

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Π.Μ.Σ. «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη του μεταφορέα K^+ - TRH1 ως
μοριακός διαμεσολαβητής στις
περιβαλλοντικές καταπονήσεις**



**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Γ. ΤΕΜΠΛΑΛΕΞΗΣ
ΑΘΗΝΑ 2016**

Επιβλέπων:
Επίκουρος Καθηγητής Σταμάτης Ρήγας

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Π.Μ.Σ. «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη του μεταφορέα K^+ - TRH1 ως
μοριακός διαμεσολαβητής στις
περιβαλλοντικές καταπονήσεις**



**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Γ. ΤΕΜΠΛΑΛΕΞΗΣ
ΑΘΗΝΑ 2016**

Επιβλέπων:
Επίκουρος Καθηγητής Σταμάτης Ρήγας

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τομέα Βιοχημείας, Ενζυμικής Τεχνολογίας, Μικροβιολογίας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

Τύπος εργασίας: Μεταπτυχιακή Εργασία

Τίτλος εργασίας: Μελέτη του μεταφορέα K^+ - TRH1 ως μοριακός διαμεσολαβητής στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις

Ον/μο: Δημήτριος Γ. Τεμπλαλέξης

Εξεταστική επιτροπή:

- 1. Επίκουρος Καθηγητής Ρήγας Σταμάτης (Επιβλέπων)***
- 2. Καθηγητής Χατζόπουλος Πολυδεύκης (μέλος)***
- 3. Επίκουρος Καθηγήτρια Μηλιώνη Δήμητρα (μέλος)***

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	5
Περίληψη.....	6
Abstract.....	6
1. Εισαγωγή	9
1.1 Το φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i> ως φυτό μοντέλο.....	9
1.2 Η φυτική ορμόνη αυξίνη.....	10
1.3 Η μεταφορά της αυξίνης	13
1.4 Αυξίνη και γεωτροπισμός.....	16
1.5 Η χημειοσωματική θεωρία για την πολική διάχυση της αυξίνης	18
1.6 Το γονίδιο <i>TRH1</i>	20
1.7 Η οξίνιση των εδαφών	24
1.8 Η θεωρία της τροφομορφογένεσης.....	27
1.9 Η υπόθεση για τα λειτουργία του <i>TRH1</i>	30
1.10 Σκοπός της εργασίας.....	32
2. Υλικά και Μέθοδοι	35
2.1 Φυτικό υλικό	35
2.2 Συνθήκες καλλιέργειας φυτών	35
2.3. Γενικά για μικροσκοπία και απεικόνιση GUS	36
2.4. Παρασκεύασμα φυτού <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.5. Χρώση GUS	37
2.6. Ανάλυση εικόνων με το πρόγραμμα ImageJ.....	38
3. Αποτελέσματα.....	40
3.1 Επίδραση συνθηκών καταπόνησης.....	40
3.2 Επίδραση του χαμηλού pH στην ανάπτυξη της ρίζας.....	42
3.3 Επίδραση του υψηλού pH στην ανάπτυξη της ρίζας	48
3.4 Η επίδραση τοξικών συγκεντρώσεων αργιλίου στην ανάπτυξη των φυτών	51
4. Συζήτηση.....	56
4.1 Η μεταφορά της αυξίνης και ο ρόλος του <i>TRH1</i>	56
4.2 Δυναμική ενδοκυτταρική μεταβολή συστημάτων μεταφοράς και ο ρόλος της στην ανάπτυξη	60
Βιβλιογραφία	63

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Π. Χατζόπουλο που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με την επιστήμη της Μοριακής Βιολογίας, καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή Σ. Ρήγα για την καθοδήγηση και τις καθοριστικές συμβουλές του στη συγγραφή αυτής της διπλωματικής μελέτης. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω και το άλλο μέλος της εξεταστικής επιτροπής την Επίκουρη Καθηγήτρια Δ. Μηλιώνη.

Στη συνέχεια θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου τη μοριακής βιολογίας, τα οποία με βοήθησαν στο εργαστήριο και σε οποιοδήποτε άλλο θέμα προέκυπτε. Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές, Αλατζά Αναστάσιο και Ντικράν Τσιτσεκιάν για τη βοήθεια τους και την συνεργασία τους, αλλά και ιδιαίτερα το Γεράσιμο Δάρα, ο οποίος αρχικά μου έμαθε τις τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας και στη συνέχεια έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και του ανθρώπους που ήταν δίπλα μου, αλλά ιδιαίτερα τον αδερφό μου, ο οποίος μου ήταν, είναι και θα είναι πάντα εκεί για εμένα.

Περίληψη

Η φυτική ορμόνη αυξίνη σχετίζεται με την ανάπτυξη και την απόκριση του φυτού στις καταπονήσεις. Η αυξίνη παράγεται στα υπέργεια τμήματα και μεταφέρεται στη ρίζα μέσω ενός εξειδικευμένου δικτύου πρωτεϊνικών μεταφορέων, στο οποίο συμμετέχουν μεταξύ άλλων οι πρωτεΐνες PIN, AUX/LAX και TRH1. Η αυξίνη απαντάται σε δύο μορφές στο φυτό: Στην πρωτονιομένη IAAH σε όξινα περιβάλλοντα και την ανιονική IAA⁻ σε ουδέτερα περιβάλλοντα. Σύμφωνα με τη χημειοσωματική θεωρία για τη πολικής μεταφορά της αυξίνης, στο κυτταρόπλασμα το pH είναι ουδέτερο ($\approx 7,0$), ενώ διατηρείται όξινο ($\text{pH} \approx 5,5$) στον αποπλάσματικό χώρο. Έτσι η διαβάθμιση pH που δημιουργείται επιτρέπει στην αυξίνη να εισέλθει στο κύτταρο κυρίως με ενεργή εισροή της μορφής IAA⁻ από τους πρωτεϊνικούς μεταφορείς AUX/LAX. Στη συνέχεια η εκροή της αυξίνης γίνεται μόνο μέσω εξειδικευμένων μεταφορέων εκροής PIN και TRH1.

Το γονίδιο *TRH1* κωδικοποιεί ένα μεταφορέα καλίου. Στα φυτά *trh1*, η ρίζα δεν αντιλαμβάνεται τον άξονα της βαρύτητας και δεν σχηματίζει ριζικά τριχίδια. Οι φαινοτυπικές αυτές ανωμαλίες σχετίζονται με τη διαταραχή της ομοιόστασης της αυξίνης στο ακρορίζιο. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να διευκρινιστεί ο ρόλος του μεταφορέα TRH1 στην αντίληψη-απόκριση σε συνθήκες καταπονήσεις ακραίων τιμών pH και τοξικότητας αργιλίου εξετάζοντας ταυτόχρονα την ορθότητα της χημειοσωματικής θεωρίας. Αυτό έγινε μέσω καταγραφής της αρχιτεκτονικής απόκρισης του ριζικού συστήματος βάση κύριων μορφολογικών χαρακτηριστικών της ρίζας όπως η στρέψη, το μήκος και η μορφογένεση των ριζικών τριχιδίων. Παράλληλα με τη βοήθεια του βιοδείκτη αυξίνης *DR5::GUS* εντοπίστηκε η κατανομή της ορμόνης στο ακρορίζιο.

Σε αντίθεση με το βασικό pH, σε όξινες συνθήκες παρατηρήθηκε διαταραχή στην ομοιόσταση της αυξίνης, η οποία φαίνεται να επηρεάζει το μήκος της ρίζας, τη στρέψη και την μορφογένεση των τριχιδίων. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι ο μηχανισμός απόκρισης συνδέεται με τη λειτουργία του συστήματος TRH1. Το αργίλιο δεν προκάλεσε δραματικές επιδράσεις όπως το όξινο pH στην αρχιτεκτονική της ρίζας. Συνοπτικά το σύστημα TRH1 αντιλαμβάνεται την ιοντική διαταραχή εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης H^+ επηρεάζοντας την ομοιόσταση της αυξίνης στο ακρορίζιο.

Λέξεις κλειδιά: Ομοιόσταση αυξίνης, Τροφομορφογένεση, Περιβαλλοντικές καταπονήσεις, TRH1, Μοριακός Βιοαισθητήρας

Title: Study of K⁺ transporter TRH1 that acts as a molecular mediator for environmental stress

Abstract

The plant hormone auxin is involved in plant development and response to stress. Auxin is mainly synthesized in the aerial parts and is transported to the root by an elegant network of protein transporters such as the PIN auxin-efflux carriers, the TRH1 potassium transporter and the AUX/LAX auxin-influx carriers. Auxin exists in two forms, the protonated IAAH in acidic environments and the IAA⁻ anion in neutral environments. According to the chemiosmotic theory of polar auxin transport, cells maintain a neutral pH (≈ 7) at the cytosol and an acidic pH (≈ 5.5) at the apoplastic space. In this way a pH gradient is formed, which allows the IAA⁻ form of auxin to enter the cell by active transport by the AUX/LAX transporters. Auxin efflux is performed by active transport of the IAA⁻ form through the PIN and TRH1 transporters.

The *TRH1* gene encodes a potassium transporter. The root of *trh1* plants is agravitropic and produces tiny-root-hairs. These abnormal phenotypes emanate from the auxin imbalance that occurs in the root-tip. The aim of this project was to clarify the role of *TRH1* in the perception of/response to stress caused by extreme pH values or toxic aluminum concentrations and to validate the chemiosmotic theory. This was accomplished by observing the root responses to stress through the recording of main morphological features including root length, gravitropism and morphogenesis of root hairs. In addition, auxin distribution in the root tip was monitored by the use of the auxin biosensor *DR5::GUS* construct.

In contrast to basic pH, in acidic conditions a disturbance in auxin homeostasis was observed affecting root length, gravitropisms and root hair formation. The results support the role of TRH1 system in stress response. Unlike the acidic pH, aluminum had no effect on root architecture. Taken together, the TRH1 system possibly perceives the ionic disturbance caused by high H⁺ concentration and affects auxin homeostasis in the root tip to control root response to stress.

Keywords: Auxin Homeostasis, Trophomorphogenesis, Environmental stress, TRH1, Molecular Biosensor

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή

1.1 Το φυτό *Arabidopsis thaliana* ως φυτό μοντέλο

Το φυτό *Arabidopsis thaliana* είναι μέλος της οικογένειας Brassicaceae και εμφανίζει μια ευρεία φυσική εξάπλωση στην Ευρώπη, την Ασία και τη νότια Αμερική (Meyeroowitz, 1994). Πολλοί διαφορετικοί οικότυποι έχουν συλλεχθεί από φυσικούς πληθυσμούς και είναι διαθέσιμοι για εργαστηριακή ανάλυση (1001 Genomes Consortium, 2016). Οι οικότυποι Columbia (Col), Landsberg *erecta* (Ler) και Wassilewskija (Ws) έχουν τις αποδεκτές προϋποθέσεις για γενετικές και μοριακές μελέτες λόγω των πολυμορφισμών που παρουσιάζουν στο γονιδίωμά τους (Passardi et al., 2007). Ο βιολογικός κύκλος του φυτού, συμπεριλαμβανομένου της βλάστησης των σπόρων, της ανάπτυξης της ροζέτας, έκπτυξης του κυρίως στελέχους, άνθιση και ωρίμανση των πρώτων σπόρων ολοκληρώνεται σε 6 εβδομάδες.

Τα άνθη του φυτού έχουν μήκος 2 mm και αποτελούνται από 4 σέπαλα, 4 πέταλα και 6 στήμονες. Οι καρποί έχουν μήκος 0,5 mm ενώ ένα ώριμο φυτό μπορεί να παράγει εκατοντάδες καρποταξίες με περισσότερους από 5000 σπόρους συνολικά. Τα φύλλα είναι καλυμμένα με μικρά μονοκύτταρα τριχίδια τα οποία είναι ικανοποιητικά μοντέλα για μελέτη της μορφογένεσης και της κυτταρικής διαφοροποίησης (Meinke et al, 1998).

Το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα για τους ερευνητές:

- Αναπτύσσεται και αντιδρά σε ασθένειες και καταπονήσεις με τον ίδιο τρόπο όπως τα περισσότερα καλλιεργούμενα φυτά.
- Έχει μικρό βιολογικό κύκλο, παράγει πολλούς σπόρους και η καλλιέργειά του είναι φθηνή και εύκολη μιας και λόγω του μικρού μεγέθους του απαιτεί ελάχιστο χώρο.
- Το χαμηλό κόστος παραγωγής επιτρέπει εκτεταμένα πειράματα γενετικής σε χιλιάδες φυτά ταυτόχρονα.
- Συγκριτικά με άλλα φυτά έχει μικρότερο και απλά οργανωμένο γονιδίωμα, γεγονός που διευκολύνει τις γενετικές αναλύσεις
- Ήταν το πρώτο φυτό του οποίου αποκωδικοποιήθηκε πλήρως η γενωματική αλληλουχία του.

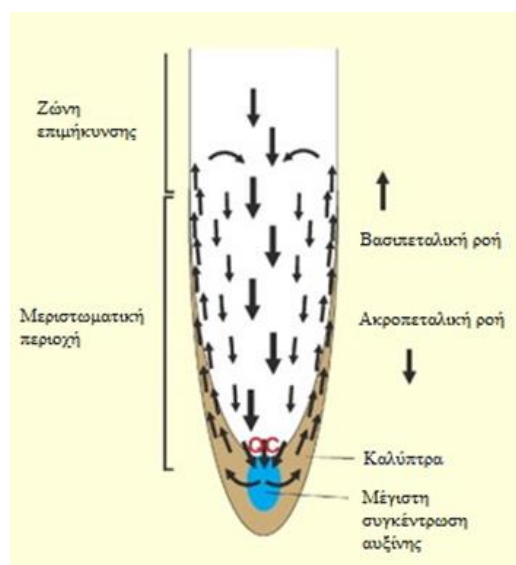
- Ήταν το φυτό στο οποίο έγιναν μεταλλάξεις που εξήγησαν το βιολογικό ρόλο των φυτικών ορμονών, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη διακίνηση της ορμόνης αυξίνης με τα συστήματα εισροής AUX1 (Bennett et al., 1996) και εκροής PIN/AGR/EIR (Chen et al., 1998; Gälweiler et al., 1998; Luschnig et al., 1998; Müller et al., 1998; Utsuno et al., 1998).

1.2 Η φυτική ορμόνη αυξίνη

Οι φυτικές ορμόνες είναι χημικές ενώσεις οι οποίες δρουν σε μικρές συγκεντρώσεις και επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη μορφολογία των φυτών. Τα φυτά χρησιμοποιούν πολλές διαφορετικές ορμόνες όπως πεπτιδία και στεροειδή, αλλά και τις πέντε μεγάλες κατηγορίες ορμονών: το αμπισικό οξύ τις κυτοκινίνες, το αιθυλένιο, τις γιββερελλίνες και την αυξίνη (Teale and al., 2006). Για τη φυτοορμόνη αυξίνη (από το ελληνικό ρήμα αυξάνω) γίνονταν υποθέσεις ότι ρυθμίζει την ανάπτυξη του φυτού, ακόμη και πολύ καιρό πριν ταυτοποιηθεί η χημική της δομή. Στα τέλη του 1800, ο Sachs υπέθεσε πως μια μικρή συγκέντρωση ρυθμιστών της φυτικής ανάπτυξης (plant growth regulators) κινούνται με διάφορους ρυθμούς στο φυτό ώστε να δίνουν ένα πλαίσιο για την ανάπτυξη του φυτού (Santner et al., 2009). Παράλληλα ο Charles Darwin και ο Francis Darwin το 1880, ανακάλυψαν πως οι βλαστοί και οι ρίζα του φυτού αντιλαμβάνονται το φως και τη βαρύτητα, αλλά και πως αυτό το ερέθισμα μεταβιβάζονται και στους άλλους ιστούς του φυτού όπου πυροδοτούσαν μία αναπτυξιακή απόκριση (Hart, 1990). Αυτές οι δύο ιδέες βελτιώθηκαν από τον Boysen-Jensen και τον Paál, μέχρι που οι Cholodny και Went κατέληξαν στη υπόθεσή τους πως οι τροπισμοί (φωτοτροπισμός και γεωτροπισμός) προκαλούνται από την **ασύμμετρη κατανομή** μιας ουσίας που προάγει την φυτική ανάπτυξη (Jensen, 1936; Dolk and Thimann, 1932; Went and Thimann, 1937). Η *in vitro* βιοδοκιμή στην οποία κομμάτια gel αγαρόζης τα οποία περιείχαν συγκέντρωση αυξίνης ήταν ικανά να επηρεάσουν την αναπτυξιακή κατεύθυνση ενός κολεόπτρου βρώμης απέδειξε πως το ινδολο-3-οξικό οξύ (indole-3-acetic acid-IAA), είναι η κύρια φυσική μορφή αυξίνης στα φυτά. Έτσι η αυξίνη χαρακτηρίστηκε ως ορμόνη

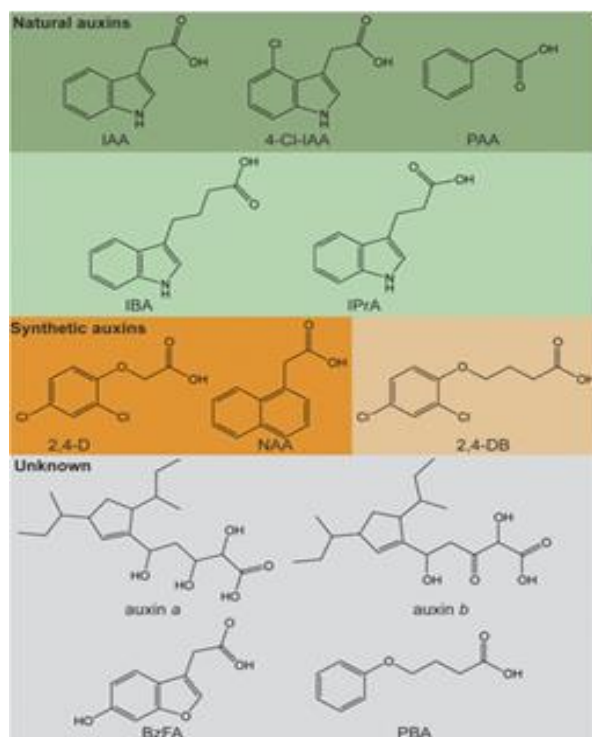
ανάπτυξης επειδή είχε τη ικανότητα να σηματοδοτήσει την ανάπτυξη σε απόκριση στο ερέθισμα της βαρύτητας ή του φωτός.

Η αυξίνη ρυθμίζει ένα ευρύ φάσμα από κυτταρικές αποκρίσεις, οι οποίες είναι ζωτικής σημασίας για την μορφογένεση και την ανάπτυξη των φυτών. Η ορμόνη αυτή εμπλέκεται σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες όπως την εμβρυογένεση, την οργανογένεση, το σχηματισμό του καρπού, την διαφοροποίηση του αγγειακού ιστού, το σχηματισμό του επικοτυλιακού άγκιστρου και την κυριαρχία του ακραίου μεριστώματος του βλαστού (Kepinski and Leyser, 2005). Στις ρίζες, η αυξίνη διεγείρει την ανάπτυξη των δευτερογενών μεριστωμάτων, επηρεάζει την επιμήκυνση των κυττάρων της ρίζας, ρυθμίζει το σχηματισμό των ριζικών τριχιδίων και είναι απαραίτητη για το γεωτροπισμό (Rigas et al., 2013). Η ορμόνη αυτή παράγεται κατά κύριο λόγο στα εναέρια μέρη του φυτού και μεταφέρεται στη συνέχεια στα υπόλοιπα. Μέσα στη ρίζα η αυξίνη μεταφέρεται **ακροπεταλικά** μέσω του κεντρικού κυλίνδρου και **βασιπεταλικά** μέσω του φλοιού (Sabatini et al., 1999), δημιουργώντας μία χαρακτηριστική ροή ανατροφοδοτούμενου βρόγχου, ενώ στο ακρορίζιο και ειδικότερα στην περιοχή του εφησυχάζοντος κέντρου και του ακραίου μεριστώματος της ρίζας η συγκέντρωση της αυξίνης φτάνει στο μέγιστο επίπεδο (*auxin maxima*) (Εικόνα 1.1). Αυτή η σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της αυξίνης μέχρι το **auxin maxima** είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της οργάνωσης της δομής της ρίζας (Friml et al., 2003)

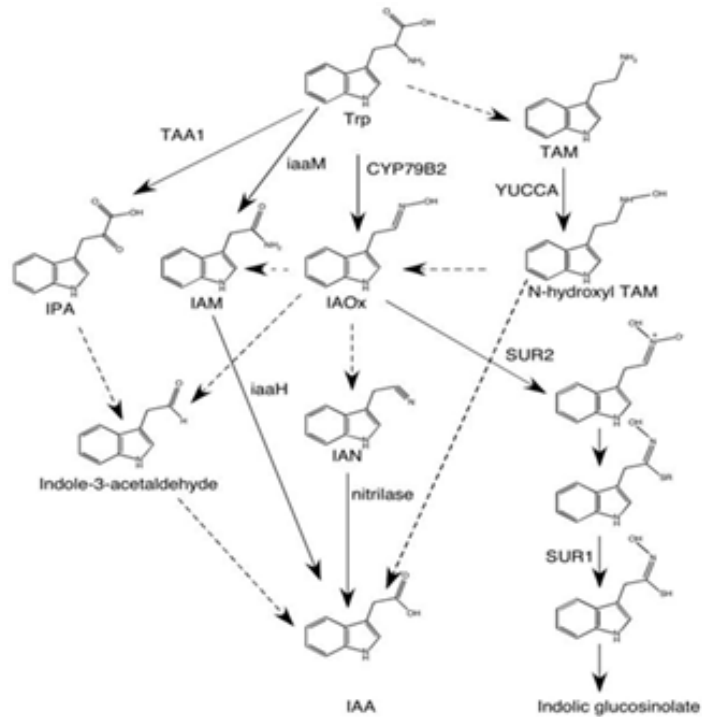


Εικόνα 1.1. Ο χαρακτηριστικός ανατροφοδοτούμενος βρόγχος της ροής της αυξίνης στη ρίζα. (QC = εφησυχάζον κέντρο).

Υπάρχουν πολλά είδη αυξινών, φυσικά και συνθετικά (Εικόνα 1.2). Είναι πολύ πιθανό ότι υπάρχει μία πληθώρα βιοσυνθετικών μονοπατιών που οδηγούν στην de novo παραγωγή της αυξίνης. Η φυσική αυξίνη IAA βιοσυντίθεται και από μονοπάτια που έχουν ως βάση την **τρυπτοφάνη**, αλλά και από μονοπάτια που χρησιμοποιούν άλλα μόρια (Tivendale et al., 2014). Φυτοπαθογόνα βακτηριακά είδη που παράγουν αυξίνη όπως το *Agrobacterium tumefaciens* και το *Pseudomonas savastanoi* χρησιμοποιούν και αυτά την τρυπτοφάνη ως το κύριο πρόδρομο μόριο της αυξίνης (Zhao, 2010). Το ινδολοξικό οξύ μπορεί να προέλθει από ενώσεις IAA-αμινοξέων, IAA-σακχάρων και IAA-μεθυλεστέρων (Bartel et al., 1997; Li et al., 2008), αλλά πέντε κύριες φυσικές ενώσεις, αναγνωρίζονται ως πρόδρομοι του IAA, συμπεριλαμβανομένων το ινδολο-3-πυροσταφυλικό οξύ (IPyA), την ινδόλη-3-ακεταλδοξίμη (IAOx), την ινδόλη-3-ακετονιτρίλιο (IAN), την ινδόλη-3-ακεταμίδιο (IAM), και την ινδολο-3-ακεταλδεΐδη (IAAld) (Εικόνα 1.3). Το μονοπάτι του IPyA θεωρείται η "κύρια" βιοσυνθετική οδός της αυξίνης. (Zhao, 2010). Επιπλέον, αν και ο κύριος μηχανισμός παραγωγής της αυξίνης είναι συντηρημένος σχεδόν σε ολόκληρο το φυτικό βασίλειο, υπάρχουν πολλά φυτικά είδη τα οποία έχουν αναπτύξει τις δικές τους τροποποιήσεις στον μηχανισμό αυτό, έτσι ώστε να μεγιστοποιήσουν την βιοσύνθεση του ινδολοξικού οξέος (Bartel et al., 1997).



