



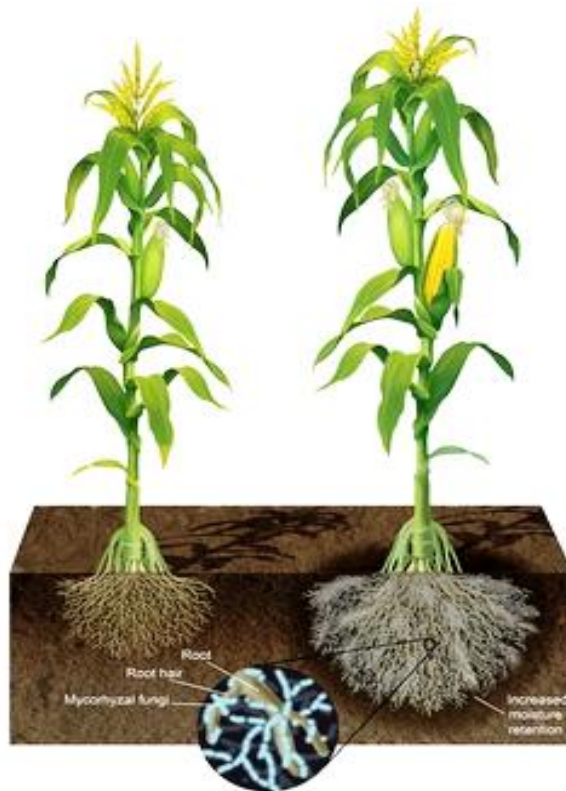
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ  
ΠΜΣ «ΑΓΡΟ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ  
ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ»

Διερεύνηση των προτύπων έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα της πορείας αφομοίωσης θεικών σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσονται παρουσία του μυκορριζικού μύκητα *Rhizophagus irregularis*

---

## Μεταπτυχιακή Μελέτη

Πέτρος Π. Σιγάλας



Επιβλέπουσα: Δρ. Στυλιανή Χωριανοπούλου

ΑΘΗΝΑ 2017

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**  
**ΠΜΣ «ΑΓΡΟ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ»**

Διερεύνηση των προτύπων έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα της πορείας αφομοίωσης θεικών σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσονται παρουσία του μυκορριζικού μύκητα *Rhizophagus irregularis*

**Μεταπτυχιακή Μελέτη**

**Πέτρος Π. Σιγάλας**

**Επιβλέπουσα: Δρ. Στυλιανή Χωριανοπούλου**

**ΑΘΗΝΑ 2017**

## **Μεταπτυχιακή Μελέτη**

Διερεύνηση των προτύπων έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα της πορείας αφομοίωσης θεικών σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσονται παρουσία του μυκορριζικού μύκητα *Rhizophagus irregularis*

**Πέτρος Π. Σιγάλας**

### **Μέλη Εισηγητικής - Εξεταστικής Επιτροπής**

Στυλιανή Χωριανοπούλου, Επ. Καθηγήτρια - Επιβλέπουσα

Δημήτριος Μπουράνης, Καθηγητής

Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής

*Στην οικογένειά μου*

*Στη Μαριλού*

## Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που συνετέλεσαν με ποικίλους τρόπους στην συγγραφή της μεταπτυχιακής μου εργασίας και στην ολοκλήρωση και αυτού του κύκλου των σπουδών μου. Δεν θα μπορούσα να μην ξεκινήσω από την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Στυλιανή Χωριανοπούλου, η οποία από την πρώτη στιγμή δέχτηκε με χαρά να είναι επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Την ευχαριστώ θερμά τόσο για την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης όσο και για το ότι πίστεψε σε εμένα δίνοντας μου πολλές ευκαιρίες και ενθαρρύνοντας με συνεχίζω να κάνω αυτό που ονειρεύομαι. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπή που δέχτηκαν να με αξιολογήσουν, τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κατινάκη και τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Μπουράνη, ή αλλιώς «δάσκαλο», τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα για την βοήθεια του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας. Ποτέ δεν θα ξεχάσω τις πολύτιμες συμβουλές του.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου ακόμη και στο **Κοινωφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης** για την οικονομική στήριξη που μου παρείχε κατά το διάστημα των μεταπτυχιακών μου σπουδών, μια στήριξη πολύ σημαντική για την συνέχιση των σπουδών μου.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους γονείς μου Παρασκευά και Άννα, την αδελφή μου Ευαγγελία και την κοπέλα μου Μαριλού, οι οποίοι με βοήθησαν και με στήριξαν με διάφορους τρόπους όλο το διάστημα των σπουδών μου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και συνεχίζουν να με στηρίζουν στα μελλοντικά μου σχέδια.

## Περιεχόμενα

|  |    |
|--|----|
| Περίληψη .....   | 7  |
| Abstract.....  | 9  |
| 1. Εισαγωγή.....   | 12 |
| 1.1. Καλαμπόκι.....  | 12 |
| 1.1.1. Γενική περιγραφή.....   | 12 |
| 1.1.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά καλαμποκιού.....                                     | 13 |
| 1.1.3. Στάδια ανάπτυξης .....  | 17 |
| 1.2. Ομοίωση του θείου (S).....  | 20 |
| 1.2.1. Πρόσληψη και διακίνηση των $\text{SO}_4^{2-}$ εντός του φυτού.....              | 20 |
| 1.2.2. Ρύθμιση της πρόσληψη και διακίνησης των $\text{SO}_4^{2-}$ εντός του φυτού..... | 22 |
| 1.2.3. Αφομοίωση του θείου (S) .....   | 24 |
| 1.2.4. Ρύθμιση της αφομοίωσης του θείου (S) .....                                      | 26 |
| 1.2.5. Αναγωγή του APS (APR) .....   | 27 |
| 1.2.6. Αναγωγή των θειωδών (SiR).....  | 29 |
| 1.3. Ομοίωση του σιδήρου (Fe) .....  | 31 |
| 1.3.1. Στρατηγική I.....   | 31 |
| 1.3.2. Στρατηγική II .....   | 32 |
| 1.3.3. Διακίνηση του Fe εντός του φυτού.....   | 33 |
| 1.4. Αλληλεπίδραση μεταβολισμών Fe – S.....  | 33 |
| 1.5. Μυκορριζική συμβίωση .....  | 35 |
| 1.5.1. Μεταφορά άνθρακα από το φυτό στο μυκορριζικό μύκητα .....                       | 36 |
| 1.5.2. Επίδραση των AMF στην πρόσληψη φωσφόρου (P) .....                               | 37 |
| 1.5.3. Επίδραση των AMF στην πρόσληψη αζώτου (N) .....                                 | 38 |
| 1.5.4. Επίδραση των AMF στην πρόσληψη θείου (S).....                                   | 38 |
| 1.6. Σκοπός της μελέτης.....   | 40 |
| 2. Πειραματικό Μέρος .....   | 42 |
| 2.1. Ανάπτυξη των φυτών .....  | 42 |

|      |   |     |
|------|---|-----|
| 2.2. | Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων – Παραλαβή ολικού RNA – Κατασκευή cDNA.....   | 44  |
| 2.3. | Κατασκευή εξειδικευμένων εκκινητών για τα γονίδια <i>ZmAPRL1</i> , <i>ZmAPRL2</i> και <i>ZmSiR</i> .....  | 44  |
| 2.4. | Κανονικοποίηση των δειγμάτων .....  | 46  |
| 2.5. | qPCR για τα υπό μελέτη γονίδια <i>ZmAPRL1</i> , <i>ZmARPL2</i> και <i>ZmSiR</i> στα δείγματα cDNA φύλλων και ριζών .....  | 47  |
| 2.6. | Επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....  | 48  |
| 2.7. | Στατιστική ανάλυση .....  | 50  |
| 3.   | Αποτελέσματα.....   | 52  |
| 3.1. | <i>In silico</i> ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα APS reductase (APS) και sulfite reductase (SiR) στο φυτό <i>Zea mays</i> .....   | 52  |
| 3.2. | Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων <i>ZmAPRL1</i> , <i>ZmAPRL2</i> και <i>ZmSiR</i> στα φύλλα μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών υπό συνθήκες παρατεταμένης έλλειψης θείου και μετά την παροχή θείου.....  | 56  |
| 3.3. | Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων <i>ZmAPRL1</i> , <i>ZmAPRL2</i> και <i>ZmSiR</i> στις ρίζες μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών υπό συνθήκες παρατεταμένης έλλειψης θείου και μετά την παροχή θείου..... | 63  |
| 4.   | Συζήτηση.....   | 71  |
| 5.   | Συμπεράσματα .....  | 83  |
| 6.   | Βιβλιογραφία .....  | 86  |
| 7.   | Παράρτημα.....  | 94  |
| 7.1. | Παράρτημα 1 .....   | 94  |
| 7.2. | Παράρτημα 2 .....   | 100 |
| 7.3. | Παράρτημα 3 .....   | 102 |
| 7.4. | Παράρτημα 4 .....   | 105 |

## Περίληψη

Τα φυτά προσλαμβάνουν το θείο (S) από το έδαφος με την μορφή των θεικών, τα οποία μέσω της αφομοιωτικού μονοπατιού του S χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό σημαντικών οργανικών θειούχων ενώσεων. Το ένζυμο **αναγωγή του αδενόσινο 5'-φωσφοθειικό (APR)** καταλύει την αναγωγή του APS σε θειώδη και θεωρείται ένα ένζυμο κλειδί για την ρύθμιση της αφομοίωσης του S, διότι ελέγχει την κατανομή του S μεταξύ του πρωτογενή και του δευτερογενή μεταβολισμού, καθώς επίσης συντονίζει το μεταβολισμό του S με το μεταβολισμό του N και του C. Επιπλέον, είναι γνωστό πως η έκφραση του APR ελέγχεται αυστηρά ανάλογα με τις ανάγκες των φυτών σε οργανικό S. Επόμενο ένζυμο του μονοπατιού είναι η **αναγωγή των θειωδών (SiR)**, το οποίο καταλύει την αναγωγή των θειωδών σε ανιόν του θείου. Για το λόγο αυτό θεωρείται ως ένα «bottleneck» της αφομοίωσης του S, ενώ παράλληλα θεωρείται ότι προστατεύει τα κύτταρα από την τοξικότητα των θειωδών. Σε αυτή τη μελέτη μυκορριζικά και μη-μυκορριζικά φυτά (μαρτυράς) αναπτύχθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα υπό συνθήκες έλλειψης S, ενώ ο σίδηρος χορηγήθηκε με την μορφή αδιάλυτου σιδήρου ( $\text{FePO}_4$ ). Μετά την πάροδο 60 ημερών χορηγήθηκε S στα φυτά με την μορφή των θεικών. Η βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση της NCBI και MGDB έδειξε πως στο καλαμπόκι υπάρχουν 2 ισομορφές του ενζύμου APR, ενώ ένα μόνο αντίγραφο για το SiR. Έτσι, μελετήθηκαν τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων *ZmAPRL1*, *ZmAPRL2* και *ZmSiR* στις πλάγιες ρίζες και στα νεαρά φύλλα των μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών πριν και μετά την χορήγηση S. Υπό συνθήκες έλλειψης S και οι 2 ισομορφές του ενζύμου APR ήταν στατιστικά σημαντικά υπερεκφρασμένες στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών, υποδηλώνοντας τις υψηλότερες ανάγκες των φυτών για οργανικό S, πιθανά για να διατηρήσουν υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης. Η προσθήκη θεικών οδήγησε σε μείωση της έκφρασης και των 2 γονιδίων στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση του *ZmSiR* στα φύλλα των 2 μεταχειρίσεων πριν και μετά την χορήγηση S. Ακόμη, είναι φανερό πως η μακροχρόνια έλλειψη S οδήγησε σε επαγωγή της αφομοίωσης του S στις ρίζες των φυτών. Ωστόσο, την ημέρα 60 η σχετική έκφραση των *ZmAPRL1* και *ZmAPRL2* ήταν μεγαλύτερη στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών



σε σχέση με τα μη μυκορριζικά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως οι ρίζες των μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών είχαν την αντίθετη απόκριση στην χορήγηση θεικών. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση S είχε σαν αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική επαγωγή της έκφρασης του *ZmAPRL1* την ημέρα 62 στα φυτά του μάρτυρα, ενώ αντίθετα η έκφραση του ίδιου γονιδίου μειώθηκε στις μυκορριζικές ρίζες. Η παρατήρηση αυτή ίσως οφείλεται στην διαφορετική ικανότητα των φυτών να προσλάβουν τη αδιάλυτη μορφή του Fe, λόγω της πιθανής ύπαρξης ενός συμβιωτικού μονοπατιού πρόσληψης του Fe. Τέλος, είναι φανερό πως η ομοίωση του Fe επηρεάζει την πρόσληψη και αφομοίωση του S και το αντίστροφο.

**Λέξεις κλειδιά:** καλαμπόκι, αραβόσιτος, μεταβολισμός του θείου, θειικά, αναγωγή του APS (APR), αναγωγή των θειωδών (SiR), μυκορριζικά φυτά, *Rhizophagus irregularis*

## Abstract

Plants are mainly taking up sulfate from the soil solution, in order to synthesize essential organic sulfur compounds via the sulfate assimilation pathway. **Adenosine 5'-phosphosulphate reductase (APR)** catalyses the reduction of APS to sulfite and it is considered to be a key regulatory point in the plastidic sulfate assimilation and reduction because it plays a crucial role in sulfur partitioning between the primary and secondary metabolism and coordinates S, N, and C assimilation. In addition, it is known that the expression of APR is highly regulated according to a demand driven manner. Following this reaction, **sulfite reductase (SiR)** catalyses the reduction of sulfite to sulfide. Thus, it is considered as a bottleneck of the sulfate assimilation and its protecting role against sulfite toxicity has been recently discussed. In this study, non-mycorrhizal and mycorrhizal maize plants were grown in pots with sterile river sand, in a long term experiment. Iron was provided in the sparingly soluble form of  $\text{FePO}_4$ . After a 60 days period of sulfur deficiency, sulfur was provided to the plants in the form of sulfate. The bioinformatics analysis using NCBI and MGDB revealed that there are two different APR isoforms in *Zea mays*, while SiR is a single copy gene. So, the expression profiles of *ZmAPRL1*, *ZmAPRL2* and *ZmSiR* in the lateral roots and in the two young expanding leaves were monitored in both mycorrhizal and non-mycorrhizal plants, before and after the S supply. Both *ZmAPRL1* and *ZmAPRL2* were significantly over-expressed in the leaves of mycorrhizal plants before S supply, indicating that mycorrhizal plants were in higher need for reduced S, maybe in order to sustain higher growth rates. The supply of sulfate resulted in a significant down-regulation of both genes' expression in the leaves of mycorrhizal plants. According to our results, there was no significant difference in the expression of *ZmSiR* between the two treatments prior and post sulfate supply. Moreover, it is clear that long term sulfate deprivation resulted in an induction of sulfur assimilation in the roots. However, on day 60 in the mycorrhizal roots the respective expression ratios were significantly higher than in the non-mycorrhizal plants. Interestingly, mycorrhizal and non-mycorrhizal plant showed an opposite response to sulfate supply. More specifically, the sulfur supply resulted in a significant up-regulation of *ZmAPRL1* in the roots of non-mycorrhizal plant on day 62 whilst in the mycorrhizal roots the

expression of this gene declined. This fact may be due to the different capability of the plant to acquire the soluble form of Fe because of a possible symbiotic Fe uptake pathway. In overall, our data sustain that Fe homeostasis regulates S uptake and assimilation and vice versa.

**Keywords:** maize plants, sulfur metabolism, sulfate, APS reductase (APR), sulfite reductase (SiR), mycorrhizal plants, *Rhizophagus irregularis*

## Εισαγωγή

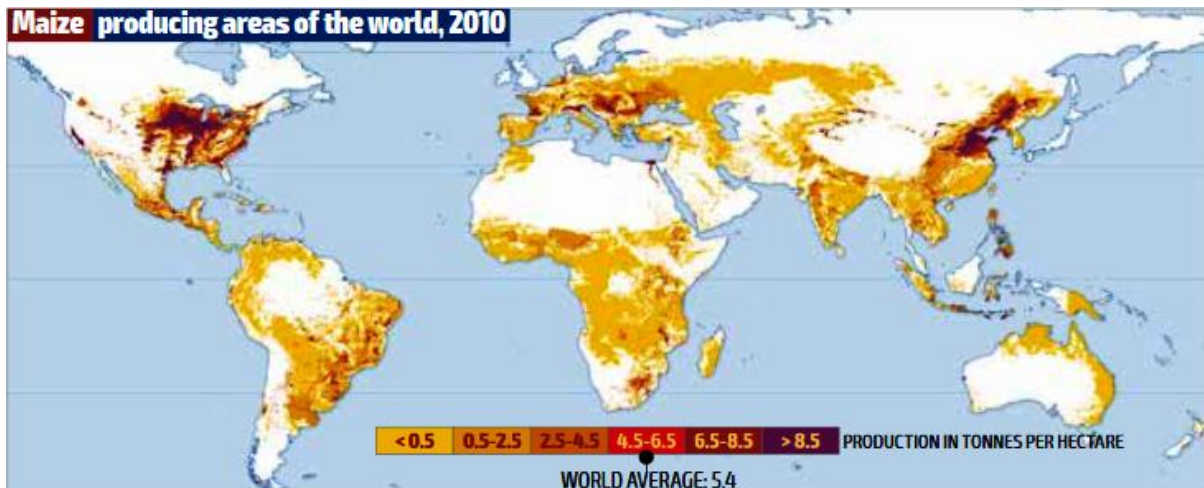
---

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Καλαμπόκι

### 1.1.1. Γενική περιγραφή

Το καλαμπόκι ή αραβόσιτος (*Zea mays*) είναι φυτό που ανήκει στην οικογένεια Poaceae (Αγρωστώδη) και αποτελεί το μοναδικό είδος του γένους *Zea*. Κατάγεται από την αμερικανική ήπειρο, πιθανά από τη περιοχή του Μεξικό και η εμφάνιση του χρονολογείται περίπου 4.8 εκατομμύρια χρόνια πριν. Είναι φυτό μεγάλης καλλιέργειας και αποτελεί σε παγκόσμιο επίπεδο τη τρίτη πιο σημαντική καλλιέργεια μετά το σιτάρι και το ρύζι. Η καλλιέργεια του αποσκοπεί στη παραγωγή σπόρου, που κυρίως χρησιμοποιείται για τη κάλυψη των διατροφικών αναγκών του ανθρώπου. Ένα μεγάλο μέρος της παγκόσμιας παράγωγης, ωστόσο χρησιμοποιείται σαν ζωοτροφή αλλά και ως πρώτη ύλη για τις βιομηχανίες για την παραγωγή προϊόντων όπως το άμυλο αραβοσίτου, καλαμποκέλαιο κ.α. Τέλος, τα τελευταία χρόνια σε κάποιες χώρες καλλιεργείται και για την παραγωγή βιοκαυσίμων.



**Εικόνα 1.1:** Περιοχές καλλιέργειας καλαμποκιού (*Zea mays*) σε παγκόσμια επίπεδο. Οι διαφορετικές χρωματικές αποχρώσεις αντιστοιχούν σε διαφορετικές αποδόσεις (t/ha) ανά περιοχή (FAO/IIASA).

Γενικά, το καλαμπόκι μπορεί να καλλιεργηθεί σε ένα πολύ μεγάλο εύρος κλιματικών συνθηκών και η βιωσιμότητα της καλλιέργειας του σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες το καθιστούν ξεχωριστό ανάμεσα στα άλλα σιτηρά. Ενδεικτικά, η περιοχή καλλιέργειας του εκτείνεται από 58 °N έως 40 °S και σε περιοχές από το επίπεδο της

θάλασσας μέχρι και 3.000 m υψόμετρο. Παρόλα αυτά, οι κύριες περιοχές παραγωγής καλαμποκιού, όπου παρατηρούνται και οι υψηλότερες αποδόσεις, βρίσκονται στην εύκρατη ζώνη (Εικόνα 1.1). Οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή παγκοσμίως είναι οι Η.Π.Α, η Κίνα, η Βραζιλία και το Μεξικό. Σχεδόν το 70% της παγκόσμιας παραγωγής παράγεται σε αυτά τα κράτη, ενώ στην Ευρώπη αντιστοιχεί περίπου το 11.4%. Η μέση στρεμματική απόδοση παγκοσμίως είναι περίπου 5.4 ton/ha (FAO/IIASA). Στην Ελλάδα κατά μέσω όρο καλλιεργούνται περίπου 2 εκ. στρ. ετησίως, ενώ η στρεμματική απόδοση που παρατηρείται στην χώρα μας είναι από τις υψηλότερες παγκοσμίως και φτάνει περίπου τους 10 ton/ha (FAOSTAT 2014).

### **1.1.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά καλαμποκιού**

#### **Ριζικό Σύστημα**

Το ριζικό σύστημα του καλαμποκιού, όπως και των υπολοίπων σιτηρών, είναι θυσσανώδες και αποτελείται από 3 διαφορετικούς τύπους ριζών: τις εμβρυακές, τις μόνιμες και τις εναέριες (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2008).

Οι **εμβρυακές ρίζες** διακρίνονται στην πρωτογενή εμβρυακή ρίζα και στις δευτερογενείς, ο αριθμός των οποίων συνήθως κυμαίνεται από 3 έως 5. Οι καταβολές των εμβρυακών ριζών υπάρχουν στο έμβρυο και επομένως αυτές αναπτύσσονται από το σπόρο μετά το φύτευμα. Ο ρόλος του εμβρυακού ριζικού συστήματος είναι να παρέχει στο νεαρό αναπτυσσόμενο φυτό νερό και θρεπτικά συστατικά, βοηθώντας την καλύτερη εγκατάσταση του. Το εμβρυακό ριζικό σύστημα μπορεί να παραμείνει σε λειτουργία καθ' όλη την διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού ή να καταστραφεί μετά από ένα χρονικό διάστημα από την έκπτυξη του.

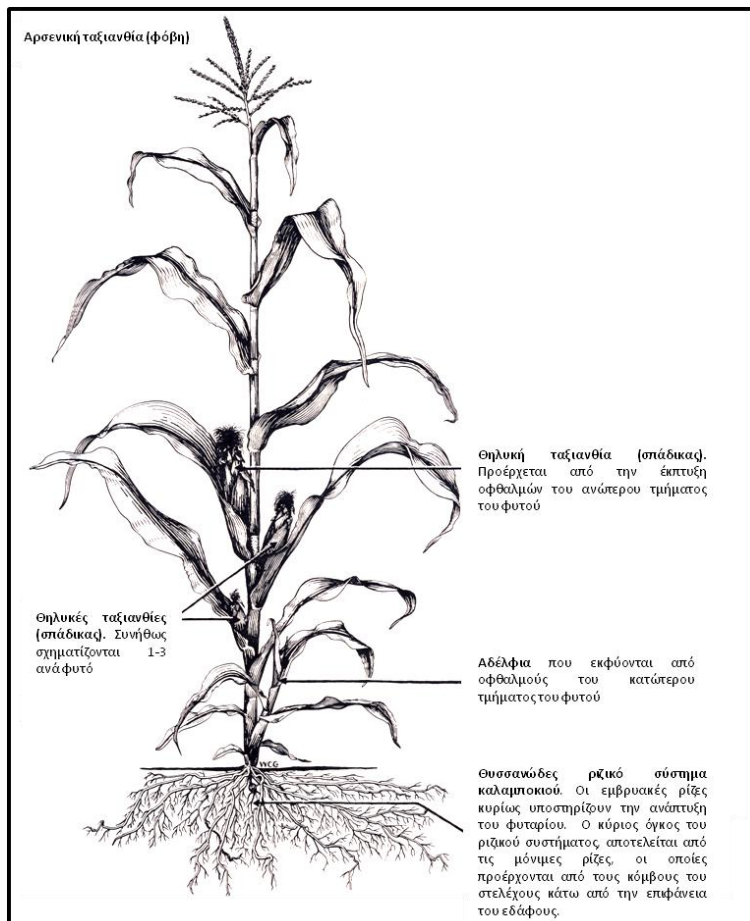
Το **μόνιμο ριζικό σύστημα** προέρχεται από τους πρώτους κόμβους του στελέχους που βρίσκονται κάτω από την επιφάνεια του εδάφους και αποτελούν το κύριο όγκο του ριζικού συστήματος στο καλαμπόκι. Μετά την έκπτυξη τους, οι μόνιμες ρίζες έχουν τη τάση να επεκτείνονται οριζόντια μέχρι 30-60 cm από το κύριο στέλεχος, στη συνέχεια κάμπτονται και εισχωρούν κατακόρυφα στο έδαφος, επιτυγχάνοντας έτσι την αξιοποίηση μεγαλύτερου όγκου εδάφους. Το μόνιμο ριζικό σύστημα είναι αυτό που συμβάλει περισσότερο στην

απορρόφηση νερού και θρεπτικών και ο κύριος όγκος του βρίσκεται στα πρώτα 30-50 cm του εδάφους.

Οι **εναέριες ρίζες** εκφύονται, όπως και οι μόνιμες, από τους κόμβους που υπάρχουν στο βλαστό, αλλά σε αυτή τη περίπτωση από τους κόμβους που βρίσκονται πάνω από την επιφάνεια του εδάφους. Ο συγκεκριμένος τύπος ριζών μπορεί να εισχωρήσει στο έδαφος και να αποκτήσει τη φυσιολογική λειτουργία των ριζών. Ωστόσο, ο κύριος ρόλος τους φαίνεται να είναι στηρικτικός, βοηθώντας τη στήριξη των φυτών σε όρθια θέση.

### **Βλαστός**

Ο βλαστός ή καλάμι στο καλαμπόκι έχει συνήθως 8-21 μεσογονάτια ανάλογα με τη ποικιλία. Το μήκος του βλαστού κυμαίνεται από 0.6 έως 5 m και η διάμετρος από 1.3 έως 5 cm. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθορίζονται από το γονότυπο. Τα μεσογονάτια είναι



**Εικόνα 1.2:** Τυπικό φυτό καλαμποκιού (*Zea mays*). Σημειωμένα είναι τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του (Strable and Scanlon, 2009)

μικρότερα στα κατώτερα τμήματα του φυτού ενώ μεγαλύτερα σε μήκος στο ανώτερο τμήμα αυτού. Σε κάθε κόμβο του κύριου στελέχους υπάρχει ένας οφθαλμός, ενώ εξαίρεση αποτελεί ο υψηλότερος κόμβος. Οι κατώτεροι κόμβοι φέρουν επίσης και τις καταβολές των εναέριων ριζών. Από τους οφθαλμούς που βρίσκονται στο κατώτερο μέρος του φυτού μπορούν να εκπτυχθούν τα αδέλφια. Σε αντίθεση με άλλα σιτηρά, όπως στο σιτάρι, το κριθάρι κ.α, στην περίπτωση του καλαμποκιού το αδελφωμα

είναι ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό, καθώς θεωρείται ότι τα αδέρφια αναπτύσσονται σε βάρους του κύριου βλαστού. Από την άλλη, οι οφθαλμοί που βρίσκονται στο μέσο και ανώτερο τμήμα του βλαστού έχουν εξέχουσα σημασία, καθότι όταν εκπτυχθούν παράγουν βλαστούς στους οποίους στην συνέχεια θα σχηματιστούν οι σπάδικες, με άλλα λόγια οι θηλυκές ταξιανθίες (Εικόνα 1.2).

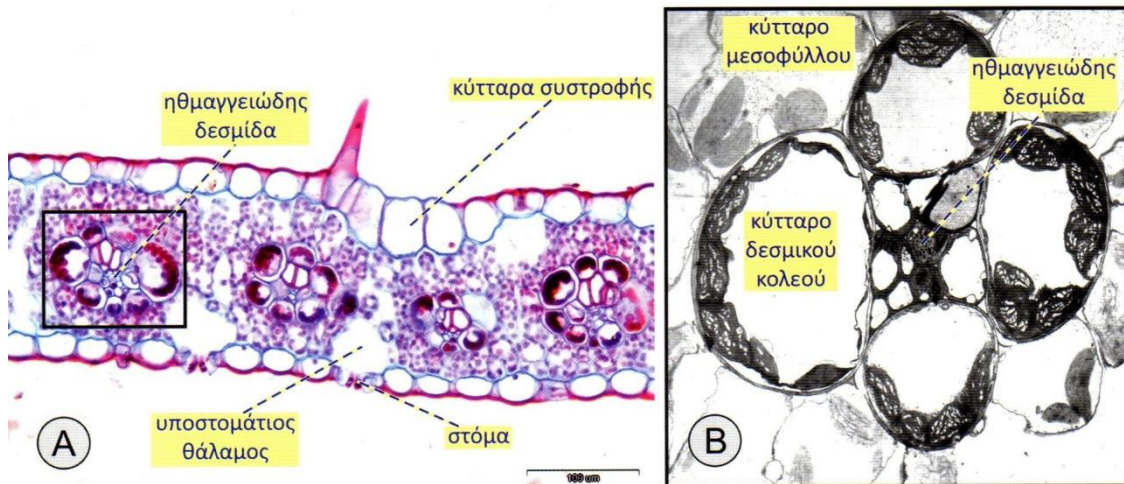
### **Φύλλα**

Τα φύλλα του καλαμποκιού αναπτύσσονται ανά ένα σε κάθε κόμβο. Κάθε ανεπτυγμένο φύλλο αποτελείται από το έλασμα και το κολεό. Ο κολεός κάθε φύλλου περιβάλλει το μεσογονάτιο διάστημα, προσδίδοντας έτσι επιπλέον αντοχή σε αυτό. Σε ορισμένους γονοτύπους σχηματίζεται χαρακτηριστική γλωσσίδα, στο σημείο ένωσης του ελάσματος με το κολεό. Η παρουσία ή απουσία της γλωσσίδας επιδρά στη κλίση του φύλλου σε σχέση με τον κύριο βλαστό. Το μήκος του ελάσματος κυμαίνεται από 30 έως 150 cm και το πλάτος από 4 έως 15 cm. Ο αριθμός των φύλλων είναι ένα χαρακτηριστικό που εξαρτάται αφενός από το γονότυπο και αφετέρου τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου κάθε ποικιλίας. Γενικά, ο αριθμός κυμαίνεται από 8 έως 48 φύλλα ανά φυτό. Οι νευρώσεις των φύλλων είναι παράλληλες όπως σε όλα τα αγρωστώδη (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2008).

Ανατομικά το έλασμα του φύλλου αποτελείται από την άνω, την κάτω επιδερμίδα και το μεσόφυλλο. Το καλαμπόκι ανήκει στην ομάδα των  $C_4$  φυτών και για αυτό το λόγο παρουσιάζει μια εξειδικευμένη ανατομία των φύλλων (ανατομία τύπου Kranz), η οποία είναι στενά συνδεδεμένη με τη σημαντική βιοχημική διαφοροποίηση του από τα  $C_3$  φυτά. Στην λειτουργική ομάδα των  $C_4$ , τα κύτταρα του δεσμικού κολεού (bundle sheath cells) εκτός από το στηρικτικό και προστατευτικό τους ρόλο γύρω από τις ηθμαγιώδεις δεσμίδες, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην λειτουργία του ιδιόμορφου μεταβολισμού των φυτών αυτών. Πιο συγκεκριμένα, τα φύλλα του καλαμποκιού περιλαμβάνουν 2 τύπους φωτοσυνθετικών κυττάρων διευθετημένα σε δύο ομόκεντρους κύκλους γύρω από τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικόνα 1.3A). Ο εξωτερικός κύκλος αποτελείται από τα κύτταρα του μεσοφύλλου, ενώ ο εσωτερικός κύκλος περιλαμβάνει τα κύτταρα του κολεού της δέσμης, τα οποία είναι ευμεγέθη, διαθέτουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα και μεγάλο αριθμό χλωροπλαστών (Εικόνα 1.3B). Το  $CO_2$  δεσμεύεται αρχικά από τα κύτταρα του μεσοφύλλου (καρβοξυλίωση του PEP) και στην συνέχεια επαναδεσμεύεται στα κύτταρα



του δεσμικού κολεού, με τη μορφή οξέων με 4 άτομα άνθρακα, όπου και τελικά παράγονται οι υδατάνθρακες (Αιβαλάκις 2014). Με αυτό το τρόπο, εξασφαλίζεται η διαμερισματοποίηση των βασικών ενζύμων που είναι απαραίτητα για την λειτουργία του κύκλου στα δύο διαφορετικά είδη κυττάρων. Με άλλα λόγια, η PEP καρβοξυλάση δραστηριοποιείται μόνο στο μεσόφυλλο και η Rubisco μόνο στον κολεό, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η δράση της τελευταίας ως οξυγενάσης.



**Εικόνα 1.3:** Ανατομική διάπλαση φύλλων του φυτού *Zea mays*, (A) με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου, (B) ανατομία τύπου Kranz με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (Αιβαλάκις 2014)

### Άνθη και Ταξιανθίες

Το καλαμπόκι είναι το μόνο αγρωστώδες φυτό που είναι μόνικο και δίκλινο, δηλαδή τα θηλυκά και τα αρσενικά άνθη σχηματίζουν χωριστές ταξιανθίες στο ίδιο φυτό. Η αρσενική ταξιανθία ονομάζεται φόβη και σχηματίζεται στην κορυφή του φυτού, ο κεντρικός άξονας της οποίας αποτελεί προέκταση του άκρου του βλαστού. Από την άλλη, η θηλυκή ταξιανθία είναι στάχυς, σχηματίζεται στο άκρο μικρών πλευρικών διακλαδώσεων του κεντρικού στελέχους και ονομάζεται σπάδικας. Ο αριθμός των θηλυκών ταξιανθιών ανά φυτό ποικίλει ανάλογα με το τύπο του καλαμποκιού και φυσικά το γονότυπο. Ο αριθμός τους κυμαίνεται από 1-3 σπάδικες ανά φυτό. Τα περισσότερα υβρίδια που καλλιεργούνται έχουν μόνο ένα μεγάλο σπάδικα που αναπτύσσεται στο μέσο του στελέχους (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2008).

## **Καρπός και σπόρος**

Ο σπόρος του καλαμποκιού είναι καρυόψη, το σχήμα του οποίου ποικίλει ανάλογα με το τύπο του υβριδίου. Υπάρχουν 7 διαφορετικοί τύποι ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των σπόρων, οι διαφορές των οποίων καθορίζουν και τις χρήσεις τους (pop-corn, ζωοτροφή κ.α)

Κάθε σπόρος διακρίνεται σε τρία κύρια μέρη: το περικάρπιο, το ενδοσπέρμιο και το έμβρυο. Το περικάρπιο είναι το εξωτερικό μέρος του σπόρου και ο ρόλος του είναι προστατευτικός. Το ενδοσπέρμιο αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του σπόρου, περίπου το 80% του βάρους, και αποτελείται από άμυλο και πρωτεΐνες. Ο ρόλος του είναι πολύ σημαντικός καθότι τροφοδοτεί την ανάπτυξη του φυταρίου, μέχρι να αρχίσει η δραστηριότητα της ρίζας και η φωτοσύνθεση στα φύλλα. Το έμβρυο από την άλλη, φέρει τις καταβολές των πρώτων οργάνων, από τις οποίες θα εκπτυχθούν το υπόγειο και το υπέργειο τμήμα του φυτού, με άλλα λόγια αποτελεί μικρογραφία του φυτού (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2008)

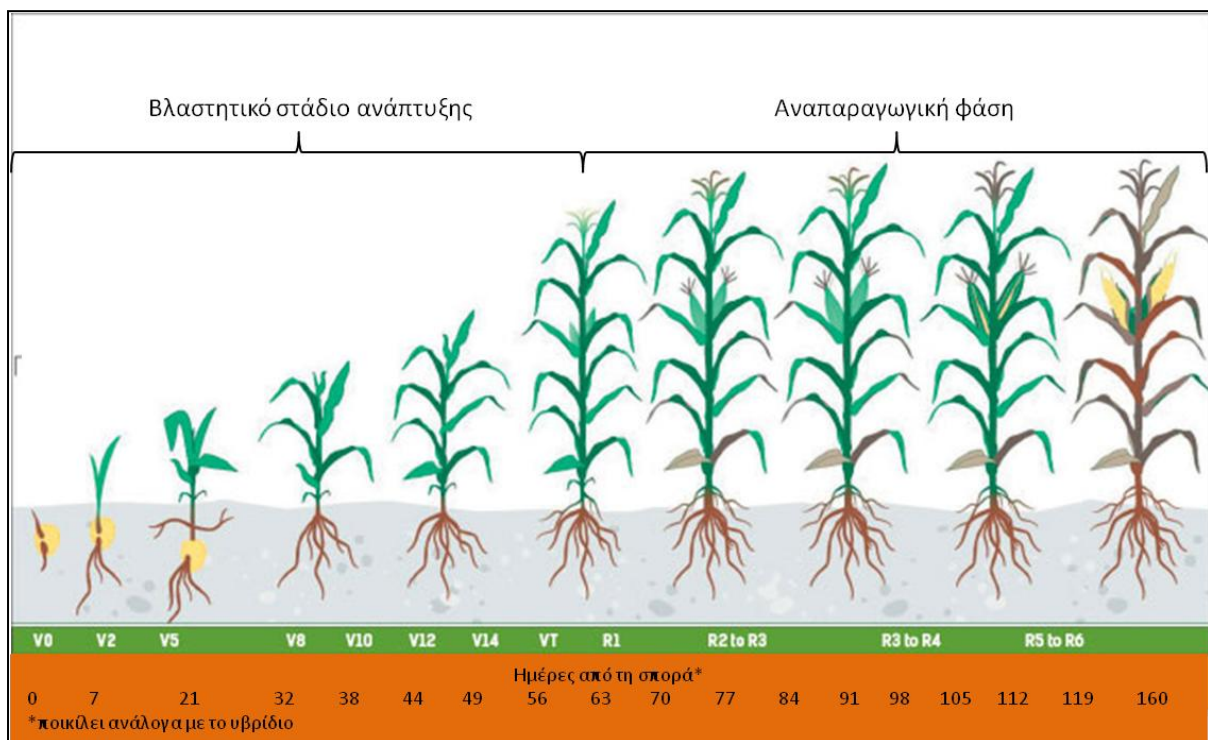
Από πλευράς σύστασης, ο σπόρος του αραβοσίτου περιέχει κατά μέσο όρο 61% άμυλο, 13,5% νερό, 10% πρωτεΐνη, 6% πεντοζάνες, 4% λάδι, 2,3% κυτταρίνες, 1,4% σάκχαρα, 1,4% ανόργανες ύλες και 0,4% διάφορες άλλες ουσίες. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αραβόσιτος θεωρείται το δεύτερο πλουσιότερο δημητριακό σε λάδι μετά τη βρώμη (Καραμάνος, 1999).

