αντίσταση διάχυσης των υδρατμών που παρεμβάλλεται στην έξοδο του νερού από τα φύλλα και συνεπώς η απώλεια νερού ήταν μεγαλύτερη. Το άμεσο επακόλουθο ήταν η αύξηση του ρυθμού διαπνοής το πρώτο δεκαήμερο. Την 19^η ημέρα της μεταχείρισης, η ξηρή μάζα του ριζικού συστήματος και του υπέργειου μέρους καθώς και η φυλλική επιφάνεια των φυτών -S ήταν σημαντικά μικρότερα, ενώ το πάχος του ελάσματος και κολεού δεν διαφοροποιήθηκε και το αερέγχυμα περιορίστηκε σημαντικά αυτήν την ημέρα. Αυτά τα αποτελέσματα δικαιολογούν την μείωση του ρυθμού διαπνοής του υπέργειου μέρους του φυτού αραβοσίτου ως απόκριση στην έλλειψη θεικών.

Σε όλα τα φυτικά όργανα που πραγματοποιήθηκαν τομές (δηλαδή στις BP1, στο μεσοκοτύλιο, στο κόμβο, στο έλασμα και στο κολεό του 2^{ου} φύλλου), η παρουσία του τρισθενούς σιδήρου κυρίως την ημ10 και λιγότερο την ημ19 της μεταχείρισης ήταν ασθενέστερη σε σύγκριση με αυτή των φυτών μαρτύρων.

Στα φυτά -S, ο μοριακός λόγος Stot:Fe ήταν αυξημένος σε επίπεδο ολόκληρου φυτού (26.2:1 έναντι 15.7:1 των φυτών μαρτύρων) και σε επίπεδο ριζικού συστήματος (17.3 : 1 έναντι 5.3 : 1) κατά την ημέρα 19. Σε όλους τους τύπους ριζών ο λόγος Stot:Fe στα φυτά -S ήταν μεγαλύτερος από αυτόν των φυτών μαρτύρων. Στο υπέργειο μέρος, η μοριακή αναλογία Stot:Fe ήταν μειωμένη (32:1 έναντι 205:1) ή κατ' αντιστοιχία η αναλογία Sorg:Fe ήταν 21:1 έναντι 170:1. Επομένως σίδηρος παρέμενε στο υπέργειο μέρος, αλλά μειωνόταν δραματικά η αναλογία του προς το οργανικό θείο, ενώ σημαντικό μέρος από την ελάχιστη ποσότητα συσσωρευμένων θειικών παρέμενε αναξιοποίητη.

Στα φυτά -S, η συσχέτιση του συνολικού μήκους του κάθε τύπου ρίζας με τη ξηρή μάζα που επενδύθηκε σε αυτό έδειξε ότι αποτίθεται περισσότερη ξηρή μάζα σε κάθε τύπο ρίζας, με εξαίρεση τις ΔΡ οι οποίες δεν έδειξαν διαφοροποίηση σε σχέση με των φυτών-μαρτύρων. Στις περισσότερες περιπτώσεις βρέθηκε γραμμική σχέση μεταξύ συνολικού μήκους και αποτιθέμενης ξηρής μάζας. Εξετάζοντας το ειδικό μήκος του κάθε τύπου ρίζας (cm mg^{-1}) σε συνάρτηση με το συνολικό μήκος του κάθε τύπου ρίζας διαπιστώθηκε ότι υπό συνθήκες -S διαμορφώνεται μικρότερο μήκος ανά μονάδα επενδεδυμένης μάζας με εξαίρεση τις ΔΡ. Αυξανόμενου του συνολικού μήκους σε όλους του τύπους ριζών συσσωρεύεται λιγότερο οργανικό θείο έναντι των φυτών-μαρτύρων. Βρέθηκε γραμμική σχέση μεταξύ συνολικού μήκους και αποτιθέμενου οργανικού θείου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απόθεση ξηρής μάζας και οργανικού θείου μέσα σε αυτή γίνεται με συγχρονισμένο τρόπο, ακόμη και υπό συνθήκες σοβαρής έλλειψης θειικών διάρκειας 19 ημερών. Άρα, η διανομή του υπάρχοντος θείου και του ελάχιστου προστιθέμενου γίνεται με συντονισμένο τρόπο στο επίπεδο του ριζικού συστήματος.

Η συσχέτιση της ξηρής μάζας με την αντίστοιχη επιφάνεια των φύλλων έδειξε ότι το ίδιο ποσό ξηρής μάζας φύλλου αντιστοιχούσε σε υψηλότερη επιφάνεια στα φύλλα -S. Η συσχέτιση ανάμεσα στην επιφάνεια και στην ειδική επιφάνεια ($\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$) έδειξε ότι αυξανόμενης της επιφάνειας αυξάνεται η ειδική επιφάνεια και στην περίπτωση των φύλλων -S ίδια επιφάνεια αντιστοιχούσε σε υψηλότερη ειδική επιφάνεια. Υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας του οργανικού θείου που επενδύθηκε ανά φύλλο και της ειδικής επιφάνειας αυτού του φύλλου. Στην περίπτωση των φυτών μαρτύρων η συσχέτιση είναι γραμμική, ενώ στην περίπτωση των φυτών -S, η δημιουργία φυλλικής

επιφάνειας αποκλίνει από την γραμμικότητα όσο αυξάνει η ποσότητα του οργανικού θείου, προς την κατεύθυνση δημιουργίας περισσότερης επιφάνειας.

Επιπλέον, η διδακτορική διατριβή ανέδειξε μία γενικότερη στρατηγική σχηματισμού αερεγχύματος υπό συνθήκες έλλειψης θειϊκών. Συγκεκριμένα, τα αερεγχύματα που βρέθηκαν ήταν όλα εντοπισμένα: (1) σε ριζικούς άξονες δίπλα σε αναπτυσσόμενες πλάγιες ρίζες, (2) στο μεσοκοτύλιο δίπλα στις ρίζες μεσοκοτυλίου, καθώς και (3) σε φύλλο, σε επιλεγμένη θέση στο βλαστό και σε επιλεγμένη θέση μέσα στο έλασμα). Επομένως αναφερόμαστε σε τροφικά (ή τροφοπενικά) αερεγχύματα και όχι σε αερεγχύματα που σχηματίζουν δίκτυο για διακίνηση αερίων.