Εικόνα 1.2. Η χημική δομή των διάφορων αυξινών (φυσικών και συνθετικών)



Εικόνα 1.3. Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια παραγωγής IAA από την τρυπτοφάνη. Με πλήρη βέλη εικονίζονται τα βήματα για τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί τα αντίστοιχα γονίδια σε φυτά ή μικρόβια, ενώ με διακεκομμένα βέλη εικονίζονται πιθανά βήματα για τα οποία δεν έχουν βρεθεί τα υπεύθυνα γονίδια.

1.3 Η μεταφορά της αυξίνης

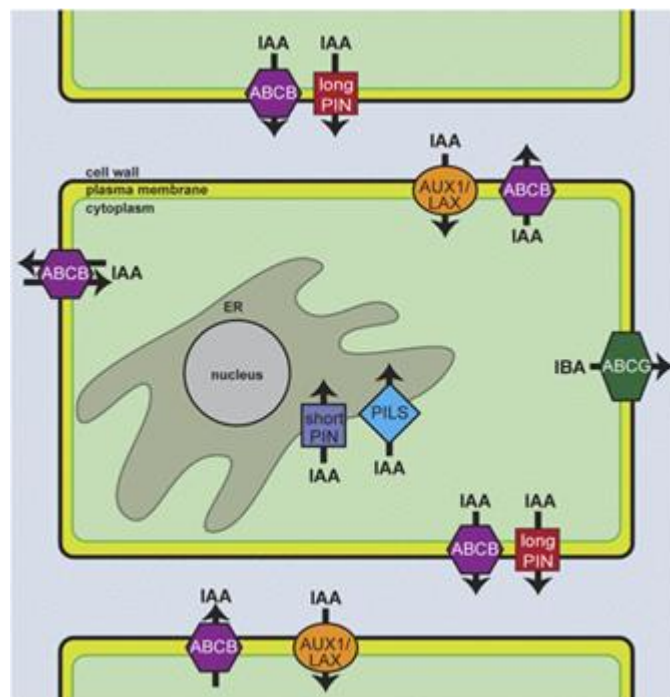
Όπως προαναφέρθηκε, ακόμα και πριν ανακαλυφθεί η χημική δομή της αυξίνης, γνωρίζαμε πως η ταχύτατη και πολική μεταφορά της είναι απαραίτητη για τις αναπτυξιακές αποκρίσεις. Οι Went και Thimann από το 1937, υπέθεσαν πως η αυξίνη δεν μεταφέρεται με απλή διάχυση αλλά με εξειδικευμένους μεταφορείς. Οι μεταφορείς αυτοί είναι πολυπληθείς και δημιουργούν ένα πολύπλοκο δίκτυο διακίνησης της αυξίνης (Εικόνα 1.4). Μέλη της οικογένειας γονιδίων PIN και ABCB (ATP-Binding Cassette Subfamily B) είναι υπεύθυνα για την **εκροή** της αυξίνης από το φυτικό κύτταρο, ενώ μέλη της οικογένειας AUX/LAX (Auxin Resistant1/Like AUX1) είναι υπεύθυνα για την **εισροή** της στο κύτταρο. Η οικογένεια AUX/LAX

απαρτίζεται από μέλη τα οποία μοιάζουν με περμεάσες αμινοξέων και περιλαμβάνει τους συμμεταφορείς πρωτονίων (H⁺) AUX1, LAX1, LAX2 και LAX3, οι οποίοι τοποθετούνται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και είναι ικανοί να μεταφέρουν την φυσική αυξίνη με τη μορφή του IAA και την συνθετική αυξίνη 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), αλλά όχι το πρόδρομο μόριο IBA και τη συνθετική αυξίνη NAA (1-Naphthaleneacetic acid) (Yang et al., 2006). Τα γονίδια PIN-FORMED (PIN) εκφράζουν πρωτεΐνες, οι οποίες δρουν ως μεταφορείς του μορίου αυξίνης κατά την εκροή της από τα κύτταρα. Σε αυτή την οικογένεια έχουν χαρακτηριστεί έως τώρα 8 γονίδια από το AtPIN1 έως και το AtPIN8 (Křeček et al., 2009). Οι πρωτεΐνες PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, και PIN7 τοποθετούνται στην **κυτταροπλασματική μεμβράνη** των κυττάρων, ενώ οι πρωτεΐνες PIN5 και PIN8 τοποθετούνται στον **ενδοπλασματικό δίκτυο** (Endoplasmic Reticulum-ER). Εξαιρεση αποτελεί η πρωτεΐνη PIN6 η οποία παρουσιάζει δυαδική στόχευση και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά και στο ER. Όλοι οι μεταφορείς PIN αποτελούνται από 5 διαμεμβρανικές δομές στο άμινο-τελικό τους άκρο και 5 διαμεμβρανικές δομές στο καρβόξυ-τελικό τους άκρο. Μεταξύ των δύο διαμεμβρανικών περιοχών σχηματίζεται ένας υδρόφιλος βρόγχος, ο οποίος στην περίπτωση των μεταφορέων PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 και PIN7 δημιουργεί ένα μεγάλο πόρο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη για αυτό και χαρακτηρίζονται ως **“μακριές” πρωτεΐνες PIN**, ενώ στην περίπτωση των μεταφορέων PIN5 και PIN8, ο πόρος που σχηματίζεται στο ER είναι μικρότερος και επομένως χαρακτηρίζονται ως **“κοντές” πρωτεΐνες PIN**.

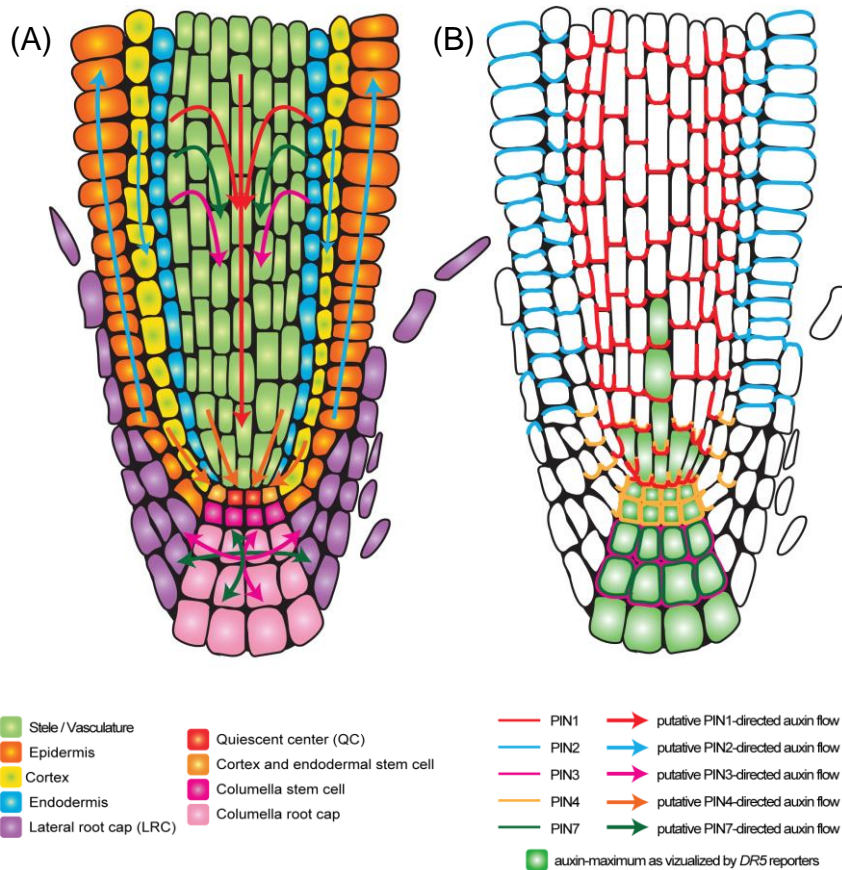
Οι μεταφορείς που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων τοποθετούνται μη συμμετρικά στα κύτταρα και η πολικότητά τους αυτή καθορίζει την κατεύθυνση της διακυτταρικής ροής της αυξίνης, κατευθύνοντας έτσι τη ροή της όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5A. Ο ακριβής ρόλος των γονιδίων PIN που τοποθετούνται στο ER δεν έχει ακόμα αποκαλυφθεί αλλά φαίνεται πως περιλαμβάνει τον έλεγχο της συγκέντρωσης του IAA στο κυτταρόπλασμα μέσω του μεταβολισμού ή τη διαμερισματοποίησή της (Enders et al., 2015).

Η **ιστοειδική έκφραση** των γονιδίων PIN δημιουργεί ένα αλληλεπικαλυπτόμενο δίκτυο για τη μεταφορά της αυξίνης (Εικόνα 1.5B)

όπου κάθε πρωτεΐνη παίζει το δικό της ρόλο αλλά ταυτόχρονα υποστηρίζεται και από άλλες (Wiśniewska et al., 2006; Vieten et al., 2005). Τα γονίδια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο και σε άλλα αναπτυξιακά στάδια του φυτού και ειδικότερα: το γονίδιο *PIN1* παίζει ρόλο στην οργανογένεση και τη διαφοροποίηση του αγγειακού ιστού (Gälweiler et al., 1998; Benková et al., 2003; Reinhardt et al., 2003), το γονίδιο *PIN2* παίζει ρόλο στο γεωτροπισμό της ρίζας (Müller et al., 1998), το γονίδιο *PIN3* συμμετέχει στη ρύθμιση της γεωτροπικής απόκρισης και της διαφορικής ανάπτυξης του βλαστού (Friml et al., 2002b), το γονίδιο *PIN4* ελέγχει την οργάνωση του μεριστώματος της ρίζας (Friml et al., 2002a) και το γονίδιο *PIN7* ρυθμίζει την πρόωμη ανάπτυξη του εμβρύου (Friml et al., 2003b).



Εικόνα 1.4. Οι διάφοροι μηχανισμοί μεταφοράς της αυξίνης. Οι πρωτεΐνες AUX1/LAX εισάγουν την αυξίνη στο κύτταρο, οι «μακριές» πρωτεΐνες PIN και οι ABCB εξάγουν την αυξίνη από τα κύτταρα ενώ οι «κοντές» πρωτεΐνες PIN βοηθούν τη μεταφορά της αυξίνης από το κυτταρόπλασμα στο ER.

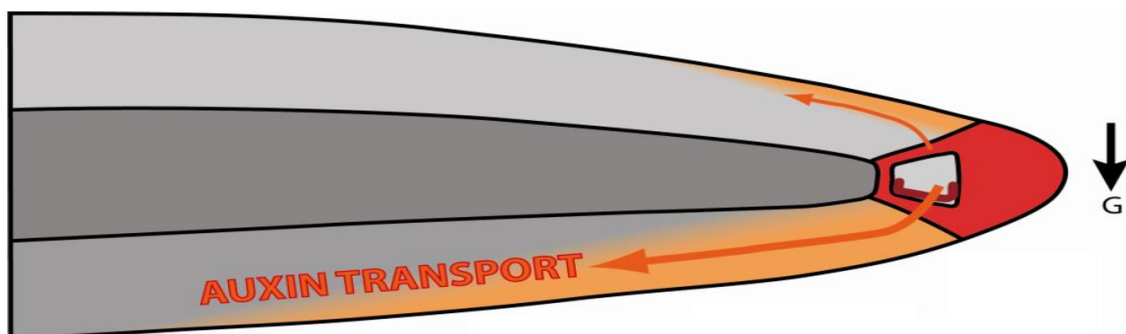


Εικόνα 1.5. Η πολική μεταφορά της αυξίνης και η τοποθέτηση των πρωτεϊνών-μεταφορέων PIN στο ακρορίζιο. (A) Τα βέλη υποδεικνύουν την ροή της αυξίνης στη οποία συμμετέχει κάθε PIN. (B) Η ιστοειδική τοποθέτηση του κάθε μεταφορέα PIN στα κύτταρα του ακρορίζιου.

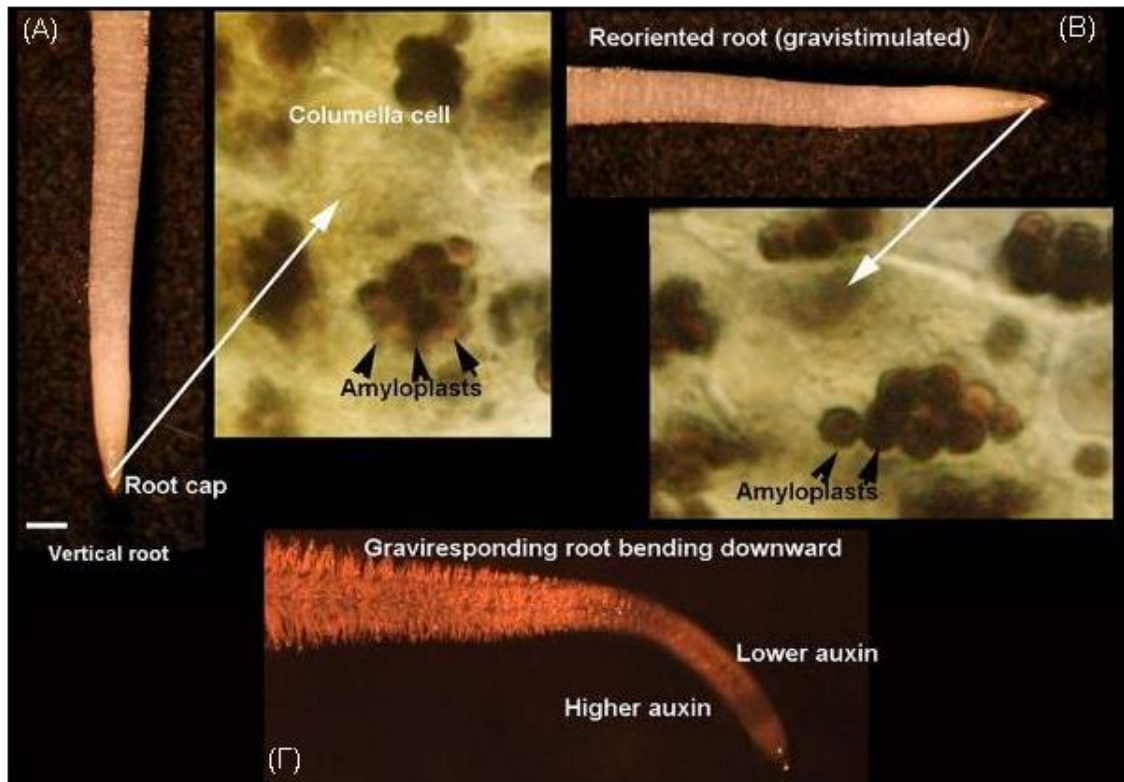
1.4 Αυξίνη και γεωτροπισμός

Η ανάπτυξη της ρίζας ξεκινά αρχικά με τη διαίρεση των μεριστωματικών κυττάρων που βρίσκονται στο ακραίο μερίστωμα, ενώ στη συνέχεια τα κύτταρα που δημιουργήθηκαν επεκτείνονται σε μέγεθος στη ζώνη επιμήκυνσης. Ο ρυθμός της επιμήκυνσης των κυττάρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αυξίνης, όπου περισσότερη αυξίνη σημαίνει πιο αργή επιμήκυνση των κυττάρων (το αντίθετο από ότι συμβαίνει στο βλαστό). Η ρίζα χρησιμοποιεί αυτό το μηχανισμό για να ανταποκριθεί στο ερέθισμα της βαρύτητας, μια φυσιολογική διαδικασία η οποία καλείται **γεωτροπισμός**. Ο γεωτροπισμός είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος στο έδαφος και επηρεάζει κρίσιμες λειτουργίες του φυτού, όπως η καλύτερη στερέωση του φυτού στο έδαφος και η

αποδοτικότερη πρόσληψη νερού και θρεπτικών (Chen et al., 1999). Η διαδικασία της γεωτροπικής απόκρισης της ρίζας έχει χωριστεί σε τέσσερις διακριτές φάσεις: αρχικά γίνεται η αντίληψη του ερεθίσματος της βαρύτητας, μετά η μεταγωγή του σήματος, στη συνέχεια η μετάδοση του σήματος και τέλος η απόκριση της ρίζας μέσω της στρέψης της (Perrin et al., 2005). Όταν η ρίζα δεν μεγαλώνει παράλληλα προς το διάνυσμα της βαρύτητας δημιουργείται μια ασύμμετρη κατανομή της συγκέντρωσης της αυξίνης (Εικόνα 1.6) όπου σύμφωνα με τη **θεωρία των Cholodny–Went** οδηγεί σε έναν διαφορετικό ρυθμό κυτταρικής επιμήκυνσης των κυττάρων στις δύο πλευρές της ρίζας με αποτέλεσμα της στρέψης της προς τα βαθύτερα στρώματα του εδάφους (Blancaflor, 2013). Η αντίληψη της βαρύτητας από τη ρίζα γίνεται από μια ομάδα κυττάρων που βρίσκεται στο ακρορίζιο, τους στατόλιθους οι οποίοι μέσα τους έχουν μεγάλα και βαριά μόρια αμύλου, τα οποία καλούνται αμυλοπλάστες και κινούνται προς τη μεριά του κυττάρου που είναι κάθετη στη βαρύτητα (Εικόνα 1.7). Οι υπεύθυνοι υποδοχείς και οι αντίστοιχοι μοριακοί μηχανισμοί που αντιλαμβάνονται αυτήν τη μετακίνηση των αμυλοπλαστών όμως δεν είναι ακόμα γνωστοί. Σύμφωνα με παρατηρήσεις που έχουν γίνει φαίνεται να παίζουν ρόλο τα διάφορα κυτταροπλασματικά ιόντα (πχ Ca^{2+}), αλλά και οι απότομες αλλαγές στο pH του κυτταροπλάσματος (Scott et al., 1999; Gehring et al., 1990).



Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση του πως η βαρύτητα προκαλεί ασύμμετρη κατανομή της αυξίνης μέσα στη ρίζα με αποτέλεσμα τη στρέψη



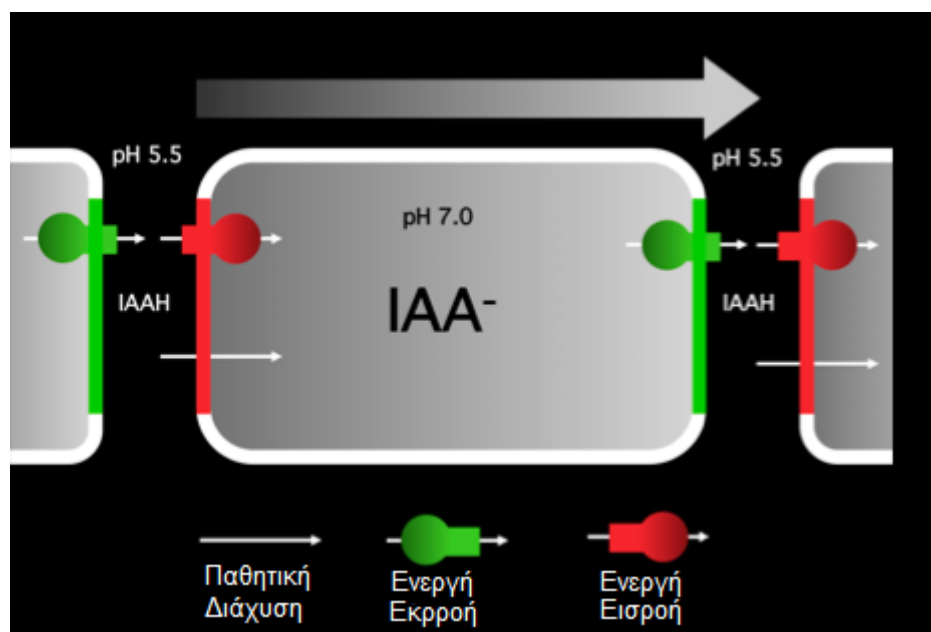
Εικόνα 1.7. Αντίληψη της βαρύτητας και στρέψη της ρίζας. (Α) Οι αμυλοπλάστες τοποθετούνται στο κάτω μέρος των κυττάρων όταν η ρίζα αναπτύσσεται παράλληλα με τον άξονα της βαρύτητας. (Β) Με στρέψη της ρίζας οι αμυλοπλάστες αλλάζουν προσανατολισμό και κατακρημνίζονται στα πλάγια. (Γ) Η διαφορετική συγκέντρωση αυξίνης επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων με αποτέλεσμα τη στρέψη της ρίζας.

1.5 Η χημειωσμητική θεωρία για την πολική διάχυση της αυξίνης

Η αυξίνη ως ινδολο-3-οξεικό οξύ είναι ένα ασθενές οξύ με pK_a 4,75, το οποίο βρίσκεται σε δύο μορφές στο φυτικό κύτταρο. Σε περιβάλλοντα όπου το pH είναι ουδέτερο, η αυξίνη βρίσκεται στη μη πρωτονιομένη μορφή της (το ανιόν IAA^-), ενώ σε περιβάλλον όξινου pH , η αυξίνη απαντάται σε ένα μεγάλο ποσοστό (17%) με την πρωτονιομένη μορφή της $IAAH$, όπως φαίνεται και από την εξίσωση διάστασης των ασθενών οξέων των Henderson και Hasselbalch, όπου $IAAH \rightleftharpoons IAA^- + H^+$ (Zažímalová et al., 2010). Η μορφή $IAAH$ είναι ικανή να περάσει μέσα από τις μεμβράνες του κυττάρου με απλή διάχυση, ενώ το ανιόν IAA^- δεν μπορεί να περάσει από τις μεμβράνες χωρίς την βοήθεια εξειδικευμένων μεταφορέων που μεταφέρουν το IAA^- και H^+ (Εικόνα 1.8) (Hasenstein et al., 1984). Σύμφωνα με τη **χημειωσμητική**

θεωρία της πολικής μεταφοράς της αυξίνης τα κύτταρα διατηρούν ένα ουδέτερο pH μέσα στο κύτταρο (περίπου 7), ενώ μέσω H^+/ATP ασων διατηρούν το pH του αποπλάστη όξινο (περίπου 5,5). Με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα δημιουργούν μία **διαβάθμιση pH**, η οποία επιτρέπει στην αυξίνη να εισέλθει στο κύτταρο και μέσω απλής διάχυσης, αλλά και μέσω ενεργής εισροής με πρωτεϊνικούς μεταφορείς (πχ AUX1) (Blakeslee et al., 2005). Στη συνέχεια η αυξίνη εγκλωβίζεται μέσα στο κύτταρο με την μορφή ανιόντος και μπορεί να εξαχθεί μόνο από άλλου τύπου πρωτεϊνικούς μεταφορείς (πχ PIN) (Hasenstein et al., 1984).

Η διαδικασία συσσώρευσης ενός ασθενούς οξέος ή βάσης μέσα στο κύτταρο υπό τη μορφή ιόντος καλείται **παγίδευση ιόντων** (ion trapping) και παρατηρείται τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα. Στην ιατρική εκμεταλλευόμαστε την παγίδευση ιόντων στην φαρμακοκινητική για την αποτελεσματικότερη αξιοποίηση φαρμακευτικών ενώσεων από τον οργανισμό (Weiss, 2009). Αυτό το μοντέλο μεταφοράς, όπου η αυξίνη μπορεί να εισαχθεί με δύο τρόπους στο κύτταρο (διάχυση και μεταφορείς), αλλά να εξαχθεί μόνο με έναν (μεταφορείς), υποδεικνύει επίσης πως το μοριακό δίκτυο των πρωτεϊνικών μεταφορέων που εξάγουν την αυξίνη από το κύτταρο παίζει σημαντικότερο ρόλο στην πολική μεταφορά της αυξίνης από το αντίστοιχο σύστημα που την εισάγει στο κύτταρο (Blakeslee et al., 2005; Goldsmith et al., 1981; Steinacher et al., 2012).



Εικόνα 1.8. Η χημειωσμητική πολική μεταφορά της αυξίνης. Στο εξωτερικό του κυττάρου, όπου το pH είναι χαμηλό 5.5, η μορφή IAAH είναι η επικρατέστερη έναντι της IAA⁻. Αντίθετα, στο εσωτερικό του κυττάρου η αυξίνη υπάρχει αποκλειστικά με τη μορφή του IAA⁻ εξαιτίας του ουδέτερου pH 7.0. Για αυτό το λόγο η αυξίνη από το εξωτερικό του κυττάρου διέρχεται με διάχυση (IAAH-απλό βέλος) αλλά κυρίως ενεργητικά με μεταφορείς (IAA⁻κόκκινος μεταφορέας). Η μεταφορά από το εσωτερικό προς το εξωτερικό γίνεται μόνο με εξειδικευμένες μεταφορείς IAA⁻ (πράσινο χρώμα).