### **1.1.3. Στάδια ανάπτυξης**

Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου του καλαμποκιού ποικίλει ανάλογα με το υβρίδιο αλλά και τις συνθήκες ανάπτυξης και κυμαίνεται από 110-150 ημέρες. Ο καλαμπόκι είναι φυτό καθορισμένης ανάπτυξης με διακριτά στάδια βλαστικής και αναπαραγωγικής ανάπτυξης.

Περιληπτικά, το πρώτο στάδιο ανάπτυξης περιλαμβάνει τη βλάστηση του σπόρου, το φύτευμα και την εμφάνιση του νεαρού φυταρίου. Μετά την ενυδάτωση του σπόρου, πρώτα επιμηκύνεται το ριζίδιο και η κολεόριζα, που το περιβάλλει, τα οποία εμφανίζονται 2-3 ημέρες μετά την σπορά, ενώ 1-2 μέρες αργότερα πραγματοποιείται η έκπτυξη του πτεριδίου. Στην συνέχεια, το ριζίδιο επιμηκύνεται και άλλο και σταδιακά εμφανίζονται οι υπόλοιπες εμβρυακές ρίζες. Η έξοδος (ανάδυση) του φυταρίου πάνω από την επιφάνεια

του εδάφους γίνεται με επιμήκυνση του κολεόπτρου και του πρώτου μεσογονατίου διαστήματος. Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ σποράς και φυτρώματος εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την υγρασία και την επάρκεια οξυγόνου στο έδαφος. Σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης το νεαρό φυτάριο εξέρχεται από την επιφάνεια του εδάφους 6-10 ημέρες μετά τη σπορά. Ο αραβόσιτος βλαστάνει σε θερμοκρασίες πάνω από 10 °C, ενώ σε θερμοκρασίες 10-15 °C ο χρόνος φυτρώματος επιμηκύνεται και μπορεί να φθάσει τις 14 ημέρες. Ικανοποιητικό και ομοιόμορφο φύτερωμα επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες 16-20 °C (Καραμάνος, 1999).



**Εικόνα 1.4:** Βασικά στάδια ανάπτυξης αραβοσίτου (*Zea mays*) και τυπική εικόνα του φυτού από την σπορά μέχρι τη συγκομιδή (πηγή Pannar).

Κατά την βλασθητική ανάπτυξη παρατηρούνται ταχύτατη αύξηση του ριζικού συστήματος, επιμήκυνση των μεσογονατίων του στελέχους και την γρήγορη εμφάνιση των φύλλων (Εικόνα 1.4). Το τελικό ύψος του φυτού καθορίζεται τόσο από τον αριθμό των μεσογονατίων αλλά και από το μήκος αυτών. Κατά την άνθηση του αραβοσίτου πρώτα εμφανίζεται η φόβη στην κορυφή του φυτού, που προηγείται 7-10 ημέρες από την εμφάνιση των στύλων των θηλυκών ανθέων του σπάδικα. Η γύρη ωριμάζει σταδιακά, είναι άφθονη και μεταφέρεται με τον άνεμο σε μεγάλες αποστάσεις. Κατά τη διάρκεια της άνθησης των θηλυκών ανθέων του σπάδικα, επιμηκύνονται οι στύλοι και εμφανίζονται ως

νήματα έξω από τα βράκτεια φύλλα του σπάδικα (στάδιο μεταξώματος). Μετά τη γονιμοποίηση ο κόκκος αναπτύσσεται σχηματίζοντας αρχικά ένα γαλακτώδες υγρό πλούσιο σε ζάχαρα που σε διάστημα 15 ημερών μετατρέπεται σε άμυλο. Στη συνέχεια παρατηρείται αφυδάτωση του κόκκου και σκλήρυνσή του. Ένδειξη φυσιολογικής ωρίμανσης στον αραβόσιτο αποτελεί η εμφάνιση μιας ζώνης μαύρου χρωματισμού στον ποδίσκο του κόκκου. Στη χώρα μας, η συγκομιδή του αραβοσίτου πραγματοποιείται σε υγρασία κόκκων περίπου 15% (Καραμάνος, 1999).

## 1.2. Ομοιόσταση του θείου (S)

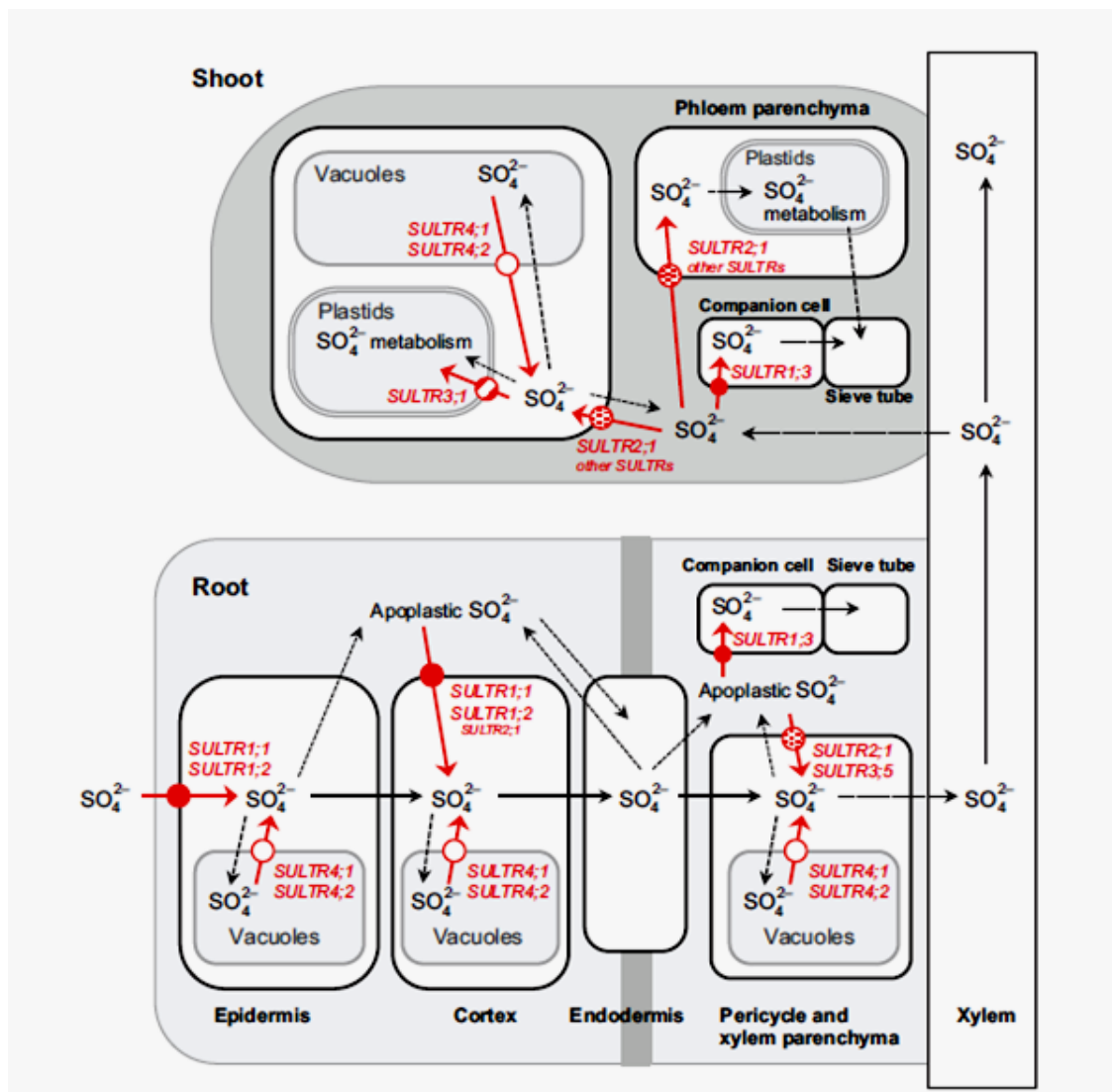
Το θείο (S) είναι ένα μακροστοιχείο απαραίτητο για την αύξηση και την ανάπτυξη των ανώτερων φυτών. Είναι βασικό συστατικό ενώσεων που παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές μεταβολικές και αναπτυξιακές διεργασίες των φυτών. Αποτελεί βασικό συστατικό της κυστεΐνης (Cys) και της μεθειονίνης (Met), δυο αμινοξέων πολύ σημαντικών για την λειτουργία διαφόρων ενζύμων. Επίσης, είναι συστατικό ενώσεων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Πιο χαρακτηριστική περίπτωση είναι αυτή του τριπεπτιδίου γλουταθειόνη (GSH) που μετέχει στην άμυνα του φυτού έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης. Τέλος, ένα μεγάλος αριθμός φυτοχελαιτινών, γλυκοσινολυτών και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών περιέχουν S (Bohrer and Takahashi, 2016)

Γενικά, το S προσλαμβάνεται από τα φυτά κυρίως με την μορφή των θειικών ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Τόσο η πρόσληψη όσο και μεταφορά του S μέσα στο φυτό, γίνεται μέσω ειδικών μεταφορέων των θειικών (sulfate transporters, SULTRs). Εντός των κυττάρων τα  $\text{SO}_4^{2-}$  είτε αποθηκεύονται στα χυμοτόπια είτε μεταφέρονται στα πλαστίδια, όπου λαμβάνει χώρα η αφομοίωση του S, χρησιμοποιώντας ενέργεια που προέρχεται από την φωτοσύνθεση. Τα  $\text{SO}_4^{2-}$  μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για τη σύνθεση θειούχων αμινοξέων (πρωτογενής μεταβολισμός) είτε για την παραγωγή θειούχων δευτερογενών μεταβολιτών (δευτερογενής μεταβολισμός). Λόγω, της σημαντικότητας των θειούχων ενώσεων για την ανάπτυξη των φυτών, τα φυτά διαθέτουν διάφορους μηχανισμούς ρύθμισης τόσο της πρόσληψης όσο και την αφομοίωσης ανάλογα με τα επίπεδα θείου και τις ανάγκες σε ανηγμένο S (Bohrer and Takahashi, 2016).

### 1.2.1. Πρόσληψη και διακίνηση των $\text{SO}_4^{2-}$ εντός του φυτού

Η πρόσληψη και η διακίνηση του S εντός των φυτών γίνεται μέσω διαφόρων SULTRs (Εικόνα 1.5). Οι μεταφορείς αυτοί λειτουργούν σαν συµμεταφορείς  $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}^+$ . Ο αριθμός τους ποικίλει ανάλογα με το φυτικό είδος από 12 έως 16, ενώ στο *Arabidopsis thaliana* είναι γνωστό ότι υπάρχουν συνολικά 14 SULTRs. Οι μεταφορείς αυτοί ανάλογα με τη λειτουργία τους και τη θέση τους (κυτταρική και υποκυτταρική) χωρίζονται σε 4 ομάδες. Στην 1<sup>η</sup> ομάδα ανήκουν οι μεταφορείς υψηλής συγγένειας (high affinity SULTR). Οι μεταφορείς SULTR1;1 και SULTR1;2 είναι υπεύθυνοι για τη πρόσληψη των  $\text{SO}_4^{2-}$  από τη

ριζόσφαιρα. Εκφράζονται στα ριζικά τριχίδια, στα επιδερμικά κύτταρα και στα κύτταρα του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας. Τόσο τα επίπεδα mRNA όσο και των πρωτεϊνών των μεταφορέων αυτών αυξάνονται σε απόκριση στην έλλειψη  $\text{SO}_4^{2-}$ , αποδεικνύοντας έτσι πως η έκφραση του ελέγχεται αυστηρά ανάλογα με τις ανάγκες του φυτού σε S. Εντονότερη απόκριση στην έλλειψη S παρουσιάζει ο μεταφορέας  $\text{SULTR1;1}$ , τα μεταγραφήματα του οποίου αυξάνονται σε συνθήκες  $-S$ , ενώ ο  $\text{SULTR1;2}$  είναι αυτός που συνεισφέρει περισσότερο στην πρόσληψη  $\text{SO}_4^{2-}$  υπό κανονικές συνθήκες (Bohrer and Takahashi, 2016).



**Εικόνα 1.5:** Σχηματική απεικόνιση της πρόσληψης και της διακίνησης  $\text{SO}_4^{2-}$  εντός του φυτού. Τα κόκκινα βέλη αντιστοιχούν στην ύπαρξη γνωστών SULTRs που μετέχουν στην εισροή  $\text{SO}_4^{2-}$  στο κυτταρόπλασμα ή στα χυμοτόπια, ενώ οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν σε πιθανά/άγνωστα μονοπάτια που θα μπορούσαν να λειτουργούν (Bohrer and Takahashi, 2016).

Μόλις τα  $\text{SO}_4^{2-}$  μεταφερθούν εντός των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας, τότε μεταφέρονται συμπλαστικά (διακυτταρικά) μέχρι τον κεντρικό κύλινδρο μέσω των πλασμοδεσμών, ξεπερνώντας έτσι το εμπόδιο της λωρίδας Casparian στην ενδοδερμίδα. Ακόμη, ένα μέρος των  $\text{SO}_4^{2-}$  μπορεί να μεταφερθεί στον αποπλασμικό χώρο των κυττάρων του φλοιώδους παρεγχύματος μέσω παθητικής μεταφοράς. Τα  $\text{SO}_4^{2-}$  αυτά επανεισάγονται στα κύτταρα με τη δράση των μεταφορέων SULTR1;1 και SULTR1;2 που εδράζονται στα κύτταρα του φλοιώδους παρεγχύματος. Στη συνέχεια, ο μεταφορέας SULTR2;1, που ανήκει στην ομάδα 2 των SULTRs και εδράζεται στα παρεγχυματικά κύτταρα του αγγειακού συστήματος, ελέγχει την μεταφορά  $\text{SO}_4^{2-}$  από την ρίζα στο υπέργειο μέρος μέσω του ξύλου (Takahashi *et al.*, 2000). Εκτός από το SULTR2;1, στα παρεγχυματικά κύτταρα του ξύλου εδράζεται και ο μεταφορέας SULTR3;5, ο οποίος φαίνεται να συμμετέχει στην αύξηση της συγκέντρωσης  $\text{SO}_4^{2-}$  στο συγκεκριμένο τύπο κυττάρων. Ωστόσο, ο μεταφορέας αυτός απαιτεί την παρουσία του SULTR2;1 για να είναι λειτουργικός, ειδάλλως είναι ανενεργός. Μέσω του ξύλου τα  $\text{SO}_4^{2-}$  μεταφέρονται στο υπέργειο μέρος. Η μεταφορά των  $\text{SO}_4^{2-}$  εντός των κυττάρων των φύλλων επιτυγχάνεται είτε μέσω του μεταφορέα SULTR2;1 είτε άλλων μεταφορέων που δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί. Από την άλλη, ο SULTR1;3 είναι ένας μεταφορέας που εδράζεται στα συνοδά κύτταρα του ηθμού και φαίνεται να ρυθμίζει την μεταφορά θείου από τα φύλλα στη ρίζα μέσω του ηθμού.

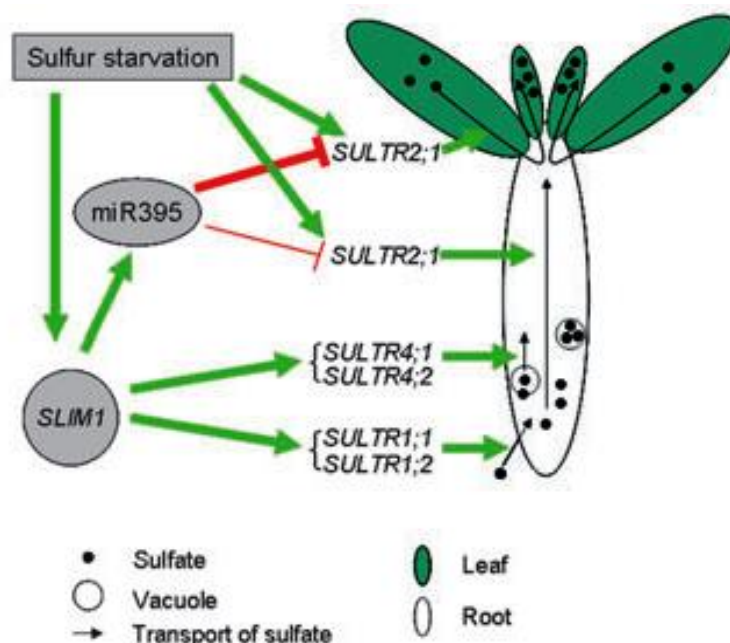
Εντός των κυττάρων τα  $\text{SO}_4^{2-}$  μπορούν είτε να αποθηκευτούν στα χυμοτόπια είτε να μεταφερθούν στους χλωροπλάστες, όπου λαμβάνει χώρα η αφομοίωση του S. Η είσοδος των  $\text{SO}_4^{2-}$  στα χυμοτόπια πιθανά δεν απαιτεί την μεσολάβηση ειδικού μεταφορέα. Αντίθετα, η έξοδος τους από αυτά επιτυγχάνεται μέσω ειδικών μεταφορέων της ομάδας 4, όπως έχει αποδειχθεί στο *Arabidopsis thaliana*. Η έκφραση των SULTR4;1 και SULTR4;2 είναι αυξημένη σε συνθήκες έλλειψης  $\text{SO}_4^{2-}$ , με αποτέλεσμα την επανακινητοποίηση των  $\text{SO}_4^{2-}$ , που ήταν αποθηκευμένα στα χυμοτόπια ανάλογα με τις ανάγκες του φυτού σε S.

### **1.2.2. Ρύθμιση της πρόσληψη και διακίνησης των $\text{SO}_4^{2-}$ εντός του φυτού**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, λόγω της μεγάλης σημασίας του S για τις λειτουργίες των φυτών, τόσο η πρόσληψη όσο και η διακίνηση των  $\text{SO}_4^{2-}$  εντός του φυτού ελέγχεται σε πολλά επίπεδα ανάλογα κυρίως με την διαθεσιμότητα των  $\text{SO}_4^{2-}$  και τις ανάγκες σε οργανικό S. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει πως η ρύθμιση της έκφρασης των SULTR1;1

και SULTR1;2 είναι σημαντική για τον εγκλιματισμό των φυτών σε συνθήκες έλλειψης S. Πιο συγκεκριμένα, στη ρύθμιση αυτή φαίνεται να εμπλέκεται ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο SULFUR LIMITATION1 (SLIM1), ο οποίος ελέγχει τόσο τη πρόσληψη των  $SO_4^{2-}$  αλλά και την αφομοίωση τους (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006). Ο SLIM1 επάγει την έκφραση των μεταφορέων *SULTR1;1* και *SULTR1;2* υπό συνθήκες έλλειψης S, καθώς επίσης φαίνεται να καταστέλλει τη βιοσύνθεση θειούχων δευτερογενών μεταβολιτών, παίζοντας ένα ρυθμιστικό ρόλο μεταξύ πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό του S. Ωστόσο, ένα άλλο ρυθμιστικό στοιχείο, που έχει βρεθεί στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *SULTR1;1*, φαίνεται να απαιτείται για την ρύθμιση της έκφρασης του ανάλογα με τα επίπεδα S. Το ρυθμιστικό στοιχείο αυτό δεν υπάρχει στο γονίδιο *SULTR1;2*. Ίσως σε αυτό οφείλεται η μεγαλύτερη απόκριση του *SULTR1;1* σε συνθήκες έλλειψης S, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Εκτός από τη ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο οι *SULTR1;1* και *SULTR1;2* υπόκεινται και σε μετα-μεταφραστικό έλεγχο, σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει με την χρήση μεταλλαγμάτων. Στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση φαίνεται πως τα μοτίβα STAS (sulfate transporter and antisigma factor antagonism) στο C τελικό άκρο των πρωτεϊνών παίζουν σημαντικό ρόλο.

Εκτός όμως από την ρύθμιση της πρόσληψης, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η ρύθμιση της



**Εικόνα 1.6:** Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης της έκφρασης των *SULTR* ανάλογα με τις συνθήκες διαθεσιμότητας S. Τα πράσινα βέλη αντιστοιχούν σε επαγωγή της έκφρασης των αντιστοιχών γονιδίων, ενώ τα κόκκινα σε καταστολή της έκφρασης. (Liang *et al.*, 2010).

διακίνησης των  $SO_4^{2-}$  εντός του φυτού. Στην περίπτωση του *SULTR2;1* είναι γνωστά μέχρι σήμερα 2 ρυθμιστικά στοιχεία, τα οποία έχουν αντίθετη επίδραση στην ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης του. Πιο συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες *Sure21A* και *Sure21B*, που έχουν εντοπιστεί στην 3' αμετάφραστη περιοχή, είναι απαραίτητες για την επαγωγή της έκφρασης του σε συνθήκες -S, ενώ υπό τις ίδιες



συνθήκες έχει παρατηρηθεί συσσώρευση του miR395, το οποίο είναι υπεύθυνο για την μετα-μεταγραφική αποσιώπηση του *SULTR2;1* (Kawashima *et al.*, 2011). Η επαγωγή της έκφρασης του MIR395 ελέγχεται και αυτή από τον SLM1 (Kawashima *et al.*, 2011). Φαίνεται λοιπόν, ότι ο μηχανισμός ρύθμισης του *SULTR2;1* είναι ιστοειδικός. Με άλλα λόγια, στα παρεγχυματικά κύτταρα του ξύλου στις ρίζες υπό συνθήκες -S επάγεται η έκφραση του μεταφορέα *SULTR2;1* με αποτέλεσμα να αυξάνεται η μεταφορά  $SO_4^{2-}$  από τις ρίζες στα φύλλα. Από την άλλη, το miR395 συσσωρεύεται κυρίως στα συνοδά κύτταρα του ηθμού στα φύλλα εμποδίζοντας την μετακίνηση των  $SO_4^{2-}$  μέσω του ηθμού (Liang *et al.*, 2010)

Τέλος, υπό συνθήκες -S έχει αποδειχθεί πως ο SLIM1 επάγει εκτός των παραπάνω την έκφραση των μεταφορέων *SULTR4;1/4;2* με αποτέλεσμα την επανακινητοποίηση των  $SO_4^{2-}$  από το χυμοτόπιο. Η επαγωγή της έκφρασης τους εντοπίζεται στα παρεγχυματικά κύτταρα του ξύλου και στα κύτταρα του περικυκλίου, συνεισφέροντας έτσι στην αύξηση των επιπέδων  $SO_4^{2-}$  που φορτώνονται στο ξύλο και μεταφέρονται προς το υπέργειο μέρος.

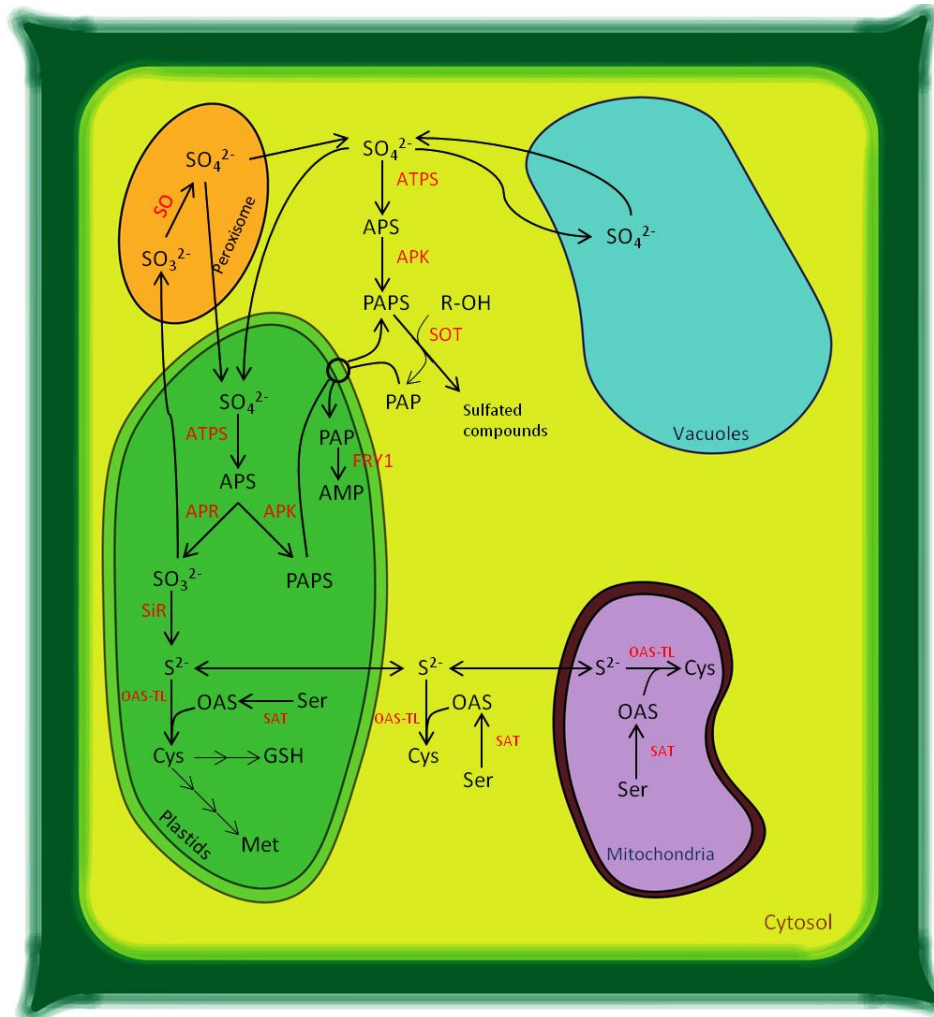
### 1.2.3. Αφομοίωση του θείου (S)

Η αφομοίωση του S λαμβάνει χώρα κυρίως στους χλωροπλάστες (πλαστίδια) αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Το ένζυμο **σουλφουρυλάση του ATP (ATPS)** είναι το πρώτο ένζυμο του μονοπατιού, το οποίο καταλύει την παραγωγή αδενόσινο 5'-φωσφοροθειϊκό (APS), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα  $SO_4^{2-}$  και ATP. Το ένζυμο ATPS εδράζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα πλαστίδια. Στο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν συνολικά 4 γονίδια που κωδικοποιούν το ένζυμο αυτό. Οι ισομορφές του ενζύμου που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *ATPS1*, *ATPS3* και *ATPS4* εδράζονται αποκλειστικά στα πλαστίδια. Μόνο το γονίδιο *ATPS2* μπορεί να παράξει 2 διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου, καθότι περιέχει 2 διαφορετικά κωδικόνια έναρξης της μεταγραφής. Εάν η μεταγραφή ξεκινήσει από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης, τότε η πρωτεΐνη που προκύπτει μεταφέρεται στα πλαστίδια, αντίθετα εάν η μετάφραση ξεκινήσει από το 2<sup>ο</sup> κωδικόνιο η πρωτεΐνη κατευθύνεται στο κυτταρόπλασμα, καθόσον δεν διαθέτει το κατάλληλο πεπτιδίο οδηγό για την μεταφορά της στο χλωροπλάστη (Bohrer *et al.*, 2015).

Στην συνέχεια, το APS είτε κατευθύνεται προς τον πρωτογενή μεταβολισμό του S και χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα από την **αναγωγή του APS (APR)** είτε χρησιμοποιείται

ως υπόστρωμα από την **κινάση του APS (APK)** με σκοπό για την παρασκευή θειούχων δευτερογενών μεταβολιτών (δευτερογενής μεταβολισμός). Η αναγωγή του APS (APR) είναι ένα ενζυμο που εδράζεται μόνο στο χλωροπλαστη των φυτών και χρησιμοποιεί το APS ως υπόστρωμα παράγοντας θειώδες ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). Στην συνέχεια το  $\text{SO}_3^{2-}$  μέσω **αναγωγής του θειώδους (SiR)** ανάγεται σε ανιόν του θείου ( $\text{S}^{2-}$ ). Αυτό ενσωματώνεται στο σκελετό της Ο-ακετυλό-σερίνης από την **θειολολύση της Ο-ακετυλό-σερίνης (OAS-TL)** και παράγεται κυστεΐνη (Cys). Η σύνθεση της Cys λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια αλλά και στους χλωροπλάστες. Η Ο-ακετυλό-σερίνη σχηματίζεται από το ενζυμο **ακετυλοτρανσφεράση της σερίνης (SAT)**.

Εναλλακτικά, μέσω της κινάσης του APS (APK) παράγεται αδενόσινο 3'-φωσφορο 5'-φωσφοροθειϊκό (PAPS). Το ενζυμο APK εδράζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο χλωροπλάστη. Στο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν 4 γονίδια που κωδικοποιούν το συγκεκριμένο ενζυμο. Τα γονίδια *APK1*, *APK2* και *APK4* κωδικοποιούν τις ισομορφές του ενζύμου που εδράζονται στα πλαστίδια, ενώ το *APK3* κωδικοποιεί την κυτταροπλασματική ισομορφή του ενζύμου. Στην συνέχεια, το PAPS που παράγεται στα πλαστίδια εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του μεταφορέα PAPST1. Η παραγωγή δευτερογενών θειούχων μεταβολιτών λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα μέσω της **σουλφοτρανσφεράσης (SOT)**. Ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν την SOT είναι μεγάλος ανάλογα το φυτικό είδος και ανάλογα με τους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται σε κάθε φυτό. Ενδεικτικά, στο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν 17 διαφορετικά γονίδια. Από την αντίδραση που καταλύεται από την SOT επίσης παράγεται σαν παραπροϊόν της αντίδρασης αδενόσινο 3'-φωσφορο 5'-φωσφορικό (PAP). Αυτό εισέρχεται στο χλωροπλάστη μέσω ενός πιθανού μεταφορέα και εκεί χρησιμοποιείται για την παραγωγή AMP.



**Εικόνα 1.7:** Βασικά στάδια του αφομοιωτικού μονοπατιού του S. Με κόκκινα γράμματα είναι σημειωμένα τα διάφορα ενζύμα που μετέχουν στην αφομοίωση του S. Συντομογραφίες: **APS**:adenosine 5'-phosphosulfate, **PAPS**:3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, **OAS**:O-acetylserine, **Cys**:cysteine, **Met**:methionine, **GSH**:glutathione, **Ser**:serine, **PAP**:3'-phosphoadenosine 5'-phosphate, **ATPS**:ATP sulfurylase, **APR**:APS reductase, **APK**:APS kinase, **SiR**:sulfite reductase, **SO**:sulfite oxidase, **OAS-TL**:OAS thiollyase, **SAT**:serine acetyltransferase, **SOT**:sulfotransferase.

#### 1.2.4. Ρύθμιση της αφομοίωσης του θείου (S)

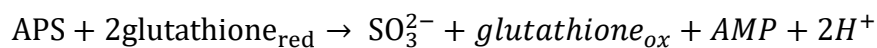
Γενικά, η αφομοίωση του S ρυθμίζεται ανάλογα με τις ανάγκες του φυτού σε ανηγμένο θείο. Ο έλεγχος της ρύθμισης λαμβάνει χώρα κυρίως στα πρώτα στάδια του μονοπατιού αφομοίωσης των  $SO_4^{2-}$ , με άλλα λόγια στο στάδιο σύνθεσης του APS και στο στάδιο αναγωγής του APS από τα ένζυμα ATPS και APR, αντίστοιχα. Η ρύθμιση των συγκεκριμένων ενζύμων γίνεται κυρίως σε μεταγραφικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, υπό συνθήκες έλλειψης S τα γονίδια των ενζύμων ATPS και APR υπερεκφράζονται με στόχο τη καλύτερη διαχείριση του διαθέσιμου S, όπως έχει αποδειχθεί στο καλαμπόκι (Hopkins *et al.*, 2004).

Από την άλλη, στο *Arabidopsis thaliana* μεγαλύτερη επαγωγή της έκφρασης παρουσίασε μόνο το ένζυμο APR, αποδεικνύοντας πως ίσως υπάρχει διαφορά στη ρύθμιση μεταξύ των διαφορετικών ειδών (Vauclare *et al.*, 2002). Επιπλέον, σημαντικά ένζυμα του μεταβολισμού φαίνεται να είναι τα ένζυμα SiR και SAT, καθώς προβλήματα στη ρύθμιση της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων έχει σαν αποτέλεσμα την εκδήλωση σημαντικών προβλημάτων στην ανάπτυξη των φυτών.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ρύθμιση των περισσότερων γονιδίων του μεταβολισμού του S γίνεται κυρίως σε μεταγραφικό επίπεδο, με μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων να μετέχουν στην ρύθμιση αυτή. Ο πιο διαδεδομένος από αυτούς είναι ο μεταγραφικός παράγοντας SULFUR LIMITATION 1 (SLIM1), ο οποίος μετέχει στην ρύθμιση της έκφρασης πολλών γονιδίων της αφομοίωσης αλλά και της πρόσληψης των  $SO_4^{2-}$ . Τέλος, σε κάποια στάδια του μεταβολισμού έχει βρεθεί πως υπάρχουν και διάφοροι μετα-μεταφραστικοί μηχανισμοί ρύθμισης. Η πιο χαρακτηριστική περίπτωση είναι η ρύθμιση των ενζύμων SAT και OAS-TL που μετέχουν στη σύνθεση της Cys (Bohrer and Takahashi, 2016).

#### 1.2.5. Αναγωγή του APS (APR)

Το ένζυμο APR καταλύει την αντίδραση αναγωγής του APS σε  $SO_3^{2-}$ , μια αντίδραση μεταφοράς  $2e^-$ . Ως δότης ηλεκτρονίων για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται η γλουταθειόνη (Martin *et al.*, 2005).



Σε όλα τα φυτά που έχει χαρακτηριστεί το συγκεκριμένο ένζυμο, έχει εντοπιστεί αποκλειστικά στους χλωροπλάστες (πλαστίδια) όπου λαμβάνει χώρα και το συγκεκριμένο στάδιο του μεταβολισμού του S (Sutter *et al.*, 2000). Όπως και η αφομοίωση άλλων θρεπτικών, έτσι και η αφομοίωση του S απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας τα οποία προέρχονται κατά κύριο λόγο από το ATP και δοτές ηλεκτρονίων που προέρχονται από την φωτοσύνθεση (Martin *et al.*, 2005). Πιο συγκεκριμένα το ένζυμο αυτό ανήκει στην οικογένεια των ισομερασών του διθειώδους και περιέχει ένα μοτίβο θειορεδοξίνης (TRX domain) στο C-τελικό άκρο, το οποίο είναι σημαντικό για την αλληλεπίδραση με την γλουταθειόνη (Houston *et al.*, 2005). Το καταλυτικό ενεργό κέντρο βρίσκεται στο N-τελικό άκρο στο οποίο συνδέεται ένα  $[Fe_4-S_4]$  cluster (Kopriva *et al.*, 2001). Και τα 2

χαρακτηριστικά μοτίβα της APR είναι συντηρημένα μεταξύ των φυτικών ειδών και δεν είναι ικανά να καταλύσουν την αντίδραση αναγωγής του APS ανεξάρτητα το ένα από το άλλο.

