



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μοριακός άτλας της μορφογένεσης των ριζικών τριχιδίων στο *Arabidopsis Thaliana*

Αθανασία Δ. Δρεμπέλα

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γεράσιμος Δάρας, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2020

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μοριακός άτλας της μορφογένεσης των ριζικών τριχιδίων στο *Arabidopsis Thaliana*

“Molecular atlas of root hairs morphogenesis in *Arabidopsis Thaliana*”

Αθανασία Δ. Δρεμπέλα

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Γεράσιμος Δάρας, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σταμάτης Ρήγας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ

Μοριακός άτλας της μορφογένεσης των ριζικών τριχιδίων στο Arabidopsis Thaliana

*ΠΜΣ Βιολογία Συστημάτων
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φυτορμόνες δρουν με μηχανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν μια αλληλουχία μεταβολικών και μοριακών τροποποιήσεων με κοινά χαρακτηριστικά. Η αυξίνη σχετίζεται με την ανάπτυξη του φυτού, μεταφέρεται στο ριζικό σύστημα σε διαφορετικά σημεία με τη βοήθεια πρωτεϊνών (PIN, AUX, Trh1). Η εκροή της Αυξίνης αναλόγως το pH εισέρχεται στο κύτταρο κυρίως με ανιονική μορφή IAA⁻ από πρωτεϊνικούς φορείς AUX/LAX και στη συνέχεια μεταφέρεται μέσω PIN και Trh1.

Η δημιουργία ριζικών τριχιδίων περιλαμβάνει το σχηματισμό εξογκώματος στο βασικό άκρο του τριχοβλάστη από τοπική διάχυτη ανάπτυξη. Τα φυτά Arabidopsis είναι ομόζυγα για μια πλήρη μετάλλαξη μικροσκοπικών ριζικών τριχιδίων (Trh1, tiny root hair) με απώλεια λειτουργίας δημιουργήθηκαν μέσω της μεθόδου σήμανσης T-DNA. Τα φυτά Trh1 δε σχηματίζουν ριζικά τριχίδια αλλά ούτε αντιλαμβάνονται τον άξονα της βαρύτητας. Μια προβλεπόμενη πρωτογενής δομή του TRH1 δείχνει ότι ανήκει στην οικογένεια μεταφορέων AtKT / AtKUP / HAK K (+). Ο φαινότυπος TRH1 δεν αποκαταστάθηκε όταν τα μεταλλαγμένα φυτά αναπτύχθηκαν σε υψηλές εξωτερικές συγκεντρώσεις καλίου. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι το TRH1 μεσολαβεί στη μεταφορά K (+) στις ρίζες του Arabidopsis και είναι υπεύθυνο για τη συγκεκριμένη μετατόπιση του K.

Στο Arabidopsis Thaliana στο γονίδιο Trh1 πραγματοποιούνται 2 μεταλλάξεις, το ON το οποίο σηματοδοτεί την αλλαγή Σερίνης σε Γλουταμινικό Οξύ και το OFF σηματοδοτεί μετάλλαξη πρωτεϊνικού οξέος Σερίνης σε Αλανίνη. Χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή 35S::TRH1:ON:YFP:FLAG και 35S::TRH1:OFF:YFP:FLAG ώστε να τακτοποιηθούν διαφορές μεταξύ τους σε σχέση με την ανάπτυξη τους και το φαινότυπο τους.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση σε γονίδια που σχετίζονται με γεωτροπισμό αλλά και με ριζικά τριχίδια ώστε να φανερωθούν τα κοινά στοιχεία.

Επιστημονική περιοχή: Βιοτεχνολογία

Λέξεις Κλειδιά: Arabidopsis Thaliana, Μοριακή Ανάλυση, Αυξίνη, Πρωτεΐνες ON-OFF, TRH1, Βιοπληροφορική Ανάλυση

Molecular atlas of root hairs morphogenesis in *Arabidopsis Thaliana*

*MSc System Biology
Department of Biotechnology
Laboratory of Molecular Biology*

ABSTRACT

Phytormones act by mechanisms, which include a sequence of metabolic and molecular modifications with common characteristics. Auxin is associated with plant growth, is transported to the root system at different points as a consequence of proteins (PIN, AUX, Trh1). Auxin-dependent pH enters the cell mainly in the anionic form of IAA⁻ from AUX / LAX protein vectors and is then transported via PIN and Trh1.

The formation of root hairs involves the formation of a prominence at the base of the hair trichoblast from growth. *Arabidopsis* plants are homozygous for a complete mutation of tiny root hairs (Trh1, tiny root hair) with loss of function created through the T-DNA labeling method. Trh1 plants do not form root hairs but do not perceive the axis of gravity. A predicted primary structure of Trh1 indicates that it belongs to the AtKT / AtKUP / HAK K (+) transporter family. The Trh1 phenotype was not restored when the mutant plants were grown at high external potassium concentrations. These data indicate that TRH1 mediates the transport of K (+) to the roots of *Arabidopsis* and is responsible for the specific displacement of K.

In *Arabidopsis Thaliana*, two mutations occur in the Trh1 gene, the ON which signals the change of Serine to Glutamic Acid and the OFF signal the mutation of Serine protein acid to Alanine. The 35S: TRH1: ON: YFP: FLAG and OFF: YFP: FLAG to sort out differences between them in terms of their development and phenotype

In addition, bioinformatics analysis was performed on genes related to geotropics as well as root hairs to reveal the common ones.

Scientific area: Biotechnology

Key Words: *Arabidopsis Thaliana*, Molecular Analysis, Auxin, ON – OFF proteins, TRH1, Bioinformatics Analysis

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε από τη φοιτήτρια Δρεμπέλα Αθανασία στο τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Γεράσιμου Δάρα, Επίκουρου Καθηγητή και Σταμάτη Ρήγα, Αναπληρωτή Καθηγητή.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω σε όλους τους καθηγητές που είχα όλα τα χρόνια της μέχρι στιγμής ακαδημαϊκής μου ζωής, για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν. Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω το Γεράσιμο Δάρα για τη βοήθεια που μου χάρισε απλόχερα και συγκεκριμένα στην πειραματική διαδικασία, κατά τη διάρκεια του προγράμματος, διότι χωρίς τη βοήθεια του η διπλωματική μου δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος το Σταμάτη Ρήγα για την υπομονή του και τη στήριξη του για την εκπόνηση της παρακάτω πτυχιακής εργασίας και τη βοήθεια του ως επιβλέπων καθηγητή της πτυχιακής μου εργασίας. Ιδιαίτερα δε, οφείλω να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Τεμπλαλέξη αλλά και τον μεταδιδάκτορα Ντικράν Τσιτσεκιάν τόσο για τη βοήθεια τους στην πειραματική διαδικασία στο χειρισμό μηχανημάτων αλλά και στην επεξήγηση προγραμμάτων, χωρίς. Τέλος, ευχαριστώ τον Καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλο για τη βοήθεια του και για την αποδοχή του να είναι στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, ένα μεγάλο και εγκάρδιο ευχαριστώ αξίζουν δύο ήρωες της καθημερινότητάς μου, οι γονείς μου Ευαγγελία Διακονικολή και Δημήτριος Δρεμπέλας, που με στηρίζουν ηθικά και οικονομικά όλα αυτά τα χρόνια, δίνοντάς μου κουράγιο να προχωρώ και να υπερπηδώ κάθε εμπόδιο για να φτάσω στο στόχο μου.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
Κατάλογος Εικόνων	7
Κατάλογος Διαγραμμάτων	7
Κατάλογος πινάκων	8
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Γενικές πληροφορίες	10
1.2 Φυτική Ορμόνη Αυξίνη	12
1.3 Γονίδιο Trh1.....	15
1.3.1 Πρωτεΐνες PINs	16
1.4 Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών.....	19
1.5 Μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης Trh1	21
1.6 Μετασχηματισμός <i>Arabidopsis Thaliana</i>	22
1.6.1 Ανάπτυξη φυτών και διείσδυση με κατάλληλο στέλεχος <i>Agrobacterium</i>	22
1.6.2 Επιλογή μετασχηματισμένων φυτών T3 γενιάς.....	23
1.7 Οντολογία Γονιδίων	24
1.7.1 Δομή Οντολογίας	25
1.8 Σκοπός Εργασίας.....	29
2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
2.1 Συνθήκες Περιβάλλοντος	30
2.2 Φυτικό υλικό	31
2.3 Πρωτόκολλα απομόνωσης.....	31
2.3.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από σπορόφυτα <i>Arabidopsis</i>	31
2.3.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού DNA από έμβρυα <i>Arabidopsis</i>	32
2.4 Σύσταση θρεπτικού υλικού	34
2.5 Στερεοσκόπιο – Μικροσκόπιο	36
2.6 GFP (Green Fluorescent Protein).....	36
2.7 Πρόγραμμα- ImageJ	37
3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
3.1 Επίδραση θρεπτικού υλικού στα ON – OFF	38
3.2 Επίδραση χαμηλού pH στο ριζικό σύστημα	57
3.5 Βιοπληροφορική Ανάλυση	73
3.6 Αποτελέσματα Βιοπληροφορικής Ανάλυσης	76
4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΣΥΖΗΤΗΣΗ	81
4.5 Βιοπληροφορική Ανάλυση	83
ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ:	87

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Βιοσυνθετική οδός εξάρτηση αυξίνης από τρυπτοφάνη.....	14
Εικόνα 2: Κατανομή των PIN πρωτεϊνών συνεισφέρει στη δημιουργία διαβάθμισης αυξίνης gradients.....	18
Εικόνα 3: Οι πρωτεΐνες μεταφοράς αυξίνης ρυθμίζουν τις ενδοκυτταρικές ροές και τις ροές από κύτταρο σε κύτταρο.....	19
Εικόνα 4: Πολικός εντοπισμός των πρωτεϊνών PIN στο άκρο της ρίζας Arabidopsis.....	19
Εικόνα 5: Τα επίπεδα σχέσεων στις οντολογίες.....	27
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση κατηγοριοποίησης γονιδίων. Οι σχέσεις μεταξύ των αντικειμένων και των ιδιοτήτων τους δεν είναι αλληλο-αποκλειόμενες και ένα γονίδιο μπορεί να αντιστοιχηθεί σε περισσότερες από μία ιδιότητες.....	28
Εικόνα 11: Παρουσιάζονται οι σειρές OFF, με κίτρινη βούλα εμφανίζονται τα φυτά με ριζικά τριχίδια και με μαύρη βούλα ο φθορισμός.....	41
Εικόνα 13: Στερεοσκοπική παρουσίαση σειρών ON-OFF κ control και με χαμηλό pH και χαμηλό κάλιο.....	63
Εικόνα 14: Φωτογραφικό Υλικό απο στερεοσκόπιο για παρατήρηση ριζικών τριχιδίων.....	66
Εικόνα 15: Φωτογραφικό Υλικό από στερεοσκόπιο για παρατήρηση ριζικών τριχιδίων.....	66
Εικόνα 16: Φωτογραφικό Υλικό από στερεοσκόπιο για παρατήρηση ριζικών τριχιδίων στο τεστ 6.....	68
Εικόνα 17: Φωτογραφικό Υλικό από στερεοσκόπιο για παρατήρηση ριζικών τριχιδίων, σε στρεσογόνο περιβάλλον, OFF Control/Low στο τεστ 6.....	68
Εικόνα 18: Διάγραμμα γονιδιακής Οντολογίας, εύρεση κοινών γονιδίων σχετικά με γεωτροπισμό και ριζικών τριχιδίων του Arabidopsis Thaliana.....	75

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Figure 1: Το φυτικό σώμα στο αρτίβλαστο της Arabidopsis.....	12
Figure 2: Boxplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 4 ^η μέρα.....	52
Figure 3: Scatterplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 4 ^η μέρα.....	52
Figure 4: Scatterplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 5 ^η μέρα.....	53
Figure 5: Boxplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 5 ^η μέρα.....	53
Figure 6: Scatterplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 6 ^η μέρα.....	53
Figure 7: Boxplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 6 ^η μέρα.....	53
Figure 8: Scatterplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 7 ^η μέρα.....	54
Figure 9: Boxplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 7 ^η μέρα.....	54
Figure 10: Scatterplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 5 ^η μέρα.....	55
Figure 11: Scatterplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 4 ^η μέρα.....	55
Figure 12: Boxplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 5 ^η μέρα.....	55
Figure 13: Boxplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 4 ^η μέρα.....	55
Figure 14: Boxplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 6 ^η μέρα.....	56
Figure 15: Scatterplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 6 ^η μέρα.....	56
Figure 16: Boxplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 7 ^η μέρα.....	56
Figure 17: Scatterplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 7 ^η μέρα.....	56

Figure 18:Τεστ 5 boxplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 5 ^η μέρα.....	58
Figure 19:Τεστ 5 Scatterplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 5 ^η μέρα	58
Figure 20:Τεστ 5 boxplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 4 ^η μέρα.....	58
Figure 21:Τεστ 5 Scatterplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 4 ^η μέρα	58
Figure 22:Τεστ 5 boxplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 6 ^η μέρα	59
Figure 23:Τεστ 5 Scatterplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 6 ^η μέρα	59
Figure 24:Τεστ 5 boxplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 7 ^η μέρα.....	59
Figure 25:Τεστ 5 Scatterplot Μέτρηση μήκους A.thaliana 7 ^η μέρα	59
Figure 26:Τεστ 5 Scatterplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 5 ^η μέρα	60
Figure 27:Τεστ 5 boxplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 5 ^η μέρα.....	60
Figure 28:Τεστ 5 boxplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 4 ^η μέρα.....	60
Figure 29:Τεστ 5 Scatterplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 4 ^η μέρα	60
Figure 30:Τεστ 5 boxplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 6 ^η μέρα.....	61
Figure 31:Τεστ 5 Scatterplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 6 ^η μέρα	61
Figure 32:Τεστ 5 Scatterplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 7 ^η μέρα	62
Figure 33:Τεστ 5 boxplot Μέτρηση γεωτροπισμού A.thaliana 7 ^η μέρα.....	62
Figure 34:Τεστ 6 boxplot μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 4.5.....	67
Figure 35:Τεστ 6 scatterplot μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 5	67
Figure 36:Τεστ 6 scatterplot μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 4.5.....	67
Figure 37:Τεστ 6 boxplot μέτρηση μήκους ρίζας με pH 5.7	67
Figure 38:Τεστ 6 μέτρηση μήκους ρίζας boxplot pH 5.....	67
Figure 39:Τεστ 6 scatterplot μέτρηση μήκους ρίζας με pH 5.7	67
Figure 40:Τεστ 6 boxplot μέτρηση μήκους ρίζας με pH 5.7	69
Figure 41:Τεστ 6,scatterplot,μέτρηση μήκους ρίζας με pH 5.7	69
Figure 42:Τεστ 6 μέτρηση μήκους ρίζας boxplot pH 5.....	69
Figure 43:Τεστ 6 scatterplot μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 5	69
Figure 44:Τεστ 6 boxplot μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 4.5.....	69
Figure 45:Τεστ 6 scatterplot μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 4.5.....	69
Figure 46:boxplot μέτρηση γεωτροπισμού 4.5.....	70
Figure 47:boxplot μέτρηση γεωτροπισμού 5.....	70
Figure 48:scatterplot μέτρηση γεωτροπισμού pH 4.5	70
Figure 49:scatterplot μέτρηση γεωτροπισμού pH 5	70
Figure 50:scatterplot μέτρηση γεωτροπισμού pH 5.7	71
Figure 51:boxplot μέτρηση γεωτροπισμού 5.7.....	71
Figure 52:διαγράμματα scatterplot και boxplot μέτρησης γεωτροπισμού σε pH 4.5-5 και 5.7	72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Δεδομένα πειραματικών διαδικασιών,Test 1,2.....	42
Πίνακας 2 :Πίνακας 2:Test 3, OFF 1,11,18, 21/01/2020	44
Πίνακας 3:Test 3 ON 6,10,13,25,38 & OFF 1,11,18 21/01/2020.....	46
Πίνακας 4:Test 3 OFF1,11,15,pTrh1 31/01/2020 A.....	47
Πίνακας 5:Test 3 ON6,10,13,25,28 31/01/2021 B	49
Πίνακας 6:Test 3, ON 6,10,13,25,28 & OFF1,11,18 04/02/2021.....	51
Πίνακας 7:Μετρήσεις Μέσου όρου του πληθυσμού των φυτών, στις 5,6,7 μέρες με το πρόγραμμα ImageJ.....	52

Πίνακας 8:Μετρήσεις Μέσου όρου του πληθυσμού των φυτών, στις 5,6,7 μέρες με το πρόγραμμα ImageJ στην Πέμπτη πειραματική διαδικασία χαμηλού pH.....	57
Πίνακας 9:Οντολογία γονιδίων για γεωτροπισμό,Biological Process(2222).	76
Πίνακας 10:Οντολογία γονιδίων και Cellular component για γεωτροπισμό(2222).	76
Πίνακας 11:Οντολογία γονιδίων για Molecular functionγονιδίων για γεωτροπισμό(2222)..	76
Πίνακας 12:Οντολογία γονιδίων βιολογικής διεργασίας (91) Trh1-PIN1.....	76
Πίνακας 13:Οντολογία γονιδίων βιολογικής διεργασίας (54) Trh1-PIN2.....	76
Πίνακας 14:Οντολογία γονιδίων για 479 γονίδια βιολογικής λειτουργίας Trh1-PIN1.	77
Πίνακας 15:Οντολογία γονιδίων για Molecular function 479 γονιδίων Trh1-PIN1.	78
Πίνακας 16:Οντολογία γονιδίων βιολογική λειτουργία 357 Trh-PIN2.....	78
Πίνακας 17:Οντολογία γονιδίων μοριακή λειτουργία 357 Trh1-PIN2	78
Πίνακας 18:Οντολογία γονιδίων κυταρική συνιστώσα 357 Trh1-PIN2.	78
Πίνακας 19:Οντολογία Γονιδίων Ριζικών τριχιδίων 2918 γονιδίων βιολογική λειτουργία. ...	79
Πίνακας 20:Οντολογία Γονιδίων 2918 Μοριακής λειτουργίας ριζικά τριχίδια.	79
Πίνακας 21:Οντολογία Γονιδίων 2918 ριζικά τριχίδια Cellular component.	79
Πίνακας 22:Οντολογία Γονιδίων ριζικά τριχίδια Cellular component 151.	79
Πίνακας 23:Οντολογία Γονιδίων ριζικά τριχίδια Biological Process 104.	80
Πίνακας 24:Οντολογία Γονιδίων pin1-pin2 Biological Process 58.	80
Πίνακας 25: Οντολογία Γονιδίων Pin1-Pin2 Biological Process 355.	80
Πίνακας 26:Οντολογία Γονιδίων Μοριακή λειτουργία Pin1-Pin2 355.....	80
Πίνακας 27:Οντολογία Γονιδίων Cellular component Pin1-Pin2 355.	81

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικές πληροφορίες

Το φυτό περιγράφηκε πρώτη φορά το 1577 από τον Johannes Thal (1542-1583), γιατρό από το Nordhausen, Thüringen, Γερμανία, που το ονόμασε *Pilosella siliquosa*. Το 1753, ο Carl Linnaeus μετονόμασε το φυτό *Arabis thaliana* προς τιμήν του Thal. Το 1842, ο Γερμανός βοτανολόγος Gustav Heynhold μετονόμασε το νέο γένος *Arabidopsis* και τοποθέτησε το φυτό σε αυτό το γένος. Το όνομα του γένους, *Arabidopsis*, προέρχεται από τα ελληνικά, που σημαίνει "μοιάζει με *Arabis*" (το γένος στο οποίο το είχε τοποθετήσει αρχικά ο Linnaeus).

Το *Arabidopsis thaliana* (*thale cress*) είναι φυτό ετήσιο βραχείας διάρκειας, 20-25 εκατοστά είναι συμβατό και κατά κύριο λόγο σε αναπαραγωγή, που επικρατεί στις εύκρατες περιοχές της Ευρώπης, της Άπω Ανατολής και της Ανατολικής Αφρικής. Κατά τους προηγούμενους αιώνες, η *A. thaliana* εισήχθη στη Βόρεια Αμερική, τη Νότια Αφρική και την Αυστραλία και συνεχίζει να επεκτείνει τη γκάμα της. Το φυτό *A. thaliana* ανήκει στην οικογένεια μουστάρδας (*Brassicaceae*). Αυτή η οικογένεια προσδιορίζεται μορφολογικά από την εξαιρετικά διατηρημένη αρχιτεκτονική των ανθέων της, 3 χιλιοστά σε διάμετρο, με τέσσερα σέπαλα και τέσσερα πέταλα και 6 στήμονες, το καθένα διατεταγμένο σε σταυρό και τέσσερα εσωτερικά συν δύο εξωτερικά στήμονες (σταυρανθή φυτά). Το φυτό αυτό μετά τη φύτευση τα αρτίβλαστα αναπτύσσουν μία σειρά φύλλων σ' ένα περιορισμένο τμήμα του βλαστού, που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πυκνής ροζέτας (ή ρόδακα) πολύ κοντά στο χώμα. Κατά την άνθιση ο βλαστός επιμηκύνεται σημαντικά και σχηματίζονται σειρές ανθέων (ταξιανθία), καθεμία από τις οποίες ύστερα από αυτογονιμοποίηση παράγει ένα κεράτιο. Όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε αραιή διεύθεση, η μέγιστη διάμετρος της ροζέτας φθάνει τα 4-6 cm και η ταξιανθία τα 30-40 cm σε ύψος (figure 1)¹. Το μικρό μέγεθος των φυτών επιτρέπει την ανάπτυξή τους στο εργαστήριο σε ειδικούς θαλάμους και θερμοκήπια, καθιστώντας έτσι μη αναγκαία τη διαθεσιμότητα αγρών για την εκτέλεση πειραμάτων. Οι σπόροι μπορούν να χωριστούν σε *siliquae* (φρούτα περισσότερο από τρεις φορές μεγαλύτερο από το πλάτος), πράγμα που ισχύει για το *A. thaliana* ή το *silicula* (φρούτα λιγότερο από τρεις φορές όσο το πλάτος). Το όνομα της οικογένειας προέρχεται από μια χαρακτηριστική ένωση αυτού του κλάδου το οποίο χαρακτηρίζει όχι μόνο τα *Brassicaceae* αλλά και μια μεγαλύτερη μονοφυτική ομάδα 15 οικογενειών φυτών (με το *Capparaceae* ως την πιο κοντινή αδελφή ομάδα στην οικογένεια *Brassicaceae*).

Οι ρίζες του φυτού είναι απλές σαν δομή, με μια μόνο ρίζα που αναπτύσσεται κάθετα προς τα κάτω παράγοντας περισσότερες πλευρικές ρίζες. Αυτές οι ρίζες σχηματίζουν

αλληλεπιδράσεις με βακτήρια. Η ρίζα του *Arabidopsis* παρέχει ένα εξαιρετικό μοντέλο για αναπτυξιακές μελέτες². Υπό κανονικές συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας (100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ και 20°C), το *Arabidopsis* ανθίζει σ' έναν μήνα και παράγει ώριμα σπέρματα σε δύο μήνες. Ο χρόνος αυτός μπορεί να ελαττωθεί κατά δύο εβδομάδες, αν τα φυτά αναπτυχθούν υπό συνθήκες συνεχούς φωτός. Η δυνατότητα αυτογονιμοποίησης και ο μεγάλος αριθμός απογόνων (>1000 σπέρματα/φυτό) απλοποιούν τις αναλύσεις κληρονομικότητας και τη διατήρηση γενετικών αποθεμάτων.

Το μικρό μέγεθος του γονιδιώματός του (125 Mbp), και το γεγονός ότι είναι διπλοειδές, καθιστά το *Arabidopsis thaliana* χρήσιμο για γενετική χαρτογράφηση και αλληλούχιση, με περίπου 135 μεγάλα ζεύγη βάσεων και πέντε χρωμοσώματα κάτι που απλουστεύει τη γενετική του χαρτογράφηση, το *A. thaliana* έχει ένα από τα μικρότερα γονιδιώματα μεταξύ των φυτών. Ήταν το πρώτο φυτικό γονιδίωμα που αλληλουχήθηκε, και η αλληλούχιση ολοκληρώθηκε το 2000 από το Arabidopsis Genome Initiative. Η πιο ενημερωμένη έκδοση του γονιδιώματος *A. thaliana* διατηρείται από το Arabidopsis Information Resource (TAIR). Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές εργασίες για την ανάθεση λειτουργιών στα 27.000 γονίδια και στις 35.000 πρωτεΐνες που κωδικοποιούν. Εκτός από τη γονιδιωματική έρευνα και η μεταβολική, παρείχε επίσης χρήσιμες πληροφορίες για το μεταβολισμό αυτού του είδους και πώς οι περιβαλλοντικές διαταραχές μπορούν να επηρεάσουν τις μεταβολικές.

Οι μεταλλάξεις ένθεσης (δηλαδή μεταλλάξεις κατά τις οποίες ένα ξένο τμήμα DNA ενσωματώνεται σ' ένα γονίδιο, οδηγώντας σε απώλεια λειτουργίας του προϊόντος) έχουν δημιουργηθεί για όλα τα γονίδια του *Arabidopsis*, επιτρέποντας έτσι τη λειτουργική ανάλυση οποιουδήποτε γονιδίου και καθιστώντας διαθέσιμο το γενετικό υλικό για τις επόμενες γενιές μοριακών γενετιστών.

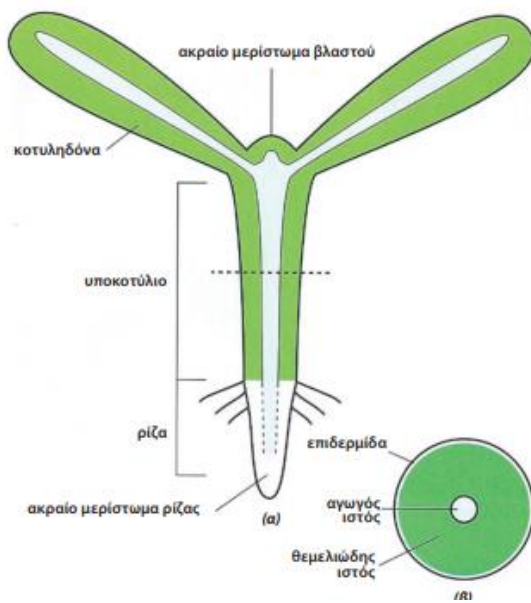


Figure 1: Το φυτικό σώμα στο αρτίβλαστο της *Arabidopsis* (α) Το ακρο-βασικό πρότυπο εμφανίζεται με έναν άξονα που έχει το ακραίο μερίστωμα του βλαστού στη μία άκρη και το μερίστωμα της ρίζας στην άλλη. (β) Μια εγκάρσια τομή στο ύψος του υποκοτυλίου αποκαλύπτει το ακτινωτό πρότυπο που συγκροτείται από τρία συστήματα ιστών: την επιδερμίδα, τον θεμελιώδη ιστό και τον αγωγό ιστό.

1.2 Φυτική Ορμόνη Αυξίνη

Οι φυτορμόνες δρουν με μηχανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν μια αλληλουχία μεταβολικών και μοριακών τροποποιήσεων με κοινά χαρακτηριστικά. Οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν κάποια στάδια όπως την αντίληψη του ερεθίσματος που προέρχεται από εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες που προκαλούν τη σύνθεση μιας φυτορμόνης. Στη συνέχεια η φυτορμόνη μεταφέρεται στα κύτταρα στόχους όπου προσδένεται σε ένα ειδικό υποδοχέα. Επιπροσθέτως, η πρόσδεση της φυτορμόνης στον υποδοχέα της προκαλεί ακολουθίες διαβίβασης σήματος και ακολουθούν δυο εναλλακτικές πορείες. Η πρώτη πορεία περιλαμβάνει μιτωτικές κινάσες ή άλλους αντίστοιχους μηχανισμούς που ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν γονίδια του πυρήνα με τελικό αποτέλεσμα τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Η δεύτερη πορεία περιλαμβάνει την απενεργοποίηση ή καταστροφή ρυθμιστικών πρωτεϊνών που παρεμποδίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Επομένως η εξουδετέρωση των πρωτεϊνών αυτών έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση γονιδίων και σύνθεση πρωτεϊνών.³

Το όνομα αυξίνη δόθηκε στην ουσία η οποία προωθούσε την αύξηση του μεγέθους των κυττάρων, παρουσιάζοντας φυτοορμονική δράση. Αναλυτικότερα, η αυξίνη είναι φυτική ορμόνη η οποία παρουσιάζει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και μορφογένεση των φυτών. Η αυξίνη συνδέεται με την κυτταρική διαίρεση (προάγει την κυτταρική διαίρεση μαζί με τις κυτοκινίνες), την κυτταρική αύξηση και στη διαφοροποίηση των κυττάρων και των ιστών. Σχετίζεται με τη δημιουργία τροπισμών και φωτοτροπισμών, την ανάπτυξη άνθων, τη ριζογένεση και τη δημιουργία ριζικών τριχιδίων και διατήρηση πολικής αύξησης.

Οι αποκρίσεις της αυξίνης ρυθμίζονται από δυο μεγάλες οικογένειες πρωτεϊνών τις **ARF** (*auxin response factors*) και **AUX/IAA** (*Auxin/Indole-3-Acetic Acid*). Στο *Arabidopsis* υπάρχουν 23 πρωτεΐνες ARF και κάθε μια περιέχει μια συντηρημένη επικράτεια σύνδεσης με το DNA. Οι AUX/IAA είναι 29 πρωτεΐνες που περιέχουν τέσσερις διατηρημένους τομείς. Οι πρωτεΐνες ARF είναι πιθανά συστατικά που παρέχουν εξειδίκευση στην απόκριση της αυξίνης μέσω της επιλογής γονιδίων στόχου ως παραγόντων μεταγραφής. Συνδέονται με στοιχεία DNA απόκρισης σε αυξίνη (AuxRE) στους προαγωγείς γονιδίων που ρυθμίζονται με αυξίνη και είτε ενεργοποιούν είτε καταστέλλουν τη μεταγραφή αυτών των γονιδίων ανάλογα με έναν συγκεκριμένο τομέα στη μέση της πρωτεΐνης⁴. Οι πρωτεΐνες AUX/IAA είναι πυρηνικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν διατηρημένες περιοχές που κωδικοποιούνται από την οικογένεια γονιδίων πρώιμης απόκρισης αυξίνης, έχουν συγκεκριμένα τμήματα που αλληλοεπιδρούν με ARF και αναστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων που ενεργοποιούνται από τις πρωτεΐνες ARF.

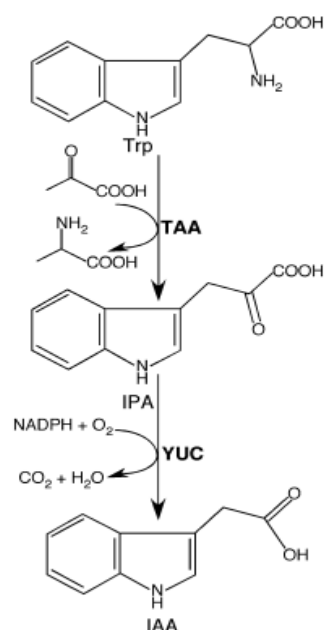
Μοριακές μελέτες αποκάλυψαν ότι τα μέλη της οικογένειας IAA μπορούν να σχηματίσουν διμερή σε συνδυασμό με ARF για τη ρύθμιση γονιδίων με διάφορους τρόπους. Επίσης οι IAA έχουν διαφορετικούς ρόλους στην ανάπτυξη φυτών, στην ανάπτυξη ριζών και βλαστών καθώς και στην ωρίμανση φρούτων⁵.

1.2.1 *Μεταβολισμός αυξίνης*

Η φυτική ορμόνη αυξίνη οδηγεί στην ανάπτυξη και τη μορφογένεση των φυτών. Γενικά αποτελούν μια οικογένεια διαφορετικών ουσιών. Η πρώτη ουσία που αναγνωρίστηκε ως αυξίνη ήταν το ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA), η οποία είναι και η πιο διαδεδομένη αυξίνη. Σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί στα φυτά ως αυξίνες, εκτός από το IAA, το ινδολ-3-βουτανικό οξύ (IBA), το φαινολοξικό οξύ (CPA) και το 4-χλώρο-IAA.