1.6 Το γονίδιο *TRH1*

Πρόσφατα δεδομένα αποκαλύπτουν το σημαντικό ρόλο του γονιδίου *TRH1* στην διακίνηση της αυξίνης και στη ρύθμιση της ομοιόστασης στο κύτταρο. Το γονίδιο *TRH1* (Tiny Root Hair 1) ή αλλιώς *AtKUP4/KT3* ανήκει στην οικογένεια των *KT/KUP/HAK* γονιδίων (Grabov, 2007) και φαίνεται πως κωδικοποιεί ένα μεταφορέα καλίου (K⁺). Στη ρίζα η έκφραση του εντοπίζεται κυρίως στο κεντρικό κύλινδρο και στο ακρορίζιο. Τα μεταλλαγμένα φυτά που δεν εκφράζουν το γονίδιο *TRH1*, εμφανίζουν δυο φαινοτυπικές ανωμαλίες. Η πρώτη είναι ότι η ρίζα των φυτών *trh1* δεν αντιλαμβάνεται την βαρύτητα και έτσι αναπτύσσεται μη γεωτροπικά (Εικόνα 1.9A και B). Η δεύτερη φαινοτυπική ανωμαλία των φυτών *trh1* είναι ότι ενώ γίνεται έκπτυξη των ριζικών τριχιδίων, αυτά δεν επιμηκύνονται (Εικόνα 1.9) (Rigas et al., 2001; Daras et al 2015). Στο φυτό *Arabidopsis* τα κύτταρα της ρίζας που θα διαφοροποιηθούν σε ριζικά τριχίδια ονομάζονται τριχοβλάστες και είναι τοποθετημένα με συγκεκριμένο μοτίβο στη ρίζα. Όταν δεν εκφράζεται το γονίδιο *TRH1*, στους τριχοβλάστες εμφανίζονται περισσότερες από μία θέσεις έκπτυξης ριζικών τριχιδίων. Ένα από τα σημεία έκπτυξης βρίσκεται μόνιμα στη σωστή θέση δηλαδή στη βάση του τριχοβλάστη, ενώ τα υπόλοιπα σημεία εντοπίζονται διασκορπισμένα σε ολόκληρο το μήκος του επιδερμικού κυττάρου (Εικόνα 1.9 H).



Εικόνα 1.9. Η επίδραση του γονιδίου *TRH1* στο σχηματισμό των ριζικών τριχιδίων και το γεωτροπισμό της ρίζας. Α) Φυτό αγρίου τύπου, Β) Φυτό *trh1*, Γ) Φυτό αγρίου τύπου, Δ) Φυτό *trh1*, Ε) Φυτό *trh1* μετασχηματισμένο με το γενωματικό κομμάτι που περιέχει το γονίδιο *TRH1*, ΣΤ) Φυτό αγρίου τύπου, Ζ) Φυτό *trh1*, Η) Τριχοβλάστης φυτού *trh1*, τα βέλη δείχνουν τα όρια του κυττάρου και οι αστερίσκοι τις θέσεις έκπτυξης ριζικών τριχιδίων.

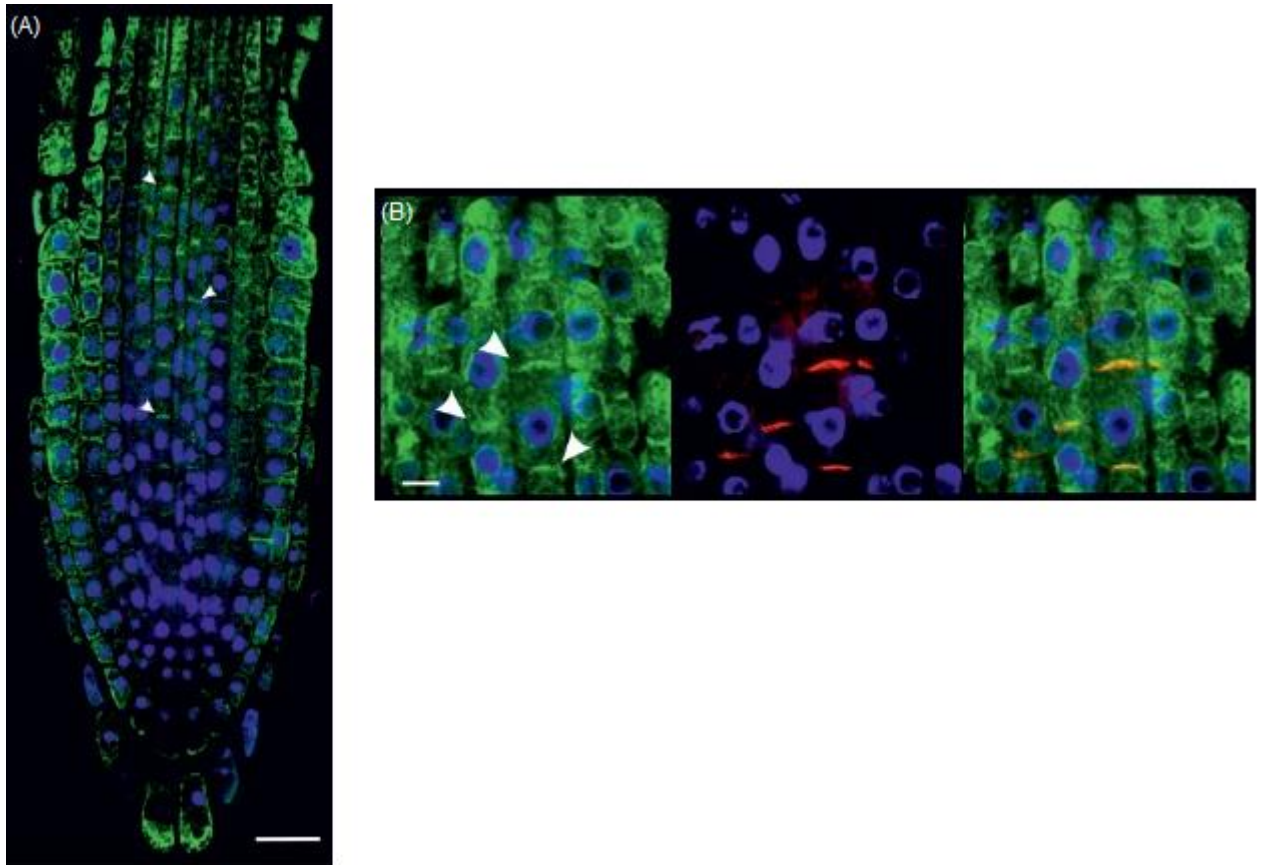
Οι μεταλλάξεις στα γονίδια της οικογένειας *KT/KUP/HAK* που κωδικοποιούν μεταφορείς K^+ εμφανίζουν φαινότυπους μειωμένης ανάπτυξης των φυτών, οι οποίοι πιθανώς οφείλονται σε ελαττωματική διακίνηση της αυξίνης (Fu and Luan, 1998; Kim et al., 1998; Maser et al., 2001; Quintero and Blatt, 1997; Rubio et al., 2000). Για παράδειγμα τα μεταλλάγματα του γονιδίου *KT2/KUP2* εμφανίζουν κοντό υποκοτύλιο, μικρότερη φυλλική επιφάνεια και κοντότερο ανθοφόρο βλαστό (Elumalai et al., 2005).

Ένα γεγονός που συνδέει το γονίδιο *TRH1* και την ομοίωση της αυξίνης είναι ότι οι φαινότυποι των φυτών *trh1* συμπληρώνονται όταν εφαρμοστεί εξωγενώς αυξίνη, κάτι που δεν παρατηρείται όταν αυξηθεί η συγκέντρωση K^+ (Vicente et al., 2004). Σε συμφωνία με το ιστοειδικό

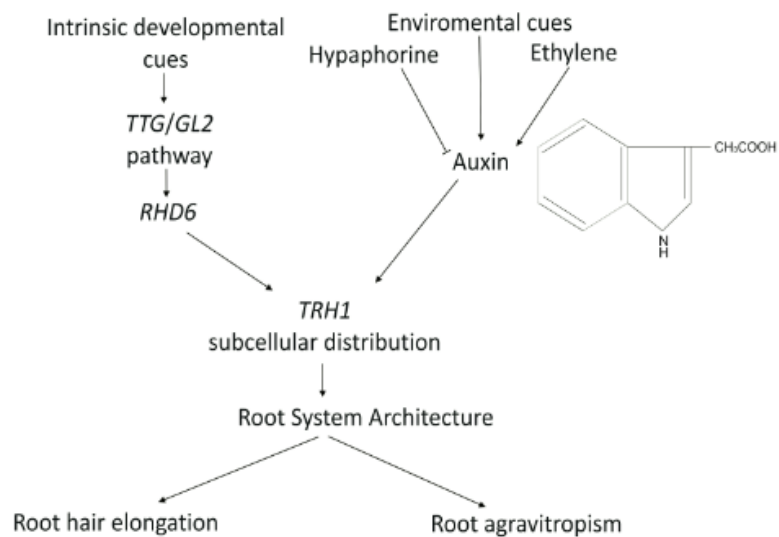
πρότυπο έκφρασης του γονιδίου, ο μεταφορέας K^+ TRH1 βρίσκεται στα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου, όπου γίνεται η ακροπεταλική μεταφορά της αυξίνης. Η πρωτεΐνη τοποθετείται πολικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όπως το σύστημα εκροής αυξίνης PIN1, αλλά εντοπίζεται και σε ενδομεμβρανικές δομές τύπου ER (Εικόνα 1.10) (Desbrosses et al. 2003; Rigas et al. 2013).

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν πως ο μεταφορέας TRH1 σχηματίζει **ομοδιμερή**, κάτι που φαίνεται να έχει ως σκοπό την δομική προσομοίωση με μεταφορείς καλίου τύπου Shaker (Daras et al., 2015). Οι μεταφορείς καλίου τύπου Shaker συνήθως αποτελούνται από 4 υπομονάδες που περιέχουν 6 διαμεμβρανικές περιοχές η καθεμία, με σύνολο 24 διαμεμβρανικές περιοχές (Pilot et al., 2001; Daram et al., 1997). Κατά αντιστοιχία ο ομοδιμερισμός του συστήματος TRH1 με 12 υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές ανά υπομονάδα οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλόκου με 24 διαμεμβρανικές περιοχές.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι στη ρίζα των φυτών της μετάλλαξης *trh1*, παρατηρείται **εκτοπική τοποθέτηση** του μεταφορέα εκροής αυξίνης PIN1 στα αρχικά κύτταρα της επιδερμίδας. Το πρότυπο αυτό εξηγείται ως προσπάθεια αποκατάστασης της ροής της αυξίνης της ρίζας, φαινόμενο που παρατηρείται γενικά σε άλλα μεταλλάγματα που αδυνατούν να ρυθμίσουν την ομοιόσταση της αυξίνης (Rigas et al., 2013). Από τα παραπάνω φαίνεται, ότι το γονίδιο *TRH1* συγκεντρώνει ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά που δεν σχετίζονται μόνο με τη μεταφορά K^+ αλλά και με τη ρύθμιση της ομοιόστασης της αυξίνης στο ακρορίζιο, αφού σχετίζεται με τη διακίνηση της ορμόνης επηρεάζοντας την **αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος** (Vicente et al., 2004). Παρόλα αυτά, δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός με τον οποίο το σύστημα TRH1 συμμετέχει στην διακίνηση της αυξίνης. Από πρόσφατα δεδομένα όμως φαίνεται πως στα φυτά το σύστημα TRH1 λειτουργεί ως διαμεσολαβητής μεταξύ των εξωγενών ή περιβαλλοντικών παραγόντων με τα ενδογενή αναπτυξιακά σιγνάλα. Το TRH1 το πετυχαίνει αυτό επηρεάζοντας την ομοιόσταση της αυξίνης για να ρυθμίσει την ανάπτυξη της ρίζας, επηρεάζοντας τη μορφογένεση των ριζικών τριχιδίων και τη στρέψη της ρίζας, σε απόκριση στους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Εικόνα 1.11) (Rigas et al., 2013).



Εικόνα 1.10. Κατανομή του συστήματος TRH1 στη ρίζα. (A) Η υποκυτταρική της κατασκευής TRH1:YFP στα κύτταρα της ρίζας φαίνεται με πράσινο φθορισμό, B) Αριστερά: με πράσινο η πρωτεΐνη TRH1:YFP τοποθετείται στην κάτω μεριά των κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου. Στο κέντρο: με κόκκινο η τοποθέτηση της πρωτεΐνης PIN1 και δεξιά: η πρωτεΐνη PIN1 αλληλεπικαλύπτεται πολικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με τη πρωτεΐνη TRH1 δίνοντας κίτρινο φθορισμό [Κλίμακα: A) 20 μm B) 5 μm].



Εικόνα 1.11. Το σύστημα TRH1 μεσολαβεί στη σύγκλιση εξωγενών/περιβαλλοντικών παραγόντων με ενδογενή σινιάλα. Το TRH1 χρησιμοποιεί την αυξίνη για να ρυθμίσει την ανάπτυξη της ρίζας (ριζικά τριχίδια και γεωτροπισμός), ώστε να διασφαλίσει την πλαστικότητα της ανάπτυξης του φυτού αναλόγως το περιβάλλον.

1.7 Η οξίνιση των εδαφών

Το pH του εδάφους κυμαίνεται και μπορεί να είναι όξινο ή βασικό. Το όξινο έδαφος ($\text{pH} < 5.5$) συναντάται σε πολλές περιοχές του κόσμου, όπως στην Βόρειο και Νότιο Αμερική, σε όλη την Ευρώπη, στην κεντρική Αφρική, αλλά και στα Βόρεια τμήματα της Ασίας (Chesworth, 2008). Στην Ελλάδα τα όξινα εδάφη καλύπτουν το 15% των συνολικών καλλιεργούμενων εκτάσεων (Κουκουλάκης και Παπαδόπουλος, 2007). Οι όξινες συνθήκες εδάφους είναι κατάσταση περιβαλλοντικής καταπόνησης για τα περισσότερα φυτά. Αυτό οφείλεται σε διάφορους λόγους, όπως είναι η περιορισμένη ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων του εδάφους, η οποία οδηγεί σε ευκολότερη καθίζηση θρεπτικών σε χαμηλότερα εδαφικά στρώματα, η διαταραχή της ομοιόστασης της αυξίνης στη ρίζα, η περιορισμένη ικανότητα πρόσληψης συγκεκριμένων απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων όπως το μαγνήσιο (Mg) το ασβέστιο (Ca) και το κάλιο (K), η μείωση της διαλυτότητας θρεπτικών στοιχείων του εδάφους, όπως ο φωσφόρος (P) και το μολυβδένιο (Mo), αλλά και η ενίσχυση της τοξικότητας μετάλλων και ιόντων των οποίων η κινητικότητα αυξάνεται λόγω της μείωσης του pH, όπως τα πρωτόνια (H^+), τα νιτρικά (NO_3^-), το αργίλιο (Al) και το μαγγάνιο (Mn) (Robson et al., 2012; Foy et al., 1978; 1984).

Η οξίνιση των εδαφών είναι συχνό φαινόμενο, ιδιαίτερα στα υγρά κλίματα και προκαλείται από δύο παράγοντες. Ο πρώτος είναι φυσικός και έχει να κάνει με την απελευθέρωση των προϊόντων του κύκλου του άνθρακα και του αζώτου από τους οργανισμούς που ζουν στο έδαφος (Helyar and Porter, 1989), αλλά και την φυσική καθίζηση των διαθέσιμων βάσεων και των αλάτων του εδάφους λόγω της βροχόπτωσης, σε βαθύτερα και απρόσιτα για τα φυτά, εδαφικά στρώματα. Ο δεύτερος έχει να κάνει με τη συνεχή καλλιέργεια του εδάφους και την υπερβολική χρήση λιπασμάτων που

περιέχουν άζωτο, ιδιαίτερα αυτών που απελευθερώνουν ιόντα NH_4^+ , όπως η ουρία ή το θειικό αμμώνιο (Uchida and Hue, 2000). Η οξίνιση του εδάφους μπορεί να διορθωθεί με την προσθήκη στο έδαφος, υλικών πλούσιων σε ασβέστιο ή μαγνήσιο όπως η κιμωλία, ο ασβεστόλιθος και ο ενυδατωμένος ασβέστης, μια διαδικασία που ονομάζεται ασβέστωση (liming) και προκαλεί αύξηση του pH του εδάφους μέσω της έκλυσης ιόντων OH^- , τα οποία εγκλωβίζουν τα ιόντα Al^{3+} και H^+ με τις αντιδράσεις $3\text{OH}^- + \text{Al}^{3+} \rightarrow \text{Al}(\text{OH})_3$ (στερεό) και $\text{OH}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ αντίστοιχα (Kamprath, 2010).

Η μείωση του pH του εδάφους, αλλά και η διεργασία που απαιτείται για την αναστροφή της μείωσης του pH προκαλεί πολλά προβλήματα στις καλλιέργειες ανεβάζοντας το κόστος παραγωγής (Brown et al., 2008). Το κύριο πρόβλημα φαίνεται να είναι η αναστολή της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος, κάτι που επηρεάζει την ενεργή ριζική επιφάνεια του φυτού, η οποία σχετίζεται με την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων και την ανθεκτικότητά στην ξηρασία (Barak et al., 1997). Τα φυτά αποκρίνονται διαφορετικά στην καταπόνηση εξαιτίας του όξινου εδάφους. Για παράδειγμα, στο ψυχανθές *Lotus corniculatus* παρατηρήθηκε καταστροφή των κυττάρων του φλοιού και της επιδερμίδας και απώλεια του δυναμικού των μεμβρανών (Pavlokin et al., 2009; Pal'ove-Balang et al., 2012), στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* παρατηρήθηκαν ρωγμές μεταξύ των μεριστωματικών κυττάρων και μείωση του μήκος της ρίζας (Koyama et al., 1995; Iyer-Pascuzzi et al., 2011), ενώ στο σιτάρι παρατηρήθηκε μείωση του μήκους της κύριας ρίζας και των ριζικών τριχιδίων (Moore, 1974; Ryan et al., 1993). Μείωση του μήκους της ρίζας παρατηρήθηκε και στη μηδική (Yokota and Ojima, 1995), στο σπανάκι (Yang et al., 2005), στο κοινό φασόλι (Rangel et al., 2005) και στο κριθάρι (Song et al., 2011). Η αιτία του προβλήματος φαίνεται να σχετίζεται με τη **διαταραχή της ομοιόστασης της αυξίνης** και την αδυναμία πρόσληψης ασβεστίου, διαδικασίες απαραίτητες για την επιμήκυνση της ρίζας (Howeler, 1991). Παρόλα αυτά, οι γνώσεις μας όσον αφορά την επίδραση του όξινου εδάφους στην διακίνηση της αυξίνης και στην ομοιόσταση της στο ακρορίζιο παραμένουν περιορισμένες. Δεδομένου ότι η χημειοσωματική θεωρία στηρίζεται στην ιοντική μορφή με την οποία διακινείται η αυξίνη από κύτταρο σε κύτταρο, φαίνεται πιθανόν τα H^+ που υπερτερούν σε ένα όξινο έδαφος να επηρεάζουν τη διακίνηση της ορμόνης.

Μέχρι σήμερα όμως δεν υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις που να συσχετίζουν το χαμηλό pH του εδάφους με τη διακίνηση πρωτίστως και στη συνέχεια την ομοίωση της αυξίνης στη ρίζα.

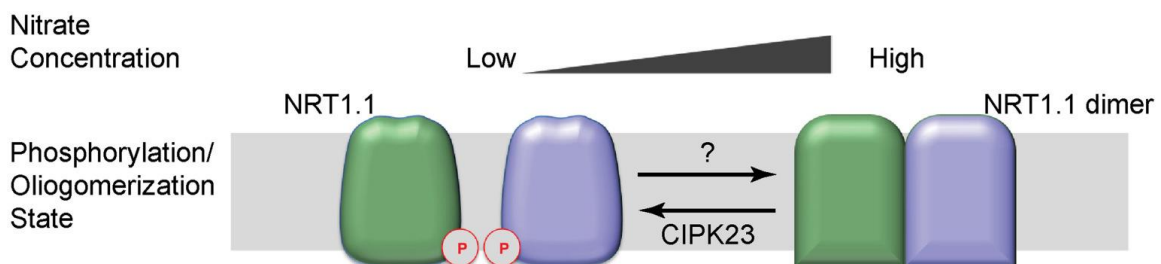
Οι φυτικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για να αντιμετωπίσουν τη περιβαλλοντική καταπόνηση που οφείλεται στην οξίνιση του εδάφους. Υπάρχουν φυτά που ακολουθούν την τακτική της ανοχής στη καταπόνηση, αλλά και φυτά που εφαρμόζουν την τακτική αποφυγής της καταπόνησης. Τα φυτά που ακολουθούν τη στρατηγική της ανοχής, συνήθως έχουν μειωμένες ανάγκες πρόσληψης στοιχείων, διαμερισματοποιούν τις τοξικές συγκεντρώσεις μετάλλων ή ο ιστός τους εμφανίζει υψηλή ανθεκτικότητα απέναντι σε τοξικά στοιχεία. Από την άλλη, τα φυτά που ακολουθούν τη στρατηγική της αποφυγής αντιμετωπίζουν τα όξινα περιβάλλοντα κυρίως με τρεις τρόπους. Ο πρώτος είναι με την αλλαγή του pH της ριζόσφαιρας μέσω της έκκρισης ουσιών από την ίδια τη ρίζα, ο δεύτερος είναι η έκκριση ουσιών που προκαλούν χηλοποίηση των τοξικών μετάλλων (Al, Mn), η οποία με τη σειρά της τα καθιστά ακίνδυνα για το φυτό και τέλος η αύξηση της ριζικής επιφάνειας μέσω συμβίωσης με μυκόρριζες, οι οποίες επιτρέπουν στο φυτό να επιβιώσει στο δυσμενές αυτό περιβάλλον (Marschner, 1991). Είναι επίσης γνωστό, πως οι αβιοτικές καταπονήσεις πυροδοτούν διάφορους και πολύπλοκους μοριακούς μηχανισμούς στα φυτά ώστε να ανταπεξέλθουν τροποποιώντας κυρίως την αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος ή την ενδοκυτταρική κατανομή και τοπολογία των πρωτεϊνών (Yang et al., 2014; Wu et al., 2015; Krouk et al., 2010; Beeckman et al., 2010; Barberon et al., 2010; Kasai et al., 2014; Zou et al., 2012). Παράδειγμα τέτοιου μηχανισμού είναι η απόκριση του μεταφορέα νιτρικών NRT1.1 στην καταπόνηση του χαμηλού pH του εδάφους. Η έλλειψη νιτρικών στο εσωτερικό της ρίζας ενισχύει την ανθεκτικότητα στη τοξικότητα που οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση H^+ . Αυτό το γεγονός εκμεταλλεύεται η ρίζα και μέσω της φωσφορυλίωσης του μεταφορέα NRT1.1 από την κινάση CIPK23, μειώνει την εισροή νιτρικών, κάτι που έχει ως συνέπεια την αυξημένη αντοχή ενάντια στην όξινη καταπόνηση (Hachiya and Noguchi, 2011).