Το ένζυμο APR θεωρείται ως το ένζυμο κλειδί για τη ρύθμιση του μεταβολισμού του S ανάλογα με την διαθεσιμότητα S και τις απαιτήσεις του φυτού σε οργανικό S. Στο *Arabidopsis thaliana* και οι 3 ισομορφές του ενζύμου υπερεκφράζονται σε συνθήκες έλλειψης  $SO_4^{2-}$ , ενώ η έκφραση τους μειώνεται όταν επαναχορηγείται S. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με την ιδέα πως σε συνθήκες  $-S$  δίνεται προτεραιότητα στην βιοσύνθεση ανηγμένων μορφών S. Στο *Arabidopsis thaliana*, με εφαρμογή της τεχνικής της ανάλυσης του ελέγχου των ροών (flux control analysis), έχει αποδειχθεί πως το APR ελέγχει το 90% της αναγωγής των  $SO_4^{2-}$ . Στο ίδιο φυτό η μείωση των επιπέδων έκφρασης του APR έχει σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση  $SO_4^{2-}$  στα κύτταρα. Από την άλλη, σε διαγονιδιακά φυτά *A.thaliana* και *Z.mays* η υπερέκφραση του γονιδίου APR οδήγησε σε αύξηση των ενώσεων που περιέχουν ανηγμένο θείο (Tsakraklides *et al.*, 2002).

Πιο συγκεκριμένα, η απόκριση του ενζύμου APR στην έλλειψη S είναι παρόμοια με αυτή των SULTR1;1 και SULTR1;2, που είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη των  $SO_4^{2-}$  από την ριζόσφαιρα. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός ρύθμισης είναι ακόμη υπο διερεύνηση. Ο ρυθμιστικός παράγοντας SLIM1, που είναι βασικός ρυθμιστικός παράγοντας για διάφορα γονίδια της πρόσληψης και της αφομοίωσης του S, δεν φαίνεται να εμπλέκεται στην ρύθμιση του APR (Naruyama-Nakashita *et al.*, 2006). Εκτός από τα επίπεδα S, τα μεταγραφήματα της APR αυξάνονται μετά την προσθήκη άνθρακα, αζώτου και επηρεάζονται από τα επίπεδα φωτισμού, αποδεικνύοντας έτσι πως αποτελεί βασικό ένζυμο το οποίο σχετίζεται με την γενική κατάσταση του φυτού και την μεταβολική ισορροπία (Lee *et al.*, 2011).

Επιπλέον, το ένζυμο APR βρίσκεται στο σημείο όπου τα διαθέσιμα  $SO_4^{2-}$  είτε θα χρησιμοποιηθούν από τον πρωτογενή μεταβολισμό είτε από το δευτερογενή, καθότι το APS αποτελεί υπόστρωμα και για το ένζυμο APK (Kopriva *et al.*, 2012). Τα μεταγραφήματα των APR και APK ρυθμίζονται ανάλογα με τα επίπεδα του διαθέσιμου S κατά αντίθετο τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του APR επάγεται υπό συνθήκες έλλειψης S, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ενώ ταυτόχρονα το γονίδιο APK υποεκφράζεται (Vauclare *et al.*, 2002, Naruyama-Nakashita *et al.*, 2006). Αντίθετα, σε συνθήκες επάρκειας S η έκφραση της

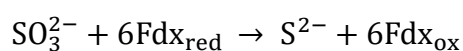
APR μειώνεται και αυξάνεται αυτή της APK. Σύμφωνα με την παραπάνω παρατήρηση είναι φανερό πως υπό  $-S$  δίνεται προτεραιότητα στον πρωτογενή μεταβολισμό του θείου με σκοπό την κάλυψη των βασικών αναγκών του φυτού σε οργανικό S και περιορίζεται η σύνθεση δευτερογενών θειούχων μεταβολιτών.

### 1.2.6. Αναγωγή των θειωδών (SiR)

Το ένζυμο αναγωγή του θειώδους καταλύει την αναγωγή των θειωδών ( $SO_3^{2-}$ ) και παράγεται ανιόν του θείου ( $S^{2-}$ ). Στην συνέχεια, το  $S^{2-}$  χρησιμοποιείται για το σχηματισμό της κυστεΐνης, το πρώτο προϊόν του πρωτογενή μεταβολισμού του S. Όπως είναι φανερό, το ένζυμο αυτό είναι πολύ σημαντικό καθότι αποτελεί ένα “bottleneck” στο αφομοιωτικό μονοπάτι του S και παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των φυτών έναντι της τοξικότητας του  $SO_3^{2-}$  (Khan *et al.*, 2010). Εδράζεται αποκλειστικά στους χλωροπλάστες των φυτών και η έκφραση του φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στα φύλλα απ’ ότι στην ρίζα φυτών *Arabidopsis* (Bork *et al.*, 1998). Γενικά η εκφράση του είναι σταθερή και δεν εξαρτάται τόσο από τις διαθέσιμες ποσότητες S, ωστόσο έχει παρατηρηθεί πως η μακροχρόνια έλλειψη S οδηγεί στην αύξηση του αριθμού των μεταγραφημάτων του γονιδίου *SiR* (Bork *et al.*, 1998).

Στο *Arabidopsis thaliana* το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο SiR υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο, επομένως υπάρχει μόνο μια ισομορφή του ενζύμου. Το ίδιο συμβαίνει και στο σπανάκι και σε άλλα είδη. Η αλληλουχία των γονιδίων *SiR* μεταξύ των φυτών είναι αρκετά συντηρημένη και η ομολογία τους φτάνει περίπου το 77%-82% (Nakayama *et al.*, 2000).

Η αντίδραση αναγωγής των  $SO_3^{2-}$  είναι μια αντίδραση μεταφοράς  $6e^-$  και παρόμοια με την περίπτωση του ενζύμου APR τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται προέρχονται από το φωτοσύστημα I (PSI) μέσω της φερρεδοξίνης (Fd), όπως παρουσιάζεται στη παρακάτω αντίδραση. Το ένζυμο SiR περιέχει ένα  $[Fe_4-S_4]$  σύμπλεγμα και μια σιροαίμη κοντά στο ενεργό κέντρο, σημαντικά για την λειτουργία του ενζύμου.



Η παραπάνω περίπτωση αναφέρεται στα φωτοσυνθετικά κύτταρα, ωστόσο η αφομοίωση του S λαμβάνει χώρα και σε μη φωτοσυνθετικά κύτταρα όπως κύτταρα της ρίζας. Στην

περίπτωση αυτή φαίνεται ότι τα απαραίτητα  $e^-$  προέρχονται από το NADPH μέσω της δράσης της αναγωγάσης Fd-NADP (FNR) (Nakayama *et al.*, 2000).

Εκτός των άλλων, το ένζυμο SiR παρουσιάζει μικρή ομολογία με το ένζυμο αναγωγάση των νιτρωδών (NiR), ένζυμο του αφομοιωτικού μονοπατιού του N, καθώς και οι 2 πρωτεΐνες καταλύουν μια αντίδραση μεταφοράς  $6e^-$ . Για το λόγο αυτό η SiR έχει την ικανότητα να ανάγει τα  $NO_2^{2-}$  αλλά με πολύ μικρότερη  $K_m$  απ' ό τι με τα  $SO_3^{2-}$ .

Ακόμη, είναι γνωστό πως το χλωροπλαστικό DNA (cpDNA) πακετάρεται σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες, σχηματίζοντας cp-nucleoids. Στα φυτά υπάρχουν διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες μετέχουν στον σχηματισμό των συμπλόκων αυτών, μια εκ των οποίων φαίνεται να είναι και η πρωτεΐνη SiR. Ωστόσο, πρόσφατα αποδείχθηκε πως κάτι αντίστοιχο δεν συμβαίνει στο *Zea mays* και στο *Arabidopsis thaliana*. Μετά από αναλύσεις της πολυπεπτιδικής αλυσίδας φάνηκε ότι η διαφορά έγκειται στην έλλειψη ενός πεπτιδίου στο C-τελικό άκρο. Αυτή η πεπτιδική ακολουθία δίνει στη πρωτεΐνη τη δυνατότητα πρόσδεσης της με το cpDNA. Το φαινόμενο αυτό δεν συμβαίνει γενικά στα αγρωστώδη και στα φυτά της οικογενείας Brassicaceae (Kobayashi *et al.*, 2016).

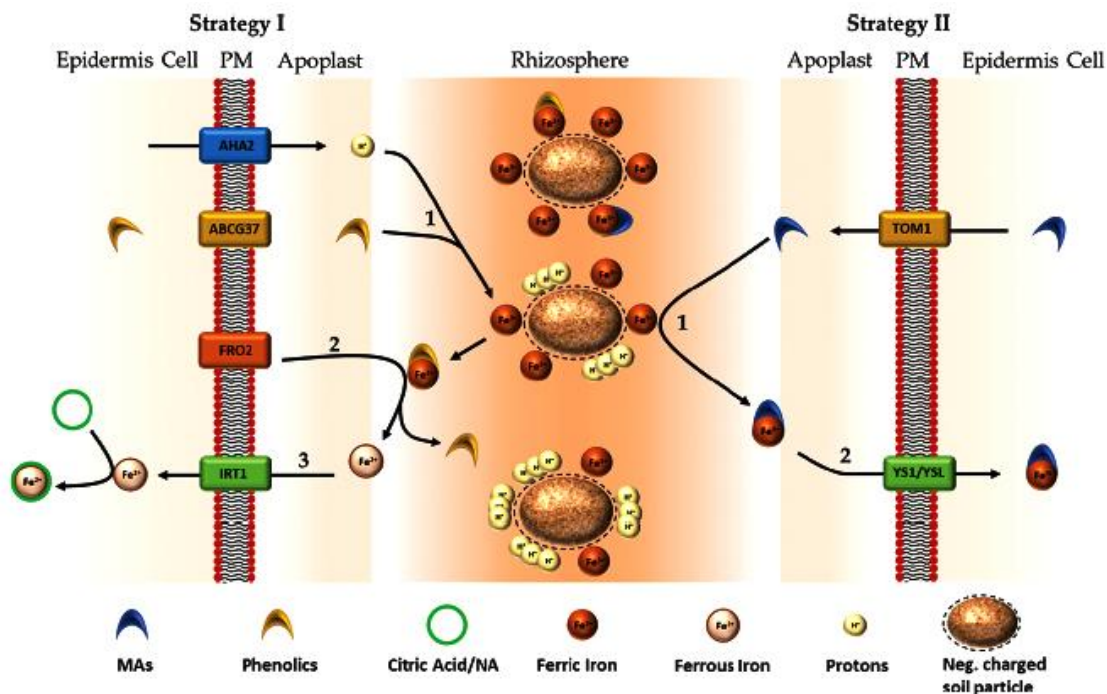
### 1.3. Ομοίωση του σιδήρου (Fe)

Ο σίδηρος (Fe) αποτελεί ένα από τα 5 πιο διαδεδομένα μεταλλικά στοιχεία στη φύση, ωστόσο η βιοδιαθεσιμότητα του είναι περιορισμένη. Για το λόγο αυτό, τα φυτά έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς με σκοπό την κινητοποίηση του. Οι βασικές μορφές Fe που απαντώνται στην φύση είναι ο  $Fe^{3+}$  και ο  $Fe^{2+}$ . Σε όξινα περιβάλλοντα ο Fe δρα ως δότης ηλεκτρονίων ενώ σε βασικά ως δέκτης. Στο έδαφος το μεγαλύτερο ποσοστό του Fe απαντάται με την μορφή  $Fe^{3+}$ , ο οποίος έχει την ιδιότητα να προσκολλάται στα εδαφικά κolloειδή, καθιστώντας έτσι δύσκολη την απορρόφηση του από τα φυτά. Τα φυτά έχουν αναπτύξει 2 διαφορετικές στρατηγικές για την απορρόφηση του από τη ριζόσφαιρα. Η στρατηγική I αφορά την αναγωγή του  $Fe^{3+}$  σε  $Fe^{2+}$  και την απευθείας απορρόφηση του ανηγμένου Fe ενώ, η στρατηγική II περιλαμβάνει την έκκριση συμπλεκτικών μορίων που συμπλοκοποιούν τον Fe και στη συνέχεια το τελικό σύμπλοκο απορροφάται από τη ρίζα (Εικόνα 1.8 από Naranjo-Acros και Bauer, 2016).

#### 1.3.1. Στρατηγική I

Η στρατηγική I χρησιμοποιείται από όλα τα ανώτερα φυτά μη συμπεριλαμβανομένων των αγρωστωδών. Μεταξύ αυτών είναι και το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* στο οποίο έχει μελετηθεί αρκετά η παραπάνω στρατηγική. Βασικό στάδιο της στρατηγικής I είναι η οξίνιση της ριζόσφαιρας μέσω της έκκρισης  $H^+$  μέσω ATPασών που υπάρχουν στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας. Ακόμη, για να βελτιωθεί η κινητοποίηση του Fe τα φυτά εκκρίνουν και κάποια συμπλεκτικά μόρια, που στη περίπτωση της στρατηγικής I είναι κυρίως φαινολικές ενώσεις. Η αναγωγή του  $Fe^{3+}$  πραγματοποιείται στην επιφάνεια της ρίζας μέσω του ενζύμου αναγωγής του  $Fe^{3+}$ . Στη συνέχεια η απορρόφηση του  $Fe^{2+}$  από τα κύτταρα της ρίζας γίνεται από ειδικούς μεταφορείς που ονομάζονται IRT1 (Εικόνα 1.8)





**Εικόνα 1.8:** Σχηματική απεικόνιση των στρατηγικών I και II για την απορρόφηση του σιδήρου (Fe) από τα φυτά. Αριστερά παρουσιάζεται η στρατηγική I, ενώ δεξιά η στρατηγική II που χρησιμοποιείται από τα αγρωστώδη (Naranjo-Acros and Bauer, 2016).

### 1.3.2. Στρατηγική II

Η στρατηγική II για την απορρόφηση του Fe χρησιμοποιείται μόνο από τα αγρωστώδη, με άλλα λόγια από τα φυτά της οικογένειας Poaceae. Μεταξύ αυτών είναι καλλιεργούμενα φυτά όπως το κριθάρι (*Hordeum vulgare*), το σιτάρι (*Triticum spp.*) και το καλαμπόκι (*Zea mays*). Η στρατηγική βασίζεται στην έκκριση συμπλεκτικών μορίων στη ριζόσφαιρα που ονομάζονται φυτοσιδηροφόρα (PS). Η έκκριση πραγματοποιείται μέσω του μεταφορέα TOM1 που εδράζεται στις ρίζες των φυτών (Nozoye *et al.*, 2011). Τα PS είναι συμπλεκτικά μόρια υψηλής συγγένειας που μπορούν να σχηματίζουν σύμπλοκα με το Fe<sup>3+</sup> και να τον διαλυτοποιούν. Τα πιο διαδεδομένα είναι αυτά της οικογένειας των μαγινεικών οξέων (MA). Πρόδρομο μόριο για την σύνθεση των MA είναι η αδενόσυλο-μεθειονίνη (SAM). Η **συνθάση της νικοτιαναμίνης (NAS)** είναι το κομβικό ένζυμο του μονοπατιού που καταλύει την ένωση 3 μορίων SAM για τον σχηματισμό της νικοτιαναμίνης (NA). Στη συνέχεια μέσω της δράσης των ενζύμων αμινοτρανσφεράση της νικοτιαναμίνης (NAAT) και συνθάση του δεοξυμαγινεικού οξέος (DMAS) συντίθεται το MA. Το τελευταίο εκκρίνεται στη

ριζόσφαιρα και στη συνέχεια το σύμπλοκο  $Fe^{3+}/NA$  που σχηματίζεται, απορροφάται από τη ρίζα μέσω του μεταφορέα YELLOW STRIPE 1 (YS1) (Kobayashi *et al.*, 2006).

### **1.3.3. Διακίνηση του Fe εντός του φυτού.**

Μόλις ο Fe εισέλθει στα κύτταρα της ρίζας μεταφέρεται συμπλαστικά μέχρι τα κύτταρα του περικυκλίου. Η πρωτεΐνη IRON-REGULATED PROTEIN 1 (IREG1) είναι υπεύθυνη για την φόρτωση του Fe στα αγγεία του ξύλου. Το κιτρικό φορτώνεται και αυτό στα αγγεία του ξύλου μέσω της πρωτεΐνης FERRIC DEFECTIVE 3 (FRD3) και παίζει το ρόλο συμπλεκτικού μορίου, το οποίο μετέχει στην διακίνηση του Fe στα αγγεία του ξύλου. Από την άλλη, για την μετακίνηση του Fe μέσω του ηθμού η NA είναι αυτή που λειτουργεί ως συμπλεκτικό μόριο. Εντός των κυττάρων, ο Fe είτε αποθηκεύεται στο χυμοτόπιο είτε κατευθύνεται προς αλλά διαμερίσματα ανάλογα με τις ανάγκες. Στα κύτταρα του φύλλου η μεγαλύτερη ποσότητα Fe χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό της χλωροφύλλης και από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, επομένως ένα μεγάλο μέρος εισέρχεται στους χλωροπλάστες. Ο σίδηρος αποθηκεύεται στο στρώμα των πλαστιδίων μέσα σε ειδικές πρωτεΐνες που λέγονται φερριτίνες (FER) (Naranjo-Acros and Bauer, 2016).

### **1.4. Αλληλεπίδραση μεταβολισμών Fe – S**

Εκτός από τον σημαντικό του ρόλο για τον μεταβολισμό των φυτών, η θρέψη σε S είναι σημαντική για την πρόσληψη και την αφομοίωση του Fe. Τα αγρωστώδη φυτά, συμπεριλαμβανομένου και του καλαμποκιού χρησιμοποιούν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, την στρατηγική II για την πρόσληψη του Fe. Επομένως, η σημασία του S για τα αγρωστώδη είναι μεγάλη καθώς η Met είναι το πρόδρομο μόριο για την σύνθεση των φυτοσιδηροφόρων. Έτσι, οι ανάγκες σε ανηγμένο S είναι μεγαλύτερες στα φυτά αυτά. Η ανάγκη σε ανηγμένο S είναι αυτή που κατά κύριο λόγο ρυθμίζει τόσο την αφομοίωση όσο και την πρόσληψη του S. Όπως είναι φανερό η ανάγκη αυτή εντείνεται ακόμη περισσότερο σε συνθήκες έλλειψης Fe. Στο σιτάρι έχει παρατηρηθεί πως σε συνθήκες έλλειψης Fe τα φυτά εμφανίζουν απόκριση έλλειψης S μολονότι αναπτύσσονταν σε φυσιολογικές συνθήκες χορήγησης S (Ciaffi *et al.*, 2013). Ακόμη, σε φυτά κριθαριού, που χρησιμοποιούν και αυτά την στρατηγική II, έχει βρεθεί πως η έλλειψη Fe επηρεάζει τα επίπεδα ανηγμένου S στα φύλλα και στη ρίζα καθώς επίσης επιδρά στην πρόσληψη και την αφομοίωση του S

ειδικά υπό συνθήκες έλλειψης του τελευταίου (Astolfi *et al.*, 2006). Τέλος, η αποδοτικότητα της χρήσης του  $Fe^1$  βρέθηκε αυξημένη σε φυτά αραβοσίτου που αναπτύσσοντας υπό συνθήκες επάρκειας S, ενώ μειώθηκε όταν μειώθηκαν τα  $SO_4^{2-}$  στο υπόστρωμα (Astolfi *et al.*, 2003).

Εκτός των παραπάνω, ένα μεγάλο ποσοστό του Fe στο φυτό συνδέεται σε θειολικές ομάδες πρωτεϊνών σχηματίζοντας συμπλέγματα Fe-S. Τα φυτικά κύτταρα απαντώνται περισσότερα από 50 ένζυμα που περιέχουν συμπλέγματα Fe-S και τα οποία συμμετέχουν σημαντικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις σε διάφορα στάδια του μεταβολισμού (Bernard *et al.*, 2009). Μεταξύ αυτών είναι η φερρεδοξίνη (Fd), η οποία μετέχει στη φωτοσύνθεση κατά την παραγωγή του NADP+, την αναγωγή των νιτρωδών και θειωδών, τη σύνθεση του γλουταμινικού κ.α. Αντίστοιχα και άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν συμπλέγματα Fe-S εμπλέκονται στο μεταβολισμό άνθρακα, οξυγόνου, υδρογόνου, θείου και αζώτου. Στην περίπτωση του μεταβολισμού του θείου τόσο το ένζυμο APR όσο και το SiR διαθέτουν ένα Fe-S συμπλέγματα, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο για την λειτουργία τους. Μάλιστα, υπό συνθήκες έλλειψης Fe έχει παρατηρηθεί μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου APR πιθανά λόγω αδυναμίας σύνθεσης του συμπαραγόντα Fe-S (Kopriva *et al.*, 2001, Ciaffi *et al.*, 2013).

---

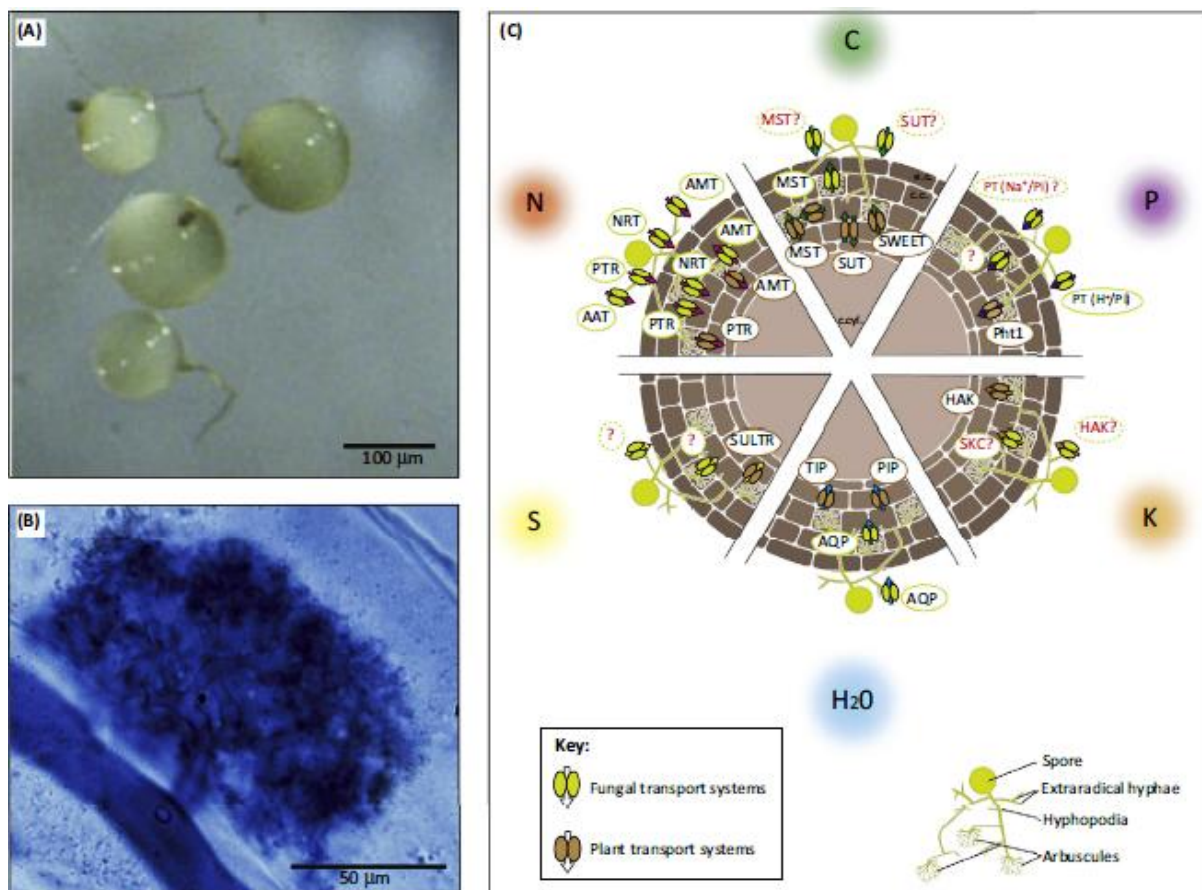
<sup>1</sup> Αποδοτικότητα της χρήσης Fe: Η συγκομιζόμενη ξηρή βιομάζα διαιρούμενη με την συνολική ποσότητα του Fe στο υπέργειο μέρος του φυτού κατά τη συγκομιδή (Kg ξηρής μάζας σπόρου/Kg Fe στο υπέργειο μέρος κατά τη συγκομιδή)

## 1.5. Μυκορριζική συμβίωση

Η πιο διαδεδομένη συμβιωτική σχέση στα περισσότερα φυσικά και γεωργικά οικοσυστήματα είναι η συμβιωτική σχέση που αναπτύσσεται μεταξύ των φυτών και των μυκορριζικών μυκήτων (Drigo and Donn, 2017). Περίπου το 80% των φυτών σχηματίζουν αυτή τη σχέση, η οποία χρονολογείται περίπου 600 εκατομμύρια χρόνια πριν και σύμφωνα με υποθέσεις ήταν αυτή που βοήθησε τα φυτά να αποικίσουν τη στεριά (Bonfante and Anca, 2009). Στη φύση υπάρχουν διάφοροι τύποι μυκορριζικών μυκήτων όπως οι εκτομυκόρριζες, οι ερικοειδείς, οι ορχιδεοειδείς και τέλος οι πιο διαδομένες που είναι οι ενδομυκόρριζες. Οι τελευταίες σχηματίζονται ανάμεσα στο φυτό και στους δενδροειδείς μυκορριζικούς μύκητες (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF), οι οποίοι είναι υποχρεωτικά συμβιωτικοί μύκητες που ανήκουν στο φύλο Glomeromycota (Frey-Kleit *et al.*, 2007). Γενικά, η σχέση του φυτού με το μυκορριζικό μύκητα αναφέρεται ως μια μωτουαλιστική σχέση, δηλαδή μια σχέση αλληλοβοήθειας στην οποία ο μυκορριζικός μύκητας τροφοδοτεί το φυτό με ανόργανα θρεπτικά συστατικά, προωθώντας την ανάπτυξη του φυτού, ενώ το φυτό τον τροφοδοτεί με πηγές άνθρακα. Η καλύτερη απορρόφηση θρεπτικών στην περίπτωση των μυκορριζικών φυτών οφείλεται στις υφές του μύκητα οι οποίες αναπτύσσονται έξω από τη ρίζα του φυτού και οι οποίες αυξάνουν το συνολικό όγκο του εδάφους που αξιοποιείται. Ο όγκος του εδάφους που είναι υπό την επίδραση των μυκορριζικών φυτών ονομάζεται μυκορριζόσφαιρα και περιλαμβάνει τόσο την ριζόσφαιρα όσο και την υφόσφαιρα.

Ο αποικισμός της ρίζας από τους AMF γίνεται είτε από μυκήλιο, είτε έπειτα από τη βλάστηση спорίων του μύκητα που υπάρχουν στο έδαφος (Εικόνα 1.9Α). Μόλις, οι υφές του μύκητα έρθουν σε φυσική επαφή με την επιφάνεια της ρίζας, αρχίζει η διόγκωση των υφών και σχηματίζονται τα χαρακτηριστικά απρεσόρια. Τα τελευταία αφενός συμβάλουν στην αναγνώριση φυτού και μύκητα σε προ-συμβιωτικό στάδιο και αφετέρου βοηθούν στην διείσδυση των υφών του μύκητα εντός των ριζών. Σε μία εγκατεστημένη μυκορριζική σχέση οι υφές του μύκητα αναπτύσσονται τόσο μέσα στη ρίζα του φυτού όσο και έξω από αυτή. Πιο συγκεκριμένα, μέσα στη ρίζα οι υφές του μύκητα αναπτύσσονται στους μεσοκυττάριους χώρους αλλά και μέσα στα κύτταρα του φλοιώδους παρεγχύματος. Εκεί δημιουργούν κύστεις, που αποτελούν αποθησαυριστικά όργανα του μύκητα, αλλά και τα χαρακτηριστικά δενδρία, τα οποία αποτελούν θυσανοειδείς κατασκευές στις οποίες

γίνονται οι ανταλλαγές θρεπτικών ανάμεσα στο φυτό και στο μύκητα (Εικόνα 1.9B, Miransari, 2011). Τα δένδρια περιβάλλονται από μια μεμβράνη, που αποτελείται κυρίως από υλικά του κυτταρικού τοιχώματος του φυτού, η οποία ονομάζεται περιδενδριώδης μεμβράνη, πάνω στην οποία είναι τοποθετημένοι όλοι οι κατάλληλοι μεταφορείς για την διακίνηση συστατικών μεταξύ των 2 συμβιωτών (Gutjahr and Parniske 2013). Τέλος, τα δένδρια δεν είναι μόνιμες κατασκευές, καθώς μετά απο μέρες γηράσκουν και αδρανοποιούνται.



**Εικόνα 1.9:** Μυκορριζική συμβίωση μεταξύ φυτών και δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF). (A) Σπόρια του μύκητα που βλαστάνουν, (B) Χαρακτηριστικά δένδρια των AMF, που αναπτύσσονται εντός των κυττάρων της ρίζας, (C) Γνωστοί μεταφορείς που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση φυτών και AMF, σε μια ανεπτυγμένη μυκορριζική συμβίωση (Garcia *et al.*, 2016).

### 1.5.1. Μεταφορά άνθρακα από το φυτό στο μυκορριζικό μύκητα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε μια εγκατεστημένη μυκορριζική συμβίωση, το φυτό παρέχει στον ετερότροφο συμβιώτη σάκχαρα τα οποία προέρχονται από την φωτοσύνθεση, που λαμβάνει χώρα στα φύλλα. Στην διακίνηση αυτή από τα

φωτοσυνθετικά κύτταρα των φύλλων στη ρίζα και στη συνέχεια στο μύκητα, συμμετέχουν τόσο μεταφορείς του φυτού όσο και μεταφορείς που διαθέτουν οι μυκορριζικοί μύκητες (Εικόνα 1.9C, Garcia *et al.*, 2016).

Περιληπτικά, η σακχαρόζη που συντίθεται στο μεσόφυλλο, φορτώνεται στον ηθμό και στην συνέχεια από εκεί μεταφέρεται στη ρίζα. Στα κύτταρα της ρίζας διασπάται σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Είναι γενικά αποδεκτό, πως η γλυκόζη αποτελεί την βασική μορφή C, η οποία προσλαμβάνεται από τον μύκητα. Σύμφωνα με μελέτες, η μυκορριζική συμβίωση εντείνει την μεταφορά σακχάρων προς την ρίζα και κατ' επέκταση τα μυκορριζικά φυτά έχουν αυξημένες συνολικές ανάγκες για σκελετούς άνθρακα. Από την πλευρά του φυτού η διακίνηση των σακχάρων φαίνεται να ελέγχεται από μεταφορείς γλυκόζης (SUTs), μεταφορείς μονοσακχαριτών (MSTs) αλλά και από τους μεταφορείς SWEET. Οι τελευταίοι ταυτοποιήθηκαν πρόσφατα και πιθανά μετέχουν στην απευθείας μεταφορά σκελετών άνθρακα από το φυτό στο μύκητα. Δεν υπάρχουν πολλές λεπτομέρειες για τους μεταφορείς που διαθέτουν οι μυκορριζικοί μύκητες αλλά πιθανά στην διαδικασία αυτή μετέχουν κυρίως μεταφορείς μονοσακχαριτών (MSTs) (Εικόνα 1.9C, Garcia *et al.*, 2016).

### **1.5.2. Επίδραση των AMF στην πρόσληψη φωσφόρου (P)**

Η πιο μελετημένη συμβολή των AMF στην θρέψη των φυτών είναι μέσω της θετικής επίδρασης τους στην απορρόφηση του φωσφόρου. Ο φωσφόρος (P) γενικά έχει συνδεθεί άμεσα με τη μυκορριζική συμβίωση, καθώς έχει αποδειχθεί πως τα επίπεδα φωσφόρου στο έδαφος επιδρούν τόσο στην εγκατάσταση της μυκορριζικής συμβίωσης αλλά και στην τροφοδοσία του μύκητα με σκελετούς άνθρακα από το φυτό. Ο P προσλαμβάνεται τόσο από τα φυτά όσο και από του μυκορριζικούς μύκητες και γενικά από τους μικροοργανισμούς του εδάφους με την μορφή των ανόργανων φωσφορικών (Pi). Τα τελευταία συνήθως είναι ακινητοποιημένα στο έδαφος καθιστώντας δύσκολη την απορρόφηση τους για τα φυτά. Ωστόσο, οι μυκορριζικοί μύκητες μέσω του εκτεταμένου δικτύου υφών που διαθέτουν προσλαμβάνουν ευκολότερα τα Pi και τα μεταφέρουν στο φυτό. Η πρόσληψη γίνεται μέσω ειδικών μεταφορέων (Pht1, high affinity Pi transporter) που διαθέτουν στην επιφάνεια των υφών τους. Τα Pi αφού απορροφηθούν από το μύκητα, συνδέονται μεταξύ τους μέσω φωσφο-ανυδριτικών δεσμών σχηματίζοντας πολυφωσφορικά (PolyP). Τα PolyP αποτελούν τη βασική μορφή μεταφοράς P σε μεγάλες

αποστάσεις. Στα δένδρια των AMF τα PolyP υδρολύονται και τα Pi μεταφέρονται στο φυτό μέσω εξειδικευμένων μεταφορέων που εδράζονται στην περιδενδιώδη μεμβράνη (Garcia *et al.*, 2016).

### **1.5.3. Επίδραση των AMF στην πρόσληψη αζώτου (N)**

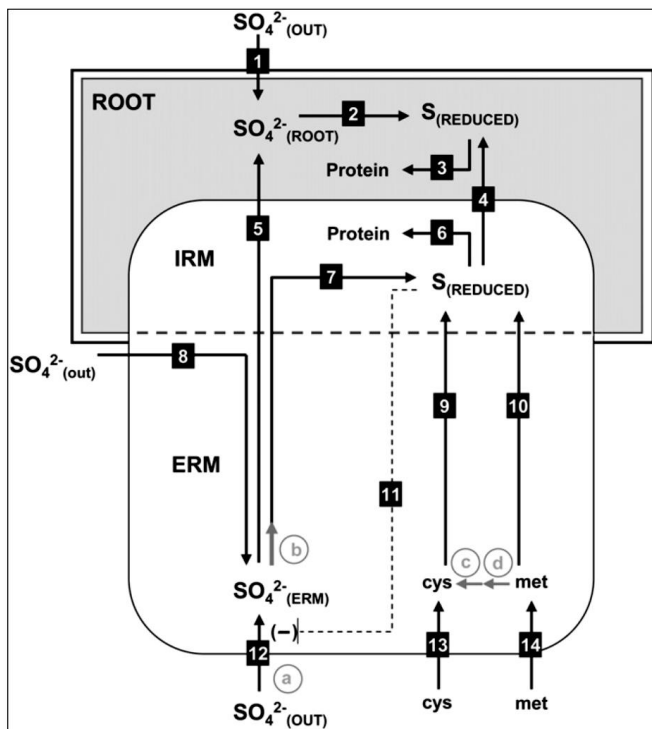
Το άζωτο (N) είναι ένα άλλο θρεπτικό που φαίνεται να μεταφέρεται μέσω των AMF στα φυτά. Περιληπτικά, το N προσλαμβάνεται από του μυκορριζικούς μύκητες είτε σε οργανική (αμινοξέα) είτε σε ανόργανη μορφή (νιτρικά,  $\text{NO}_3^-$ ). Τα  $\text{NO}_3^-$  εντός των υφών του μύκητα ανάγονται σε αμμώνιο το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της γλουταμίνης (κύκλος GS/GOGAT). Η γλουταμίνη καθώς και άλλα αμινοξέα μετατρέπονται σε αργινίνη. Η αργινίνη είναι η κύρια μορφή N που διακινείται εντός των υφών του μύκητα. Στα δένδρια λαμβάνει χώρα καταβολισμός της αργινίνης και έτσι απελευθερώνεται αμμώνιο το οποίο μεταφέρεται στο φυτό (Bitterlich *et al.*, 2017). Η διαδικασία αυτή μεταφοράς αζώτου από τον AMF στο φυτό φαίνεται να ελέγχεται από τα επίπεδα C που μεταφέρονται από το φυτό στο μύκητα. Έχει παρατηρηθεί πως η διαδικασία αυτή επάγεται όταν ο μύκητας τροφοδοτείται με περισσότερο C από το φυτό (Fellbaum *et al.*, 2012).

Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι η συμβολή των AMF στην πρόσληψη N δεν παίζει τόσο καθοριστικό ρόλο όσο στην περίπτωση του P, που αναφέρθηκε παραπάνω. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως τα επίπεδα N που χρειάζονται τα φυτά είναι 10 φορές υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά του φωσφόρου. Με άλλα λόγια, η συνολική συνεισφορά των AMF είναι μικρή συγκριτικά με τις συνολικές απαιτήσεις. Επίσης, ο μηχανισμού απορρόφησης του N που διαθέτουν οι μύκητες είναι παρόμοιος με αυτόν των φυτών επομένως δεν αξιοποιούν καλύτερα τα αποθέματα N στο έδαφος όπως γίνεται με το P. Τέλος, οι ανάγκες των AMF σε N είναι και αυτές υψηλές καθότι απαιτείται αφενός για την σύνθεση της χιτίνης, βασικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων, και αφετέρου για την σύνθεση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την γκλομαλίνη (Bitterlich *et al.*, 2017).