Κεφάλαιο 8

Βιβλιογραφία

- Abadia, J. et al. (2002) Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant Soil* 241, 75–86.
- Abadia, J. et al. (2011) Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 471–482.
- Abbe EC, Stein OL (1954) The origin of the shoot apex in maize: embryogeny. *Am J Bot* 41:285-293
- Ambler, J. E., Brown, J. C., and Gauch, H. G. (1971). *Agron. J.* 63, 95-97.
- Andaluz, S. et al. (2006) Proteome profiles of thylakoid membrane and changes in response to iron deficiency. *Photosynth. Res.* 89, 141–155.
- Anderson, A. J. and Spencer, D. (1950). Sulphur in nitrogen metabolism of legumes and non-legumes. *Austr. J. Sci. Res. Ser. B* 3, 431–449.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Arora, S. K. and Luchra, Y. P. (1970). Metabolism of sulphur containing amino acids in *Phaseolus aureus* Linn. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 126, 151–158.
- 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? *J Plant Nutr* 26:2111-21
- Astolfi S, Cesco S, Zuchi S, Neumann G, Roemheld V (2006a) Sulfur starvation reduces phytosiderophores release by iron-deficient barley plants. *Soil Sci Plant Nutr* 52:43-48
- Astolfi S, Zuchi S, Hubberten M, Pinton R, Hoefgen R (2010) Supply of sulphur to S-deficient young barley seedlings restores their capability to cope with iron shortage. *Journal of Experimental Botany* 61, 799–806
- Awad F, Romheld V and Marschner H. (1988). Mobilization of ferric iron from a calcareous soil by plant-borne chelators (phytosiderophores). *J. Plant Nutr.* 11,701-713.
- Balk, J. and Pilon, M. (2011) Ancient and essential: the assembly of Fe-S cluster in plants. *Trends Plant Sci.* 16, 218–226.
- Barak, P., and Chen, Y. (1983). *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 14, 945-950.
- Bashir, K. et al. (2010) Iron uptake and loading into rice grains. *Rice* 3, 122–130.
- Bashir, K. et al. (2011) The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nat. Commun.* 2, 322.
- Baudet, J., Huet, J.-C., Lesaint, C., Mosse, J. and Pernollet, J.-C. (1986). Changes in accumulation of seed nitrogen compounds in maize under conditions of sulphur deficiency. *Physiol. Plant.* 68, 608–614.
- Bienfait HF, van den Briel W, Mesland-Mul NT (1985) Free space iron pools in roots, generation and mobilization. *Plant Physiol* 78: 596–600
- Black CC (1973) Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO₂ uptake. *Annu Rev Plant Physiol* 24:253-86
- Blake-Kalff, M. M. A., Hawkesford, M. J., Zhao, F. J. and McGrath, S. P. (2000). Diagnosing sulphur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Soil* 225, 95–107.
- Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Protonotarios VE, Siyannis YF, Hopkins L, and Hawkesford MJ 2003a: Leaf response of young iron-inefficient maize plants to sulfur deprivation. *r. Plant Nutr.*, 26, 1189-1202
- Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Siyannis VF, Protonotarios VE, Hawkesford MJ (2003b) Aerenchyma formation in roots of maize during sulphate starvation. *Planta* 217:382-91
- Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Siyannis VF, Protonotarios VE, Hawkesford MJ (2004) Lignification of young maize plants under sulphate deprivation. *Comp Biochem Physiol* 137A:S239
- Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Kollias C, Maniou P, Protonotarios VE, Siyannis VF, Hawkesford MJ (2006) Dynamics of aerenchyma distribution in the cortex of sulfate-deprived adventitious roots of maize. *Annal Bot* 97:695-704

- Bret-Harte M, Baskin TI, Green PB (1991) Auxin stimulates both deposition and breakdown of material in the pea outer epidermal cell wall, as measured interferometrically. *Planta* 185: 462–471
- Briat J-F, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobreaux S, Pascal N, et al. 1995. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biol. Cell* 84:69–81
- Briat, J.F. et al. (2003) Iron utilization and metabolism in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 276–282.
- Briat, J.F. et al. (2010) Ferritins and iron storage in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 806–814.
- Briat J.F. (2011). The molecular and physiological basis of nutrient use efficiency in crops, First Edition.
- Brown, J. C., Holmes, R. S., and Tiffin, L. O. (1961). *Soil Sci.* 91: 127-132.
- Brown, J. C., and Ambler, J. E. (1974a). *Physiol. Plant.* 31, 221-224.
- Brown JC 1978 Mechanism of iron uptake by plants. *Plant Cell Environ* 1: 249-257
- Brown RH (1978) A difference in N use efficiency in C₃ and C₄ plants and its implications in adaptation and evolution. *Crop Sci* 18:93-8
- Bruggemann W, Moog PR (1989) NADH-dependent Fe³⁺-EDTA and oxygen reduction by plasmamembrane vesicles from barley roots. *Physiol Plant* 75: 245–254
- Bruggemann W, Maas-Kantel K, Moog PR (1993) Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. *Planta* 190: 151–155
- Burke, J. J., Holloway, P. and Dalling, M. J. (1986). The effect of sulfur deficiency on the organization and photosynthetic capability of wheat leaves. *J. Plant Physiol.* 125, 371–375.
- Busi, M.V. et al. (2006) Deficiency of Arabidopsis thaliana frataxin alters activity of mitochondrial Fe-S proteins and induces oxidative stress. *Plant J.* 48, 873–882
- Cakmak, I. and Marschner, H. (1992). Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* 98, 1222–1227.
- Carter MR (1980) Association of cation and organic anion accumulation with iron chlorosis of Scot pine on prairie soils. *Plant Soil* 56: 291–299
- Castle, S. L. and Randall, P. J. (1987). Effects of sulfur deficiency on the synthesis and accumulation of proteins in the developing wheat seed. *Aust. J. Plant Physiol.* 14, 503–516.
- Chaney RL, Brown JC, Tiffin LO (1972) Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol* 50: 208–213
- 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 WW, Yang JL, Qin C, Jin CW, Mo JH, Ye T, Zheng SJ (2010) Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in Arabidopsis. *Plant Physiol* 154:810–819.
- Clarkson, D. T. & Sanderson, J. 1978. Sites of absorption and translocation of iron in barley roots. - *Plant Physiol.* 61: 731-736.
- Cliquet, J. B., E. Deleens, and A. Mariotti. 1990. Carbon and N mobilization from stalk and leaves during kernel filling by ¹³C and ¹⁵N tracing in *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 94:1547–1553.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159–182.
- Conte, S.S. and Walker, E.L. (2011) Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Mol. Plant* 4, 464–476.
- Couee, I. et al. (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 57, 449–459.
- Craig, T. A., and Crane, F. L. (1982). *Plant Physiol.* 67, S 151.
- Crowley DE, Romheld V, Marschner H, Szaniszlo PJ (1992) Rootmicrobial effects on plant iron uptake from siderophores and phytosiderophores. *Plant Soil* 142: 1–7