1.8 Η θεωρία της τροφομορφογένεσης

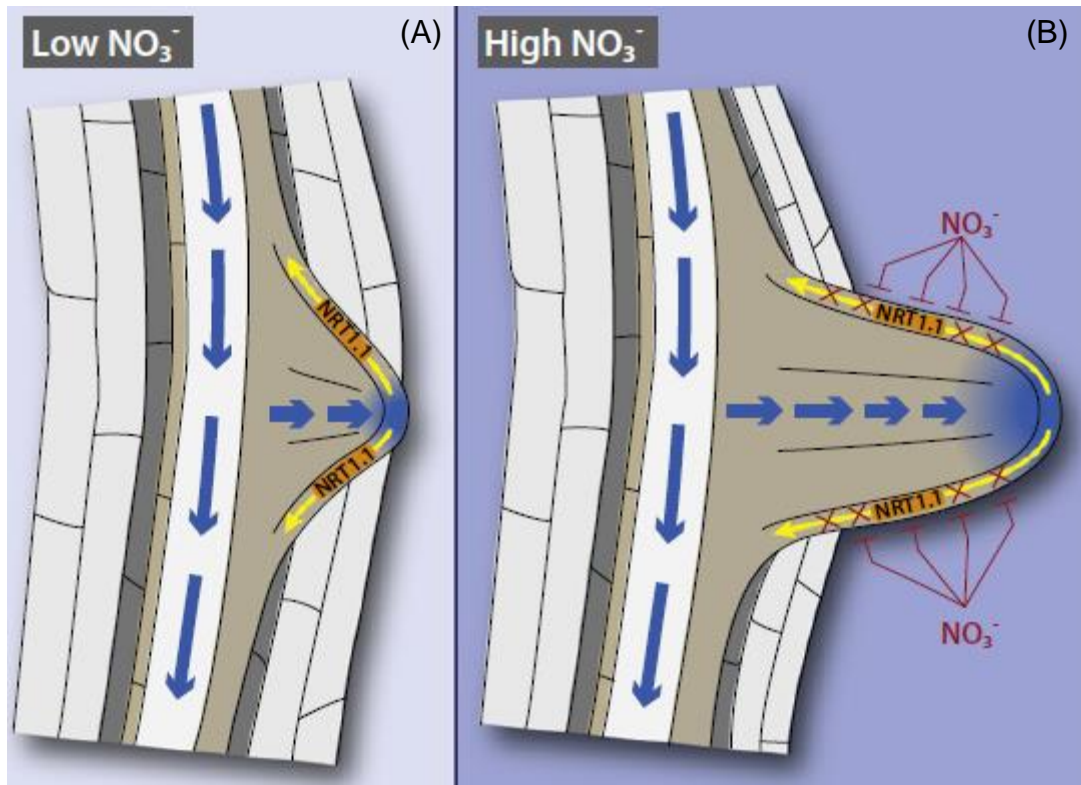
Τα φυτά είναι αυτότροφοι οργανισμοί. Χρησιμοποιούν το φως του ήλιου για την παραγωγή ενέργειας μέσω της φωτοσύνθεσης και ανόργανα θρεπτικά στοιχεία ως δομικά συστατικά για τη σύνθεση πολύπλοκων αλλά απαραίτητων οργανικών μορίων όπως τα νουκλεϊκά οξέα, τα αμινοξέα, τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια. Χαρακτηριστικό της φυτικής ανάπτυξης είναι ότι δεν ακολουθεί ένα προκαθορισμένο σχέδιο, αλλά τροποποιείται συνεχώς εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του φυτικού οργανισμού με το περιβάλλον (Sultan, 2000). Τα φυτά έχουν ανάγκη αυτήν τη πλαστικότητα στην ανάπτυξη γιατί δεν έχουν την ικανότητα της κίνησης και γιατί πρέπει να εξερευνούν το περιβάλλον τους, ώστε να εξασφαλίζουν τους απαραίτητους πόρους (στοιχεία και φως) που χρειάζονται. Το ριζικό σύστημα παίζει καθοριστικό ρόλο στη ζωή του φυτού γιατί του επιτρέπει να εξερευνεί το έδαφος και να απορροφά νερό και θρεπτικά στοιχεία (Shao et al., 2007), συνεπώς έχει και αυτό ανάγκη αυτή την πλαστικότητα στην ανάπτυξη του, η οποία πυροδοτεί αλλαγές και στα υπέργεια μέρη του φυτού με αλλαγές στο χρόνο άνθισης, την αύξηση της φυλλικής επιφάνειας και την έκπτυξη περισσότερων διακλαδώσεων στους βλαστούς, οι οποίες ρυθμίζονται από σινιάλα της ρίζας (Casal et al., 2004), που με τη σειρά τους προέρχονται από μεταβολές στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων (Schmidt and Linke, 2007; Weiser et al., 2016). Αυτές οι αλλαγές στο πρόγραμμα ανάπτυξης της ρίζας, που οφείλονται στη περιορισμένη διαθεσιμότητα και κατανομή θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος, χαρακτηρίστηκαν με τον όρο **τροφομορφογένεση** (Forde and Lorenzo, 2001).

Σε αντίθεση με τη θεωρία της φωτομορφογένεσης ή της θιγμομορφογένεσης που έχουν εδραιωθεί με πειραματικά δεδομένα, η τροφομορφογένεση παρέμεινε για αρκετό διάστημα ως θεωρητική έννοια, επειδή δεν υπήρξαν αναφορές μοριακών μηχανισμών που να αποδεικνύουν την ύπαρξή της. Αυτή η κατάσταση άλλαξε όταν μελετήθηκε ο μηχανισμός δράσης του μεταφορέα NRT1.1 (Nitrate transporter 1.1). Αυτός ο μεταφορέας νιτρικών NRT1.1 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τα ιόντα νιτρικών αλλά και με την αυξίνη, συνδέοντας την επάρκεια νιτρικών στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας με την μεταφορά της ορμόνης (Krook et al., 2010). Είναι

γνωστό πως όταν το φυτό μεγαλώνει σε έδαφος με επάρκεια νιτρικών, τότε η ριζική του επιφάνεια αυξάνει εξαιτίας της έκπτυξης πλάγιων ριζών. Αντίθετα, όταν το φυτό βρίσκεται σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, δεν αναπτύσσει πλάγιες ρίζες, αλλά επιμηκύνει την κύρια ρίζα (Miller and Cramer, 2005). Η απόκριση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης νιτρικών ο μεταφορέας NRT1.1 σχηματίζει ένα διμερές, το οποίο όμως απουσιάζει σε συνθήκες έλλειψης νιτρικών, εξαιτίας της φωσφορυλίωσης του αμινοξέος θρεονίνη στη θέση 101 (Εικόνα 1.12). Το διμερές σύμπλοκο εμφανίζει χαμηλή συγγένεια με το νιτρικό ανιόν ($K_m \approx 4\text{mM}$) και δεν μεταφέρει αυξίνη, ενώ η φωσφορυλιωμένη μορφή του μονομερούς εμφανίζει πολύ υψηλή συγγένεια με το νιτρικό ανιόν και μεταφέρει την αυξίνη ($K_m \approx 50\mu\text{M}$) (Sun and Zheng, 2015). Έτσι ο μεταφορέας NRT1.1, που τοποθετείται στα κύτταρα φλοιού της ρίζας, ρυθμίζει την έκπτυξη των πλάγιων ριζών ανάλογα με την συγκέντρωση των νιτρικών ανιόντων στο έδαφος. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.13, όταν υπάρχει χαμηλή συγκέντρωση νιτρικών το NRT1.1 ανατροφοδοτεί την αυξίνη περιφερειακά προς το εσωτερικό της ρίζας μέσω του βασιπεταλικού ρεύματος ώστε να μην συσσωρευτεί αυξίνη στο περικύκλιο, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η έκπτυξη των πλάγιων ριζών. Η λειτουργία του NRT1.1 εξαιτίας του σχηματισμού του διμερούς συμπλόκου, αλλάζει στην περίπτωση που το έδαφος είναι πλούσιο σε νιτρικά. Τότε το NRT1.1 σταματά να λειτουργεί ως περιφερειακός μεταφορέας αυξίνης προς το εσωτερικό της ρίζας, με αποτέλεσμα σε συγκεκριμένα σημεία του περικυκλίου να συσσωρεύεται υψηλή συσσώρευση ορμόνης προκαλώντας την έκπτυξη και επιμήκυνση των πλάγιων ριζών (Beeckman and Friml, 2010; Bouguyon et al., 2012).



Εικόνα 1.12. Το μοντέλο της δομής του μεταφορέα NRT1.1. Όταν υπάρχει χαμηλή συγκέντρωση νιτρικών, ο NRT1 φωσφορυλιώνεται και δεν μπορεί να σχηματίσει το διμερές. Το αντίθετο συμβαίνει όταν υπάρχει υψηλή συγκέντρωση νιτρικών, όπου βλέπουμε πως η αποφωσφορυλιωμένη μορφή του NRT1, σχηματίζει διμερές σύμπλοκο.



Εικόνα 1.13. Ο μηχανισμός NRT1.1 για την ρύθμιση της ανάπτυξης των πλάγιων ριζών. (A) Σε χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικών, ο μεταφορέας NRT1.1 αποτρέπει τη συσσώρευση αυξίνης στη περιφέρεια διοχετεύοντας την ορμόνη στο εσωτερικό της ρίζας μέσω του βασιπιταλικού ρεύματος, αναστέλλοντας έτσι την ανάπτυξη των δευτερογενών ριζών. (B) Σε υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών, η μεταφορά της αυξίνης από το NRT1.1 σταματά με αποτέλεσμα την συγκέντρωσή ορμόνης σε σημεία της περιφέρειας όπου ξεκινά η ανάπτυξη των πλάγιων ριζών.

Ο εκλεπτυσμένος αυτός μηχανισμός επίδρασης των θρεπτικών στοιχείων, ο οποίος βασίζεται στην διακριτή μεταφορά μεταξύ ενός ενδογενούς σιγιάλου, της αυξίνης, και του εξωγενούς σιγιάλου που είναι τα νιτρικά ιόντα, έδωσε στον μεταφορέα NRT1.1, τον υβριδικό χαρακτηρισμό transceptor ως σύνθετη λέξη που αποτελείται από τον όρο transporter (μεταφορέας) και receptor (αισθητήρας) (Giehl and von Wirén, 2015). Με

βάση τον μηχανισμό του NRT1.1, φαίνεται πως η τροφομορφογένεση σαν διαδικασία, έχει διευρυμένο φάσμα δράσης πέρα της απλής προσαρμογής στις συνθήκες επάρκειας/ανεπάρκειας θρεπτικών στοιχείων του εδάφους. Τροφομορφογενετικά σινιάλα μπορεί να προέρχονται όχι μόνο από εξωγενή σήματα όπως η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων, η διαθεσιμότητά τους, η κινητικότητα τους ή η υπερβολική συγκέντρωσή τους (τοξικότητα), αλλά και σε συνδυασμό με ενδογενή σήματα που σχετίζονται με τη διακίνηση, τη συγκέντρωση, την ομοίωση ή την απόκριση σε ορμόνες. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών ορμονικών μονοπατιών και της επίδρασης των ερεθισμάτων που προέρχονται από το εδαφικό περιβάλλον είναι που επιτρέπει τη στοχευμένη και ταχύτατη αναπροσαρμογή της ριζικής ανάπτυξης προς την εξερεύνηση νέων εδαφικών στρωμάτων (Salazar-Henao and Schmidt, 2016).

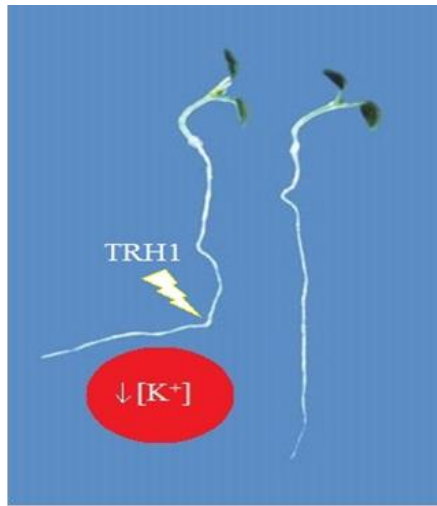
1.9 Η υπόθεση για τα λειτουργία του *TRH1*

Όπως προαναφέρθηκε, γνωρίζουμε πως η αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος παρουσιάζει εξαιρετική πλαστικότητα ως αποτέλεσμα της απόκρισης σε περιβαλλοντικές μεταβολές μέσω των ορμονικών ερεθισμάτων που τροποποιούν δυναμικά το πρότυπο ανάπτυξης και τη μορφολογία της ρίζας (Ditengou et al. 2003, 2008; Felten et al. 2009; Wang et al. 2012; Sokołowska et al. 2014). Αυτή η προσαρμοστικότητα στις περιβαλλοντικές πιέσεις σχετίζεται με τις ορμονικές αλληλεπιδράσεις που μετατρέπουν ένα εξωγενές ερέθισμα σε ενδογενή αναπτυξιακή απόκριση (Teale et al. 2008; Kazan and Manners, 2009). Ο ρόλος ειδικά της αυξίνης είναι καθοριστικός για προσαρμογή της αρχιτεκτονικής και της μορφολογίας της ρίζας, αναλόγως των περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως φαίνεται και στο παράδειγμα του transceptor NRT1.

Είναι γνωστό ότι η αυξίνη διεγείρει τα κύτταρα του περικυκλίου ώστε να διαφοροποιηθούν και με διαιρέσεις να σχηματίσουν τις καταβολές των πλάγιων ριζών (Dubrovsky et al. 2008), οι οποίες εξασφαλίζουν καλύτερη διείσδυση στο έδαφος προς αναζήτηση γόνιμων και με επάρκεια σε νερό εδαφικών στρωμάτων. Η μεταβολή της βιοσύνθεσης αυξίνης ρυθμίζει την

απόκριση της ρίζας σε συνθήκες έλλειψης νερού, τροφοπενίας και υψηλής αλατότητας (Li and Zhang, 2008). Το μεταλλάγμα του γονιδίου *TRH1* φαίνεται να επιβεβαιώνει ότι ο γεωτροπισμός της ρίζας και ο σχηματισμός των ριζικών τριχιδίων είναι συνδεδεμένες αναπτυξιακές διαδικασίες που συγχρονίζονται από την ομοιόσταση της αυξίνης (Rigas et al., 2013). Αυτή, με τη σειρά της, διαμορφώνεται από τις αβιοτικές συνθήκες και διασφαλίζει τη προσαρμογή των φυτών και την επιβίωσή τους σε ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον.

Ο μεταφορέας καλίου *TRH1* ενδέχεται να είναι εργαλείο τροφομορφογένεσης και να λειτουργεί ως **βιοαισθητήρας περιβαλλοντικών πιέσεων**, ο οποίος αντιλαμβάνεται την ανεπάρκεια καλίου ή κάποιας περιβαλλοντικής καταπόνησης η οποία επιφέρει αλλαγή στην ομοιόσταση της αυξίνης και αλλάζει την τοποθέτησή του με σκοπό την καλύτερη και πιο ευέλικτη απόκριση του φυτού ανάλογα με το περιβάλλον του (Εικόνα 1.14) (Rigas et al., 2013). Έτσι όταν το φυτό αναπτύσσεται σε έδαφος με επάρκεια καλίου ή οι συνθήκες γενικότερα είναι ευνοϊκές τότε το σύστημα *TRH1* τοποθετείται πολικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και σε ενδομεμβρανικές κυτταρικές δομές ρυθμίζοντας την ακροπεταλική διακίνηση της αυξίνης και την ομοιόσταση εντός των κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου. Συνεπώς, η ρίζα αναπτύσσεται κανονικά προς τα κάτω και τα ριζικά τριχίδια επιμηκύνονται φυσιολογικά ώστε να αυξηθεί η ενεργή επιφάνεια της ρίζας. Όταν όμως στο έδαφος επικρατεί ανεπάρκεια καλίου ή κάποια άλλη δυσμενή συνθήκη που μεταβάλλει το πρότυπο της αυξίνης, τότε ενδέχεται η κατανομή του συστήματος *TRH1*, ως βιοαισθητήρας καταπόνησης, να αλλάζει μεταβάλλοντας το πρότυπο μεταξύ της πολικής τοποθέτησης στη κυτταροπλασματική μεμβράνη και της κατανομής στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτό πιθανώς να συμβαίνει με σκοπό την καλύτερη ρύθμιση της ομοιόστασης της αυξίνης (Vicente - Agullo et al., 2004). Οι μεταβολές αυτές στο πρότυπο ανάπτυξης της ρίζας αποσκοπούν στην στρέψη της ρίζας για να αποφύγει περιοχές του εδάφους με δυσμενή επίδραση στη φυσιολογία του φυτού και να διερευνήσει νέα στρώματα του εδάφους ώστε να ξεπεραστεί η απειλή.



Εικόνα 1.14. Η πρωτεΐνη TRH1 μπορεί να λειτουργεί ως αισθητήρας καταπόνησης και να αλλάζει την τοποθέτησή της, έτσι ώστε να εξασφαλίσει την ομοιόσταση τη αυξίνης κατά τη διάρκεια της αβιοτικής καταπόνησης.

1.10 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθεί η υπόθεση ότι ο μεταφορέας K^+ TRH1 μπορεί να λειτουργήσει ως **μοριακός διαμεσολαβητής** ώστε μόλις αντιληφθεί μια κατάσταση εδαφικής καταπόνησης να τροποποιεί ελεγχόμενα την αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος μέσω της μεταβολής της ομοιόστασης της αυξίνης στο ακρορίζιο. Είναι γνωστή η επίδραση του συστήματος TRH1 στην αρχιτεκτονική της ρίζας εξαιτίας της επίδρασης του στην κατανομή της αυξίνης. Για το σκοπό της εργασίας θα δοκιμαστεί η επίδραση ακραίων συνθηκών pH, με έμφαση στην όξινη περιοχή που ενισχύει την τοξική επίδραση του αργιλίου (Al^{3+}) στη ρίζα, σε φυτά της μετάλλαξης *trh1* και αγρίου τύπου που θα χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες. Η καταγραφή της αρχιτεκτονικής απόκρισης του ριζικού συστήματος θα γίνει με βιομετρική ανάλυση των κύριων μορφολογικών χαρακτηριστικών της ρίζας, όπως ο γεωτροπισμός, το μήκος και η πυκνότητα των ριζικών τριχιδίων. Παράλληλα, με παρακολούθηση της έκφρασης της κατασκευής *DR5::GUS* που λειτουργεί ως βιοδείκτης αυξίνης θα καταγραφεί η πιθανή μεταβολή της ομοιόστασης της ορμόνης εξαιτίας των ακραίων τιμών pH ή της τοξικότητας του Al^{3+} . Η πειραματική προσέγγιση αναμένεται να ξεκαθαρίσει το ρόλο του μεταφορέα TRH1 στην αντίληψη-απόκριση στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις και

ταυτόχρονα να εξετάσει την ορθότητα της χημειωσμοτικής θεωρίας στην οποία στηρίζεται η πολιτική διακίνηση της αυξίνης στην ρίζα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

Σαν υλικό για τα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Arabidopsis thaliana* (οικότυπος Columbia) που ανήκει στην οικογένεια *Brassicaceae*. Ενδείκνυται ιδιαίτερα για πειράματα βασικής έρευνας λόγω του μικρού του μεγέθους, του μικρού κύκλου ζωής του, του μικρού του γονιδιώματος, του μεγάλου αριθμού σπερμάτων που παράγει και των σχετικά εύκολων συνθηκών καλλιέργειάς του.

2.2 Συνθήκες καλλιέργειας φυτών

Για την ανάπτυξη φυτών, σπέρματα *Arabidopsis thaliana* τοποθετούνται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS. Η σύσταση του υποστρώματος είναι η εξής:

- Σουκρόζη: 1 g (1%)
- MES: 0,05 g (0,05%)
- MS: 0,44 g (MS : Murashige And Skoog Medium)
- KOH 1N
- Phytigel: 0,33 g (0,33%)
ή Αγαρόζη: 1,2 g (1,2%)
- $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10mM): 500μL (50μM), 1000μL (100μM), 2000μL (200μM)
ανάλογα με τη συνθήκη

- Η σουκρόζη παρέχει τους απαραίτητους υδατάνθρακες για την ανάπτυξη του φυτού, ενώ το MS περιέχει τα αναγκαία στοιχεία και ιχνοστοιχεία. Το MES χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του pH, ενώ το KOH για τη ρύθμιση του pH στο 4.5 ή 5.7, ανάλογα τη συνθήκη. Τέλος, το phytigel ή η αγαρόζη χρησιμοποιείται για την πήξη του θρεπτικού υποστρώματος.
- Για την ανάπτυξη φυτών κάτω από ασηπτικές συνθήκες, τα σπέρματα ενυδατώνονται για 24 ώρες στους 40°C και αποστειρώνονται σε 20% διάλυμα χλωρίνης. Συγκεκριμένα:

- Σπόροι *Arabidopsis* τοποθετούνται στους 40°C και στο σκοτάδι για 48h προκειμένου να διακοπεί ο λήθαργος.
- Στην συνέχεια αποστειρώνονται με 20% διάλυμα χλωρίνης για 2-3 λεπτά. Το διάλυμα απομακρύνεται και η πλύση επαναλαμβάνεται.
- Οι σπόροι ξεπλένονται στη συνέχεια 5 συνεχόμενες φορές με αποστειρωμένο ddH₂O.
- Με τη βοήθεια πιπέτας Gilson, οι αποστειρωμένοι σπόροι επιστρώνονται σε τριβλίο που περιέχει θρεπτικό μέσο MS.
- Τα τρυβλία τοποθετούνται σε κλίβανο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι και σχετική υγρασία περίπου 50%).
- Μετά από 5 περίπου μέρες οι σπόροι βλαστάνουν οπότε εμφανίζονται οι κοτυληδόνες και η εμβρυακή ρίζα.

Μετά από περίπου δύο βδομάδες τα φυτά έχουν αναπτύξει τον κορυφαίο βλαστό. Στο στάδιο αυτό είναι αρκετά αναπτυγμένα και μπορούν να μεταφερθούν στο χώμα, όπου αρχικά για τρεις μέρες παραμένουν καλυμμένα με διάφανη μεμβράνη και διατηρούνται σε περιβάλλον υψηλής σχετικής υγρασίας για να ξεπεράσουν την καταπύκνωση από τη μεταφύτευση. Στην συνέχεια αναπτύσσονται μέχρι να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο και να γίνει η συλλογή των σπερμάτων.

2.3. Γενικά για μικροσκοπία και απεικόνιση GUS

Για την εξέταση των δειγμάτων χρησιμοποιείται το οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX-50 (Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με λάμπα UV και διαφορετικά φίλτρα. Ο φθορισμός της πρωτεΐνης-μάρτυρα YFP, εντοπίζεται με το φίλτρο filter #41017, Endow GFP Bandpass Emission Filter (Chroma Technology Corp., Battleboro, USA), ενώ ο φθορισμός της χλωροφύλλης εντοπίζεται με το φίλτρο ροδαμίνης U-MSWG (Olympus, Tokyo, Japan). Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με την κάμερα Olympus DP71 και αποθηκεύτηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Cell[^]A (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany). Η

επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με το πρόγραμμα Adobe Photoshop CS5 (version 12.0).

2.4. Παρασκεύασμα φυτού *Arabidopsis thaliana*

Παρατηρούνται φυτάρια ηλικίας 12 ημερών από την επίστρωση σε θρεπτικό μέσο MS. Τα φυτά τοποθετούνται σε σταγόνα dH₂O επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα και, αφού αφαιρεθούν οι κοτύλες τους, το παρασκεύασμα σκεπάζεται με καλυπτρίδα.

2.5. Χρώση GUS

Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε όπως παρουσιάστηκε από τους Jefferson et al., (1987); Ulmasov et al., (1997)

- Ο ιστός ή τα όργανα του *A.thaliana* που θα υποστούν τη χρώση GUS ξεπλένονται μία φορά με διάλυμα RS (rinse solution).
- Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα χρώσης GSS (GUS staining solution) μέχρι ο ιστός να καλυφθεί πλήρως.
- Ακολουθεί διεύδυση των ιστών με τη βοήθεια αντλίας κενού 1 φορά. Σε αυτό το στάδιο δίνεται ιδιαίτερη προσοχή, έτσι ώστε ο ιστός/τα όργανα να είναι πλήρως εμβαπτισμένα μέσα στο διάλυμα GSS και να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρος γύρω από τον ιστό.
- Επώαση στους 37°C για 0,5h, 1h, 2h και 4h για την καλύτερη εικόνα χρώσης το οποίο διαφέρει ανάλογα με τον ιστό και την ενζυμική δραστηριότητα.
- Αφαιρείται το διάλυμα χρώσης GSS και αφυδατώνεται ο ιστός με διάλυμα αιθανόλης 70%, το οποίο ανανεώνεται συχνά. Οι ιστοί με αυτόν τον τρόπο αποχρωματίζονται, καθώς απομακρύνεται σταδιακά η χλωροφύλλη και η εμφάνιση του μπλε χρώματος γίνεται πιο έντονη. Μετά την αφυδάτωση με την αιθανόλη, ο ιστός τοποθετείται σε διάλυμα 50% γλυκερόλης όπου μπορεί να παραμείνει για αρκετές ημέρες.