### **1.5.4. Επίδραση των AMF στην πρόσληψη θείου (S)**

Μέχρι σήμερα ελάχιστες μελέτες επικεντρώνονται στην επίδραση των AMF στην απορρόφηση και των μεταβολισμό του θείου στα φυτά. Οι Allen and Shacher-Hill (2009) αναφέρουν πως το S μπορεί να προσληφθεί από τους AMF με την μορφή των  $\text{SO}_4^{2-}$  και στην

συνέχεια να αναχθεί σε κυστεΐνη και μεθειονίνη. Αυτές οι οργανικές μορφές του S φαίνεται στην συνέχεια να μπορούν να μεταφερθούν και στις υφές του μύκητα που αναπτύσσονται εντός των ριζών του φυτού και από εκεί να μεταφερθούν στο φυτό μέσω ειδικών μεταφορέων. Επίσης στο *Medicago truncatula* η εγκατάσταση μυκορριζικής συμβίωσης οδήγησε σε μείωση των αποκρίσεων των φυτών στην έλλειψη S μόνο όταν τα επίπεδα P ήταν ικανοποιητικά, με αποτέλεσμα να είναι αυξημένης φυσιολογικής σημασίας η έλλειψη S (Sieh *et al.*, 2013). Παρόλα αυτά, δεν έχουν ακόμη διασαφηνιστεί οι ακριβείς μηχανισμοί.



**Εικόνα 1.10:** Σχηματική απεικόνιση του πιθανού μηχανισμού μεταφοράς S από το μυκορριζικό μύκητα στο φυτό σε μια ανεπτυγμένη μυκορριζική συμβίωση (Allen and Shacher-Hill, 2009).



## 1.6. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της μυκορριζικής συμβίωσης στον μεταβολισμό του θείου. Για το λόγο αυτό μυκορριζικά και μη-μυκορριζικά φυτά (μάρτυρας) αναπτύχθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα (60 ημέρες) υπό συνθήκες έλλειψης θείου, ενώ ο σίδηρος χορηγήθηκε με την μορφή αδιάλυτου σιδήρου ( $\text{FePO}_4$ ). Μετά την πάροδο 60 ημερών χορηγήθηκε θείο στα φυτά με την μορφή των θεικών, με σκοπό να μελετηθεί η απόκριση τους. Για την μελέτη της επίδρασης της μυκορριζικής συμβίωσης στην αφομοίωση του θείου επιλέχτηκαν τα ένζυμα APR και SiR, δυο ένζυμα κλειδιά του πρωτογενή μεταβολισμού του θείου. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση των αντίστοιχων γονιδίων στο καλαμπόκι (*Zea mays*) και στην συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση τους σε ιστούς ριζών και φύλλων των φυτών.

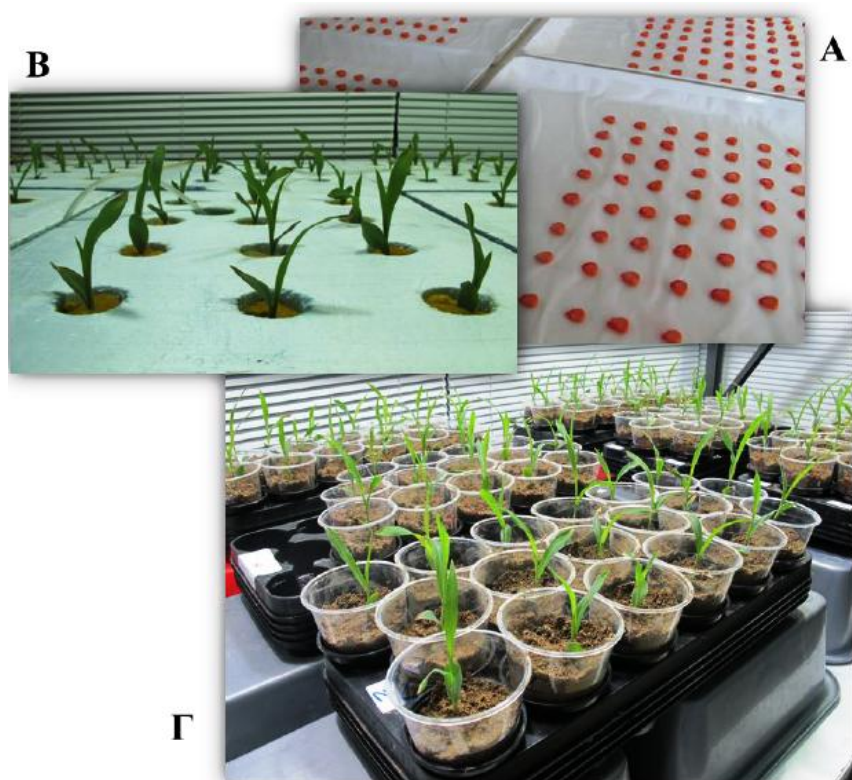
## Πειραματικό μέρος

---

## 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1. Ανάπτυξη των φυτών

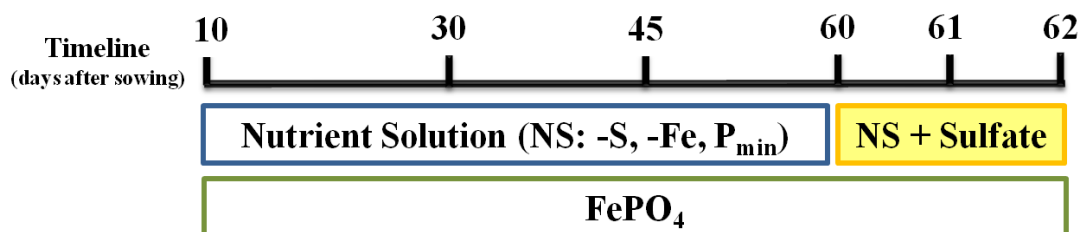
Για την εγκατάσταση των φυτών χρησιμοποιήθηκαν σπόροι καλαμποκιού (*Zea mays* L., Cisko, Syngenta Hellas), οι οποίοι τοποθετήθηκαν πάνω σε βρεγμένο διηθητικό χαρτί και παρέμειναν στους 28 °C για 4 ημέρες, απουσία φωτός, για να βλαστήσουν. Στην συνέχεια, τα αρτίβλαστα μεταφέρθηκαν σε υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας με λεκάνες, οι οποίες περιείχαν απιονισμένο νερό. Ο επαρκής αερισμός του νερού εξασφαλίστηκε με την χρήση αντλίας αέρα. Έπειτα από 4 ημέρες ( 8 ημέρες μετά την σπορά), αποκόπηκαν από τα νεαρά φυτά όλα τα τμήματα κάτω από το κόμβο (μεσοκοτύλιο, σπόρος και εμβρυακό ριζικό σύστημα). Κατόπιν, αναπτύχθηκαν για 2 ημέρες στο υδροπονικό σύστημα που αναφέρθηκε παραπάνω με την διαφορά πως χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό διάλυμα που ήταν ελλειμματικό σε Fe και S και περιείχε χαμηλή συγκέντρωση P (10μM). Την 10<sup>η</sup> ημέρα από τη σπορά, επιλέχτηκαν τα φυτά των οποίων είχε εκπτυχθεί η πρώτη σειρά εμβρυακών ριζών και μεταφέρθηκαν σε δοχεία των 250ml που περιείχαν αποστειρωμένη άμμο. Σε κάθε δοχείο τοποθετήθηκε μόνο ένα φυτό και εκτός από την άμμο είχαν προστεθεί και 500mg αδιάλυτου FePO<sub>4</sub>.



**Εικόνα 2.1:** Η πορεία εγκατάστασης των φυτών, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. (Α) Σπόροι καλαμποκιού τοποθετημένοι σε δίσκους για να βλαστήσουν. (Β) Αρτίβλαστα καλαμποκιού σε υδροπονικό σύστημα. (Γ) Καλλιέργεια φυτών σε δοχεία ανάπτυξης με αμμώδες υπόστρωμα (Σαρίδης 2014).

Τα φυτά χωρίστηκαν σε 2 διαφορετικές μεταχειρίσεις: Τα μυκορριζικά φυτά (M) και τα μη μυκορριζικά φυτά (NM). Στην μεταχείριση των μυκορριζικών φυτών, χρησιμοποιήθηκαν 300mg σκευάσματος του AMF *Rhizophagus irregularis*, με στόχο των εμβολιασμό των φυτών με τον επιθυμητό μυκορριζικό μύκητα. Τα φυτά και των 2 μεταχειρίσεων ποτίζοντας με θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε Fe και S και περιείχε χαμηλή συγκέντρωση P μέχρι την ημέρα 60 από τη σπορά. Οι συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης P επιλέχθηκαν, καθότι σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι εγκατάσταση του μυκορριζικού μύκητα επιτυγχάνεται ευκολότερα (Smith *et al.*, 2011). Έπειτα από την ημέρα 60 χορηγήθηκε S στα φυτά με την μορφή των  $SO_4^{2-}$ .

Οι δειγματοληψίες με σκοπό την μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων των επιθυμητών ενζύμων, πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 30, 45, 60, 61 και 62 μετά τη σπορά. Αξίζει να σημειωθεί πως τις ημέρες αυτές τα φυτά βρίσκονταν στο βλαστητικό στάδιο ανάπτυξης. Η δειγματοληψία της ημέρας 60 πραγματοποιήθηκε πριν την χορήγηση  $SO_4^{2-}$  (Εικόνα 2.2) Σε κάθε δειγματοληψία, χρησιμοποιήθηκε φυτικός ιστός από τουλάχιστον 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά μεταχείριση. Η απομόνωση των νουκλειικών οξέων για την περίπτωση των φύλλων έγινε από αναπτυσσόμενα φύλλα, ενώ για τα δείγματα των ριζών επιλέχθηκαν πλάγιες ρίζες. Οι πλάγιες ρίζες επιλέχθηκαν διότι, σύμφωνα με την πρόσφατη μελέτη των Gutjahr και Paszkowski (2013), στα μονοκοτυλήδονα φυτά οι ΔM μύκητες προτιμούν να εγκαθίστανται σε αυτόν τον τύπο ριζών.



**Εικόνα 2.2:** Χρονοδιάγραμμα του πειράματος. Σημειώνονται οι ημέρες όπου πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες καθώς και οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών.

## **2.2. Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων – Παραλαβή ολικού RNA – Κατασκευή cDNA**

Περίληπτικά, το πρώτο στάδιο για την κατασκευή του cDNA, ήταν εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων από του φυτικού ιστούς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος φαινόλης-χλωροφορμίου σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Brusslan and Tobin (1992), το οποίο τροποποιήθηκε για τις ανάγκες του φυτικού υλικού. Στη συνέχεια ακολουθήσε απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα, με την χρήση DNase I (RNase-free, Takara Bio Inc), με σκοπό την παραλαβή του ολικού RNA. Τέλος, ακλούθησε η κατασκευή του cDNA με τη χρήση του ενζύμου αντιστροφής μεταγραφάσης, PrimeScript RT reagent (Perfect Real Time, Takara Bio Inc).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως οι διαδικασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω (ανάπτυξη των φυτών- Κατασκευή cDNA) πραγματοποιήθηκαν από τον φοιτητή Σαρίδη Γεώργιο στα πλαίσια της πτυχιακής του μελέτης στο εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015 (Σαρίδης 2014). Για το λόγο αυτό περισσότερες λεπτομέρειες για τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν αναφέρονται στο Παράρτημα 1.

## **2.3. Κατασκευή εξειδικευμένων εκκινητών για τα γονίδια *ZmAPRL1*, *ZmAPRL2* και *ZmSiR***

Με την χρήση των πρωτεϊνικών ακολουθιών των ενζύμων AtAPR (*Arabidopsis thaliana* APS reductase), OsAPRL (*Oryza sativa* APS reductase like), AtSiR (*Arabidopsis thaliana* sulfite reductase) και OsSiR (*Oryza sativa* sulfite reductase) έγινε εύρεση των ομόλογων πρωτεϊνών στο καλαμπόκι (*Zea mays*) με τη χρήση blastp στη βάση δεδομένων NCBI και MaizeGDB. Οι πρωτεΐνες που προέκυψαν από τις 2 βάσεις για κάθε περίπτωση, συγκρίθηκαν μεταξύ τους και αφού απομακρύνθηκαν οι διπλές και ελλιπείς καταγραφές καταλήξαμε στις πρωτεϊνικές αλληλουχίες που υπάρχουν στο καλαμπόκι. Από τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες *ZmAPRL1*, *ZmAPRL2* και *ZmSiR* αποσπάστηκαν οι αντίστοιχες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, όπως αυτές ήταν καταχωρημένες στην NCBI με σκοπό να σχεδιαστούν οι κατάλληλοι εκκινητές.

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων με τη χρήση Real-time PCR, σχεδιάστηκαν ώστε να ενισχύουν επιλεκτικά μόνο το υπό μελέτη

γονίδιο σε κάθε περίπτωση. Η σχεδίαση έγινε με την βοήθεια του εργαλείου PrimerBlast της NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) και επιλέχθησαν εκκινητές που να στοχεύουν στο 3' άκρο του mRNA κάθε γονιδίου. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Μέγεθος προϊόντος: περίπου 100 βάσεις
- Tm (θερμοκρασία υβριδισμού): 56-61 °C
- Μέγεθος εκκινητών: 18-22 βάσεις
- Περιεκτικότητα σε GC (%): 40-60%

Όπως είναι γνωστό, για τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων απαιτείται η χρήση των επιπέδων έκφρασης ενός γονιδίου αναφοράς, του οποίου η έκφραση είναι σχετικά σταθερή σε κάθε κύτταρο. Στην περίπτωση μας, το γονίδιο αναφοράς που επιλέχθηκε, ήταν το γονίδιο της ουμπικουιλίνης (*UBQ*). Κατά αντίστοιχο τρόπο, όπως αναφέρεται παραπάνω, έγινε ο σχεδιασμός των εκκινητών και για το γονίδιο *ZmUBQ* (Accession number NCBI: NM\_001138130) στο 3' άκρο του mRNA (Εικόνα 2.3).

*ZmUBQ*: Forward Primer: 5'-TGTCTTCATGGCCAACCACT-3'  
Reverse Primer: 5'-GCTTGATAGGTAGGCGGGTG-3'

```
CACCCGCCGCAGCCAAACCCCTCTCCAGCAGCCGTCGTCGCCACCGCTGCAGCGCGGAGGCGACCCCATC
GCCGCCAAGATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACGGGGAAAACCATCACGTTGGAGGTGGAGTCCTCGG
ACACCATCGACAACGTGAAGGCCAAGATACAGGACAAGGAGGGCATCCCGCCGACCAGCAGCGGCTCAT
CTTCGCCGGCAAGCAGCTCGAGGACGGCCGCACCCCTCGCCGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTC
CACCTGGTGCTCCGCCTCCGAGGTGGCGCCAAGAAGCGCAAGAAGAAGACGTACACCAAGCCCAAGAAGA
TCAAGCACAAGCACAAGAAGGTGAAGCTCGCAGTGCTGCAGTTCTACAAGGTGGACGACGCCACCGGCAA
GGTGACCCGCCTCCGCAAGGAGTGCCCCAACACCGAGTGCGGTGCGGGTGTCTTCATGGCCAACCACTTC
GACCGCCACTACTGCGGCAAGTGCGGCCTCACCTACGTCTACAATCAGAAGGCGTAATCCCATGCGCCGC
TTTGCTTCACCCGCCTACCTATCAAGCATTCACCTGTTGGTTACTCGATTTGAATATCATTTAGATCTGT
TTGAGGTTGGAACATAAATGCAGCAGTAGTTTCTGTCTT
```

**Εικόνα 2.3:** Νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου αναφοράς *ZmUBQ*. Με πορτοκαλί χρώμα παρουσιάζεται το τμήμα 119 βάσεων που ενισχύθηκε. Τα υπογραμμισμένα τμήματα αντιστοιχούν στο ζεύγος των εκκινητών που κατασκευάστηκε.

## 2.4. Κανονικοποίηση των δειγμάτων

Για να γίνει προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης 2 γονιδίων απαιτείται τα δείγματα cDNA να είναι κανονικοποιημένα. Με άλλα λόγια, πρέπει τα δείγματα να περιέχουν σχεδόν τον ίδιο αριθμό αντιγράφων του γονιδίου αναφοράς. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε Real-time PCR (qPCR) για τα δείγματα φύλλων και ριζών, με την χρήση του KAPA SYBR FAST Master Mix (KAPA Biosystems) στη συσκευή της Real-time PCR, MxPro-Mx3005P (Stratagene, USA).

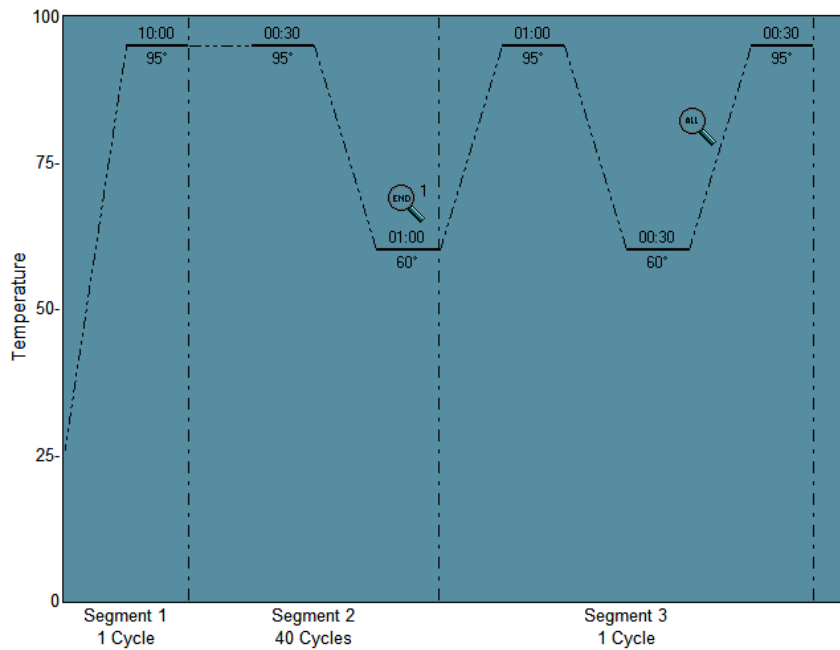
Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την qPCR περιγράφεται παρακάτω:

- Χρησιμοποιήθηκε plate 96 θέσεων κατάλληλα για real-time PCR και σε κάθε μια θέση προστέθηκαν οι εξής αναλογίες:
    - Δείγμα cDNA 1  $\mu$ L
    - KAPA SYBR FAST Master Mix 5  $\mu$ L
    - Primer Mix<sup>2</sup> (ZmUBQ) 2  $\mu$ L
    - ROX Low 0.2  $\mu$ L
    - ddH<sub>2</sub>O 1.8  $\mu$ L, τελικός όγκος 10  $\mu$ L
- } 9 $\mu$ L mix σε κάθε θέση
- Το plate μεταφέρθηκε στην συσκευή MxPro, έχοντας ήδη ρυθμίσει τις απαραίτητες παραμέτρους του προγράμματος, δηλαδή τα στάδια της αντίδρασης (Εικόνα 2.4)

Μετά το πέρας της qPCR τα αποτελέσματα αποθηκεύτηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος ανάλυσης δεδομένων της συσκευής MxPro-Mx3005P (v4.10, Build 389, Schema 85, Stratagene 2007). Με τη βοήθεια του λογισμικού αυτού καταγράφηκε το CP της κάθε αντίδρασης, δηλαδή ο κύκλος στον οποίο άρχισε να καταγράφεται ενίσχυση του τμήματος μεταξύ των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν. Τα δείγματα θα πρέπει να έχουν σχεδόν το ίδιο CP ώστε να θεωρηθούν κανονικοποιημένα. Σε διαφορετική περίπτωση, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις με αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O των δειγμάτων cDNA που ήταν πιο “πυκνά”

---

<sup>2</sup> Χρησιμοποιήθηκαν primers συγκέντρωσης 2 $\mu$ M



**Εικόνα 2.4:** Στάδια της αντίδρασης real-time PCR και οι αντίστοιχες θερμοκρασιακές μεταβολές. Στο 1<sup>ο</sup> στάδιο επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση του ενζύμου. Στους επόμενους 40 κύκλους λαμβάνει χώρα η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (αποδιάταξη των DNA αλυσίδων, πρόσδεση εκκινητών, ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος). Στο τελευταίο στάδιο γίνεται η αποδιάταξη των δίκλωνων αλυσίδων και η απελευθέρωση της χρωστικής SYBR Green.

## 2.5. qPCR για τα υπό μελέτη γονίδια *ZmAPRL1*, *ZmARPL2* και *ZmSiR* στα δείγματα cDNA φύλλων και ριζών

Αφού εξασφαλίστηκε πως όλα τα δείγματα cDNA ήταν κοινωνικοποιημένα, ακολούθησε ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν Real-time PCR (qPCR) στα δείγματα φύλλων και ριζών, με την χρήση του KAPA SYBR FAST Master Mix (KAPA Biosystems) στη συσκευή της Real-time PCR, MxPro-Mx3005P (Stratagene, USA).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την qPCR περιγράφεται παρακάτω:

- Χρησιμοποιήθηκαν plates 96 θέσεων κατάλληλα για Real-time PCR και σε κάθε μια θέση προστέθηκαν οι εξής αναλογίες:
  - Δείγμα cDNA 1 μL
  - KAPA SYBR FAST Master Mix 5 μL
  - Primer Mix<sup>3</sup> (*ZmAPRL1*, *ZmARPL2* και *ZmSiR*) 2 μL
  - ROX Low 0.2 μL
  - ddH<sub>2</sub>O 1.8 μL

} 9μL mix σε κάθε θέση

### Διαδικασία προετοιμασίας των plates:

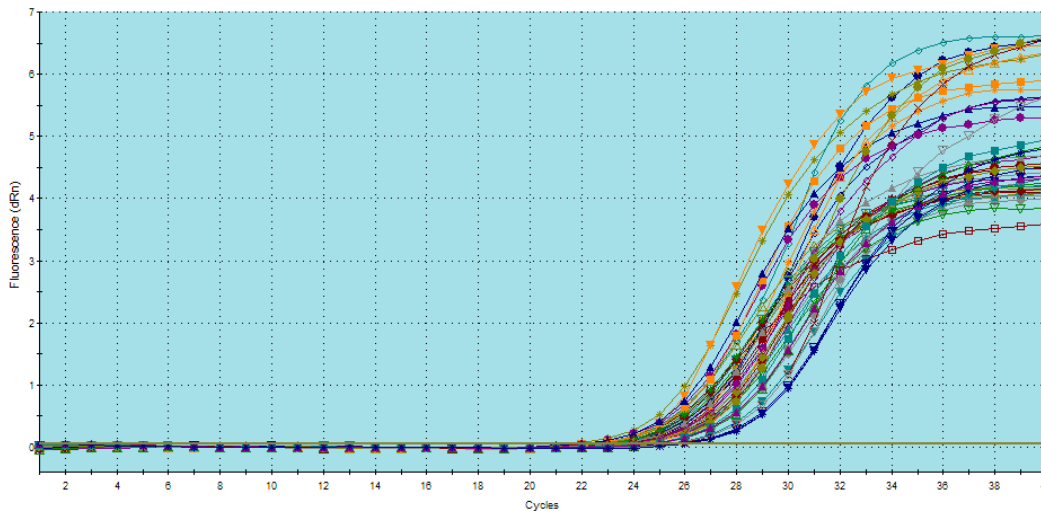
<sup>3</sup> Χρησιμοποιήθηκαν primers συγκέντρωσης 2μM



1. Σε πρώτο στάδιο γίνεται ο σχεδιασμός του προγράμματος της Real-Time PCR που θα πραγματοποιήσουμε δηλαδή ορίζουμε τις παραμέτρους της αντίδρασης (Εικόνα 2.4) και διαμορφώνουμε το plate setup.
2. Στην συνέχεια, και αφού έχουν συγκεντρωθεί όλα τα αναλώσιμα που θα χρειαστούν, γίνεται η παρασκευή του mix για κάθε ζευγάρι εκκινήτων (δηλαδή διαφορετικό mix για κάθε υπό μελέτη γονίδιο)  
Για τον υπολογισμό της ποσότητας του mix που θα παρασκευαστεί, λαμβάνεται υπόψη ο αριθμός των δειγμάτων που θα αναλυθούν ανά γονίδιο (αριθμός των δειγμάτων Χ 9μL). Για τη παρασκευή του mix γίνεται προσθήκη κάθε αντιδραστηρίου στις αναλογίες που παρουσιάζονται παραπάνω.
3. Έπειτα, σε κάθε θέση του plate προστίθενται 9μL του mix.
4. Αφού έχει ολοκληρωθεί τη προσθήκη του mix σε κάθε θέση, προστίθεται το αντίστοιχο δείγμα cDNA, σύμφωνα πάντα με το plate setup.  
Στο στάδιο αυτό απαιτείται μεγάλη προσοχή ώστε να μην γίνει λάθος στην διαδικασία «φόρτωσης» των δειγμάτων.
5. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη των δειγμάτων, με προσοχή το plate κλείνεται με το ειδικό καπάκι ή αυτοκόλλητο. Πλέον το plate είναι έτοιμο για να το τοποθετήσουμε στη συσκευή της Real-time PCR
  - Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα αποτελέσματα της qPCR αποθηκεύονται και επεξεργάζονται σε επόμενη φάση για τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων έκφρασης.

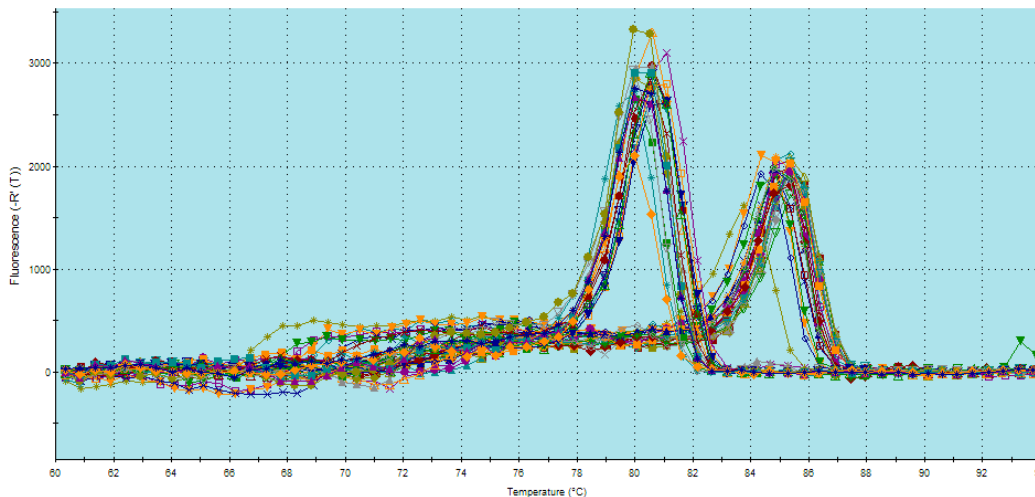
## **2.6. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Τα πρωτογενή αποτελέσματα σε πρώτη φάση αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος ανάλυσης δεδομένων της συσκευής MxPro-Mx3005P, με σκοπό τον αποκλεισμό των δειγμάτων που εμφάνιζαν λανθασμένη ενίσχυση. Στο πρόγραμμα αυτό τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με την μορφή καμπυλών ενίσχυσης ως προς του κύκλους της αντίδρασης καθώς επίσης και με καμπύλες αποδιάταξης ως προς την θερμοκρασίας (Εικόνες 2.5 και 2.6 αντίστοιχα).



**Εικόνα 2.5:** Καμπύλες ενίσχυσης μιας τυπικής αντίδρασης Real-time PCR. Ο κύκλος στον οποίο άρχισε να συσσωρεύεται το προϊόν της κάθε αντίδρασης υπολογίζεται με βάση το σημείο στο οποίο η εκάστοτε καμπύλη τέμνει την ευθεία που έχει οριστεί ως κατώφλι (συνήθως Φθορισμός=0.05).

Από τις καμπύλες ενίσχυσης παρέχεται η πληροφορία του κύκλου της κάθε αντίδρασης που άρχισε να καταγράφεται ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος κάθε φορά, με άλλα λόγια του CP της κάθε αντίδρασης.



**Εικόνα 2.6:** Καμπύλες αποδιάταξης μιας τυπικής αντίδρασης Real-time PCR. Κάθε κορυφή είναι χαρακτηριστική για κάθε προϊόν ενίσχυσης. Επομένως, στις αντιδράσεις των οποίων οι κορυφές είναι στην ίδια θερμοκρασία έχει ενισχυθεί το ίδιο τμήμα.

Από την άλλη, οι καμπύλες αποδιάταξης είναι χρήσιμες καθότι είναι χαρακτηριστικές για κάθε προϊόν της αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, στο τελευταίο στάδιο της Real-time PCR, το στάδιο της αποδιάταξης των δίκλωνων αλυσίδων, γίνεται η εκτίμηση του θερμοκρασιακού σημείου όπου οι δύο αλυσίδες του συσσωρευμένου προϊόντος συνδέονται με αποτέλεσμα να εμφανίζεται φθορισμός. Το θερμοκρασιακό σημείο αυτό εξαρτάται από το μέγεθος καθώς επίσης και την αλληλουχία κάθε ενισχυμένου τμήματος. Κοντολογίς, μέσω των

καμπυλών αυτών μπορούμε να συμπεράνουμε εάν ενισχύθηκε το επιθυμητό τμήμα ή έχει πραγματοποιηθεί κάποια τυχαία ενίσχυση.

Αφού αποκλείστηκαν οι αντιδράσεις οι οποίες δεν είχαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, ακλούθησε η καταγραφή του CP κάθε αντίδρασης και ο υπολογισμός του παράγοντα E, δηλαδή της απόδοσης της εκάστοτε αντίδρασης, με την βοήθεια του προγράμματος LinRegPCR (Ruijter et al., 2009).

Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *ZmAPRL1*, *ZmAPRL2* και *ZmSiR* υπολογίστηκαν ως μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων με τη χρήση του μαθηματικού τύπου που αναφέρεται

από το Pfaffl (2001): 
$$\frac{E_{goi}^{\Delta cp(\text{control-sample})}}{E_{ref}^{\Delta cp(\text{control-sample})}}$$
, όπου E<sub>goi</sub> και E<sub>ref</sub> οι απόδοσης των

αντιδράσεων του κάθε δείγματος για το γονίδιο-στόχο και το γονίδιο αναφοράς αντίστοιχα. Το ΔCP αναφέρεται στη διαφορά των κύκλων στους οποίους εμφανίστηκε προϊόν μεταξύ του μαρτύρα και του εκάστοτε δείγματος. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ουμπικουιλίνης, ενώ το γονίδιο-στόχος ήταν κάθε φορά το *ZmAPRL1* ή το *ZmAPRL2* ή το *ZmSiR*. Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης μέχρι την ημέρα 60, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η ημέρα 30 κάθε μεταχείρισης. Από την άλλη για την μελέτη της απόκρισης κάθε μεταχείρισης στην χορήγηση θείου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η ημέρα 60 της κάθε μεταχείρισης. Εναλλακτικά, για την εκτίμηση της μεταβολής των σχετικών επιπέδων έκφρασης του κάθε γονιδίου από μέρα σε μέρα μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων, ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα των μη μυκορριζικών φυτών της κάθε ημέρας.

## 2.7. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με t test (P<0.05), για την σύγκριση των μέσων όρων 2 δειγμάτων. Για τον υπολογισμό αυτό χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SEM>).

## Αποτελέσματα

---

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1. *In silico* ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα APS reductase (APS) και sulfite reductase (SiR) στο φυτό *Zea mays*.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των αμινοξικών αλληλουχιών των ενζύμων APS reductase (5'-adenylylphosphosulfate reductase) και sulfite reductase που υπάρχουν στο φυτό *Arabidopsis thaliana* μέσω της βάσης δεδομένων NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Από την αναζήτηση αυτή προέκυψαν τρεις (3) διαφορετικές πρωτεϊνικές αλληλουχίες, που αντιστοιχούν στις τρεις (3) διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου APR και μια πρωτεϊνική αλληλουχία για το ένζυμο SiR (Πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1:** Τα Accession number των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των ενζύμων APR και SiR του φυτού *Arabidopsis thaliana*, όπως αυτά προέκυψαν από την αναζήτηση στην NCBI.

| Protein | Accession number (NCBI) |
|---------|-------------------------|
| AtAPR1  | NP_192370.1             |
| AtAPR2  | NP_001185293.1          |
| AtAPR3  | NP_193930.1             |
| AtSiR   | NP_196079.1             |

Με βάση τις παραπάνω αμινοξικές αλληλουχίες πραγματοποιήθηκε blastp στην NCBI, με σκοπό να βρεθούν οι ομόλογες πρωτεΐνες τόσο στο καλαμπόκι (*Zea mays*) όσο και στο ρύζι (*Oryza sativa*). Για κάθε μια από τις ισομορφές της AtAPR προέκυψαν επτά (7) αλληλουχίες με μεγάλη ομοιότητα στο καλαμπόκι και δύο (2) αλληλουχίες στο ρύζι. Από την άλλη, το blastp χρησιμοποιώντας ως οδηγό την AtSiR έδωσε δύο (2) και τρεις (3) ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες στο καλαμπόκι και στο ρύζι αντίστοιχα. Όλες οι αμινοξικές αλληλουχίες με την μεγαλύτερη ομολογία που προέκυψαν σε κάθε περίπτωση κατεγράφησαν σε μια λίστα.

Εκτός από το blastp στην NCBI, πραγματοποιήθηκε επίσης blastp και στην βάση δεδομένων Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) χρησιμοποιώντας της αμινοξικές αλληλουχίες από το *A.thaliana*. Τα αποτελέσματα του blastp και για τις τρεις ισομορφές της APR, εμφάνισαν μόνο μια αμινοξική ακολουθία η οποία εμφανίζει μεγάλη ομολογία, την OsAPRL1 (Accession number: Os07g32570.1). Στην

περίπτωση της SiR, η πρωτεϊνική ακολουθία με την μεγαλύτερη συγγένεια ήταν OsSiR (Accession number: Os05g42350.1).

Στη συνέχεια οι αμινοξικές αλληλουχίες AtAPR1, AtAPR2, AtAPR3, OsAPRL1, AtSiR και OsSiR, που αναφέρθηκαν παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση ομόλογων αμινοξικών αλληλουχιών και στην MaizeGDB (<https://www.maizegdb.org/>). Στην περίπτωση της APR, τα αποτελέσματα από την MaizeGDB αποκάλυψαν δύο (2) διαφορετικές πρωτεϊνικές αλληλουχίες (Accession number: GRMZM2G087254\_P01 και AC189750.4\_FGT004), ενώ για την SiR μόνο μια (1) (Accession number: GRMZM2G090338\_P01).

Με σκοπό την διασταύρωση των αποτελεσμάτων, οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τις διαφορετικές βάσεις συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Αφού απομακρυνθήκαν οι διπλές και ελλιπείς καταγραφές, καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως στο καλαμπόκι υπάρχουν 2 ισομορφές του ενζύμου APR, η **ZmAPRL1** και **ZmAPRL2**, και μια ισομορφή για το ένζυμο **ZmSiR** (Πίνακας 3.2). Για την ονομασία των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε η ονομασία που χρησιμοποιείται στην NCBI.