- Crowley DE (2001) Function of siderophores in the plant rhizosphere. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri R (eds) *The Rhizosphere*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 223–262
- Curie, C. and Briat, J.F. (2003) Iron transport and signalling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 183–206
- DeBoer, D. L. and Duke, S. H. (1982). Effects of sulphur nutrition on nitrogen and carbon metabolism in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Physiol. Plant.* 54, 343–350.
- Deloch, H. W. (1960). Über die analytische Bestimmung des Schwefels in biochemischen Substanzen und die Schwefelaufnahme durch landwirtschaftliche Kulturpflanzen in Abhängigkeit von der Düngung. Dissertation, Universität Giessen.
- Dickison, C. W. (2000). *Integrative plant anatomy*. San Diego, California: Academic Press
- Dietz, K.-J. (1989). Recovery of spinach leaves from sulfate and phosphate deficiency. *J. Plant Physiol.* 134, 551–557.
- Dijkshoorn, W. and van Wijk, A. L. (1967). The sulphur requirement of plants as evidenced by the sulphur-nitrogen ratio in the organic matter. A review of published data. *Plant Soil* 26, 129–157.
- Donnini, S. et al. (2009) Differential responses in pear and quince genotypes induced by Fe deficiency and bicarbonate. *J. Plant Physiol.* 166, 1181–1193.
- Donnini, S. et al. (2010) Proteomic characterization of iron deficiency responses in *Cucumis sativus* L. roots. *BMC Plant Biol.* 10, 268
- Drew M.C., He C. J. and Morgan P.W. (1989). Decreased ethylene biosynthesis, and induction of aerenchyma, by nitrogen- or phosphate- starvation in adventitious roots of *Zea mays*. *Plant Physiol* 91: 266 – 271.
- Duncan, W. G. 1975. Maize. In L. T. Evans (ed.), *Crop Physiology*. Cambridge University Press, London, U.K., pp. 23–50.
- Eck, H. V. 1984. Irrigated corn yield response to nitrogen and water. *Agron. J.* 76:421–428.
- Edelbauer, A. (1980). Auswirkung von abgestuftem Schwefelmangel auf Wachstum, Substanzbildung und Mineralstoffgehalt von Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Nährlösungskultur. *Die Bodenkultur* 31, 229–241.
- Edwards GE, Franceschi VR, Ku MS, Vosnesenskaya EV, Pyankov VI, Andreo CS (2001) Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C4 plants. *J Exp Bot* 52:577-90
- Enomoto Y, Hodoshima H, Shimada H, Shoji K, Yoshihara T, Goto F (2007) Long-distance signals positively regulate the expression of iron uptake genes in tobacco roots. *Planta* 227:81–89.
- Enomoto Y, Hashida S, Shoji K, Shimada H, Yoshihara T, Goto F (2009) Expressions of iron uptake genes in roots are affected by long-distance signals both in non-graminaceous and in graminaceous plants. In: IPNC XVI paper:1209
- Enomoto Y, Goto F (2013) Long-distance signaling of iron deficiency in plants. *Signaling and Communication in Plants* 19: 167-188
- Erdei, L., Stuiver, B. and Kuiper, P. J. C. (1980). The effect of salinity on lipid composition and on activity of Ca²⁺ and Mg²⁺-stimulated ATPases in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago* species. *Physiol.Plant.* 49, 315–319.
- Ernst, W. H. O. (1993). Ecological aspect of sulfur in higher plants: the impact of SO₂ and the evolution of the biosynthesis of organic sulfur compounds on populations and ecosystems. In *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants* (J. L. De Kok, I. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold and W. E. Rauser, eds.), pp. 295–313. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands.
- Esau K. (1965) *Plant Anatomy*, 2nd ed. Wiley International Edition
- Ewart, J. A. D. (1978). Glutamin and dough tenacity. *J. Sci. Food Agric.* 29, 551–556.
- Fageria, N. K. 2001. Response of upland rice, dry bean, corn and soybean to base saturation in cerrado soil. *Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.* 5:416–424.