Διαλύματα χρώσης GUS και παρατήρησης παρασκευασμάτων

- Διάλυμα ξεπλύματος RS (rinse solution) : 50mM Na[PO]₄ pH 7.2, 0.5mM K₃Fe(CN)₆, 0.5mM K₄Fe(CN)₆
- Διάλυμα χρώσης GSS (GUS staining solution) : 50mM Na[PO]₄ pH 7.2, 0.5mM K₃Fe(CN)₆, 0.5mM K₄Fe(CN)₆, 1.5mM X-GLUC (Duchefa Cat.No : X1405, MW=520,8).

2.6. Ανάλυση εικόνων με το πρόγραμμα ImageJ

Κατά την ανάπτυξη των φυτών πραγματοποιείται μια σειρά παρατηρήσεων και μετρήσεων με σκοπό τον χαρακτηρισμό του φαινοτύπου του μεταλλάγματος. Οι μετρήσεις έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (Abramoff et al., 2004). Μέσω του προγράμματος ImageJ μήκος 1cm αντιστοιχείται με τα pixels που του αναλογούν στη φωτογραφία. Στη συνέχεια, χαράσσοντας μία γραμμή κατά μήκος του τμήματος του φυτού που πρέπει να μετρηθεί, υπολογίζεται το αντίστοιχο μέγεθος.

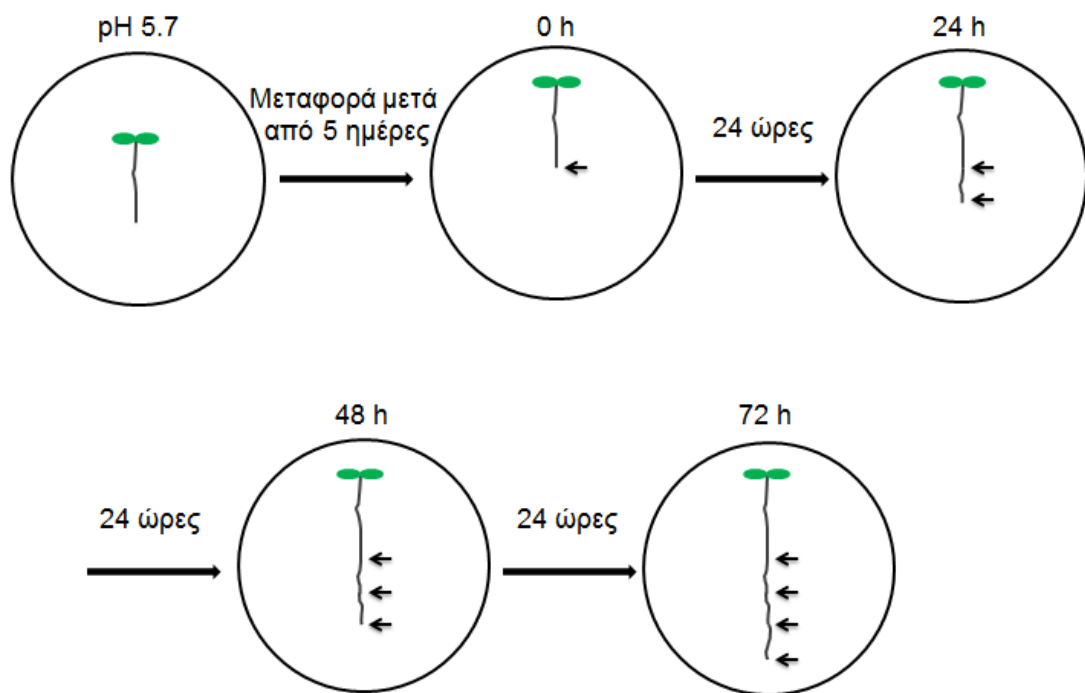
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. Αποτελέσματα

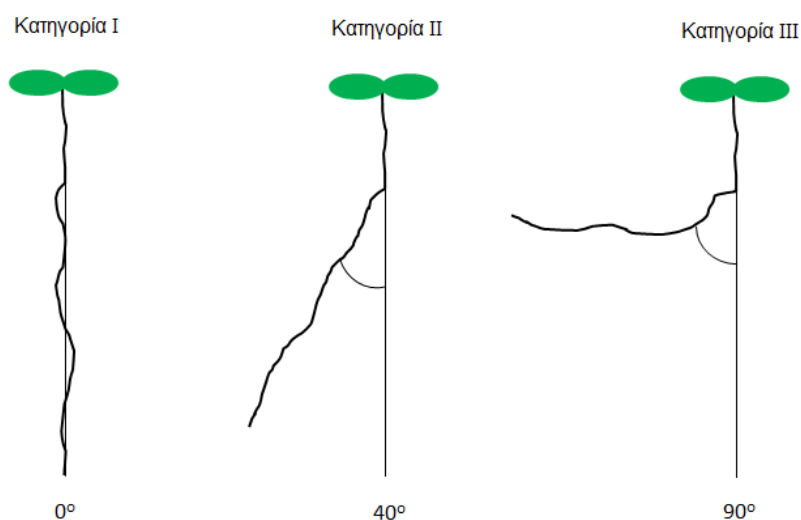
3.1 Επίδραση συνθηκών καταπόνησης

Για τη μελέτη των καταπονήσεων χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου οικότυπου Col-0 και μεταλλάγματα *trh1*. Και στους δύο αυτούς γενότυπους είχε εισαχθεί με μόνιμο μετασχηματισμό η κατασκευή *DR5::GUS*, η οποία χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί το πρότυπο συσσώρευσης αυξίνης στο ακρορίζιο. Οι σπόροι των φυτών παρέμειναν στο νερό για δύο ημέρες πριν στρωθούν σε τρυβλία, τα οποία προσομοιάζαν φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης με pH 5.7. Το pH που προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες είναι ελαφρώς όξινο (5.7) και όχι ουδέτερο (7), γιατί επιτρέπει στα φυτά την καλύτερη απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων (κυρίως μεταλλικών ιόντων) από το υπόστρωμα (Rivego et al., 2014). Μετά από 5 ημέρες ανάπτυξης σε φυσιολογικές συνθήκες τα φυτά μεταφέρθηκαν σε νέα τρυβλία τα οποία αντιπροσώπευαν διάφορες καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης χαμηλού/υψηλού pH ή υψηλών συγκεντρώσεων αργιλίου σε συνδυασμό με χαμηλό pH και παρατηρήθηκαν μετά από 24, 48 και 72 ώρες (Εικόνα 3.1).

Για την καλύτερη παρατήρηση της στρέψης των φυτών και του γεωτροπικού τους χαρακτήρα, οι ρίζες ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες, σύμφωνα με τη γωνία στρέψης ως προς τον άξονα της βαρύτητας. Στην κατηγορία I ανήκουν τα φυτά που η ανάπτυξή τους είναι παράλληλη με τον άξονα της βαρύτητας και δεν αποκλίνουν γεωτροπικά. Στην κατηγορία II ταξινομήθηκαν τα φυτά, των οποίων η στρέψη της ρίζας σχηματίζει γωνία με τον άξονα της βαρύτητας που δεν υπερβαίνει τις 40°. Τέλος, στην κατηγορία III κατηγοριοποιήθηκαν φυτά των οποίων η ρίζα παρουσιάζει εντυπωσιακή στρέψη μεγαλύτερη του κατώτερου ορίου των 40° (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.1. Επεξηγηματικό διάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας. Τα φυτά παρέμειναν αρχικά για 5 ημέρες σε τρυβλία που προσομοίαζαν φυσιολογικές συνθήκες (pH 5.7) και μετά μεταφέρθηκαν στις αντίστοιχες συνθήκες καταπόνησης για μετρήσεις. Ανά 24 ώρες σημειωνόταν η ανάπτυξη της ρίζας στο τρυβλίο (μαύρο βέλος) και γινόταν: i) Μέτρηση μήκους της κύριας ρίζας από τη στιγμή μεταφοράς στη νέα συνθήκη, ii) Παρατήρηση τροπισμού της ρίζας, iii) Μέτρηση πυκνότητας ριζικών τριχιδίων και iv) Μέτρηση μήκους ριζικών τριχιδίων.



Εικόνα 3.2. Απεικόνιση των τριών κατηγοριών στρέψης της ρίζας. Στην κατηγορία I ανήκουν ρίζες που ακολουθούν πιστά το γεωτροπικό ερέθισμα, στην κατηγορία II ανήκουν ρίζες που η στρέψη τους αποκλίνει από τον άξονα της βαρύτητας (περίπου $\leq 40^\circ$), ενώ στην κατηγορία III ανήκουν φυτά των οποίων η ρίζα ανταποκρίνεται ελάχιστα στο ερέθισμα της βαρύτητας.

3.2 Επίδραση του χαμηλού pH στην ανάπτυξη της ρίζας

Οι ρίζες των φυτών που μετά τη μεταφορά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες όπου το pH μειώθηκε από 5.7 σε 4.5 παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο ανάπτυξης από τις ρίζες που μετά τη μεταφορά εξακολούθησαν να αναπτύσσονται σε φυσιολογικές τιμές pH 5.7. Όσον αφορά το μήκος της ρίζας, παρατηρήθηκε αναστολή της επιμήκυνσης σε pH 4.5 στις ρίζες των φυτών Col-0 και πιθανώς η αρνητική επίδραση να είναι εντονότερη στη ρίζα των φυτών *trh1* (Εικόνα 3.3). Πιο συγκεκριμένα βλέπουμε πως τα φυτά αγρίου τύπου είχαν κατά 16,8% μικρότερη ανάπτυξη στο όξινο περιβάλλον σε σχέση με την ανάπτυξη στις φυσιολογικές συνθήκες στο πρώτο εικοσιτετράωρο, κατά 19,4% υστέρηση τη δεύτερη μέρα ανάπτυξης και κατά 26,4% λιγότερη ανάπτυξη την τρίτη μέρα. Για τις ρίζες *trh1*, τα ποσοστά αυτά ήταν αντίστοιχα κατά 23,5% μικρότερη ανάπτυξη την πρώτη μέρα, κατά 29,4% μικρότερη ανάπτυξη την δεύτερη μέρα και κατά 42,9% μικρότερη ανάπτυξη την τρίτη ημέρα. Παρατηρούμε δηλαδή πως η επίδραση του χαμηλού pH στην ανάπτυξη της ρίζας ήταν πιο έντονη στα φυτά *trh1* από ότι στα φυτά αγρίου τύπου ($p < 0,05$), φαινόμενο που έγινε πιο έντονο με την πάροδο του χρόνου, γεγονός που υποδεικνύει πως τα φυτά *trh1* έχουν χάσει την ικανότητα να ανταπεξέρχονται στις όξινες συνθήκες.

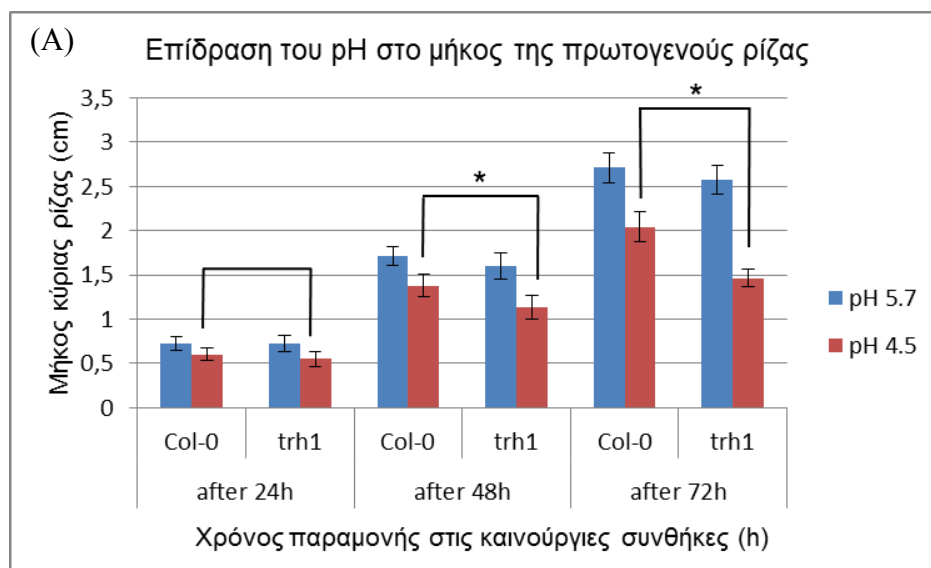
Παρόμοια επίδραση είχε η ανάπτυξη σε pH 4.5 στο γεωτροπισμό της ρίζας. Τα φυτά αγρίου τύπου παρουσίασαν ελαφρά στρέψη και απώλεια του γεωτροπισμού τους στο χαμηλό pH 4.5 (Εικόνες 3.4 και 3.5). Όσον αφορά τα φυτά *trh1*, ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες pH 5.7 παρουσιάζουν μη γεωτροπικό χαρακτήρα, η ανωμαλία αυτή ενισχύεται σημαντικά όταν το pH μειωθεί σε τιμή 4.5 καθώς περιορίζεται σημαντικά η κατηγορία I και αυξάνει η κατανομή των φυτών στις κατηγορίες II και III (Εικόνες 3.4 και 3.5). Παρατηρώντας την κατανομή των φυτών στις τρεις κατηγορίες στρέψης είναι

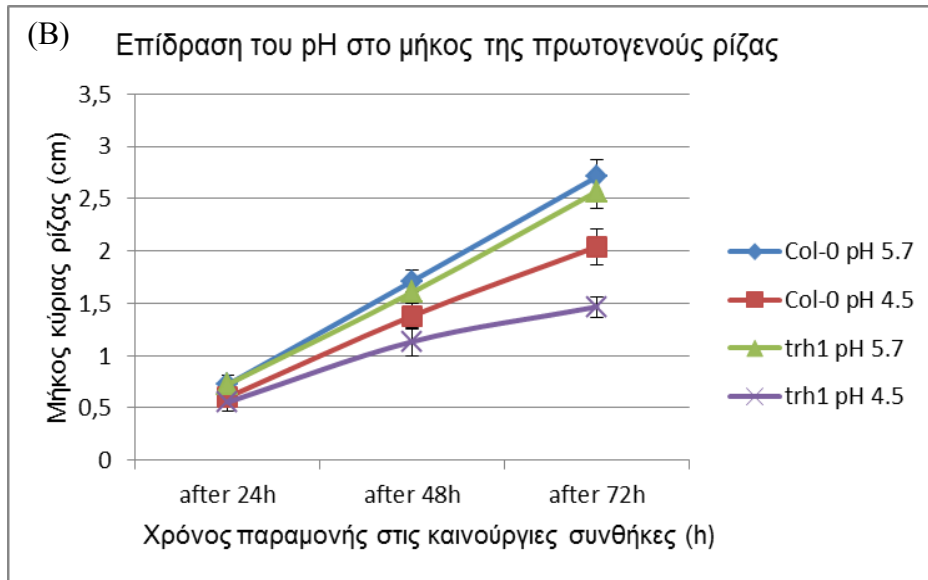
φανερό ότι η κατηγορία I διατηρείται ως επικρατέστερη στα φυτά αγρίου ακόμα και μετά τη μεταφορά στο pH 4.5. Αντίθετα στα φυτά *trh1*, σε όξινο pH 5.7 η κατηγορία I (11/32) μειοψηφεί έναντι κυρίως της κατηγορίας II (12/32) γεγονός που υποδηλώνει τη μη γεωτροπική απόκριση της μετάλλαξης *trh1*. Όμως στο όξινο pH η κατηγορία I μειώνεται δραματικά (4/31) με σημαντική ενίσχυση της κατηγορίας II (16/31), αλλά και με μικρή αλλά φανερή ενίσχυση της κατηγορίας III (11/31). Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τα προηγούμενα που αφορούν το μήκος της πρωτογενούς ρίζας δείχνουν ότι η ρίζα των φυτών *trh1* είναι περισσότερο ευαίσθητη στο όξινο pH σε σχέση με τη ρίζα των φυτών αγρίου τύπου υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι το σύστημα TRH1 μπορεί να λειτουργήσει ως μοριακός διαμεσολαβητής. Έτσι σε συνθήκες όξινου pH το TRH1 μετριάζει τις δυσμενείς επιπτώσεις στην ανάπτυξη της ρίζας.

Η πυκνότητα των ριζικών τριχιδίων των φυτών δε φάνηκε να επηρεάζεται από το χαμηλό pH, αφού σε όξινο pH 4.5 και οι δύο γενότυποι Col-0 και *trh1* διατήρησαν την ίδια πυκνότητα τριχιδίων (Εικόνα 3.6A). Όπως ήταν αναμενόμενο τα φυτά Col-0 είχαν περισσότερα τριχίδια από τα *trh1*, ενώ αυτή η διαφορά φαίνεται να διατηρείται ίδια και στις όξινες συνθήκες. Το όξινο περιβάλλον επηρέασε όμως το μήκος των ριζικών τριχιδίων των φυτών. Τα ριζικά τριχίδια των φυτών Col-0 ήταν σημαντικά μικρότερα ($p < 0,05$) σε συνθήκες όξινου pH κατά περίπου 20%, ενώ τα ριζικά τριχίδια των φυτών *trh1*, δεν φαίνεται να επηρεάστηκαν σημαντικά από το χαμηλό pH (Εικόνα 3.4B). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το σύστημα TRH1 αναστέλλει την επιμήκυνση των ριζικών τριχιδίων μόλις η ρίζα αντιληφθεί τη μείωση του pH στο έδαφος.

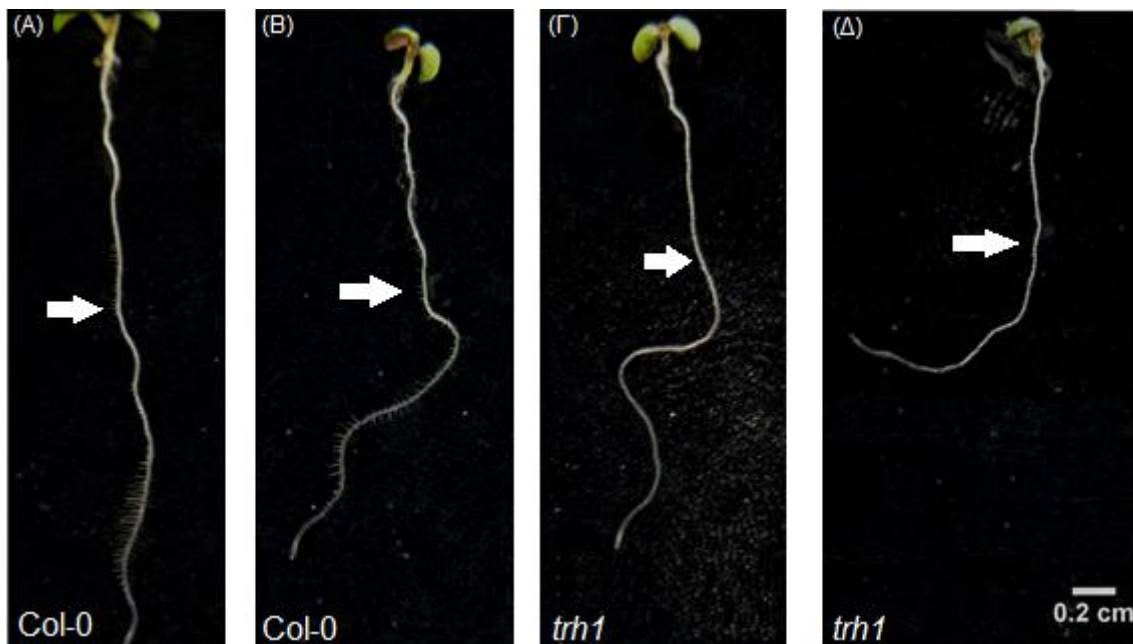
Για να διευκρινιστεί η διασύνδεση μεταξύ της μεταβολής του pH στο μέσο ανάπτυξης και του προγράμματος ανάπτυξης της ρίζας χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή *DR5::GUS*. Η ανάλυση επιβεβαίωσε το πρότυπο της αυξίνης που αναφέρει η βιβλιογραφία (Rigas et al., 2013), όπου έντονη συγκέντρωση αυξίνης εντοπίζεται στο ακρορίζιο και ιδιαίτερα στο εφησυχάζον κέντρο και την κεντρική καλύπτρα (Εικόνα 3.7A). Το πρότυπο όμως αλλάζει όταν οι ρίζες μεταφερθούν σε όξινο περιβάλλον (Εικόνα 3.7B). Τότε φαίνεται ότι παρατηρείται εκτοπική συσσώρευση αυξίνης υψηλότερα στα πρωτοξυλικά αγγεία στον κεντρικό κύλινδρο της ρίζας. Παρόμοιο

πρότυπο παρατηρείται στις ρίζες των φυτών *trh1* που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες pH 5.7, με τη διαφορά ότι η αυξίνη συσσωρεύεται έντονα σε μεγαλύτερη έκταση στα πρωτοξυλικά αγγεία (Εικόνα 3.7Γ). Ακραία συσσώρευση της αυξίνης ιδιαίτερα στους περιφερειακούς ιστούς που συνδέονται με τη βασιπεταλική μεταφορά παρατηρείται στη ρίζα των φυτών *trh1* που αναπτύχθηκαν σε χαμηλό pH 4.5 (Εικόνα 3.7Δ). Στη περίπτωση αυτή, η συσσώρευση στον κεντρικό κύλινδρο σε γενικές γραμμές είναι ίδια με το πρότυπο ανάπτυξης της ρίζας *trh1* σε pH 5.7. Στο όξινο όμως pH 4.5 είναι φανερό το πρότυπο της περιφερειακής συσσώρευσης της ορμόνης. Εντύπωση λοιπόν προκαλεί ότι το πρότυπο συσσώρευσης της αυξίνης στα φυτά αγρίου τύπου στις όξινες συνθήκες αποκλίνει του φυσιολογικού και μοιάζει αρκετά με το πρότυπο της ρίζας φυτών *trh1* που αναπτύσσονται σε φυσιολογικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι το σύστημα TRH1 επηρεάζει, σε φυσιολογικές τιμές pH 5.7, κυρίως την ακροπεταλική διακίνηση της αυξίνης διαταράσσοντας την ομοιόσταση στο ακρορίζιο. Σε τιμές χαμηλού pH 4.5 αναδεικνύεται ο ρόλος του συστήματος TRH1 στη βασιπεταλική διακίνηση της αυξίνης. Η επίδραση του όξινου pH, κυρίως στην ακροπεταλική διακίνηση της αυξίνης, φαίνεται ότι αποκαλύπτει τη διαταραχή που προκαλούν τα ιόντα H^+ στη χημειοσωματική κατανομή της ορμόνης.