**Πίνακας 3.2:** Τα Accession numbers των νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών των υπό μελέτη ενζύμων APR και SiR στο *Zea mays*, όπως προέκυψαν από την *in silico* ανάλυση. Επίσης, παρουσιάζονται και τα ποσοστά ομοιότητας των πρωτεϊνών με τις ομόλογες από το *Arabidopsis thaliana*.

| Gene           | DNA sequence (MGDB) | cDNA (NCBI)    | Protein Accession number (NCBI) | Putative orthologous Arabidopsis genes | Protein Identity (%) |
|----------------|---------------------|----------------|---------------------------------|--|----------------------|
| <b>ZmAPRL1</b> | AC189750.4_FG004    | NM_001112294.1 | ONM57603.1                      | <i>AtAPR3</i>                          | 71                   |
|                |                     |                |                                 | <i>AtAPR1</i>                          | 70                   |
|                |                     |                |                                 | <i>AtAPR2</i>                          | 73                   |
| <b>ZmAPRL2</b> | GRMZM2G087254       | NM_001112335.2 | NP_001105805.2                  | <i>AtAPR3</i>                          | 69                   |
|                |                     |                |                                 | <i>AtAPR2</i>                          | 74                   |
|                |                     |                |                                 | <i>AtAPR3</i>                          | 70                   |
| <b>ZmSiR</b>   | GRMZM2G090338       | NM_001111832.2 | NP_001105302.2                  | <i>AtSiR</i>                           | 77                   |

Για την πρόβλεψη και την επιβεβαίωση της υποκυτταρικής θέσης των παραπάνω ενζύμων χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, Emanuelsson et al., 2000) και ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>, Emanuelsson et al., 1999), τα οποία εντοπίζουν τα πεπτίδια οδηγούς (target peptide), που υπάρχουν σε κάθε πρωτεϊνική ακολουθία. Τα αποτελέσματα και για τις τρεις πρωτεΐνες, ZmAPRL1, ZmAPRL2 και ZmSiR έδειξαν, με μεγάλη πιθανότητα, πως τα ένζυμα αυτά εδράζονται στον κλωροπλάστη (Πίνακας 3.3), όπως ήταν γνωστό και από την αντίστοιχη βιβλιογραφία.

**Πίνακας 3.3:** Πιθανή υποκυτταρική θέση και μέγεθος του target peptide (aa) των υπό μελέτη πρωτεϊνών ZmAPRL1, ZmAPRL2 και ZmSiR, συμφώνα με τα αποτελέσματα των εργαλείων TargetP1.1 και Chlorop1.1.

| Protein | Accession number | TargetP Prediction/Score | ChloroP predicted Tp length |
|---------|------------------|--------------------------|-----------------------------|
| ZmAPRL1 | ONM57603.1       | Chloroplast 0.909        | 62aa                        |
| ZmAPRL2 | NP_001105805.2   | Chloroplast 0.926        | 56aa                        |
| ZmSiR   | NP_001105302.2   | Chloroplast 0.763        | 52aa                        |

Στην συνέχεια, από τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες αποσπάστηκαν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες όπως αυτές αναφέρονται στην NCBI (Πίνακας 3.2). Με βάση τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών, συμφώνα με τη βάση δεδομένων MaizeGDB (Παράρτημα 4), αποφασίστηκε να μελετηθεί η έκφραση και των τριών γονιδίων τόσο στα δείγματα των ριζών όσο και των φύλλων. Στην περίπτωση των γονιδίων *ZmAPRL1* και *ZmAPRL2*, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση με το πρόγραμμα Cluster Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), με στόχο να εντοπιστούν περιοχές στις οποίες διαφέρουν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (Παράρτημα 2). Η πληροφορία αυτή βοήθησε στον σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών (primers) που θα ενισχύουν επιλεκτικά σε κάθε περίπτωση μόνο την μια από τις 2 ισομορφές του ενζύμου APR. Οι εκκινητές για κάθε ένα από τα γονίδια *ZmAPRL1*, *ZmAPRL2* και *ZmSiR* σχεδιάστηκαν στο 3' άκρο (Πίνακας 3.4, Παράρτημα 3).

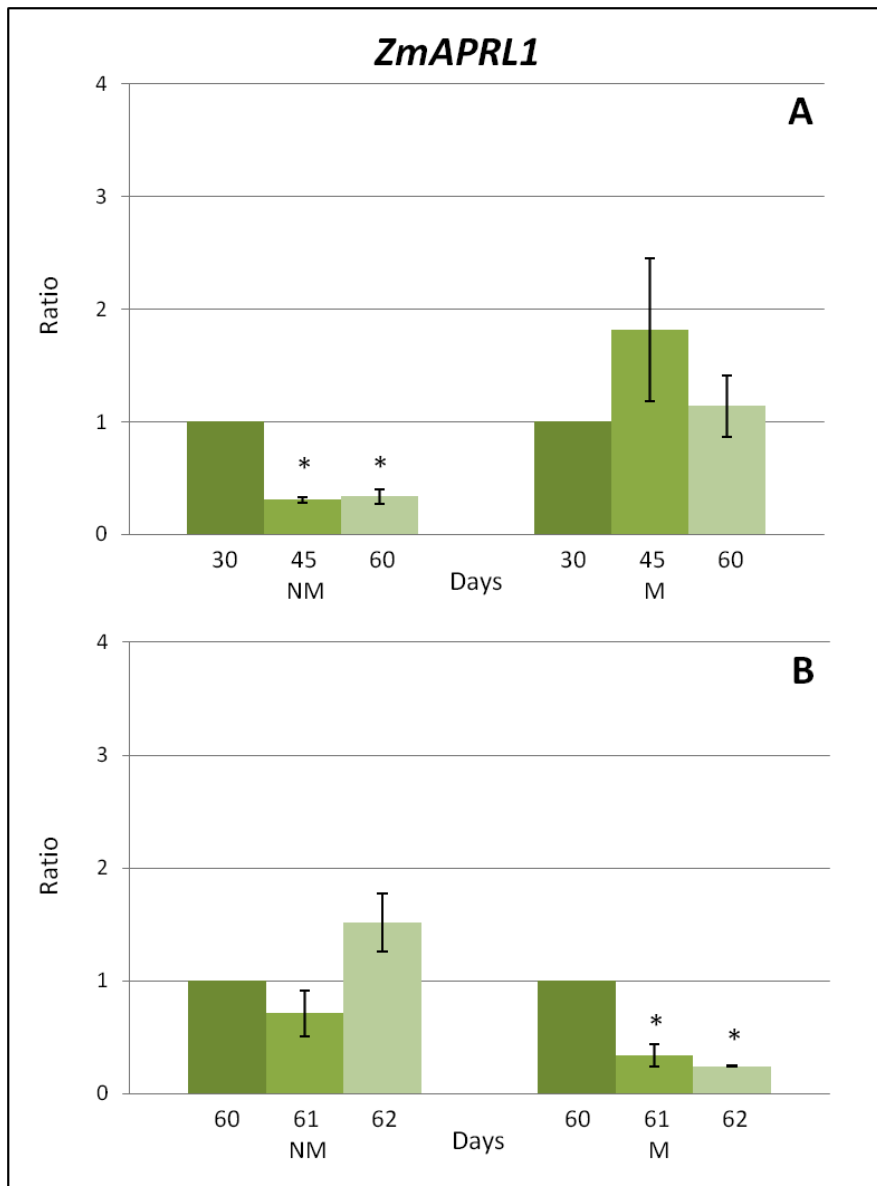
**Πίνακας 3.4:** Τα ζεύγη των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *ZmAPRL1*, *ZmAPRL2* και *ZmSiR* και οι οποίοι σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Primer Blast της NCBI.

| <b>mRNA</b>           | <b>Accession Number<br/>NCBI</b> | <b>Primer</b> |                            | <b>Product<br/>Length</b> |
|-----------------------|----------------------------------|---------------|----------------------------|---------------------------|
| <b><i>ZmAPRL1</i></b> | NM_001112294.1                   | Forward       | 5'-GACACAGGAAGGAACGAGGG-3' | 121                       |
|                       |                                  | Reverse       | 5'-CTCAGCTACCAAGCACAGGG-3' |                           |
| <b><i>ZmAPRL2</i></b> | NM_001112335.2                   | Forward       | 5'-CCATCTAGGTGCGCTGTACG-3' | 150                       |
|                       |                                  | Reverse       | 5'-AAATCTCTCCCTCAGCTGCC-3' |                           |
| <b><i>ZmSiR</i></b>   | NM_001111832.2                   | Forward       | 5'-GCTGAACGGGGGATCTTACC-3' | 119                       |
|                       |                                  | Reverse       | 5'-CTAGCGCATCCATTAGGGCA-3' |                           |



**3.2. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ZmAPRL1*, *ZmAPRL2* και *ZmSiR* στα φύλλα μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών υπό συνθήκες παρατεταμένης έλλειψης θείου και μετά την παροχή θείου.**

➤ *ZmAPRL1*



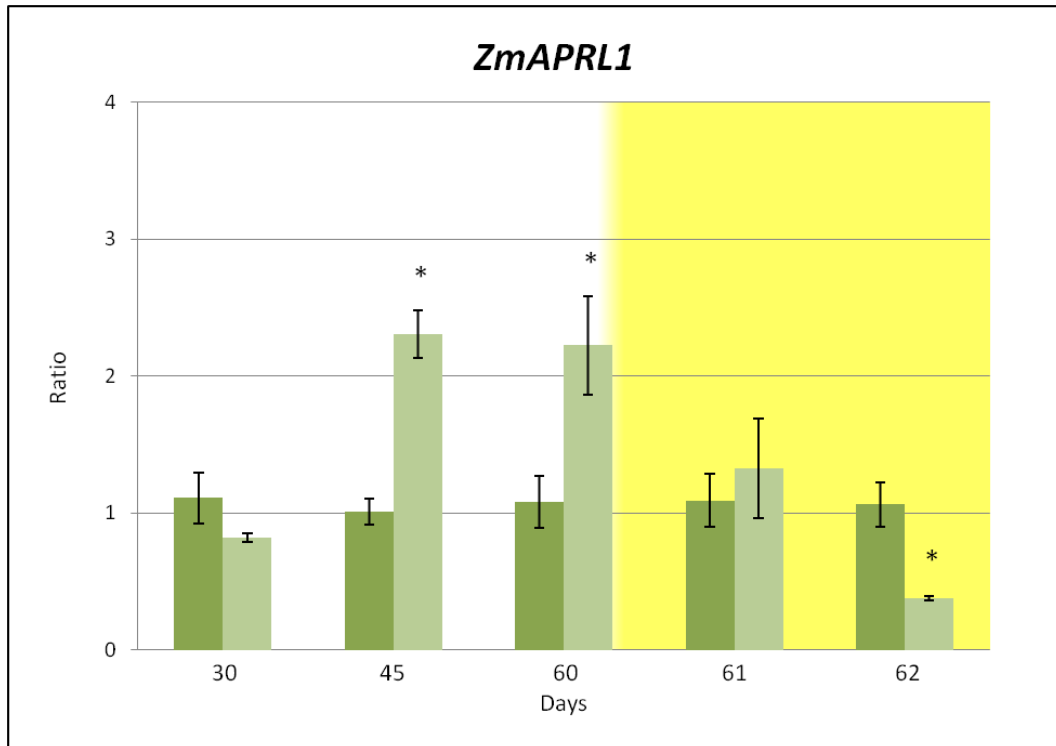
**Εικόνα 3.1:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmAPRL1* στα φύλλα μυκορριζικών (δεξιά) και μη μυκορριζικών (αριστερά) φυτών *Zea mays*, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της ουμπικουτίνης. Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης την περίοδο έλλειψης θείου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η ημέρα 30 της κάθε μεταχείρισης (A), ενώ για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης μετά την προσθήκη θεικών χρησιμοποιήθηκε η ημέρα 60 (B). Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

Όπως αναφέρθηκε και στο πειραματικό μέρος, τα φυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης S για 60 ημέρες, ενώ μετά την δειγματοληψία της ημέρας 60 χορηγήθηκαν στα φυτά  $SO_4^{2-}$  με σκοπό να μελετηθεί η απόκριση τους στη χορήγηση S. Για το λόγο αυτό, για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης μέχρι την ημέρα 60 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η ημέρα 30 κάθε μεταχείρισης. Από την άλλη, για τη μελέτη της απόκρισης κάθε μεταχείρισης στην χορήγηση S χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η ημέρα 60 της αντίστοιχης μεταχείρισης. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη και των υπολοίπων γονιδίων τόσο στα δείγματα φύλλων όσο και ριζών.

Στα μη μυκορριζικά φυτά τα επίπεδα έκφρασης του *ZmAPRL1* ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα την ημέρα 45, ενώ παρέμειναν σε παρόμοια επίπεδα μέχρι και την ημέρα 60. Από την άλλη πλευρά, στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *ZmAPRL1* την ημέρα 45, χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Την ημέρα 60 ο αριθμός των μεταγραφημάτων του *ZmAPRL1* ήταν στα ίδια επίπεδα με την ημέρα 30 (Εικόνα 3.1A).

Στα φύλλα των μη μυκορριζικών φυτών η έκφραση του γονιδίου *ZmAPRL1* ήταν μειωμένη 24 ώρες μετά την χορήγηση  $SO_4^{2-}$ , ενώ την ημέρα 62 το γονίδιο υπερεκφράστηκε. Ωστόσο οι αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Αντίθετα, η προσθήκη  $SO_4^{2-}$  οδήγησε στη σταδιακή μείωση των επιπέδων έκφρασης του παραπάνω γονιδίου στα μυκορριζικά φυτά, σημειώνοντας την ελάχιστη τιμή την ημέρα 62 (Εικόνα 3.1B).

Για την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των 2 μεταχειρίσεων, υπολογίστηκε η σχετική έκφραση των γονιδίων χρησιμοποιώντας τα μη μυκορριζικά φυτά κάθε ημέρας ως μάρτυρας. Με βάση τα αποτελέσματα φαίνεται πως μολονότι την ημέρα 30 η έκφραση του γονιδίου *ZmAPRL1* ήταν ελαφρά χαμηλότερη στα μυκορριζικά φυτά, την ημέρα 45 και 60 το γονίδιο υπερεκφράζονταν στατιστικά σημαντικά στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών. Μια μέρα μετά την προσθήκη  $SO_4^{2-}$  παρατηρήθηκαν παρόμοια επίπεδα μεταγραφημάτων του γονιδίου *ZmAPRL1*, ενώ την ημέρα 62 η έκφραση του ήταν αρκετά μικρότερη στα φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία του μυκορριζικού μύκητα (Εικόνα 3.2).

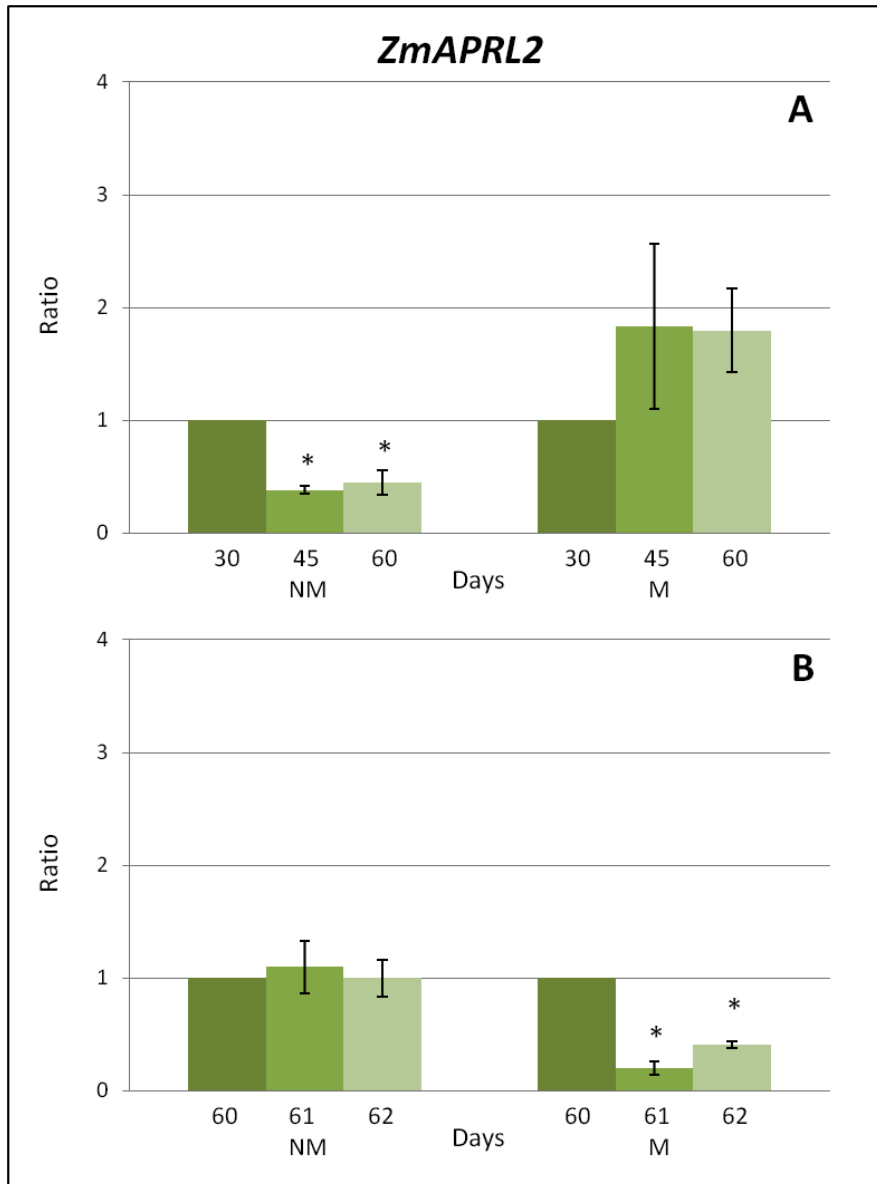


**Εικόνα 3.2:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmAPRL1* στα φύλλα μυκορριζικών (ανοιχτό πράσινο) και μη μυκορριζικών (σκούρο πράσινο) φυτών *Zea mays*. Για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης κάθε ημέρας χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας τα μη μυκορριζικά φυτά της αντίστοιχης ημέρας και ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της σμπικουτίνης. Η κίτρινη περιοχή του γραφήματος αντιστοιχεί στην περίοδο μετά την χορήγηση θείου. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

### ➤ *ZmAPRL2*

Την ημέρα 45 η έκφραση του γονιδίου *ZmAPRL2* στα φύλλα των μη μυκορριζικών φυτών μειώθηκε σε σχέση με την ημέρα 30 και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα έως και την ημέρα 60. Από την άλλη πλευρά, η παρατεταμένη έλλειψη  $SO_4^{2-}$  οδήγησε στην υπερέκφραση του γονιδίου την ημέρα 45 και 60 στα μυκορριζικά φυτά, χωρίς όμως να παρατηρηθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Εικόνα 3.3A).

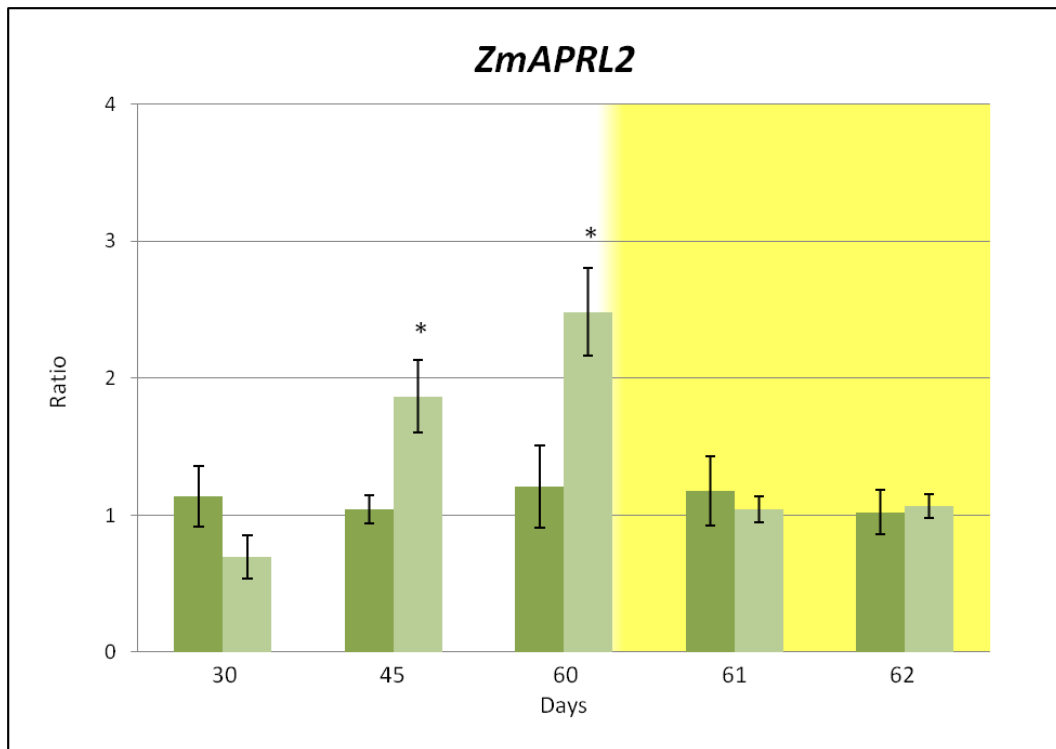
Η χορήγηση S με βάση τα αποτελέσματα της real-time PCR, δεν οδήγησε σε καμία αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου *ZmAPRL2* στα φύλλα των μη μυκορριζικών φυτών καθώς η έκφραση παρέμεινε σταθερή μετά την ημέρα 60. Αντιθέτως, τα μυκορριζικά φυτά παρουσίασαν μια τελείως διαφορετική απόκριση στην προσθήκη  $SO_4^{2-}$ , παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα των μεταγραφημάτων της συγκεκριμένη ισομορφής της αναγωγής του APS τις ημέρες 61 και 62 (Εικόνα 3.3B)



**Εικόνα 3.3:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmAPRL2* στα φύλλα μυκορριζικών (δεξιά) και μη μυκορριζικών (αριστερά) φυτών *Zea mays*, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της σμικκοιτίνης. Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης την περίοδο έλλειψης θείου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυράς η ημέρα 30 της κάθε μεταχείρισης (A), ενώ για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης μετά την προσθήκη θεικών χρησιμοποιήθηκε η ημέρα 60 (B). Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

Την ημέρα 30, η έκφραση του γονιδίου *ZmAPRL2*, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 3.4), ήταν χαμηλότερη στα φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία του μυκορριζικού μύκητα. Ωστόσο, την ημέρα 45 και 60, το συγκεκριμένο γονίδιο βρέθηκε να είναι υπερεκφρασμένο στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών. Μάλιστα, οι διαφορές στην έκφραση ήταν στατιστικά σημαντικές. Μετά την χορήγηση S με την μορφή  $SO_4^{2-}$  μέσω του

θρεπτικού διαλύματος δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στην έκφραση του *ZmAPRL2* μεταξύ μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών (Εικόνα 3.4).



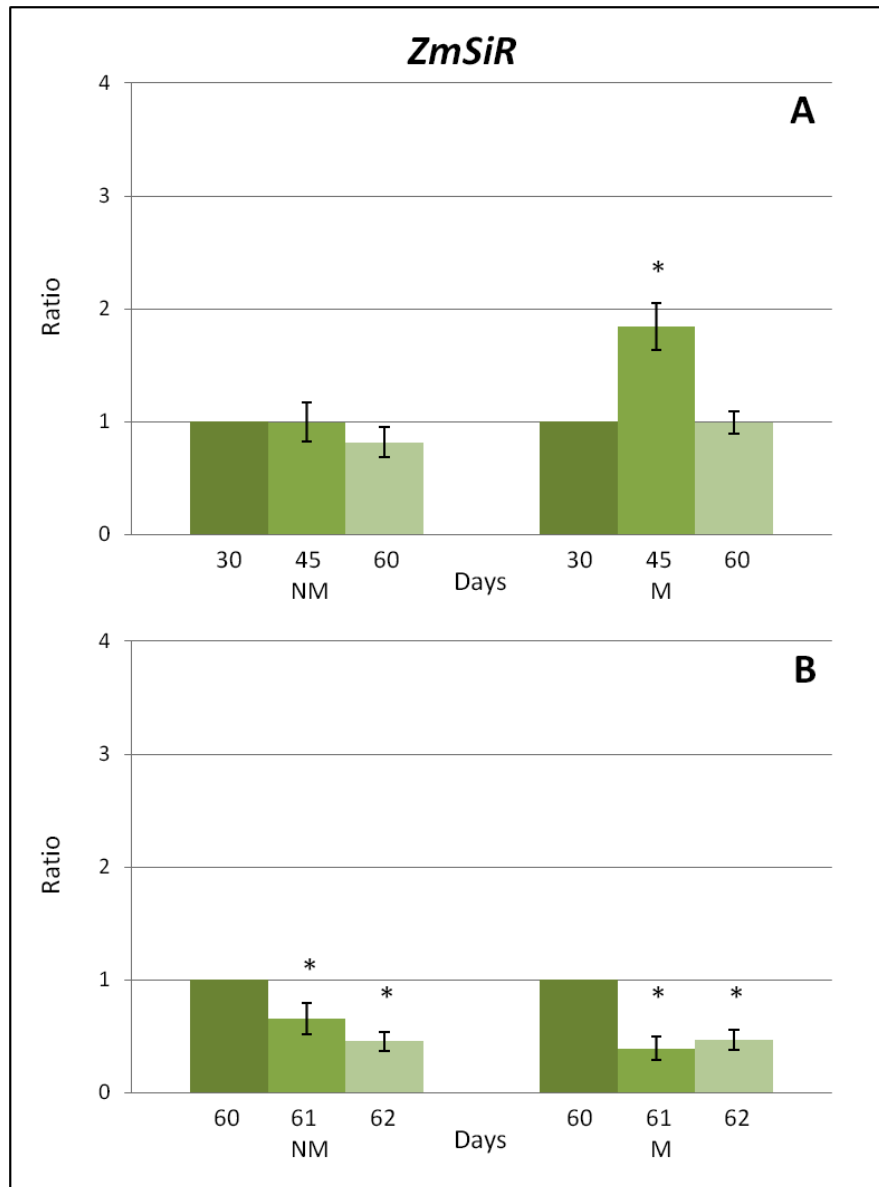
**Εικόνα 3.4:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmAPRL2* στα φύλλα μυκορριζικών (ανοιχτό πράσινο) και μη μυκορριζικών (σκούρο πράσινο) φυτών *Zea mays*. Για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης κάθε ημέρας χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας τα μη μυκορριζικά φυτά της αντίστοιχης ημέρας και ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της σμπικουτίνης. Η κίτρινη περιοχή του γραφήματος αντιστοιχεί στην περίοδο μετά την χορήγηση θείου. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

#### ➤ *ZmSiR*

Την ημέρα 45, ο αριθμός των μεταγραφημάτων του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο SiR παρέμεινε στα ίδια επίπεδα με την ημέρα 30, ενώ και την ημέρα 60 δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική αλλαγή στην έκφραση του, παρά μόνο μια μικρή τάση για μείωση της έκφρασης του συγκριτικά με την ημέρα 30. Από την άλλη πλευρά, την ημέρα 45 τα φυτά, που ανέπτυξαν συμβιωτική σχέση με τον μυκορριζικό μύκητα, αύξησαν τα επίπεδα έκφρασης του *ZmSiR*, ενώ την ημέρα 60 επανήλθαν στα ίδια επίπεδα με την ημέρα 30 (Εικόνα 3.5A).

Όσον αφορά την έκφραση του παραπάνω γονιδίου μετά τη προσθήκη  $SO_4^{2-}$ , τόσο στα μυκορριζικά όσο και στα μη μυκορριζικά φυτά παρατηρήθηκε η ίδια απόκριση. Πιο συγκεκριμένα στα μη μυκορριζικά φυτά η έκφραση του *ZmSiR* σταδιακά μειώθηκε την

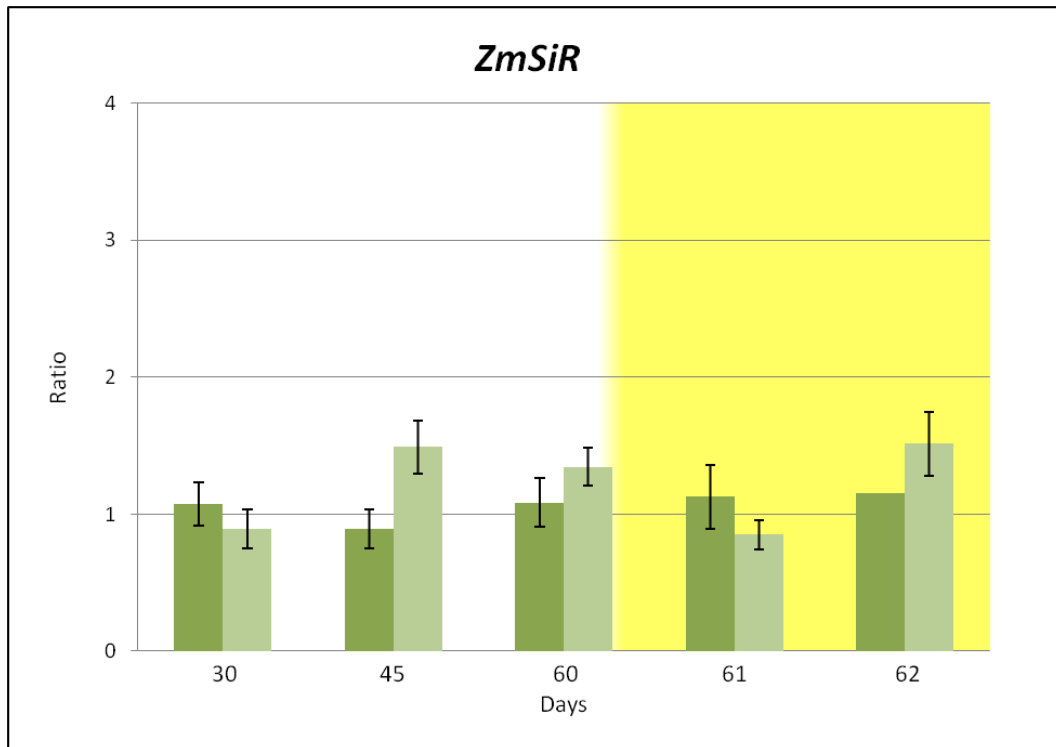
ημέρα 61 και 62. Παρομοίως, στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών η έκφραση του γονιδίου ήταν μικρότερη την ημέρα 61, ενώ την ημέρα 62 παρέμεινε σχεδόν στα ίδια χαμηλά επίπεδα με την ημέρα 61, χωρίς περαιτέρω μείωση (Εικόνα 3.5B).



**Εικόνα 3.5:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmSiR* στα φύλλα μυκορριζικών (δεξιά) και μη μυκορριζικών (αριστερά) φυτών *Zea mays*, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της ουμπικουτίνης. Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης την περίοδο έλλειψης θείου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η ημέρα 30 της κάθε μεταχείρισης (A), ενώ για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης μετά την προσθήκη θεικών χρησιμοποιήθηκε η ημέρα 60 (B). Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

Την ημέρα 30, η έκφραση του γονιδίου *ZmSiR* ήταν στα ίδια επίπεδα και στις 2 μεταχειρίσεις. Την ημέρα 45 και 60, παρατηρήθηκε μια μικρή υπερέκφραση του γονιδίου αυτού στα μυκορριζικά φυτά, χωρίς όμως οι διαφορές τους να είναι στατιστικά σημαντική.

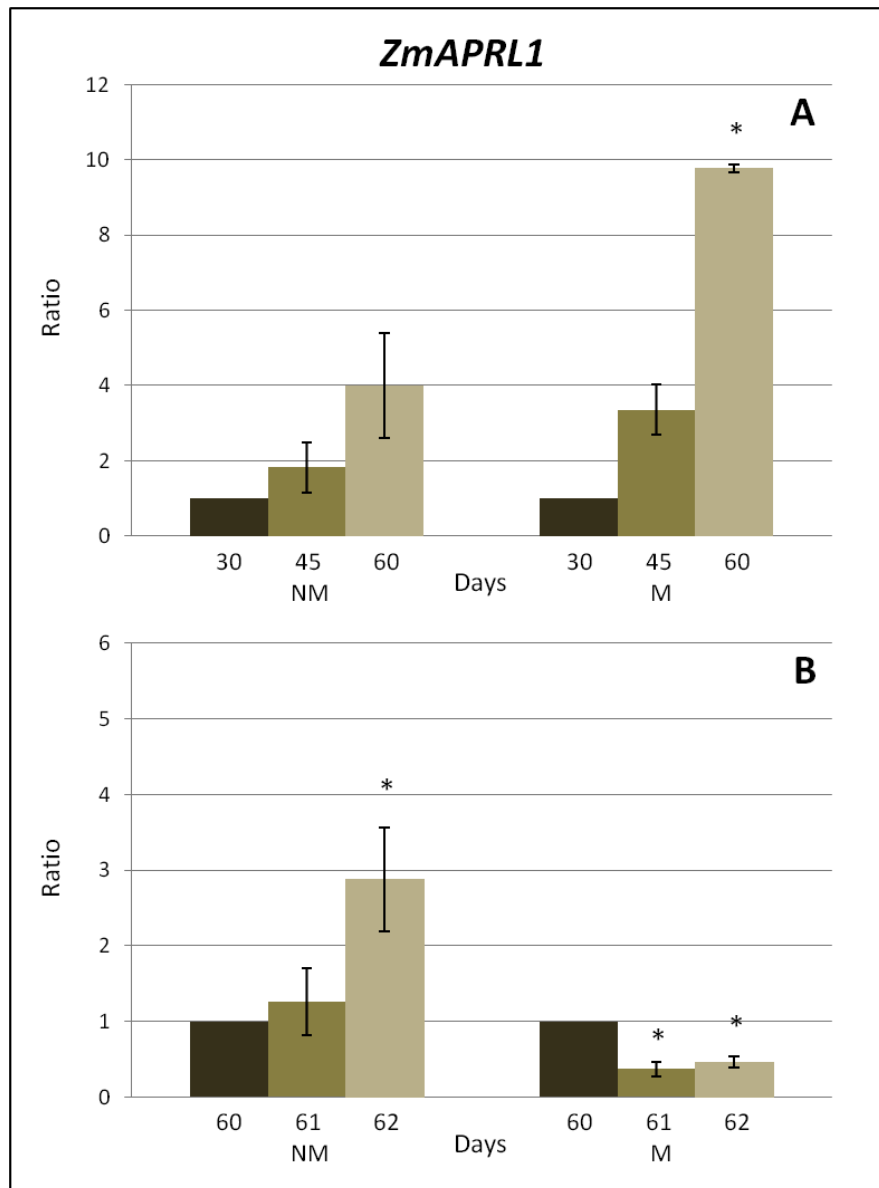
Την ημέρα 61 παρατηρείται μια τάση για υποέκφραση του *ZmSiR* στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών, συγκριτικά με τα μη μυκορριζικά, ωστόσο την ημέρα 62 παρατηρείται το αντίθετο (Εικόνα 3.6).



**Εικόνα 3.6:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmSiR* στα φύλλα μυκορριζικών (ανοιχτό πράσινο) και μη μυκορριζικών (σκούρο πράσινο) φυτών *Zea mays*. Για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης κάθε ημέρας χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας τα μη μυκορριζικά φυτά της αντίστοιχης ημέρας και ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της ουμπικουιλίνης. Η κίτρινη περιοχή του γραφήματος αντιστοιχεί στην περίοδο μετά την χορήγηση θείου. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

**3.3. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ZmAPRL1*, *ZmAPRL2* και *ZmSiR* στις ρίζες μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών υπό συνθήκες παρατεταμένης έλλειψης θείου και μετά την παροχή θείου.**

➤ *ZmAPRL1*

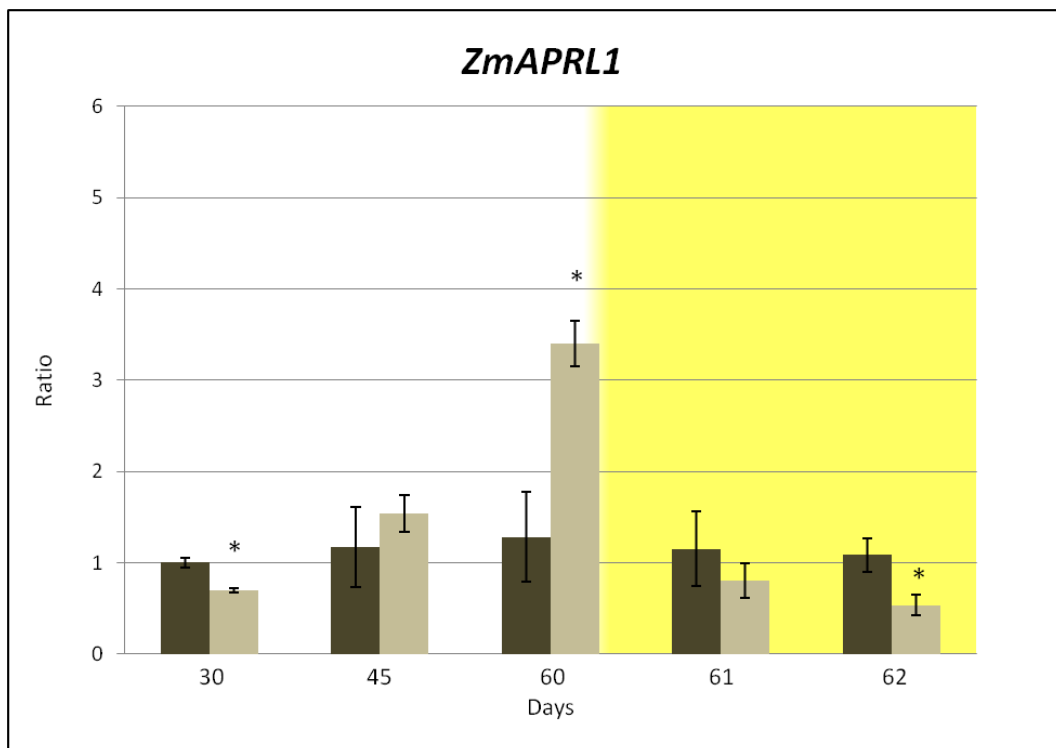


**Εικόνα 3.7 :** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmAPRL1* στις ρίζες μυκορριζικών (δεξιά) και μη μυκορριζικών (αριστερά) φυτών *Zea mays*, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της ομπικουτίνης. Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης την περίοδο έλλειψης θείου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η ημέρα 30 της κάθε μεταχείρισης (A), ενώ για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης μετά την προσθήκη θεικών χρησιμοποιήθηκε η ημέρα 60 (B). Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .



Όπως και στα φύλλα έτσι και στις ρίζες χρησιμοποιήθηκε η ίδια προσέγγιση για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα μυκορριζικά και μη μυκορριζικά φυτά πριν και μετά την χορήγηση S. Με βάση τα αποτελέσματα, στα μη μυκορριζικά φυτά τα επίπεδα έκφρασης του *ZmAPRL1* ήταν υψηλότερα την ημέρα 45 και 60, ωστόσο όχι στατιστικά σημαντικά, σε σχέση με την ημέρα 30. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασαν και τα μυκορριζικά φυτά, στα οποία παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου, με την ημέρα 60 να εμφανίζει 10 φορές υψηλότερη έκφραση σε σύγκριση με την ημέρα 30 (Εικόνα 3.7A).

Η προσθήκη  $SO_4^{2-}$  φαίνεται να είχε διαφορετικά αποτελέσματα στην έκφραση του γονιδίου *ZmAPRL1* μεταξύ των 2 μεταχειρίσεων. Στα μη μυκορριζικά φυτά, 24 ώρες μετά την χορήγηση  $SO_4^{2-}$ , η έκφραση του γονιδίου κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα με την ημέρα 60, ενώ 48 ώρες μετά παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης του. Αντιθέτως, τα μεταγραφήματα του *ZmAPRL1* στα δείγματα ριζών των μυκορριζικών φυτών ήταν στατιστικά σημαντικά λιγότερα τόσο την ημέρα 61 όσο και 62 (Εικόνα 3.7B).



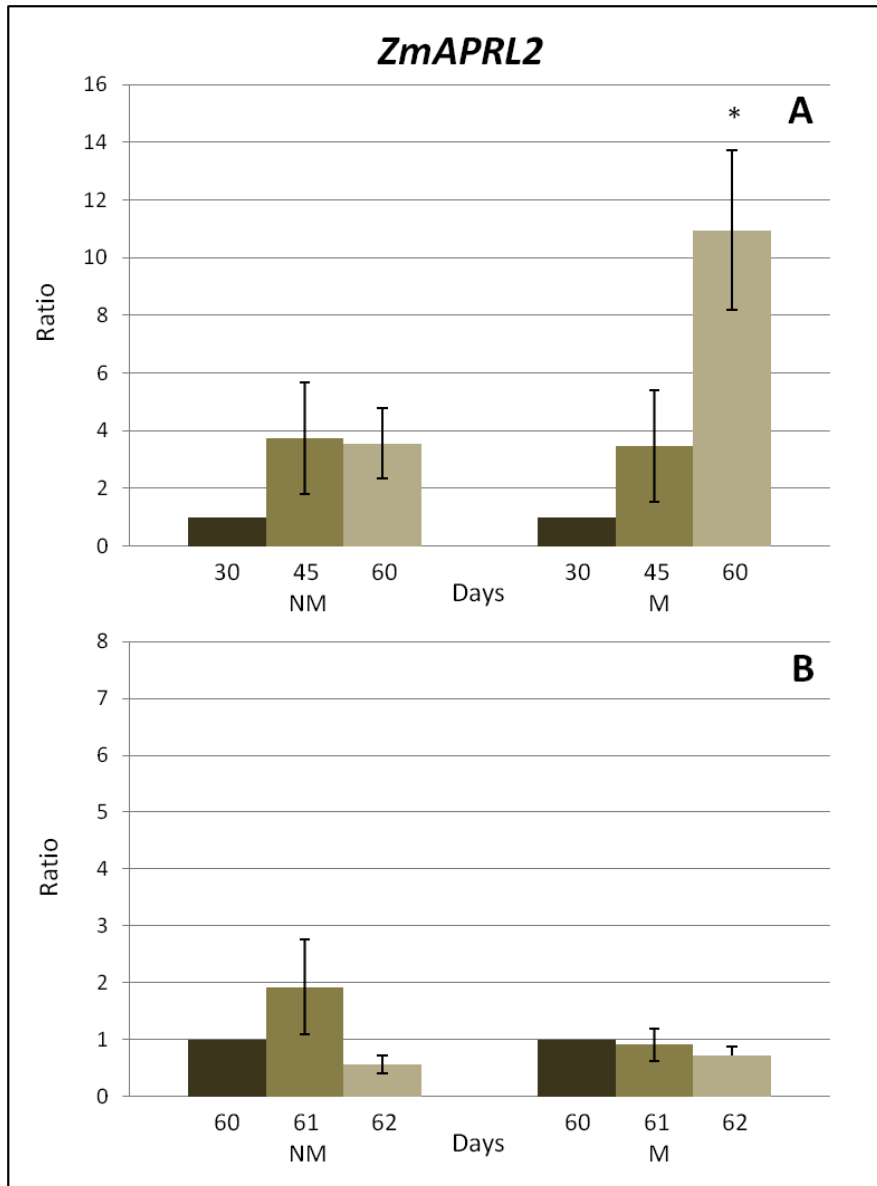
**Εικόνα 3.8:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmAPRL1* στις ρίζες μυκορριζικών (ανοιχτό καφέ) και μη μυκορριζικών (σκούρο καφέ) φυτών *Zea mays*. Για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης κάθε ημέρας χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας τα μη μυκορριζικά φυτά της αντίστοιχης ημέρας και ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της ομπικουτίνης. Η κίτρινη περιοχή του γραφήματος αντιστοιχεί στην περίοδο μετά την χορήγηση θείου. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

Συγκρίνοντας τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmAPRL1* μεταξύ των 2 μεταχειρίσεων, είναι φανερό πως την ημέρα 30 στα μυκορριζικά φυτά η έκφραση του γονιδίου ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη, ενώ την ημέρα 45 ήταν στα ίδια σχεδόν επίπεδα. Η παρατεταμένη έλλειψη S είχε σαν αποτέλεσμα την υπερέκφραση του γονιδίου την ημέρα 60 στα μυκορριζικά φυτά σε σχέση με το μάρτυρα. Ωστόσο, η προσθήκη  $\text{SO}_4^{2-}$  οδήγησε σε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αυτού την ημέρα 61 και 62 στα μυκορριζικά φυτά. Μάλιστα, την ημέρα 62 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 μεταχειρίσεων (Εικόνα 3.8).

➤ *ZmAPRL2*

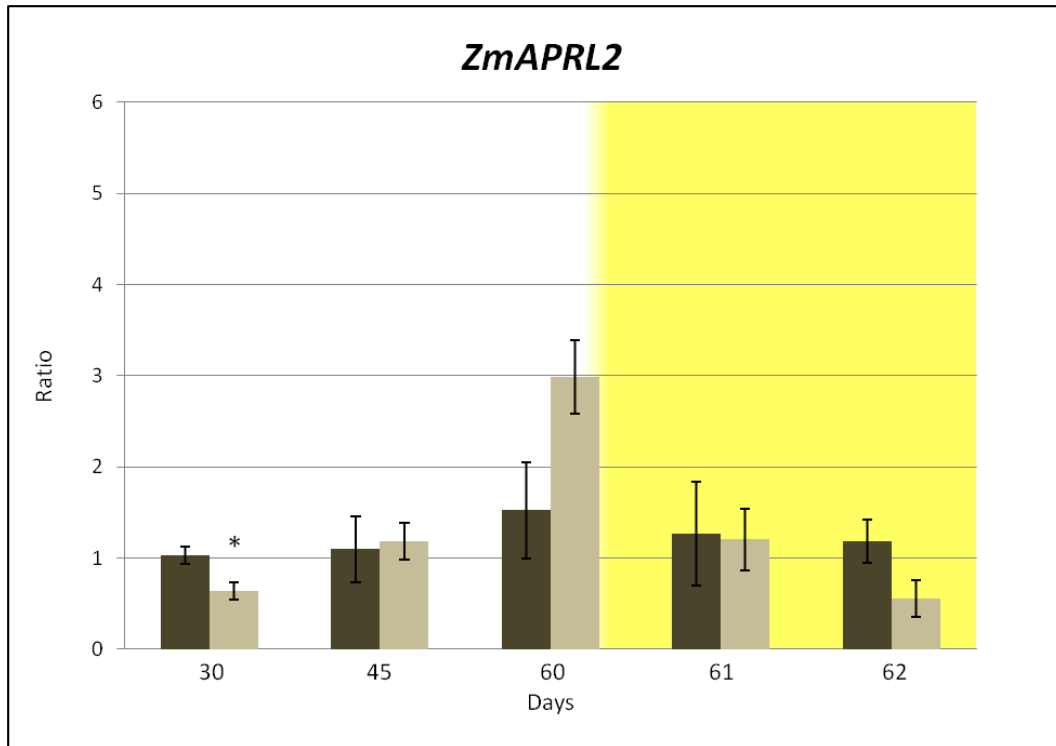
Την ημέρα 45 η έκφραση του γονιδίου *ZmAPRL2* στις ρίζες του μάρτυρα ήταν αυξημένη σε σύγκριση με την ημέρα 30, ενώ την ημέρα 60 διαμορφώθηκε περίπου στα ίδια επίπεδα με την ημέρα 45. Από την άλλη πλευρά, στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου μέχρι την ημέρα 60. Τη συγκεκριμένη ημέρα μάλιστα η σχετική έκφραση ήταν στατιστικά σημαντική υψηλότερη σε σύγκριση με την ημέρα 30 (Εικόνα 3.9A)

Η χορήγηση  $\text{SO}_4^{2-}$  δεν μετέβαλε σημαντικά τον αριθμό των μεταγραφημάτων του γονιδίου *ZmAPRL2* στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών, ο αριθμός των οποίων είχε μια τάση μικρής μείωσης με την πάροδο του χρόνου. Στα μη μυκορριζικά φυτά ωστόσο, η προσθήκη S οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *ZmAPRL2* 24 ώρες μετά την προσθήκη. Αντίθετα την ημέρα 62 τα επίπεδα έκφρασης ήταν μειωμένα (Εικόνα 3.9B).



**Εικόνα 3.9:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmAPRL2* στις ρίζες μυκορριζικών (δεξιά) και μη μυκορριζικών (αριστερά) φυτών *Zea mays*, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της ουμπικουϊνίνης. Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης την περίοδο έλλειψης θείου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η ημέρα 30 της κάθε μεταχείρισης (A), ενώ για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης μετά την προσθήκη θεικών χρησιμοποιήθηκε η ημέρα 60 (B). Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

Όπως και στη περίπτωση του γονιδίου *ZmAPRL1* και το γονίδιο *ZmAPRL2* ήταν στατιστικά σημαντικά υποεκφράσμενο στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών την ημέρα 30, σε σύγκριση πάντα με τα μη μυκορριζικά φυτά. Η εγκατάσταση του μυκορριζικού μυκητα εντός των ριζών των φυτών, οδήγησε σε υπερέκφραση την ημέρα 60. Την ημέρα 61 τα επίπεδα έκφρασης κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα και στις 2 μεταχειρίσεις, ενώ 48 ώρες μετά την προσθήκη  $SO_4^{2-}$  η έκφραση του γονιδίου ήταν χαμηλότερη στα μυκορριζικά φυτά έναντι αυτή στα φυτά του μάρτυρα (Εικόνα 3.10).

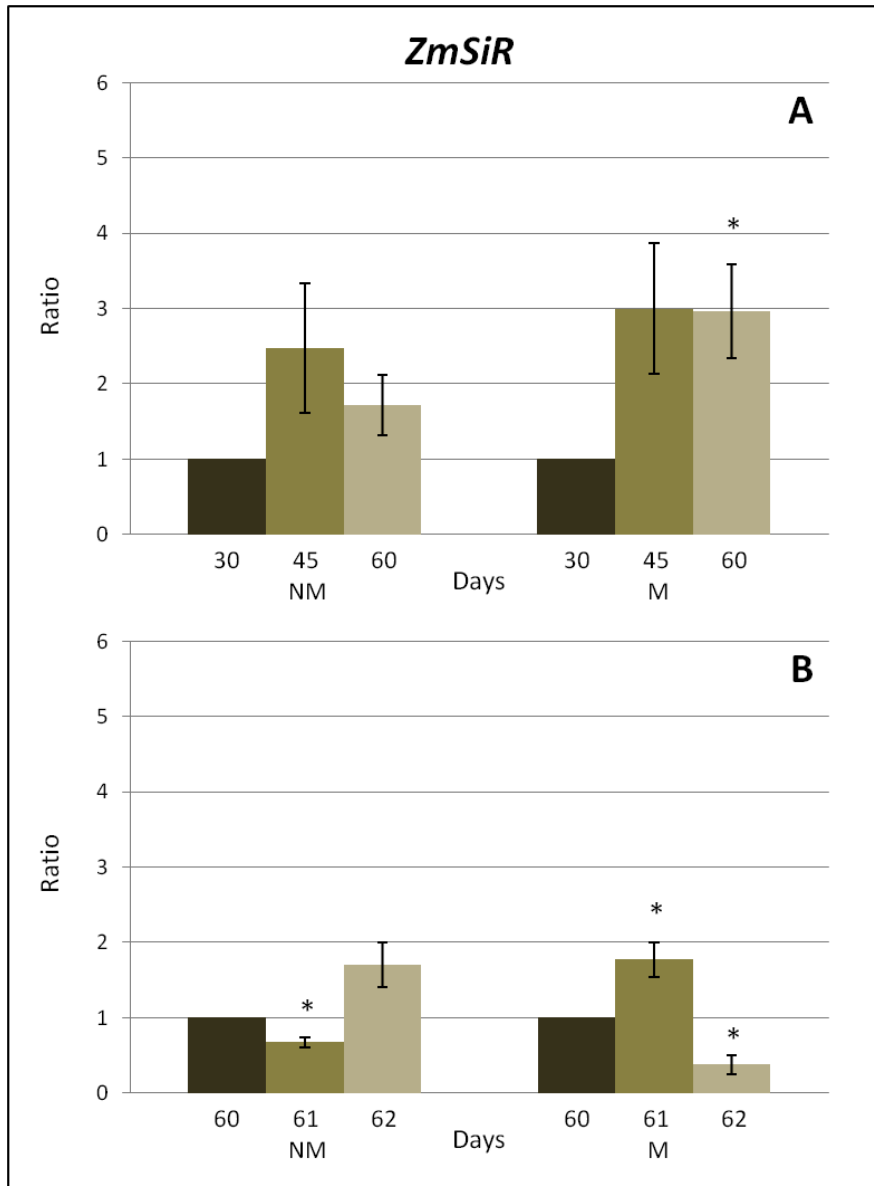


**Εικόνα 3.10:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ZmAPRL2 στις ρίζες μυκορριζικών (ανοιχτό καφέ) και μη μυκορριζικών (σκούρο καφέ) φυτών *Zea mays*. Για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης κάθε ημέρας χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας τα μη μυκορριζικά φυτά της αντίστοιχης ημέρας και ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της ουμπικουιλίνης. Η κίτρινη περιοχή του γραφήματος αντιστοιχεί στην περίοδο μετά την χορήγηση θείου. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

### ➤ *ZmSiR*

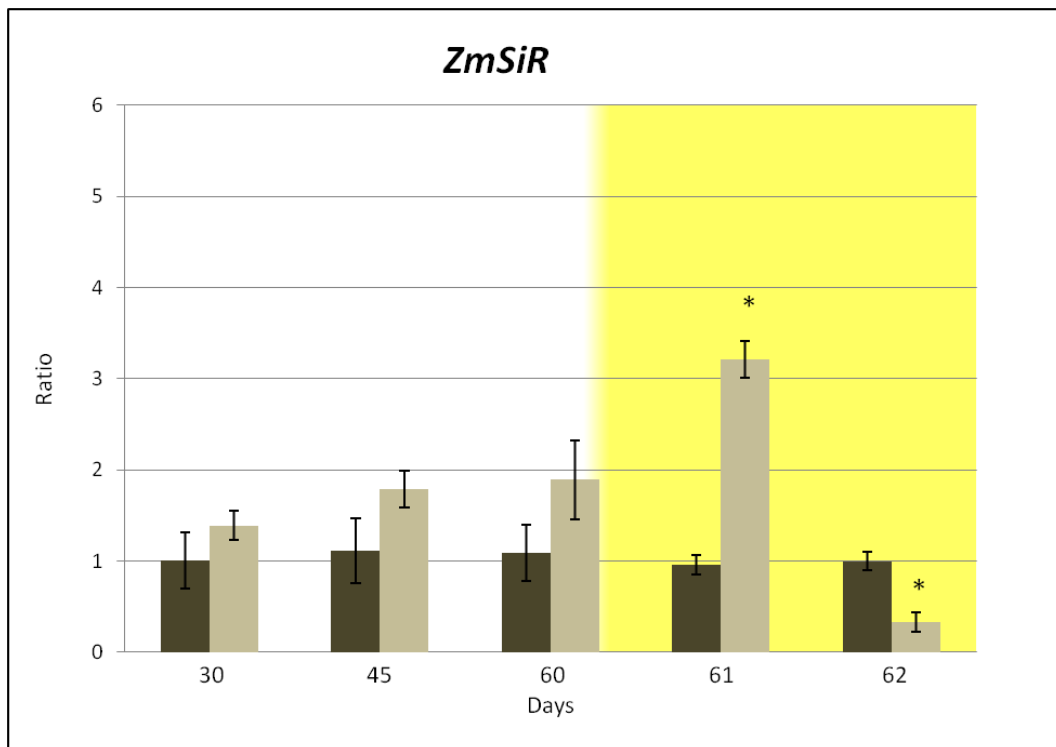
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmSiR* στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών ήταν υψηλότερα την ημέρα 45 και 60 σε σχέση με την ημέρα 30. Ωστόσο, μόνο την ημέρα 60 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των μη μυκορριζικών φυτών. Πιο συγκεκριμένα την ημέρα 45 η έκφραση του γονιδίου αυξήθηκε, ενώ την ημέρα 60 μειώθηκε πάλι, παραμένοντας ωστόσο σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με την ημέρα 30 (Εικόνα 3.11A)

Την ημέρα 61 στις ρίζες των μη μυκορριζικών φυτών παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης του ενζύμου που κωδικοποιεί το ένζυμο SiR. Από την άλλη μεριά, την ίδια ημέρα στα μυκορριζικά φυτά παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του, ενώ 48 ώρες μετά την προσθήκη S ο αριθμός των μεταγραφημάτων του παραπάνω γονιδίου ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερος (Εικόνα 3.11B).



**Εικόνα 3.11:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmSiR* στις ρίζες μυκορριζικών (δεξιά) και μη μυκορριζικών (αριστερά) φυτών *Zea mays*, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της ουμπικουιλίνης. Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης την περίοδο έλλειψης θείου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η ημέρα 30 της κάθε μεταχείρισης (A), ενώ για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης μετά την προσθήκη θεικών χρησιμοποιήθηκε η ημέρα 60 (B). Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

Την περίοδο έλλειψής S, με άλλα λόγια από την ημέρα 30 μέχρι και την ημέρα 60, η έκφραση του γονιδίου *ZmSiR* βρέθηκε υψηλότερη στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών, χωρίς όμως οι διαφορές τους να είναι στατιστικά σημαντικές. Με βάση τα αποτελέσματά μας, 24 ώρες μετά την χορήγηση  $\text{SO}_4^{2-}$  το γονίδιο *ZmSiR* συνεχίζει να υπερεκφράζεται στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών, ωστόσο την ημέρα 62 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υποέκφραση του γονιδίου στις μυκορριζικές ρίζες σε σύγκριση πάντα με τα μη μυκορριζικά φυτά (Εικόνα 3.12).



**Εικόνα 3.12:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ZmSiR* στις ρίζες μυκορριζικών (ανοιχτό καφέ) και μη μυκορριζικών (σκούρο καφέ) φυτών *Zea mays*. Για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης κάθε ημέρας χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας τα μη μυκορριζικά φυτά της αντίστοιχης ημέρας και ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της συμπικουιτίνης. Η κίτρινη περιοχή του γραφήματος αντιστοιχεί στην περίοδο μετά την χορήγηση θείου. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο 3 βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  SE. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά κάθε τιμής από τον αντίστοιχο μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

## Συζήτηση

---

#### 4. Συζήτηση

Είναι γνωστό, πως κατά την διάρκεια της μυκορριζικής συμβίωσης ο μυκορριζικός μύκητας επιδρά θετικά στη θρέψη του φυτού, τροφοδοτώντας το με ανόργανα θρεπτικά και νερό. Σε αντάλλαγμα το φυτό παρέχει στο συμβιωτικό μύκητα σάκχαρα (πηγές άνθρακα) που προέρχονται από τη φωτοσύνθεση (Smith and Smith, 2011). Η συμβίωση αυτή, όπως έχει αποδειχτεί, επιφέρει μια σειρά αλλαγών τόσο στην ανάπτυξη όσο και στο μεταβολισμό των φυτών. Πράγματι, μετά την εγκατάσταση της μυκορριζικής συμβίωσης ενεργοποιούνται ειδικοί μηχανισμοί πρόσληψης θρεπτικών μέσω συμβιωτικών μονοπατιών, καθώς επίσης έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στην έκφραση μεταφορέων που μετέχουν στη πρόσληψη και στη διακίνηση των θρεπτικών εντός του φυτού, όπως μεταφορείς P, N και S (Wipft *et al.*, 2014). Πρόσφατα, διαφορές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις αλλαγές σε κυτταρικό αλλά και σε μεταβολικό επίπεδο που επιφέρει η μυκορριζική εγκατάσταση εντός των ριζών και πως αυτή επηρεάζει την απόκριση των φυτών στην έλλειψη διαφορών θρεπτικών, όπως P και N.

Ωστόσο, μέχρι στιγμής ελάχιστες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη διαφορετική απόκριση μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών στην έλλειψη S, ενώ δεν υπάρχουν πληροφορίες για ταυτόχρονη έλλειψη Fe. Δυο πρόσφατες μελέτες με τη χρήση του φυτού *Medicago truncatula* έχουν φανερώσει πως τα μυκορριζικά φυτά παρουσιάζουν διαφορετική απόκριση στην έλλειψη S σε σχέση με τα μη μυκορριζικά. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση των φυτών στην έλλειψη S βρέθηκε μειωμένη στα μυκορριζικά φυτά που αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις P. Ενζυμα όπως το APR και διάφοροι μεταφορείς θειικών (SULTRs) υποεκφράζονται στα μυκορριζικά φυτά υπό συνθήκες -S, ως αποτέλεσμα ενός πιθανού συμβιωτικού μονοπατιού πρόσληψης S (Sieh *et al.*, 2012). Μάλιστα, η μυκορριζική συμβίωση έχει αποδειχθεί στο ίδιο φυτό ότι αυξάνει τη πρόσληψη και την αφομοίωση του S. Οι Wipf *et al.* (2014) μέσω transcriptomics analysis αναφέρουν πως σε μυκορριζικά φυτά *Medicago truncatula*, που αναπτύχθηκαν υπό -S συνθήκες, υπήρχαν διαφορές στην έκφραση χιλιάδων γονιδίων, αποδεικνύοντας πως η μυκορριζική συμβίωση εκτός από την θετική επίδραση στην θρεπτική κατάσταση του φυτού οδηγεί και σε αλλαγές στον μεταβολισμό του φυτού. Πολλά από αυτά τα μεταβολικά μονοπάτια είναι μονοπάτια που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στον μεταβολισμό του S. Γενικά, σύμφωνα με την μελέτη αυτή τα μυκορριζικά φυτά εμφανίζουν

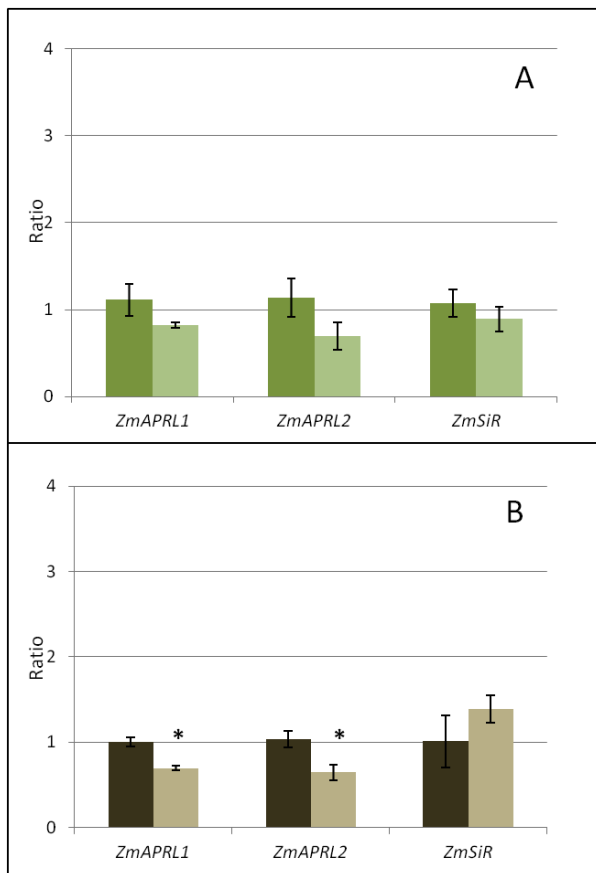


μειωμένη απόκριση την έλλειψη S (Wirf *et al.*, 2014). Έτσι λοιπόν, φαίνεται να επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ενός συμβιωτικού μηχανισμού πρόσληψης του S και μεταφοράς τους στο φυτό είτε σε οργανική είτε σε ανόργανη μορφή, όπως έχει προταθεί από τους Allen and Shacher-Hill (2009).

Στο πείραμα μας μυκορριζικά και μη-μυκορριζικά φυτά καλαμποκιού χρησιμοποιήθηκαν με στόχο την μελέτη της απόκρισης των φυτών στην μακροχρόνια έλλειψη S και μετά την χορήγηση S με την μορφή των  $SO_4^{2-}$ . Σημαντική διαφορά της μελέτης αυτής με τις άλλες, που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι πως η χορήγηση Fe έγινε σε αδιάλυτη μορφή, καθιστώντας την πρόσληψη του Fe δυσκολότερη για τα φυτά. Η παροχή δυσδιάλυτου Fe σε συνδυασμό με το γεγονός πως τα φυτά καλαμποκιού χρησιμοποιούν την στρατηγική II για την απορρόφηση του Fe, εντείνει την ανάγκη των φυτών σε οργανικό S. Πιο συγκεκριμένα, τα φυτά της στρατηγικής II για την πρόσληψη του Fe συνθέτουν και εκκρίνουν στην ριζόσφαιρα φυτοσιδηροφόρα (PS), πρόδρομο μόριο των οποίων είναι η μεθειονίνη. Με άλλα λόγια, τα φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες -Fe έχουν υψηλότερες ανάγκες σε ανηγμένο S. Επιπλέον, οι Forieri *et al.* (2017) αναφέρουν πως η ομοιόσταση του S και του Fe είναι οι πιο στενά συνδεδεμένες συγκριτικά με άλλα θρεπτικά, πιθανά λόγω της χρήσης των 2 παραπάνω θρεπτικών για τον σχηματισμό Fe-S clusters. Τα συμπλέγματα Fe-S αποτελούν προσθετικές ομάδες διαφόρων φυτικών ενζύμων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία τους.

### **Εγκατάσταση της μυκορριζικής συμβίωσης**

Από προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο μας έχει αποδειχθεί πως η εγκατάσταση της μυκορριζικής συμβίωσης πραγματοποιήθηκε γύρω στην ημέρα 45. Επομένως, από την ημέρα 45 και μετά τα φυτά θεωρούνται μυκορριζικά. Η παρατήρηση αυτή έγινε τόσο με την χρήση μοριακών τεχνικών όσο και με μικροσκοπική παρατήρηση τμημάτων ριζών, έπειτα από χρώση με κατάλληλη χρωστική Trypan Blue (Πετρήs 2014). Για τον παραπάνω λόγο την ημέρα 30 αναμένουμε να μην υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων μεταξύ μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών, καθότι αναπτύσσονται ακριβώς κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Πράγματι, την ημέρα 30 στα φύλλα των φυτών και των δυο μεταχειρίσεων οι σχετικές εκφράσεις όλων των υπό μελέτη γονιδίων δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά. Από την άλλη πλευρά όμως, την ίδια ημέρα και παρόλο που ο μύκητας δεν είχε εγκατασταθεί στις ρίζες των



**Εικόνα 4.1:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ZmAPRL1*, *ZmAPRL2* και *ZmSiR* την ημέρα 30 στα φύλλα (A) και στις ρίζες (B) μυκορριζικών (ανοιχτό χρώμα) και μη μυκορριζικών (σκούρο χρώμα) φυτών *Zea mays*, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα τα μη μυκορριζικά φυτά

φυτών, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υποέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις 2 ισομορφές του ενζύμου APR στις ρίζες των φυτών της μεταχείρισης με το μυκορριζικό μύκητα (Εικόνα 4.1). Πιθανά οι διαφορές αυτές να οφείλονται στις μεταβολικές αλλά και κυτταρικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στις ρίζες των φυτών με σκοπό της εγκατάστασης του μύκητα. Είναι γνωστό πως πριν από την πλήρη εγκατάσταση του μύκητα εντός των ριζών των φυτών προηγείται ένας μοριακός διάλογος μεταξύ του φυτού και του μύκητα, με στόχο τη προετοιμασία των δύο συμβιωτών για την εγκατάσταση της συμβιωτικής τους σχέσης.

### Η μυκορριζική συμβίωση τροποποιεί την απόκριση των φύλλων στην έλλειψη S.

Η αφομοίωση του S είναι μια διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα κυρίως στα φύλλα των φυτών. Μάλιστα, στα C<sub>4</sub> φυτά όπως το καλαμπόκι η αφομοίωση του S και η σύνθεση της κυστεΐνης λαμβάνει χώρα στα κύτταρα του δεσμικού κολεού (bundle sheath cells), ενώ η σύνθεση της γλουταθειόνης στα κύτταρα του μεσοφύλλου (Hopkins *et al.*, 2004). Λόγω της μεγάλης σημασίας των ενώσεων που περιέχουν S για την φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη των φυτών, τα φυτά διαθέτουν αυστηρούς μηχανισμούς ρύθμισης τόσο της πρόσληψης όσο και της αφομοίωσης του S. Πράγματι, η έκφραση των SULTRs και των ενζύμων που μετέχουν στον πρωτογενή μεταβολισμό του S ρυθμίζονται ανάλογα με την διαθεσιμότητα S αλλά και τις ανάγκες του φυτού σε ανηγμένο S (Vauclare *et al.*, 2002). Η ζήτηση σε S είναι αυξημένη είτε υπό συνθήκες έλλειψης S είτε σε περιπτώσεις διαφόρων βιοτικών ή αβιοτικών καταπονήσεων λόγω του ρόλου διαφόρων ενώσεων που περιέχουν S, όπως της GSH, στην απόκριση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης. Τα βασικά «σημεία»

ρύθμισης της ομοιόστασης του S είναι η πρόσληψη  $SO_4^{2-}$  από την ρίζα μέσω των ειδικών μεταφορέων, κυρίως της ομάδας 1, αλλά και το ένζυμο APR (Kopriva *et al.*, 2012). Το τελευταίο θεωρείται το ένζυμο που ελέγχει την ροή των  $SO_4^{2-}$  προς τον πρωτογενή μεταβολισμό του S. Η υπερέκφραση του ενζύμου APR αυξάνει την παραγωγή κυστεΐνης, ενώ κάτι αντίστοιχο δεν συμβαίνει με τα άλλα ένζυμα της αφομοίωσης του S, αποδεικνύοντας την σημασία του για τον έλεγχο του μονοπατιού. Ο έλεγχος κυρίως γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο, με τα επίπεδα έκφρασης να αυξάνονται όταν υπάρχει αυξημένη ζήτηση σε οργανικό S.

Την ημέρα 30 τόσο στα μυκορριζικά όσο και στα μη μυκορριζικά φυτά τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου APR ήταν σε παρόμοια επίπεδα. Μέχρι την ημέρα 30 τα φυτά ήδη αναπτύσσονταν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε συνθήκες έλλειψης S, επομένως αναμένουμε να αποκρίνονται στην έλλειψη αυτή έχοντας αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου APR. Γενικά, η απόκριση στην έλλειψη S είναι μια γρήγορη διαδικασία. Οι Hopkins *et al.* (2004) αναφέρουν πως σε φυτά καλαμποκιού η έκφραση του ενζύμου APR αυξήθηκε μόλις μια ημέρα μετά την έλλειψη του S από το υπόστρωμα. Ωστόσο, την ημέρα 45 και 60 στα μη-μυκορριζικά φυτά τα επίπεδα έκφρασης βρέθηκαν μειωμένα. Φαίνεται λοιπόν πως η μακροχρόνια έλλειψη S μείωσε την απόκριση των φυτών στην έλλειψη S. Μάλιστα, η χορήγηση S, δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης, φανερώνοντας έτσι πως τα μη μυκορριζικά φυτά την ημέρα 45 και 60 δεν αποκρίνονταν έντονα στην έλλειψη S, πιθανά λόγω μειωμένης ζήτησης. Το ίδιο διάστημα τα μυκορριζικά φυτά συνεχίζουν να αποκρίνονται στην έλλειψη S, διατηρώντας την έκφραση των γονιδίων *ZmAPRL1* και *ZmAPRL2* στα ίδια επίπεδα με την ημέρα 30.

Συμφώνα με τους Chorianoπουλου *et al.* (2015) το διάστημα αυτό (ημέρα 45-60) τα μη μυκορριζικά φυτά αισθάνονται εντονότερη έλλειψη Fe, λόγω αδυναμίας πρόσληψης του δυσδιάλυτου Fe. Πράγματι, είναι γνωστό πως τα φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες έλλειψης S παρουσιάζουν και έλλειψη Fe, λόγω αδυναμίας σύνθεσης PA για την πρόσληψη του Fe. Πιθανά, η παράλληλη μακροχρόνια έλλειψη Fe περιορίζει την απόκριση των μη μυκορριζικών φυτών στην έλλειψη S, ως προσαρμογή στις χαμηλές απαιτήσεις S για την σύνθεση Fe-S cluster (Vigani and Briat 2015). Από την άλλη τα μυκορριζικά φυτά, παρόλο που την ημέρα 60 είχαν τα ίδια επίπεδα Fe στο υπέργειο μέρος με τα φυτά του μάρτυρα, η απόκριση τους στην έλλειψη Fe ήταν μειωμένη λαμβάνοντας υπόψη το γονίδιο *ZmNAS3*

στα φύλλα ως δείκτη (Chorianopoulou *et al.*, 2015) και για το λόγο αυτό ίσως συνεχίζουν να αποκρίνονται έντονα στην έλλειψη S. Ακόμη, η υπερέκφραση των *ZmAPRL1* και *ZmAPRL2* στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών την ημέρα 45 και 60 σε σχέση με μη μυκορριζικά (Πίνακας 4.2), ίσως να αντικατοπτρίζει την ανάγκη των μυκορριζικών φυτών να διατηρήσουν εντονότερους ρυθμούς ανάπτυξης αλλά και φωτοσύνθεσης με στόχο την τροφοδοσία του μυκορριζικού μύκητα με σάκχαρα.