Η Αυξίνη συντίθεται από το αμινοξύ τρυπτοφάνη (Trp) σε δύο χημικά στάδια. Η μετατροπή του Trp (Τρυπτοφάνη) σε IAA πραγματοποιείται σε δύο στάδια και είναι η κύρια οδός βιοσύνθεσης της αυξίνης η οποία παίζει ουσιαστικό ρόλο σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες⁶. Πολλές επιδράσεις της αυξίνης επιτυγχάνονται μέσω αλλαγών στη μεταγραφή των γονιδίων. Η παρουσία της αυξίνης έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνη για την έκφραση ορισμένων γονιδίων, τα οποία απουσία της αυξίνης δεν εκφράζονται⁷.

Το πρώτο βήμα είναι η απομάκρυνση της αμινομάδας από την οικογένεια TAA (tryptophan Aminotransferase of *Arabidopsis*) αμινοτρανσφερασών για την παραγωγή IPA (ινδολο-3-πυροσταφυλικού οξέος). Το δεύτερο βήμα είναι η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του IPA που καταλύεται από την οικογένεια YUC, γονίδια που συνδέονταν αρχικά με τη βιοσύνθεση της αυξίνης, η υπερέκφρασή τους οδηγεί σε υπερβολική παραγωγή αυξίνης, των μονοξυγενεασών της φλαβίνης για να παράγει IAA, CO₂ και νερό⁶.



Εικόνα 1: Βιοσυνθετική οδός εξάρτηση αυξίνης από τρυπτοφάνη.

Το φυσικό μόριο αυξίνης, IAA μπορεί να συντεθεί μέσω του προδρόμου μορίου τρυπτοφάνης (Trp), (βιοσυνθετική οδός) που εξαρτάται από το Trp⁸. Ωστόσο, το IAA μπορεί επίσης να συντεθεί μέσω μιας προτεινόμενης ανεξάρτητης από Trp IAA βιοσυνθετικής οδού.

Ολόκληρη η ρίζα έχει ικανότητα σύνθεσης IAA και οι ρυθμοί σύνθεσης είναι ιδιαίτερα υψηλοί στην κύρια ρίζα και στις άκρες ανάπτυξης πλευρικών ριζών. Η αύξηση της συγκέντρωσης αυξίνης στην κάτω πλευρά της ρίζας, αναστέλλει την επιμήκυνση των κυττάρων.

Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια IAA εξακολουθούν να μην έχουν ακόμη ολοκληρωθεί στα φυτά. Τα γονίδια που κωδικοποιούν ανεξάρτητα Trp ένζυμα μονοπατιού δεν έχουν

ακόμη εντοπιστεί. Ωστόσο, είναι γνωστά πολλά γονίδια και οικογένειες γονιδίων που κωδικοποιούν υποτιθέμενα εξαρτώμενα από Trp ένζυμα οδού⁹

Το IAA παράγεται στις νεαρές καταβολές των φύλλων και το ακραίο ριζικά μερίστωμα αλλά και στα νεαρά φύλλα και τους σπόρους στα αναπτυσσόμενα φρούτα με μονόδρομη μεταφορά(μετακίνηση μορίου προς μια κατεύθυνση δια μέσου ζωντανών κυττάρων) μετακινείται προς τη ρίζα μέσω του βλαστού. Η κίνηση αυτή της αυξίνης χαρακτηρίζεται ως βασιπεταλική από την κορυφή προς τη βάση του φυτού. Αυτή η κίνηση επιτελείται μέσω των κυττάρων του ξυλώδους παρεγχύματος η ηθμοσωληνών από πρωτεΐνες μεταφορείς και απαιτεί δαπάνη ενέργειας.

Η διαβίβαση σήματος μέσω της αυξίνης γίνεται με τη δεύτερη ακολουθία και περιλαμβάνει την πρόσδεση της αυξίνης στον αντίστοιχο υποδοχέα ο οποίος στη συνέχεια επάγει την αποικοδόμηση πρωτεϊνών που παρεμποδίζουν την έκφραση των γονιδίων που ελέγχει η αυξίνη. Για να αποικοδομηθούν οι πρωτεΐνες αυτές ο υποδοχέας ενεργοποιεί την ουμπικουΐτινη, η οποία συνδέεται και επισημαίνει τις πρωτεΐνες-στόχους που πρόκειται να καταστραφούν. Οι σημασμένες πλέον πρωτεΐνες οδηγούνται στα πρωτεασώματα, σύμπλοκα ενζύμων που είναι επιφορτισμένα με την αποδόμηση πρωτεϊνών.

1.2.2 Μεταφορά αυξίνης

Η ενεργή κίνηση των κυττάρων στα οποία διακινείται η αυξίνη είναι γνωστή ως μεταφορά πολικής αυξίνης (PAT), σε αντίθεση με την άμεση και ταχεία μεταφορά της αυξίνης από τους βλαστούς στις ρίζες μέσω το φλοιού. Δυο γενικές κατηγορίες μεταφορέων που εμπλέκονται στο PAT είναι φορείς εισροής αυξίνης όπως το AUX1 (Auxin resistant 1) όπως aux1, οι οποίοι είναι μεταφορείς αυξίνης, και το LAX1 (όπως και το aux1) οι οποίοι μεταφέρουν την αυξίνη μέσα στα κύτταρα, και οι μεταφορείς όπως το PIN (Pin-formed,ATP-binding casset type ABCB), (εικόνα 3) οι οποίες αντλούν την αυξίνη από το κύτταρο. Τα PINs εντός του κυττάρου επηρεάζουν την κατεύθυνση της μεταφοράς αυξίνης¹⁰.

1.3 Γονίδιο *Trh1*

Η δημιουργία ριζικών τριχιδίων περιλαμβάνει το σχηματισμό επιμήκυνσης στο άκρο του τριχοβλάστη από τοπική διάχυτη ανάπτυξη. Τα φυτά Arabidopsis είναι ομοζυγωτά Trh1(tiny root hair) δημιουργήθηκαν μέσω της μεθόδου σήμανσης T-DNA. Οι

τριχοβλάστες των φυτών *Trh1* σχηματίζουν περιοχές έναρξης αλλά δεν υποβάλλονται σε ανάπτυξη άκρων. Μια προβλεπόμενη πρωτογενής δομή του *TRH1* δείχνει ότι ανήκει στην οικογένεια μεταφορέων *AtKT / AtKUP / HAK K⁺*. Ο φαινότυπος *TRH1* δεν αποκαταστάθηκε όταν τα μεταλλαγμένα φυτά αναπτύχθηκαν σε υψηλές εξωτερικές συγκεντρώσεις καλίου. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι το *Trh1* μεσολαβεί στη μεταφορά *K⁺* στις ρίζες του *Arabidopsis* και είναι υπεύθυνο για τη συγκεκριμένη μετατόπιση του *K⁺*, το οποίο είναι απαραίτητο για την επιμήκυνση των τριχιδίων των ριζών¹¹.

Το *TRH1* το μετάλλαγμα απομονώθηκε από έναν πληθυσμό 4000 ατόμων με μεταλλαξιγένεση που περιέχουν ενθέσεις T-DNA¹² Στη συνέχεια με την παρουσία ενός στενά συνδεδεμένου T-DNA, κάθε φυτό ανθεκτικό στην καναμυκίνη διαχωρίζεται για το *TRH1* μετάλλαξη. Όταν δεν εκφράζεται το *TRH1* παρατηρείται ανάπτυξη ριζικών τριχιδίων στο *Arabidopsis*. Όταν υπάρχει το γονίδιο *TRH1* παρατηρούνται δυο φαινοτυπικές ανωμαλίες. Πρώτον, το φυτό εμφανίζεται μη γεωτροπικό δηλαδή δε μπορεί να αντιληφθεί τη βαρύτητα. Δεύτερον, υπάρχει πιθανότητα δημιουργίας ριζικών τριχιδίων αλλά πιο λεπτές και αραιές κατά μήκος της ρίζας. Το γεγονός ότι το γονίδιο ελέγχει την ανάπτυξη τριχιδίων αποδεικνύει ότι είναι ένας θετικός γενετικός ρυθμιστής της ανάπτυξης τριχιδίων και μπορεί να θεωρηθεί και ως βιοαισθητήρας περιβαλλοντικών πιέσεων.

1.3.1 Πρωτεΐνες PINs

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες PIN-FORMED (PIN) ορίζονται, μέσω μοριακών μελετών γενετικής στο *Arabidopsis*, ως πρωτεΐνες εκροής της αυξίνης. Καθορίζουν την Πολική Μεταφορά Αυξίνης (Π.Μ.Α.) μέσω του ασύμμετρου υποκυτταρικού εντοπισμού τους). Οι PINs πήραν το όνομά τους από τα μεταλλάγματα σε σχήμα καρφίτσας που παρατηρήθηκαν σταρίηϊτου *Arabidopsis*¹³. **Τα PINs είναι πρωτεΐνες, οι οποίες ρυθμίζουν την κατανομή της αυξίνης όντας μεταφορείς *K⁺* σε πολλαπλές αναπτυξιακές διαδικασίες (εμβρυογένεση, οργανογένεση, διαφοροποίηση ιστών).** Ο πολικός εντοπισμός των PIN στα κύτταρα είναι έντονα δυναμικός. Αποκρίνεται σε εξωγενή και ενδογενή σήματα, μεταξύ των οποίων και η αυξίνη και ρυθμίζεται από την κυκλοφορία κυστιδίων, την αποδόμηση και φωσφορύλιωση πρωτεϊνών. Σε κυτταρικό επίπεδο, η προσαρμοστικότητα του συστήματος μεταφοράς μπορεί να απορρέει από τη συνεχή ανακύκλωση των PIN μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και των ενδοσωμάτων. Έτσι επιτυγχάνονται γοργές αλλαγές στον πολικό εντοπισμό των PIN και κατ' επέκταση στην αναδιανομή της αυξίνης. Όλες οι πρωτεΐνες PIN

έχουν παρόμοια δομή με αμινο/καρβοξυ τελικό ακρό υδρόφοβους, μεμβρανικές επικράτειες που διαχωρίζονται από μια κεντρική υδρόφιλη περιοχή. Η δομή των υδρόφοβων περιοχών διατηρείται καλά. Συνολικά, το *Arabidopsis* έχει οκτώ γονίδια PIN, από τα οποία έξι έχουν χαρακτηριστεί ως τώρα λειτουργικά: PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN5 και PIN7. Τα PIN6 και PIN8 αναμένουν ακόμη χαρακτηρισμό.¹⁴

Επιπλέον, τα PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 στο *Arabidopsis* εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη (PM), όπου εμπλέκονται στην εκροή της αυξίνης. Επιπροσθέτως είναι υπεύθυνες για πολική μεταφορά αυξίνης. Το Pin 5,8 εντοπίζεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου.

Το **PIN1** συμμετέχει στην κατακόρυφη μεταφορά της αυξίνης από το βλαστό προς τη ρίζα¹⁵. Στις ρίζες, η πρωτεΐνη βρίσκεται κυρίως στο βασικό άκρο των αγγειακών κυττάρων, αλλά ασθενή σήματα πρωτεΐνης μπορούν να ανιχνευθούν στην επιδερμίδα και στον φλοιό. Τα PIN1 και PIN2 είναι σημαντικά για την ανάπτυξη / συντήρηση μερισμάτων ρίζας υπό κανονικές συνθήκες.

Το **PIN2** σχετίζεται με την πολική μεταφορά αυξίνης και συμβάλλει στο γεωτροπισμό. Βρίσκεται στην επιδερμίδα και το πλευρικό κάλυμμα της ρίζας.¹⁶

Το **PIN3** εκφράζεται σε ιστούς που ευθύνονται για την ανίχνευση της βαρύτητας. Το PIN3 εντοπίζεται στη πλασματική μεμβράνη και στα κυστίδια. Στις ρίζες, το PIN3 εκφράζεται χωρίς έντονη πολικότητα στα επίπεδα δύο και τριών των κυττάρων της καλύπτρας (columella), στη βασική πλευρά των αγγειακών κυττάρων και στην πλευρική πλευρά των κυκλικών κυττάρων της ζώνης επιμήκυνσης. Η υπερέκφραση του PIN3 αναστέλλει την ανάπτυξη των ριζικών κυττάρων. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης παίζει ρόλο στη ρύθμιση της διακίνησης στη πλασματική μεμβράνη

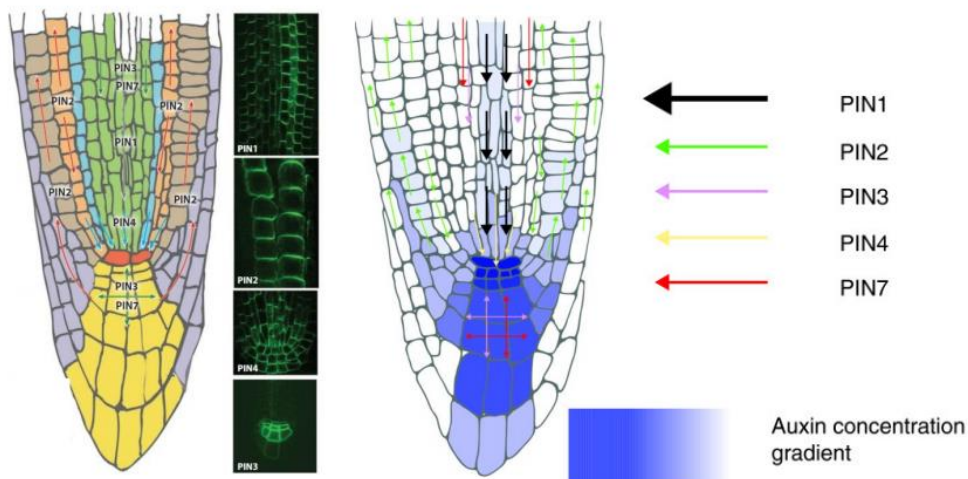
Το **PIN4** κωδικοποιεί έναν πιθανό φορέα εκροής αυξίνης που εντοπίζεται στην ανάπτυξη και την ωρίμανση των μεστωμάτων ρίζας. Συμμετέχει στη συντήρηση των βαθμίδων εμβρυϊκής αυξίνης. Στη ρίζα, το PIN4 ανιχνεύεται γύρω από το ανενεργό κέντρο (quiescent centre) και τα κύτταρα που το περιβάλλουν.

Το **PIN5** δεν έχει άμεσο ρόλο στη μεταφορά κυττάρων σε κύτταρο αλλά ρυθμίζει την ομοιόσταση και τον μεταβολισμό της ενδοκυτταρικής αυξίνης. Το PIN5 εντοπίζεται, σε αντίθεση με άλλες χαρακτηριστικές πρωτεΐνες PIN μεμβράνης πλάσματος, στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER).

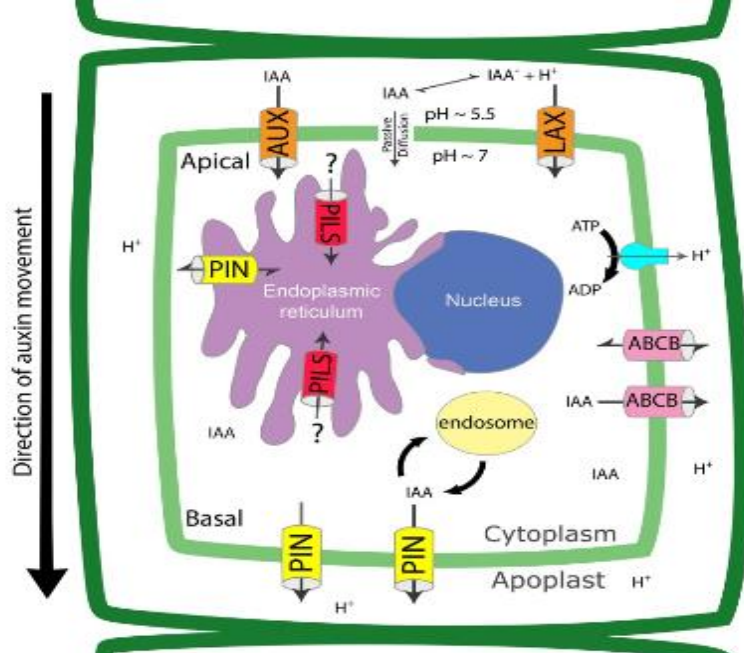
Το **PIN6** εκφράζεται κατά τη διάρκεια πολλαπλών αναπτυξιακών διαδικασιών που ρυθμίζονται από την αυξίνη. Η απώλεια της λειτουργίας PIN6 παρεμποδίστηκε από την ανάπτυξη της πρωτογενούς ρίζας και την ανάπτυξη της πλευρικής ρίζας. Η έκφραση του PIN6 επηρέασε τη μεταφορά αυξίνης και παρεμπόδισε την ομοιοστάση της αυξίνης σε άλλες διαδικασίες ανάπτυξης, όπως η κυριαρχία στην κορυφή των βλαστών, η ανάπτυξη πλευρικής ρίζας, η τυχαία δημιουργία ριζών, η ανάπτυξη των ριζών και η κυματική ρίζα.¹⁷

Το **PIN7** σηματοδοτεί την κίνηση προς το γεωτροπισμό. Αυτό το αναπτυξιακό πλαίσιο αποκαλύπτει τους διακριτούς ρόλους των φορέων εκροής PIN αυξίνης στον έλεγχο της ακτινικής ανάπτυξης των ριζικών συστημάτων.¹⁸

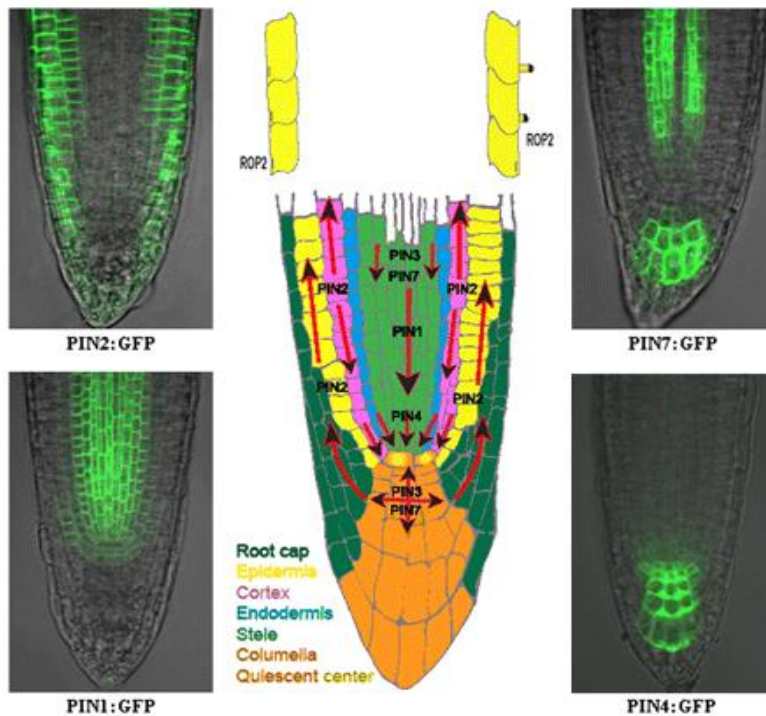
Το **PIN8** κωδικοποιεί έναν μεταφορέα αυξίνης με ισχυρή έκφραση σε έναν αρσενικό γαμέτη. Μελέτες μεταλλαγμάτων αποκαλύπτουν ένα σημαντικό ρόλο για τη μεταφορά της αυξίνης στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της λειτουργίας της γύρης.



Εικόνα 2: Κατανομή των PIN πρωτεϊνών συνεισφέρει στη δημιουργία διαβάθμισης αυξίνης gradients.



Εικόνα 3: Οι πρωτεΐνες μεταφοράς αυξίνης ρυθμίζουν τις ενδοκυτταρικές ροές και τις ροές από κύτταρο σε κύτταρο. Η αυξίνη IAA διασχιζεί τη πλάσματική μεμβράνη μέσω παθητικής διάχυσης, ως πρωτονιωμένη μορφή, ή μέσω μεταφορέων PM, ως αποπρωτονιωμένη μορφή. Οι πρωτεΐνες PIN είναι φορείς μεταφοράς που βρίσκονται στα PM και ER και μπορούν να εισαχθούν ξανά στη λιπιδική διπλή στρώση με ανακύκλωση μέσω της ενδοκυτταρικής οδού. Τα AUX / LAXs και PIL είναι φορείς εισροής που βρίσκονται στα PM (πλάσματική μεμβράνη) και ER (ενδοπλασματικό δίκτυο), αντίστοιχα. Τα ABCB βρίσκονται στο PM και χρησιμοποιούν ενέργεια από ATP για να μετατοπίσουν το IAA. Ο συντονισμένος εντοπισμός των διαφόρων μεταφορέων καθορίζει τη συνολική κατεύθυνση της ροής αυξίνης και συμβάλλει στη ρύθμιση των επιπέδων ενδοκυτταρικών αυξινών²⁹.



Εικόνα 4: Πολικός εντοπισμός των πρωτεϊνών PIN στο άκρο της ρίζας Arabidopsis. Η κατεύθυνση της μεταφοράς αυξίνης (βέλη) καθορίζεται από τον πολικό, υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών PIN. Το PIN1 εντοπίζεται στη βασική πλευρά (ριζική πλευρά) του αγγειακού συστήματος ρίζας. Το PIN2 στη βασική πλευρά των φλοιού των κυττάρων και στην κορυφή (βλαστός προς την κορυφή) των επιδερμικών κυττάρων και των κυττάρων ρίζας. Το PIN3 με έναν μη πολικό τρόπο στα κύτταρα της καλύπτρας της ρίζας. Το PIN4 στη βασιπεταλική πλευρά των κυττάρων στο κεντρικό ριζικό σύστημα και με λιγότερο έντονη πολικότητα στα κελιά του κέντρου ηρεμίας και το PIN7 στη βασιπεταλική πλευρά των επιγονατίδων κυττάρων και του απολικού στα κύτταρα του στατευχύματος (columella). Το ROP2 εντοπίζεται επίσης ασύμμετρα, σχετίζεται με τις θέσεις σχηματισμού τριχιδίων ρίζας. Παρατίθενται παραδείγματα PIN1: GFP, PIN2: GFP, PIN4: GFP και PIN7: GFP στη ρίζα³⁰.

1.4 Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών

Η φωσφορυλίωση είναι η χημική διαδικασία κατά την οποία προστίθεται μια ομάδα φωσφόρου σε ένα οργανικό μόριο. Αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs)¹⁹. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων και κατά συνέπεια τη

δομή τους. Οι δομικές αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν την ενεργότητα της πρωτεΐνης και τις αλληλεπιδράσεις της με άλλα βιομόρια. Για να πραγματοποιηθεί η φωσφορυλίωση χρειάζονται τουλάχιστον 3 στοιχεία. Το υπόστρωμα, το ένζυμο και το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη). Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών έγκειται σε 3 αμινοξέα (Τυροσίνη, Σερίνη, Θρεονίνη) τα οποία φέρουν ελεύθερο -OH στην πλευρική τους αλυσίδα. Για να πραγματοποιηθεί η φωσφορυλίωση απαραίτητες είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες (αναγνωρίζουν τις πρωτεϊνικές περιοχές που φέρουν Ser, Thr, Tyr) οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων από το ATP στις πλευρικές αλυσίδες σερίνης και θρεονίνης (πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης) ή τυροσίνης (πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης). Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες καταλύουν την απομάκρυνση των φωσφορικών ομάδων από τα αμινοξέα αυτά μέσω υδρόλυσης.

Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε κατάλοιπα Ser/Thr και Tyr είναι ένα ρυθμιστικό σήμα που λειτουργεί ως διακόπτης στα σηματοδοτικά μονοπάτια. Ο φωσφορικός εστέρας που δημιουργείται στις πρωτεΐνες με τη δράση κινασών είναι μια σταθερή τροποποίηση που δημιουργεί αλλαγή στη διαμόρφωση και, συνεπώς, στη δραστηριότητα των κυτταρικών πρωτεϊνών. Εξαιτίας της σταθερότητας των φωσφορικών εστέρων απαιτείται δράση πρωτεϊνικών φωσφατασών για την αποκοπή τους. Το υψηλό επίπεδο ρύθμισης των κινασών και των φωσφατασών χρησιμοποιείται από το κύτταρο, για να δημιουργήσει ένα τοπικά και χρονικά περιορισμένο σήμα, που επηρεάζει τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών με πολύ εξειδικευμένο τρόπο.

1.3.2 Αρχές Ρύθμισης ενζύμων στην φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση

Η πρωτεϊνική φωσφορυλίωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μετατρέψει τη δράση του ενζύμου σε ενεργή ή μη ενεργή. Το ίδιο ισχύει και για την αποφωσφορυλίωση των ενζύμων. Στο κύτταρο συχνά βρίσκουμε καταρράκτες αντιδράσεων φωσφορυλίωσης, όπου ορισμένες αντιδράσεις φωσφορυλίωσης συνδέονται η μία με την άλλη. Επιπλέον, υπάρχουν δίκτυα φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης. Πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr και Πρωτεϊνικές φωσφατάσες Ser/Thr, τα οποία επιτρέπουν στο κύτταρο να αποκριθεί σε εξωτερικά ερεθίσματα με αρμονικό τρόπο. Μια πρωτεϊνική κινάση ή πρωτεϊνική φωσφατάση μπορεί να ρυθμίζεται από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Έτσι, διαφορετικά εξωτερικά ερεθίσματα μπορεί να επηρεάσουν τη φωσφορυλιωμένη κατάσταση μιας πρωτεΐνης. Αυτή η διαφορετική διέγερση μπορεί να

διαμεσολαβείται από τις υπομονάδες του ενζύμου. Η ανταπόκριση του κυττάρου στα σήματα που θα αποκριθεί εξαρτάται από την κατάσταση στην οποία βρίσκεται. Τα διαφορετικά σήματα μπορεί, επίσης, να ρυθμίζονται και να διαφοροποιούνται από διαφορετικές θέσεις φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης. Εξαιτίας της προτίμησης υποστρωμάτων των πρωτεϊνικών κινάσων, οι πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης που υπάρχουν σε ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα μπορεί να φωσφορυλιωθούν από διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες. Οι ανεξάρτητες θέσεις φωσφορυλίωσης μπορεί να έχουν ξεχωριστές λειτουργίες στη ρύθμιση της δράσης του ενζύμου, έτσι ώστε μια ειδική ρύθμιση του ενζύμου να είναι πιθανή. Πολλές φυσιολογικές λειτουργίες της πρωτεϊνικής κινάσης και της πρωτεϊνικής φωσφατάσης εξαρτώνται από τη μεταφορά του ενζύμου, με τη βοήθεια εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές δομές κοντά στα υποστρώματά τους. Οι πρωτεϊνικές κινάσες μπορούν να υπάρξουν σε ενεργή και ανενεργή διαμόρφωση και αυτό εξηγεί γιατί μπορούν να παίζουν τον ρόλο διακόπτη στα σηματοδοτικά μονοπάτια. Στο μεγαλύτερο διάστημα βρίσκονται στην “off” κατάσταση (κατάσταση χαμηλής ενέργειας) και κάτω από την επίδραση ειδικών σημάτων μεταπίπτουν στην “on” κατάσταση της πλήρους ενεργοποίησης.

1.5 Μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης Trh1

Ο μηχανισμός ελέγχου της σχέσης δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών είναι χημικός. Η πρώτη μέθοδος βρίσκεται στο επίπεδο της μεταγραφής. Το μάτισμα του ίδιου γονιδιακού προϊόντος μπορεί να οδηγήσει σε μια ποικιλία μοναδικών πρωτεϊνών με μοναδικές λειτουργίες. Το δεύτερο είναι μέσω στοχευμένης μετα-μεταφραστικής τροποποίησης των υπαρχουσών πρωτεϊνών και πεπτιδίων οι οποίες «επισημαίνονται» χημικά. Αυτές οι «ετικέτες» μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης ή μπορεί να ερμηνευθούν από ένα άλλο μικρό μόριο σύνδεσης, το οποίο στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι μια πρωτεΐνη που λειτουργεί ως βιολογικός διακόπτης ON / OFF. Αυτή η σε μεγάλο βαθμό αναστρέψιμη σήμανση προσφέρει τη δυνατότητα συντονισμού των δικτύων σηματοδότησης σε χρονικό διάστημα γρηγορότερα από ό, τι απαιτείται για τη σύνθεση πρωτεϊνών και την πρωτεόλυση²⁰. Η σερίνη μεταλλάσσεται συχνά σε γλουταμικό οξύ (μερικές φορές ασπαρτικό οξύ) για να μιμείται τη φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης (ON). Αντιστρόφως, η μετάλλαξη σερίνης σε αλανίνη αποτρέπει την πιθανή φωσφορυλίωση (OFF). Είναι συζητήσιμο εάν το γλουταμικό οξύ μπορεί πραγματικά να αντικαταστήσει μια φωσφοσερίνη. Στο

Arabidopsis Thaliana στο γονίδιο Trh1 πραγματοποιούνται 2 μεταλλάξεις, το ON το οποίο σηματοδοτεί την αλλαγή Σερίνης σε Γλουταμινικό Οξύ και το OFF σηματοδοτεί μετάλλαξη πρωτεϊνικού οξέος Σερίνης σε Αλανίνη. Επομένως, όταν ένα γλουταμινικό ή ασπαρτικό οξύ αντικαθιστά μια σερίνη, είναι ένα φωσφομιμητικό της φωσφοσερίνης και μπορεί να κάνει την πρωτεΐνη πάντα στη φωσφορυλιωμένη μορφή της. Οι πρωτεΐνες αυτές δηλαδή, λειτουργούν ως «κρίσιμοι ρυθμιστές» οδηγώντας την αποφωσφορυλίωση των φωσφορυλιωμένων στόχων, σχηματίζοντας έτσι έναν «μοριακό διακόπτη» που ενεργοποιεί ή απενεργοποιεί.

1.6 Μετασχηματισμός *Arabidopsis Thaliana*

Για την πραγματοποίηση του μετασχηματισμού τηρήθηκε το πρωτόκολλο²¹ διαπιστώθηκε ότι τα άλατα MS, οι ορμόνες κ.α. δε διαφέρουν.. Με το πρωτόκολλο αυτό επιτυγχάνεται μετασχηματισμός με ποσοστό πάνω του 1% (δηλ. 1 μετασχηματισμός για κάθε 100 σπόρους θα είναι διαγονιδιακά). Το ποσοστό επιτυχίας σταθερού μετασχηματισμού ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν τον αριθμό μετασχηματισμένων φυτών που θα δημιουργηθούν είναι η πυκνότητα της καλλιέργειας και το στέλεχος του *Agrobacterium*, η καλή εφαρμογή του κενού, και οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών μετά το μετασχηματισμό.

1.6.1 Ανάπτυξη φυτών και διείσδυση με κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium*

Όταν τα φυτά φτάσουν ένα ύψος 20-25cm και τα πρώτα άνθη έχουν σχηματιστεί, είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν. Αναπτύσσουμε μία καλλιέργεια με το κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium* (που φέρει την επιθυμητή κατασκευή του δυαδικού φορέα) σε 5ml θρεπτικό μέσο LB για 16 ώρες στους 28⁰C. 1ml αυτής της καλλιέργειας μεταφέρεται σε 500 ml θρεπτικό μέσο LB και αναπτύσσεται στους 28⁰C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει OD₆₀₀=2.0. Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 5min στις 5000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύονται σε 750 ml διαλύματος διείσδυσης (IM). Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί για άλλες 2 ώρες.

Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε ένα δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 500ml και όλο το δοχείο τοποθετείται σε έναν κάδο κενού. Ένα δοχείο που περιέχει 4 ανεπτυγμένα φυτά αναποδογυρίζεται και τα φυτά εμβαπτίζονται μέσα στην καλλιέργεια του

Agrobacterium. Προσέχουμε τα φυτά να είναι βυθισμένα ολόκληρα μέσα στην καλλιέργεια, συμπεριλαμβανομένης της ροζέτας και των δευτερογενών βλαστών που αρχίζουν να εμφανίζονται στη βάση της ροζέτας. Συνίσταται το χώμα να ενυδατώνεται καλά πριν την διείσδυση, ώστε να απορροφά όσο το δυνατό λιγότερη καλλιέργεια *Agrobacterium*. Σε αντίθετη περίπτωση το μολυσμένο χώμα παρεμποδίζει την ανάπτυξη των φυτών. Ο κάδος κενού κλείνεται αεροστεγώς και με τη βοήθεια μιας αντλίας λαδιού εφαρμόζεται κενό 400 mm Hg, για 5-10 λεπτά. Μεταφορά των φυτών σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασίας 22°C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι), μέχρι να κλείσουν τον κύκλο ζωής τους. Μόλις τα φυτά αφυδατωθούν, γίνεται συγκομιδή των σπερμάτων τους.