- Fan, M.S., J.M. Zhu, C. Richards, K.M. Brown, and J.P. Lynch. 2003. Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. *Funct. Plant Biol.* 30:493-506.
- Fankhauser, H. and Brunold, C. (1978). Localization of adenosine 59-phosphosulfate sulfotransferase in spinach leaves. *Planta* 143, 285–289.
- Federico, R., and Giartosio, C. E. (1983). *Plant Physiol.* 73, 182-183.
- Fox TC, Shaff JE, Grusak MA, Norvell WA, Chen Y, Chaney RL, Kochian LV (1996) Direct measurement of ^{59}Fe labelled Fe^{2+} influx in roots of pea using a chelator buffer system to control free Fe in solution. *Plant Physiol* 112: 93–100
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 119, 355–364.
- Frahn, J. L. (1958). *Aust. J. Chem.* 11,399-405.
- Freney, J. R., Spencer, K. and Jones, M. B. (1978). The diagnosis of sulphur deficiency in wheat. *Austr. J. Agric. Res.* 29, 727–738.
- Gas, E. et al. (2009) Hunting for plant nitric oxide synthase provides new evidence of a central role for plastids in nitric oxide metabolism. *Plant Cell* 21, 18–23.
- Gilbert, S., Clarkson, D. T., Cambridge, M., Lambers, H. and Hawkesford, M. J. (1997). Sulfate-deprivation has an early effect on the content of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. *Plant Physiol.* 115, 1231–1239
- Grill, E., Winnacker, E.-L. and Zenk, M. H. (1987). Phytochelatins, a class of heavy metal binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 439–443.
- Guerinot, M.L. and Yi, Y. (1994) Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.* 104, 815–820.
- Guerinot, M.L. (2001) Improving rice yields – ironing out the details. *Nat Biotechnol* 19:417–418.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1–14.
- Hatch, M. D. and C. R. Slack. 1970. Photosynthetic CO_2 fixation pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21:141–162.
- Hatch MD, Osmond CB (1976) Compartmentation and transport in C_4 photosynthesis. In: Stocking CR, Heber U (eds) Encyclopedia of plant physiology. New Series, Springer-Verlag, Berlin, pp. 144-84
- Hausler, R.E. et al. (2009) Chlororespiration and grana hyperstacking: how an Arabidopsis double mutant can survive despite defects in starch biosynthesis and daily carbon export from chloroplasts. *Plant Physiol.* 149, 515–533.
- Hawkesford, M. J. (2003). Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family – redundancy or specialization? *Physiol. Plant.* 117, 155–165.
- Hawkesford, M. J. and DeKok, L. J. (2006). Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell Environ.* 29, 382–395.
- Hell, R. and Bergmann, L. (1988). Glutathione synthetase in tobacco suspension cultures: catalytic properties and localization. *Physiol. Plant.* 72, 70–76.
- Hell, R. and Stephan, U.W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216, 541–551.
- Herschbach, C.; Rennenberg, H. Sulphur nutrition of conifers and deciduous trees. In *Trees—Contributions to Modern Tree Physiology*; Rennenberg, H., Eschrich, W., Ziegler, H., Eds.; Backhuys Publ.: Leiden, 1994; 293–311.
- Hochholdinger F, Woll K, Sauer M, Dembinsky D (2004) Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific developmental programmes. *Ann Bot* 93:359-68.
- Hochholdinger F, Park W, Sauer M, Woll K (2004). From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Plant Science* 9: 42-48.
- Hoffmann B, Planker R, Mengel K (1992) Measurements of pH in the apoplast of sunflower leaves by means of fluorescence. *Physiol Plant* 84: 146–153.

- Höglund, A.-S., Lenman, M., Falk, A. and Rask, L. (1991). Distribution of myrosinase in rape-seed tissues. *Plant Physiol.* 95, 213–221.
- Holden MJ, Luster DG, Chaney RL, Buckhout TJ, Robinson C (1991) Fe³⁺-chelate reductase activity of plasma membranes isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots: comparison of enzymes from Fe-deficient and Fe-sufficient roots. *Plant Physiol* 97: 537–544
- Hopkins L, Parmar S, Bouranis DL, Howarth JR, Hawkesford MJ (2004) Coordinated expression of sulfate uptake and components of the sulfate assimilatory pathway in maize. *Plant Biol* 6:408-14
- Hsieh, S.I. et al. (2013) The proteome of copper, iron, zinc and manganese micronutrient deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 65–86.
- Hughes, D.F., V.D. Jolley, and J.C. Brown. 1992. Roles for potassium in the iron-stress response mechanisms of strategy I and strategy II plants. *J. Plant Nutr.* 15: 1821-1839.
- Ishikawa H, Evans ML (1995) Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol* 109:725-7
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, et al. 2006. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J.* 45:335–46
- Jones, C. A. 1985. *C4 Grasses and Cereals: Growth, Development, and Stress Response*. Wiley, New York.
- Jones, M. G., Hughes, J., Tregova, A., Milne, J., Tomsett, A. B. and Collin, H. A. (2004c). Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *J. Exp. Bot.* 55, 1903–1918.
- Kakei Y, Ishimaru Y, Kobayashi T, Yamakawa T, Nakanishi H, Nishizawa NK (2012) OsYSL16 plays a role in the allocation of iron. *Plant Mol Biol* 79:583–594
- Karmoker, J. L., Clarkson, D. L., Saker, L. R., Rooney, J. M. and Purves, J. V. (1991). Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and the hydraulic conductivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Planta* 185, 269–278.
- Kashirad A, H Marschner, C Richter (1973) Absorption and translocation of Fe-59 from various parts of the corn root. *Z Pflanzenernaehr Bodenkd* 134: 136-147
- Kim SA, Gueriot ML. 2007. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett.* 581:2273–80.
- Kobayashi T, Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK (2007) The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19150–19155
- Kobayashi T, Nakanishi H., Nishizawa K. (2010). Recent insights into iron homeostasis and their application in graminaceous crops. *Proc. Jpn. Acad, Ser B* 86:900-913.
- Kobayashi T, Nishizawa NK (2012) Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 63:131–152
- Koike, S., Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N. (2004) OsYSL2 is a rice metalnicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J.* 39, 415–424.
- Konings H. and Verschuren G. (1980). Formation of aerenchyma in roots of *Zea mays* in aerated solutions, and its relation to nutrient supply. *Physiol. Plant* 49: 265-270.
- Kopriva, S. (2006). Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Annals Botany* 97, 479–495.
- Kopriva, S. and Koprivova, A. (2005). Sulfate assimilation and glutathione synthesis in C-4 plants. *Photosynthesis Res* 86, 363–372.
- Kosegarten H, Englisch G (1994) Effect of various nitrogen forms on the pH in leaf apoplast and on iron chlorosis of *Glycine max.*L. *Z Pflanzenernaehr Bodenkd* 157: 401–405
- Kosegarten H, Wilson G, Esch A (1998) The effect of nitrate nutrition on iron chlorosis and leaf growth in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Eur J Agron* 8: 283–292