**Πίνακας 4.1:** Συγκεντρωτικός πίνακας των προτύπων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στα μη-μυκορριζικά (NM) και μυκορριζικά (M) φυτά τις ημέρες 30-60 (-S) και 60-62 (+S). Τα βέλη ↑ και ↓ δηλώνουν την υπερέκφραση και υποέκφραση κάθε γονιδίου αντίστοιχα. Το σύμβολο - δηλώνει ότι τα επίπεδα παρέμειναν σχετικά σταθερά.

| Φύλλα        | -S |   | +S |   |
|--------------|----|---|----|---|
|              | NM | M | NM | M |
| <i>APRL1</i> | ↓  | ↑ | -  | ↓ |
| <i>APRL2</i> | ↓  | ↑ | -  | ↓ |
| <i>SiR</i>   | -  | - | ↓  | ↓ |

Στα μυκορριζικά φυτά η χορήγηση  $SO_4^{2-}$  μείωσε τα επίπεδα έκφρασης και των 2 ισομορφών του ενζύμου όπως ήταν αναμενόμενο (Πίνακας 4.1). Πιο συγκεκριμένα, 48 ώρες μετά την προσθήκη  $SO_4^{2-}$  το γονίδιο *ZmAPRL1* βρέθηκε στατιστικά σημαντικά υποεκφρασμένο στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών σε σύγκριση με τα μη μυκορριζικά, υποδηλώνοντας πως τα μυκορριζικά φυτά έχουν μειωμένες ανάγκες σε S σε σχέση με το μάρτυρα (Πίνακας 4.2). Συμφώνα με προηγούμενη παρατήρηση, μετά την χορήγηση S τα μυκορριζικά φυτά προσλαμβάνουν Fe ευκολότερα σε σχέση με τα μη μυκορριζικά, πιθανά λόγω της ύπαρξης ενός συμβιωτικού μηχανισμού πρόσληψης. Ενδεικτικά την ημέρα 65 η συγκέντρωση Fe στο υπέργειο μέρος των μυκορριζικών φυτών ήταν 3 φορές υψηλότερη σε σχέση με αυτή των μη-μυκορριζικών (Πετρή 2014). Με άλλα λόγια, τα μη μυκορριζικά φυτά μετά την προσθήκη  $SO_4^{2-}$  έχουν υψηλότερες απαιτήσεις σε ανηγμένο S, για την σύνθεση NA με στόχο την απορρόφηση του Fe, ενώ τα μυκορριζικά φυτά λόγω της παρουσίας του μύκητα προσλαμβάνουν τον Fe ευκολότερα. Σε φυτά σιταριού, που έχουν τον ίδιο μηχανισμό πρόσληψης Fe με το καλαμπόκι, έχει παρατηρηθεί πως η έλλειψη Fe οδηγεί σε υπερέκφραση του *TdAPR* στα φύλλα σε σχέση με φυτά που αναπτύσσονται σε +Fe συνθήκες (Ciaffi *et al.*, 2013).

**Πίνακας 4.2:** Συγκεντρωτικός πίνακα των σχετικών επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών σε σχέση με τα μη μυκορριζικά. Τα σύμβολα + και - δηλώνουν την υπερέκφραση και υποέκφραση κάθε γονιδίου αντίστοιχα. Το σύμβολο  $\approx$  δηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης δεν παρουσίασαν διαφορά μεταξύ των 2 μεταχειρίσεων. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά.

| Φύλλα | APRL1     | APRL2     | SiR       |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 45    | +*        | +         | +         |
| 60    | +*        | +*        | $\approx$ |
| 61    | $\approx$ | $\approx$ | $\approx$ |
| 62    | -*        | $\approx$ | $\approx$ |

### **Έκφραση του γονιδίου *ZmSiR* στα φύλλα μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών.**

Τα θειώδη ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) που παράγονται από τη δράση του ενζύμου APR, χρησιμοποιούνται ως υποστρώμα από το ένζυμο SiR από το οποίο παράγεται ανιόν του θείου ( $\text{S}^{2-}$ ). Το τελευταίο χρησιμοποιείται για την συνθήση της κυστεΐνης. Όπως είναι φανερό, το ένζυμο αυτό είναι πολύ σημαντικό καθότι αποτελεί ένα “bottleneck” στο αφομοιωτικό μονοπάτι του S και παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των φυτών έναντι της τοξικότητας του  $\text{SO}_3^{2-}$ . Η εκφράση του εντοπίζεται τόσο στις ρίζες όσο και στα φύλλα, με την εκφράση στα φύλλα να είναι ψηλότερη (Παράρτημα 4). Γενικά, η εκφράση του είναι σταθερή και δεν επηρεάζεται έντονα από τις διαθεσιμές ποσότητες S, σε αντίθεση με άλλα ένζυμα του αφομοιωτικού μονοπατιού του S. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί πως η μακροχρόνια έλλειψη S οδηγεί στην αύξηση του αριθμού των μεταγραφημάτων του γονιδίου *SiR* (Bork *et al.*, 1998).

Από την ημέρα 30 έως και την ημέρα 60 και στις δύο μεταχειρίσεις η έκφραση του *ZmSiR* ήταν σταθερή, ενώ παράλληλα δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση μεταξύ μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών (Πίνακας 4.1 και 4.2). Η προσθήκη  $\text{SO}_4^{2-}$  οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης και στις 2 μεταχειρίσεις. Πιθανά, ήδη από την ημέρα 30 η παρατεταμένη έλλειψη S είχε οδηγήσει σε αύξηση των μεταγραφημάτων και για αυτό το λόγο η προσθήκη  $\text{SO}_4^{2-}$  είχε σαν αποτέλεσμα τη καταστολή της έκφρασης του. Έτσι, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στα φύλλα δεν επηρεάστηκε από την μυκορριζική συμβίωση, αναδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο του ενζύμου αυτού για την προστασία των κυττάρων.

## Η παρατεταμένη έλλειψη θείου επάγει την αφομοίωση του S στη ρίζα

Η αφομοίωση του S είναι μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα κυρίως στα φύλλα των φυτών χρησιμοποιώντας ενέργεια που προέρχεται από τη φωτοσύνθεση. Ωστόσο, η αφομοίωση λαμβάνει χώρα και στα κύτταρα της ρίζας. Συμφώνα με την MGDDB και τα τρία υπό μελέτη γονίδια εκφράζονται και στα διάφορα τμήματα της ρίζας των φυτών καλαμποκιού, ωστόσο σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα φύλλα (Παράρτημα 4). Ειδικότερα, η έκφραση του ενζύμου APR αυξάνεται στη ρίζα υπό συνθήκες έλλειψης S, ως απόκριση στη μειωμένη διαθεσιμότητα S, ενώ παράλληλα παρατηρείται αύξηση του λόγου υπογείου/υπεργείου με στόχο την καλύτερη διερεύνηση του εδάφους και πρόσβαση σε οποία διαθέσιμα  $SO_4^{2-}$  (Hopkins *et al.*, 2004). Από την άλλη, είναι γνωστό πως τα φυτά της στρατηγικής II τα οποία παράγουν PS έχουν αυξημένες ανάγκες σε S στη ρίζα. Μάλιστα στο σιτάρι έχει παρατηρηθεί πως υπό συνθήκες -Fe επάγεται η έκφραση των ενζύμων που μετέχουν στον μεταβολισμό του S στη ρίζα, υποδεικνύοντας πως αυξάνονται οι ανάγκες για αφομοίωση του S στο ριζικό σύστημα (Ciaffi *et al.*, 2013).

**Πίνακας 4.3:** Συγκεντρωτικός πίνακας των προτύπων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στα μη-μυκορριζικά (NM) και μυκορριζικά (M) φυτά τις ημέρες 30-60 (-S) και 60-62 (+S). Τα βέλη ↑ και ↓ δηλώνουν την υπερέκφραση και υποέκφραση κάθε γονιδίου αντίστοιχα. Το σύμβολο - δηλώνει ότι τα επίπεδα παρέμειναν σχετικά σταθερά.

| Ρίζες        | -S |    | +S |    |
|--------------|----|----|----|----|
|              | NM | M  | NM | M  |
| <b>APRL1</b> | ↑  | ↑* | ↑  | ↓  |
| <b>APRL2</b> | ↑  | ↑* | -  | -  |
| <b>SiR</b>   | ↑  | ↑  | ↓↑ | ↑↓ |

Συμφώνα με τα αποτελέσματα μας, η παρατεταμένη έλλειψη S οδήγησε σε μια ενίσχυση της έκφρασης των APR και SiR στις ρίζες τόσο των μυκορριζικών όσο και μη μυκορριζικών φυτών την ημέρα 45 και 60 (Πίνακας 4.3). Επομένως, η παρατήρηση μας αυτή υποδηλώνει πως δίνεται προτεραιότητα στην αφομοίωση του S στη ρίζα, λόγω της ταυτόχρονης έλλειψης και των δύο θρεπτικών.

Ωστόσο, η αύξηση της έκφρασης των παραπάνω ενζύμων ήταν μεγαλύτερη στην περίπτωση των μυκορριζικών φυτών. Ιδίως, την ημέρα 60 τόσο τα ένζυμα APR όσο και SiR ήταν στατιστικά σημαντικά υπερεκφρασμένα στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών (Πίνακας 4.4). Ακριβώς την ίδια εικόνα παρουσίαζε και ο μεταφορέας SULTR1;1 το ίδιο διάστημα,

σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη (Τσούτσουρα 2016). Το ένζυμο APR μαζί με τους μεταφορείς SULTR1;1 χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την απόκριση των φυτών στην έλλειψη S, καθώς είναι τα σημεία βασικά σημεία ελέγχου της ομοιόστασης του S (Bohrer and Takahashi, 2016). Επομένως, η παρατήρηση αυτή ίσως υποδηλώνει την εντονότερη απόκριση των μυκορριζικών ριζών στην μακροχρόνια έλλειψή S. Πιθανά, η διαφορετική απόκριση των μυκορριζικών φυτών ίσως αντικατοπτρίζει την ανάγκη τους να διατηρήσουν εντονότερους ρυθμούς ανάπτυξης για την διατήρηση της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης.

Η διαφορετική απόκριση στην περίπτωση των φυτών καλαμποκιού ίσως οφείλεται εν μέρει στην ταυτόχρονη χαμηλή διαθεσιμότητα P και στην αδυναμία πρόσληψης Fe. Οι μυκορριζικοί μύκητες, όπως είναι γνωστό, τροφοδοτούν τα μυκορριζικά φυτά με P δίνοντας πλεονέκτημα στα μυκορριζικά φυτά έναντι των μη μυκορριζικών. Παράλληλα οι Chorianopoulou *et al.* (2015) αναφέρουν πως τα μη μυκορριζικά φυτά αισθάνονται εντονότερη έλλειψη Fe. Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο NAS1 βρέθηκε υποεκφρασμένο στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών την ημέρα 60 υποδηλώνοντας πως τα μυκορριζικά φυτά δεν αποκρίνονται τόσο έντονα στην έλλειψη Fe, ίσως λόγω της παρουσίας του συμβιωτικού μύκητα. Η εντονότερη παρατεταμένη αδυναμία πρόσληψης Fe στα φυτά του μάρτυρα ίσως περιορίζει την απόκριση στην έλλειψη S, ως προσαρμογή στις χαμηλές απαιτήσεις S για την σύνθεση συμπλεγμάτων Fe-S (Vigani and Briat 2015).

Η εντονότερη έκφραση των ενζύμων APR και SiR στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών ίσως οφείλεται στην ίδια την παρουσία του μύκητα. Γενικά η μυκορριζική συμβίωση δημιουργεί τροποποιήσεις στην αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος καθώς επίσης αλλάζει την έκφραση γονιδίων που μετέχουν σε ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια (Wirf *et al.*, 2014). Παράλληλα περισσότερα σάκχαρα διακινούνται προς τη ρίζα για την παροχή πηγών C στο μυκορριζικό μύκητα. Είναι γνωστό πως η έκφραση αλλά και η δράση των ενζύμων της αφομοίωσης του S είναι στενά συνδεδεμένη με τον μεταβολισμό του άνθρακα (Vauclare *et al.*, 2002).

**Πίνακας 4.4:** Συγκεντρωτικός πίνακα των σχετικών επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών σε σχέση με τα μη μυκορριζικά. Τα σύμβολα + και - δηλώνουν την υπερέκφραση και υποέκφραση κάθε γονιδίου αντίστοιχα. Το σύμβολο  $\approx$  δηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης δεν παρουσίασαν διαφορά μεταξύ των 2 μεταχειρίσεων. Το \* συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά.

| Ρίζες | APRL1     | APRL2     | SiR       |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 45    | $\approx$ | $\approx$ | $\approx$ |
| 60    | +*        | +         | +         |
| 61    | $\approx$ | $\approx$ | +         |
| 62    | -*        | -         | -         |

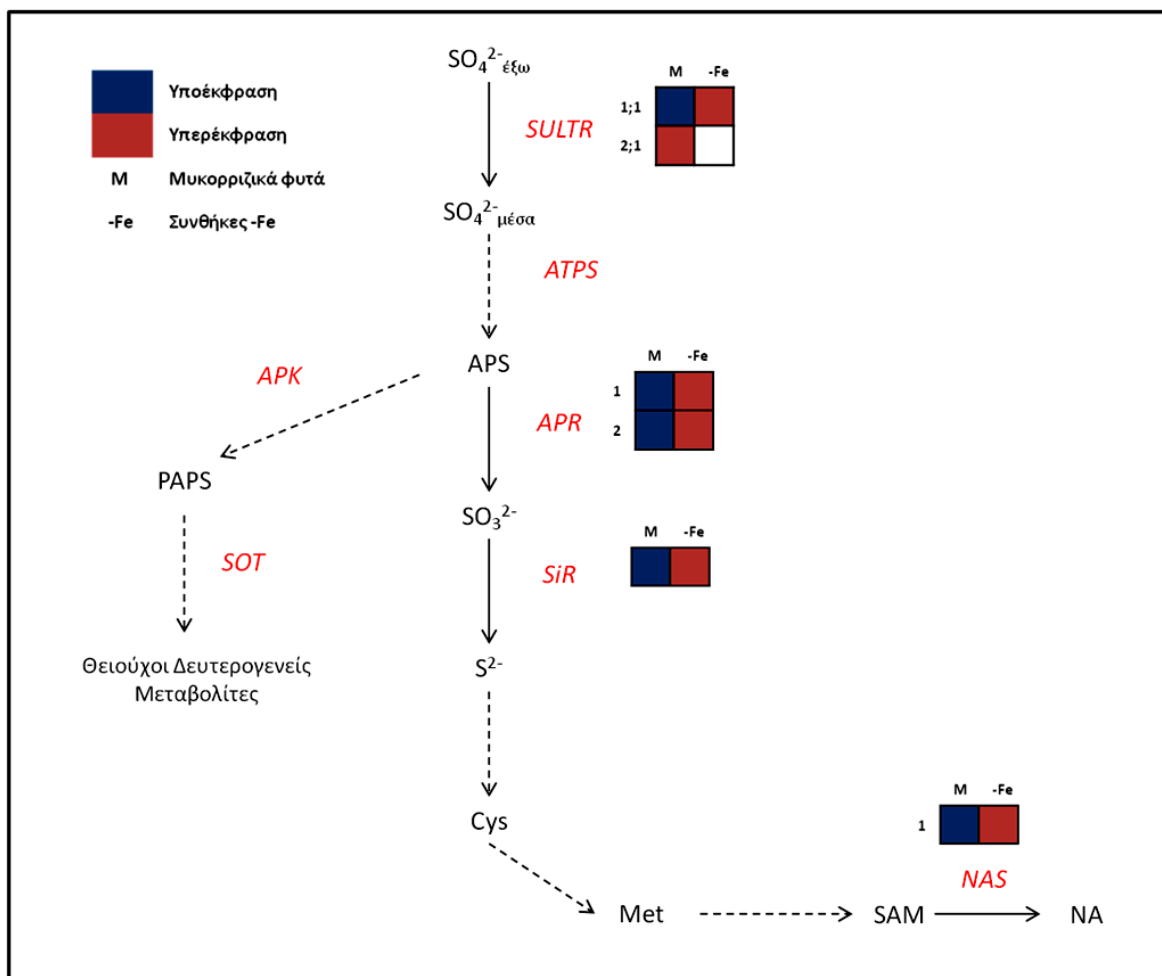
### Η μυκορριζική συμβίωση επέδρασε στην απόκριση των φυτών στην χορήγηση $SO_4^{2-}$ μετά από παρατεταμένη έλλειψη S

Είναι γενικά αποδεκτό, πως η παροχή S με την μορφή των  $SO_4^{2-}$  σε φυτά που αναπτύσσονται υπό συνθήκες έλλειψης S οδηγεί σε μείωση των επιπέδων έκφρασης των ενζύμων που μετέχουν στον πρωτογενή μεταβολισμό του S, με βασικότερο το ενζυμο APR. Στο πείραμα μας η χορήγηση  $SO_4^{2-}$  οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης του *ZmAPRL1* στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών, υποδηλώνοντας ότι όντως η χορήγηση  $SO_4^{2-}$  οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου.

Αντίθετα, κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση των μη μυκορριζικών φυτών. Πιο συγκεκριμένα, στα φυτά του μάρτυρα η χορήγηση S είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των μεταγραφημάτων του *ZmAPRL1* (Πίνακας 4.3). Μάλιστα, την ημέρα 62 το γονίδιο αυτό ήταν υπερέκφρασμένο στις ρίζες των μη μυκορριζικών φυτών. Αντίστοιχη υπερέκφραση παρατηρήθηκε και για τον *SULTR1;1* την ημέρα 62 (Τσούτσουρα 2016). Με μια πρώτη ματιά η απόκριση αυτή φαίνεται μη αναμενόμενη. Ωστόσο, με μια πιο λεπτομερή παρατήρηση και σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες, η επαγωγή αυτή της έκφρασης πιθανά οφείλεται στις υψηλότερες ανάγκες των μη μυκορριζικών φυτών για οργανικό S. Η χορήγηση  $SO_4^{2-}$  στα μη μυκορριζικά φυτά οδήγησε στην αύξηση της έκφρασης του *ZmNAS1* στις ρίζες των μη μυκορριζικών φυτών το οποίο μετέχει στη σύνθεση φυτοσιδητοφόρων, υποδηλώνοντας την ανάγκη των φυτών για πρόσληψη Fe (Σαρίδης 2015). Οι Chorianoπουλου *et al.* (2015) αναφέρουν πως φαίνεται να υπάρχει ένα συμβιωτικό μονοπάτι αφομοίωσης του Fe ή πως ο μυκορριζικός μύκητας αλλάζει την αίσθηση του φυτού στην έλλειψη Fe. Με άλλα λόγια, υποθέτουμε πως μετά την χορήγηση S τα μυκορριζικά φυτά αποκρίνονται σαν +S/+Fe συνθήκες, ενώ τα μη μυκορριζικά



αποκρίνονται σε συνθήκες +S/-Fe (Εικόνα 4.2). Είναι γνωστό πως φυτά της στρατηγικής II, όπως το καλαμπόκι, σε συνθήκες έλλειψης Fe παρουσιάζουν απόκριση και σε έλλειψη S, επάγοντας τα γονίδια που μετέχουν στην πρόσληψη και την αφομοίωση του S στη ρίζα (Forieri *et al.*, 2017). Κάτι αντίστοιχο αναφέρουν και οι Ciaffi *et al.* (2013) σε φυτά σιταριού που αναπτύχθηκαν σε έλλειψη S ή Fe ή ταυτόχρονη έλλειψη και των δύο. Τέλος, εκτός των γονιδίων που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο μεταφορέας SULTR2;1 ήταν υπερεκφράσμενος στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών την ημέρα 62 (Εικόνα 4.2). Ο μεταφορέας αυτός ελέγχει την μεταφορά των  $SO_4^{2-}$  από το ριζικό σύστημα προς τα φύλλα μέσω του ξύλου. Η αυξημένη έκφραση του στα μυκορριζικά φυτά υποδηλώνει την εντονότερη μεταφορά του S προς το υπέργειο μέρος, πιθανά λόγω μικρότερων αναγκών στο ριζικό σύστημα, σε σύγκριση πάντα με τα φυτά του μάρτυρα, ενισχύοντας την παραπάνω υπόθεση.



**Εικόνα 4.2:** Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης των βασικών γονιδίων που μετέχουν στην πρόσληψη (*SULTR1;1, 2;1*), αφομοίωση του S (*APR1,2, SiR*) και στην απόκριση των φυτών στην έλλειψη Fe (*NAS*). Τα δεδομένα για τα μυκορριζικά φυτά (M) αφορούν την ημέρα 62 (+S/FePO<sub>4</sub>), ενώ τα δεδομένα για τις συνθήκες -F αντιστοιχούν στην αναμενόμενη απόκριση των φυτών στις συνθήκες αυτές (+S/-Fe) με βάση την βιβλιογραφία (Τσούτσουρα 2016, Chorianopoulou *et al.*, 2015, Ciaffi *et al.*, 2013).

## Η έκφραση του γονιδίου *ZmSiR* στις ρίζες των μυκορριζικών και μη μυκορριζικών φυτών.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το ένζυμο SiR είναι ένα σημαντικό ένζυμο για τον μεταβολισμό του S αλλά και για την προστασία των φυτικών κυττάρων από την τοξικότητα των  $SO_3^{2-}$ . Γενικά, στο ριζικό σύστημα η έκφραση του είναι σταθερή και μικρότερη από αυτή στα φύλλα. Η παρατεταμένη έλλειψη S έχει παρατηρηθεί πως αυξάνει την έκφραση του στις ρίζες των φυτών. Στο σιτάρι τόσο η έλλειψη S όσο και Fe οδηγεί σε επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *TdSiR* στις ρίζες (Ciaffi *et al.*, 2013). Κάτι αντίστοιχο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση τόσο των μυκορριζικών όσο και των μη μυκορριζικών φυτών (Πίνακας 4.3). Ωστόσο, έπειτα την χορήγηση  $SO_4^{2-}$  τα μυκορριζικά φυτά είχαν διαφορετική απόκριση σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, 24 ώρες μετά την προσθήκη S η έκφραση του *SiR* μειώθηκε στα μη μυκορριζικά φυτά πιθανά λόγω της παρουσίας  $SO_4^{2-}$ , τα οποία καταστέλλουν την έκφραση του λειτουργώντας σαν σήμα. Στα μυκορριζικά φυτά το ίδιο διάστημα το γονίδιο *ZmSiR* υπερεκφράστηκε. Η γρήγορη είσοδος των  $SO_4^{2-}$  στο φυτό, είτε μέσω των μεταφορέων SULTR1;1 είτε μέσω του μυκορριζικού μύκητα, δημιουργήσε την ανάγκη προστασίας των φυτών από  $SO_3^{2-}$  αυξάνοντας έτσι την έκφραση του *ZmSiR*. Από την άλλη μεριά, την ημέρα 62 το ίδιο γονίδιο βρέθηκε υποεκφρασμένο στα μυκορριζικά φυτά (Πίνακας 4.4). Από την παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω για το ένζυμο APR, είναι φανερό πως τα μη μυκορριζικά φυτά έχουν αυξημένες ανάγκες για αφομοίωση του S στη ρίζα για την πρόσληψη του δυσδιάλυτου Fe και μετά την προσθήκη  $SO_4^{2-}$ , σε σχέση με τα μυκορριζικά. Οι μικρότερες ανάγκες των μυκορριζικών φυτών οφείλονται στην πρόσληψη Fe μέσω ενός συμβιωτικού μονοπατιού όπως έχει προταθεί από τους Chorianopoulou *et al.* (2015).

## Συμπεράσματα

---

## 5. Συμπεράσματα

- Τα μυκορριζικά φυτά παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *ZmAPRL1* και *ZmAPRL2* την ημέρα 45 και 60, υποδηλώνοντας πως τα μυκορριζικά φυτά αποκρίνοντας εντονότερα στην παρατεταμένη έλλειψη S σε σχέση με τα μη-μυκορριζικά, πιθανά για να διατηρήσουν εντονότερους ρυθμούς ανάπτυξης για την τροφοδοσία του μύκητα με φωτοσυνθετικά υλικά.
- Η προσθήκη  $\text{SO}_4^{2-}$  οδήγησε στη μείωση της έκφρασης όλων των υπό μελέτη ενζύμων στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών. Την ημέρα 62 το γονίδιο *ZmAPRL1* ήταν υποεκφράζόμενο στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών, πιθανά λόγω των χαμηλότερων απαιτήσεων των μυκορριζικών φυτών σε οργανικό S για την πρόσληψη του δυσδιάλυτου Fe.
- Η έκφραση του *ZmSiR* στα φύλλα δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων, τόσο υπό συνθήκες έλλειψης S όσο και μετά την χορήγηση  $\text{SO}_4^{2-}$ . Αυτή η παρατήρηση καταδεικνύει την μεγάλη σημασία του ενζύμου αυτού για τα φυτικά κύτταρα.
- Ακόμη, με βάση τα αποτελέσματα μας είναι φανερό πως η παρατεταμένη έλλειψη S οδήγησε σε επαγωγή της αφομοίωσης του S στις ρίζες και στις δύο μεταχειρίσεις. Ωστόσο, η επαγωγή ήταν υψηλότερη στα μυκορριζικά φυτά την ημέρα 45 και 60 σε σχέση με τα μη-μυκορριζικά.
- Οι ρίζες των μυκορριζικών φυτών παρουσίασαν τελείως αντίθετη απόκριση στην προσθήκη  $\text{SO}_4^{2-}$  σε σχέση με τα μη-μυκορριζικά. Οι διαφορές εντοπιστήκαν κυρίως στην έκφραση του *ZmAPRL1*.
- Οι παραπάνω παρατηρήσεις σε συνδυασμό με δεδομένα των εκφράσεων των γονιδίων ομοιόστασης του Fe, μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η διαφορετική απόκριση ίσως οφείλεται στην διαφορετική ικανότητα των μυκορριζικών έναντι των μη-μυκορριζικών φυτών για την απορρόφηση του  $\text{FePO}_4$

- Επιβεβαιώνεται η στενή σύνδεση του μεταβολισμού του S και του Fe, καθώς επίσης ενισχύεται η προηγούμενη υπόθεση για την ύπαρξη ενός πιθανού συμβιωτικού μηχανισμού πρόσληψης Fe.

## Βιβλιογραφία

---

## 6. Βιβλιογραφία

- Allen J.W., and Shachar-Hill Y. (2009) Sulfur transfer through an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* 149: 549-560.
- Astolfi S., Zuchi S., Cesco S., Sanità di Toppi L., Pirazzi D., Badiani M., Varanini Z., Pinton R. (2006) Fe deficiency induces sulphate uptake and modulates redistribution of reduced sulphur pool in barley plants. *Functional Plant Biology* 33: 1055–1061.
- Astolfi S., Zuchi S., Passera C. and Cesco S. (2003) Does the sulphur assimilation pathway play a role in the response to Fe deficiency in maize (*Zea mays L.*) plants? *Journal of Plant Nutrition* 26: 2111–2121.
- Bernard D.G., Cheng Y., Zhao Y. and Balk J. (2009) An allelic mutant series of ATM3 reveals its key role in the biogenesis of cytosolic iron-sulfur proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151: 590–602.
- Bitterlich M., Graefe J. and Franken P. (2017) Primary metabolism in arbuscular mycorrhizal symbiosis: Carbon, nitrogen and sulfur. In: Martin F. (eds) *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. John Wiley & Sons, Chapter 13: 217-231.
- Bohrer A.-S. and Takahashi H. (2016) Compartmentalization and Regulation of Sulfate Assimilation Pathways in Plants. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 326: 1-31. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.03.001>
- Bohrer A.-S., Yoshimoto N., Sekiguchi A., Rykalski N., Saito K. and Takahashi H. (2015) Alternative translational initiation of ATP sulfurylase underlying dual localization of sulfate assimilation pathways in plastids and cytosol in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 5: 750.
- Bonfante P. and Anca I-A. (2009). *Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions*. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 363-383.
- Bork C., Schwenn J.D. and Hell R. (1998) Isolation and characterization of a gene for assimilatory sulfite reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 212: 147–153.

Brusslan J.A. and Tobin E.M. (1992) Light-independent developmental regulation of cab gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7791-7795.

Chorianopoulou S.N., Saridis Y.I., Dimou M., Katinakis P. and Bouranis D.L. (2015) Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters the expression patterns of three key iron homeostasis genes, *ZmNAS1*, *ZmNAS3*, and *ZmYS1*, in S deprived maize plants. Front. Plant Sci. 6: 257. doi: 10.3389/fpls.2015.00257.

Ciaffi M., Paolacci A.R., Celletti S., Catarcione G., Kopriva S., Astolfi S. (2013) Transcriptional and physiological changes in the S assimilation pathway due to single or combined S and Fe deprivation in durum wheat (*Triticum durum L.*) seedlings. J. Exp. Bot. 64: 1663-1675.

Drigo B. and Donn S. (2017) Trading Carbon Between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Hyphae – Associated Microbes. In book: Mycorrhizal Mediation of Soil 22: 395-412.

Emanuelsson O., Nielsen H. and von Heijne G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. Protein Sci. 8(5): 978-84.

Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S. and von Heijne G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J. Mol. Biol. 300: 1005-1016.

FAO/IIASA: <http://www.fao.org/nr/gaez/en/>

FAOSTAT 2014. FAOSTAT Database results

Fellbaum C.R., Gachomo E.W., Beesetty Y., Choudhari S., Strahan G.D., Pfeffer P.E., Kiers E.T. and Bucking H. (2012) Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Proceedings of the National Academy of Science USA 109: 2666–2671.

Frieri I., Sticht C., Reichelt M., Gretz N., Hawkesford M.J., Malagoli M., Wirtz M. and Hell R. (2017) System analysis of metabolism and the transcriptome in *Arabidopsis thaliana*



roots reveals differential co-regulation upon iron, sulfur and potassium deficiency. *Plant Cell Environ.* 40: 95-107.

Frey-Klet P., Garbaye J., Tarkaa M. (2007) The mycorrhizal helper bacteria revisited. *New Phytol.* 176: 22-36.

Garcia K., Doidy J., Zimmermann S.D., Wipf D. and Courty P.E. (2016) Take a Trip Through the Plant and Fungal Transportome of Mycorrhiza. *Trends in Plant Science* 21: 937-950.

Gutjahr C. and Paszkowski U. (2013) Multiple control levels of root system remodeling in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Front. Plant Sci.* 4: 204.

Gutjahr C., and Parniske M. (2013) Cell and Developmental Biology of Arbuscular Mycorrhiza Symbiosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29: 593–617.

Hesse H., Trachsel N., Suter M., Kopriva S., von Ballmoos P., Rennenberg H. and Brunold C. (2003) Effect of glucose on assimilatory sulphate reduction in *Arabidopsis thaliana* roots. *J. Exp. Bot.* 54: 1701–1709.

Hopkins L., Parmar S., Bouranis D.L., Howarth J.R. and Hawkesford M.J. (2004) Coordinated expression of sulfate uptake and components of the sulfate assimilatory pathway in maize. *Plant Biology* 6: 408–414.

Houston N.L., Fan C., Xiang Q.Y., Schulze J.M., Jung R. and Boston R.S. (2005) Phylogenetic Analyses Identify 10 Classes of the Protein Disulfide Isomerase Family in Plants, Including Single-Domain Protein Disulfide Isomerase-Related Proteins. *Plant Physiol.* 137: 762-778.

Kawashima C.G., Matthewman C.A., Huan, S., Le, B.-R., Yoshimoto N., Koprivova A., Rubio-Somoza I., Todesco M., Rathjen T., Saito K., Takahashi H., Dalmay T. and Kopriva S. (2011). Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 66: 863–876.

Khan M.S., Haas F.H., Samami A.A., Gholami A.M., Bauer A., Fellenberg K., Reichelt M., Hansch R., Mendel R.R., Meyer A.J., Wirtz M. and Hell R. (2010) Sulfite reductase defines a newly discovered bottleneck for assimilatory sulfate reduction and is

- essential for growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22: 1216–1231.
- Kobayashi T., Nishizawa N.K., and Mori S. (2006) Molecular analysis of iron-deficient graminaceous plants. In: Barton L.L. and Abadia J. (eds) *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*, Springer, 395–435.
- Kobayashi Y., Otani T., Ishibashi K., Shikanai T. and Nishimure Y. (2016) C-Terminal Region of Sulfite Reductase Is Important to Localize to Chloroplast Nucleoids in Land Plants. *Genome Biol. Evol.* 8(5): 1459–1466. doi: 10.1093/gbe/evw093
- Kopriva S., Buchert T., Fritz G., Suter M., Weber M., Benda R., Schaller J., Feller U., Schurmann P., Schunemann V., Trautwein A.X., Kroneck P.M. and Brunold C. (2001) Plant adenosine 5'-phosphosulfate reductase is a novel iron-sulfur protein. *J. Biol. Chem.* 276: 42881–42886.
- Kopriva S., Mugford S.G., Baraniecka P., Lee B., Matthewman C.A. and Koprivova A. (2012) Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 3: 163. doi: 10.3389/fpls.2012.00163.
- Lee B.-R., Koprivova A. and Kopriva S., (2011) The key enzyme of sulfate assimilation, adenosine 5'-phosphosulfate reductase, is regulated by HY5 in *Arabidopsis*. *Plant J.* 67: 1042–1054.
- Liang G., Yang F. and Yu D. (2010) MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 62: 1046–1057.
- Martin M.N., Tarczynski M.C., Shen B. And Leustek T. (2005) The role of 5'-adenylylsulfate reductase in controlling sulfate reduction in plants. *Photosynth. Res.* 86: 309-323.
- Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Tohge T., Saito K. and Takahashi H. (2006) *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *Plant Cell* 18: 3235–3251.
- Miransari M. (2011) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 917-930.

- Nakayama M., Akashi T. and Hase T. (2000) Plant sulfite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 82: 27-32.
- Naranjo-Across M.A. and Bauer P. (2016) Iron Nutrition, Oxidative Stress and Pathogen Defense. In: Erkekoglu P. and Kocer-Gumusel B. (eds) *Nutritional Deficiency*, InTech, Chapter 4, 63-98. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/63204>
- Nozoye T., Nagasaka S., Kobayashi T., Takahashi M., Sato Y., Sato Y. et al. (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *Journal of Biological Chemistry*. 286 (7): 5446–5454.
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 2002–2007.
- Ruijter J.M., Ramakers C., Hoogaars W., Bakker O., van den Hoff M.J.B., Karlen Y., and Moorman A.F.M. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37: e45.
- Sieh D., Watanabe M., Devers E.A., Brueckner F., Hoefgen R., and Krajinski, F. (2013) The arbuscular mycorrhizal symbiosis influences sulfur starvation responses of *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 197: 606-616.
- Smith S.E., and Smith F.A. (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 227–50.
- Smith S.E., Jakobsen I., Grønlund M, and Smith F.A. (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: Interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol.* 156: 1050–1057
- Strable J. and Scanlon M.J. (2009) *Maize (Zea mays) : A Model Organism for Basic and Applied. Research in Plant Biology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 4: 10.
- Suter M., von Ballmoos P., Kopriva S., den Camp R.O., Schaller J., Kuhlemeier C., Schurmann P. and Brunold C. (2000) Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and

- adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes. *J. Biol. Chem.* 275: 930–936.
- Takahashi H., Watanabe-Takahashi A., Smith F.W., Blake-Kalff M., Hawkesford M.J. and Saito K. (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 23: 171–182.
- Tsakraklides G., Martin M., Chalam R., Tarczynski M.C., Schmidt A. and Leustek T. (2002) Sulfate reduction is increased in transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing 5'-adenylylsulfate reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Plant J.* 32: 879–889.
- Vauclare P., Kopriva S., Fell D., Suter M., Sticher L., von Ballmoos P., Krahenbuhl U., den Camp R.O. and Brunold C. (2002) Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *Plant J.* 31: 729–740.
- Vigani G. And Briat J.F. (2015) Impairment of respiratory chain under nutrient deficiency in plants: does it play a role in the regulation of iron and sulfur responsive genes? *Front. Plant. Sci.* 6, doi:10.3389/fpls.2015.01185.
- Wipf D., Mongelard G., Van Tuinen D., Gutierrez L. and Casieri L. (2014) Transcriptional responses of *Medicago truncatula* upon sulfur deficiency stress and arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Front. Plant Sci.* 5: 680
- Αιβαλάκης Γ., Καραμπουρνιώτης Γ., Λιακοπουλός Γ. και Φασσέας Κ. (2014) Λειτουργική Ανατομία Φυτών, Εκδόσεις Έμβρυο, 162-165.
- Καραμάνος Α. (1999) Τα σιτηρά των θερμών κλιμάτων: Αραβόσιτος, σόργο, ρύζι, κεχρί. Εκδόσεις Παπαζήση, 21-197.
- Παπακώστα-Τασοπούλου Δ. (2008) Ειδική Γεωργία Ι – Τεύχος Α Σιτηρά Χειμερινά-Εαρινά, Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, 183-274.
- Πέτρης Β. (2014) «Η δυναμική της κατανομής σιδήρου και θείου φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται παρουσία του μυκορριζικού μυκητά *Rhizophagus irregularis* υπο συνθηκών μεταβαλλομένης χορηγησης θείου» Πτυχιακή Μελέτη. Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών.

Σαρίδης Γ. (2014) «Διερεύνηση των προτύπων έκφρασης των γονιδίων των συνθασών νικοτιαναμίνης *ZmNAS1* και *ZmNAS3* φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται παρουσία του μυκορριζικού μύκητα *Rhizophagus irregularis* υπό συνθήκες μεταβαλλόμενης χορήγησης θείου». Πτυχιακή Μελέτη. Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών.