1.6.2 Επιλογή μετασχηματισμένων φυτών T3 γενιάς

Γενικά, σταθερός μετασχηματισμός διαρκεί το πολύ 1 ώρα, ο μετασχηματισμός στοχεύει στα ανώριμα διπλοειδή μητρικά κύτταρα κατά μήκος του βλαστικού σώματος. Ουσιαστικά, μετασχηματίζονται τα αρχέγονα μητρικά κύτταρα του βλαστού τα οποία εν συνεχεία δίνουν γαμετικά κύτταρα κ έπειτα όταν κλείσει ο κύκλος του φυτού πραγματοποιείται αυτογονιμοποίηση η οποία με τη σειρά της δίνει διαγονιδιακά σπέρματα τα οποία συλλέγονται για την επόμενη γενιά T1., ο συνολικός χρόνος συλλογής σπερμάτων διαρκεί 2 μήνες και στη συνέχεια τοποθετούνται σε θρεπτικό υλικό παρουσία αντιβιοτικού. Μετα τα φυτά αναπτύσσονται στο χώμα και προχωράμε σε T2 κ T3 γενιά και αναλύουμε το φαινότυπο. Ο μετασχηματισμός στα φυτά πραγματοποιείται αρχικά δημιουργώντας την κατασκευή (2) 35S::TRH1:ON:YFP:FLAG και 35S::TRH1:OFF:YFP:FLAG ανάμεσα σε αριστερό και δεξί συνοριακό της T-DNA περιοχής του ti-plasmid του Αγροβακτηρίου στο γονιδίωμα του φυτού. Πραγματοποιείται μεταφορά σπερμάτων, αφού πρώτα αποστειρώνονται (διάλυμα χλωρίνης, αιθανόλης) προκειμένου να επιστρωθούν στο κατάλληλο τρυβλίο σε θρεπτικό μέσο με επιλογή το οποίο εμπεριείχε το αντιβιοτικό υγρομυκίνης από όπου θα επιλεγούν τα διαγονιδιακά σπέρματα. Η πλειονότητα των φυτών που αναπτύσσεται στο θρεπτικό υλικό πεθαίνει αναπτύσσονται αρχικά, αλλά λόγω του ότι δε μπορούν να φωτοσυνθέσουν γίνονται χλωρωτικά, ενώ τα διαγονιδιακά σπέρματα μεταβολίζουν την υγρομυκίνη και εμφανίζουν διπλά και τριπλά ζευγάρια φύλλων, τότε το μεταφέρεται στο χώμα και διατηρείται σε ένα θάλαμο επώασης με σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα τρυβλία μεταφέρονται σε θάλαμο

ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22⁰C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι).

- ❖ Τα τρυβλία επωάζονται σε αυτές τις συνθήκες για περίπου 14 ημέρες.
- ❖ Μετά από 5-7 ημέρες τα μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύσσονται σε σκούρα πράσινα φυτά και έχουν φυσιολογικό φαινότυπο. Η ρίζα τους είναι κοντή αλλά φυσιολογική. Τα μη μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύσσουν πολύ κοντό ριζικό σύστημα και έχουν ανοιχτές πράσινες ή υποκίτρινες κοτυληδόνες. Μετά τη δέκατη ημέρα ο διαχωρισμός των μετασχηματισμένων φυτών από τα μη μετασχηματισμένα είναι πλέον εμφανής. Τα μετασχηματισμένα φυτά αναπτύσσουν σχεδόν φυσιολογική ρίζα και δεύτερο ζευγάρι φύλλων, ενώ η ανάπτυξη των μη μετασχηματισμένων επιβραδύνεται και τελικά νεκρώνονται.
- ❖ Μετά την επιλογή, τα μετασχηματισμένα φυτά μεταφέρονται σε άλλα τρυβλία με θρεπτικό μέσο 1xMS, χωρίς αντιβιοτικό προκειμένου να αναπτυχθούν όσο το δυνατό καλύτερα μέχρι το στάδιο της ροζέτας και τότε μεταφέρονται στο χώμα για να συνεχιστεί η ανάπτυξή τους στις ίδιες συνθήκες φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας.

Η T3 γενιά (ομόζυγα) φαινοτυπικά θα μας δείξει διαφορές μεταξύ των σειρών ON-OFF (ριζικά τριχίδια, γεωτροπισμό) αναλόγως τις πειραματικές συνθήκες.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, κατά το μετασχηματισμό σε κάθε τριβλίο πραγματοποιήθηκε ένα διαφορετικό γεγονός. Σε κάθε μετασχηματισμό για μια κατασκευή χρειάζονται πολλά 'transformats'. Με την κατασκευή ON, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός και προέκυψαν 6 διαφορετικές διαγονιδιακές σειρές δηλαδή διαφορετικά γεγονότα μετασχηματισμού (**σειρές ON 6,10,13,25,28,38** και για το OFF 1,11,18 αντίστοιχα). Το ON έχει μπει σε διαφορετικό διαγονίδιο στο line 1 σε διαφορετική θέση. Από τα 6 αυτά παρατηρήθηκε πως το έκτο ήταν το πιο σταθερό φαινότυπο στις μετέπειτα γενεές.

1.7 *Οντολογία Γονιδίων*

Η οντολογία γονιδίων (*Gene Ontology, GO*) αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο της βιολογίας συστημάτων και της βιοπληροφορικής, καθώς περιέχει βιολογικές πληροφορίες για τη λειτουργία των πρωτεϊνών και απότερο σκοπό έχει την

απόδοση όρων για τη λειτουργία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί κάθε γονίδιο. Τα γονίδια ή οι πρωτεΐνες συνδέονται με όρους GO μέσω επισημειώσεων (*annotations*). Κάθε επισημείωση στο GO περιέχει μια πηγή και μια καταχώρηση βάσης δεδομένων. Η πηγή μπορεί να είναι αναφορά βιβλιογραφίας, αναφορά βάσης δεδομένων, ή υπολογιστικά στοιχεία. Το GO υποδιαιρείται σε τρεις κατηγορίες (οντολογίες) που περιγράφουν τα γονίδια όλων των μελετημένων οργανισμών στη βάση : Μοριακή Λειτουργία(*Molecular Function*), Βιολογική Διαδικασία(*Biological Process*) και το Κυτταρική τοποθέτηση (*Cellular Component*).

Το πιο καίριο χαρακτηριστικό των συγκεκριμένων οντολογιών είναι η διασφάλιση ύπαρξης κάθε όρου μόνο σε μία από τις τρεις οντολογίες. Επεξηγώντας, όταν αποδίδεται ένας όρος Γονιδιακής οντολογίας σε ένα γονίδιο αυτόματα αποκλείεται η ύπαρξη ενός αντίστοιχου όρου από άλλη οντολογία που φέρει πανομοιότυπες ιδιότητες.

- Η **Molecular function (MF)** σχετίζεται με τη βιοχημεία (πρόσδεση ή κατάλυση αντίδρασης), της μοριακής λειτουργίας δηλαδή των πρωτεϊνικών προϊόντων τους, με ποιο τρόπο επιτελεί μοριακά τη λειτουργία της η πρωτεΐνη που αντιστοιχεί στο γονίδιο. (φωσφορυλίωση, πρόσδεση DNA κ.α.)
- Η **Biological Process (BP)** περιλαμβάνει διαδικασίες που αφορούν την κυτταρική λειτουργία όπως π.χ κυτταρικός κύκλος, ανάπτυξη, ανοσοαπόκριση, μεταβολισμός κ.α.
- Η **Cellular component (CC)** περιλαμβάνει περιοχές κυτταρικού περιβάλλοντος εντός των οποίων εντοπίζονται πρωτεΐνες π.χ. νουκλεόπλασμα, σύμπλεγμα Golgi, μιτοχόνδρια κ.α. Δηλαδή, περιγράφει τα μέρη στο κύτταρο όπου τα γονιδιακά προϊόντα εντοπίζονται ενεργά.

Οι **MF** και **CC** οντολογίες απαντούν στο ερώτημα του τι κάνει ένα γονιδιακό προϊόν και σε ποια μέρη βρίσκεται ενεργό ενώ η **BP** οντολογία αποσαφηνίζει το βιολογικό σκοπό που επιτελεί ένα γονιδιακό προϊόν

1.7.1 Δομή Οντολογίας

Η οντολογία μπορεί να παρουσιάζεται σαν άκυκλος γραφος (**DAG, Directed Acyclic Graph**) με κόμβους να αναπαριστούν τα αντικείμενα και τις ακμές τις

σχέσεις μεταξύ τους. Η επιλογή του σχήματος αφήνει το περιθώριο πολλαπλής συγγένεια των αντικειμένων μεταξύ τους.

Η δομή καθεμίας από τις τρεις οντολογίες-απόψεις φέρει τα εξής κύρια χαρακτηριστικά. Κατ' αρχήν, είναι μία δομή Κατευθυνόμενου Άκυκλου Γράφου που αντίθετα με τις δενδρικές δομές επιτρέπει την πολλαπλή γονεϊκότητα. Δεύτερον, αποτελείται αποκλειστικά από σχέσεις θεμελιώδους τύπου (“is-a”, ”part-of”) και κάθε όρος έχει ένα μοναδικό αναγνωριστικό σημείο που χρησιμοποιείται σαν παραπομπή μεταξύ των συνεργαζόμενων βάσεων δεδομένων. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο αριθμός των σχέσεων (ακμών) και στις τρεις οντολογίες-απόψεις είναι περίπου μιάμιση φορά μεγαλύτερος από τον αριθμό των όρων (κόμβων). Η μόνη διαφορά με χρήση της Γονιδιακής Οντολογίας εντοπίζεται στην MF οντολογία όπου η αναλογία κόμβων προς ακμές είναι προσεγγιστικά ίση με ένα. Όσον αφορά τον τύπο των σχέσεων της Γονιδιακής Οντολογίας ισχύουν τα ακόλουθα. Ο τύπος “είναι” (“is-a” type) αποτελεί μία απλή σχέση κλάσης – υποκλάσης. Μ' άλλα λόγια, δηλώνει μία σχέση κληρονομικότητας μεταξύ γονέα και παιδιού. Για παράδειγμα, ένα πυρηνικό χρωμόσωμα (nuclear chromosome) είναι ένα (is-a) χρωμόσωμα (chromosome) αφού φέρει όλες τις ιδιότητες του χρωμοσώματος σε συνδυασμό με τα όποια πρόσθετα γνωρίσματα του προσδίδει ο όρος πυρηνικός.²²

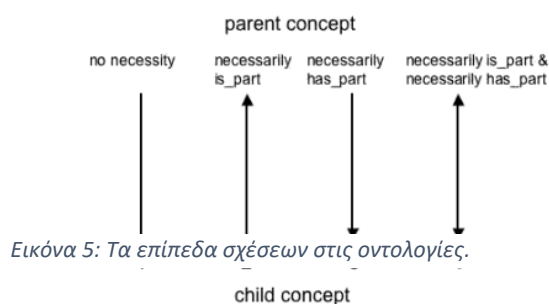
Από την άλλη, ο τύπος “μέρος-του” (“part-of” type) είναι πιο πολύπλοκος αφού υπάρχουν τέσσερα βασικά επίπεδα περιορισμού για τον τύπο αυτό:

- το επίπεδο όπου δεν υπάρχει κανένας περιορισμός (no restriction),
- το “απαραιτήτως είναι μέρος-του” (“necessarily is-part”) επίπεδο,
- το “απαραιτήτως περιέχει” (“necessarily has-part”) επίπεδο και
- το “απαραιτήτως είναι μέρος-του και περιέχει” (“necessarily is-part and has-part”) επίπεδο.

Αναλυτικότερα, στο επίπεδο όπου δεν υπάρχει κανένας περιορισμός (no restriction) δεν μπορεί να εξαχθεί κανένα συμπέρασμα για τη σχέση μεταξύ “parent - child” εκτός βέβαια από το γεγονός ότι ο γονέας μπορεί να περιέχει το παιδί και το παιδί μπορεί να αποτελεί μέρος του γονέα. Στο “απαραιτήτως είναι μέρος-του” (“necessarily is-part”) επίπεδο η ύπαρξη του παιδιού δεν νοείται χωρίς αυτή του γονέα. Για παράδειγμα, η διχάλα αντιγραφής (replication fork) είναι απαραίτητα μέρος του (necessarily is-part

of) χρωμοσώματος (chromosome). Έτσι, όποτε αυτή συμβαίνει είναι πάντα μέρος του χρωμοσώματος. Από την άλλη, κάθε χρωμόσωμα δεν περιέχει απαραίτητα διχάλα

Το “απαραιτήτως περιέχει” (“necessarily has-part”) επίπεδο είναι το αντίστροφο του “απαραιτήτως είναι μέρος-του”. Εδώ, όποτε ο γονέας υπάρχει, σημαίνει ότι περιέχει το παιδί. Παραδειγματικά, πάντα ο πυρήνας (nucleus) περιέχει (necessarily has-part) χρωμόσωμα (chromosome).. Τέλος, το “απαραιτήτως είναι μέρος-του και περιέχει” (“necessarily is-part and has-part”) επίπεδο αποτελεί ένα συνδυασμό των δύο παραπάνω επιπέδων. Για παράδειγμα, κάθε πυρήνας (nucleus) περιέχει πυρηνική μεμβράνη (nucleus membrane) και κάθε πυρηνική μεμβράνη (nucleus membrane) αποτελεί μέρος του πυρήνα (nucleus) αντιγραφής (Εικόνα 4).

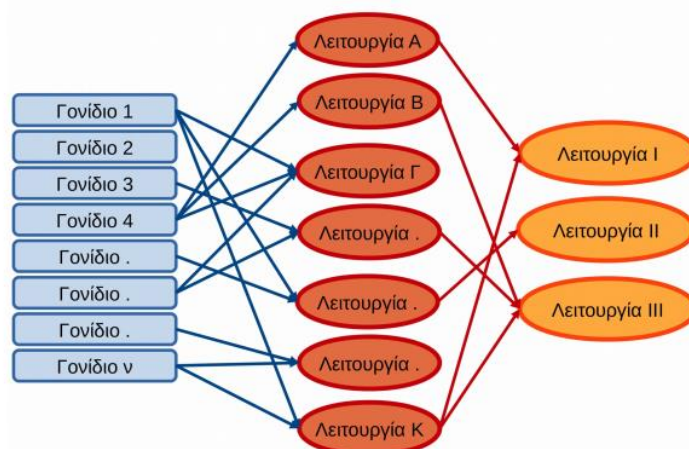


Εικόνα 5: Τα επίπεδα σχέσεων στις οντολογίες.

Συνεχίζοντας την καταγραφή γνωρισμάτων των δύο τύπων σχέσεων της Γονιδιακής Οντολογίας αξίζει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των “is-a” σχέσεων είναι κυρίαρχος αφού υπερτερεί κατά εφτά περίπου φορές αυτόν των “part-of” σχέσεων. Ενώ, η MF οντολογία αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από “is-a” ακμές. Τέλος, συνηθίζεται να αποφεύγεται όταν ένας όρος έχει “part-of” σχέσεις να συνδέεται ταυτόχρονα και με “is-a” ακμές ώστε να αποτραπεί η γενικότητα (abstractness), κάτι που δεν εμπίπτει στα πλάνα σχεδίασης της Γονιδιακής Οντολογίας.²²

Οι γονιδιακές οντολογίες προσομοιάζονται με ένα δίκτυο στο οποίο τα γονίδια αποδίδονται με λειτουργίες και οι λειτουργίες συνδέονται με έναν ιεραρχικό τρόπο αλλά όχι 1 προς 1. Οι λειτουργίες μπορεί να είναι πολλαπλές, επικαλυπτόμενες (πολλά γονίδια σε μια λειτουργία) ή ιεραρχικά οργανωμένες. Η οντολογία ορίζεται από τις επιμέρους σχέσεις μεταξύ των καταλογημένων ιδιοτήτων που είναι οι διάφορες γονιδιακές λειτουργίες και οι οποίες εκφράζονται ως

όροι (terms) της οντολογίας. Οι σχέσεις μεταξύ των όρων αυτών ορίζονται ιεραρχικά και οργανώνονται σε κατευθυνόμενους ακυκλικούς γράφους (directed acyclic graph).



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση κατηγοριοποίησης γονιδίων. Οι σχέσεις μεταξύ των αντικειμένων και των ιδιοτήτων τους δεν είναι αλληλο-αποκλειόμενες και ένα γονίδιο μπορεί να αντιστοιχηθεί σε περισσότερες από μία ιδιότητες. Στο σχήμα της Εικόνας το Γονίδιο 2 δεν αποδίδεται σε καμία λειτουργία, ενώ τα 1 και 4 αποδίδονται σε τρεις διαφορετικές λειτουργίες. Οι ίδιες οι λειτουργίες οργανώνονται ιεραρχικά από ειδικότερες (Α, Β, Γ κλπ) σε γενικότερες (Ι, ΙΙ, ΙΙΙ).

Η οργάνωση της πληροφορίας στα βιολογικά μονοπάτια είναι της μορφής του σχήματος, όπου ένα γονίδιο αντιστοιχίζεται σε ένα ή περισσότερα μονοπάτια, αυτό που διαφέρει ωστόσο είναι ότι μέσω της λεπτομερούς αναπαράστασης για κάθε μονοπάτι, υπάρχει άμεση πρόσβαση στην πληροφορία σχετικά με την εγγύτητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ γονιδίων. Αντιθέτως, με γονιδιακή οντολογία όπου υπάρχει συνεχής ανατροφοδότηση πληροφορίας για τη διατήρησή και την ενημέρωση της βάσης δεδομένων.

- Η **KEGG** (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) (Kanehisa & Goto, 2000) αποτελεί την παλαιότερη βάση δεδομένων βιολογικών μονοπατιών. Περιέχει ίσως το μεγαλύτερο όγκο πληροφορίας κι είναι, από άποψη κατηγοριών, η πληρέστερη βάση, ωστόσο μειονεκτεί σε ό,τι αφορά την αναπαράσταση των μονοπατιών. Από την άλλη πλευρά, λόγω ακριβώς της παλαιότητάς της είναι ενσωματωμένη στα περισσότερα διαδικτυακά εργαλεία λειτουργικής ανάλυσης (όπως θα δούμε παρακάτω) και γι' αυτό το λόγο είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη.

- **DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)** ο αλγόριθμος του αντλεί δεδομένα από περισσότερες από 40 κατηγορίες αναγνωρισμένων βιολογικών πληροφοριών, όπως όροι οντολογίας γονιδίων, αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών, λειτουργικές επικράτειες πρωτεϊνών βιο-μονοπάτια, χαρακτηριστικά αλληλουχίας και βιβλιογραφικές πηγές, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο πολύπλευρη εξαγωγή βιολογικών πληροφοριών για τα εξεταζόμενα γονίδια.

1.8 Σκοπός Εργασίας

Ο σκοπός της εργασίας είναι η διερεύνηση της πρωτεΐνης *Trh1* το οποίο ορίζεται ως μοριακός διαμεσολαβητής, και της μεταφοράς της αυξίνης σε διαφορετικές συνθήκες. Το *Trh1* μεσολαβεί στη μεταφορά K^+ στις ρίζες του *Arabidopsis* και είναι υπεύθυνο για τη συγκεκριμένη μετατόπιση του K^+ , το οποίο είναι απαραίτητο για την επιμήκυνση των τριχιδίων των ριζών. Επομένως έχει επίδραση στην αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος μέσω της μεταβολής της αυξίνης στο εσωτερικό υπόστρωμα της ρίζας. Για το σκοπό αυτό θα πραγματοποιηθεί σύγκριση σειρών *ON-OFF*, μεταξύ τους αλλά και *ON-ON, OFF-OFF* σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου (*wild type*). Αυτή η σύγκριση ερευνά το μήκος της πρωταρχικής ρίζας, τη μορφογένεση των φυτών δηλαδή, την έκπτυξη ριζικών τριχιδίων καθώς και τα αίτια κατά τα οποία κάποιες σειρές εμφανίζουν έντονο γεωτροπισμό η μη. Η καταχώριση των αποτελεσμάτων θα γίνει με βιομετρική ανάλυση των κύριων μορφολογικών χαρακτηριστικών. Επιπροσθέτως, εφαρμόστηκαν και διαφορετικά μέσα θρεπτικών με διαφορετική σύσταση pH και K^+ , ώστε να φανερωθούν οι διαφορές μεταξύ *ON* και *OFF*. Τέλος, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική μελέτη του *Trh1* vs *PIN1/PIN2* ώστε να διαφανούν τα κοινά γονίδια σε σχέση με το γεωτροπισμό και τα ριζικά τριχίδια,

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συνθήκες Περιβάλλοντος

Για την ανάπτυξη των φυτών ήταν απαραίτητο να δημιουργηθεί το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Οι περισσότεροι φυτικοί ιστοί αναπτύσσονται καλύτερα σε πλούσια θρεπτικά διαλύματα όπως είναι αυτό των Murashige και Skoog (MS).

Το θρεπτικό υπόστρωμα αποτελεί το μέσο πάνω ή μέσα στο οποίο πραγματοποιείται η καλλιέργεια και η περαιτέρω ανάπτυξη ή διαφοροποίηση των εκφύτων (ιστών ή κυττάρων). Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος πρέπει να είναι τέτοια ώστε:

(α) να επιτρέπει την τροφοδοσία των εκφύτων με απαραίτητους για την επιβίωσή τους χημικούς παράγοντες μετά τη διακοπή της παροχής αυτών από το μητρικό φυτό.

(β) να κατευθύνει την κυτταρική διαφοροποίηση ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό του εκάστοτε πειράματος. Το θρεπτικό μέσο μιας καλλιέργειας αποτελείται κυρίως από:

- ανόργανα άλατα, δηλαδή μακροστοιχεία και μικροστοιχεία ή ιχνοστοιχεία
- σύνθετα οργανικά συστατικά, κυρίως βιταμίνες
- ρυθμιστικές ουσίες ανάπτυξης, όπως οι φυτοορμόνες
- πηγές άνθρακα και ενέργειας, συνήθως υδατάνθρακες
- στερεοποιητικό παράγοντα, όπως το άγαρ, σε περίπτωση καλλιέργειας σε στερεό υπόστρωμα
- διάφορες πρόσθετες ουσίες γνωστής ή μη καθορισμένης σύστασης, όπως γάλα καρύδας (ως ρυθμιστή ανάπτυξης), ενεργό άνθρακα (για απομάκρυνση τοξικών μεταβολιτών) κ.λπ.
- Τέλος, η οξύτητα του μέσου ρυθμίζεται σε μια ορισμένη τιμή. Για συνήθειες εφαρμογές το pH του υποστρώματος πρέπει να είναι 5,6-5,8.

2.2 Φυτικό υλικό

Σαν υλικό για τα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Arabidopsis thaliana* (οικότυπος Columbia), το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Σταυρανθών – *Brassicaceae* και το φυτό *Nicotiana benthamiana* της οικογένειας Solanaceae.

Για την ανάπτυξη φυτών κάτω από ασηπτικές συνθήκες, τα σπέρματα ενυδατώνονται για 24 ώρες στους 4°C και αποστειρώνονται σε 25% διάλυμα χλωρίνης, 0.01% Triton-X. Στη συνέχεια μεταφέρονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία, παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου (βλέπε επιμέρους πρωτόκολλα). Τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι). Μετά από 2 εβδομάδες τα φυτά μεταφυτεύονται στο χώμα και τοποθετούνται στον ίδιο θάλαμο ανάπτυξης φυτών.

2.3 Πρωτόκολλα απομόνωσης

2.3.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από σπορόφυτα *Arabidopsis*

Φρέσκο φυτικό υλικό (ολόκληρα φυτά *Arabidopsis* ή διάφορα όργανά του) ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου με κατάλληλο γουδί λειοτρίβησης²³.

- ❖ Το δείγμα μεταφέρεται σε eppendorf tube των 2ml. (Για κάθε 2gr ιστού προστίθεται 1ml διαλύματος απομόνωσης και 1ml φαινόλης). Έντονη ανάμιξη του δείγματος.
- ❖ Φυγοκέντρηση (max speed) για 10min.
- ❖ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο tube και ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος με ίσο όγκο φαινόλης.
- ❖ Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες.
- ❖ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο tube και ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1). Έντονη μίξη.
- ❖ Επαναλαμβάνεται η ίδια φυγοκέντρηση.
- ❖ Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο tube χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1). Έντονη μίξη.
- ❖ Επαναλαμβάνεται η ίδια φυγοκέντρηση.

- ❖ Ξανά μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο tube χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (24:1). Έντονη μίξη.
- ❖ Επαναλαμβάνεται η ίδια φυγοκέντρηση.
- ❖ Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων, στο υπερκείμενο προστίθεται 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa pH 4.8 και 2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100% και στους -20°C overnight.
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C σε max speed.
- ❖ Το ίζημα διαλύεται σε αποστειρωμένο ddH₂O (με θέρμανση στους 65°C όταν χρειάζεται)

2.3.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού DNA από έμβρυα *Arabidopsis*

Έμβρυα από το κατάλληλο στάδιο του φυτού *Arabidopsis thaliana*, απομονώνονται με τη βοήθεια λαβίδας και στερεοσκοπίου²³

- ❖ Στα έμβρυα προστίθεται το διάλυμα απομόνωσης (όσο το δυνατό λιγότερο όγκος, μέχρι 150μl). Μέσα στο διάλυμα τα έμβρυα μπορούν να αποθηκευτούν και στους -80°C
- ❖ Με μικρο γουδί ομογενοποιούνται στα έμβρυα
- ❖ Σε 150μl διάλυμα ομογενοποίησης (έμβρυα και διάλυμα απομόνωσης) προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο και ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση για 30'.
- ❖ Φυγοκέντρηση για 5'
- ❖ Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erppendorf tube και προστίθενται 300μl φαινόλης, ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση για 1'. Στη συνέχεια προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο κα ισχυρή ανακίνηση για 3'.
- ❖ Φυγοκέντρηση για 5'
- ❖ Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erppendorf tube (~250μl) και προστίθεται 1/3 του όγκου 8M LiCl (83μl). Ακολουθεί ελαφριά ανακίνηση. Το δείγμα αφήνεται στους -20°C για 1h
- ❖ Φυγοκέντρηση για 30' στους 4°C

- ❖ Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 30μl ddH₂O
- ❖ Ακολουθεί αντίδραση DNAse (στα 60μl) όπως αναφέρεται παρακάτω
- ❖ Μετά την αντίδραση DNAse προστίθενται στο δείγμα 440μl ddH₂O, 7μl 3M NaAc pH:5.2 (Sodium Acetate) και 250μl 100% αιθανόλης
- ❖ Φυγοκέντρηση για 10' στους 4°C. (Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται τα συστατικά της αντίδρασης DNAse και όλοι οι πολυσακχαρίτες)
- ❖ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf tube και εκεί προστίθενται 43μl 3M NaAc pH:5.2 και 750μl 100% αιθανόλης. Ανακινείται ελαφρά και αφήνεται ο/η στους -20 °C
- ❖ Φυγοκέντρηση για 30' στους 4°C
- ❖ Απομακρύνεται προσεχτικά το υπερκείμενο, ακολουθεί μια γρήγορη φυγοκέντρηση για να απομακρυνθεί τυχόν υπερκείμενο που έχει μείνει και το ίζημα επαναιωρείται στα 20-25μl με ddH₂O

2.3.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από Arabidopsis

Φρέσκο φυτικό υλικό ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου σε κατάλληλο γουδί λειοτρίβισης ή μέσα σε erpendorf tube με μικρογουδί²⁴.

- ❖ Το ρυθμιστικού διάλυμα CTAB τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 65°C
- ❖ Προσθέτουμε έναν όγκο (200μl) ζεστού CTAB και τοποθετούμε τα erpendorf σε υδατόλουτρο στους 65°C για 10-30 λεπτά
- ❖ Προστίθεται ίσος όγκος SEVAG [χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1)] και το μίγμα αναδεύεται ελαφρά.
- ❖ Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13.000 στρ/λεπτό)
- ❖ Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό erpendorf tube.
- ❖ Προσθέτουμε 0,7 του όγκου (140μl) ισοπροπανόλης, αναδεύουμε με το χέρι και το αφήνουμε σε ηρεμία για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ❖ Φυγοκέντρηση του δείγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις μέγιστες στροφές

- ❖ Το ιζημα που προκύπτει ξεπλένεται προσθέτωντας 0,5 ml 100% αιθανόλης και στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές
- ❖ Απομακρύνση του υπερκειμένου.
- ❖ Επαναιώρηση του ιζήματος σε 100ml H₂O ή T.E.

2.4 Σύσταση θρεπτικού υλικού

- ❖ Η συνταγή του θρεπτικού υλικού είναι η εξής: για ποσότητα **Control 100mL** (5 τρυβλία)

½ MS – Control 100 mL		400 mL
Σουκρόζη (Sucrose)	1gr	0.88gr
(1/2 MS)	0.22gr	4gr/mL
(MES)	0.05gr	0.2gr/mL
KOH	1N (eq/Lt)	1N (eq/Lt)
pH	4.4-4.5 →5.7	4.4-4.5→5.7
Phytigel ή Agar	0.33gr ή 1.4gr	0.33gr ή 1.4gr

- ❖ Η συνταγή για χαμηλό Κάλιο (K⁺) και pH : για ποσότητα **Control 100ml**

1/5 MS - Control 100mL		200mL
Sucrose	1gr	2gr
MES	0.05gr	0.1gr
MS	0.0156gr	0.0312gr
K	10mL από 200mM	0mL από200mM
N	10mL από 206,1mM	20mL από 206,1mM
pH	5.7	5.7
phytagel	0.33gr	0.66gr

❖ Η συνταγή για χαμηλό Κάλιο (K⁺) και pH 4.5,5,5.7 : για ποσότητα **100ml**

Low K Low pH	200mL	200mL
Sucrose	2gr	2gr
MES	0.1gr	0.1gr
MS	0.0312gr 10mL	0.312gr 10mL
K	20 mL	0mL
N	20mL από 206,1mM	20mL
pH	4.5/5/5.7	4.5/5/5.7
phytagel	0.66gr	0.66gr

200mL KCl → 20mL m=2.98gr

200mL NH₄NO₃ → 20mL m=3.29gr

❖ **Θρεπτικό μέσο ½ MS :**

½ x MS Θρεπτικό μέσο που αποτελείται από MS άλατα και βιταμίνες (4,3g/l ICN), 2% Σακχαρόζη, 0,5 g/l MES, 3g/l Phytigel, pH 5,7.

❖ **Διάλυμα διείσδυσης (IM):**

Σε ένα λίτρο ddH₂O διαλύουμε 2.2g MS θρεπτικό διάλυμα αλάτων, 1x B5 βιταμίνες (από 1000x), 50g σακχαρόζη, 0,5g MES, 8g/l Difco Bacto άγαρ, pH 5,7. Μετά την αποστείρωση προσθέτουμε 0,01 mg/l BAP και 200μl Silwet L-77 (Osi Specialties).

Η σουκρόζη παρέχει τους απαραίτητους υδατάνθρακες για την ανάπτυξη του φυτού, το MS περιέχει τα αναγκαία στοιχεία και ιχνοστοιχεία. Επιπλέον, το MES χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του pH, ενώ το KOH για τη ρύθμιση του pH στο 4.5 ή 5.7. Τέλος το phytigel ή η αραρόζη χρησιμοποιείται για την πήξη του θρεπτικού υποστρώματος. Το κάλιο συμμετέχει στην ενεργοποίηση ενζύμων, στη σύνθεση πρωτεϊνών, στο άνοιγμα και το κλείσιμο των στομάτων, στην ωσμωρύθμιση, καθώς και στην αύξηση του μεγέθους των κυττάρων

2.4.1 Διαλύματα απομόνωσης γονιδιωματικού DN

❖ **CTAB DNA Ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης:**

2% (w/v) CTAB, 100mM Tris pH 8,0, 20mM EDTA pH 8,0, 1,4M NaCl, 1% (w/v) PVP (πολυβινυλ-πυρρολιδόνη, M.B 40.000), 2% (w/v) CTAB.