- Kosegarten H, Hoffmann B, Mengel K (1999a) Apoplastic pH and Fe³⁺ reduction in young sunflower leaves. *Plant Physiol* 121: 1069–1079
- Kosegarten H, Grolig F, Esch A, Glu[¨]senkamp KH, Mengel K (1999b) Effects of NH₄⁺, NO₃⁻ and HCO₃⁻ on apoplast pH in the outer cortex of root zones of maize as measured by fluorescence ratio of fluorescein boronic acid. *Planta* 209: 444–452
- Kosegarten H, Koyro W. (2001) Apoplastic accumulation of iron in the epidermis of maize (*Zea mays*) roots grown in calcareous soils. *Physiol. Plant* 113: 515–522
- Kruger C, Berkowitz O, Stephan UW, Hell R (2002) A metal binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J Biol Chem* 277:25062–25069
- Kutschera U, Briggs WR (1987) Differential effect of auxin on in vivo extensibility of cortical cylinder and epidermis in pea internodes. *Plant Physiol* 84: 1361–1366
- Kutschera U (1992) The role of the epidermis in the control of elongation growth in stems and coleoptiles. *Bot Acta* 105: 246–252
- Kutz A, Muller A, Hennig P, Kaiser WM, Piotrowski M, Weiler EW (2002) A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 30:95-106
- Labrou, N. E., Karavangeli, M., Tsaftaris, A. and Clonis, Y. D. (2005). Kinetic analysis of maize glutathione S-transferase I catalysing the detoxification from chloroacetanilide herbicides. *Planta* 222, 91–97.
- Lan, P. et al. (2011) iTRAQ protein profile analysis of *Arabidopsis* roots reveals new aspects critical for iron homeostasis. *Plant Physiol.* 155, 821–834.
- Larson, W. E. and J. J. Hanway. 1977. Corn production. In G. F. Sprague (ed.), *Corn and Corn Improvement, Monograph 18*. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 625–669.
- Lazlo JA (1987) Mineral-binding properties of the soybean seed coat. *Plant Physiol* : S 83: 44
- Lee, E. A. and M. Tollenaar. 2007. Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield. *Crop Sci.* 47:203–215.
- Leister, D. (2012) Retrograde signalling in plants: from simple to complex scenarios. *Front. Plant Sci.* 3, 135
- Levitt, J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses, 2nd. ed., Vol. 2. Academic Press, New York.
- Li, J. et al. (2008) Proteomic response to iron deficiency in tomato root. *Proteomics* 8, 2299–2311.
- Lin, W. (1984). *Plant Physiol.* 74, 219422.
- Lindsay WL, Schwab AP (1982) The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J Plant Nutr* 5: 821–840
- Lindsay WL (1995) Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants. A quantitative approach. In: Abadia J (ed) *Iron Nutrition in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 7–14
- Lobreaux, S., Massenet, O. and Briat, J.F. (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol. Biol.* 19, 563-575.
- Lobreaux, S., Hardy, T. and Briat, J.F. (1993) Abscisic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. *EMBO. J.* 12, 651-657.
- Lobreaux, S., Thoiron, S. and Briat, J.F. (1995) Induction of ferritin synthesis is in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. *The Plant Journal* 8, 443-449.
- Loeppert RH, Hallmark CT (1985) Indigenous soil properties influencing the availability of iron in calcareous soils. *Soil Sci Soc Am J* 49: 597–603
- Longnecker N, Welch R. (1990) Accumulation of apoplastic iron in plant roots. *Plant Physiol.* 92: 17-22
- Lopez-Millan, A.F. et al. (2000) Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiol.* 124, 885–898.
- Lopez-Millan, A.F. et al. (2012) Carboxylate metabolism change induced by Fe deficiency in barley, a Strategy II plant species. *J. Plant Physiol.* 169, 1121–1124
- Lucena, J.J. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis: a review. *J. Plant Nutr.* 2000, 23, 1591–1606.

- Lunn JE, Droux M, Mmtin J, and Douce R 1990: Localization of ATP sulfurylase and O-acetylserine(thiol)lyase in spinach leaves. *Plant Physiol.*, 94, 1345-1352
- Lynch, J. 1998. The role of nutrient efficient crops in modern agriculture. In Z. Rengel (ed.), *Nutrient Use in Crop Production*. The Haworth Press, New York, pp. 241-261.
- Ma. J, F, and Nomoto. K, 1996. Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants. The role of mugineic acids as phytosiderophores, - *Physiol. Plant.* 97: 609-617.
- Maddonni, G. A., M. E. Otegui, A. G. Cirilo. 2006. Row width and maize grain yield. *Agron. J.* 98:1532-1543.
- Maliandi, M.V. et al. (2011) The mitochondrial protein frataxin is essential for heme biosynthesis in plants. *FEBS J.* 278, 470-481.
- Marschner, H., Romheld, V., and Ossenberg-Neuhaus, H. (1982). *Z. Pflanzenphysiol.* 105, 407-416.
- Marschner H, Romheld V and Kissel M (1986). Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9, 695-713.
- Marschner H, Romheld V and Kissel M 1987 Localization of phytosiderophore release and iron uptake along intact barley roots. *Physiol. Plant.* 71, 157-162.
- Marschner H, Treeby M and Romheld V (1989). Role of root-induced changes in the rhizosphere for iron acquisition in higher plants. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* 152, 197-204.
- Marschner H, Romheld V (1994). Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil.* 165, 261-274.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Plants*, Academic Press, Boston.
- Masalha J, Kosegarten H, Elmaci O, Mengel K (2000) The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol Fertil Soils* 30: 433-439
- Masuda Y, Yamamoto R (1972) Control of auxin-induced stem elongation by the epidermis (peas). *Physiol Plant* 27: 109-115
- McCully, M. E., Miller, C., Sprague, S. J., Huang, C. X. and Kirkegaard, J. A. (2008). Distribution of glucosinolates and sulphur-rich cells in roots of field-grown canola (*Brassica napus*). *New Phytol.* 180, 193-205
- Meguro R, Asano Y, Odagiri S, Li C, Iwatsuki H, Shoumura K (2007) Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Arch Histol Cytol* 70: 1-19
- Mengel, D. B. and S. A. Barber. 1974. Development and distribution of the corn root system under field conditions. *Agron. J.* 66:341-344.
- Mengel K, Malissiovas N (1981) Bikarbonat als auslösender Faktor der Eisenchlorose bei der Weinrebe (*Vitis vinifera*). *Vitis* 20: 235-243
- Mengel, K. and Geurtzen, G. 1988. Relationship between iron chlorosis and alkalinity in *Zea mays*. - *Physiol. Plant.* 72: 460-465.
- Mengel K (1994) Iron availability in plant tissues - Iron chlorosis on calcareous soils. *Plant Soil* 165: 275-283
- Mengel K (1995) Iron availability in plant tissues: iron chlorosis on calcareous soils. In J Abadia, ed, *Iron Nutrition in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 389-396
- Merchant, S. et al., eds (2007) *The Structure and Function of Plastids*, Springer.
- Miao, Y., D. J. Mulla, J. A. Hennandez, M. Wiebers, and P. C. Robert. 2007. Potential impact of precision nitrogen management on corn yield, protein content, and test weight. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71:1490-1499.
- Miyazaki, J. H. and Yang, S. F. (1987). The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine synthesis. *Physiol. Plant.* 69, 366-370.
- Mock, J. J. and R. B. Pearce. 1975. An ideotype of maize. *Euphytica* 24:613-623.
- Moller, I.M. et al. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 459-481.
- Moller, I.M. and Sweetlove, L.J. (2010) ROS signalling - specificity is required. *Trends Plant Sci.* 15, 370-374.