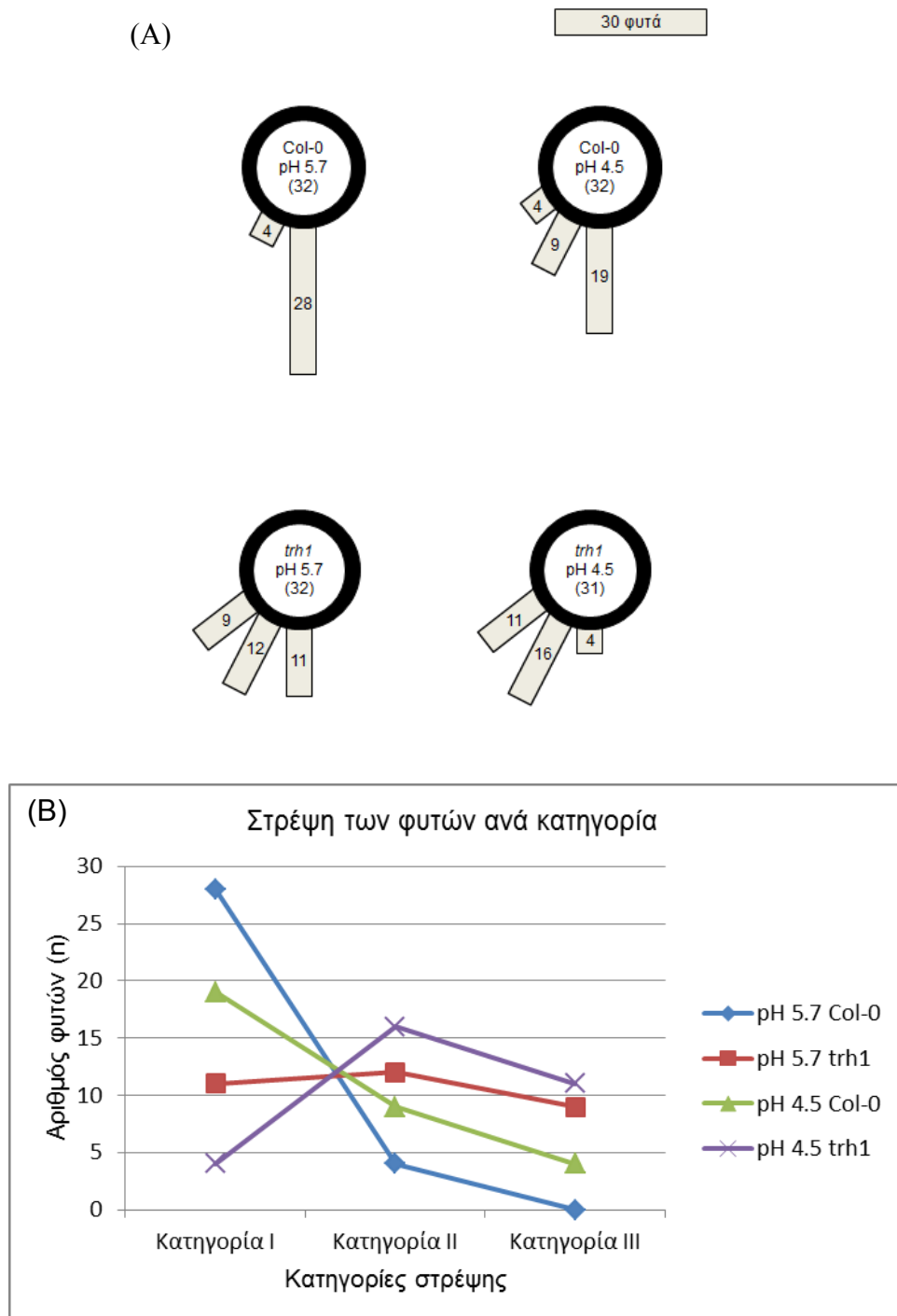


Εικόνα 3.3. Η επίδραση του pH στο μήκος της πρωτογενούς ρίζας μετά τη μεταφορά τους. Μετρήσεις μήκους πρωτογενούς ρίζας φυτών Col-0 ($n \geq 18$) και *trh1* ($n \geq 22$), που αναπτύχθηκαν αρχικά για 5 ημέρες σε θρεπτικό μέσο pH 5.7 και στη συνέχεια για 72 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες pH 5.7 και σε όξινο pH 4.5. (A): Απεικόνιση των μετρήσεων με γράφημα. Με αστερίσκο σημειώνονται οι όξινες συνθήκες που έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ Col-0 και *trh1* ($p < 0,05$). (B): Απεικόνιση των μετρήσεων με καμπύλες.

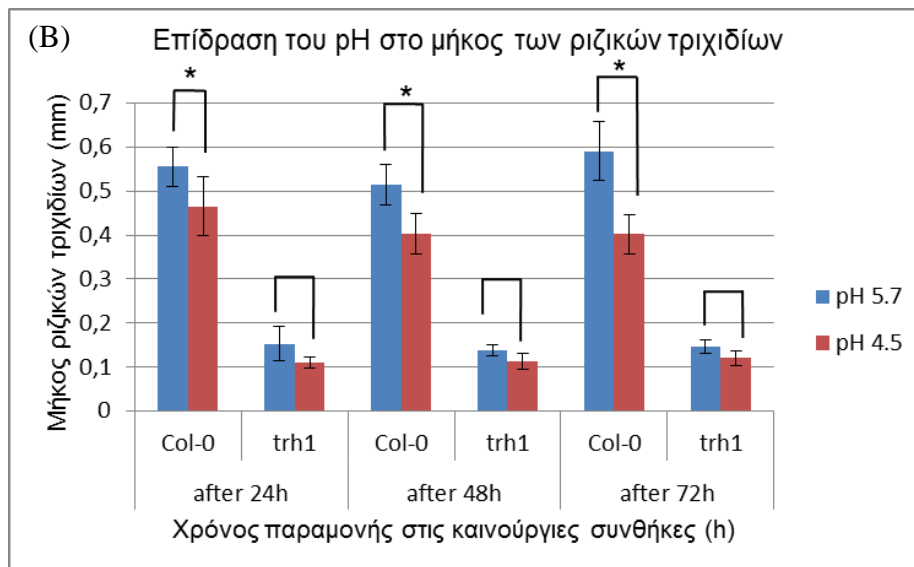
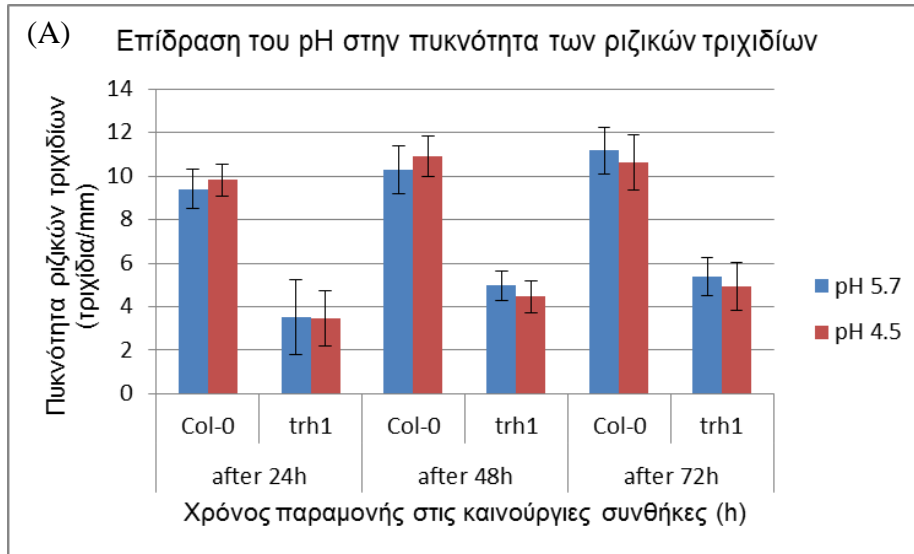


Εικόνα 3.4. Η επίδραση του pH στη γεωτροπική απόκριση της ρίζας. Φυτά *Arabidopsis thaliana* οικότυπου Col-0 7 ημερών που αρχικά μεγάλωσαν για 5 ημέρες σε θρεπτικό μέσο με pH 5.7 και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν και αναπτύχθηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο με (A) pH 5.7 και (B) με pH 4.5.

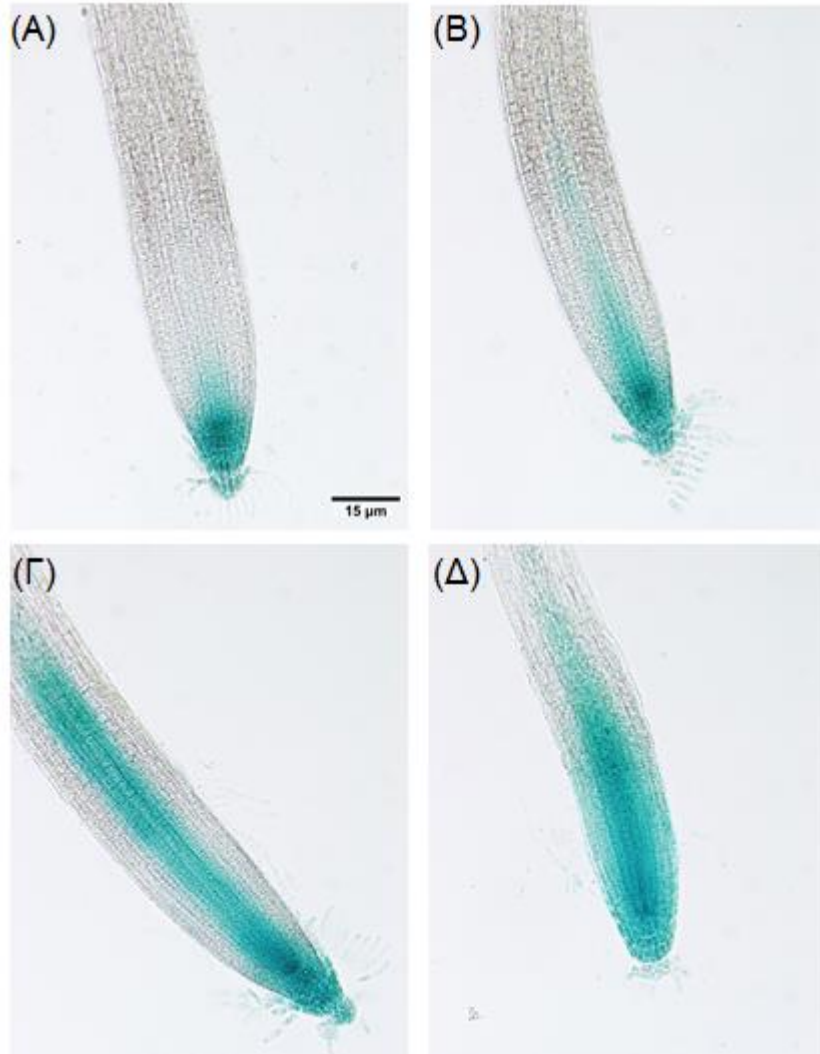
Αντίστοιχη μεταχείριση φυτών *trh1* που μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο με (Γ) pH 5.7 και (Δ) με pH 4.5. Με λευκό βέλος σημειώνεται σε ποιο σημείο ανάπτυξης βρίσκονταν τα φυτά όταν έγινε η μεταφορά τους.



Εικόνα 3.5. Κατηγοριοποίηση των ριζών σύμφωνα με τη στρέψη τους ως απόκριση στην μεταβολή του pH μετά από τη μεταφορά. Οι μετρήσεις έγιναν 72h μετά τη μεταφορά σε νέο θρεπτικό μέσο. (A): Απεικόνιση στρέψης της ρίζας με μορφή ρολογιού, (B): Απεικόνιση με διάγραμμα



Εικόνα 3.6 Επίδραση του όξινο pH στην πυκνότητα και το μήκος των ριζικών τριχιδίων. (A) Το όξινο pH δεν επηρεάζει τη πυκνότητα των ριζικών τριχιδίων στα φυτά *Col-0* ($n \geq 11$) και *trh1* ($n \geq 12$). (B) Η μείωση του pH επηρεάζει το μήκος των ριζικών τριχιδίων κυρίως αναστέλλοντας την επιμήκυνση στα φυτά *Col-0* ($n \geq 20$) από ότι στα φυτά *trh1* ($n \geq 20$). Με αστερίσκο σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στην επιμήκυνση ριζικών τριχιδίων ($p < 0,05$).



Εικόνα 3.7. Η επίδραση του όξινου pH στη συσσώρευση αυξίνης στη ρίζα φυτών *Arabidopsis* 9 ημερών. Έπειτα από μεταφορά τα φυτά αναπτύχθηκαν για 96 ώρες στις νέες συνθήκες και στην συνέχεια έγινε χρώση GUS. (A) και (B) Το πρότυπο της αυξίνης σε ρίζες Col-0 που μετά τη μεταφορά αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες pH 5.7 και σε όξινες συνθήκες pH 4.5, αντίστοιχα. (Γ) και (Δ) Η επίδραση στο πρότυπο της αυξίνης σε ρίζες *trh1* που μετά τη μεταφορά αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες pH 5.7 και σε όξινες συνθήκες pH 4.5, αντίστοιχα.

3.3 Επίδραση του υψηλού pH στην ανάπτυξη της ρίζας

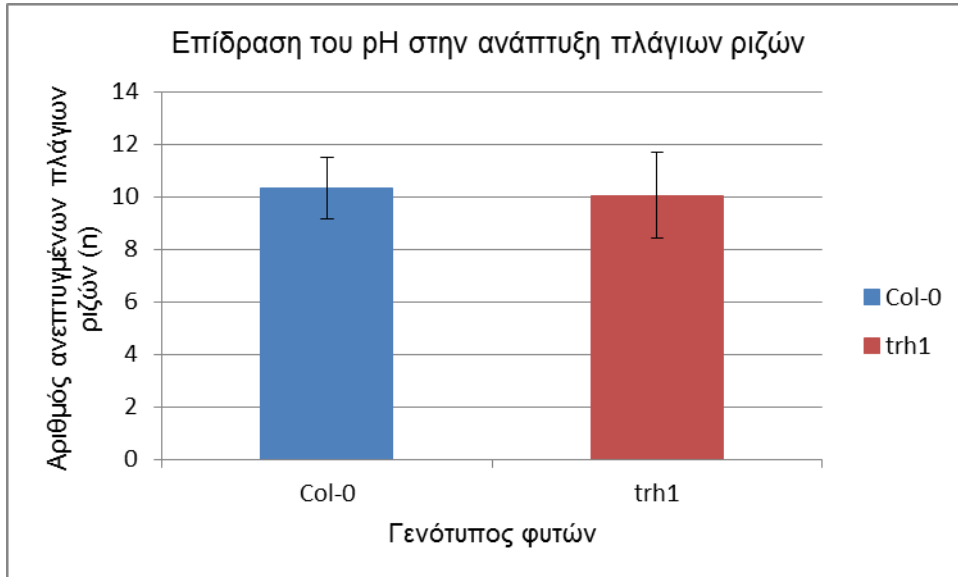
Σε αντίθεση με το όξινο pH, το υψηλό pH είχε μια ομοιογενή επίδραση στην ανάπτυξη των ριζών αγρίου τύπου και *trh1*. Αρχικά οι δύο γενότυποι εμφάνισαν σημαντική αδυναμία στην επιμήκυνση της πρωτογενούς ρίζας, η οποία παρέμενε καθηλωμένη καθόλη τη διάρκεια των δοκιμών (5 ημέρες

αρχική ανάπτυξη σε τρυβλίο με pH 5.7 και μετά μεταφορά σε τρυβλίο με pH 8.0 για 9 ημέρες). Σε αντίθεση με τη πρωτογενή ρίζα όμως, τα φυτά ανέπτυξαν πλήθος δευτερογενών φυτών τα οποία μέχρι και την 14 μέρα έφταναν ή και ξεπέρασαν σε μήκος την κύρια ρίζα (Εικόνα 3.8). Ο αριθμός όμως αυτών των πλάγιων ριζών ήταν ίδιος μεταξύ των φυτών Col-0 και *trh1* (Εικόνα 3.9).

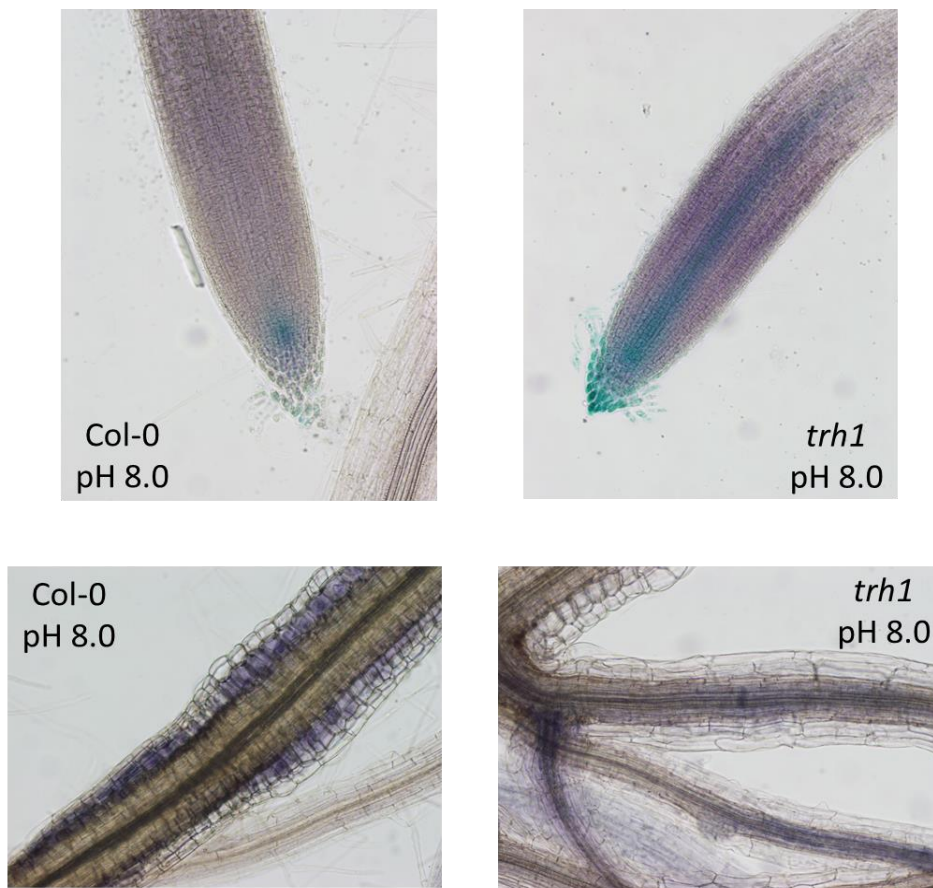
Η χρώση *DR5::GUS* στα φυτά του αγρίου τύπου τα οποία μεγάλωσαν σε συνθήκες βασικού pH 8.0 έδειξε πως το πρότυπο της αυξίνης παραμένει το ίδιο στο ακρορίζιο, όπως αυτό της ανάπτυξης σε φυσιολογικές συνθήκες pH 5.7. Παρόμοιο αποτέλεσμα είχαμε και στα φυτά *trh1*, όπου παρουσίασαν το ίδιο πρότυπο συσσώρευσης της αυξίνης στο ακρορίζιο και στις φυσιολογικές συνθήκες pH 5.7, αλλά και σε βασικό pH 8.0. Και οι δύο γενότυποι όμως παρουσίασαν πρότυπο χρώσης που σχετίζεται με την έντονη συγκέντρωση αυξίνης στις αρχές τόσο της κεντρικής ρίζας, αλλά και των πλάγιων ριζών (Εικόνα 3.10). Η υψηλή τιμή του pH στο μέσο ανάπτυξης πιθανά να παρεμποδίζει την ακροπεταλική διακίνηση της αυξίνης διαταράσσοντας τη χημειωσμοτική ισορροπία, με αποτέλεσμα η συσσώρευση της αυξίνης να προκαλεί την ενεργοποίηση του μηχανισμού έκπτυξης των πλάγιων ριζών.



Εικόνα 3.8. Επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών του υψηλού pH. Φυτά (A) Col-0 και (B) *trh1*, ηλικίας 14 ημερών που αναπτύχθηκαν για 9 ημέρες σε θρεπτικό μέσο με pH 8.0.



Εικόνα 3.9. Επίδραση του υψηλού pH 8.0 στην ανάπτυξη των πλάγιων ριζών. Ο αριθμός των πλάγιων ριζών σε φυτά Col-0 (n=22) και *trh1* (n=18) ηλικίας 14 ημερών τα οποία αναπτύχθηκαν για 9 ημέρες σε βασικό περιβάλλον.



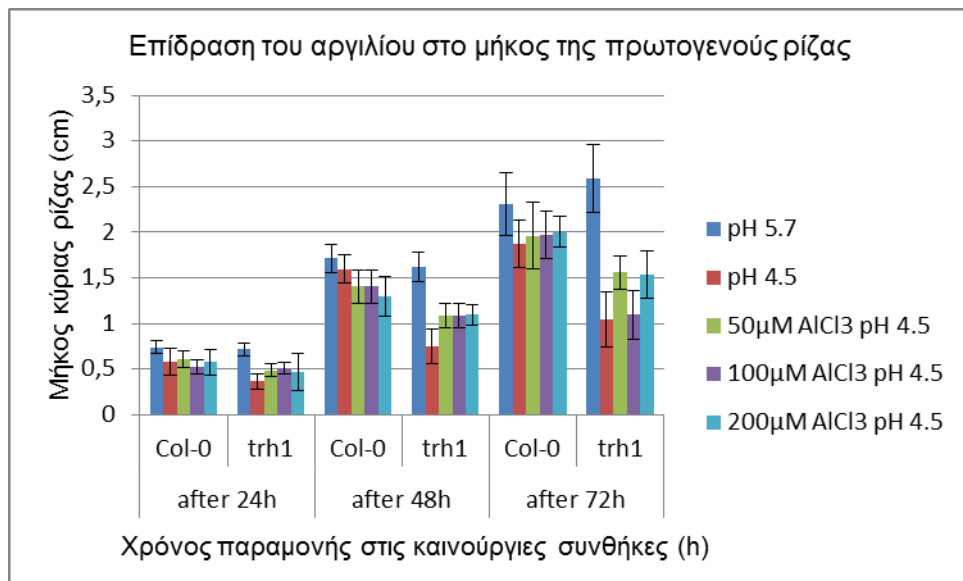
Εικόνα 3.10. Πρότυπο συσσώρευσης της αυξίνης σε ρίζες φυτών που αναπτύχθηκαν σε υψηλό pH. Χρώση GUS φυτών *Arabidopsis* 14 ημερών, τα οποία έχουν μεγαλώσει για 9 μέρες σε βασικό pH. Στην κάτω σειρά απεικονίζονται οι βάσεις των ριζών.

3.4 Η επίδραση τοξικών συγκεντρώσεων αργιλίου στην ανάπτυξη των φυτών

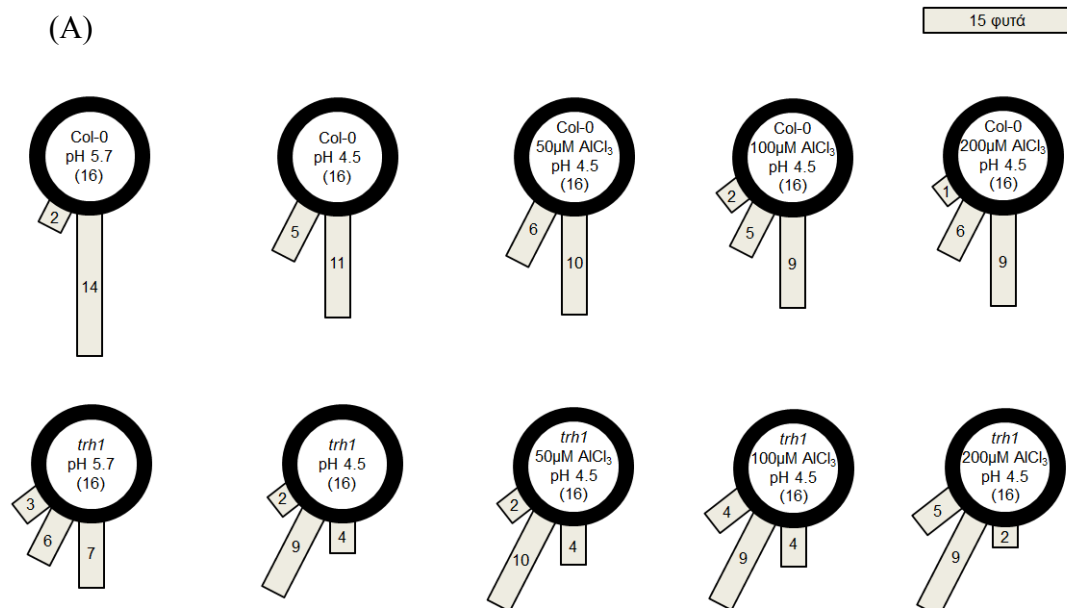
Για να μελετηθεί η επίδραση του αργιλίου στην ανάπτυξη των φυτών, φυτά Col-0 και *trh1* μεταφέρθηκαν σε τρυβλία στα οποία περιείχαν τρεις συγκεντρώσεις χλωριούχου αργιλίου (50 μM AlCl_3 , 100 μM AlCl_3 και 200 μM AlCl_3). Για να διασφαλιστεί η επίδραση του Al^{3+} , η εφαρμογή του έγινε χρησιμοποιώντας θρεπτικά μέσα με όξινο pH 4.5, το οποίο είναι απαραίτητο για την κινητικότητα του ιόντος (Wagatsuma and Ezoe, 1985). Τα αποτελέσματα μετά από τη μεταφορά των φυτών στις διάφορες συγκεντρώσεις Al^{3+} έδειξαν ότι οι μεταβολές στο μήκος της πρωτογενούς ρίζας των φυτών αγρίου τύπου Col-0 και *trh1* οφείλονται αποκλειστικά στο όξινο pH 4.5 του θρεπτικού μέσου και όχι στη τοξικότητα των συγκεντρώσεων Al^{3+} (Εικόνα 3.11).