❖ **Sevag :**

(24:1) (Χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη)

2.5 Στερεοσκόπιο – Μικροσκόπιο

Τα οπτικό μικροσκόπιο είναι εξοπλισμένο με λάμπα UV και διαφορετικά φίλτρα. Ο φθορισμός της πρωτεΐνης –μάρτυρα YFP, εντοπίζεται με το φίλτρο 4107, Endow GFP Bandpass Emission Filter (Chroma Technology Corp, Brattleboro, USA) ενώ ο φθορισμός της χλωροφύλλης εντοπίζεται στο φίλτρο ροδαμίνης U-MSWG (Olympus, Tokyo, Japan). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε αρχικά στο μικροσκόπιο το οποίο κατέχει 4 φίλτρα, το 0 →ορατό, Wu →μπλε, SwB →πράσινο, SwG →κόκκινο. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για αυτή τη διαδικασία είναι το Cell A από το οποίο καταγράφεται σε φωτογραφικό υλικό ο φθορισμός της κάθε ρίζας.

Το στερεοσκόπιο βρίσκει εφαρμογές εκεί που χρειάζεται να παρατηρηθεί σε μεγέθυνση η εξωτερική μορφολογία ενός αντικείμενου, ιστού ή στην περίπτωση ο φαινότυπος των ριζικών τριχιδίων. Όταν χρησιμοποιείται προσπίπτων ή πλάγιος φωτισμός οργανισμού, ή και την εσωτερική μορφολογία διαφανών ή διαφοροποιημένων παρασκευασμάτων όταν αυτά φωτίζονται από κάτω. Τα στερεοσκόπια είτε έχουν αντικειμενικούς φακούς σταθερής εστιακής απόστασης (μεγέθυνσης) είτε μεταβαλλόμενης (zoom). Συνήθως τα όργανα αυτά μπορούν να μεγεθύνουν μέχρι περίπου 80X γιατί μεγαλύτερες μεγεθύνσεις έχουν πολύ μικρό βάθος εστίασης και επομένως οι εικόνες δε μπορούν πλέον να θεωρηθούν στερεοσκοπικές. Το παρασκεύασμα συνήθως δε χρειάζεται καμία προετοιμασία και μπορεί να παρατηρηθεί αρκεί να μπορεί να τοποθετηθεί στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου. Στα στερεοσκόπια ο φωτισμός του παρασκευάσματος μπορεί να γίνει και από πάνω και από κάτω. Τα πιο σύγχρονα στερεοσκόπια διαθέτουν και σύστημα φωτισμού με υπεριώδη ακτινοβολία για μετατροπή τους σε μικροσκόπια φθορισμού. Τα στερεοσκόπια έχουν πολλές εφαρμογές στη γεωπονία όπως είναι η μελέτη και προσδιορισμό εντόμων, μικρών καρπών, ασθενειών σε φυτά, πλαγκτονικών οργανισμών κλπ. Για καλύτερη παρατήρηση συνιστάται η χρήση ισχυρής φωτεινής πηγής με λαμπτήρα αλογόνου και οπτικές ίνες.

2.6 GFP (Green Fluorescent Protein)

Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στη βιολογία φυτών από κυτταρικό επίπεδο έως ολόκληρο επίπεδο των φυτών. Χρησιμοποιείται για τη μελέτη της γονιδιακής μεταγραφής. Συνδέεται το γονίδιο GFP με το γονίδιο της υπό μελέτη πρωτεΐνης, το ανασυνδυασμένο γονίδιο εισάγεται στο κύτταρο εκφράζοντας πρωτεΐνη που φθορίζει. Αποτελείται από 298 αμινοξέα (MW:26.9 kDa) και φθορίζει

πράσινη όταν διεγερθεί με υπεριώδη ακτινοβολία. ως *in vivo* ανταποκριτής για την αξιολόγηση της συχνότητας παροδικού και σταθερού μετασχηματισμού. Η πρωτεΐνη GFP έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την παρακολούθηση και του υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών. Σε μια μελέτη, ο καπνός μετασχηματίστηκε με μια τροποποιημένη έκδοση του γονιδίου GFP που ελέγχεται από ένα συστατικό (35S) προαγωγό. Η έκφραση GFP σε απογόνους φυτών κυμαινόταν από 0% έως 0,5%, και περίπου 0,1% GFP ήταν η ελάχιστη ποσότητα που απαιτείται για σαφή μακροσκοπική ανίχνευση. Το GFP είναι το πρώτο αληθινά *in vivo* σύστημα αναφοράς χρήσιμο σε ολόκληρα φυτά και προβλέπουμε ότι η χρησιμότητά του θα αυξηθεί ακόμη περισσότερο καθώς γίνονται διαθέσιμες καλύτερες μορφές γονιδίων GFP²⁵.

Εξετάστηκαν ριζικά τριχίδια και υποκοτύλια με το οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX-50 (Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με φθορισμό. Ο φθορισμός του YFP παρατηρήθηκε με το φίλτρο filter #41017, Endow GFP Bandpass Emission Filter (Chroma Technology Corp., Brattleboro, USA), ενώ ο φθορισμός της χρώσης με το φίλτρο ροδαμίνης U-MSWG (Olympus, Tokyo, Japan). Οι φωτογραφίες τραβήχθηκαν με την κάμερα Olympus DP71, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Cell^A (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany). Η ένωση των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Adobe Photoshop CS3 (version 9.01).

2.7 Πρόγραμμα- ImageJ

Το ImageJ είναι λογισμικό ανοιχτού κώδικα ανάλυσης εικόνας, γραμμένο σε Java και διατίθεται δωρεάν. Αρχικά βασισμένο στο NIH Image το οποίο είχε γραφτεί για Macintosh υπολογιστές, τρέχει ως εφαρμογή (applet) σε οποιοδήποτε λειτουργικό το οποίο διαθέτει μμηχανή Java 1.4. Το πρόγραμμα αυτό έχει την δυνατότητα οπτικοποίησης, επεξεργασίας, ανάλυσης, αποθήκευσης και αποτύπωσης εικόνων 8-bit, 16-bit και 32-bit διαφόρων τύπων. Υποστηρίζει την επεξεργασία και διαχείριση εικονοσειρών σε ένα μόνο παράθυρο αλλά και την παράλληλη πολλαπλή επεξεργασία αρχείων εικόνας. Είναι ένα πολύ δυνατό και χρήσιμο εργαλείο για την στατιστική ανάλυση εικόνας καθώς μπορεί εύκολα να κάνει αναλύσεις έντασης στα εικονοστοιχεία (pixel), να μετρήσει αποστάσεις, γωνίες και εμβαδά, ενώ έχει και δυνατότητα γραφικής αναπαράστασης δεδομένων (Wayne Rasband, 1997). Με τη

βοήθεια του προγράμματος ImageJ μήκος 1 cm αντιστοιχείται με τα pixels που αναλογούν σε κάθε φωτογραφία. Το ImageJ είναι γραμμένο με τέτοιο τρόπο ώστε να έχει επεκτασιμότητα στις δυνατότητές του μέσω προσθέτων (plugin) και αυτοματοποίηση μέσω μακροεντολών (macros). Να τονιστεί ότι έχει την υποστήριξη μια ενεργής, μεγάλης και ανοιχτής κοινότητας επιστημών για την ανάπτυξη νέων προσθέτων και μακροεντολών. Η παρατήρηση των φυτών πραγματοποιείται μέσω από μια σειρά μετρήσεων με σκοπό το χαρακτηρισμό του φαινοτύπου του μεταλλάγματος. Στη συνέχεια, χαράσσοντας την προβολή της ρίζας μετρείται το μήκος και παρομοίως ο γεωτροπισμός από τη διαίρεση των 2 μετρήσεων (Προβολή Ρίζας/Μήκος Ρίζας).

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση θρεπτικού υλικού στα ON – OFF

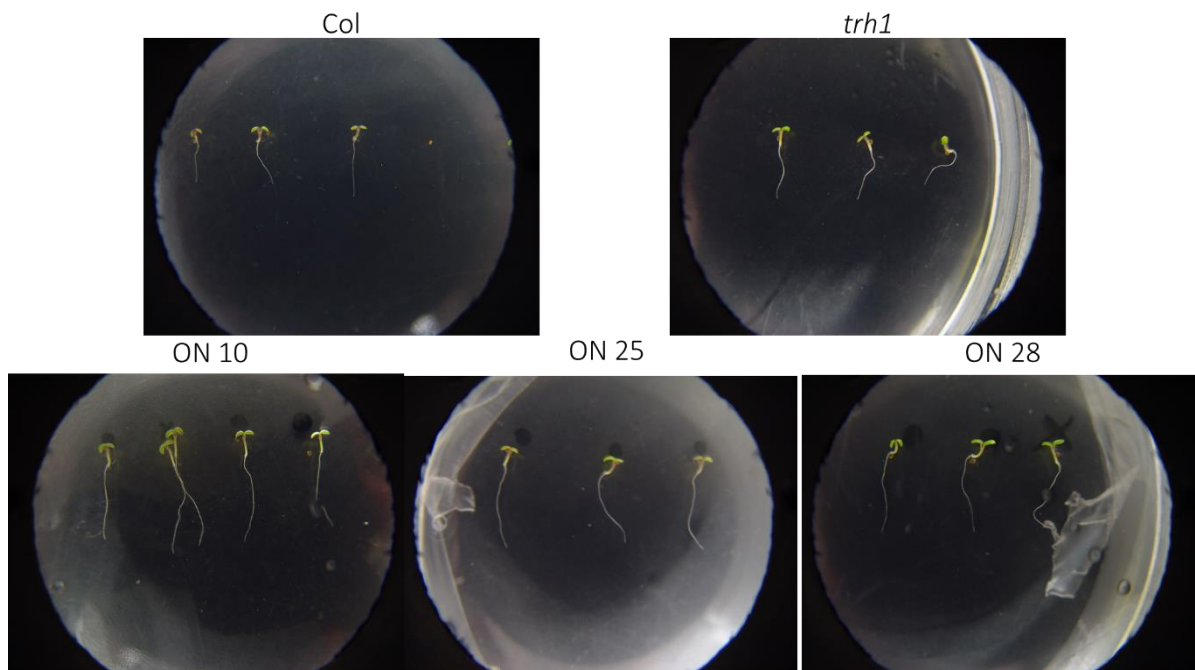
Για τη μελέτη επιδράσεων θρεπτικού υλικού MS που έχει ως αποτέλεσμα τη σύγκριση των 2 σειρών ON(6,10,13,25,28,38) και OFF(1,3,8,18) για παρατήρηση διαφοροποιήσεων σε γεωτροπισμό και ριζικά τριχίδια, χρησιμοποιήθηκε ως φυτό control το *Col-0* αλλά και το μετάλλαγμα *Trh1*. Στους γενότυπους ON και OFF έχει εισαχθεί με μόνιμο μετασχηματισμό η κατασκευή *35S::TRH1:ON:YFP:FLAG* and *35S::TRH1:OFF:YFP:FLAG* η οποία χρησιμοποιήθηκε για να αναγνωριστεί η οποιαδήποτε διαφορά σε ριζικά τριχίδια και γεωτροπισμό, κατά τη ροή της αυξίνης η οποία ρυθμίζεται από το γονίδιο *Trh1* που λειτουργεί στο ίδιο κυτταρικό διαμέρισμα μεταβάλλοντας τα επίπεδα της έκφρασης. Οι σπόροι των φυτών παρέμειναν στο νερό για 1 μέρα πριν στρωθούν στα τρυβλία, τα οποία προσομοιάζουν τις φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης με pH 5.7, ώστε να απορροφηθούν καλύτερα τα θρεπτικά στοιχεία (μεταλλικά ιόντα από το υπόστρωμα ²⁶). Μετά από 3-5 μέρες ελέγχεται ο φθορισμός στο μικροσκόπιο. Έπειτα, παρατηρείται ο φαινότυπος των φυτών στο στερεοσκόπιο την 7 ημέρα. Συνεχίζοντας, τα φυτά μεταφέρονται σε νέα τρυβλία και αφού αναπτυχθούν φυτεύονται στο χώμα για περαιτέρω μετρήσεις.

Οι πειραματικές διαδικασίες χωρίστηκαν 6 Τεστ, από τα οποία τα 4 πρώτα αντιπροσωπεύουν ½ MS pH 5.7, και οι 2 τελευταίες 1/5 MS pH 4.5-5-5.7 και χαμηλή συγκέντρωση καλίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι αρχικά χρησιμοποιήθηκαν

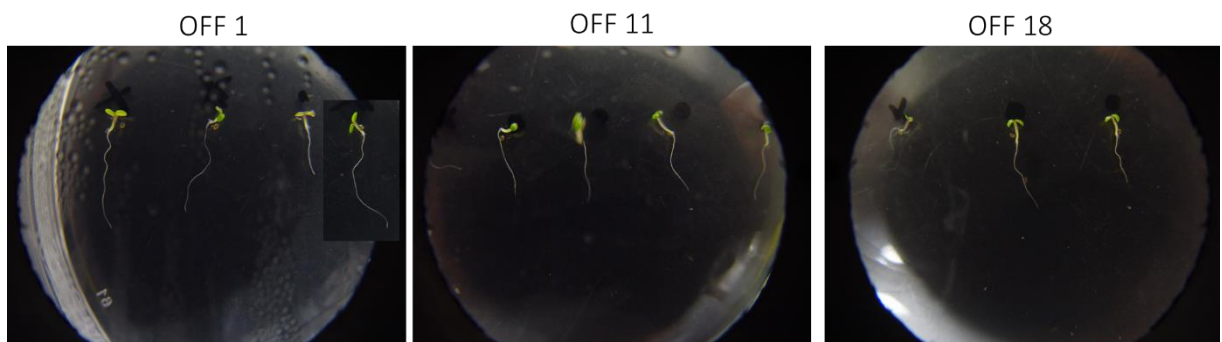
περισσότερες σειρές ON και OFF ώστε να εξακριβωθούν οι σειρές των οποίων τα ακρορίζια είχαν τη μεγαλύτερη ένταση φθορισμού, ON (10,28) και OFF (1,3,8).

Στο πρώτο Τεστ δοκιμάστηκαν οι σειρές A:ON(3,13,38), B:ON(10,25,28), Γ:OFF(1,11,18), col,Trh1, όπου στα περισσότερα φυτά εμφανίστηκαν ριζικά τριχίδια και μη γεωτροπικά. Στο συγκεκριμένο Τεστ στρώθηκαν 2 σειρές σπόρων σε καθένα από τα 20 τρυβλία.. Συνεχίζοντας, τραβήχτηκαν φωτογραφίες μετά από 5-7 μέρες. Στο μικροσκόπιο μετά από 5 μέρες παρατηρήθηκε φθορισμός, όπου σχεδόν το 70% των φυτών φθορίζει.

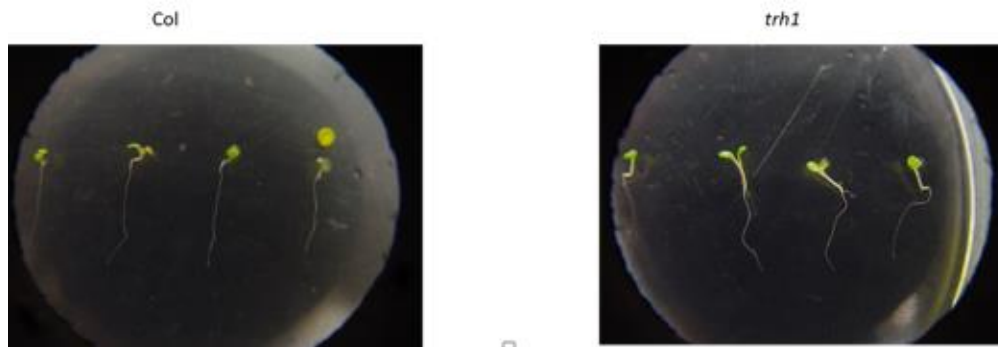
Στο τρίτο Τεστ μετρήθηκε επιπλέον, ο φθορισμός και καταγράφηκε σε πίνακα για τις σειρές ON(6,10,13,25,28,38) και OFF(1,11,18). Το Τεστ επαναλήφθηκε 3 φορές. Σε αυτή την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 3 τρυβλία σε κάθε σειρά από 6 σπόρους. Ο φθορισμός μετρήθηκε την 5^η μέρα και ο γεωτροπισμός την 7^η μέρα. Παρατηρείται ότι το ON 6 και στις 3 πειραματικές διαδικασίες δεν έχει έντονο φθορισμό ούτε έχει ριζικά τριχίδια και είναι μη γεωτροπικό επομένως τείνει στο Trh1. Σε αντίθεση με το ON 10 το οποίο έχει έντονο φθορισμό, ριζικά τριχίδια και είναι γεωτροπικό. Οι υπόλοιπες σειρές δεν έχουν ξεκάθαρα αποτελέσματα για ριζικά τριχίδια και γεωτροπισμό, όμως ο φθορισμός παρατηρήθηκε έντονος στις σειρές ON 10,25,28 και OFF 1,11.



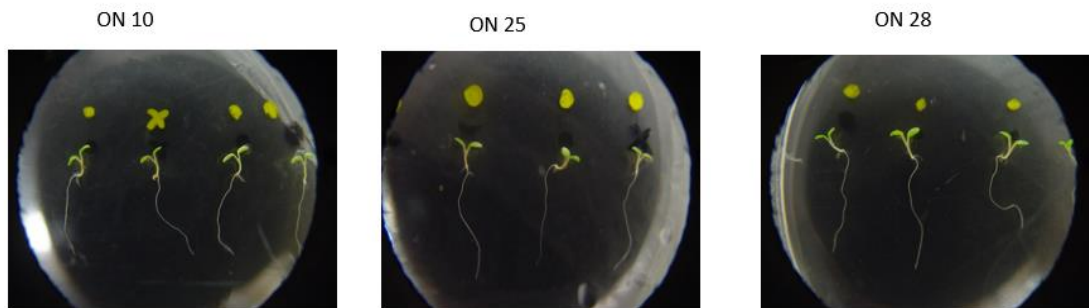
Εικόνα 7 :Παρουσίαση σειρών ON την 4η μέρα, εμφάνιση διαφορών και ομοιοτήτων σε σχέση με το Col/Trh1.



Εικόνα 8:Παρουσίαση σειρών OFF την 4η μέρα, εμφάνιση διαφορών και ομοιοτήτων σε σχέση με το Col/Trh1.



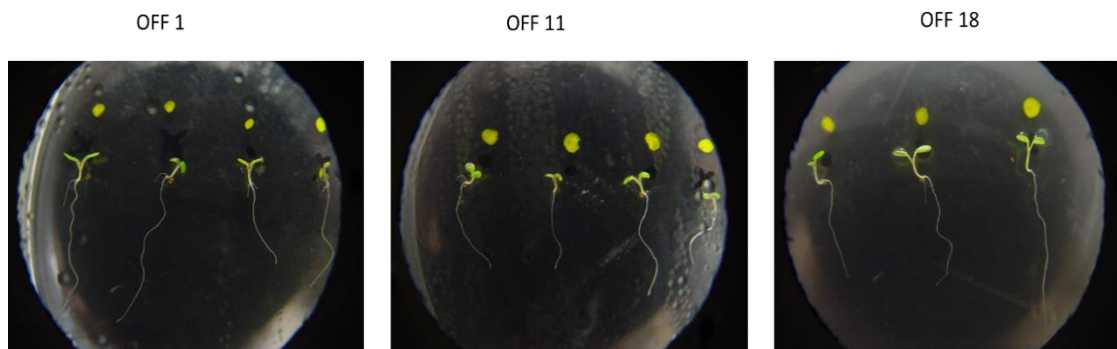
Εικόνα 9: Col/Trh1 5η μέρα ανάπτυξης.



Εικόνα 10: Παρουσιάζονται οι σειρές ON, με κίτρινη βούλα εμφανίζονται τα φυτά με ριζικά τριχίδια και με μαύρη βούλα ο φθορισμός.



Εικόνα 71: Παρουσιάζονται οι σειρές OFF, με κίτρινη βούλα εμφανίζονται τα φυτά με ριζικά τριχίδια και με μαύρη βούλα ο φθορισμός.



Εικόνα 12 :Παρουσιάζονται οι σειρές OFF, με κίτρινη βούλα εμφανίζονται τα φυτά με ριζικά τριχίδια και με μαύρη βούλα ο φθορισμός.

<i>Test</i>	<i>Ημερομηνία</i>	<i>Σειρά</i>	<i>Ριζικά Τριχίδια</i>	<i>Γεωτροπισμός</i>
1	6.12.2019 (A)	Col, Trh1, ON (6,13,38)	ON 6 ON 13	ON 6 ON 13
	11.12.2019 (B)	Col,Trh1, ON(10,25,28)	ON 10 (63 col-like) ON 25 (50 Col-like) ON 28 (53 Col-like)	ON 10 (17 Trh1- like) ON 25 (18 Trh1- like) ON 28 (29 Trh1- like)
	12.12.2019 (Γ)	Col,Trh1 OFF(1,11,18)	OFF 1 (58 Col-like) OFF 11 (41 Col-like) OFF 18 (74 Col-like)	OFF 1 (11 Trh1 - like) OFF 11 (26 Trh1- like) OFF 18 (11 Trh1- like)
2	16.01.2020	Col,Trh1 OFF(1,11,18) ON(6,10,13,28,38)	OFF 1 (22 Col-like) OFF 11 (32 Col-like) OFF 18 (30 Col-like) ON 6 (17 Col-like) ON 10 (43 Col-like) ON 13 (26 Col-like) ON 28 (11 Col-like) ON 38 (45 Col-like)	OFF 1 (20 Trh1- like) OFF 11 (31 Trh1- like) OFF 18 (8 Trh1-like) ON 6 (19 Trh1- like) ON 10 (17 Trh1- like) ON 13 (13 Trh1- like) ON 28 (5 Trh1-like) ON 38 (6 Trh1-like)
	17.01.2020	ON 25	ON 25 (45 Col-like)	ON 25 (5 Trh1-like)
	23.01.2020	OFF 1,11 ON 10	OFF 1 (23 Col-like) OFF 11 (7 Col-like) ON 10 (9 Col-like)	OFF 1 (3 Trh1- like) OFF 11 (11 Trh1- like) ON 10 (4 Trh1-like)

Πίνακας 1: Δεδομένα πειραματικών διαδικασιών, Test 1,2.

ON 6	GFP	10/31	Root Hair	7/10	Gravity	5
					No Gravity	2
			No Root Hair	3/10	Gravity	3
	NO GFP	21/31	Root Hair	5/21	Gravity	3
					No Gravity	2
			No Root Hair	16/21	Gravity	3
				No Gravity	11	
ON 10	GFP	23/35	Root Hair	21/23	Gravity	5
					No Gravity	16
			No Root Hair	2/23	Gravity	0
	NO GFP	12/35	Root Hair	2/12	Gravity	0
					No Gravity	2
			No Root Hair	10/12	Gravity	3
				No Gravity	7	
ON 13	GFP	20/33	Root Hair	19/20	Gravity	4
					No Gravity	15
			No Root Hair	1/20	Gravity	0
	NO GFP	13/33	Root Hair	0/13	Gravity	0
					No Gravity	0
			No Root Hair	13/13	Gravity	1
				No Gravity	12	
ON 25	GFP	20/32	Root Hair	19/20	Gravity	11
					No Gravity	8
			No Root Hair	1/20	Gravity	0
	NO GFP	12/32	Root Hair	5/12	Gravity	3
					No Gravity	1
			No Root Hair	7/12	Gravity	2
				No Gravity	4	
ON 28	GFP	11/19	Root Hair	7/11	Gravity	3
					No Gravity	3
			No Root Hair	4/11	Gravity	3
	NO GFP	8/19	Root Hair	0/8	Gravity	0
					No Gravity	0
			No Root Hair	8/8	Gravity	4
				No Gravity	4	
ON 38	GFP	27/31	Root Hair	20/27	Gravity	11
					No Gravity	9
			No Root Hair	7/27	Gravity	4
					No Gravity	3

			5d			7d		
		GFP	10/31	Root Hair		7/10	Gravity	5
ON 6	NO GFP	5/31		Root Hair	2/5	Gravity	No Gravity	2
				No Root Hair		No Gravity	Gravity	3
				No Root Hair	3/5	Gravity	No Gravity	0
				No Root Hair		No Gravity	Gravity	2
	NO GFP	21/31	Root Hair		5/21	Gravity	No Gravity	3
OFF 1	GFP	17/30		Root Hair	15/17	Gravity	No Gravity	2
				No Root Hair		No Gravity	Gravity	3
				No Root Hair	2/17	Gravity	No Gravity	11
	NO GFP	13/30		Root Hair	4/13	Gravity	No Gravity	16
				No Root Hair		No Gravity	Gravity	0
				No Root Hair	9/13	Gravity	No Gravity	2
	NO GFP	12/35	Root Hair		2/12	Gravity	No Gravity	0
OFF 11	GFP	16/36		Root Hair	14/16	Gravity	9	
				No Root Hair		No Gravity	5	
				Root Hair	2/16	Gravity	0	
				No Root Hair		No Gravity	2	
				Root Hair	8/20	Gravity	3	
				No Root Hair		No Gravity	5	
	NO GFP	20/36		Root Hair	12/20	Gravity	8	
				No Root Hair		No Gravity	4	
				Root Hair	2/9	Gravity	1	
				No Root Hair		No Gravity	1	
				Root Hair	7/9	Gravity	4	
				No Root Hair		No Gravity	2	

Πίνακας 2
:Πίνακας
ας
2:Test
3, OFF
1,11,1
8,
21/01

/2020.

					No Gravity	2
			No Root Hair	10/12	Gravity	3
					No Gravity	7
ON 13	GFP	20/33	Root Hair	19/20	Gravity	4
					No Gravity	15
			No Root Hair	1/20	Gravity	0
			No Gravity	1		
	NO GFP	13/33	Root Hair	0/13	Gravity	0
					No Gravity	0
No Root Hair			13/13	Gravity	1	
					No Gravity	12
ON 25	GFP	20/32	Root Hair	19/20	Gravity	11
					No Gravity	8
			No Root Hair	1/20	Gravity	0
					No Gravity	1
	NO GFP	12/32	Root Hair	5/12	Gravity	3
					No Gravity	1
			No Root Hair	7/12	Gravity	2
					No Gravity	4
ON 28	GFP	11/19	Root Hair	7/11	Gravity	3
					No Gravity	3
			No Root Hair	4/11	Gravity	3
					No Gravity	1
	NO GFP	8/19	Root Hair	0/8	Gravity	0
					No Gravity	0
			No Root Hair	8/8	Gravity	4
					No Gravity	4
ON 38	GFP	27/31	Root Hair	20/27	Gravity	11
					No Gravity	9
			No Root Hair	7/27	Gravity	4
					No Gravity	3
	NO GFP	5/31	Root Hair	2/5	Gravity	2
					No Gravity	0
			No Root Hair	3/5	Gravity	2
					No Gravity	1
OFF 1	GFP	17/30	Root Hair	15/17	Gravity	6
					No Gravity	9
			No Root Hair	2/17	Gravity	0
					No Gravity	2
	NO GFP	13/30	Root Hair	4/13	Gravity	1
					No Gravity	3
			No Root Hair	9/13	Gravity	7
					No Gravity	2
OFF 11	GFP	16/36	Root Hair	14/16	Gravity	9
					No Gravity	5

			No Root Hair	2/16	Gravity	0		
			No Gravity	2				
			NO GFP	20/36	Root Hair	8/20	Gravity	3
			No Gravity	5				
			No Root Hair	12/20	Gravity	8		
			No Gravity	4				
OFF 18	GFP	18/27	Root Hair	14/18	Gravity	7		
			No Gravity	7				
			No Root Hair	4/18	Gravity	0		
			No Gravity	4				
	NO GFP	9/27	Root Hair	2/9	Gravity	1		
			No Gravity	1				
			No Root Hair	7/9	Gravity	4		
					No Gravity	2		

Πίνακας 3: Test 3 ON 6,10,13,25,38 & OFF 1,11,18 21/01/2020.

		3day		5day		6day
OFF 1	GFP	2/12	Root Hair	2	Gravity	0
			No Gravity	2		
			No Root Hair	0	Gravity	0
			No Gravity	0		
	NO GFP	10/12	Root Hair	8/10	Gravity	2
			No Gravity	6		
			No Root Hair	2/10	Gravity	2
					No Gravity	0
OFF 11	GFP	13/19	Root Hair	13/13	Gravity	5
			No Gravity	8		
	NO	5/19	No Root Hair	0	Gravity	0
			No Gravity	0		
			Root Hair	5/5	Gravity	1

	GFP				No Gravity	4
			No Root Hair	0/5	Gravity	0
					No Gravity	0
OFF 18	GFP	16/17	Root Hair	15/16	Gravity	9
					No Gravity	6
			No Root Hair	1/16	Gravity	1
					No Gravity	0
	NO GFP	1/17	Root Hair	0	Gravity	0
					No Gravity	0
No Root Hair			1	Gravity	1	
				No Gravity	0	
pTrh1	GFP	16/16	Root Hair	3	Gravity	3
					No Gravity	0
			No Root Hair	13	Gravity	5
					No Gravity	8
	NO GFP	0/16	Root Hair	0	Gravity	0
					No Gravity	0
			No Root Hair	0	Gravity	0
					No Gravity	0

Πίνακας 4: Test 3 OFF1,11,15,pTrh1 31/01/2020 A.

		3day		5day		6day
ON 6	GFP	6/15	Root Hair	4	Gravity	1
			No Root Hair	2	No Gravity	3
					Gravity	1
	NO GFP	9/15	Root Hair	0	No Gravity	1
			No Root Hair	9	Gravity	0
					No Gravity	0
ON 10	GFP	15/20	Root Hair	15	Gravity	9
			No Root Hair	0	No Gravity	6
					Gravity	0
	NO GFP	5/20	Root Hair	0	No Gravity	0
			No Root Hair	5	Gravity	0
					No Gravity	0
ON 13	GFP	9/17	Root Hair	9/9	Gravity	4
			No Root Hair	0	No Gravity	5
					Gravity	0
	NO GFP	8/17	Root Hair	1	No Gravity	0
			No Root Hair	7	Gravity	1
					No Gravity	0
ON 25	GFP	13/18	Root Hair	13/13	Gravity	3
			No Root Hair	0	No Gravity	11
					Gravity	0
	NO GFP	5/18	Root Hair	5/5	No Gravity	0
			No Root Hair	0/5	Gravity	1
					No Gravity	4
ON 28	GFP	8/14	Root Hair	8/8	Gravity	5
			No Root Hair	0/8	No Gravity	3
					Gravity	0
	NO GFP	6/14	Root Hair	2/6	No Gravity	0
			No Root Hair	4/6	Gravity	2
					No Gravity	2
ON	GFP	5/11	Root Hair	5/5	Gravity	2
			No Root Hair	0/5	No Gravity	3
					Gravity	0

38					No Gravity	0
	NO GFP	6/11	Root Hair	1	Gravity	1
					No Gravity	0
			No Root Hair	5	Gravity	2
					No Gravity	3

Πίνακας 5: Test 3 ON6,10,13,25,28 31/01/2021 B.