- Moog P. R., Bruggemann W. (1994) Iron reductase system on the plant plasma membrane – A review. *Plant and soil* 165, 241-260.
- Moore RC, Black CC (1979) Nitrogen assimilation pathways in leaf mesophyll and bundle sheath cells of C4 photosynthesis plants formulated from comparative studies with *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. *Plant Physiol* 64:309-13
- Morgan, M.J. et al. (2008) Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant Physiol.* 147, 101–114.
- Mori, S. (1999) Iron acquisition by plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 250–253.
- Mori, S.; Nishizawa, N. Methionine as a dominant precursor of phytosiderophores in gramineae plants. *Plant Cell Physiol.* 1987, 28, 1081–1092.
- Morrison TA, Kessler JR, Buxton DR (1994) Maize internode elongation patterns. *Crop Science* 34:1055-60
- Murata, Y., Ma, J.F., Yamaji, N., Ueno, D., Nomoto, K. and Iwashita, T. (2006) A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *Plant J.* 46, 563–572.
- Murphy, M. D. and Boggan, J. M. (1988). Sulphur deficiency in herbage in Ireland. 1. Causes and extent. *Irish J. Agric. Res.* 27, 83–90.
- Musick, J. T. and D. A. Dusek. 1980. Irrigated corn yield response to water. *Trans. ASAE* 23:92–103.
- Naumann, B. et al. (2007) Comparative quantitative proteomics to investigate the remodeling of bioenergetic pathways under iron deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics* 7, 3964–3979.
- Negishi T, Nakanishi H, Yazaki J, Kishimoto N, Fujii F, et al. 2002. cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant J.* 30:83–94.
- Nieto-Sotelo, J. and Ho, T.-H. D. (1986). Effects of heat shock on the metabolism of glutathione in maize roots. *Plant Physiol.* 82, 1031–1035.
- Nikiforova, V. J., Gakiθre, B., Kempa, S., Adamik, M., Willmitzer, L., Hesse, H. and Hoefgen, R. (2004). Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism. *J. Exp. Bot.* 55, 1861–1870.
- Norvell, W. A., Welch R. M., Adams M. L. and Kochian L. V. (1993) Reduction of Fe(III), Mn(II), Cu(II) chelates by roots of pea (*Pisum sativum* L.) or soybean (*Glycine max*). *Plant and soil* 156, 123-126.
- Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, Takahashi M, Sato Y, Sato Y, Uozumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *J Biol Chem* 286:5446–5454
- O’Hara, G. W., Franklin, M. and Dilworth, M. J. (1987). Effect of sulphur supply on sulfate uptake, and alkaline sulfatase activity in free-living and symbiotic bradyrhizobia. *Arch. Microbiol.* 149, 163–167.
- Pich A, Manteuffel R, Hillmer S, Scholz G, Schmidt W (2001) Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta* 213:967–976.
- Powell PE, Szaniszlo PJ, Cline GR, Reid CPP (1982) Hydroxamate siderophores in the iron nutrition of plants. *J Plant Nutr* 5: 653–673
- Pourabdol L, Heidary R. and Farboodnia T. (2008) Effects of different flooding periods on some histochemicals of *Zea mays* L. seedlings. *Plant Sci. Res.* 1 (1): 8-12.
- Press MC (1999) The functional significance of leaf structure: a search for generalizations. *New Phytol* 143:213-19
- Purseglove, J. W. 1985. *Tropical Crops: Monocotyledons*. Longman, New York.
- Randall, P. J. and Wrigley, C. W. (1986). Effects of sulfur supply on the yield, composition, and quality of grain from cereals, oilseeds and legumes. *Adv. Cereal Sci. Technol.* 8, 171–206.
- Rausser, W. E. (1990). Phytochelatin. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 61–86.
- Ray J.D., Kindiger B., Sinclair T.R. (1999). Introgressing root aerenchyma into maize. *Maydica* 44: 113-117.