Τσούτσουρα Ν. (2016) «Διερεύνηση των προτύπων έκφρασης των γονιδίων μεταφορέων θεικών στις ρίζες φυτών αραβοσίτου που αναπτύσσονται παρουσία του μυκορριζικού μύκητα *Rhizophagus irregularis* υπό συνθήκες μεταβαλλόμενης χορήγησης θείου» Πτυχιακή Μελέτη. Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών.

## Παράρτημα

---

## 7. Παράρτημα

### 7.1. Παράρτημα 1

#### Ανάπτυξη Φυτών

Σπόροι αραβοσίτου (*Zea mays* L., 'Cisko', Syngenta Hellas) ξεπλύθηκαν προσεκτικά, τοποθετήθηκαν σε δίσκους με βρεγμένο διηθητικό χαρτί και παρέμειναν στο σκοτάδι, στους 28°C για τέσσερις μέρες με σκοπό να βλαστήσουν. Κατόπιν, τα φυτάρια μεταφέρθηκαν κατά παρτίδες σε λεκάνες υδροπονικής καλλιέργειας και αναπτύχθηκαν σε καλώς αεριζόμενο απιονισμένο νερό για τις επόμενες τέσσερις μέρες. Κατά την ημέρα οκτώ από τη σπορά, όλα τα τμήματα κάτω από το κόμβο (μεσοκοτύλιο, σπόρος και εμβρυακό ριζικό σύστημα) αποκόπηκαν από τα φυτάρια, τα οποία μετέπειτα, αναπτύχθηκαν για δύο ημέρες, υδροπονικά σε καλώς αεριζόμενο θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε σίδηρο και θείο που περιείχε χαμηλή συγκέντρωση φωσφόρου (10 μM). Η χαμηλή συγκέντρωση φωσφορικών συμβάλλει στην διευκόλυνση της εγκατάστασης της μυκορριζικής σχέσης (Smith et al., 2011). Την δέκατη ημέρα από τη σπορά, τα φυτάρια των οποίων είχε εκπτυχθεί η 1η σειρά βλαστογενών ριζών μεταφέρθηκαν σε ατομικά δοχεία με 250 ml αποστειρωμένης ποταμίσιας άμμου μέσα στην οποία είχαν διασπαρεί 500 mg πρακτικά αδιάλυτου  $\text{FePO}_4$ . Η αποστείρωση της άμμου έγινε στους 121°C για μία ώρα και επί τρεις διαδοχικές ημέρες.

Οι μεταχειρίσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν δύο: Μυκορριζικά (M+) και Μη-Μυκορριζικά (M-) φυτά. Για την ανάπτυξη των μυκορριζικών φυτών, 300 mg σκευάσματος του δενδριώδους μυκορριζικού μύκητα *Rhizophagus irregularis* (συνώνυμο: *Glomus irregulare* DAOM197198, SYMPLANTA-001 standard grade, Symplanta) προστέθηκαν σε κάθε δοχείο. Τα φυτά ποτίζονταν με το θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε σίδηρο και θείο και με χαμηλή συγκέντρωση φωσφόρου μέχρι την ημέρα 60 από τη σπορά. Από την ημέρα 60 και μετά, το πότισμα γινόταν με θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό μονάχα σε σίδηρο αλλά πάντα με χαμηλή συγκέντρωση φωσφόρου. Το θρεπτικό διάλυμα ελλειμματικό σε σίδηρο και θείο περιείχε τις εξής συγκεντρώσεις αλάτων: 5 mM  $\text{KNO}_3$ , 10 μM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.86 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.9 μM  $\text{ZnCl}_2$ , 30 μM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.9 μM  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 μM  $\text{MoO}_3$  85% and 20 μM  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Το θρεπτικό διάλυμα

ελλειμματικό σε σίδηρο περιείχε τις εξής συγκεντρώσεις αλάτων: 5 mM KNO<sub>3</sub>, 10 μM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 2.5 mM CaSO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 1 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 4 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0.9 μM ZnCl<sub>2</sub>, 30 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.9 μM CuCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0.5 μM MoO<sub>3</sub> 85% and 20 μM MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ένα ρυθμιζόμενο περιβάλλον πυκνότητας φωτονιακής ροής 250 μmol φωτονίων m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, φωτοπεριόδου 14/10 φωτός/σκότους με θερμοκρασιακή διακύμανση μέρας/νύχτας 28/23°C και υγρασίας 36/40% στη βάση του βλαστού.

| Χρονοδιάγραμμα      | Ημέρα 0 | Ημέρα 8                             | Ημέρα 10  | Ημέρα 60          |
|---------------------|---------|-------------------------------------|---|-------------------|
| Μη-Μυκορριζικά (M-) | Σπορά   | Αποκοπή τμημάτων κάτω από τον κόμβο | + FePO <sub>4</sub>                                     | + SO <sub>4</sub> |
| Μυκορριζικά (M+)    |         |                                     | + <i>Rhizophagus irregularis</i><br>+ FePO <sub>4</sub> |                   |

**Πίνακας 7.1:** Χρονοδιάγραμμα επεμβάσεων. Σημειώνονται οι κομβικές χρονικές στιγμές και επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος (Σαρίδης 2014).

### Παραλαβή δειγμάτων

Για τη μελέτη των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ZmST1.1, ZmST2.1, ZmST3.1, ZmST3.2 και ZmST4.1 πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες τις μέρες 45, 60, 61 και 62 από τη σπορά. Η δειγματοληψία της ημέρας 60 έγινε πριν τη χορήγηση θείου. Πλάγιες ρίζες πάγωσαν αμέσως με χρήση υγρού αζώτου και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Χρησιμοποιήθηκε φυτικός ιστός από τουλάχιστον τρεις βιολογικές επαναλήψεις ανά μεταχείριση και δειγματοληψία. Οι πλάγιες ρίζες επιλέχθηκαν διότι, σύμφωνα με την πρόσφατη μελέτη των Gutjahr και Paszkowski (2013), στα μονοκοτυλήδονα φυτά οι ΔΜ μύκητες προτιμούν να εγκαθίστανται σε αυτόν τον τύπο ριζών.

### Εκχύλιση νουκλεοξέων

Τα ολικά νουκλεϊκά οξέα εκχυλίστηκαν με τη χρήση της μεθόδου φαινόλης-χλωροφορμίου από τα δείγματα ριζών και φύλλων που παραλήφθηκαν. Όλα τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κάθε φορά αποστειρωμένα σε ειδικό κλίβανο στους 121 °C για 20 min. Η διαδικασία εκχύλισης γινόταν σε πάγο και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν



ήταν πάντα παγωμένα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βασίστηκε στο αντίστοιχο των Brusslan and Tobin (1992) ήταν κατάλληλα τροποποιημένο για τις ανάγκες του φυτικού υλικού και είχε τα εξής βήματα:

- Παραλήφθηκε ποσότητα φυτικού ιστού που αντιστοιχούσε σε περίπου 0.5 g και λειοτριβήθηκε σε παγωμένο γουδί με χρήση υγρού αζώτου, μέχρι να γίνει σκόνη. Το δείγμα μεταφέρθηκε αμέσως με παγωμένη σπάτουλα σε tube των 2.0 mL, που έχει ψυχθεί προηγουμένως με υγρό άζωτο.
- Προστέθηκαν 300  $\mu$ L διαλύματος εκχύλισης RNA (REB) και 300  $\mu$ L μίγματος PIC. Έγινε πολύ καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές, για 7 min και σε θερμοκρασία 4 °C.
- Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε tube των 1.5 mL και επαναλήφθηκε η εκχύλιση με 300  $\mu$ L μίγματος PIC. Έγινε πολύ καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές, για 7 min και σε θερμοκρασία 4 °C. Το στάδιο αυτό έγινε ακόμη μία φορά.
- Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο tube των 1.5 mL και προστέθηκε ίσος όγκος μίγματος SEVAG. Έγινε πολύ καλή ανάδευση με το χέρι και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές, για 10 min και σε θερμοκρασία 4 °C.
- Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο tube των 1.5 mL και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίστηκαν με την προσθήκη 1/10 του όγκου του υπερκειμένου διαλύματος οξικού νατρίου 3 M (pH: 5.2). Προστέθηκε, επίσης, 2.5 φορές ο όγκος του παραπάνω μίγματος αιθανόλης 100%.
- Ακολούθησε επώαση στους -25 °C για τουλάχιστον 12 h.
- Τα δείγματα μεταφέρθηκαν για 30 min στους -80 °C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές, για 30 min και σε θερμοκρασία 4 °C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρέθηκε. Το ίζημα, αφού στέγνωσε καλά, επαναδιαλύθηκε σε 25  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O (HPLC απεσταγμένο). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

Ο έλεγχος της καθαρότητας των νουκλεοξέων που απομονώθηκαν έγινε με μέτρηση της συγκέντρωσης και των λόγων καθαρότητας των δειγμάτων σε φωτόμετρο NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) καθώς και ανάλυσή τους με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 2%. Επιβεβαιώθηκε η αρχή ότι οι λόγοι 260/280 και 260/230 πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 1.8

και 2.0 και παρατηρήθηκαν ξεκάθαρα οι ζώνες του DNA και των ριβοσωμικών RNA στην ηλεκτροφόρηση.

### **Παραλαβή ολικού RNA**

Για την απομάκρυνση του DNA τα δείγματα μεταχειρίστηκαν με ανασυνδυασμένη DNase I (RNase-free, Takara Bio Inc) με σκοπό την παραλαβή του ολικού RNA του κάθε δείγματος. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του kit της DNase I τροποποιημένο κατάλληλα, όπως φαίνεται παρακάτω:

- Σε tube προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:
- Δείγμα νουκλεοξέων 20-50  $\mu\text{g}$
- Buffer DNase I 10X 5  $\mu\text{L}$
- DNase I (5 units/ $\mu\text{L}$ ) 0.5 unit / $\mu\text{g}$  νουκλεοξέων
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 50  $\mu\text{L}$
- Τα δείγματα επώαστηκαν για 60 min στους 37 °C.
- Ακολουθήθηκε διαδικασία καθαρισμών για την παραλαβή καθαρού RNA:
- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 300  $\mu\text{L}$ . Κατόπιν, προστέθηκαν 300  $\mu\text{L}$  PIC. Έγινε πολύ καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές, για 5 min και σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε tube των 1.5 mL και επαναλήφθηκε ο καθαρισμός με 300  $\mu\text{L}$  μίγματος PIC. Έγινε πολύ καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές, για 5 min και σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο tube των 1.5 mL και προστέθηκε ίσος όγκος μίγματος SEVAG. Έγινε πολύ καλή ανάδευση με το χέρι και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές, για 10 min και σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο tube των 1.5 mL και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίστηκαν με την προσθήκη 1/10 του όγκου του υπερκειμένου διαλύματος οξικού νατρίου 3 M (pH: 5.2). Προστέθηκε, επίσης, 2.5 φορές ο όγκος του παραπάνω μίγματος αιθανόλης 100%.
- Ακολούθησε επώαση στους -25 °C για τουλάχιστον 12 h.

- Μετά την overnight επώαση πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές, για 30 min και σε θερμοκρασία 4 °C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρέθηκε. Το ίζημα, αφού στέγνωσε καλά, επαναδιαλύθηκε σε 25 µL ddH<sub>2</sub>O (HPLC απεσταγμένο). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

Η επιβεβαίωση της καθαρότητας των δειγμάτων σε RNA πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) για εντοπισμό τυχόν υπολειμμάτων DNA. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την PCR περιγράφεται παρακάτω:

- Ετοιμάστηκαν PCR tubes με τις εξής αναλογίες αντιδραστηρίων:
  - dNTPs 10 mM 1 µL
  - Polymerase Buffer 5X 10 µL
  - MgCl<sub>2</sub> 25 mM 8 µL
  - Polymerase (5 units/µL) 0.2 µL
  - Δείγμα RNA 1 µL
  - Primer Mix UBQ 2 µL
  - ddH<sub>2</sub>O 28 µL, τελικός όγκος 50 µL
- Τα tubes μεταφέρθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή και η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με το εξής πρόγραμμα:
  - Αρχική Αποδιάταξη 94.5 °C για 4 min
  - Αποδιάταξη 94.5 °C για 1 min
  - Υβριδισμός Εκκινητών 58 °C για 1 min
  - Επιμήκυνση 72 °C για 1 min
  - Τελική Επιμήκυνση 72 °C για 10 min
  - Τα αποτελέσματα της PCR εμφανίστηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε gel αγαρόζης 2 %.

## Κατασκευή cDNA

Ποσότητα 500 ng RNA χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής με τη βοήθεια του PrimeScript RT reagent (Perfect Real Time, Takara Bio Inc). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την παραγωγή του cDNA είχε τα παρακάτω βήματα:

- Σε tube προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:
  - Δείγμα RNA 480 ng
  - PrimeScript buffer 5X 2  $\mu$ L
  - PrimeScript RT 0.5  $\mu$ L
  - Oligo dT (50  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L
  - Random 6-mers (100  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L
  - ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 10  $\mu$ L
- Τα δείγματα επώαστηκαν για 15 min στους 37 °C.
- Για την απενεργοποίηση του ενζύμου, τα tubes τοποθετήθηκαν για 5 sec στους 85 °C.
- Η αποθήκευση των δειγμάτων έγινε στους -25 °C.

## Επιβεβαίωση της εγκατάστασης του ΔΜ μύκητα στις ρίζες των φυτών

Χρησιμοποιήθηκε μοριακή προσέγγιση με σκοπό την επιβεβαίωση της μυκορριζικής εγκατάστασης στα δείγματα των ριζών που παρελήφθησαν. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε PCR με χρήση των εκχυλισμένων νουκλεϊκών οξέων, πριν τη μεταχείρισή τους με DNase I. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως στόχο το internal transcribed spacer 1 (ITS1) του γονιδίου του ριβοσωμικού RNA του μύκητα *Rhizophagus irregularis* (Κωδικός στην NCBI: JN417519.1). Η περιοχή αυτή θεωρείται ξεχωριστή για τον κάθε μύκητα και αποτελεί κατάλληλο εργαλείο ταυτοποίησής τους. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος είναι 151 ζεύγη βάσεων και οι αλληλουχίες των εκκινητών είχαν ως εξής:

Πρόσθιος εκκινητής : 5'-TGATCTTTGATCATGGTTTCGC-3'

Ανάστροφος εκκινητής : 5'-TCGCACTTCGCTACGTTCTT-3'

Τα παραγόμενα προϊόντα της PCR παρατηρήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 2 %.







TATGAGTTTATCTAGGTTTCGTAGAGAGGGAGGTGGAGGGGACTGGGTTTGTTAGTGACACAGGAAGGAAC  
GAGGGTTCAGGGGGGAAAAATCAGGTGTAGCTTTTGTAACTGCAAAATGATTGCAGCATGTATACCTGAA  
GTCTGAGCTTCTGAGGCCCTGTGCTTGGTAGCTGAGGGAGAGGTTACTTGTGTGTGCTTATAGTCAGTGG  
CGAGTGCCTACTATAAGGTTACCCGGTCATCTAAAGCACTGTTGTAAACTGTATTAAAA

>*ZmAPRL2*

ACGCCACAGGAAGGGGAAAAAAAACGCAGGTGCCAAAAACAGTTCGCCCCAGAGAATTGAAAACCTTACC  
ACTGCGAATTCAATTTCGAAAGCCTCAGACCCAGAGAGCTTCCCATGGCATCCGCTACCACCTCCATCTCG  
TCGCACCCTGCCGCCCTCCGCGACGTCAAAGCTGCGAGGATTGGTGGCGCGCTGAGGCAGGTGGGCGTGG  
CGGCGCGTGGCCAGCGCGCTCGGGCGGTGCCCCCGCTGCGCGCGGCGAGCCTGCGAGGCGGCCGGTGGC  
GGCCTCCGCGGCCGCGGCCCGCCGGCCGCGCCCGTGGCCGACGAGGCGGCGGTGGACTACGAGGCCCTG  
GCGCGGAGCTTGAAGGCGCGTCCGCCCTGGAGATCATGGATCGGGCGCTGGCCATGTTCCGGCTCCGAAA  
TCGCCATCGCCTTACGCGGCGGAGGACGTGGCGCTGATCGAGTACGCGAAGCTGACGGGGCGTCCCTT  
CCGGGTGTTTACGCTGGACACGGGGCGGCTCAACCCGAGACGTACCAGCTCTTCGACAGGGTGGAGAAG  
CACTACGGCATCCGCATCGAGTACATGTTCCCGACGCCAGCGAGGTGCAGGAGCTGGTGGGACCAAGG  
GCCTCTTCTCCTTCTACGAGGACGGCCACCAGGAGTGTGCCGCGTGCACAAGGTGGCGGCCCTGCGCAG  
GGCGCTCAGGGGGCTCAGGGCGTGGATCACCGGCCAGAGGAAGGACCAGTCCCCGGCACCAGGGCCAGC  
ATCCCTCTGGTCCAGGTTGACCCTTCTTTCGAAGGCCTGGACGGCGGGGCTGGTAGCTTGGTCAAGTGG  
ACCCCGTGGCCAACGTGACGGCAAGGACATCTGGACTTCTCTGCGGACCATGGACGTCCCTGTCAACGC  
CCTGCATGCTCAGGGCTACGTGTCCATCGGGTGGAGCCGTGCACCAGGCCTGTCTGCCGGGGCAGCAC  
GAGCGGGAAGGCCGGTGGTGGTGGGAGGACGCCAAGGCCAAGGAGTGGCGCTCCACAAGGGCAACATCG  
ACAAGGACGGCCAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCCCAGGACTGCCAACGGCAACGGCTCGGCGGGCGC  
CCCGGACATCTTCGAGAGCCCCGCGTGTCCCTCACCCGCGCCGGGGTGGAGAACCCTGCTGCGCCTG  
GAGAGCCGCGCCGAGCCGTGGCTCGTGGTGTGTACGCGCCCTGGTGGCCGTTCTGCCAGGCCATGGAGG  
CCTCCTACGTGGAGCTGGCCGAGAGGCTGGCGGGGTCCGGCGGCGTGAAGGTGGCCCGGTTCCGCGCCGA  
CGGCGAGCAGAAGCCGTTCCGCGAGGCCGAGCTGCAGCTGCAGAGCTTCCCCACCGTGTCTCTGTTCCTT  
AGCCGCACCGCCCGGCCATCAAGTACCCGTCGAGAGAAGAGGGACGTGACTCGCTCCTCGCCTTCGTCA  
ACAGCCTCCGGTGAAGGCCCGCCAGTGAGCGAGAACCATCGTTCTCTGTCAGTATGTACTGTATTACATGT  
TGGTATCCATCTAGGTGCGCTGTACGTAGAGAGGGAGGCGGAGGGAACGGGATGCTAGAAAAACAGAT  
GCAGGTGTTGCTTGTAACTGCAGAATGATGGTAGGTATGCATGAAGTCTGAGGTCCTGTGTTATTTGGCA  
GCTGAGGGAGAGATTTGTGCGTGTCTGTAGTTGTAGCTAGTGCCGATGGAGTATTCTAAGGAAAATCAA  
TAAGAATCGAAGTTTT

> *ZmSiR*

GCGACCCCTCGACCGTGCGAACGAGCAAAGGACAAAATATCCTCGCTCGCAGTCGCAGCTACTACGCCGCC  
GCACCTCCGCCCCCACCTTCTTCCCGGCTCCAGCGATGTCGGGGGCGATCGGGGGCGCCGAGGTCCACG  
GCTTCCGGGGCGCAGCGGCGCAGCTCCCGCGGTCCCGGGTGTCTCGGGAGGCCGATCCGGGTGGCGCCACC  
CGCCGCGGCCCCGCGGGCGGTGCGTCCGCGGGTAGCATACGCGCCGTCTCCGCGCCTGCGAAGAAGGAC  
GCTTCTGAAGTTAAGCGAAGCAAGGTTGAGATAATCAAGGAAAAGAGCAACTTCTCCGGTACCCTTTGA  
ACGAGGAGTTGGTCTCAGAGGCCCCAAATATCAACGAGAGTGTGTTTCCAGCTGATCAAGTTTCATGGAAG



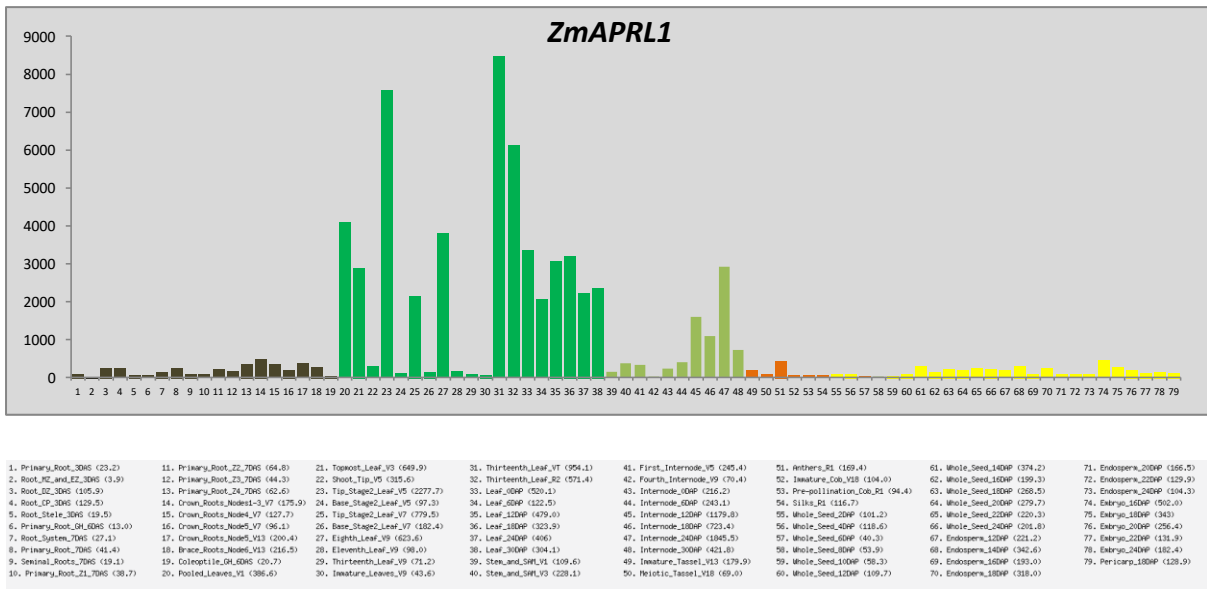
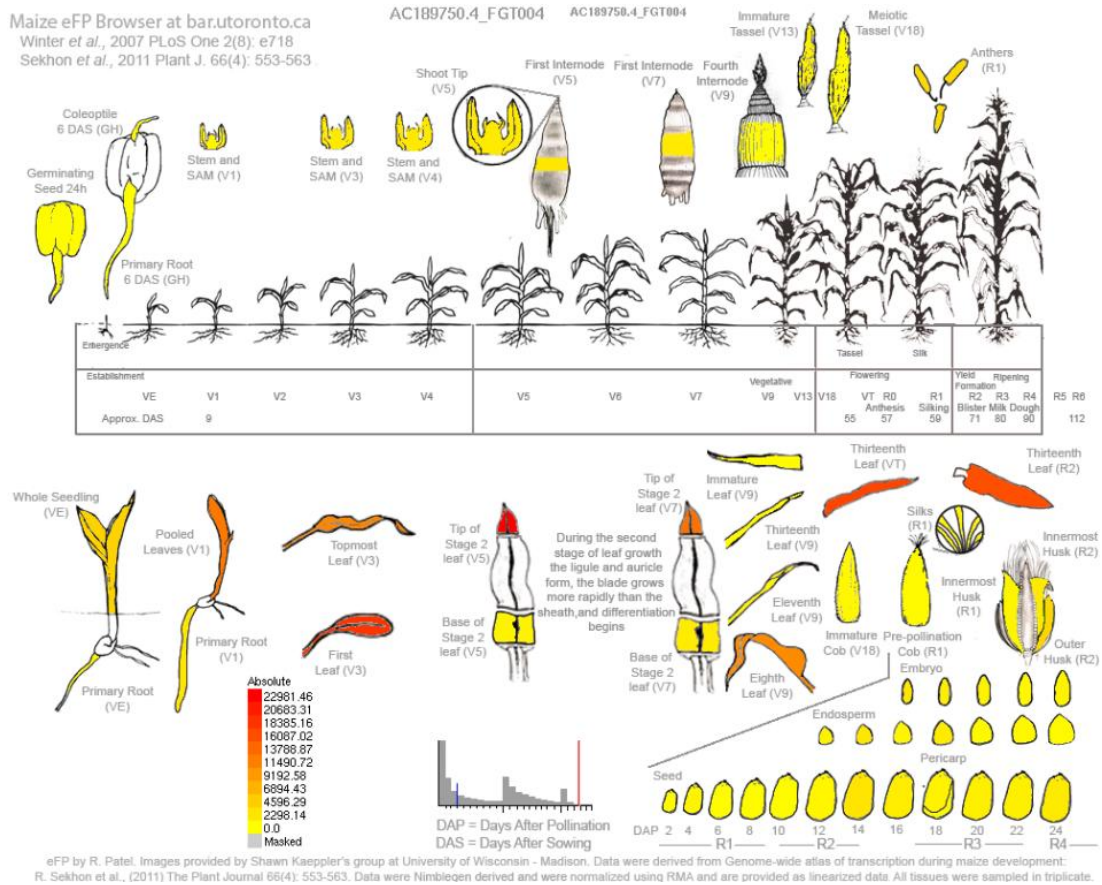
CTACCAGCAAACCTGACCGAGATGTCCGTGGGCAGAAGAATTACTCGTTTATGCTCCGGACAAAGAACCCT  
TGTGGGAAAGTTCCAAACCAACTTTATTTAGCTATGGATACACTAGCTGATGAGTTTGGCATCGGAACAC  
TCCGCTGACGACCAGGCAGACATTCCAGTTGCACGGTGTTCCTTAAGAAGAAGCTTGAAGACTGTTCTAAG  
CACTGTCATAAAGAATATGGGCTCAACATTGGGTGCTTGTGGCGATCTCAACAGGAATGTACTTGCTCCT  
GCAGCGCCTTTTGTCAAAAAAGATATCCTTTTTGCTCAACAAACAGCAGAGAACATTGCAGCACTCCTTA  
CACCACAGTCCGGGGCTTATTATGACCTGTGGGTGGATGGCGAGAAGATAATGTCAGCTGAAGAGCCTCC  
TGAGGTGACAAAAGCCCGCAATGACAACTCGCATGGAACGAACTTCCCTGACTCTCCGGAACCAATCTAT  
GGCACCCAGTATCTACCAAGGAAGTTCAAGGTTGCAGTTACCGCGGCTGGTGATAACTCTGTTGATATTC  
TGACCAATGACATCGGTGTTGTTGTTGTTTCAGATGATGCAGGAGAACCCTATTGGCTTTAACATCTATGT  
TGGTGGTGGCATGGGAAGGACACACCGAGTGGAACTACATTCCCTCGGCTGGCTGATCCATTGGGTTAT  
GTTCCAAAAGAAGATATATTATATGCTATAAAGGCCATCGTCGTCACACAGAGGGAAAATGGAAGAAGGG  
ATGACCGCAAGTATAGTAGGATGAAGTATTTGATTGACCGTTGGGGAATAGATAGGTTTCGGGCTGAAGT  
TGAAAATATTACGGGAAGAAGTTTGAAAGTTCCGACCATTGCCAGAGTGGCAGTTTAAACAGCTACCTT  
GGCTGGCAAGAACAGGGTGTGGGAAATTATTCTATGGAGTGCATGTTGATAATGGTCGTGTTGGTGGGC  
AAGCAAAGAAAACCTCTACGAGAGATAATTGAGAAGTATAATTTGGATGTTAGTATTACCCCAAACCAAAA  
TCTTATTTTATGTGGGATTGATCAAGCGTGGAGAGAACCATAACTACAGCTCTTGCCACAAGCTGGCCTG  
CTGGAACCGAAGGATGTGACCCCTGAATTTAACTGCCATGGCATGCCCTGCCCTGCCACTGTGCCCTT  
TGGCACAAACAGAAGCTGAACGGGGGATCTTACCCATTCTTAAACGAATTAGAGCAGTCTTCAATAAGGT  
TGGTATCAAGGATTCGGAGTCTGTGGTTGTGAGGATAACTGGATGCCCTAATGGATGCGCTAGACCATAT  
ATGGCAGAGCTTGGTTTTGTTGGTGTATGGCCCAAAAAGTTACCAGATCTGGCTGGGTGGAACACCAAAAC  
AGAGTACGCTAGCAGAATCATTATGACAAAAGTGAAGCTTGATGACATCGAGAAGGTTTTGGAACCTCT  
CTTTACCTATTGGAATGGCACACGCCAGGAAGGCGAATCTTTTGGAAAGCTTCACAAAACCGAACAGGATTC  
GACAAATTGAAAGAGGTAGTGAATAAGTGGCAGAGTCACCATCAGCCGCATGAAGATTTTCGCTTTTCGTT  
GGATAAAATCCCAGGCTCGCAGCACAATTTTGGCCACGGGATTAATTATATGACGAAGGAAATCCAGATA  
AGCCGAGAAATGGA AAAAGGAAGACTCGGGTGTGAGTTGCTATGTTTGTGGTGTGAGTGATCGAATTT  
TTTTGTGTGTGCTCTCAAGGAGACCTCTGTGAACTTGAATAAACTCCACACGGAGTTGTGCCAAATTAGA  
CCGAGGCGTCCGTGAACTTGAATCAGTTCTTCGGGATGTTGTGCCTGAGAATAAATCCCACCGAGGCGTC  
TGTGAACTTAATTCAATTCGTCAGGAAGCTGTGCCTTAGAATAAATTCGACGGGTGTCCAATTTCTTGT  
CATTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

> *ZmUBQ*

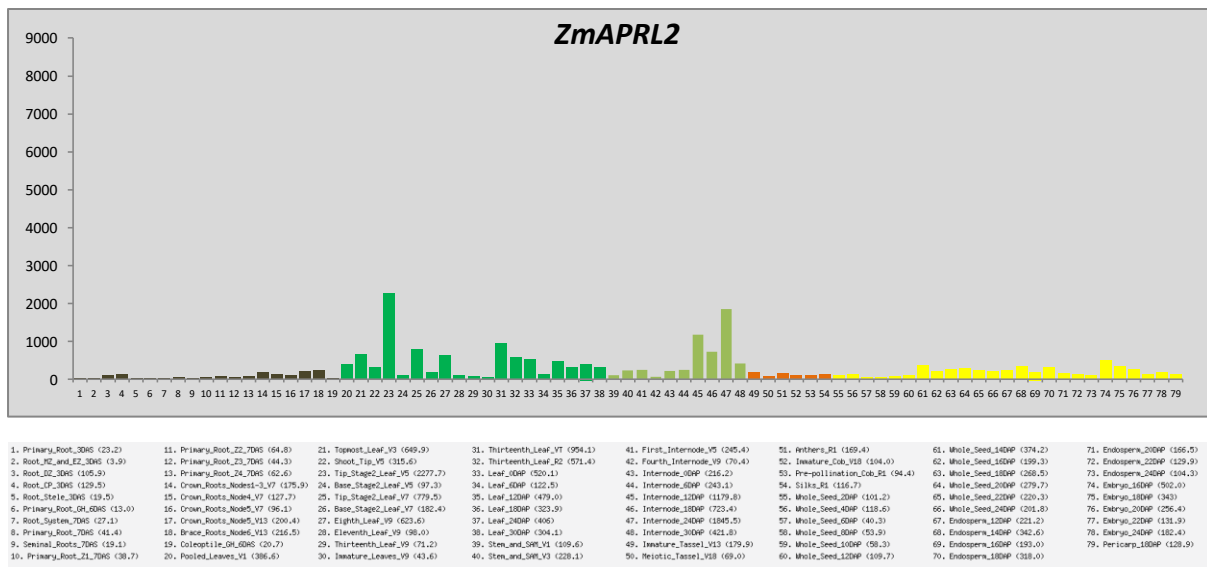
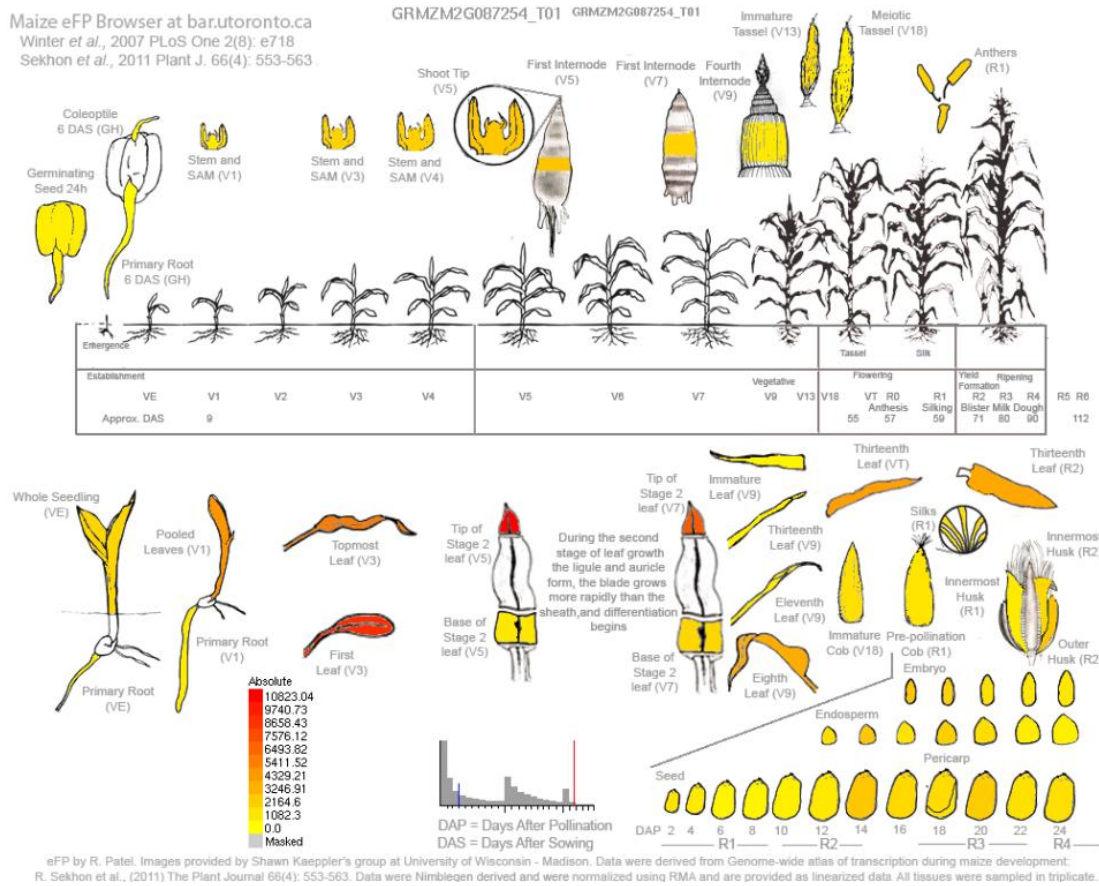
CACCCGCCGAGCCAAACCTCTCCAGCAGCCGTGTCGCCACCGCTGCAGCGCGGAGGCGACCCCATC  
GCCGCCAAGATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACGGGGAAAACCATCACGTTGGAGGTGGAGTCCCTCGG  
ACACCATCGACAACGTGAAGGCCAAGATACAGGACAAGGAGGGCATCCCGCCGACCAGCAGCGGCTCAT  
CTTCGCCGGCAAGCAGCTCGAGGACGGCCGACCCCTCGCCGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTC  
CACCTGGTGTCTCCGCTCCGAGGTGGCGCCAAGAAGCGCAAGAAGAAGACGTACACCAAGCCCAAGAAGA  
TCAAGCACAAGCACAAGAAGGTGAAGCTCGCAGTGTGAGTTCTACAAGGTGGACGACGCCACCGGCAA  
GGTGACCCGCTCCGCAAGGAGTGCCCAACACCGAGTGCGGTGCGGGTGTCTTCATGGCCAACCACTTC  
GACCGCCACTACTGCGGCAAGTGGGGCTCACCTACGTCTACAATCAGAAGGCGTAATCCCATGCGCCGC  
TTTGCTTACCCGCCTACCTATCAAGCATTACCTGTTGGTTACTCGATTTGAATATCATTTAGATCTGT  
TTGAGGTTGGAACATAAATGCAGCAGTAGTTTCTG

## 7.4. Παράρτημα 4

### Ιστο-ειδική έκφραση των γονιδίου *ZmAPRL1* και τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης σύμφωνα με την MaizeGDB.



# Ιστο-ειδική έκφραση των γονιδίου *ZmAPRL2* και τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης σύμφωνα με την MaizeGDB.



# Ιστο-ειδική έκφραση των γονιδίου ZmSiR και τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης σύμφωνα με την MaizeGDB.