		3day		5day		7d
ON 6	GFP	5/15	Root Hair	5	Gravity	3
			No Root Hair	0	No Gravity	2
			No Root Hair	0	Gravity	0
	NO GFP	9/15	Root Hair	0	No Gravity	0
			No Root Hair	9	Gravity	1
			No Root Hair	9	No Gravity	8
ON 10	GFP	15/19	Root Hair	15	Gravity	9
			No Root Hair	0	No Gravity	1
			No Root Hair	0	Gravity	0
	NO GFP	4/19	Root Hair	0	No Gravity	0
			No Root Hair	4	Gravity	0
			No Root Hair	4	No Gravity	4
ON 13	GFP	9/17	Root Hair	9/9	Gravity	9
			No Root Hair	0	No Gravity	0
			No Root Hair	0	Gravity	0
	NO GFP	8/17	Root Hair	1	No Gravity	0
			No Root Hair	7	Gravity	1
			No Root Hair	7	No Gravity	2
ON 25	GFP	13/18	Root Hair	13/13	Gravity	12
			No Root Hair	0	No Gravity	1
			No Root Hair	0	Gravity	0
	NO GFP	5/18	Root Hair	5/5	No Gravity	0
			No Root Hair	0/5	Gravity	3
			No Root Hair	0/5	No Gravity	2
ON 28	GFP	8/14	Root Hair	8/8	Gravity	0
			No Root Hair	0/8	No Gravity	7
			No Root Hair	0/8	Gravity	1
	NO GFP	6/14	Root Hair	2/6	No Gravity	0
			No Root Hair	4/6	Gravity	0
			No Root Hair	4/6	No Gravity	2
	GFP	5/11	Root Hair	5/5	Gravity	1

ON 38			No Root Hair	0/5	No Gravity	4
					Gravity	0
					No Gravity	0
	NO GFP	6/11	Root Hair	1	Gravity	0
					No Gravity	1
			No Root Hair	5	Gravity	1
				No Gravity	4	
OFF 1	GFP	7/12	Root Hair	7/7	Gravity	1
					No Gravity	6
			No Root Hair	0/7	Gravity	0
					No Gravity	0
	NO GFP	5/12	Root Hair	3/5	Gravity	0
					No Gravity	3
No Root Hair			2/5	Gravity	0	
				No Gravity	2	
OFF 11	GFP	13/18	Root Hair	13/13	Gravity	0
					No Gravity	6
			No Root Hair	0	Gravity	0
					No Gravity	0
	NO GFP	5/18	Root Hair	5/5	Gravity	1
					No Gravity	4
No Root Hair			0/5	Gravity	0	
				No Gravity	0	
OFF 18	GFP	16/17	Root Hair	15/16	Gravity	3
					No Gravity	12
			No Root Hair	1/16	Gravity	0
					No Gravity	1
	NO GFP	1/17	Root Hair	0	Gravity	0
					No Gravity	0
No Root Hair			1	Gravity	1	
				No Gravity	0	

Πίνακας 6: Test 3, ON 6,10,13,25,28 & OFF1,11,18 04/02/2021.

Στο τέταρτο τεστ εφαρμόστηκαν οι ίδιες τεχνικές στις σειρές, **ON(10,28)** και **OFF(1,3,8,18)**, την 4,5,6 και 7 ημέρα. Οι συμβολισμοί (+,-) φανερώνουν το φορτισμό σε ένα πληθυσμό φυτών.

Με τη βοήθεια του XLSTAT δημιουργήθηκαν τα **Boxplots** και τα **Scatterplots** για το μήκος και το γεωτροπισμό (VGI Vertical Growth Index, Ly/L, προβολή/μήκος, 0°) των ριζών.

Οι τιμές ορίζονται <1 όταν είναι μη γεωτροπικές ενώ ίσες με 1 σχεδόν κάθετες γεωτροπικές.

Τα διαγράμματα που παρουσιάζονται παρακάτω δείχνουν τις διαφορές ή τις ομοιότητες των σειρών μεταξύ τους πρώτα στο μήκος και έπειτα στο γεωτροπισμό.

Φαίνεται ότι το **OFF 1,3** και **ON 10,28** έχουν το μεγαλύτερο μήκος ρίζας, ενώ τα περισσότερο γεωτροπικά εμφανίζονται τα **OFF 3** και **ON 10** με μικρές διαφορές. Διαφαίνεται ότι τα περισσότερο στα **GFr(-)** είναι μη γεωτροπικά δηλ. **Trh1-like** ενώ τα **GFr(+)** εμφανίζονται γεωτροπικά με ριζικά τριχίδια δηλ. **Col-like**.

Length	OFF 1		OFF 3		OFF 8		OFF 18		ON 10		ON 28	
	OFF 1+	OFF 1-	OFF 3+	OFF 3-	OFF 8+	OFF 8-	OFF 18+	OFF 18-	ON 10+	ON 10-	ON 28+	ON 28-
4days	0.806214	0.927	0.583323	0.489938	0.414567	0.272625	0.575163	0.636429	0.795	0.783917	0.646368	0.746375
5days	1.278043	1.114667	0.838781	0.758864	0.620037	0.412412	0.983459	0.976429	1.26134	1.277143	1.063438	1.168
6days	1.877583	2.002667	1.182185	1.18935	0.86348	0.5755	1.407973	1.397571	1.804293	1.754429	1.728333	1.7497
7days	2.3188	2.658	1.58927	1.441467	1.18524	0.761615	1.923111	2.058667	2.223529	2.194778	2.366892	2.227833
VGI	OFF 1+	OFF 1-	OFF 3+	OFF 3-	OFF 8+	OFF 8-	OFF 18+	OFF 18-	ON 10+	ON 10-	ON 28+	ON 28-
4days	0.887382	0.780296	0.909279	0.910298	0.865799	0.862383	0.91455	0.923657	0.907991	0.921827	0.911191	0.863929
5days	0.902623	0.901686	0.911905	0.904805	0.872919	0.831461	0.92571	0.871516	0.921278	0.905447	0.919017	0.888473
6days	0.902685	0.849333	0.91282	0.891949	0.884115	0.846223	0.90434	0.920082	0.907282	0.820461	0.91131	0.870898
7days	0.921004	0.865252	0.929279	0.836412	0.894551	0.84439	0.928931	0.862629	0.889923	0.834478	0.912007	0.896101

Πίνακας 7: Μετρήσεις Μέσου όρου του πληθυσμού των φυτών, στις 5,6,7 μέρες με το πρόγραμμα ImageJ.

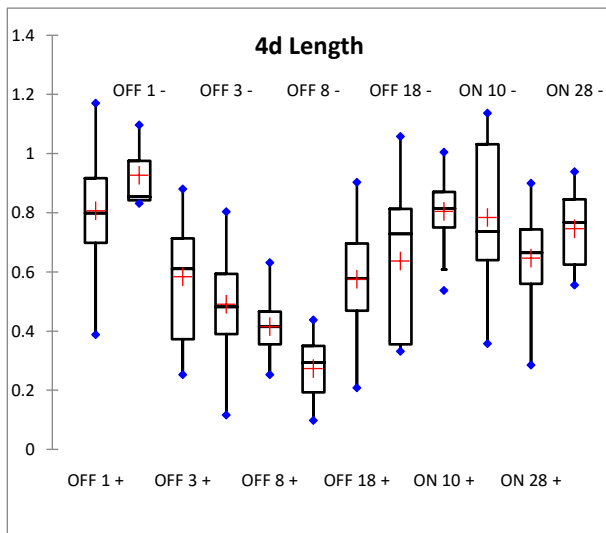


Figure 3 : Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 4^η μέρα.

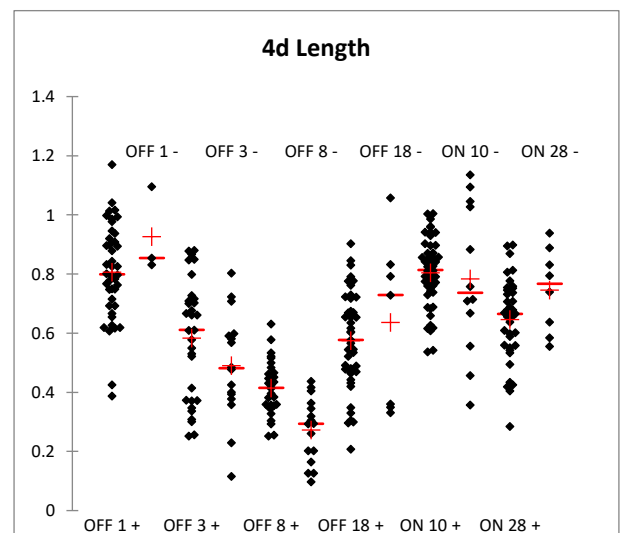


Figure 2 : Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 4^η μέρα.

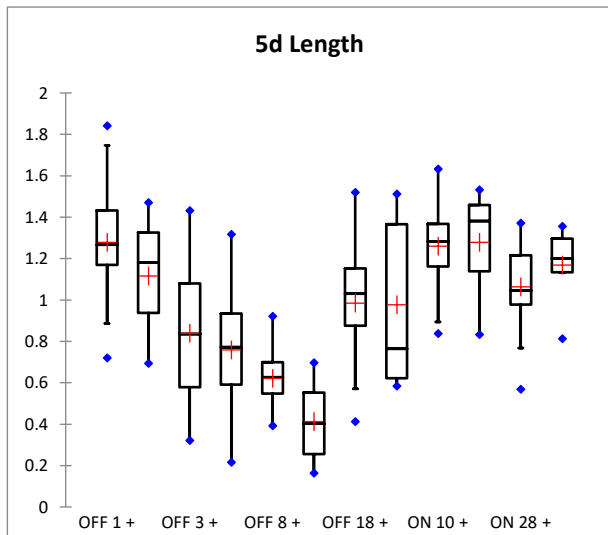


Figure 4: Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 5^η μέρα.

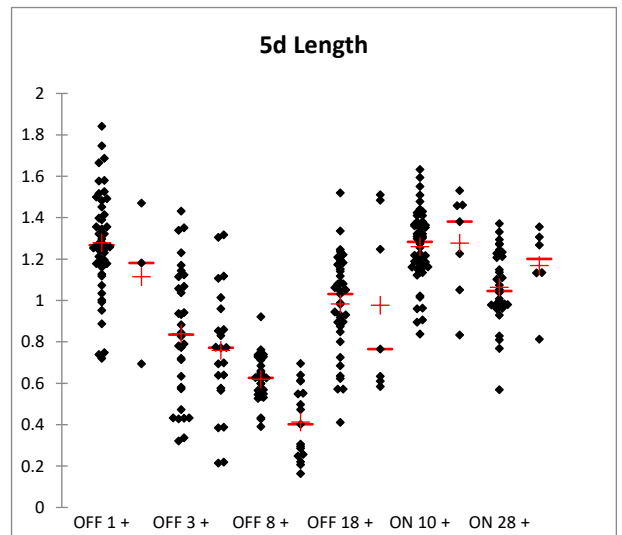


Figure 5: Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 5^η μέρα.

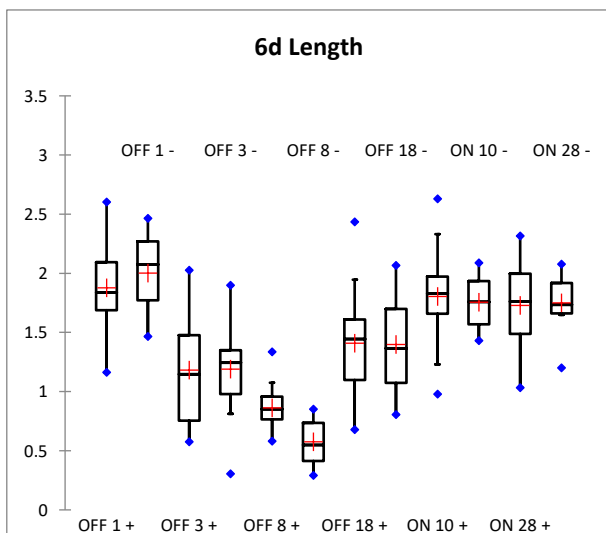
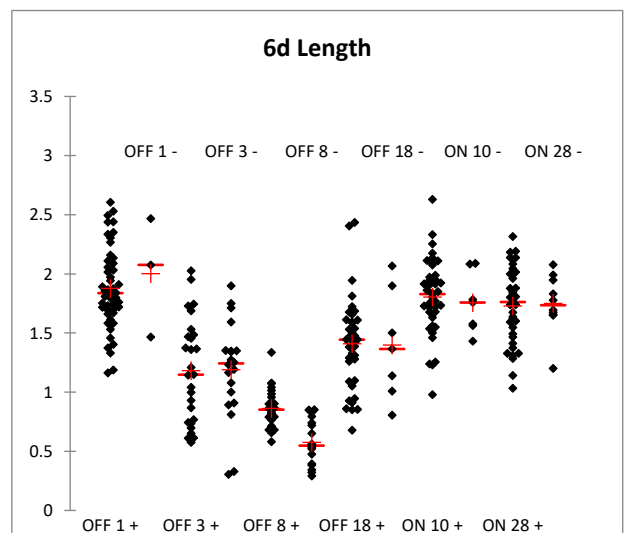


Figure 7: Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 6^η μέρα.



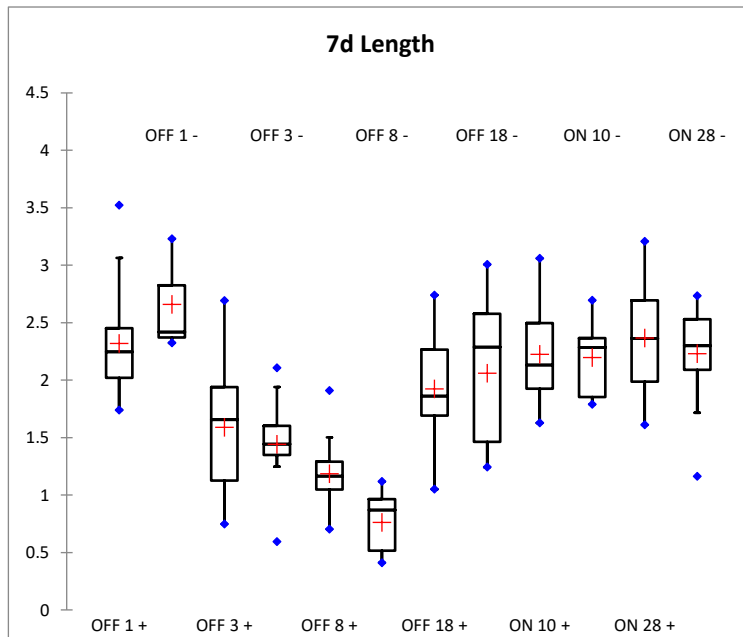


Figure 8: Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 7^η μέρα.

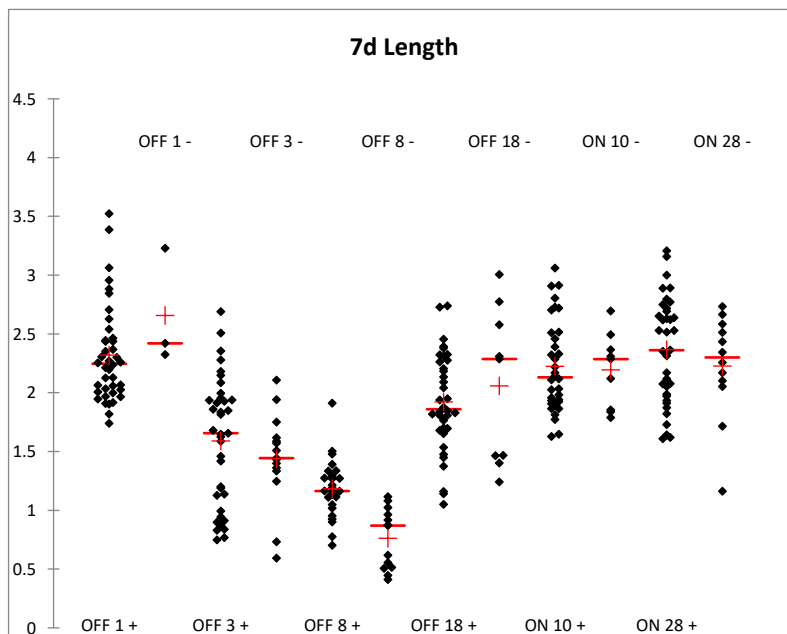


Figure 9: Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 7^η μέρα.

Στο πείραμα αυτό στο οποίο επιλέχθηκαν οι σειρές με τον εντονότερο φθορισμό και οι πιο σταθερές. Παρατηρείται από τα διαγράμματα ότι το ON 10+ και το OFF1+ εμφανίζουν το μεγαλύτερο μήκος ρίζας, ακολουθεί τον ON28+. Τα ακρορίζια με χαμηλό φθορισμό εμφανίζονται σε όλες τις σειρές με μικρότερο μήκος. Σχετικά με το γεωτροπισμό, την 7^η μέρα φαίνεται ότι οι σειρές που τείνουν στο γεωτροπισμό (>0.90) είναι ON (28)+, OFF (1,3,18)+, ενώ το ON (10) + εμφανίζεται λιγότερο γεωτροπικό(0.88) όπως και οι σειρές αρνητικού φθορισμού σε σχέση με τις σειρές έντονου φθορισμού.

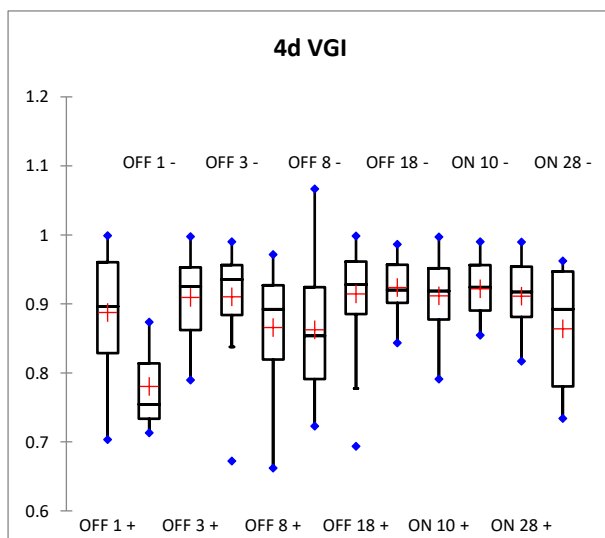


Figure 11: Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 4^η μέρα.

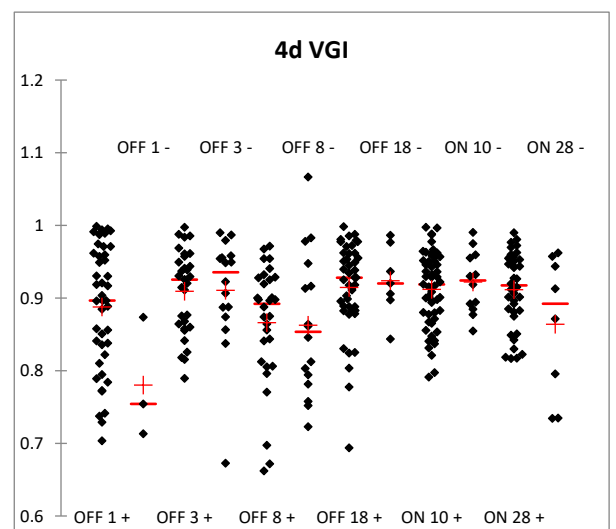


Figure 10: Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 4^η μέρα.

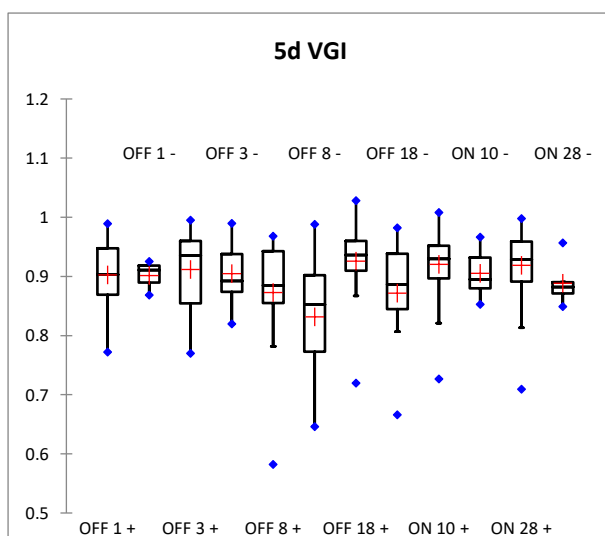


Figure 13: Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 5^η μέρα.

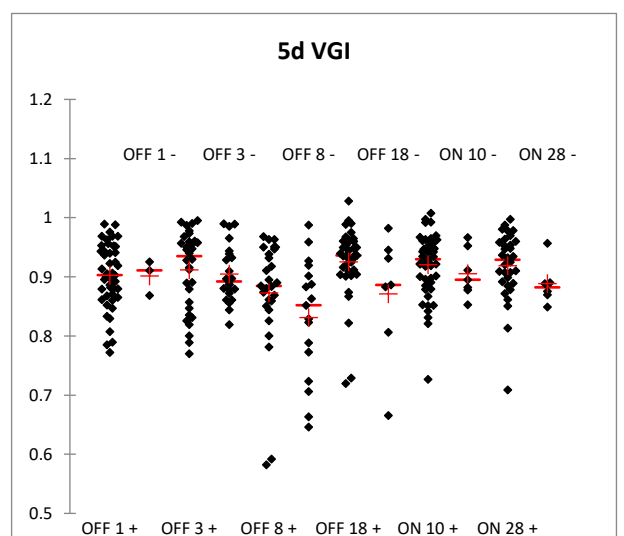


Figure 12: Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 5^η μέρα.

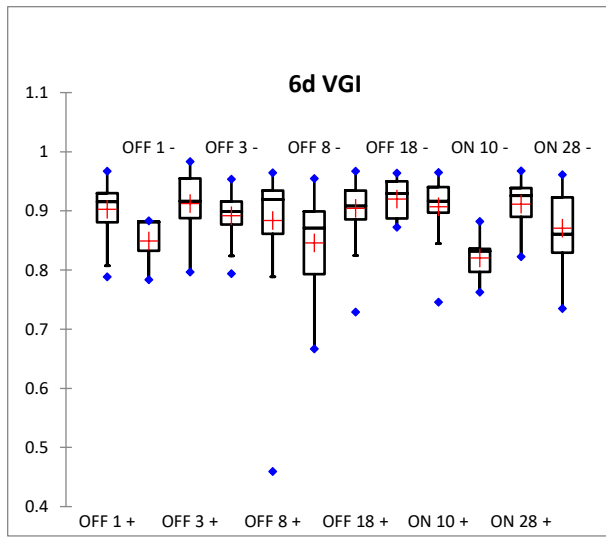


Figure 15: Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 6^η μέρα.

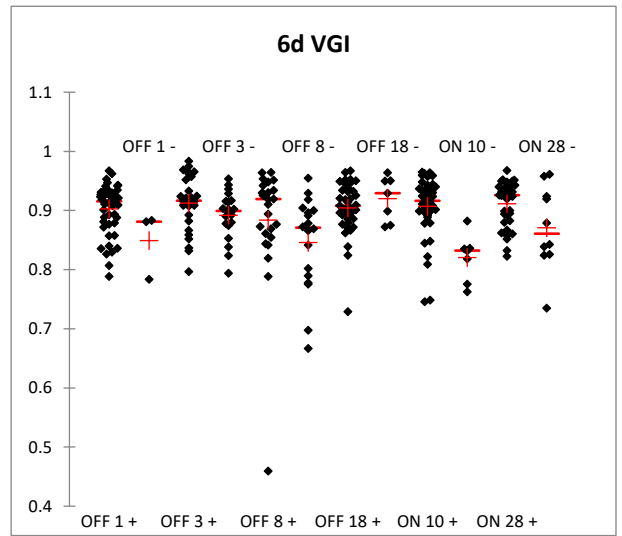


Figure 14: Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 6^η μέρα.

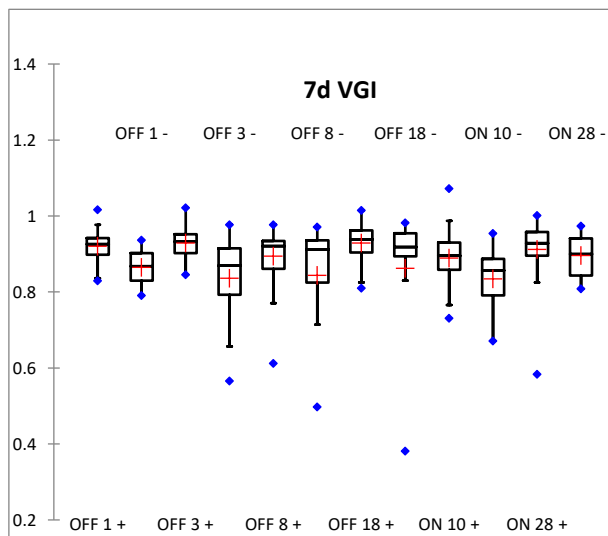


Figure 17: Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 7^η μέρα.

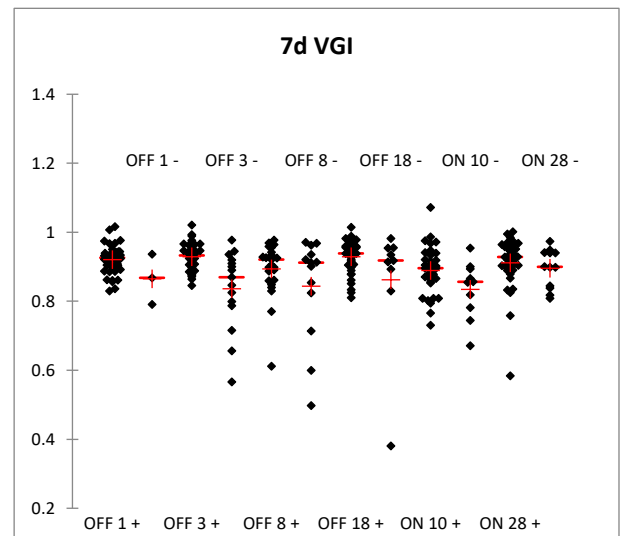


Figure 16: Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 7^η μέρα.

3.2 Επίδραση χαμηλού pH στο ριζικό σύστημα

Στο πέμπτο Τεστ, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό θρεπτικό υλικό (1/5 MS) σε στρεσογόνες συνθήκες χαμηλού pH και K για να φανερωθεί η διαφορά ON/OFF επειδή στις προηγούμενες διαδικασίες δε φάνηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των σειρών. Το control θα είναι το θρεπτικό με ½ MS. Παρατηρείται ότι αναπτύχθηκαν περισσότερο σε μήκος οι σειρές OFF 1 +, OFF 1- και ON10+, ON 28+. Ενώ μη γεωτροπικά εμφανίζονται το OFF 3-, OFF8-, ON10- με μικρή διαφορά. Γενικότερα ακόμα και στο στρεσογόνο περιβάλλον τα ριζικά συστήματα που δεν φθορίζουν διακρίνονται ως μη γεωτροπικά σε σχέση με εκείνα που φθορίζουν (πίνακας 2).

	OFF 1		OFF 3		OFF 8		OFF 18		ON 10		ON 28	
Length	OFF 1+	OFF 1-	OFF 3+	OFF 3-	OFF 8+	OFF 8-	OFF 18+	OFF 18-	ON 10+	ON 10-	ON 28+	ON 28-
4days	0.806214	0.927	0.583323	0.489938	0.414567	0.272625	0.575163	0.636429	0.795	0.783917	0.646368	0.746375
5days	1.278043	1.114667	0.838781	0.758864	0.620037	0.412412	0.983459	0.976429	1.26134	1.277143	1.063438	1.168
6days	1.877583	2.002667	1.182185	1.18935	0.86348	0.5755	1.407973	1.397571	1.804293	1.754429	1.728333	1.7497
7days	2.3188	2.658	1.58927	1.441467	1.18524	0.761615	1.923111	2.058667	2.223529	2.194778	2.366892	2.227833
VGI	OFF 1+	OFF 1-	OFF 3+	OFF 3-	OFF 8+	OFF 8-	OFF 18+	OFF 18-	ON 10+	ON 10-	ON 28+	ON 28-
4days	0.887382	0.780296	0.909279	0.910298	0.865799	0.862383	0.91455	0.923657	0.907991	0.921827	0.911191	0.863929
5days	0.902623	0.901686	0.911905	0.904805	0.872919	0.831461	0.92571	0.871516	0.921278	0.905447	0.919017	0.888473
6days	0.902685	0.84933	0.91282	0.891949	0.884115	0.846223	0.90434	0.920082	0.907282	0.820461	0.91131	0.870898
7days	0.921004	0.865252	0.929279	0.836412	0.894551	0.84439	0.928931	0.862629	0.889923	0.834478	0.912007	0.896101

Πίνακας 8: Μετρήσεις Μέσου όρου του πληθυσμού των φυτών, στις 5,6,7 μέρες με το πρόγραμμα ImageJ, Πέμπτη πειραματική διαδικασία χαμηλού pH.

Συμπερασματικά, την 7^η μέρα από τα διαγράμματα διασποράς φαίνεται ότι τα κοντύτερα σε μήκος εμφανίζονται τα OFF 8-, OFF8+ και OFF3-. Ενώ στα διαγράμματα διασποράς που δείχνουν το γεωτροπισμό δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των σειρών την 7^η μέρα. Το ON10- φαίνεται να μην είναι

γεωτροπικό αλλά και το OFF3-, όμως στο τελευταίο φαίνεται ανακριβές καθώς δεν υπήρχε επαρκής πληθυσμός φυτών.

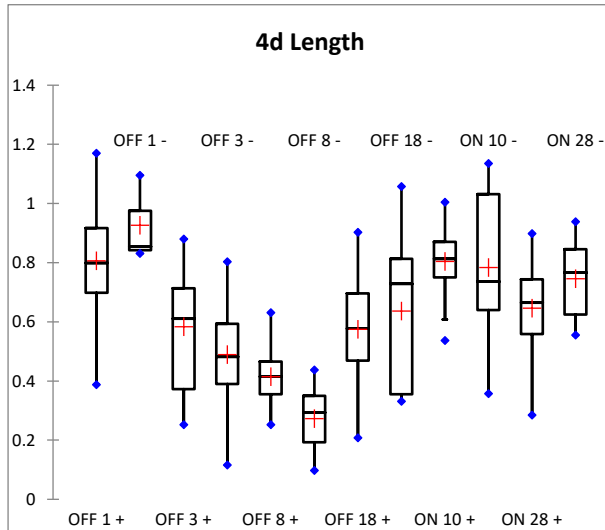


Figure 20: Τεστ 5, Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 4^η μέρα.

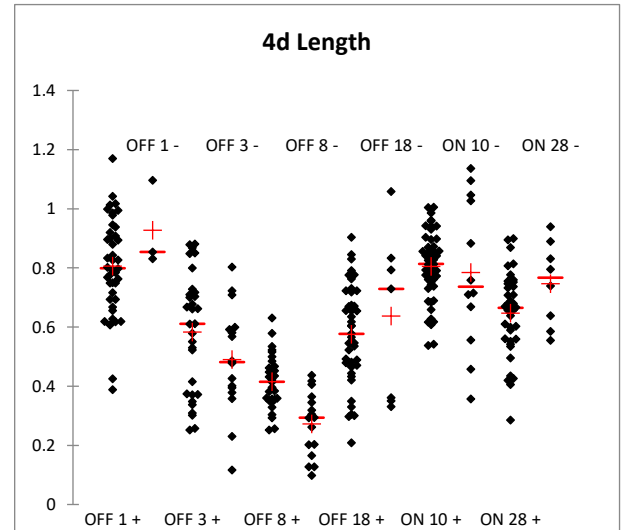


Figure 19: Τεστ 5, Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 4^η μέρα.

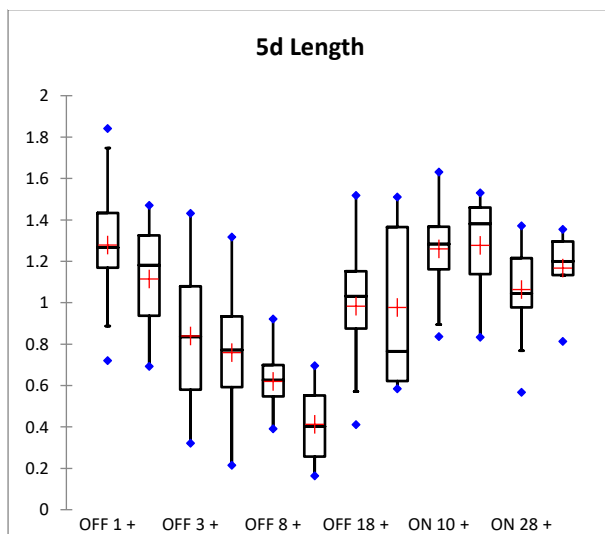


Figure 21: Τεστ 5, Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 5^η μέρα.