- Rellán-Alvarez, R. et al. (2010) Changes in the proteomic and metabolic profiles of *Beta vulgaris* root tips in response to iron deficiency and resupply. *BMC Plant Biol.* 10, 120
- Rennenberg, H. (1989). Synthesis and emission of hydrogen sulfide by higher plants. In *Biogenic Sulfur in the Environment* (E. S. Saltzman and W. J. Cooper, eds.), pp. 44–57. ACS Symp. Series 3296, Washington DC.
- Rennenberg, H. and Lamoureux, G. L. (1990). Physiological processes that modulate the concentration of glutathione in plant cells. In *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants* (H. Rennenberg et al., eds.), pp. 53–65. XPB Acad. Publ. bv. The Hague, The Netherlands.
- Rhoads, D.M. and Subbaiah, C.C. (2007) Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* 7, 177–194.
- Ribaut, J.-M., J. Betran, P. Monneveux, and T. Setter. 2009. Drought tolerance in maize. In: J.L. Bennetzen and S.C. Hake, editors, *Handbook of maize: Its biology*. Springer Science and Business Media, Berlin, Germany. p. 311-344.
- Roberts LA, Pierson AJ, Panaviene Z, Walker EL 2004: Yellow stripe 1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. *Plant Physiol.*, 135, 112–120.
- Robson, A. D. and Pitman, M. G. (1983). Interactions between nutrients in higher plants. In *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series* (A. Läuchli and R. L. Bielecki, eds.), Vol. 15A, pp. 147–180. Springer-Verlag, Berlin and New York.
- Rombola AD, Bruggemann W, Tagliavini M, Marangoni B, Moog PR (1999) Iron source affects Fe reduction and greening of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves. *J Plant Nutr.*
- Romheld, V., Müller, C., and Marschner, H. (1984). Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiol.* 76, 603–606.
- Romheld V, Marschner H (1986a) Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. In: Tinker B, Lauchli A (eds) *Advances in Plant Nutrition*, Vol. 2. Praeger Publishers, New York, NY, pp 155–204.
- Romheld V, Marschner H. (1986b). Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophore in roots of grasses. *Plant Physiol.* 80:175–180.
- Romheld, V. 1987. Different strategies for iron acquisition in higher plants - *Physiol. Plantarum* 70: 231-234.
- Romheld, V., and Marschner, H. (1990). Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores. *Plant and Soil* 123, 147-153.
- Romheld V 1991 The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach. *Plant and Soil* 130, 127-134.
- Rubinstein, B., Stern, A. I., and Stout, R. G. (1983). *Plant Physiol.* 72, S 139.
- Sahu MP, Sharma DD, Jain GL, Singh HG (1987) Effects of growth substances, sequestrene 138-Fe and sulphuric acid on iron chlorosis of garden peas (*Pisum sativum* L.). *J Hort Sci* 62: 391–394
- Salisbury FB and Ross CW, (1991). *Plant Physiology* 4th edition, Cengage Learning.
- Schmidt, A. (1986). Regulation of sulfur metabolism in plants. In *Progress in Botany* 48, 133–150. Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
- Schmidt, A. and Jäger, K. (1992). Open questions about sulfur metabolism in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 31.
- Schmutz, D. and Brunold, C. (1982). Regulation of sulfate assimilation in plants. XIII. Assimilatory sulfate reduction during ontogenesis of primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 70, 524–527.
- Schmutz, D. and Brunold, C. (1984). Intercellular localization of assimilatory sulfate reduction in leaves of *Zea mays* and *Triticum aestivum*. *Plant Physiol.* 74, 866–870.
- Schnug, E. (1993). Physiological functions and environmental relevance of sulfur-containing secondary metabolites. In *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher*

- Plants (L. J. De Kok, I. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold and W. E. Rauser, eds.), pp. 179–190. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands.
- Schonwitz R and Ziegler H 1989 Interaction of maize roots and rhizosphere microorganisms. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* 152, 217-222.
- Schröder, P., Rusness, D. G. and Lamoureux, G. L. (1990). Detoxification of xenobiotics in spruce trees is mediated by glutathione-S-transferases. In *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants* (H. Rennenberg et al., eds.), pp. 145–248. SPB Acad. Publ. bv, The Hague, The Netherlands.
- Schürmann, P. (1993). Plant thioredoxins. In *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants* (L. J. De Kok, I. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold and W. E. Rauser, eds.), pp. 153–162. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands.
- Schütz, B., De Kok, L. J. and Rennenberg, H. (1991). Thiol accumulation and cysteine desulfurylase activity in H₂S-fumigated leaves and leaf homogenates of cucurbit plants. *Plant Cell Physiol.* 32, 733–736.
- Sekiya, J., Schmidt, A., Wilson, L. G. and Filner, P. (1982a). Emission of hydrogen sulfide by leaf-tissue in response to L-cysteine. *Plant Physiol.* 70, 430–436.
- Sheen J (1999) C₄ gene expression. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:187-217
- Sijmons, P. C., van den Briel, W., and Bienfait, H. F. (1984a). *Plant. Physiol.* 75, 219-221.
- Sijmons, P. C., Lanfermeijer, F. C., and Bienfait, H. F. (1984b). *Plant Physiol.* 75, S 193.
- Sijmons, P. C., Lanfermeijer, F. C., de Boer, A. H., Prins, H. B.A., and Bienfait, H. F. (1984c). *Plant Physiol.* 76, 943-946.
- Smith, I. K., Polle, A. and Rennenberg, H. (1990b). Glutathione. In *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*, pp. 201–215. Wiley-Liss. Inc.
- Smith C. W. (2004). *Corn, origin, history, technology and production.* John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. 281-290.
- Strasser O, Kohl K, Romheld V (1999) Overestimation of apoplastic Fe in roots of soil grown plants. *Plant Soil* 210: 179–187
- Stuiver, C. E. E., Kuiper, P. J. C., Marschner, H. and Kylin, A. (1981). Effects of salinity and replacement of K¹ by Na¹ on lipid composition in two sugar beet inbred lines. *Physiol. Plant.* 52, 77–82.
- Stulen, I. and DeKok, L. J. (1993). Whole plant regulation of sulphur metabolism – a theoretical approach and comparison with current ideas on regulation of nitrogen metabolism. In *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants* (L. J. De Kok, I. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold and W. E. Rauser, eds.), pp. 77–91. SPB Academic Publishing bv. The Hague, The Netherlands.
- Susin S, Abadia A, Gonzalez-Reyes JA, Lucena JI, Abadia J (1996) The pH requirement for in vivo activity of the iron deficiency-induced 'Turbo' ferric chelate reductase – A comparison of the iron-deficiency-induced iron reductase activities of intact plants and isolated plasma membrane fractions in sugar beet. *Plant Physiol* 110: 111–123
- Suzuki, N. et al. (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 35, 259–270.
- Sweetlove, L.J. and Moller, I.M. (2009) Oxidation of proteins in plants – mechanisms and consequences. *Adv. Bot. Res.* 52, 1–23.
- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* 15:1263–1280.
- Tan, Y.F. et al. (2010) Divalent metal ions in plant mitochondria and their role in interactions with proteins and oxidative stress-induced damage to respiratory function. *Plant Physiol.* 152, 747–761.
- Terauchi, A. et al. (2010) Trophic status of *Chlamydomonas reinhardtii* influences the impact of iron deficiency on photosynthesis. *Photosynth. Res.* 105, 39–49.