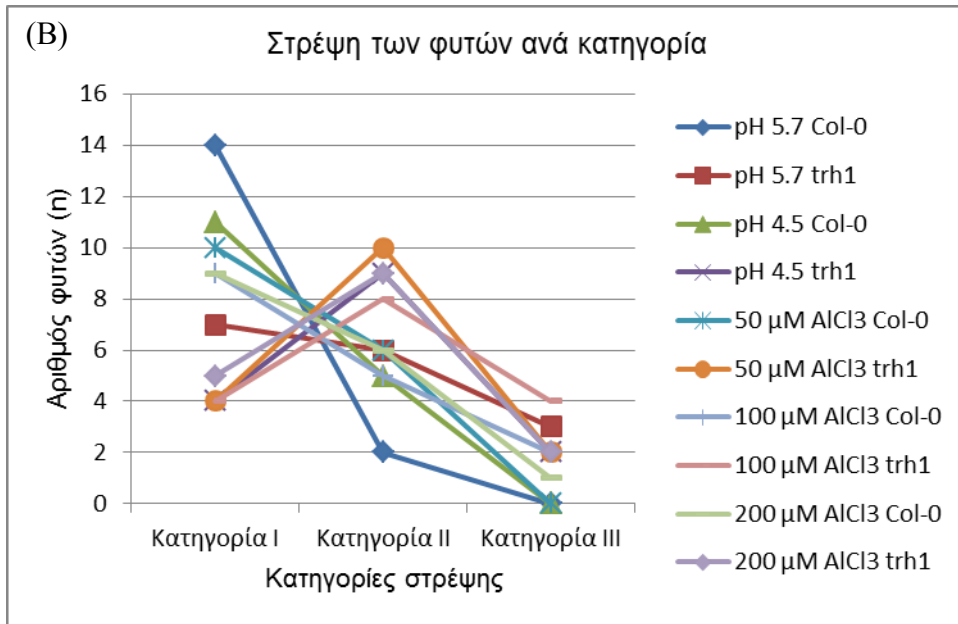
Τα αποτελέσματα της επίδρασης των ιόντων Al^{3+} στη γεωτροπική απόκριση της ρίζας των φυτών Col-0 και *trh1* έδειξαν και πάλι ότι η μεταβολή στην αρχιτεκτονική της ρίζας οφείλεται αποκλειστικά στις όξινες συνθήκες του μέσου ανάπτυξης και όχι στις υψηλές συγκεντρώσεις του Al^{3+} (Εικόνα 3.12). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της πυκνότητας και του μήκους των ριζικών τριχιδίων συμφωνούν με τα παραπάνω και δε φαίνεται να παρουσιάζουν διαφορές με αυτά που παρατηρήθηκαν στο όξινο pH (Εικόνα 3.13). Πιο συγκεκριμένα δεν παρατηρείται αλλαγή στην πυκνότητα των τριχιδίων μεταξύ των φυτών που μεταφέρθηκαν στις διάφορες συγκεντρώσεις των ιόντων Al^{3+} και αυτών που μεταφέρθηκαν σε όξινο θρεπτικό μέσο pH 4.5 χωρίς Al^{3+} . Έτσι, η διαφορά στην πυκνότητα των ριζικών τριχιδίων μεταξύ Col-0 και *trh1* παραμένει ίδια ανεξάρτητα από τη συνθήκη (Εικόνα 3.13A). Το μήκος των ριζικών τριχιδίων των φυτών Col-0 μειώνεται μόλις τα φυτά μεταφερθούν σε όξινο περιβάλλον, χωρίς όμως να υπάρχει κάποια επίδραση στα τριχίδια των φυτών εξαιτίας των

συγκεντρώσεων αργιλίου. Αντίστοιχα και με τα αποτελέσματα του όξινου pH, φαίνεται πως το μήκος των ήδη μικρότερων (από το Col-0) τριχιδίων *trh1*, δεν αλλάζει σημαντικά αν τα φυτά αυτά μεταφερθούν σε συνθήκες καταπόνησης, όξινου pH ή/και αργιλίου (Εικόνα 3.13B). Οι αναλύσεις αυτές αποκαλύπτουν ότι στις συνθήκες που εφαρμόσαμε τα ιόντα Al^{3+} φαίνεται ότι δεν ασκούν κάποια αρνητική επίδραση στην αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος των φυτών *Arabidopsis thaliana*.

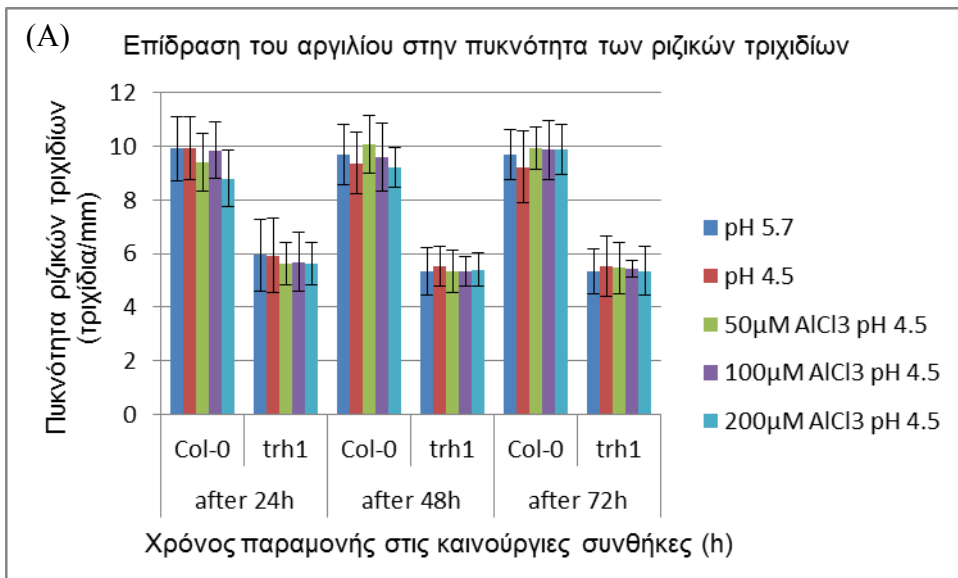


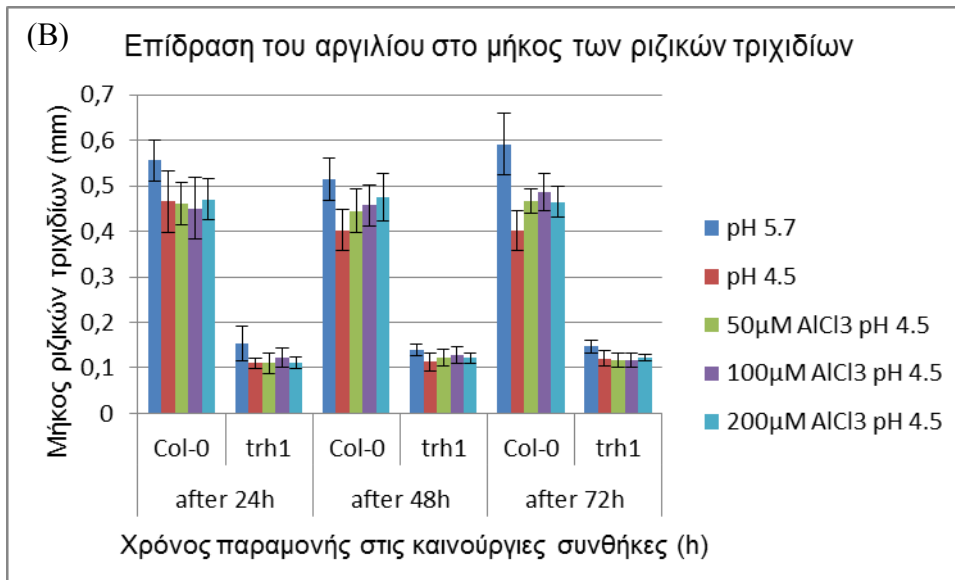
Εικόνα 3.11 Επίδραση των ιόντων Al^{3+} στο μήκος της πρωτογενούς ρίζας. Οι μετρήσεις αντιστοιχούν στο μήκος ανάπτυξης της πρωτογενούς ρίζας φυτών Col-0 ($n \geq 6$) και *trh1* ($n \geq 6$), μετά τη μεταφορά έως και 72 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις ιόντων Al^{3+} .





Εικόνα 3.12. Επίδραση των ιόντων Al^{3+} στο μήκος της πρωτογενούς ρίζας. Η μεταβολή στη γωνία στρέψης της ρίζας οφείλεται στο γενότυπο και στις όξινες συνθήκες του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης (pH 4.5), ανεξάρτητα από την συγκέντρωση των ιόντων Al^{3+} . (A) Απεικόνιση στρέψης της ρίζας με μορφή ρολογιού, (B) Απεικόνιση με διάγραμμα.





Εικόνα 3.13. Επίδραση των ιόντων Al^{3+} στην πυκνότητα και το μήκος των ριζικών τριχιδίων. (A) Τα ιόντα Al^{3+} δεν επηρεάζουν τη πυκνότητα των ριζικών τριχιδίων στα φυτά *Col-0* ($n=10$) και *trh1* ($n=10$). (B) Τα ιόντα Al^{3+} δεν επηρεάζουν το μήκος των ριζικών τριχιδίων στα φυτά *Col-0* ($n \geq 20$) από ότι στα φυτά *trh1* ($n \geq 20$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. Συζήτηση

4.1 Η μεταφορά της αυξίνης και ο ρόλος του TRH1

Η αυξίνη είναι ένα ασθενές οξύ με μία σταθερά διάστασης $pK_a=4.75$, και απαντάται σε δύο μορφές, την ουδέτερη (IAAH) και την ανιονική (IAA^-). Σε όξινα περιβάλλοντα, όπως αυτό του εξωκυτταρικού χώρου, η αυξίνη απαντάται και με τις δύο μορφές. Σε ουδέτερο όμως pH, όπως στο κυτταρόπλασμα, η αυξίνη απαντάται μόνο με τη μορφή IAA^- . Η μορφή IAAH είναι λιπόφιλη και μπορεί να περάσει από τη κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων μέσω διάχυσης, ενώ η μορφή IAA^- χρειάζεται εξειδικευμένους μεταφορείς εισροής, όπως τους AUX/LAX, για να εισέλθει στο κύτταρο και άλλους μεταφορείς εκροής, όπως το TRH1 και τα PINS. Η ισορροπία μεταξύ των δύο μορφών είναι απαραίτητη για την χημειωσμητική διακίνηση της αυξίνης μέσα στο φυτό (Εικόνα 4.1). Στην παρούσα μελέτη, έγιναν δοκιμές και παρατηρήσεις σε φυτά Col-0 και *trh1*, που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες χαμηλού και υψηλού pH, καθώς και σε υψηλές συγκεντρώσεις αργιλίου. Σκοπός ήταν να ελεγχθεί εάν το σύστημα TRH1 συμμετέχει στην απόκριση του φυτού στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις.

Στο υψηλό pH παρατηρήθηκε πως η ανάπτυξη της πρωτογενούς ρίζας των φυτών μειώθηκε έντονα, ενώ εκπτύχθηκε ένας μεγάλος αριθμός πλαγίων ριζών (Εικόνες 3.7 και 3.8). Παρατηρούμε πως η επίδραση του βασικού pH φαίνεται να είναι ίδια ανάμεσα στα φυτά αγρίου τύπου και στα μεταλλάγματα *trh1*, γεγονός που μας υποδεικνύει πως ο μεταφορέας TRH1 δεν πρέπει να παίζει κάποιο ρόλο στην αντίληψη ή στην απόκριση στα βασικά επίπεδα pH του εδάφους. Όμως, η υψηλή τιμή του pH στο μέσο ανάπτυξης πιθανώς να παρεμποδίζει την ακροπεταλική διακίνηση της αυξίνης διαταράσσοντας τη χημειωσμητική ισορροπία, με αποτέλεσμα η συσσώρευση της αυξίνης να προκαλεί την ενεργοποίηση του μηχανισμού ανάπτυξης των πλάγιων ριζών.

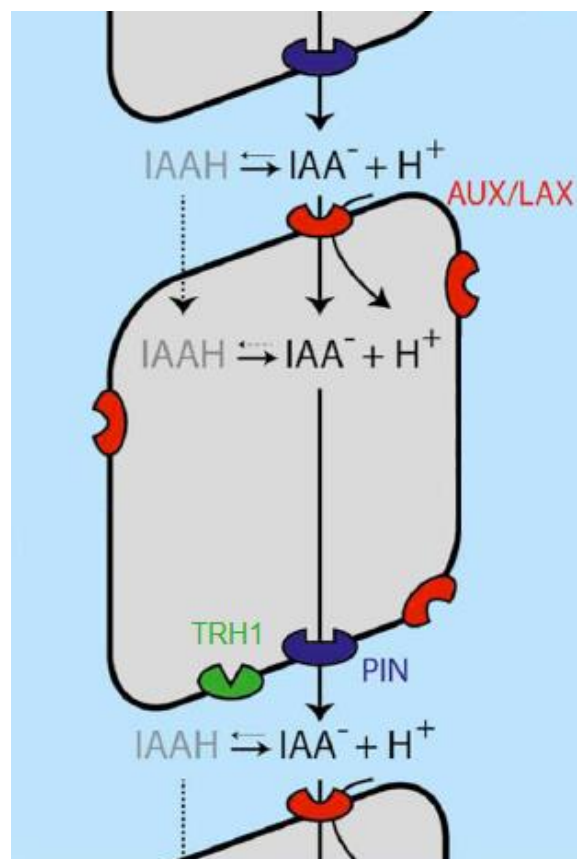
Από την άλλη παρατηρούμε πως η συμπεριφορά των φυτών Col-0 απέναντι στο όξινο pH φαίνεται να είναι διαφορετική από αυτή των φυτών *trh1*. Πιο συγκεκριμένα αν γίνει μία σύγκριση των εικόνων 3.2, 3.3 και 3.5 παρατηρούμε πως οι τέσσερις αυτοί συνδυασμοί γενοτύπων-συνθηκών

(φυτά Col-0 σε φυσιολογικές συνθήκες, φυτά Col-0 σε όξινες συνθήκες, φυτά *trh1* σε φυσιολογικές συνθήκες και φυτά *trh1* σε όξινες συνθήκες), ακολουθούν μια διαβάθμιση ως προς την ένταση παρουσίασης των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών τους. Αρχικά παρατηρούμε πως τα φυτά Col-0 στις όξινες συνθήκες παρουσίασαν μείωση του μήκους της πρωτογενούς ρίζας, μείωσης του μήκους των ριζικών τους τριχιδίων και πρόβλημα απόκρισης στο γεωτροπικό ερέθισμα. Το χαμηλό pH όμως επηρέασε πιο έντονα τα φυτά *trh1*, τα οποία είχαν ήδη πρόβλημα στην έκπτυξη ριζικών τριχιδίων και παρουσιάζουν μη γεωτροπικό χαρακτήρα. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε πως στο χαμηλό pH, τα φυτά *trh1*, έχουν πιο έντονη μείωση του μήκους και εντονότερο πρόβλημα στην απόκριση στο γεωτροπικό ερέθισμα από τα φυτά Col-0, ενώ δεν φαίνεται να παρουσιάζουν κάποιο πρόβλημα, στα ήδη υποανάπτukτα ριζικά τους τριχίδια.

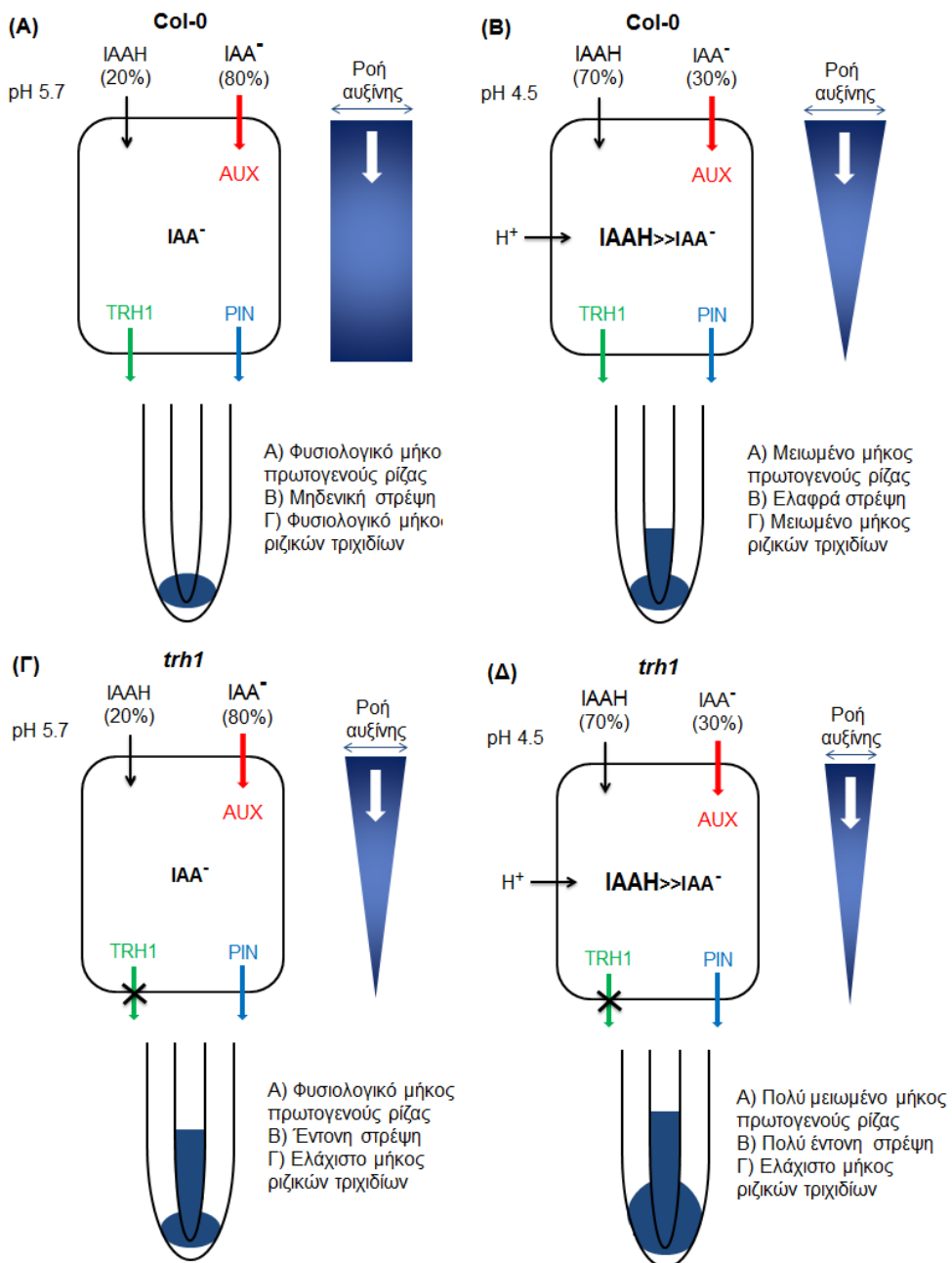
Μια πιθανή ερμηνεία των αποτελεσμάτων βασίζεται στη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των μορφών IAAH/IAA⁻ εξαιτίας του όξινου pH (Εικόνα 4.2). Το όξινο pH αλλάζει την ισορροπία μεταξύ των καταστάσεων IAAH/IAA⁻, ευνοώντας την μορφή IAAH. Στο εξωτερικό του κυττάρου η μορφή IAAH επικρατεί έναντι της IAA⁻, ενώ στο εσωτερικό του κυττάρου η εισροή των ιόντων H⁺ οξινίζει το κυτταρόπλασμα, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την επικράτηση της μορφής IAAH έναντι της IAA⁻. Η μορφή IAAH δεν μπορεί όμως να εξέλθει από το κύτταρο και οι μεταφορείς που λειτουργούν ως εκροείς έχουν να μεταφέρουν μικρότερη συγκέντρωση IAA⁻. Αυτή η κατάσταση προκαλεί την συσσώρευση της αυξίνης στα κύτταρα και την απορύθμιση του δικτύου μεταφοράς της αυξίνης (Εικόνα 4.2.B). Στην περίπτωση του μεταλλάγματος *trh1*, το σύστημα μεταφοράς TRH1 δε λειτουργεί συνεπώς και στις φυσιολογικές συνθήκες η αυξίνη έχει μικρότερο ρυθμό εκροής από το κύτταρο (Εικόνα 4.2.Γ), γεγονός που γίνεται πολύ εντονότερο σε χαμηλό pH γιατί ένα ακόμα στοιχείο που χρειάζεται έντονα να δράσει για τη μεταφορά της αυξίνης εκτός του κυττάρου δε λειτουργεί (Εικόνα 4.2.Δ). Αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται να δείχνουν πως το γονίδιο *TRH1* στην περίπτωση της όξινης καταπόνησης διαδραματίζει ρόλο στην απόκριση της ρίζας συμβάλλοντας στην ρύθμιση της ομοιόστασης αυξίνης.

Όσον αφορά το αργίλιο, πρόκειται για ένα δυσκίνητο στοιχείο, το οποίο συνήθως εγκλωβίζεται στα εξωτερικά κύτταρα του φλοιού και στα ριζικά

τριχίδια και σπάνια εισέρχεται στο εσωτερικό της ρίζας (Wagatsuma and Kaneko, 1987; Marienfeld and Stelzer, 1993). Χρησιμοποιήθηκε για την διατάραξη της βασιπεταλικής μεταφοράς της αυξίνης, η οποία γίνεται στα κύτταρα του φλοιού και της επιδερμίδας και αναμενόταν να έχει επίδραση στο σχηματισμό και την επιμήκυνση των ριζικών τριχιδίων. Οι συγκεντρώσεις αργιλίου στο θρεπτικό μέσο συνδυάστηκαν με χαμηλή όξινη τιμή pH (4.5), συνθήκη απαραίτητη για την κινητικότητα του ιόντος Al^{3+} (Kochian, 1995). Στην παρούσα μελέτη σε συνθήκες καταπόνησης αργιλίου, παρατηρήθηκε μείωση του μήκους της πρωτογενούς ρίζας και του μήκους των ριζικών τριχιδίων, καθώς και μία αδυναμία ανάπτυξης σύμφωνα με το γεωτροπικό ερέθισμα, στα φυτά που μεταφέρθηκαν. Λαμβάνοντας όμως υπόψη το γεγονός ότι οι μεταβολές αυτές παρατηρήθηκαν και στα φυτά που μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο που είχε μόνο χαμηλό pH ως συνθήκη καταπόνησης, χωρίς κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως οι αυξημένες συγκεντρώσεις αργιλίου δε φαίνεται να προκαλούν μεταβολές στην αρχιτεκτονική της ρίζας των φυτών.



Εικόνα 4.1. Η θεωρία της χημειοσωμωτικής διακίνησης της αυξίνης. Στο όξινο εξωκυτταρικό περιβάλλον η αυξίνη απαντάται με τις μορφές IAAH ($\approx 20\%$) και IAA⁻ ($\approx 80\%$), ενώ στο ουδέτερο κυτταρόπλασμα κυρίως με τη μορφή IAA⁻ ($\approx 99,8\%$). Η αυξίνη με τη μορφή IAAH εισέρχεται στο κύτταρο μέσω διάχυσης και η μορφή IAA⁻ μέσω μεταφορέων εισροής (κυρίως των AUX/LAX, [κόκκινο χρώμα]). Η αυξίνη εξέρχεται από το κύτταρο μόνο με τη μορφή IAA⁻, συνεπώς έχει ανάγκη μεταφορείς εκροής όπως οι PINs [μπλε] και TRH1 [πράσινο]. Σε όξινο περιβάλλον η επικράτηση των πρωτονίων (H⁺) εξουδετερώνει την ανιονική μορφή της αυξίνης (IAA⁻), με αποτέλεσμα η επικράτηση της IAAH να δυσχεραίνει την εκροή της.