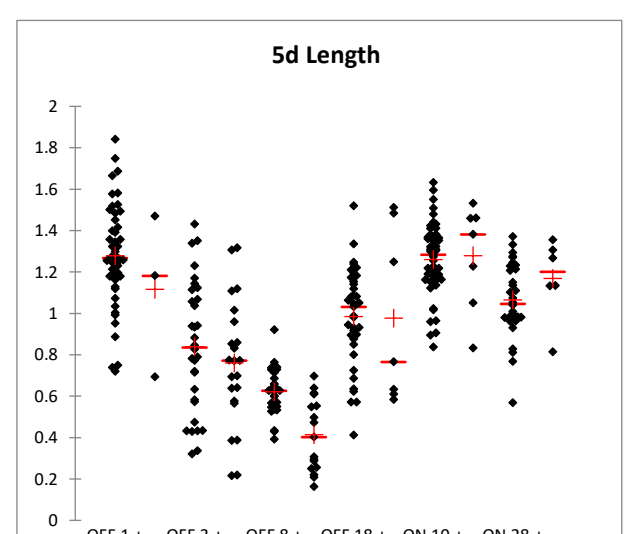


Figure 18: Τεστ 5, Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 5^η μέρα.

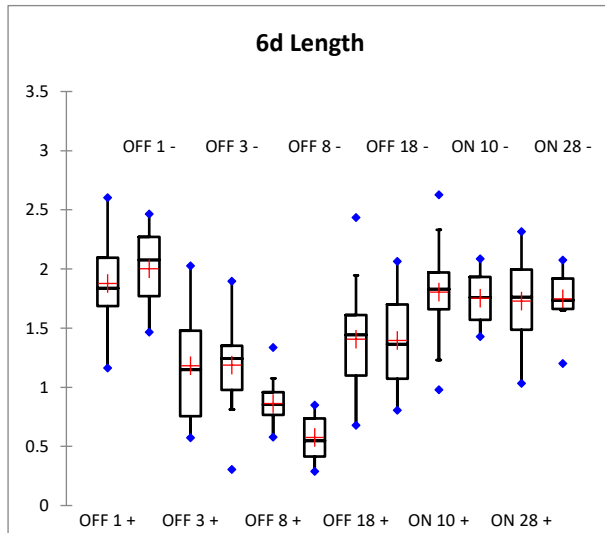


Figure 23: Τεστ 5, Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 6^ο μέρα.

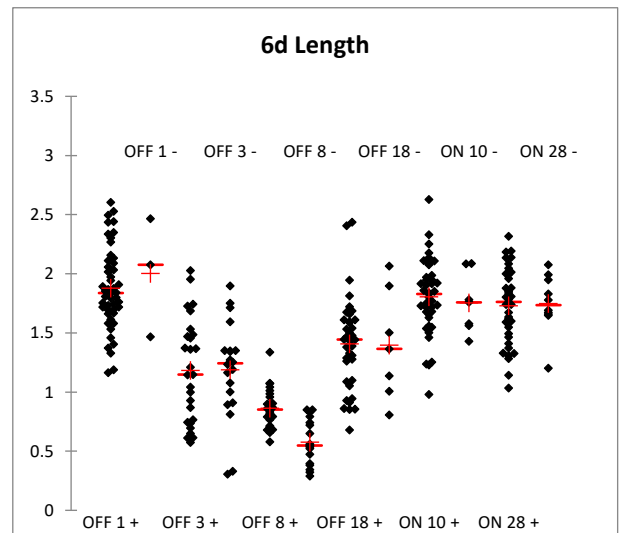


Figure 22: Τεστ 5, Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 6^ο μέρα.

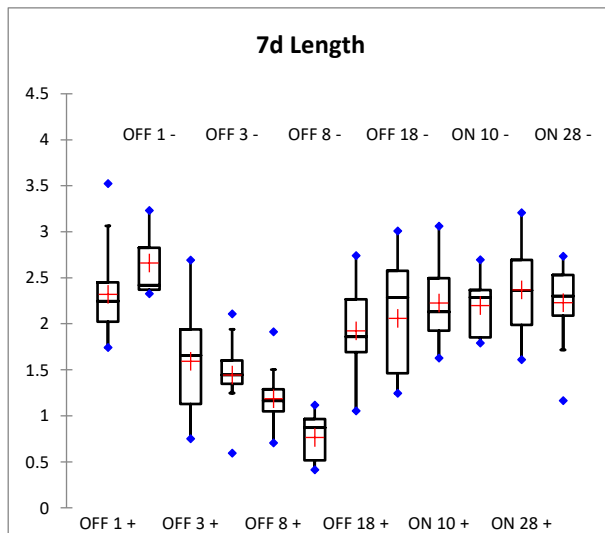


Figure 25: Τεστ 5, Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 7^ο μέρα.

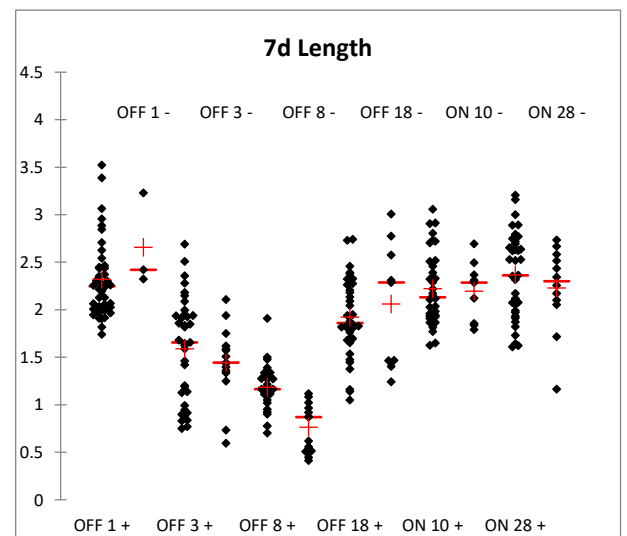


Figure 24: Τεστ 5, Μέτρηση μήκους *A.thaliana* 7^ο μέρα.

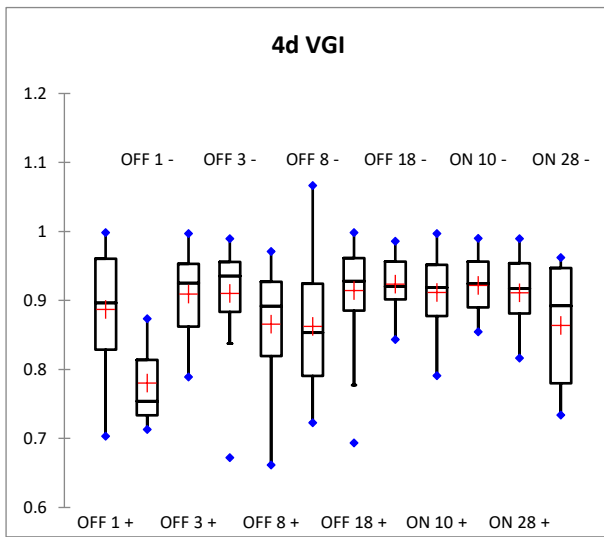


Figure 28: Τεστ 5, Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 4^η μέρα.

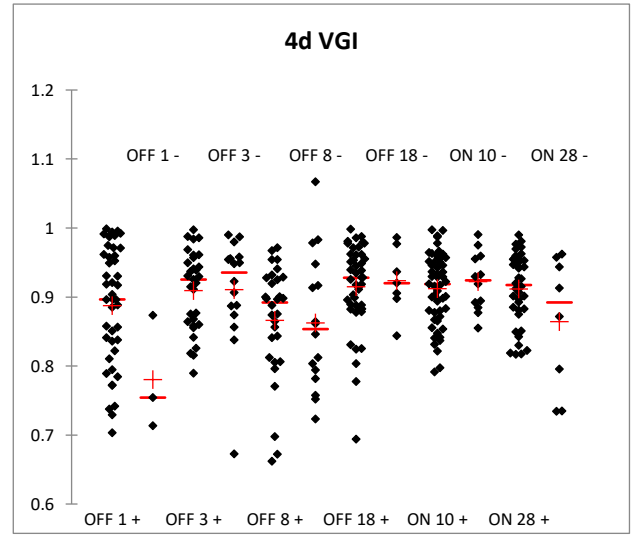


Figure 27: Τεστ 5, Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 4^η μέρα.

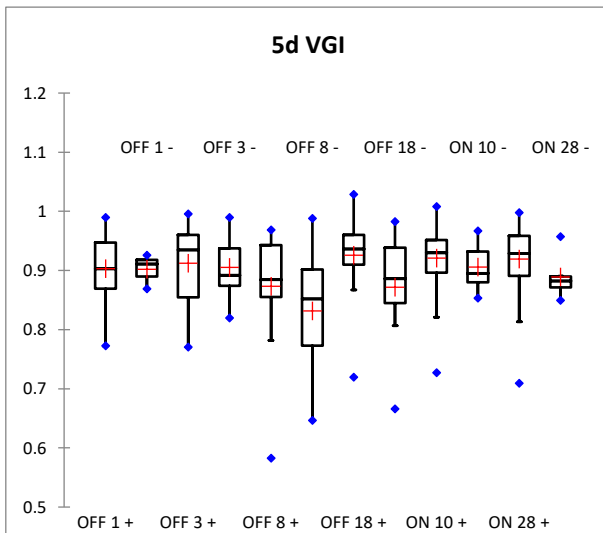


Figure 26: Τεστ 5, Scatterplot Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 5^η μέρα.

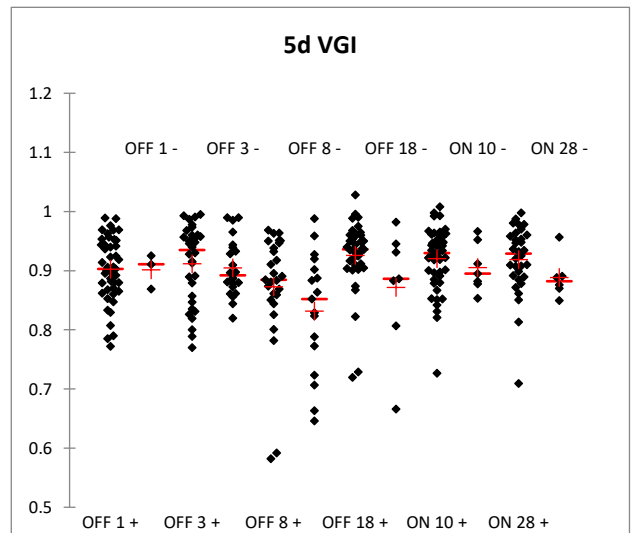


Figure 29: Τεστ 5, boxplot Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 5^η μέρα.

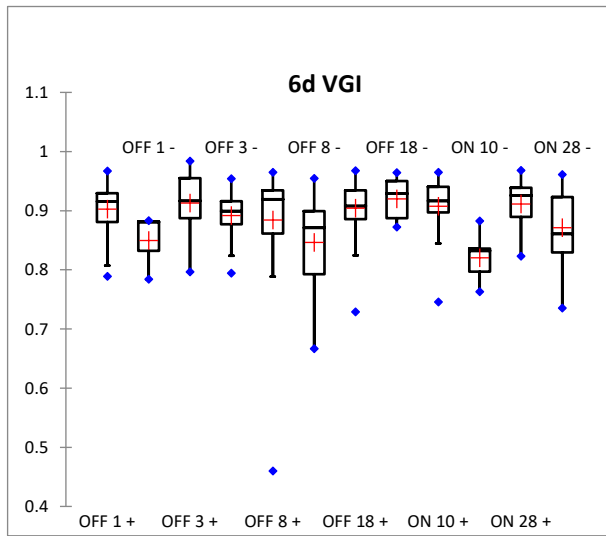


Figure 30: Τεστ 5, Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 6^η μέρα.

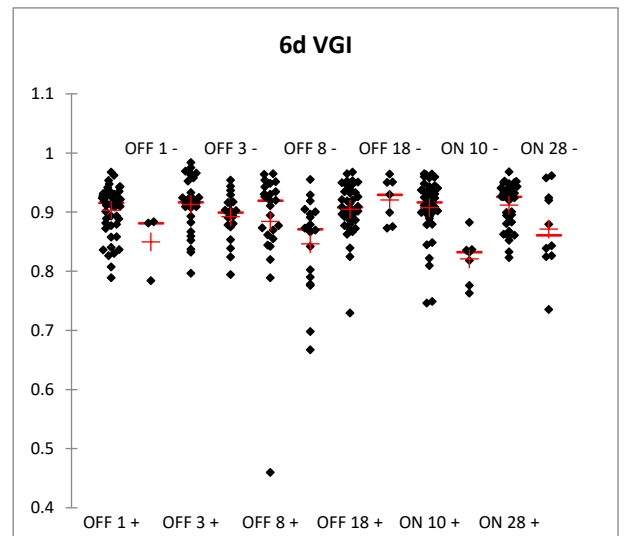


Figure 31: Τεστ 5, Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 6^η μέρα.

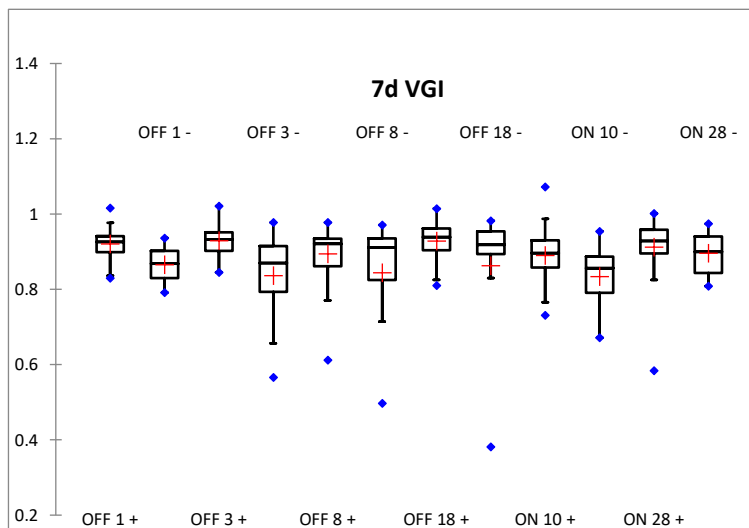


Figure 32: Τεστ 5, Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 7^η μέρα.

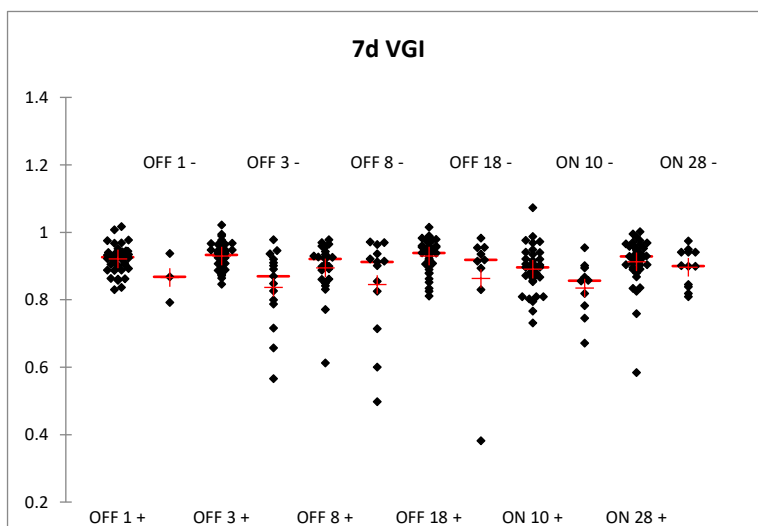
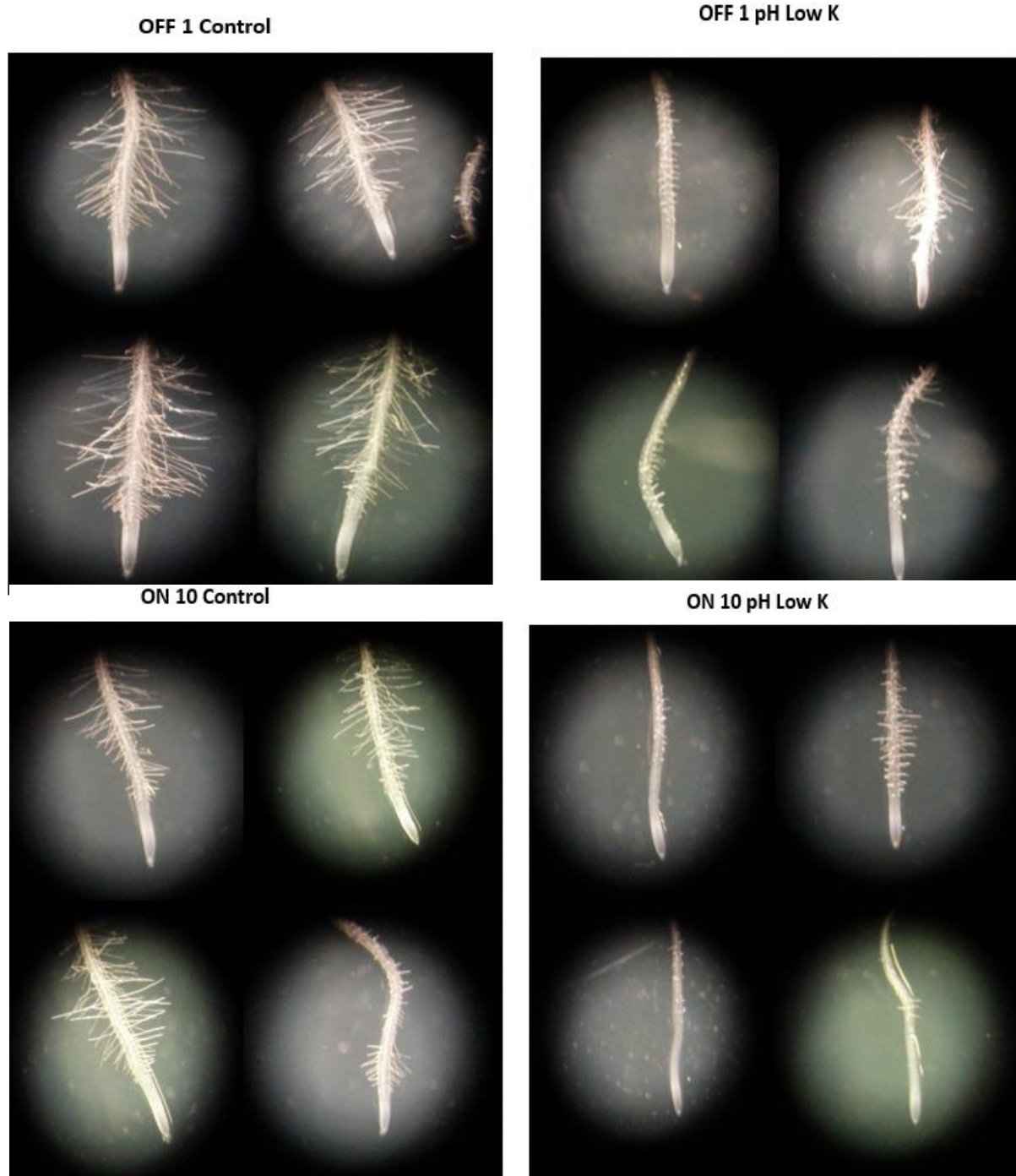


Figure 33: Τεστ 5, Μέτρηση γεωτροπισμού *A.thaliana* 7^η μέρα.



Εικόνα 8: Στερεοσκοπική παρουσίαση σειρών ON-OFF, control και με χαμηλό pH και χαμηλό κάλιο.

Από το φωτογραφικό υλικό στο στερεοσκόπιο, παρατηρείται ότι στα ριζικά συστήματα με θρεπτικό υλικό 1/5 MS (Control, pH:5.7) φαίνεται να υπάρχει πληθώρα ριζικών τριχιδίων και περισσότερο πυκνά είναι στο OFF 1 σε σχέση με το ON 10, ενώ σε περιβάλλον στρεσογόνο (1/5 MS pH:5.7) μειώνονται, είναι κοντύτερα σε μήκος ενώ σε μερικά (OFF Low) αλλάζει και η φορά τους. Φαίνεται, λοιπόν ότι σε pH 4.5 παρουσιάζεται διαφορετικό πρότυπο ανάπτυξης, όπως παρατηρείται από το φαινόμενο ON control μεγαλύτερο κατά 18.90% ενώ η διαφορά είναι μεγαλύτερη σε ON/OFF Low 12.79% μεγαλύτερο το OFF+.

Το έκτο τεστ περιλαμβάνει την ίδια διαδικασία με το πέμπτο με τη διαφορά ότι τα φυτά δοκιμάζονται σε διαφορετικό pH και σε συνθήκες με χαμηλό κάλιο. Την 5^η μέρα το ON φαίνεται ότι σε συνθήκες control παρουσιάζει ελάχιστα τριχίδια, περισσότερα σε pH 5,5.7 ενώ σε στρεσογόνες συνθήκες υπάρχει πλήρης απώλεια τριχιδίων. Την 7^η μέρα ON control παρουσιάζει αρκετά τριχίδια σε pH 4.5. Σε στρεσογόνο περιβάλλον αναπτύσσονται λιγότερα τριχίδια και πιο αραιά. Στο OFF control εμφανίζονται πολλά τριχίδια στο OFF 4.5 ενώ στο Low σε pH 4.5 είναι αρκετά αραιωμένα στο 5.7 έχει ελάχιστα.

Συνεχίζοντας, παρατηρώντας τα διαγράμματα της 5^{ης} μέρας φαίνεται ότι ON 10+ 4.5 Control, και το OFF1+ 4.5 Control φαίνεται να είναι τα μεγαλύτερα σε μήκος, ενώ το ON 10+ 4.5 Low είναι το μικρότερο σε μήκος. Σε συνθήκες με pH:5 παρατηρήθηκε ότι οι μετρήσεις ήταν παρόμοιες οπότε δε παρατηρήθηκε κάποιο συμπέρασμα. Σε συνθήκες με pH:5.7 OFF 1+ Control έχει το μεγαλύτερο μήκος ρίζας αντιθέτως το μικρότερο ON 10+ Control. Μετρώντας το VGI φανερώνεται ότι μη γεωτροπικά σε pH 4.5 είναι το OFF 1- Control και το ON10- Control (0,75-0,78). Σε pH:5 οι μετρήσεις εμφανίστηκαν παρόμοιες τείνουν προς μη γεωτροπικές (0,81-0,86), όμως παρατηρείται ότι τα ριζικά συστήματα χωρίς φθορισμό είναι χαμηλότερες οι τιμές σε σχέση με εκείνα που δε φθορίζουν. Σε pH:5.7 το περισσότερο μη γεωτροπικό ON 10- Control και εδώ παρατηρείται ότι στα φυτά με λιγότερο φθορισμό τείνουν προς μη γεωτροπικά. Την 7^η μέρα για pH:4.5 το μεγαλύτερο σε μήκος ρίζας είναι το OFF1+ Control. Σε pH:5 το μεγαλύτερο εμφανίζεται το OFF1+ αλλά και το ON 10- Low το τελευταίο με λιγότερες μετρήσεις. Σε pH:5.7 το μεγαλύτερο μήκος ρίζας είναι το OFF1+ Control αλλά και το OFF 1- Low όμως θεωρείται ανακριβές καθώς

μετρήθηκαν 4 φυτά μόνο καθώς τα άλλα μολύνθηκαν. Σχετικά με το γεωτροπισμό την 7^η μέρα, μη γεωτροπικό σε σχέση με τα υπόλοιπα θεωρείται το OFF1- Control και το ON10- Control. Σε pH:5 μη γεωτροπικό με ελάχιστη διαφορά από τα υπόλοιπα θεωρείται το ON10- Control και το ON10-Low. Σε pH:5.7 το ON10- Control χαρακτηρίζεται τείνει προς μη γεωτροπικό.

5Day

ON Control-Low

4.5 Control

5 Control

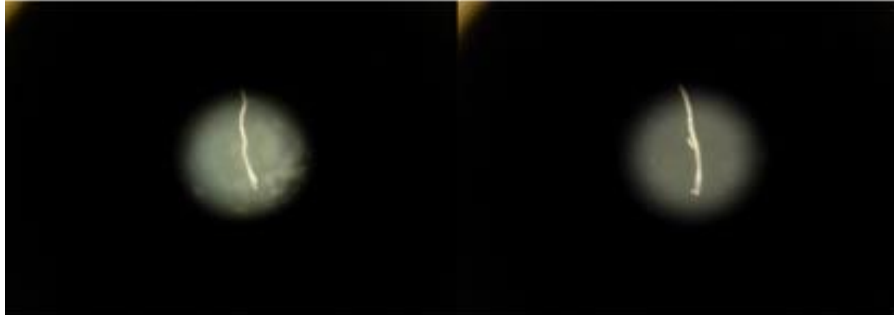
5.7 Control



4.5 LOW

5 LOW

5.7 LOW



Εικόνα 9: Φωτογραφικό Υλικό από στερεοσκόπιο για παρατήρηση ριζικών τριχιδίων.

5Day

OFF Control-Low

4.5 Control

5 Control

5.7 Control



4.5 LOW

5 LOW

5.7 LOW



Εικόνα 10: Φωτογραφικό Υλικό από στερεοσκόπιο για παρατήρηση ριζικών τριχιδίων.

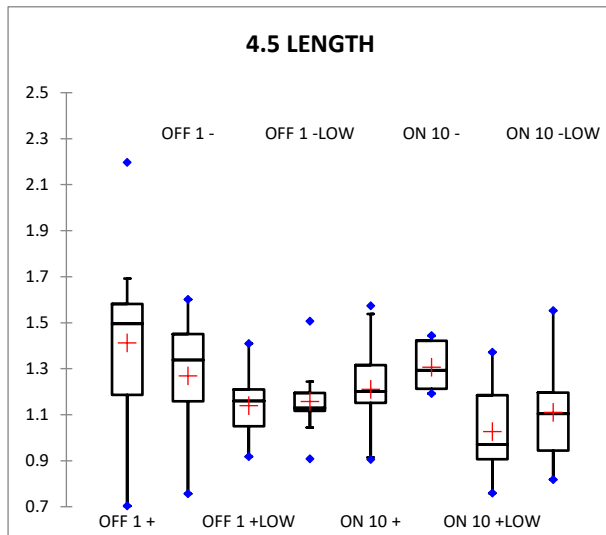


Figure 37: Τεστ 6, μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 4.5.

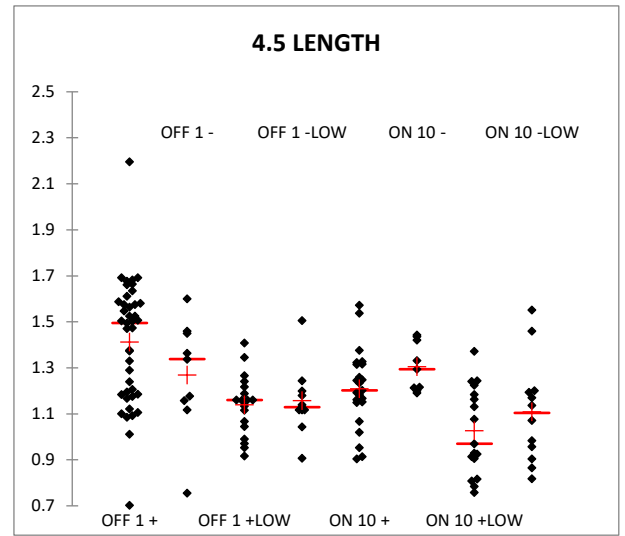


Figure 34: Τεστ 6, boxplot, μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 4.5.

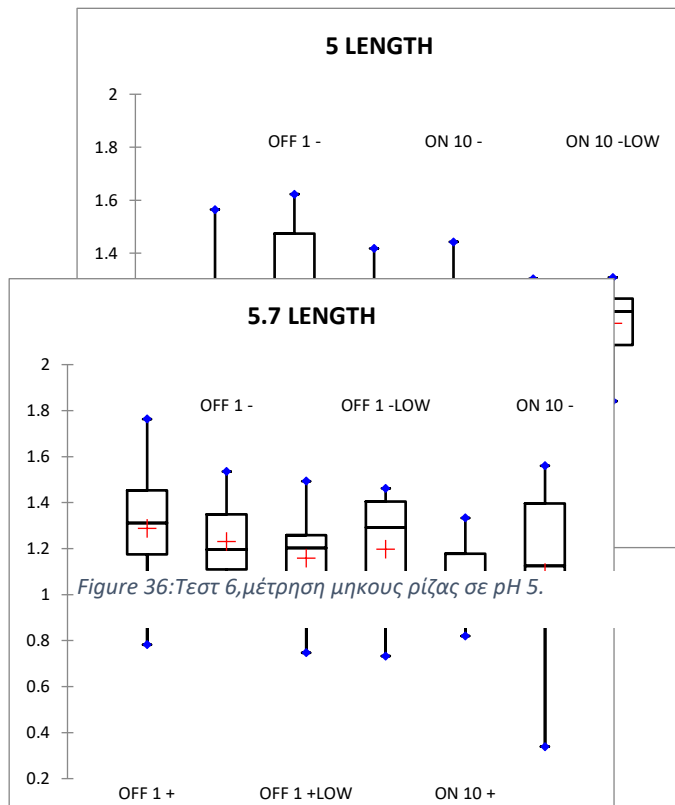


Figure 36: Τεστ 6, μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 5.

Figure 39: Τεστ 6, μέτρηση μήκους ρίζας με pH 5.7.

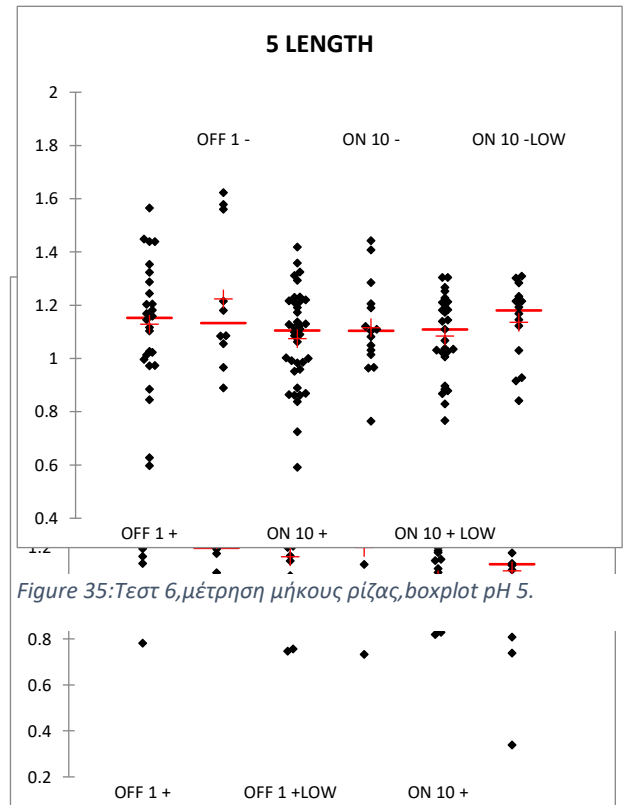
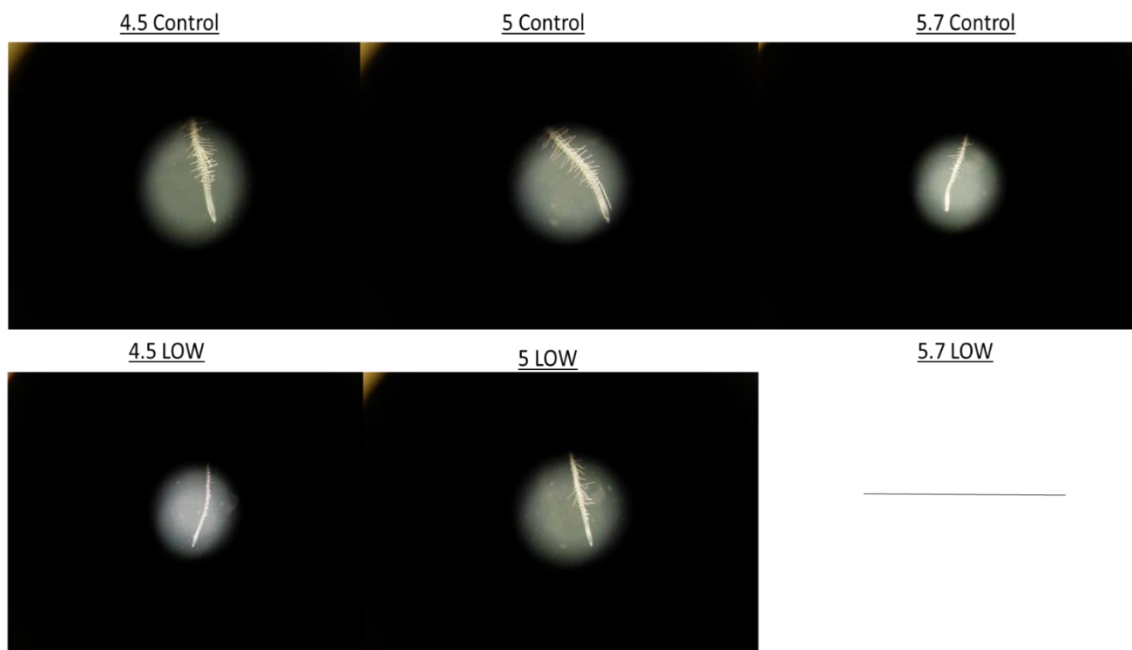


Figure 35: Τεστ 6, μέτρηση μήκους ρίζας, boxplot pH 5.