- Thimm, O. et al. (2001) Response of Arabidopsis to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol.* 127, 1030–1043.
- Timperio, A.M. et al. (2007) Proteomics, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. *J. Exp. Bot.* 58, 3695–3710
- Tollenaar, M. and L. M. Dwyer 1998. Physiology of maize. In: D. L. Smith and C. Hamel (eds.), *Crop Yield, Physiology and Process*. Springer-Verlag, New York, pp. 169–204.
- Tollenaar, M. and J. Wu. 2004. Yield improvement in temperate maize is attributable to greater stress tolerance. *Crop Sci.* 39:1597–1604.
- Tollenaar, M., A. Ahmadzadeh, and E. A. Lee. 2004. Physiological basis of heterosis for grain yield improvement in maize. *Crop Sci.* 44:2086–2094.
- Tomati, U. and Galli, E. (1979). Water stress and -SH-dependent physiological activities in young maize plants. *J. Exp. Bot.* 30, 557–563.
- Toulon V, Sentenac H, Thibaud J-B, Davidian J-C, Moulineau C, Grignon C (1992) Role of apoplast acidification by the H⁺ pump. Effect on the sensitivity to pH and CO₂ of iron reduction by roots of *Brassica napus* L. *Planta* 186: 212–218
- Touraine, B. et al. (2012) GSH threshold requirement for NO-mediated expression of the Arabidopsis AtFer1 ferritin gene in response to iron. *FEBS Lett.* 586, 880–883.
- Tuckendorf, A., Rauser, W. E. (1990). Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Sci.* 70, 155–166.
- Uren N C and Reisenauer H M 1988 The role of root exudation in nutrient acquisition. *Adv. Plant Nutr.* 3, 79-114.
- Vauclare, P., Kopriva, S., Fell, D., Suter, M., Sticher, L., von Ballmoos, P., Krähenbühl, U., den Camp, R. O. and Brunold, C. (2002). Flux control of sulphate assimilation in Arabidopsis thaliana: adenosine 59-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *Plant J.* 31, 729–740.
- Verkleij, J. A. C., Koevoets, P., van't Riet, J., Bank, R., Nijdam, Y. and Ernst, W. H. O. (1990). Poly (g-glutamylcysteinyl) glycines or phytochelatins and their role in cadmium tolerance of *Silene vulgaris*. *Plant Cell Environ.* 13, 413–421.
- Vert GA, Briat JF, Curie C (2003) Dual regulation of the Arabidopsis high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant Physiol* 132:796–804.
- Vigani, G. and Zocchi, G. (2009) The fate and the role of mitochondria in Fe-deficient roots of Strategy I plants. *Plant Signal. Behav.* 2009, 375–379.
- Vigani, G. (2012) Discovering the role of mitochondria in the iron deficiency-induced metabolic responses of plants. *J. Plant Physiol.* 169, 1–11.
- Vigani, G. et al. (2012) Metabolic adjustment under Fe deficiency in roots of dicotyledonous plants. In *Iron Deficiency and its Complications* (Dincer, Y., ed.), pp. 1–27, Nova Science Publishers
- Vigani, G., Zocchi, G., Bashir, K., Philippar, K., Briat, J. F. (2013). Signals from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation. *Trends Plant Sci.* 18, 1-7.
- Visser, E.J.W. and L.A.C.J. Voesenek, 2004. Acclimation to soil flooding-sensing and signal-transduction. *A Review Plant and Soil*, 254: 197-214.
- Walker E. and Connoly E. (2008). Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Plant Biology*, 11: 530-535.
- Wang, C. H., Liem, T. H. and Mikkelsen, D. S. (1976). Sulfur deficiency – a limiting factor in rice production in the lower Amazon basin. II.
- Willenbrink, J. (1964). Lichtabhängiger 35S-Einbau in organische Bindung in Tomatenpflanzen. *Z. Naturforsch.* 19, 356–357.
- Wink, M. (1993). The plant vacuole: a multifunctional compartment. *J. Exp. Bot.* 44 Supplement, 231–246.
- von Wiren N, Roemheld V, Morel JL, Guckert A, Marschner H (1993) Influence of microorganisms on iron acquisition in maize. *Soil Biol Biochem* 25: 371–376.

- von Wiren N, Mori S, Marschner H, Romheld V (1994) Iron inefficiency in the maize mutant *ysl* (*Zea mays* L. cv yellowstripe) is caused by a defect in uptake of iron phytosiderophores. *Plant Physiol* 106: 71-77
- Zhang FS, Romheld V, Marschner H (1991) Role of the root apoplasm for iron acquisition by wheat plants. *Plant Physiol* 97: 1302-1305
- Zhao, F.-J., Hawkesford, M. J. and McGrath, S. P. (1999a). Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *J. Cereal Sci.* 30, 1-17.
- Zhu, J., K.M. Brown, and J.P. Lynch. 2010. Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.) *Plant Cell Environ.* 33:740-749
- Zocchi, G. (2006) Metabolic changes in iron-stressed dicotyledonous plants. In *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms* (Barton, L.L. and Abadia, J., eds), pp. 359-370, Springer