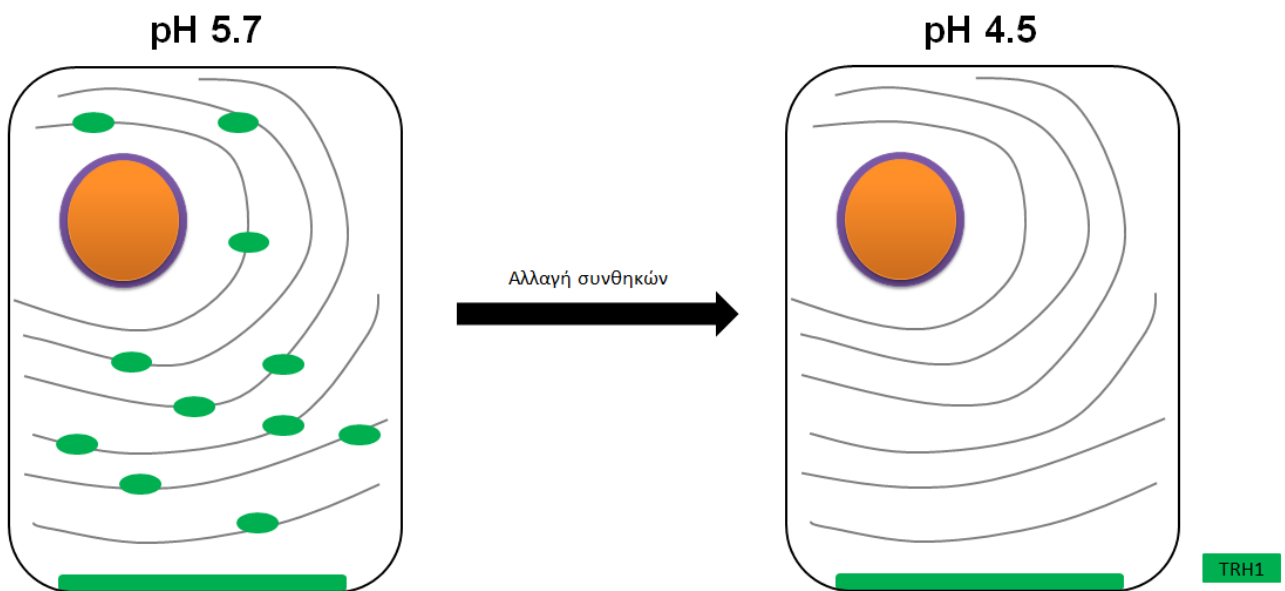
Εικόνα 4.2. Σχηματική απεικόνιση της διαταραχής στην ακροπεταλική διακίνηση της αυξίνης. (Α) Σε φυσιολογικές συνθήκες η μορφή IAA⁻ επικρατεί στο εσωτερικό του κυττάρου, γεγονός που διευκολύνει τη πολική μεταφορά της ορμόνης. (Β) Στο όξινο περιβάλλον η διαταραχή της ισορροπίας IAAH/IAA⁻ στο εσωτερικό του κυττάρου δυσκολεύει την εκροή της ορμόνης. (Γ) Στη ρίζα των φυτών *trh1*, η απώλεια ενός συστήματος εκροής αυξίνης προκαλεί πρόβλημα στη διακίνηση. (Δ) Το πρόβλημα επιδεινώνεται σε συνθήκες όξινου pH εξαιτίας της δραματικής επικράτησής της μορφής IAAH έναντι της IAA⁻.

4.2 Δυναμική ενδοκυτταρική μεταβολή συστημάτων μεταφοράς και ο ρόλος της στην ανάπτυξη

Ο μεταφορέας καλίου TRH1, φαίνεται να ρυθμίζει την ομοίωση της αυξίνης στο ακρορίζιο καθώς τοποθετείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Είναι γνωστό ότι η συνεχόμενη ανακύκλωση των μεταφορέων PIN και η εισαγωγή σε κυτταρικά έγκλειστα προς αποδόμηση επηρεάζει τη ροή και τη διαθεσιμότητα της αυξίνης εναλλάσσοντας την κατανομή των μεταφορέων PIN από το κυτταρόπλασμα στο εσωτερικό του κυττάρου (Rakusová et al., 2015). Αυτή η διαδικασία για τους μεταφορείς PIN ρυθμίζεται από φωσφορυλιώσεις και πιθανώς στη συνέχεια από ουμπικουιλινώσεις και πρωτεόλυση (Abas et al., 2006; Habets et al., 2014). Έτσι το κύτταρο ελέγχει το χώρο και το χρόνο που θα γίνει η αποδόμηση των συγκεκριμένων συστημάτων εκροής. Παρόμοιο μηχανισμό ελέγχου μέσω της πρωτεόλυσης χρησιμοποιούν και ο μεταφορέας σιδήρου IRT1 (Iron-Regulated Transporter 1) (Barberon et al., 2014), αλλά και ο μεταφορέας βορίου BOR1 (Kasai et al., 2014).

Είναι πιθανό πως και ο μεταφορέας καλίου TRH1 να ακολουθεί ένα παρόμοιο μηχανισμό συνεχούς ανακύκλωσης πρωτεϊνών και ενδοκύτωσης, ο οποίος ρυθμίζει την κατανομή της πρωτεΐνης μεταξύ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του ενδοπλασματικού δικτύου με αποτέλεσμα την αλλαγή της μορφολογίας της ρίζας, ως απάντηση σε μια κατάσταση αβιοτικής καταπόνησης. Στην περίπτωση του TRH1, η αβιοτική καταπόνηση φαίνεται πως είναι το όξινο pH, το οποίο προκαλεί αλλαγή της

ισορροπίας μεταξύ των μορφών IAAH και IAA⁻, γεγονός που δυσχεραίνει την εκροή της αυξίνης από τα κύτταρα. Για να καταπολεμήσει αυτή την υπερβολική συσσώρευση της αυξίνης στο κυτταρόπλασμα το κύτταρο πρέπει να χρησιμοποιήσει τα συστήματα εκροής της ορμόνης, όπως το TRH1 και τα PINs. Είναι πιθανό λοιπόν, η άνοδος της συγκέντρωσης της αυξίνης στο κυτταρόπλασμα να πυροδοτεί μία αλλαγή στο πρότυπο τοποθέτησης του μεταφορέα TRH1, με αποτέλεσμα αυτός να τοποθετείται κατά κύριο λόγο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Εικόνα 4.3). Με την διάταξη αυτή το σύστημα TRH1 μπορεί να συμβάλει στη διευκόλυνση της μεταφοράς της αυξίνης από το εσωτερικό του κυττάρου στον αποπλαστικό χώρο για να διατηρηθεί η ομοιόσταση της αυξίνης στο ακρορίζιο επηρεάζοντας την αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος.



Εικόνα 4.3. Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου λειτουργίας του συστήματος TRH1. Σε φυσιολογικές συνθήκες pH 5.7 ο μεταφορέας TRH1 τοποθετείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και σε δομές ενδοπλασματικού δικτύου (πράσινο χρώμα). Όταν όμως το φυτό αντιληφθεί πως υπάρχει μία αβιοτική καταπόνηση, όπως για παράδειγμα το χαμηλό pH 4.5, το οποίο διαταράσσει την ομοιόσταση της αυξίνης, η αλλαγή στη κατανομή του TRH1 αλλάζει με αποκλειστική συσσώρευση στη κυτταροπλασματική μεμβράνη μπορεί να ρυθμίσει την ομοιόσταση της αυξίνης στη ρίζα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

1001 Genomes Consortium. (2016). 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*.

Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wiśniewska, J., Moulinier–Anzola, J. C., & Luschnig, C. (2006). Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nature cell biology*, 8(3), 249-256.

Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), 36-42.

Barak, P., Jobe, B. O., Krueger, A. R., Peterson, L. A., & Laird, D. A. (1997). Effects of long-term soil acidification due to nitrogen fertilizer inputs in Wisconsin. *Plant and Soil*, 197(1), 61-69.

Barberon, M., Dubeaux, G., Kolb, C., Isono, E., Zelazny, E., & Vert, G. (2014). Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), 8293-8298.

Bartel, B. (1997). Auxin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 48(1), 51-66.

Beeckman, T., & Friml, J. (2010). Nitrate contra auxin: nutrient sensing by roots. *Developmental cell*, 18(6), 877-878.

Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., & May, S. T. (1996). *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, 273(5277), 948.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115(5), 591-602.

Blakeslee, J. J., Peer, W. A., & Murphy, A. S. (2005). Auxin transport. *Current opinion in plant biology*, 8(5), 494-500.

Blancaflor, E. B. (2013). Regulation of plant gravity sensing and signaling by the actin cytoskeleton. *American journal of botany*, 100(1), 143-152.

Bouguyon, E., Gojon, A., & Nacry, P. (2012). Nitrate sensing and signaling in plants. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 23, No. 6, pp. 648-654). Academic Press.

Brown, T. T., Koenig, R. T., Huggins, D. R., Harsh, J. B., & Rossi, R. E. (2008). Lime effects on soil acidity, crop yield, and aluminum chemistry in direct-seeded cropping systems. *Soil Science Society of America Journal*, 72(3), 634-640.

Casal, J. J., Fankhauser, C., Coupland, G., & Blazquez, M. A. (2004). Signalling for developmental plasticity. *Trends in plant science*, 9(6), 309-314.

Chen, R., Hilson, P., Sedbrook, J., Rosen, E., Caspar, T., & Masson, P. H. (1998). The *Arabidopsis thaliana* AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), 15112-15117.

Chen, R., Rosen, E., & Masson, P. H. (1999). Gravitropism in higher plants. *Plant Physiology*, 120(2), 343-350.

Chesworth, W. (Ed.). (2008). *Encyclopedia of soil science* (Vol. 207). Berlin: Springer.

Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H., & Chérel, I. (1997). Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *The EMBO journal*, 16(12), 3455-3463.

Daras, G., Rigas, S., Tsitsekian, D., Iacovides, T. A., & Hatzopoulos, P. (2015). Potassium transporter TRH1 subunits assemble regulating root-hair elongation autonomously from the cell fate determination pathway. *Plant Science*, 231, 131-137.

Desbrosses, G., Josefsson, C., Rigas, S., Hatzopoulos, P., & Dolan, L. (2003). AKT1 and TRH1 are required during root hair elongation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 54(383), 781-788.

Ditengou, F. A., Raudaskoski, M., & Lapeyrie, F. (2003). Hypaphorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp *bicostata* root hairs. *Planta*, 218(2), 217-225.

Ditengou, F. A., Teale, W. D., Kochersperger, P., Flittner, K. A., Kneuper, I., van der Graaff, E. & Laux, T. (2008). Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(48), 18818-18823.

Dolk, H. E., & Thimann, K. V. (1932). Studies on the Growth Hormone of Plants I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 18(1), 30-46.

Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Shishkova, S. & Benková, E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(25), 8790-8794.

Elumalai, R. P., Nagpal, P., & Reed, J. W. (2002). A mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *The Plant Cell*, 14(1), 119-131.

Enders, T. A., & Strader, L. C. (2015). Auxin activity: Past, present, and future. *American journal of botany*, 102(2), 180-196.

Felten, J., Kohler, A., Morin, E., Bhalerao, R. P., Palme, K., Martin, F., & Legué, V. (2009). The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and Arabidopsis through auxin transport and signaling. *Plant Physiology*, 151(4), 1991-2005.

Forde, B., & Lorenzo, H. (2001). The nutritional control of root development. *Plant and soil*, 232(1-2), 51-68.

Foy, C. D., Chaney, R. T., & White, M. C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 29(1), 511-566.

Foy, C. D. (1984). Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. *Soil acidity and liming*, (soilacidityandl), 57-97.

Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., & Palme, K. (2002a). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell*, 108(5), 661-673.

Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K., & Palme, K. (2002b). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature*, 415(6873), 806-809.

Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., & Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of Arabidopsis. *Nature*, 426(6963), 147-153.

Fu, H. H., & Luan, S. (1998). AtKUP1: a dual-affinity K⁺ transporter from Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(1), 63-73.

Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., & Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science*, 282(5397), 2226-2230.

Gehring, C. A., Williams, D. A., Cody, S. H., & Parish, R. W. (1990). Phototropism and geotropism in maize coleoptiles are spatially correlated with increases in cytosolic free calcium. *Nature*, 345(6275), 528-530.

Giehl, R. F., & von Wirén, N. (2015). Nitrate signalling: Functions of a nitrate transceptor. *Nature plants*, 1(3).

Goldsmith, M. H. M., & Goldsmith, T. H. (1981). Quantitative predictions for the chemiosmotic uptake of auxin. *Planta*, 153(1), 25-33.

Grabov, A. (2007). Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: single family–multiple functions. *Annals of botany*, 99(6), 1035-1041.

Habets, M. E., & Offringa, R. (2014). PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity: a key target for environmental and endogenous signals. *New Phytologist*, 203(2), 362-377.

Hachiya, T., & Noguchi, K. (2011). Mutation of NRT1. 1 enhances ammonium/low pH-tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant signaling & behavior*, 6(5), 706-708.

Hart, J. W. (1990). *Plant tropisms: and other growth movements*. Springer Science & Business Media.

Hasenstein, K. H., & Rayle, D. (1984). Cell wall pH and auxin transport velocity. *Plant physiology*, 76(1), 65-67.

Helyar, K. R., & Porter, W. M. (1989). Soil acidification, its measurement and the processes involved. *Soil acidity and plant growth*, 61-101.

Howeler, R. H. (1991). Identifying plants adaptable to low pH conditions. In *Plant-soil Interactions at low pH* (pp. 885-904). Springer Netherlands.

Iyer-Pascuzzi, A. S., Jackson, T., Cui, H., Petricka, J. J., Busch, W., Tsukagoshi, H., & Benfey, P. N. (2011). Cell identity regulators link development and stress responses in the Arabidopsis root. *Developmental cell*, 21(4), 770-782.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, 6(13), 3901.

Jensen, P. B. (1936). *Growth hormones in plants*. New York: McGraw-Hill.

Kamprath, E. J. (2010). Soil acidity and liming. *Century of Soil Science*, 103.

Kasai, K., Takano, J., & Fujiwara, T. (2014). Analysis of endocytosis and ubiquitination of the BOR1 transporter. *Plant Endosomes: Methods and Protocols*, 203-217.

Kazan, K., & Manners, J. M. (2009). Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in plant science*, 14(7), 373-382.

Kepinski, S., & Leyser, O. (2005). Plant development: auxin in loops. *Current Biology*, 15(6), R208-R210.

Kim, E. J., Kwak, J. M., Uozumi, N., & Schroeder, J. I. (1998). AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *The Plant Cell*, 10(1), 51-62.

Kochian, L. V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual review of plant biology*, 46(1), 237-260.

Koyama, H., Toda, T., Yokota, S., Dawair, Z., & Hara, T. (1995). Effects of aluminum and pH on root growth and cell viability in *Arabidopsis thaliana* strain Landsberg in hydroponic culture. *Plant and Cell Physiology*, 36(1), 201-205.

Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., & Zažímalová, E. (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol*, 10(12), 249.

Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., & Zazimalova, E. (2010). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental cell*, 18(6), 927-937.

Li, L., Hou, X., Tsuge, T., Ding, M., Aoyama, T., Oka, A., & Qu, L. J. (2008). The possible action mechanisms of indole-3-acetic acid methyl ester in *Arabidopsis*. *Plant cell reports*, 27(3), 575-584.

Li, X., & Zhang, W. S. (2008). Salt-avoidance tropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & behavior*, 3(5), 351-353.

Luschnig, C., Gaxiola, R. A., Grisafi, P., & Fink, G. R. (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development*, 12(14), 2175-2187.

Marienfeld, S., & Stelzer, R. (1993). X-ray microanalyses in roots of Al-treated *Avena sativa* plants. *Journal of Plant Physiology*, 141(5), 569-573.

Marschner, H. (1991). Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. In *Plant-Soil interactions at low pH* (pp. 683-702). Springer Netherlands.

Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., & Guerinot, M. L. (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 126(4), 1646-1667.

Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682.

Meyerowitz, E. M., & Somerville, C. R. (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Monshausen, G. B., Miller, N. D., Murphy, A. S., & Gilroy, S. (2011). Dynamics of auxin-dependent Ca²⁺ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. *The Plant Journal*, 65(2), 309-318.

Moore, D. P. (1974). Physiological effects of pH on roots. *Proc Plant Root Environ.*

Miller, A. J., & Cramer, M. D. (2005). Root nitrogen acquisition and assimilation. In *Root Physiology: from Gene to Function* (pp. 1-36). Springer Netherlands.

Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A. & Palme, K. (1998). AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *The EMBO journal*, 17(23), 6903-6911.

Pařove-Balang, P., Āiamporová, M., Zelinová, V., Pavlovkin, J., Gurinová, E., & Mistrík, I. (2012). Cellular responses of two Latin-American cultivars of Lotus corniculatus to low pH and Al stress. *Open Life Sciences*, 7(6), 1046-1054.

Passardi, F., Dobias, J., Valério, L., Guimil, S., Penel, C., & Dunand, C. (2007). Morphological and physiological traits of three major *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of plant physiology*, 164(8), 980-992.

Pavlovkin, J., Pal'ove-Balang, P., Kolarovič, L., & Zelinová, V. (2009). Growth and functional responses of different cultivars of *Lotus corniculatus* to aluminum and low pH stress. *Journal of plant physiology*, 166(14), 1479-1487.

Perrin, R. M., Young, L. S., Murthy, U. N., Harrison, B. R., Wang, Y. A. N., Will, J. L., & Masson, P. H. (2005). Gravity signal transduction in primary roots. *Annals of botany*, 96(5), 737-743.

Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Chérel, I., Boucherez, J., Thibaud, J. B., & Sentenac, H. (2001). Guard Cell Inward K⁺ Channel Activity in *Arabidopsis* Involves Expression of the Twin Channel Subunits KAT1 and KAT2. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3215-3221.

Quintero, F. J., & Blatt, M. R. (1997). A new family of K⁺ transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla. *FEBS letters*, 415(2), 206-211.

Rakusová, H., Fendrych, M., & Friml, J. (2015). Intracellular trafficking and PIN-mediated cell polarity during tropic responses in plants. *Current opinion in plant biology*, 23, 116-123.

Rangel, A. F., Mobin, M., Rao, I. M., & Horst, W. J. (2005). Proton toxicity interferes with the screening of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for aluminium resistance in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 607-616.

Reinhardt, D., Pesce, E. R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., & Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 426(6964), 255-260.

Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K. A., Grabov, A., & Hatzopoulos, P. (2001). TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in Arabidopsis root hairs. *The Plant Cell*, 13(1), 139-151.

Rigas, S., Ditengou, F. A., Ljung, K., Daras, G., Tietz, O., Palme, K., & Hatzopoulos, P. (2013). Root gravitropism and root hair development constitute coupled developmental responses regulated by auxin homeostasis in the Arabidopsis root apex. *New Phytologist*, 197(4), 1130-1141.

Rivero, L., Scholl, R., Holomuzki, N., Crist, D., Grotewold, E., & Brkljacic, J. (2014). Handling Arabidopsis plants: growth, preservation of seeds, transformation, and genetic crosses. *Arabidopsis Protocols*, 3-25.

Robson, A. (Ed.). (2012). *Soil acidity and plant growth*. Elsevier.

Rubio, F., Santa-María, G. E., & Rodríguez-Navarro, A. (2000). Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum*, 109(1), 34-43.

Ryan, P. R., Kinraide, T. B., & Kochian, L. V. (1993). Al³⁺-Ca²⁺ interactions in aluminum rhizotoxicity. *Planta*, 192(1), 98-103.

Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., ... & Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, 99(5), 463-472.

Salazar-Henao, J. E., & Schmidt, W. (2016). An inventory of nutrient-responsive genes in Arabidopsis root hairs. *Frontiers in plant science*, 7.

Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A., & Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology*, 5(5), 301-307.

Schmidt, W., & Linke, B. (2007). Nutrients as regulators of root morphology and architecture. *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil plant interface, 2nd edn.* Marcel Dekker Inc, New York, 135-150.

Scott, A. C., & Allen, N. S. (1999). Changes in cytosolic pH within Arabidopsis root columella cells play a key role in the early signaling pathway for root gravitropism. *Plant Physiology*, 121(4), 1291-1298.

Shao, H. B., Guo, Q. J., Chu, L. Y., Zhao, X. N., Su, Z. L., Hu, Y. C., & Cheng, J. F. (2007). Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54(1), 37-45.

Sokołowska, K., Kizińska, J., Szewczuk, Z., & Banasiak, A. (2014). Auxin conjugated to fluorescent dyes—a tool for the analysis of auxin transport pathways. *Plant Biology*, 16(5), 866-877.

Song, H., Xu, X., Wang, H., & Tao, Y. (2011). Protein carbonylation in barley seedling roots caused by aluminum and proton toxicity is suppressed by salicylic acid. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(4), 653-659.

Sultan, S. E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in plant science*, 5(12), 537-542.

Sun, J., & Zheng, N. (2015). Molecular Mechanism Underlying the Plant NRT1. 1 Dual-Affinity Nitrate Transporter. *Frontiers in physiology*, 6.

Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847-859.

Teale, W. D., Ditengou, F. A., Dovzhenko, A. D., Li, X., Molendijk, A. M., Ruperti, B., & Palme, K. (2008). Auxin as a model for the integration of hormonal signal processing and transduction. *Molecular plant*, 1(2), 229-237.

Tivendale, N. D., Ross, J. J., & Cohen, J. D. (2014). The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 19(1), 44-51.

Vicente-Agullo, F., Rigas, S., Desbrosses, G., Dolan, L., Hatzopoulos, P., & Grabov, A. (2004). Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in Arabidopsis roots. *The Plant Journal*, 40(4), 523-535.

Uchida, R., & Hue, N. V. (2000). Soil acidity and liming. *Plant nutrient management in Hawaiian soils, approaches for tropical and subtropical agriculture*. Edited by JA Silva, and R. Uchida. University of Hawaii, Honolulu, 101-111.

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*, 9(11), 1963-1971.

Utsuno, K., Shikanai, T., Yamada, Y., & Hashimoto, T. (1998). AGR, an Agravitropic locus of Arabidopsis thaliana, encodes a novel membrane-protein family member. *Plant and cell physiology*, 39(10), 1111-1118.

Vieten, A., Vanneste, S., Wiśniewska, J., Benková, E., Benjamins, R., Beeckman, T., & Friml, J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development*, 132(20), 4521-4531.

Wagatsuma, T., & Ezoë, Y. (1985). Effect of pH on ionic species of aluminum in medium and on aluminum toxicity under solution culture. *Soil science and plant nutrition*, 31(4), 547-561.

Wagatsuma, T., & Kaneko, M. (1987). High toxicity of hydroxy-aluminum polymer ions to plant roots. *Soil science and plant nutrition*, 33(1), 57-67.

- Wang, Y., Deng, D., Shi, Y., Miao, N., Bian, Y., & Yin, Z.** (2012). Diversification, phylogeny and evolution of auxin response factor (ARF) family: insights gained from analyzing maize ARF genes. *Molecular biology reports*, 39(3), 2401-2415.
- Weiser, M., Koubek, T., & Herben, T.** (2016). Root Foraging Performance and Life-History Traits. *Frontiers in Plant Science*, 7, 779.
- Weiss, S.T.** (2009). High-Yield Pharmacology. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 3-. ISBN 978-0-7817-9273-8.
- Went, F. W., & Thimann, K. V.** (1937). Phytohormones. *Phytohormones*.
- Wiśniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P. B., Růžička, K., Blilou, I., & Friml, J.** (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 312(5775), 883-883.
- Wu, D., Shen, H., Yokawa, K., & Baluška, F.** (2015). Overexpressing OsPIN2 enhances aluminium internalization by elevating vesicular trafficking in rice root apex. *Journal of experimental botany*, erv385.
- Yang, J. L., Zheng, S. J., He, Y. F., & Matsumoto, H.** (2005). Aluminium resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(414), 1197-1203.
- Yang, Y., Hammes, U. Z., Taylor, C. G., Schachtman, D. P., & Nielsen, E.** (2006). High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology*, 16(11), 1123-1127.
- Yang, Z. B., Geng, X., He, C., Zhang, F., Wang, R., Horst, W. J., & Ding, Z.** (2014). TAA1-regulated local auxin biosynthesis in the root-apex transition zone mediates the aluminum-induced inhibition of root growth in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(7), 2889-2904.

Yokota, S., & Ojima, K. (1995). Physiological response of root tip of alfalfa to low pH and aluminium stress in water culture. In *Plant-Soil Interactions at Low pH: Principles and Management* (pp. 329-331). Springer Netherlands.

Zažímalová, E., Murphy, A. S., Yang, H., Hoyerová, K., & Hošek, P. (2010). Auxin transporters—why so many?. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3), a001552.

Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, 61, 49.

Zou, N., Li, B., Dong, G., Kronzucker, H. J., & Shi, W. (2012). Ammonium-induced loss of root gravitropism is related to auxin distribution and TRH1 function, and is uncoupled from the inhibition of root elongation in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3777-3788.

Κουκουλάκης Π. και Παπαδόπουλος Α. (2007). Τα προβληματικά εδάφη και η βελτίωσή τους. *Εκδόσεις Σταμούλης*, Αθήνα. ISBN: 9789603516934.