Figure 38: Τεστ 6, μέτρηση μήκους ρίζας με pH 5.7.

7Day

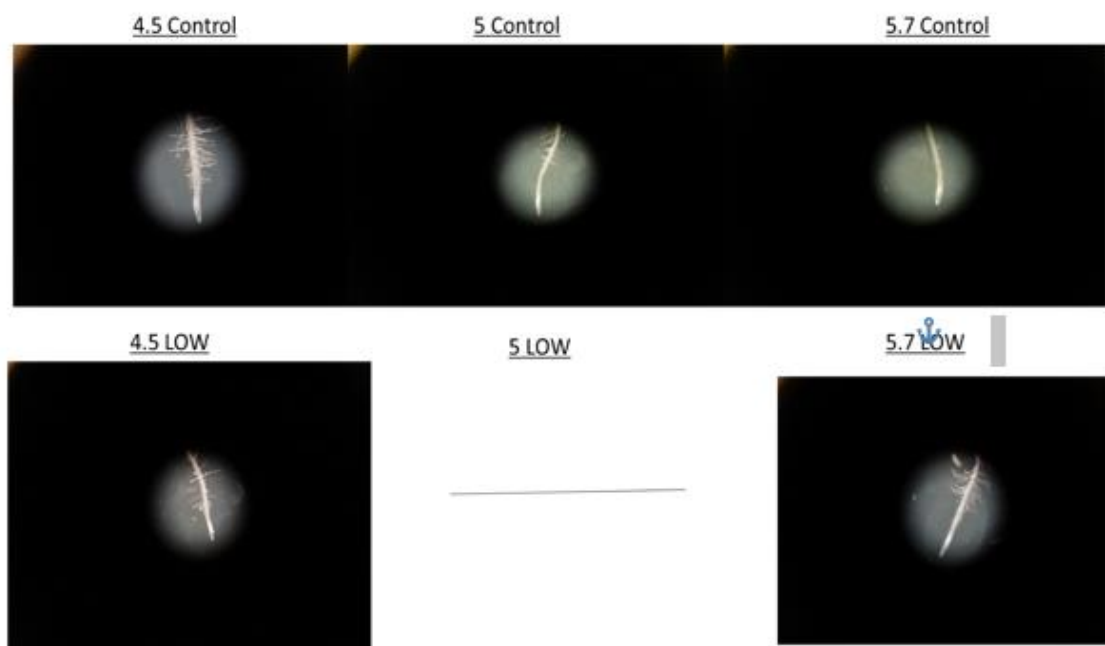
ON Control-Low



Εικόνα 11: Φωτογραφικό Υλικό από στερεοσκόπιο για παρατήρηση ριζικών τριχιδίων, τεστ 6.

7Day

OFF Control-Low



Εικόνα 12: Φωτογραφικό Υλικό από στερεοσκόπιο για παρατήρηση ριζικών τριχιδίων, σε στρεσογόνο περιβάλλον, OFF Control/Low, τεστ 6.

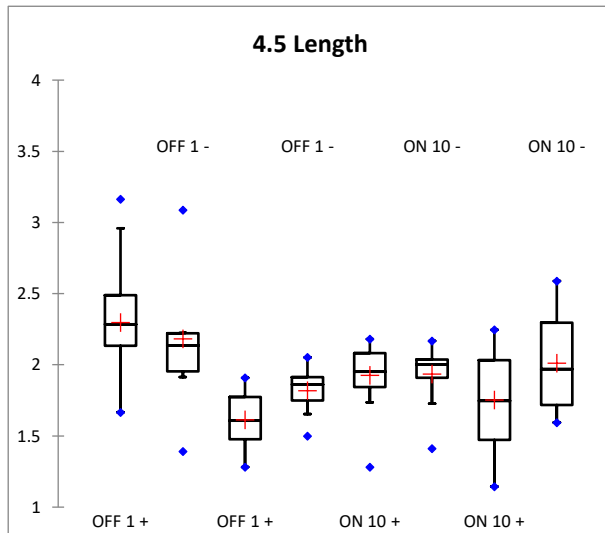


Figure 45: Τεστ 6, μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 4.5.

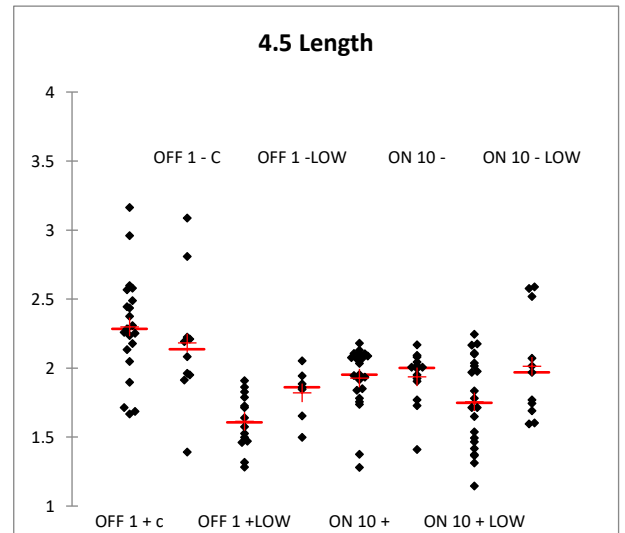


Figure 44: Τεστ 6, μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 4.5.

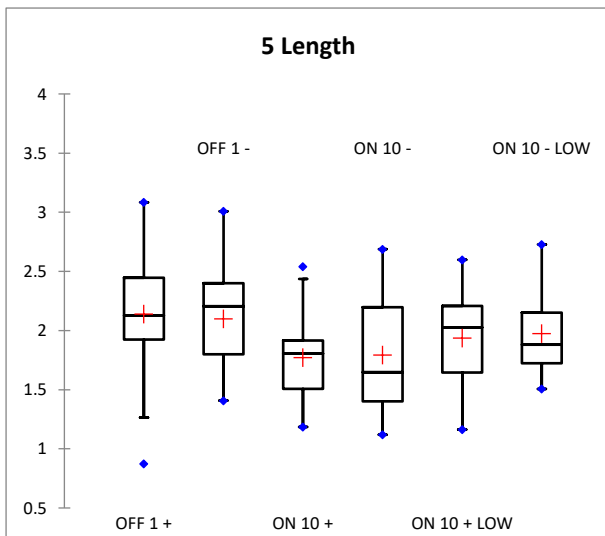


Figure 43: Τεστ 6, μέτρηση μήκους ρίζας σε pH 5.

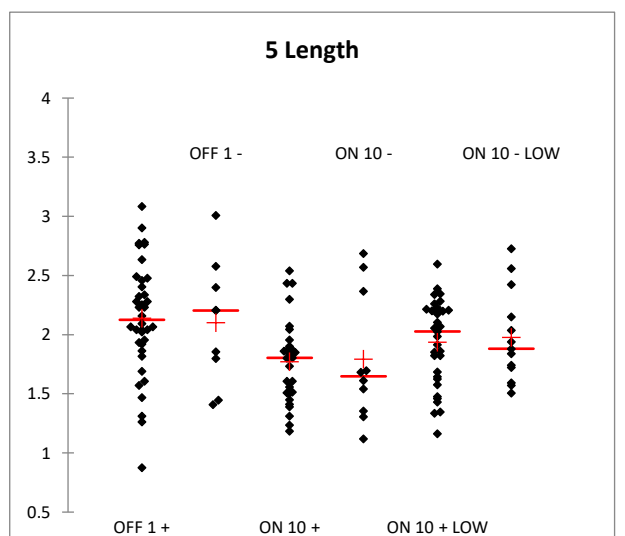


Figure 42: Τεστ 6, μέτρηση μήκους ρίζας, boxplot pH 5.

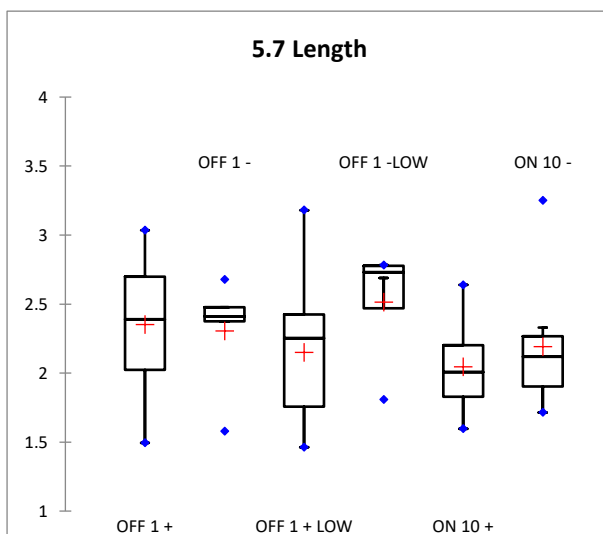


Figure 41: Τεστ 6, μέτρηση μήκους ρίζας με pH 5.7.

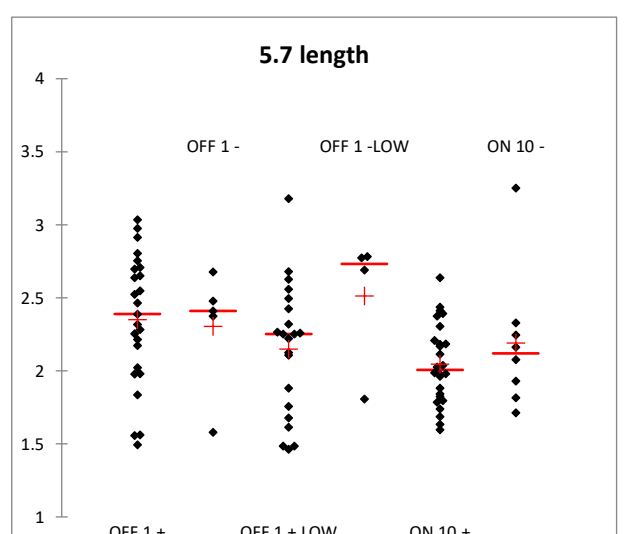


Figure 40 Τεστ 6, μέτρηση μήκους ρίζας με pH 5.7.

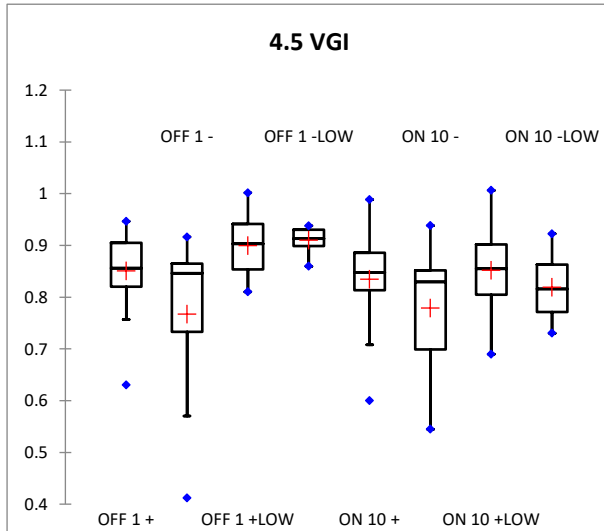


Figure 48: μέτρηση γεωτροπισμού pH 4.5.

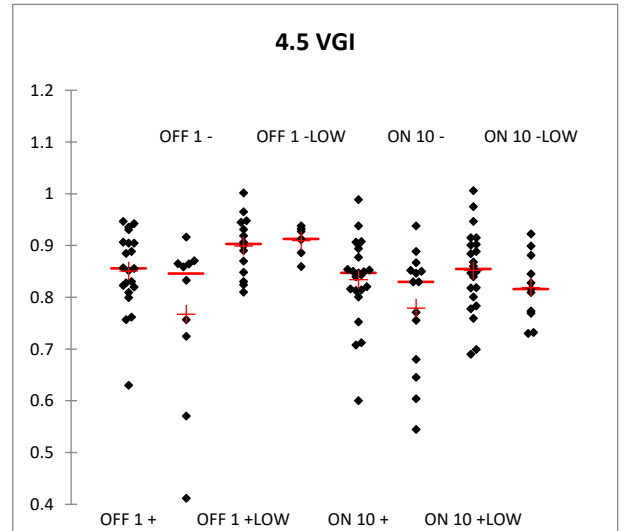


Figure 46: μέτρηση γεωτροπισμού 4.5.

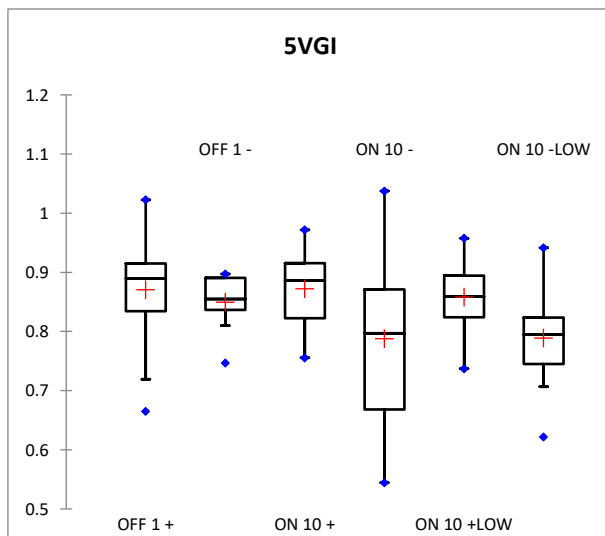


Figure 49: μέτρηση γεωτροπισμού pH 5.

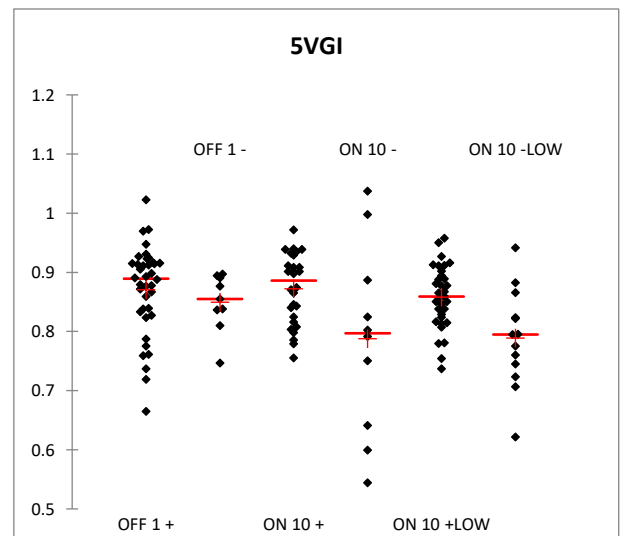


Figure 47: μέτρηση γεωτροπισμού pH 5.

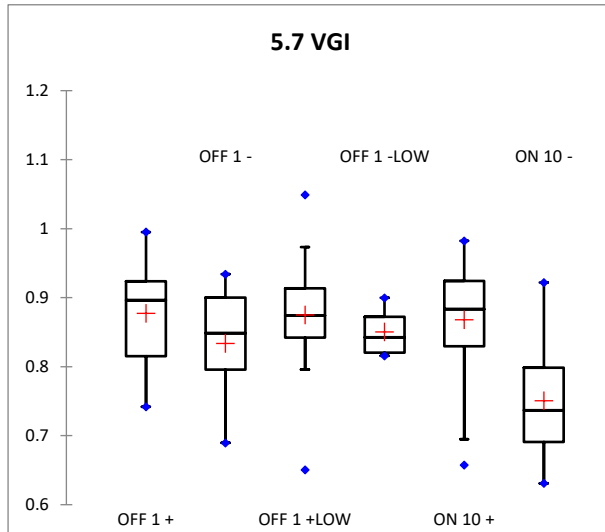


Figure 50: μέτρηση γεωτροπισμού pH 5.7.

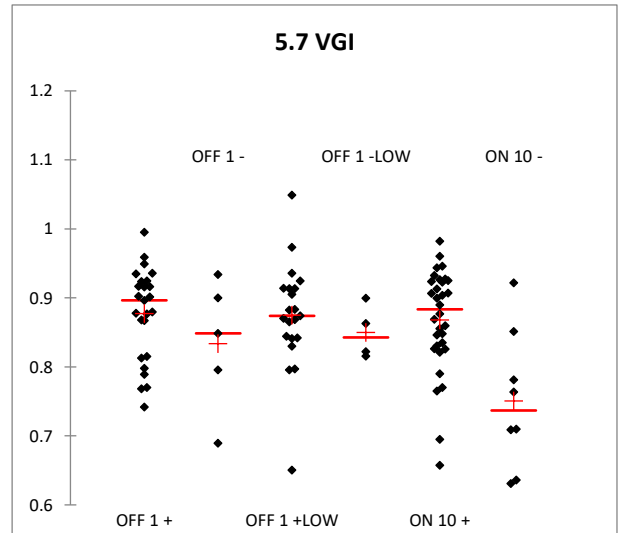


Figure 51: μέτρηση γεωτροπισμού 5.7.

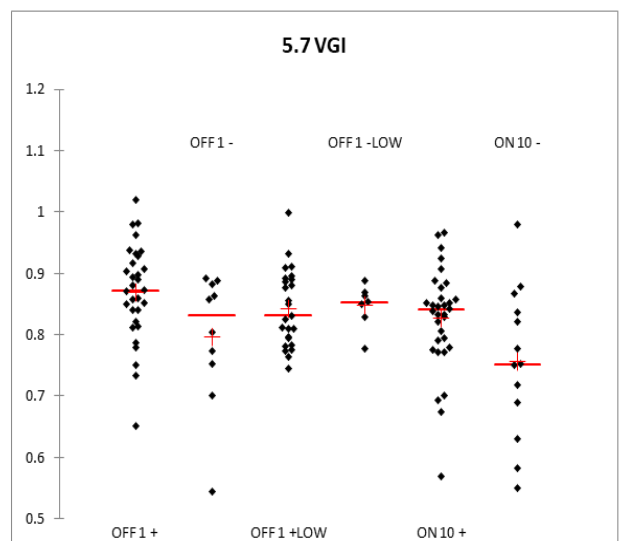
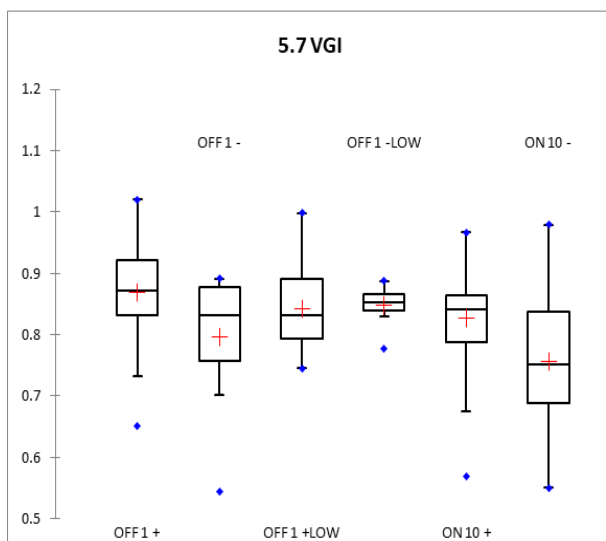
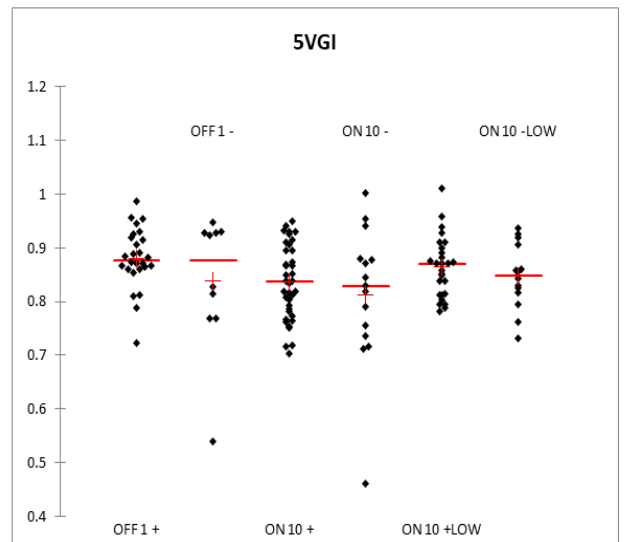
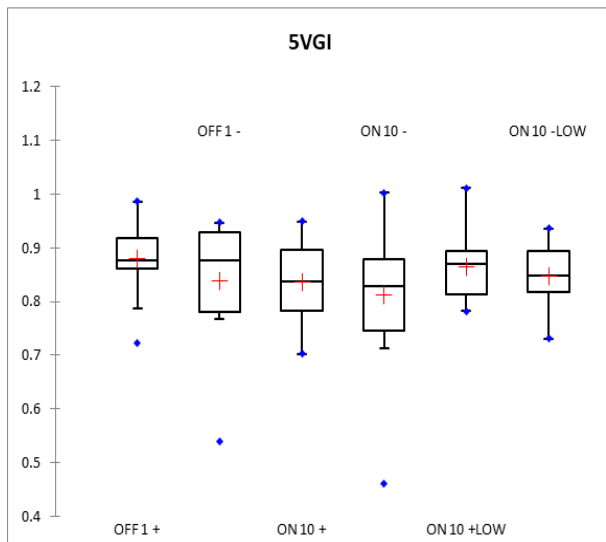
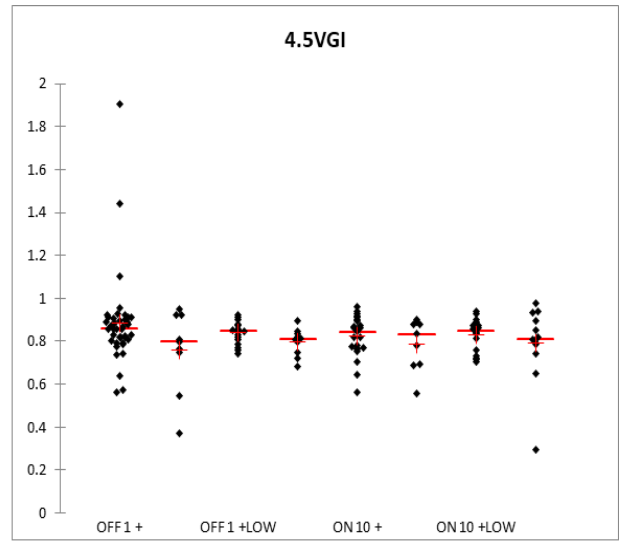
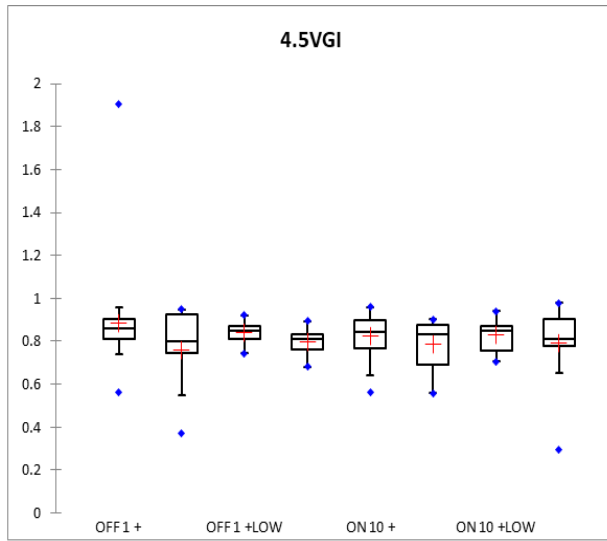


Figure 52: διαγράμματα scatterplot και boxplot μέτρησης γεωτροπισμού σε pH 4.5, 5 και 5.7.

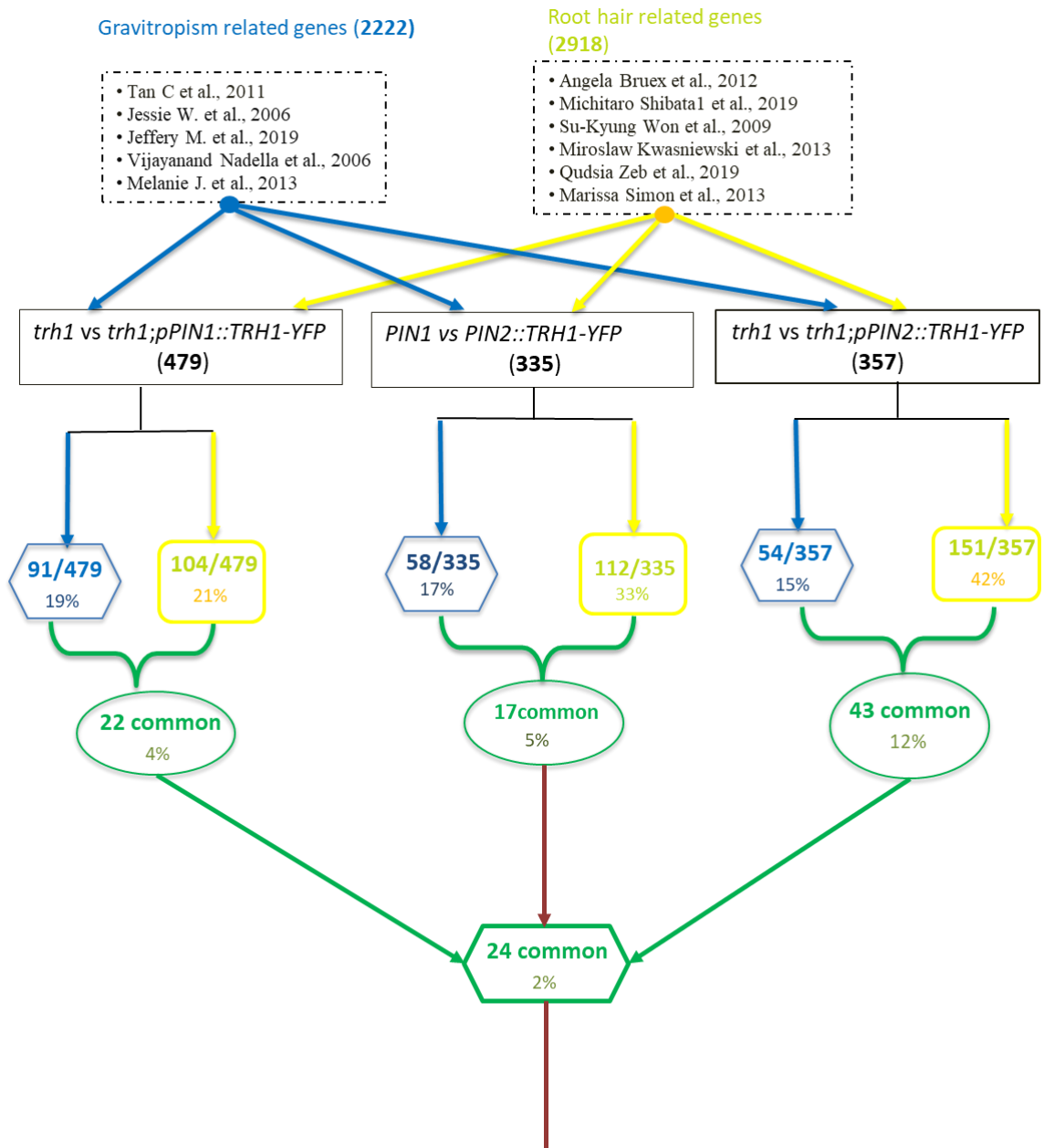
3.5 Βιοπληροφορική Ανάλυση

Η GO Database είναι μια σχεσιακή βάση δεδομένων, η οποία διατηρείται πάνω σε MySQL(σύστημα διαχείρισης [βάσεων δεδομένων](#) που μετρά περισσότερες από 11 εκατομμύρια εγκαταστάσεις), και περιλαμβάνει τις οντολογίες και τα annotations των γονιδίων και των γονιδιακών προϊόντων της GO. Οντολογία Γονιδίων είναι μια οντολογία που περιέχει πληροφορίες σχετικά με γονίδια, τις λειτουργίες και τις σχέσεις μεταξύ τους με ένα δομημένο τρόπο. Τα δύο κύρια συστατικά της GO είναι η οντολογία αυτή καθ' αυτή που περιέχει τους όρους που περιγράφουν την λειτουργία των γονιδίων και οι αντίστοιχες υποσημειώσεις. Η συγκεκριμένη οργάνωση όλων των συστατικών της GO σε μία ΒΔ, δίνει τη δυνατότητα κατασκευής ισχυρών ερωτημάτων στη ΒΔ, που στηρίζονται στα annotations(σχολιασμοί) τα οποία χρησιμοποιούνται στην οντολογία. Η ΒΔ είναι διαθέσιμη σε διάφορες μορφές και κωδικοποιήσεις, ενώ στηρίζεται στην πιο πρόσφατη εκδοχή της GO και των annotated δεδομένων που είναι διαθέσιμα από τα μέλη του GO Consortium

Συγκεντρώθηκαν γονίδια από επιστημονικά άρθρα τα γονίδια που σχετίζονται με γεωτροπισμό (2222) και ριζικά τριχίδια(2918),στα οποία εφαρμόστηκε Οντολογία γονιδίων μέσω του προγράμματος Panther σε 3 κατηγορίες (Biological Process, Molecular function και Cellular component).Ο διαχωρισμός τους έχει σχέση με γονίδια που υπερεκφράζονται η όχι σχετικά με *Trh1 vs Trh1;pPIN1::TRH1-YFP*, *PIN1 vs PIN2::TRH1-YFP*, *Trh1 vs Trh1;pPIN2::TRH1-YFP*.Για να είναι αποδεκτά τα αποτελέσματα θα πρέπει να το Ratio να είναι μικρότερο από 2 και οι μετρήσεις μεγαλύτερες από 25.

Υπάρχουν (479) γονίδια για το TRH1 σχετιζόμενα με PIN1,(357) γονίδια TRH1 σχετιζόμενα με PIN2 και (335) γονίδια κοινά για PIN1 και PIN2.Σε αυτά τα γονίδια πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός μέσω λιστών με τη βοήθεια προγράμματος της ACCESS, καθώς διαχωρίστηκαν από τα (2222) αρχικά γεωτροπικά γονίδια τα κοινά γονίδια σε σχέση με τις τρεις κατηγορίες. Στη συνέχεια έγινε ο ίδιος διαχωρισμός για γονίδια σε σχέση όμως αυτή τη φορά με γονίδια που σχετίζονται με τα ριζικά τριχίδια (2918).Σχετικά με το γεωτροπισμό βρέθηκαν (91/479) κοινά γονίδια και για τα ριζικά τριχίδια (104/479).Συνεχίζοντας, πραγματοποιήθηκε ακόμα μια λίστα συγκρίνοντας τα (91) κοινά γονίδια γεωτροπισμού με τα (104) κοινά γονίδια ριζικών τριχιδίων ώστε να ταυτοποιηθούν σε πιο αυστηρή κλίμακα τα κοινά γονίδια μεταξύ τους. Από τη συγκεκριμένη αναζήτηση βρέθηκαν (22) κοινά γονίδια. Η ίδια διαδικασία

εφαρμόστηκε για τα ριζικά τριχίδια σχετικά με TRH1 με PIN2 (357) από τα οποία (54/357) βρέθηκαν σχετιζόμενα με γεωτροπισμό και τα (151/357) σχετιζόμενα με ριζικά τριχίδια. Σε μια δεύτερη αυστηρότερη λίστα βρέθηκαν (43) κοινά γονίδια σχετικά με γεωτροπισμό και ριζικά τριχίδια στο PIN2. Τα παραπάνω στοιχεία ταυτοποιήθηκαν ξανά και βρέθηκε ότι από τα (22) κοινά συγκρινόμενα με τα (43) κοινά υπάρχουν (24) γονίδια κοινά μεταξύ τους. Επιπλέον φαίνονται τα ποσοστά σε κάθε λίστα κοινών γονιδίων. Τα αποτελέσματα διαφαίνονται στην παρακάτω εικόνα, (Εικόνα 16). Παρατηρώντας την οντολογία γονιδίων στη Biological Process (Trh1-PIN1) φαίνεται ότι τα περισσότερα γονίδια σχετίζονται με την δομή κυτταρικού τοιχώματος. Επίσης φαίνεται ότι η Biological Process εμπεριέχει γονίδια που σχετίζονται με αλλαγές σε φυσικό και χημικό περιβάλλον, την οργάνωση του κυττάρου και τη ευαισθησία του. Στα γονίδια γεωτροπισμού η Biological Process φανερώνει γονίδια που σχετίζονται με το κυτταρικό τοίχωμα ενώ στη Molecular function με δέσμευση οξυγόνου. Αντιθέτως στα 2918 γονίδια που αφορούν τα ριζικά τριχίδια αφορούν περισσότερο τη μορφογένεση, την ανάπτυξη των τριχιδίων, τη μεταβολική διαδικασία αλλά και το κυτταρικό τοίχωμα.



Εικόνα 13: Διάγραμμα γονιδιακής Οντολογίας, εύρεση κοινών γονιδίων σχετικά με γεωτροπισμό και ριζικών τριχιδίων του *Arabidopsis Thaliana*.

3.6 Αποτελέσματα Βιοπληροφορικής Ανάλυσης

GO.ID	Term	Annotated		Expect		
		Count	ed	Ratio	p-value	
GO:0009664	plant-type cell wall organization	154	35	11.76	2.97619	4.00E-09
GO:0042545	cell wall modification	157	30	11.99	2.502085	2.60E-06
GO:0044036	cell wall macromolecule metabolic process	154	29	11.76	2.465986	5.10E-06
GO:0010243	response to organonitrogen compound	183	34	13.98	2.432046	1.10E-06
GO:0010200	response to chitin	136	25	10.39	2.40616	3.40E-05
GO:0071669	plant-type cell wall organization or biogenesis	279	49	21.31	2.29939	3.50E-08
GO:0007568	aging	162	28	12.37	2.263541	3.80E-05
GO:0071555	cell wall organization	554	92	42.31	2.174427	1.10E-12
GO:1901617	organic hydroxy compound biosynthetic process	211	34	16.11	2.11049	2.70E-05
GO:0045229	external encapsulating structure organization	590	94	45.06	2.086107	7.10E-12
GO:0006869	lipid transport	171	27	13.06	2.067381	0.00025
GO:0021700	developmental maturation	197	31	15.04	2.06117	9.50E-05
GO:1901698	response to nitrogen compound	285	44	21.76	2.022059	6.20E-06

Πίνακας 9: Οντολογία γονιδίων για γεωτροπισμό, *Biological Process*(2222).

GO.ID	Term	Annotated	Count	Expected	Ratio	p-value
GO:0030312	external encapsulating structure	776	130	60.76	2.139566	5.10E-17
GO:0005618	cell wall	775	130	60.68	2.142386	4.50E-17
GO:0009505	plant-type cell wall	338	60	26.47	2.266717	1.70E-09

Πίνακας 10: Οντολογία γονιδίων, *Cellular component*, για γεωτροπισμό(2222).

GO.ID	Term	Annotated	Count	Expected	ratio	p-value
GO:0004497	monooxygenase activity	316	50	24.12	2.072968	7.00E-07
GO:0020037	heme binding	382	62	29.16	2.1262	1.30E-08
GO:0019825	oxygen binding	234	40	17.86	2.239642	1.20E-06
GO:0016209	antioxidant activity	157	27	11.99	2.251877	5.60E-05

Πίνακας 11: Οντολογία γονιδίων για *Molecular function*, γονιδίων για γεωτροπισμό(2222).

GO.ID	Term	Annotated	Count	Expected	Ratio	p-value
GO:0010033	response to organic substance	2026	25	6.7	3.731343	4.80E-09
GO:0042221	response to chemical	2847	29	9.41	3.081828	1.50E-08
GO:0006950	response to stress	3567	32	11.79	2.714165	4.20E-08
GO:0050896	response to stimulus	6373	49	21.06	2.326686	1.20E-10

Πίνακας 12: Οντολογία γονιδίων, *Biological process* (91), *Trh1-PIN1*.

GO.ID	Term	Annotated	Count	Expected	Ratio	p-value
GO:0050896	response to stimulus	6373	24	12	2	0.00018

Πίνακας 13: Οντολογία γονιδίων, *Biological process* (54), *Trh1-PIN2*.

GO.ID	Term	Annotated Count	Expected	ratio	p-value	
GO:0009725	response to hormone	1655	60	28.24	2.124646	2.80E-08
GO:0044283	small molecule biosynthetic process	758	28	12.93	2.165507	0.00012
GO:0010033	response to organic substance	2026	79	34.57	2.285218	3.30E-12
GO:0009605	response to external stimulus	1617	62	27.59	2.247191	2.00E-09
GO:0097305	response to alcohol	656	25	11.19	2.234138	0.00018
GO:0009719	response to endogenous stimulus	1767	67	30.15	2.222222	6.30E-10
GO:0098542	defense response to other organism	958	36	16.35	2.201835	9.40E-06
GO:0006811	ion transport	964	36	16.45	2.18845	1.10E-05
GO:0006950	response to stress	3567	133	60.87	2.184984	2.90E-19
GO:0043207	response to external biotic stimulus	1224	50	20.89	2.39349	1.20E-08
GO:0051707	response to other organism	1224	50	20.89	2.39349	1.20E-08
GO:0001101	response to acid chemical	1182	48	20.17	2.379772	2.80E-08
GO:0043436	oxyacid metabolic process	1326	53	22.63	2.342024	8.50E-09
GO:0006082	organic acid metabolic process	1330	53	22.7	2.334802	9.40E-09
GO:0009607	response to biotic stimulus	1265	52	21.59	2.408522	4.70E-09
GO:0042221	response to chemical	2847	117	48.58	2.408399	5.30E-20
GO:0042592	homeostatic process	669	28	11.42	2.451839	1.40E-05
GO:0055085	transmembrane transport	1130	49	19.28	2.541494	2.40E-09
GO:0055114	oxidation-reduction process	1859	80	31.72	2.522068	1.30E-14
GO:0009314	response to radiation	755	35	12.88	2.717391	1.10E-07
GO:0009651	response to salt stress	552	26	9.42	2.760085	3.70E-06
GO:0044712	single-organism catabolic process	777	38	13.26	2.865762	7.40E-09
GO:0009628	response to abiotic stimulus	1987	96	33.91	2.831023	5.90E-21
GO:0009416	response to light stimulus	725	35	12.37	2.829426	4.10E-08
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	1537	73	26.23	2.783073	1.60E-15
GO:0010035	response to inorganic substance	899	47	15.34	3.063885	1.20E-11
GO:0006970	response to osmotic stress	614	33	10.48	3.148855	8.00E-09
GO:0009266	response to temperature stimulus	561	42	9.57	4.388715	1.10E-15
GO:0044550	secondary metabolite biosynthetic process	347	27	5.92	4.560811	7.10E-11
GO:0006979	response to oxidative stress	475	38	8.11	4.685573	3.40E-15
GO:0006790	sulphur compound metabolic process	389	31	6.64	4.668675	1.40E-12
GO:0019748	secondary metabolic process	511	49	8.72	5.619266	1.10E-22
GO:0009408	response to heat	200	27	3.41	7.917889	1.10E-16

Πίνακας 14: Οντολογία γονιδίων για 479 γονίδια, Biological process, Trh1-PIN1.

GO.ID	Term	Annotated Count	Expected ratio	p-value
GO:0020037	heme binding	382	34	6.51 5.222734 4.40E-15
GO:0016491	oxidoreductase activity	1721	75	29.33 2.557109 5.30E-14
GO:0015075	ion transmembrane transporter activity	771	33	13.14 2.511416 1.50E-06
GO:0022857	transmembrane transporter activity	1170	49	19.94 2.457372 7.30E-09
GO:0022891	substrate-specific transmembrane transporter activity	955	38	16.27 2.335587 1.40E-06
GO:0020037	heme binding	1178.3	40.4	20.077 2.012253 2.47E-13

Πίνακας 15: Οντολογία γονιδίων για *Molecular function*, 479 γονιδίων, TRH1-PIN1.

GO.ID	Term	Annotated Count	Expected ratio	p-value
GO:0042221	response to chemical	2847	72	36 2 6.50E-09
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	1537	41	19.43 2.110139 5.40E-06
GO:0055085	transmembrane transport	1130	34	14.29 2.379286 3.00E-06
GO:0055114	oxidation-reduction process	1859	54	23.51 2.296895 8.30E-09
GO:0009628	response to abiotic stimulus	1987	61	25.12 2.428344 8.20E-11
GO:0010035	response to inorganic substance	899	33	11.37 2.902375 5.00E-08
GO:0019748	secondary metabolic process	511	29	6.46 4.489164 2.00E-11
GO:0009266	response to temperature stimulus	561	36	7.09 5.077574 1.50E-15
GO:0006979	response to oxidative stress	475	33	6.01 5.490849 2.50E-15
GO:0009408	response to heat	200	26	2.53 10.27668 7.00E-19

Πίνακας 16: Οντολογία γονιδίων, *Biological process*, 357, TRH1-PIN2.

GO.ID	Term	Annotated Count	Expected ratio	p-value
GO:0022857	transmembrane transporter activity	1170	37	14.73 2.511881 2.90E-07
GO:0022891	substrate-specific transmembrane transporter activity	955	29	12.02 2.412646 1.30E-05
GO:0016491	oxidoreductase activity	1721	51	21.67 2.353484 1.10E-08
GO:0005215	transporter activity	1457	39	18.34 2.126499 7.80E-06
GO:0022892	substrate-specific transporter activity	1093	29	13.76 2.107558 0.00014

Πίνακας 17: Οντολογία γονιδίων, *Molecular function*, 357, TRH1-PIN2.

GO.ID	Term	Annotated Count	Expected ratio	p-value
GO:0005576	extracellular region	1552	43	18.89 2.276337 3.10E-07

Πίνακας 18: Οντολογία γονιδίων, *Cellular component*, 357, TRH1-PIN2.

GO.ID	Term	Annotated	Count	Expected	ratio	p-value
GO:0009308	amine metabolic process	151	31	14.73	2.104549	5.10E-05
GO:0032989	cellular component morphogenesis	471	98	45.94	2.133217	3.50E-13
GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	440	91	42.92	2.120224	3.40E-12
GO:0009738	abscisic acid-activated signaling pathway	233	49	22.73	2.155741	1.90E-07
GO:0051336	regulation of hydrolase activity	199	42	19.41	2.163833	1.20E-06
GO:0009932	cell tip growth	155	33	15.12	2.18254	1.30E-05
GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	732	156	71.4	2.184874	2.50E-21
GO:0045229	external encapsulating structure organization	590	127	57.55	2.206777	6.20E-18
GO:0042545	cell wall modification	157	34	15.31	2.220771	6.80E-06
GO:0000902	cell morphogenesis	436	95	42.53	2.233717	4.40E-14
GO:1990267	response to transition metal nanoparticle	128	28	12.49	2.241793	3.50E-05
GO:0071555	cell wall organization	554	122	54.04	2.257587	4.30E-18
GO:0009611	response to wounding	217	48	21.17	2.267359	4.90E-08
GO:0016049	cell growth	441	102	43.02	2.37099	7.50E-17
GO:0044036	cell wall macromolecule metabolic process	154	36	15.02	2.396804	5.50E-07
GO:0009888	tissue development	603	143	58.82	2.431146	3.00E-24
GO:0010383	cell wall polysaccharide metabolic process	119	28	11.61	2.411714	8.40E-06
GO:0042743	hydrogen peroxide metabolic process	108	26	10.53	2.469136	1.10E-05
GO:0015698	inorganic anion transport	104	25	10.14	2.465483	1.70E-05
GO:0060560	developmental growth involved in morphogenesis	347	83	33.85	2.451994	7.80E-15
GO:0000904	cell morphogenesis involved in differentiation	244	60	23.8	2.521008	1.20E-11
GO:0051345	positive regulation of hydrolase activity	120	30	11.71	2.561913	1.10E-06
GO:0043547	positive regulation of GTPase activity	115	30	11.22	2.673797	4.00E-07
GO:0048588	developmental cell growth	183	48	17.85	2.689076	1.20E-10
GO:0071669	plant-type cell wall organization or biogenesis	279	76	27.21	2.793091	5.50E-17
GO:0016143	S-glycoside metabolic process	105	29	10.24	2.832031	1.60E-07
GO:0019757	glycosinolate metabolic process	105	29	10.24	2.832031	1.60E-07
GO:0019760	glucosinolate metabolic process	105	29	10.24	2.832031	1.60E-07
GO:0048364	root development	454	128	44.29	2.890043	2.70E-29
GO:0022622	root system development	456	128	44.48	2.877698	4.30E-29
GO:0010026	trichome differentiation	116	35	11.32	3.091873	6.80E-10
GO:0048468	cell development	324	108	31.6	3.417722	1.00E-30
GO:0009664	plant-type cell wall organization	154	56	15.02	3.728362	4.20E-19
GO:0090558	plant epidermis development	273	107	26.63	4.018025	1.00E-30
GO:0010015	root morphogenesis	238	93	23.22	4.005168	1.00E-30
GO:0021700	developmental maturation	197	75	19.22	3.902185	1.40E-26
GO:0090627	plant epidermal cell differentiation	140	79	13.66	5.783309	1.00E-30
GO:0048767	root hair elongation	57	32	5.56	5.755396	3.20E-18
GO:0080147	root hair cell development	77	48	7.51	6.391478	1.50E-29
GO:0048764	trichoblast maturation	97	63	9.46	6.659619	1.00E-30
GO:0048765	root hair cell differentiation	97	63	9.46	6.659619	1.00E-30
GO:0010053	root epidermal cell differentiation	118	76	11.51	6.602954	1.00E-30
GO:0048469	cell maturation	98	63	9.56	6.589958	1.00E-30
GO:0010054	trichoblast differentiation	103	69	10.05	6.865672	1.00E-30

Πίνακας 19:Οντολογία Γονιδίων,Ριζικών τριχιδίων,2918 γονιδίων, Biological process.

GO.ID	Term	Annotated	Count	Expected	ratio	p-value
GO:0003779	actin binding	122	30	11.95	2.51046	1.70E-06
GO:0000976	transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	121	29	11.85	2.447257	4.30E-06

Πίνακας 20:Οντολογία Γονιδίων,2918,Molecular function, ριζικά τριχίδια.

GO.ID	Term	Annotated	Count	Expected	ratio	p-value
GO:0009505	plant-type cell wall	338	70	34.02	2.057613	3.40E-09

Πίνακας 21:Οντολογία Γονιδίων,2918,ριζικά τριχίδια, Cellular component.

GO.ID	Term	Annotated	Count	Expected	ratio	p-value
GO:0005576	extracellular region	1552	26	8.01	3.245943	6.00E-08

Πίνακας 22:Οντολογία Γονιδίων,ριζικά τριχίδια,Cellular component,151.

GO ID	Term	Annotated Count	Count	Expected	RATIO	p-value
GO:0006950	response to stress	3567	29	13.3	2.180451	2.70E-05
GO:0006950	response to stress	3567	28	7.4	3.783784	3.00E-11

Πίνακας 23: Οντολογία Γονιδίων, ριζικά τριχίδια, Biological process, 104.

Πίνακας 24: Οντολογία Γονιδίων, pin1-pin2, Biological process, 58.

GO.ID	Term	Annotated Count	Expected	RATIO	p-value	
GO:0009408	response to heat	200	34	2.41	14.10788	4.90E-29
GO:0000302	response to reactive oxygen species	173	25	2.09	11.96172	7.90E-20
GO:0009266	response to temperature stimulus	561	47	6.77	6.942393	8.50E-26
GO:0010035	response to inorganic substance	899	44	10.85	4.0553	2.90E-15
GO:0006970	response to osmotic stress	614	25	7.41	3.373819	1.40E-07
GO:0009628	response to abiotic stimulus	1987	74	23.98	3.085905	1.20E-18
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	1537	55	18.55	2.96496	3.70E-13
GO:0009416	response to light stimulus	725	26	8.75	2.971429	9.00E-07
GO:0009314	response to radiation	755	26	9.11	2.854007	1.90E-06
GO:0044712	single-organism catabolic process	777	26	9.38	2.771855	3.20E-06
GO:0006950	response to stress	3567	109	43.05	2.53194	2.30E-21
GO:0009607	response to biotic stimulus	1265	37	15.27	2.423052	6.60E-07
GO:0043207	response to external biotic stimulus	1224	36	14.77	2.437373	8.30E-07
GO:0051707	response to other organism	1224	36	14.77	2.437373	8.30E-07
GO:0055114	oxidation-reduction process	1859	53	22.43	2.362907	4.20E-09
GO:0042221	response to chemical	2847	80	34.36	2.328289	2.90E-13
GO:0098542	defense response to other organism	958	27	11.56	2.33564	4.40E-05
GO:0001101	response to acid chemical	1182	30	14.26	2.103787	0.00011
GO:0051704	multi-organism process	1651	43	19.92	2.158635	1.70E-06
GO:0009605	response to external stimulus	1617	43	19.51	2.203998	9.70E-07

Πίνακας 25: Οντολογία Γονιδίων, Pin1-Pin2, Biological process, 355.

GO.ID	Term	Annotated Count	Count	Expected	RATIO	p-value
GO:0020037	heme binding	382	26	4.5	5.777778	8.40E-13
GO:0016491	oxidoreductase activity	1721	51	20.29	2.513553	1.10E-09

Πίνακας 26: Οντολογία Γονιδίων, Molecular function, Pin1-Pin2, 355.

GO.ID	Term	Annotated Count	Count	Expected	RATIO	p-value
GO:0005618	cell wall	775	25	2.558854	9.77	1.80E-05
GO:0030312	external encapsulating structure	776	25	2.553626	9.79	1.80E-05
GO:0005576	extracellular region	1552	43	2.197241	19.57	8.30E-07

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αυξίνη παίζει θεμελιώδη ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών καθώς ρυθμίζει την κυτταρική διαίρεση τη διαφοροποίηση των κυττάρων και το σχηματισμό πλευρικής ρίζας. Καίριο ρόλο για τη μεταφορά αυξίνης αποτελεί το γονίδιο Trh1 το οποίο κωδικοποιεί ένα μεταφορέα καλίου. Το γονίδιο αυτό στα φυτά παρουσιάζει φαινότυπο μη γεωτροπικό χωρίς πυκνά ριζικά τριχίδια.Θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η μορφογένεση των τριχιδίων με το μη γεωτροπικό χαρακτήρα είναι συνδυασμένες διεργασίες οι οποίες καθορίζονται από την αυξίνη και την ομοιόσταση. Στην παρούσα μελέτη έγιναν δοκιμές σε φυτά Col-0 και Trh1 σε σειρές ON-OFF που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες χαμηλού και υψηλού pH και χαμηλή συγκέντρωση καλίου. Η σερίνη μεταλλάσσεται συχνά σε γλουταμικό οξύ (μερικές φορές ασπαρτικό οξύ) για να μιμείται τη φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης(ON). Αντιστρόφως, η μετάλλαξη σερίνης σε αλανίνη αποτρέπει την πιθανή φωσφορυλίωση (OFF).

Σε χαμηλό pH παρατηρήθηκε πως επηρεάζει σημαντικά το μήκος της ρίζας και με λιγότερα και αραιότερα τριχίδια σε σχέση με το control,τα περισσότερα που δε δίνουν ισχυρό φθορισμό είναι και εκείνα που δεν είναι γεωτροπικά σε στρεσογόνο περιβάλλον..Αρχικά, τα φυτά άγριου τύπου παρουσιάζουν κοντύτερα ριζικά τριχίδια και μερικά παρουσιάζονται χωρίς ριζικά τριχίδια, επιπλέον εμφανίζονται και μη γεωτροπικά. Η μειωμένη τιμή του pH επηρέασε και τα μετασχηματισμένα φυτά Trh1-ON/OFF τα οποία παρουσιάζονται ήδη με λιγότερα τριχίδια και μη γεωτροπικό χαρακτήρα. Συγκεκριμένα, διαφαίνεται ότι τα κοντύτερα σε μήκος εμφανίζονται τα OFF 8-,OFF8+ και OFF3-.Ενώ στα διαγράμματα διασποράς που δείχνουν το γεωτροπισμό δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των σειρών την 7^η

μέρα. Το ON10- φαίνεται να μην είναι γεωτροπικό αλλά και το OFF3-, όμως στο τελευταίο φαίνεται ανακριβές καθώς δεν υπήρχε επαρκής πληθυσμός φυτών. Συμπερασματικά, τα μετασηματισμένα σε σχέση με αγρίου τύπου εμφανίζουν εντονότερη μείωση σε μήκος και μεγαλύτερο μη γεωτροπικό χαρακτήρα.

Σε υψηλό pH παρατηρείται ανάπτυξη περιμετρικών τριχιδίων με αλλαγή φοράς σε μερικά φυτά. Αυτό συμβαίνει λόγω παρεμπόδισης ακροπεταλικής διακίνησης της αυξίνης διαταράσσοντας τη χημειοσωμωτική ισορροπία με αποτέλεσμα η αυξίνη να προκαλεί ενεργοποίηση μηχανισμού πλάγιων ριζών. Τα φυτά με υψηλό pH τείνουν προς γεωτροπικό χαρακτήρα.

Συμπερασματικά αυτό μπορεί να εξηγηθεί, λόγω φυσικοχημικών ιδιοτήτων της αυξίνης καθώς σε καθώς από μόριο IAA σε pH=5 μπορεί παθητικά να διαχέεται από τον εξωκυτταρικό χώρο στα κύτταρα. Αντιθέτως, σε υψηλότερο pH=7 το IAA διαχωρίζεται από και δεν είναι διαπερατό από τη μεμβράνη κάτι που καθιστά την εκροή της αυξίνης εξαρτάται από τις πρωτεΐνες του μεταφορέα. Όταν το pH μειωθεί τότε το IAA δέχεται πρωτόνιο και κυριαρχεί η μορφή IAAH στο εξωτερικό του κυττάρου ενώ στο εσωτερικό λόγω κατιόντων H⁺ στο κυτταρόπλασμα επικρατεί και πάλι η μορφή IAAH ανι IAA⁻. Το πρόβλημα που δημιουργείται καθώς η IAAH δεν εξέρχεται από το κύτταρο ως μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ οι μεταφορείς μεταφέρουν τη μικρότερη συγκέντρωση IAA⁻. Αυτή η ανισορροπία στο κύτταρο προκαλεί συσσώρευση αυξίνης και απορρύθμιση δικτύου αναφοράς. Η ίδια ανισορροπία εμφανίζεται καθώς η αυξίνη έχει μικρότερο ρυθμό εκροής από το κύτταρο. Αυτό αποδεικνύει ότι το Tth1 είναι ένα σημαντικό μέρος του συστήματος μεταφοράς auxin στις ρίζες Arabidopsis.²⁷

Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο κατευθύνεται και ενεργοποιείται η αυξίνη μέσω της φωσφορυλίωσης είναι απαραίτητη για την κατανόηση της ανάπτυξης των φυτών. Δύο διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες που στοχεύουν τους **ίδιους φωσφοσίτες** στο PIN1 μπορούν να ενεργοποιήσουν την εκροή αυξίνης. Παραδόξως, ωστόσο, μόνο ένα επηρεάζει την πολική κατανομή PIN1. Η φωσφορυλίωση των PIN ελέγχει τη δραστηριότητα τους και την πολική κατανομή τους στη πλασματική μεμβράνη

Η κατευθυντική κατανομή της φυτοορμόνης αυξίνης είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των φυτών. Η κατευθυντική μεταφορά αυξίνης διαμεσολαβείται από τους

πολικά κατανεμημένους φορείς έκλουσης auxin PIN-FORMED (PIN). Η αποτελεσματική ροή Αυξίνης με τη μεσολάβηση PIN1 απαιτεί ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης στις τέσσερις σερίνες S1-S4 στο *Arabidopsis thaliana*

Η μεταφορά Αυξίνης με τη μεσολάβηση του PIN απαιτεί ενεργοποίηση από πρωτεϊνικές κινάσες όπως το D6 PROTEIN KINASE (D6PK), PINOID (PID). Πειραματικά στοιχεία προτείνουν ότι οι φωτοτροπίνες, η **αυξίνη**, οι **πρωτεΐνες PIN** και οι D6PKs δρουν στο ίδιο βιοχημικό μονοπάτι για το φωτοτροπισμό. Σύμφωνα με το μοντέλο που περιεγράφηκε, η διαφορετική αναδιανομή της αυξίνης είναι υπεύθυνη για την κάμψη του βλαστού. Παράλληλα, ο έντονα δυναμικός κυτταρικός εντοπισμός των PINs επηρεάζει την ροή της αυξίνης.

Έχοντας ως δεδομένο ότι η φωσφορυλίωση των PINs από άλλες φυτικές κινάσες (πχ PINOID) ρυθμίζει την πολικότητά τους, ενισχύεται η πιθανότητα οι D6PKs να επηρεάζουν την λειτουργία εκροής αυξίνης των PIN. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω φωσφορυλίωσης ή άλλων μηχανισμών, επηρεάζοντας την ικανότητά των PIN για αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες που απαιτούνται στην αποτελεσματική μεταφορά αυξίνης,²⁸

4.5 Βιοπληροφορική Ανάλυση

Στους παραπάνω πίνακες περιέχεται μια ομαδοποίηση γονιδίων μέσω προγράμματος οντολογίας ώστε να βρεθούν τα κοινά γονίδια για γεωτροπισμό και ριζικά τριχίδια. Από τα 24.000 γονίδια που υπάρχουν στο *Arabidopsis thaliana* επιλέχθηκαν τυχαία 2222 γονίδια που αφορούν το γεωτροπισμό και 2918 γονίδια που αφορούν την εκπτυξη ριζικών τριχιδίων από επιστημονικά άρθρα. Έπειτα, επιλέχθηκαν τα στατιστικά σημαντικά γονίδια με count>25 και ratio>2. Ξεκινώντας από τον πίνακα 9,10 και 11 όπου έγινε οντολογία σε 2222 γονίδια που αφορούν το γεωτροπισμό, παρατηρείται ότι τα περισσότερα γονίδια αφορούν το κυτταρικό τοίχωμα, αντιδράσεις σε νιτρικά και οργανικό άζωτο. Η αντίδραση σε οργανικό άζωτο αφορά οποιαδήποτε διαδικασία που οδηγεί σε αλλαγή της κατάστασης ή της δραστηριότητας ενός κυττάρου ή ενός οργανισμού (όσον αφορά την κίνηση, την έκκριση, την παραγωγή ενζύμων, την έκφραση γονιδίων κ.λπ.). Στον πίνακα 12 στη σύγκριση rin1-TRH1 δεν υπάρχει μια ξεκάθαρη εικόνα καθώς όλα είναι διαφορετικά (responses) σε σχέση με το γεωτροπισμό. Ενώ το rin2-TRH1 υπάρχουν γονίδια που

εκφράζονται διαφορετικά και έχουν να κάνουν με το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο σχετίζεται με τα ριζικά τριχίδια. Στους πίνακες 19,20,21,22,23 που αφορούν τα ριζικά τριχίδια παρατηρείται συχνότητα γονιδίων που αφορούν το κυτταρικό τοίχωμα, τη μορφογένεση, την ανάπτυξη ριζικών τριχιδίων αλλά και την επιμήκυνση τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Raven, P. H. *Βιολογία Των Φυτών*. (2014).
2. Ljung, K. *et al.* Sites and regulation of auxin biosynthesis in arabidopsis roots. *Plant Cell* **17**, 1090–1104 (2005).
3. Paque, S. & Weijers, D. Q & A : Auxin : the plant molecule that influences almost anything. *BMC Biol.* 1–5 (2016). doi:10.1186/s12915-016-0291-0
4. Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G. & Zhang, J. Z. A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Front. Plant Sci.* **7**, 1–7 (2016).
5. Luo, J., Zhou, J. J. & Zhang, J. Z. Aux/IAA gene family in plants: Molecular structure, regulation, and function. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–17 (2018).
6. Zhao, Y. Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-Acetic acid in plants. *Mol. Plant* **5**, 334–338 (2012).
7. Won, C. *et al.* Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of Arabidopsis and YUCCAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 18518–18523 (2011).
8. Wang, B. *et al.* Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 4821–4826 (2015).
9. Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M. & Zolman, B. K. Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: De novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *J. Plant Growth Regul.* **20**, 198–216 (2001).
10. Kazan, K. Auxin and the integration of environmental signals into plant root

- development. *Ann. Bot.* **112**, 1655–1665 (2013).
11. Rigas, S. *et al.* TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in arabidopsis root hairs. *Plant Cell* **13**, 139–151 (2001).
 12. Feldmann, K. A. T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: mutational spectrum. *Plant J.* **1**, 71–82 (1991).
 13. Robert, S. *et al.* Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 8464–8469 (2008).
 14. Křeček, P. *et al.* The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol.* **10**, 1–11 (2009).
 15. Benková, E. *et al.* Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell* **115**, 591–602 (2003).
 16. Rahman, A. *et al.* Gravitropism of Arabidopsis thaliana roots requires the polarization of PIN2 toward the root tip in meristematic cortical cells. *Plant Cell* **22**, 1762–1776 (2010).
 17. Cazzonelli, C. I. *et al.* Role of the Arabidopsis PIN6 Auxin Transporter in Auxin Homeostasis and Auxin-Mediated Development. *PLoS One* **8**, (2013).
 18. Rosquete, M. R., Waidmann, S. & Kleine-Vehn, J. PIN7 auxin carrier has a preferential role in terminating radial root expansion in Arabidopsis thaliana. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–11 (2018).
 19. Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G. & Muzio, L. Lo. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* **40**, 271–280 (2017).
 20. A., N. & A., Y. Studying Cell Signal Transduction with Biomimetic Point Mutations. *Genet. Manip. DNA Protein - Examples from Curr. Res.* (2013). doi:10.5772/35029
 21. Clough, S. & Bent, A. Simplified Arabidopsis Transformation Protocol. 8–9 (1998).
 22. Papachristoudis, G. Διπλωματική Εργασία : Βελτίωση της ακρίβειας ταξινο μ

- ησης συνόλων δεδομένων του Παπαχριστούδη Γεωργίου. (2007).
23. Oñate-Sánchez, L. & Vicente-Carbajosa, J. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Res. Notes* **1**, 1–7 (2008).
 24. Clarke, J. D. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harb. Protoc.* **4**, 5177–5179 (2009).
 25. Leffel, S. M., Mabon, S. A. & Stewart, C. N. Applications of green fluorescent protein in plants. *Biotechniques* **23**, 912–918 (1997).
 26. Templalexis, D. Μελέτη του μεταφορέα K⁺ - TRH1 ως μοριακός διαμεσολαβητής στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις Α ΘΗΝΑ 2016 Επιβλέπων : Μελέτη του μεταφορέα K⁺ - TRH1 ως μοριακός διαμεσολαβητής στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις Α ΘΗΝΑ 2016 Επιβλέπων : 1–76 (2016).
 27. Barbosa, I. C. R., Hammes, U. Z. & Schwechheimer, C. Activation and Polarity Control of PIN-FORMED Auxin Transporters by Phosphorylation. *Trends Plant Sci.* **23**, 523–538 (2018).
 28. Zourelidou, M. *et al.* Auxin efflux by PIN-FORMED proteins is activated by two different protein kinases, D6 PROTEIN KINASE and PINOID. *Elife* **2014**, 1–25 (2014).
 29. Balzan, S., Johal, G. S. & Carraro, N. The role of auxin transporters in monocots development. *Front. Plant Sci.* **5**, 1–12 (2014).
 30. Feraru, E. & Friml, J. PIN polar targeting. *Plant Physiol.* **147**, 1553–1559 (2008).

BIBΛΙΑ

Β. Γαλάτης κ.ά. (2003). Φυσιολογία Φυτών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. σελίδες 357–374. ISBN: 960-524-168-4.

Marianna Milano, in [Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology](#), 2019

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ:

https://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana