

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ - ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

‘Ανάλυση Γενετικών και Βιοχημικών Παραγόντων
στην Ανθοφορία του Φυτού Μικρής Ημέρας *Chrysanthemum spp.*’

Πτυχιακή Διατριβή του
Βουραζέρη Ευστράτιου (Α.Μ. 0492004)



Υπεύθυνος Καθηγητής
Γούναρης Ιωάννης
Αναπληρωτής Καθηγητής
Μοριακής Βιολογίας στο Π.Θ.

Μέλη Επιτροπής
Βασιλακάκης Μιλτιάδης
Καθηγητής Δενδροκομίας
στο Α.Π.Θ.

Μαμούρης Ζήσης
Λέκτορας Βιολογίας
στο Π.Θ.

ΒΟΛΟΣ
1996-1998



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 19/Δ

Ημερ. Εισ.: 04-08-2003

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΓΦΖΠ

1998

ΒΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070992

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	1
Περίληψη.....	2
A. Θεωρητικό μέρος.....	3
1. Εισαγωγή - Το φαινόμενο της άνθησης.....	4
2. Μηχανισμός ενδογενούς ελέγχου - νεανικότητα.....	5
2.1. Σχέση των αλλαγών στο ακραίο μερίστωμα με το πέρασμα από τη νεανικότητα (JUVENILITY) στην ωριμότητα (MATURITY)	6
2.2. Το κορυφαίο μερίστωμα ως αποδέκτης θρεπτικών και ορμονών προερχόμενα από το υπόλοιπο φυτό.....	6
3. Μηχανισμός εξωγενούς ελέγχου - περιβάλλον.....	7
3.1. Φωτοπεριοδισμός (PHOTOPERIODISM)	8
3.1.1. Γενικά.....	8
3.1.2. Το φυτόχρωμα.....	9
3.1.3. Ο χρονοδιακόπτης (THE TIMEKEEPER).....	10
3.1.4. Ο φωτοδέκτης (THE PHOTORECEPTOR)	12
3.1.5. Το ανθικό ερέθισμα (THE FLORAL STIMULUS Η υπόθεση της ύπαρξης της φλοριγόνου ορμόνης (FLORIGEN).....	14
3.1.6. Ενδεχόμενα χαρακτηριστικά της ανθικής προτροπής.....	15
3.1.7. Αυτόνομη επαγωγή (AUTONOMOUS INDUCTION).....	16
3.2. Εαρινοποίηση (VERNALIZATION).....	17
3.2.1. Γενικά.....	17
3.2.2. Η φωτοπερίοδος και η εαρινοποίηση μπορεί να αλληλεπιδρούν.....	18
3.2.3. Η πρωτεϊνική σύνθεση εμφανίζεται απαραίτητη για την εαρινοποίηση.....	19
3.3. STRESS.....	20
4. Μηχανισμοί μεταγωγής σημάτων (MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION).....	21
4.1. Γενικά.....	21
4.2. Κυτταρική επικοινωνία στα φυτά (CELLULAR SIGNALLING IN PLANTS).....	22

4.3. Πιθανά συστατικά των μεταγωγικών μονοπατιών των φυτών (POTENTIAL COMPONENTS OF PLANT TRANSDUCTION PATHWAYS).....	23
5. Η άνθιση ως αποτέλεσμα της γονιδιακής δράσης.....	25
5.1. Ανθικά μοντέλα.....	25
5.2. Αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση.....	26
5.2.1. Γονιδιακή έκφραση σχετιζόμενη με την ανθική επαγωγή.....	26
5.2.2. Γονιδιακή έκφραση σχετιζόμενη με την ανθική πρόκληση.....	27
5.3. Τωρινές και μελλοντικές προοπτικές.....	28
B. Υλικά και μέθοδοι.....	29
1. Φυτικό υλικό: Χρυσάνθεμο (CHRYSANTHEMUM SPP.).....	30
1.1. Γενικά - κλιματικές απαιτήσεις.....	30
1.1.1. Κατάταξη ανάλογα με την αντίδραση στο φωτοπεριοδισμό.....	30
1.1.2. Αντίδραση στη θερμοκρασία.....	30
1.2. Βοτανικά χαρακτηριστικά.....	31
1.2.1. Άνθος.....	31
1.2.2. Φύλλα.....	31
2. Μέθοδοι.....	31
2.1. Απομόνωση χλωροπλαστικού (cp) και μιτοχονδριακού (mt) DNA/RNA.....	31
2.1.1. Απομόνωση χλωροπλαστών και του DNA/RNA αυτών από φυτικούς ιστούς (cp DNA/RNA).....	32
2.1.2. Απομόνωση μιτοχονδρίων και του DNA/RNA αυτών από φυτικούς ιστούς (mt DNA/RNA).....	34
2.1.3. Απομόνωση χλωροπλαστικού (cp) και μιτοχονδριακού (mt) DNA /RNA (τροποποιημένη διαδικασία).....	34
2.2. Απομόνωση ολικού DNA.....	35
2.3. Ηλεκτροφόρηση.....	38
2.4. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας για ανίχνευση φθορίζουσών ουσιών (TLC).....	41
2.5. Παρασκευή buffers - διαλυμάτων.....	43
3. Πειραματική διαδικασία.....	46
Γ. Συζήτηση και αποτελέσματα.....	47
Δ. Παράρτημα.....	51
Ε. Βιβλιογραφία.....	69

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πριν από την αναλυτική παρουσίαση της παρούσας εργασίας, οφείλω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους οι οποίοι βοήθησαν ουσιαστικά στην εκπόνηση της.

- ▶ Πρώτον τον αναπληρωτή καθηγητή του Π.Θ. κ. Γούναρη Ιωάννη ο οποίος μέσα από τα μαθήματα που παραδίδει καλλιεργεί το ενδιαφέρον για τα νέα ερωτήματα τα οποία συνεχώς προκύπτουν στον τομέα της γενετικής. Επίσης για την συμπαράσταση που έδειξε όλο αυτό το διάστημα στα πάσης φύσεως προβλήματα τα οποία παρουσιάστηκαν.
- ▶ Τους κυρίους Μαμούρη Ζήση (Λέκτορα Βιολογίας στο Π.Θ.) και Βασιλακάκη Μιλτιάδη (Καθηγητή Δενδροκομίας στο Α.Π.Θ) για την τιμή να συμμετάσχουν στην επιτροπή βαθμολόγησης της παρούσας εργασίας.
- ▶ Τον Dr. Πετρουλέα Βασίλη από το Ινστιτούτο Επιστημών Υλικών «Δημόκριτος», καθώς επίσης και το επιστημονικό προσωπικό του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων (Μ.Α.Ι.Χ) για την εξαγωγή των φασμάτων (υπέρυθρο και μάζας).
- ▶ Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνάδελφο Τσέτσο Βασίλη για τη διαρκή συνεργασία που είχαμε στο διάστημα ενασχόλησης μου με το αντικείμενο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής Φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τη διετία 1996-1997. Στόχος της είναι η παρουσίαση των σημαντικότερων παραμέτρων-βιοχημικών και γενετικών-οι οποίες σχετίζονται με την άνθιση. Δεν περιορίζεται μόνο στην αξιολόγηση-παρουσίαση των μέχρι σήμερα καταγεγραμμένων, στη βιβλιογραφία, δεδομένων.

Με την απομόνωση μιτοχονδριακού, χλωροπλαστικού και ολικού DNA, από φύλλα και άνθη χρυσανθέμων, έγινε προσπάθεια να διερευνηθούν τυχόν διαφορές στο γενετικό υλικό μεταξύ χρυσανθέμων τα οποία έχουν υποστεί συνθήκες η οποίες προκαλούν άνθιση και σε άλλα τα οποία δεν δέχθηκαν ανάλογες συνθήκες.

Τα παραπάνω δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση προκειμένου να καταγραφούν οι τυχόν διαφορές. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν απ' αυτή τη διαδικασία δεν φαίνεται, σε πρώτη φάση τουλάχιστον να είναι αξιοποιήσιμα.

Επίσης έγινε προσπάθεια διερεύνησης των προαναφερθέντων διαφορών με την εφαρμογή της τεχνικής της «χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας». Κατά την εφαρμογή της παραπάνω τεχνικής χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες. Πηγές των προηγούμενων αποτέλεσαν τα άνθη και τα φύλλα από φυτά με άνθη, καθώς επίσης και τα φύλλα από μη ανθισμένα χρυσάνθεμα.

Το αξιοσημείωτο σ' αυτή την περίπτωση είναι η ύπαρξη μιας φθορίζουσας ουσίας στους χλωροπλάστες οι οποίοι προέρχονται από τα φύλλα φυτών τα οποία φέρουν άνθη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της φασματικής ανάλυσης πιθανώς πρόκειται για μια πρωτοταγής αλκοόλη η οποία ενδέχεται να παίζει κάποιο ρόλο στην πρόκληση της άνθισης.



Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΑΝΘΙΣΗΣ

Ρίχνοντας μια ματιά γύρω μας εύκολα θα παρατηρήσουμε μια ιδιαίτερα μεγάλη ποικιλία μεταξύ των διαφόρων ειδών όσο αφορά τη μορφολογία του άνθους. Εκτός όμως απ' αυτό, γίνεται εμφανής και μια έντονη διαφοροποίηση στο πότε και στο πώς τα άνθη μορφοποιούνται κατά τη διάρκεια της ζωής των φυτών. Εδώ τα παραδείγματα είναι πάρα πολλά. Το εύρος της παραπάνω διαφοροποίησης ορίζεται από τη μία από τα φυτά τα οποία ανθίζουν αμέσως μετά την βλάστηση και από την άλλη από εκείνα π.χ bamboo στα οποία προηγείται, της άνθισης, μια ιδιαίτερα παρατεταμένη περίοδο νεανικότητας.

Πέρα όμως απ' αυτή την ποικιλομορφία το ερώτημα το οποίο βρέθηκε στο επίκεντρο των ερευνών τις τελευταίες δεκαετίες είναι το εάν η μετάβαση από την «κατάσταση της μη-άνθισης» στην «κατάσταση της άνθισης» χρησιμοποιεί τα ίδια μονοπάτια (paths) στα διάφορα είδη και αν ναι, ποια είναι αυτά. Το δεύτερο σκέλος της ερώτησης μπορεί να μας απασχολήσει ακόμα και αν η απάντηση στο πρώτο είναι αρνητική.

Είναι σαφές πιστεύουμε, ότι δεν αποτελεί σκοπό αυτής της παραγράφου η αναλυτική παρουσίαση των διεργασιών-προτροπών οι οποίες οδηγούν στην άνθιση. Αντιθέτως στοχεύει στην επιγραμματική παρουσίαση των προσεγγίσεων οι οποίες έχουν γίνει μέχρι σήμερα. Με βάση τα παραπάνω οι προσεγγίσεις που έχουν γίνει μέχρι σήμερα είναι οι εξής:

- ♦ στην πρώτη οι συστατικές διαδικασίες (component processes) στον έλεγχο της άνθισης π.χ. νεανικότητα και φωτοπεριοδική επαγωγή αναλύονται με μεγάλη λεπτομέρεια μαζί με τον τελικό σκοπό της αποκάλυψης των μηχανισμών που «διοικούν» (governing) την κάθε ιδιαίτερη πλευρά αυτού του προβλήματος. Αυτή η προσέγγιση βρίσκεται σε ουσιαστική-στενή συσχέτιση με τις αλλαγές στο επίπεδο της γονιδιακής και της βιοχημικής έκφρασης οι οποίες μελετώνται παράλληλα με την ανθική απόκριση. Σ' αυτή την περίπτωση σημαντικό ρόλο παίζει το πειραματικό σχέδιο-σύστημα το οποίο θα χρησιμοποιηθεί
- ♦ στη δεύτερη η αναζήτηση περιστρέφεται γύρω από την ύπαρξη γενετικής μεταβολής στην ανθική απόκριση μεταξύ των μεμονωμένων ειδών.

Τέλος στο κύριο μέρος της παρούσας εργασίας γίνεται μια παρουσίαση των μέχρι σήμερα κεκτημένων όσο αφορά αυτή καθ' αυτή την ανθική διεργασία, καθώς επίσης και των παραγόντων που την επηρεάζουν. Με το πειραματικό μέρος και τα συμπεράσματα που προέκυψαν

απ' αυτό επιδιώκεται η ενίσχυση-αύξηση των γνώσεων γύρω από το πρόβλημα της άνθισης.

2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΕΑΝΙΚΟΤΗΤΑ

Προκειμένου να καθορίσουμε τη σχέση μεταξύ ενδογενούς μηχανισμού ελέγχου της άνθισης και εξωγενών παραγόντων που επιδρούν σ' αυτή πρέπει να πούμε ότι ο εξωγενής-περιβαντολλογικός έλεγχος της άνθισης βασίζεται σε αναπτυξιακούς παράγοντες που δημιουργούν την ικανότητα στο φυτό να ανθίσει. Αναφερόμενοι σε «μηχανισμό ενδογενούς ελέγχου» της άνθισης, ουσιαστικά αναφερόμαστε στα στάδια της φυσιολογικής ζωής του φυτού τα οποία όπως θα δούμε παρακάτω επιτρέπουν ή όχι την άνθιση.

Η ανάπτυξη στελεχών και η παραγωγή φύλλων είναι απαραίτητα προκειμένου να γίνεται συλλογή φωτός και φωτοσυνθετική αφομείωση από μέρους του φυτού. Μέρος των προϊόντων της φωτοσύνθεσης μεταφέρονται στους σπόρους προκειμένου να εξασφαλισθεί η επόμενη γενεά. Αυτή η απαίτηση, μαζί με τον ανταγωνισμό για πηγές όπως το φως και τα θρεπτικά, δημιουργούν μια εκλεκτική πίεση η οποία δρα προκειμένου να επεκταθεί η βλαστική φάση. *Νεανικότητα είναι το όνομα το οποίο δίδεται στη πρώιμη φάση της αύξησης κατά τη διάρκεια της οποίας δεν μπορεί να εμφανισθεί άνθιση, ανεξαρτήτως των περιβαντολλογικών παραγόντων που θα επιδράσουν στα φυτά.* Η διάρκεια της νεανικής φάσης αποτελεί συστατικό της όλης ανταγωνιστικής στρατηγικής του φυτού και είναι κομμάτι του γενετικού προγράμματος του κάθε είδους. Η διάρκεια της νεανικής φάσης ποικίλει μεταξύ των ξυλωδών (woody) και των ποωδών (herbaceous) ειδών. Στα ξυλώδη η περίοδος της νεανικότητας μπορεί να διαρκέσει μέχρι 30–40 χρόνια π.χ σε κάποια δασικά είδη, αντιθέτως στα ποώδη φυτά σπάνια ξεπερνά τις μερικές μέρες ή εβδομάδες.

Στα ξυλώδη φυτά η ικανότητα για άνθιση συνοδεύεται από αλλαγές στους φυσιολογικούς και μορφολογικούς χαρακτήρες όπως το σχήμα και το πάχος των φύλλων, η παρουσία χρωστικών και τα αποθέματα της ρίζας.

Στα ποώδη φυτά, η φάση της νεανικότητας συχνά χαρακτηρίζεται μόνο από την ανικανότητα της έναρξης της άνθισης, παρόλες τις φυσιολογικά αποτελεσματικές εξωγενείς συνθήκες οι οποίες υπάρχουν.

2. 1. ΣΧΕΣΗ ΤΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΟ ΑΚΡΑΙΟ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑ ΜΕ ΤΟ ΠΕΡΑΣΜΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΝΕΑΝΙΚΟΤΗΤΑ (JUVENILITY) ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΟΤΗΤΑ (MATURITY)

Από τα μέχρι σήμερα ερευνητικά δεδομένα έχει φανεί ότι το πέρασμα από τη νεανικότητα στην ωριμότητα σχετίζεται με γεγονότα τα οποία λαμβάνουν χώρα στο ακραίο μερίστωμα (apex).

Ερωτηματικό αποτελεί ακόμα το εάν η άνθιση προέρχεται σαν απόκριση (response) σε σήμα το οποίο προέρχεται από άλλο σημείο του φυτού. Αποτελέσματα από ορισμένα πειράματα επιβεβαιώνουν το σχέδιο σύμφωνα με το οποίο ορισμένα σήματα μεταφέρονται στο ακραίο μερίστωμα όταν το φυτό αποκτήσει επαρκές μέγεθος, το οποίο είναι ιδιαίτερο για κάθε είδος. Εδώ μπορούμε να σταθούμε στο είδος *Mango magnifera* του οποίου τα νεαρά σπορόφυτα μπορούν να ανθίσουν όταν μεταμοσχευθούν σε ώριμα φυτά. Σε άλλο είδος ανάλογη ενέργεια δεν έχει δώσει τα παραπάνω αποτελέσματα.

2. 2. ΤΟ ΚΟΡΥΦΑΙΟ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑ ΩΣ ΑΠΟΔΕΚΤΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΩΝ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΛΟΙΠΟ ΦΥΤΟ

Η μετάβαση από μέρος του ακραίου μεριστώματος στην ωριμότητα μπορεί να αποδοθεί σε ένα πλήθος από μεταφερόμενους παράγοντες. Σε αρκετά φυτά η έκθεση σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού μπορεί να προκαλέσει είτε επιμήκυνση της νεανικής φάσης είτε επάνοδο σ' αυτή (rejuvenation). Η πιο συνηθισμένη συνέπεια από την έκθεση σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού είναι η ελάττωση της παροχής υδατανθράκων στην κορυφή. Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι η παροχή υδατανθράκων στην κορυφή παίζει κάποιο ρόλο στη μετάβαση από την νεανικότητα στην ωριμότητα. Η πασιφανής σχέση μεταξύ της θρεπτικής κατάστασης και της κατάστασης ωριμότητας είναι η επίδραση που έχει η θρέψη του φυτού στο μέγεθος του ακραίου μεριστώματος. Όπως παρατήρησε ο Cockshull το 1985 στα χρυσάνθεμα δεν ξεκινά η άνθιση πρώτου επιτευχθεί ένα ελάχιστο μέγεθος κορυφής.

Η κορυφή, μαζί με τους υδατάνθρακες και τα άλλα θρεπτικά, δέχεται και μια ποικιλία από ορμονικούς παράγοντες προερχόμενους από το υπόλοιπο φυτό. Το ερώτημα που προκύπτει σ' αυτό το σημείο είναι εάν κάποιος απ' αυτούς τους παράγοντες προάγει την αλλαγή-μετάβαση από την νεανικότητα στην ωριμότητα.

Σύμφωνα με τους Pharis και King (1985) υπάρχει πλήθος πειραματικών μαρτυριών οι οποίες δείχνουν ότι η παροχή γιββεριλλινών

(exogenous GAs) είναι ικανή να προκαλέσει άνθιση σε αρκετά κονωφόρα είδη. Αν και τα κονωφόρα απαιτούν αρκετά χρόνια προκειμένου να εισέλθουν στην ωριμότητα, αυτό έγινε δυνατό στο είδος *Cupressus arizonica*, σε ηλικία 2 μηνών, όταν ψεκάστηκε με γιββεριλλίνες. Η συμμετοχή των γιββεριλλινών στον έλεγχο της άνθισης αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι άλλες μεταχειρίσεις οι οποίες επιτάχυναν την άνθιση στα πεύκα (π.χ υδατική έλλειψη, έλλειψη αζώτου κ.ά) είχαν σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση γιββεριλλινών στο φυτό. Ενώ με τα μέχρι τώρα αναφερθέντα, γύρω από τη δράση των γιββεριλλινών στα κονωφόρα, θα μπορούσαμε να τις χαρακτηρίσουμε σαν παράγοντες ωριμότητας (maturity factor), τα δεδομένα αλλάζουν όσο αφορά το είδος *Hedera helix* και σε μερικά άλλα ξυλώδη είδη. Οι Hackett και Srinivasan το 1985 διαπίστωσαν ότι στα παραπάνω είδη οι GA3 προκαλούν επάνοδο στην κατάσταση ωριμότητας. Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι ο ρόλος των γιββεριλλινών στον έλεγχο της ωριμότητας είναι περίπλοκος και πιθανώς υπόκειται σε αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες.

3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΞΩΓΕΝΟΥΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Είναι γεγονός ότι κάθε πτυχή-συστατικό απ' αυτό που εννοούμε ως περιβάλλον μπορεί να τροποποιήσει την ανθική απόκριση (flowering response). Από την μια πλευρά τα φυτά είναι σε θέση να εκμεταλλευθούν την προβλεψιμότητα που χαρακτηρίζει τις εποχιακές αλλαγές προκειμένου να εξασφαλίσουν την κατάλληλη στιγμή. Ο φωτοπεριουδισμός και η εαρινοποίηση είναι παραδείγματα τέτοιου είδους συμπεριφοράς.

Από την άλλη τα φυτά μπορούν να υιοθετούν μια πιο ευκαιριακή προσέγγιση κατά την οποία η άνθιση ξεκινά από την σπάνια ή απρόβλεπτη εμφάνιση ιδιαίτερων συνθηκών. Το υδατικό ή θερμικό stress σ' ένα ήπιο κλίμα, αλλά και αντίστροφα, η ωφελιμότητα του νερού σε συνθήκες ξηρασίας μπορούν και τα δύο να ξεκινήσουν την άνθιση. Εκτός των προηγούμενων το φως είναι ένας ιδιαίτερα ενδιαφέρον παράγοντας για την άνθιση στα φυτά. Το φως αποτελεί ένα περίπλοκο ερέθισμα (stimulus) το οποίο ποικίλει στη διάρκεια, την ακτινοβολία και την φασματική διανομή, καθένα από τα οποία φαίνεται ότι επιδρά στη άνθιση.

3. 1. ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΙΣΜΟΣ (PHOTOPERIODISM)

3. 1. 1. ΓΕΝΙΚΑ

Σύμφωνα με τον Vince-Prue (1975) η φωτοπερίοδος ίσως είναι η πιο ενδιαφέρουσα μεταβλητή η οποία για τα φυτά συσχετίζεται με την άνθιση τους. Η φωτοπερίοδος, με εξαίρεση την περιοχή του ισημερινού στην οποία παραμένει σταθερή, αλλάζει καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, πάντα προβλεπόμενα. Μ' αυτό τον τρόπο έχουμε στη διάθεση μας ένα αξιόπιστο και αντικειμενικό δείκτη της προόδου των εποχών.

Έτσι λοιπόν με κριτήριο την απόκριση, την οποία εκτιμούμε ότι θα εμφανίσουν τα φυτά, όσο αφορά την άνθιση κάτω από διάφορα μήκη ημέρας, διακρίνουμε τις κάτωθι κατηγορίες φυτών:

→ **Μικρής-ημέρας φυτά (short-day plants, SDP)** είναι εκείνα τα φυτά τα οποία ανθίζουν ή στα οποία επιταχύνεται η άνθιση όταν το μήκος της ημέρας είναι μικρότερο από ένα ιδιαίτερο, για κάθε φυτό, μήκος ημέρας, γνωστό σαν «κριτικό μήκος ημέρας» (critical daylength)

→ **Μεγάλης-ημέρας φυτά (long-day plants, LDP)** είναι εκείνα τα φυτά στα οποία η άνθιση εμφανίζεται ή επιταχύνεται όταν το μήκος της ημέρας υπερβαίνει ένα ιδιαίτερο για κάθε φυτό μήκος ημέρας, το οποίο ομοίως ονομάζεται «κριτικό μήκος ημέρας»

→ **Ουδέτερα φυτά (day-neutral plants, DNP)** είναι εκείνα τα φυτά, στην άνθιση των οποίων δεν επιδρά ο φωτοπεριοδισμός.

Στην παραπάνω κατηγοριοποίηση έγινε χρήση των όρων «μικρή» και «μεγάλη» φωτοπερίοδος γι' αυτό θα ήταν σκόπιμο να τονίσουμε ότι σ' αυτή την περίπτωση οι παραπάνω έννοιες δεν έχουν απόλυτη σημασία. Κυρίως αναφέρονται στη σχέση μεταξύ των απαιτήσεων των φυτών και της κριτικής διάρκειας ημέρας. Τα παραπάνω γίνονται κατανοητά στο παράδειγμα που ακολουθεί: το είδος *Xanthium strumarium* είναι ένα μικρής ημέρας φυτό με κριτική διάρκεια ημέρας 15-16 ώρες. Το είδος *Hyoscyamus niger* είναι ένα μεγάλης ημέρας φυτό με κριτική διάρκεια ημέρας 11 ώρες. Έστω ότι έχουμε διάρκεια φωτεινής περιόδου (διάρκεια ημέρας) 13 ώρες. Αυτές οι συνθήκες για το πρώτο είδος αποτελούν συνθήκες «μικρής ημέρας», ενώ για το δεύτερο, συνθήκες «μεγάλης ημέρας», με αποτέλεσμα και στα δύο είδη να ευνοείται η εγκατάσταση ανθικών καταβολών. Εδώ πρέπει να προσ-

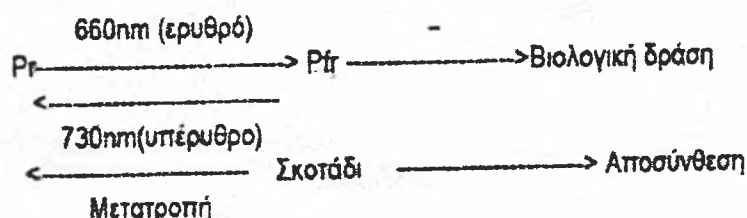
θέσουμε ότι ο φωτοπεριοδισμός επηρεάζεται και από τη θερμοκρασία. Έτσι για συγκεκριμένη θερμοκρασία τα φυτά μπορεί να είναι φωτοουδέτερα ή φωτοευαίσθητα. Το κριτικό μήκος ημέρας επηρεάζεται από την ηλικία, την καλλιέργεια, τη θερμοκρασία και την ένταση της ακτινοβολίας. Επίσης ο αριθμός των επαγωγικών ημερών μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας των φυτών.

Όσο αφορά την θέση πάνω στο φυτό στην οποία γίνεται αντιληπτό το μήκος-διάρκεια της φωτεινής περιόδου είναι γενικά αποδεκτό πως αυτή βρίσκεται στα φύλλα. Αρχικά η παραπάνω άποψη επιβεβαιώθηκε από τον Knott το 1934, ο οποίος παρατήρησε ότι προκλήθηκε εγκατάσταση ανθικού μεριστώματος έχοντας εκθέσει μόνο τα φύλλα του *Spinacia oleracea* (LDP) σε συνθήκες μεγάλης ημέρας. Το 1969 ο Zeenaart προχώρησε την παραπάνω διαπίστωση παρατηρώντας ότι τα φύλλα της *Perilla*, τα οποία έχουν δεχθεί ευνοϊκές συνθήκες για άνθιση, όταν μεταμοσχευθούν σε φυτό το οποίο διατηρείται σε μη-ευνοϊκές συνθήκες για άνθιση, προκαλούν την άνθιση του τελευταίου. Ολοκληρώνοντας τη γενική αναφορά στην φωτοπερίοδο πρέπει να τονισθεί ότι τα φυτά προκειμένου να ανταποκρίνονται στα διάφορα μήκη της φωτεινής περιόδου πρέπει να έχουν την ικανότητα να συσχετίζουν την αλλαγή από το φως στο σκοτάδι και αντίστροφα μ' ένα εσωτερικό ρολόι (an internal clock). Θεωρητικά ένας **φωτουποδοχέας (photoreceptor)** και ένας **χρονοδιακόπτης (timekeeper)** είναι τα απαραίτητα αλλά και επαρκή συστατικά για έναν μηχανισμό ευαίσθητο στη διάρκεια της ημέρας. Η σύνθεση και λειτουργία των παραπάνω συστατικών είναι προβλήματα που θα προσπαθήσουμε πρωτόλεια να μελετήσουμε παρακάτω.

3. 1. 2. ΤΟ ΦΥΤΟΧΡΩΜΑ

Σ' αυτό το σημείο κρίνεται σκόπιμο να αναφέρουμε κάποια γενικά στοιχεία γύρω από το φυτόχρωμα προκειμένου να γίνουν κατανοητά αυτά που θα ακολουθήσουν. Σε κάθε φωτομορφογένεση (κάθε επίδραση του φωτός στη μορφολογία και τη φυσιολογία του φυτού με τελικό αποτέλεσμα τον καθορισμό της αύξησης –ανάπτυξης κυττάρου, ιστού, οργάνου ή ολόκληρου του φυτού) πρέπει να υπάρχει μια χρωστική ουσία-δέκτης του φωτός (ενέργεια) που να διεγείρει στη συνέχεια την αντίστοιχη φυσιολογική διεργασία. Μελέτες με τη βλάστηση των σπόρων, την ανθοφορία, τους τροπισμούς κ.ά απέδειξαν ότι η χρωστική που χρησιμεύει σαν δέκτης του φωτισμού στο φυτό και η οποία είναι υπεύθυνη για τις διάφορες φωτομορφογενέσεις, είναι το **φυτόχρωμα**.

Το φυτόχρωμα είναι μια υδατοδιαλυτή, κυανωπή χρωμοπρωτεΐνη που συναντάται σε πολύ μικρές ποσότητες σε όλα σχεδόν τα αυτότροφα φυτά (φύκη, βρυόφυτα, γυμνόσπερμα, αγγειόσπερμα). Με βάση το φάσμα απορρόφησης του φωτός και τη βιολογική δράση το μόριο του φυτοχρώματος υπάρχει σε δύο μορφές: τη μορφή P_r βιολογικά ανενεργή και με μέγιστο απορρόφησης στην περιοχή του ερυθρού (στα 660nm) και τη μορφή P_{fr} βιολογικά δραστική με μέγιστο απορρόφησης στο υπέρυθρο (στα 730nm). Η σχέση ανάμεσα στις δύο αυτές μορφές καθώς και η επίδραση σ' αυτές του φωτός φαίνονται παρακάτω:



Στα ανώτερα φυτά το φυτόχρωμα ανιχνεύθηκε στις ρίζες, στις κολεοπτίλες, στους βλαστούς, στις κοτυλιδόνες, στους μίσχους, στα φύλλα, στους βλαστοφόρους και ανθοφόρους οφθαλμούς, στους σπόρους και τέλος στους καρπούς. Γενικά το φυτόχρωμα βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα μεριστώματα βλαστού και ρίζας καθώς και σε παρεγχυματικά κύτταρα στην κολεοπτίλη. Στο επίπεδο του κυττάρου δεν είναι ακόμα γνωστό εάν εντοπίζεται στο κυττόπλασμα, στα μιτοχόνδρια, στον πυρήνα ή στις μεμβράνες.

3. 1. 3. Ο ΧΡΟΝΟΔΙΑΚΟΠΤΗΣ (THE TIMEKEEPER)

Με σκοπό να είναι αποτελεσματικός στην καθιέρωση της στιγμής-συγκυρίας του έτους κατά την οποία έχουμε αλλαγές στη διάρκεια της φωτεινής περιόδου, ο μηχανισμός του χρονοδιακόπτη πρέπει να είναι ακριβής και σχετικά ανεξάρτητος από τη θερμοκρασία. Το 1960 προτάθηκε από τον Hendricks ότι η επαναστροφή στο μαύρο στο φυτόχρωμα (από P_{fr} στη P_r) σχημάτιζε το μέσο δια του οποίου τα φυτά μετράνε τη διάρκεια της σκοτεινής περιόδου με τη χρήση ενός «μηχανισμού κλεψύδρας» (hour-glass). Τμήμα-μέρος του παραπάνω προβληματισμού αποτέλεσαν και οι επιδράσεις που θα ασκήσει η παρεμβολή μιας φωτεινής περιόδου κατά τη διάρκεια μιας σκοτεινής περιόδου. (πίνακας 1)

Αποτέλεσμα της παραπάνω κατάστασης είναι να αποτρέπεται η άνθιση προκαλώντας φωτοχημικό σχηματισμό Pfr ή προλαμβάνοντας την πτώση του Pfr κάτω από τα επίπεδα που επιτρέπεται η άνθιση. Τα παραπάνω όπως γίνονται σαφή και από τον πίνακα 1, αναφέρονται στα φυτά «μικρής ημέρας». Συμπληρωματικά στα παραπάνω πρέπει να αναφερθεί ότι στιγμιαία πτώση των επιπέδων Pfr στην αρχή της σκοτεινής περιόδου με την εφαρμογή υπέρυθρου φωτός έχει μόνο μικρή επίδραση στη μέτρηση της σκοτεινής περιόδου (Takimoto και Hammer, 1965, Lumsden και Vince-Prue, 1984). (πίνακας 2)

Επίσης αρκετά πειράματα έδειξαν ότι το φυτόχρωμα δεν αποτελεί τον χρονοδιακόπτη του φωτοπεριοδισμού αλλά όπως θα δούμε παρακάτω το φυτόχρωμα αλληλεπιδρά με τον χρονοδιακόπτη.

Σύμφωνα με τους Brady(1982) και Sweeny(1987) οι οργανισμοί υπόκεινται σε ημερήσιους κύκλους φωτός και σκότους. Επίσης διατυπώθηκε η άποψη ότι τα φυτά και τα ζώα παρουσιάζουν μια ρυθμική συμπεριφορά σχετικά με τις παραπάνω εναλλαγές. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι αυτοί οι ρυθμοί εμφανίζονται – για κάποιο χρονικό διάστημα – ακόμα και μετά τη μεταφορά τους από το καθεστώς των ημερήσιων κύκλων σε καθεστώς διαρκούς σκότους ή χαμηλής έντασης φωτισμού. Η περίοδος του ρυθμού είναι 24 ώρες και το όνομα αυτού «κιρκάδιος».

Η παρατήρηση ότι οι ρυθμοί αυτοί εξακολουθούν να εμφανίζονται ακόμα και όταν παυθεί η περιοδική εναλλαγή σκότους–φωτός μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μία διαμεσολαβούμενη–από έναν ενδογενή αυτοδιατηρούμενο βηματοδότη–απόκριση στη παρουσία ή απουσία φωτός. Αυτόν τον «βηματοδότη» μπορούμε να τον ονομάσουμε «ενδογενή ταλαντωτή–ρολόι». Ο Lumsden το 1991 ισχυρίστηκε ότι η μέτρηση του χρόνου μπορεί να γίνεται στηριζόμενη σ' ένα «κιρκάδιο ρυθμό» της φωτοευαισθησίας. Η κυκλική εναλλαγή φάσεων μιας δραστηριότητας με περίοδο 24 ωρών κάτω από σταθερές περιβαλλοντολογικές συνθήκες είναι πολύ διαδεδομένη στη φύση. Στα φυτά στα οποία έχουμε ποιοτικής φύσεως απαιτήσεις, όσο αφορά τη διάρκεια της φωτεινής περιόδου στην άνθιση, μπορεί να εμφανισθεί μια ρυθμική αλλαγή στην ευαισθησία στο φως. Στα «μικρής ημέρας» φυτά όπως τα είδη *Chenopodium rubrum*, *Pharbitis nil*, *Chrysanthemum*, *Glycine max* η προαναφερθείσα ρυθμικότητα μπορεί να φανεί κατά τη διακοπή μιας μακράς σκοτεινής περιόδου με μικρούς φωτεινούς παλμούς ή σήματα σε διάφορες στιγμές. Τέλος ο ρυθμός παρατηρήθηκε ότι έχει μια ελεύθερα κυμαινόμενη περίοδο γύρω στις 24 ώρες, είναι ανεπηρέαστος από τη θερμοκρασία και μπορεί να διορθώνεται ή να ξαναρχίζει κάθε μέρα μ' ένα μικρό φωτεινό

σήμα (Thomas και Vince-Prue, 1984). Όλα τα παραπάνω αποτελούν διαγνωστικά χαρακτηριστικά των κερκάδιων ρυθμών.

3. 1. 4. Ο ΦΩΤΟΔΕΚΤΗΣ (THE PHOTORECEPTOR)

Πριν μας απασχολήσει αυτός καθ' αυτός ο φωτοδέκτης θα ήτανε σκόπιμο να γίνει αντιληπτός ο ρόλος του φωτός στην φωτοπεριοδική επαγωγή (photoperiodic induction). Το πρόβλημα περιπλέκεται από τη στιγμή κατά την οποία δεν μπορούμε να δεχθούμε ότι ένας απλός μηχανισμός είναι υπεύθυνος για την αντίληψη του μήκους της φωτεινής περιόδου. Το 1983 ο Vince-Prue ταξινόμησε τα φυτά ως εξής:

- ◆ **φωτο-κυρίαρχα φυτά (light-dominant)** στα οποία οι φωτεινές συνθήκες κατά τη διάρκεια της φωτοπεριόδου έχουν δυναμική επίδραση στην ανθική απόκριση. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν κυρίως τα φυτά «μεγάλης ημέρας»
- ◆ **σκοτο-κυρίαρχα φυτά (dark-dominant)** στα οποία το μήκος της σκοτεινής περιόδου είναι ο αποφασιστικός παράγοντας, ενώ οι φωτεινές συνθήκες έχουν σχετικά μικρή επίδραση. Η πλειοψηφία των «μικρής ημέρας» φυτών ανήκουν σ' αυτή την κατηγορία.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι συνθήκες φωτισμού κατά τη διάρκεια της φωτοπεριόδου των φωτο-κυρίαρχων φυτών είναι ιδιαίτερα κρίσιμες. Όταν οι μικρές ημέρες επεκτείνονται σε μεγάλες και το φως διαφοροποιείται και ποιοτικά τότε οι επιδράσεις γίνονται ορατές π.χ φως πλούσιο σε υπέρυθρο (far red) επιδρά πιο αποτελεσματικά στην προαγωγή της άνθισης.

Αναφερθήκαμε σε προηγούμενη παράγραφο για τα διαλείμματα σκότους και την επίδραση τους. Πιο συγκεκριμένα στην περιοχή 640–660nm εμφανίζονται τα μέγιστα για το λειτουργικό φάσμα τόσο στα μικρής όσο και στα μεγάλης ημέρας φυτά. Αντιθέτως στα 730nm εμφανίζει μέγιστα η αντιστροφή του νυκτερινού διαλλείματος. Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι το φυτόχρωμα αποτελεί το φωτοδέκτη. Το λειτουργικό φάσμα για τα φυτά μεγάλης ημέρας, προκειμένου να προαχθεί η άνθιση, εμφανίζει μέγιστα κοντά στα 710–720nm. Σ' αυτό το διάστημα εμφανίζεται το λειτουργικό μέγιστο της «υψηλής έντασης απόκρισης» (HIR) του φυτοχρώματος στα στερούμενα χλωροφύλλη (etiolated) φυτάρια. Σύμφωνα με τους Carr-Smith et. al. (1989) το λειτουργικό φάσμα για την επιμήκυνση της ημέρας στο σιτάρι εμφανίζει μέγιστα στα 600nm και στα 720nm. Από τους ίδιους έγιναν μετρήσεις με ανοσοκαθίζηση. Απ' αυτές προκύπτει ότι το μέγιστο στα 720nm σχετίζεται με το επίπεδο του τύπου I φυτοχρώματος

Pfr. Ομοίως από τα τελευταία προκύπτει ότι το φυτόχρωμα είναι ο φωτοδέκτης. Επίσης είναι πιθανόν να εμπλέκονται τόσο το φωτοσταθερό όσο και το ασταθές φυτόχρωμα.

Από το 1985 οι Herler και Wagne έχουν διατυπώσει την άποψη ότι το φυτόχρωμα επιδρά σε διάφορες φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες. Ενισχυτικά στο παραπάνω οι Roux et. al. (1981) παρατήρησαν ότι το Pfr ενισχύει την εκροή ιόντων Ca^{+2} από μεμονομένα μιτοχόνδρια καθώς επίσης την εισροή ιόντων Ca^{+2} κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης όπως είχαν ήδη διαπιστώσει οι Dreyer και Weisenseel (1979).

Σύμφωνα με ένα άλλο μοντέλο (Goto et. al, 1985) ένας αυτοδιατηρούμενος κερκάδιος ταλαντωτής ενεργοποιείται από μια φωτοεξαρτημένη κινητοποίηση ιόντων Ca^{+2} με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπλόκου Ca^{+2} -καλμοδουλίνη. Κατόπιν το σύμπλοκο Ca^{+2} -καλμοδουλίνη ενδέχεται να συμμετέχει σε διάφορα μοριακά γεγονότα τα οποία αποτελούν τη βάση για τη δράση αυξητικών ουσιών (Kelly, 1984, Dieter, 1984). Ακόμη γνωρίζουμε ότι ενεργοποιεί έναν αριθμό ενζύμων π.χ πρωτείνες, κινάσες κ.ά. Σ' αυτό το σημείο πρέπει να σταθούμε σε δύο παρατηρήσεις:

- ♦ το σύμπλοκο Ca^{+2} -καλμοδουλίνη ενεργοποίησε τη φωσφορυλίωση μιας H^{+} -ΑΤΡασης σε ρίζες καλαμποκιού (Zocchi et. al, 1983) και
- ♦ κατά τη διάρκεια της παρεμπόδισης του ανοίγματος των στομάτων από αμπισικό οξύ υπάρχει ανάγκη για ιόντα Ca^{+2} (DeSilva et. al, 1985).

Φαίνεται ότι τόσο οι κινήσεις των φύλλων όσο και οι στοματικές αποκρίσεις λειτουργούν με ροή ιόντων σχετιζόμενη με H^{+} -αντλίες. Έτσι πιθανώς να υπάρχει ένας κοινός μηχανισμός που να εμπλέκει τα ιόντα Ca^{+2} και καλμοδουλίνης στο «κερκάδιο» σύστημα μέτρησης χρόνου στα φυτά.

Τελειώνοντας πρέπει να αναφέρουμε ότι ο Mohr από το 1972 διαπίστωσε ότι το φυτόχρωμα μπορεί να δράσει στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης. Αυτό που παραμένει αναπάντητο είναι το εάν η δράση του φυτοχρώματος είναι άμεση ή έμμεση, μιας και είναι σε θέση να επιδρά στην κατάσταση των κυτταρικών μεμβρανών η οποία κατόπιν οδηγεί σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης (Marpe, 1977). Σύμφωνα με τους Thomas και Vince-Prue (1984) τα σκοτο-κυρίαρχα/ μικρής ημέρας φυτά, ιδιαίτερα όταν μία μικρή ημέρα επάγει την άνθιση, αντιπροσωπεύουν το απλούστερο και συνεπώς το καλύτερα χαρακτηριζόμενο σύστημα. Το είδος *Pharbitis nil* αποτελεί το πιο έντονα μελετημένο «μικρής ημέρας» φυτό. Τα δεδομένα που προέρχονται απ' αυτό γύρω απ' τη φωτοπεριοδική ευαισθησία μπορούν να φανούν καθα-

ρά στις κοτυληδόνες ενός σκοτο-αυξανόμενου σπορόφυτου, έτσι καθίσταται ικανή η χλωροφύλλη και οι άλλες χρωστικές της φωτοσύνθεσης να εξαλειφθούν σαν φωτοπεριοδικοί αισθητήρες φωτός.

3. 1. 5. ΤΟ ΑΝΘΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ (THE FLORAL STIMULUS) – Η ΥΠΟΘΕΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΦΛΟΡΙΓΟΝΟΥ ΟΡΜΟΝΗΣ (FLORIGEN)

Η διάρκεια της φωτεινής περιόδου γίνεται αντιληπτή στα φύλλα και στην περίπτωση που αυτή είναι ευνοϊκή, μια αλληλουχία-ακολουθία από γεγονότα προκαλούν αλλαγές στο ακραίο μερίστωμα. Το 1936 ο Chailakhayan (USSR) συμπέρανε από την παραπάνω άποψη ότι η άνθιση λαμβάνει χώρα στο ακραίο μερίστωμα (apex) σαν απόκριση σε μια μεταβιβάσιμη προτροπή η οποία δημιουργήθηκε στα φύλλα. Θέλοντας να ονοματίσει αυτή την προτροπή δημιούργησε τον όρο «florigen» (φλοριγόνο). Έτσι αφού η παραγωγή του βιοχημικού σήματος γίνεται στα φύλλα και οι αποδέκτες αυτών των σημάτων βρίσκονται σε απομακρυσμένες περιοχές, όπως τα μεριστώματα, κρίνεται σωστή η άποψη η οποία θεωρεί το φλοριγόνο-ανθική ορμόνη και στο βαθμό που επιβεβαιωθεί πειραματικά, την άνθιση αποτέλεσμα ορμονικής δραστηριότητας.

Σε αρκετά πειράματα έχει φανεί ότι πρέπει να υπάρχει ένα ή περισσότερα κοινά-μονοπάτια τα οποία οδηγούν στην άνθιση. Σ' αυτά τα πειράματα είχαμε τόσο εμβολιασμούς μεταξύ φυτών με διαφορετικές φωτοπεριοδικές απαιτήσεις (Lang, 1965) όσο και φωτοουδέτερων ποικιλιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτό που έχει επικρατήσει σαν φλοριγόνο αποτελεί το τελικό προϊόν σε πολλά είδη, πράγμα το οποίο γίνεται αντιληπτό από μεταδόσεις του ανθικού ερεθίσματος που έχουν επιτευχθεί μέσω εμβολιασμών εντός ή όχι σε είδη, γένη και οικογένειες.

Οι μέχρι τα σήμερα έντονες προσπάθειες για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό αυτής της υποθετικής ορμόνης δεν έχουν δώσει αποτελέσματα. Οι προσπάθειες αυτές κινήθηκαν στις εξής κατευθύνσεις:

- i) δημιουργία εκχυλίσματος από επαγμένο φυτικό ιστό (induced leaf tissue) και έλεγχος για τη δυνατότητα μεταφοράς της ανθικής ικανότητας σε μη-επαγμένα φυτά καθώς επίσης
- ii) εκχύλιση και ανάλυση χυμού φλοιώματος από επαγμένα φυτά.

Σε ορισμένες μελέτες, τα εκχυλίσματα σε μία από τις παραπάνω πηγές, αναφέρεται ότι επάγουν την άνθιση στα προς εξέταση φυτά. Τα αποτελέσματα αυτά, σύμφωνα με τις ίδιες μελέτες, δεν αναπαράγονται με συνέπεια (Zeevat και Boyer, 1987).

Επίσης πρέπει να αναφέρουμε ότι μαρτυρίες από πειράματα με μοσχεύματα και από μελέτες γύρω από τη φυσιολογία αναφέρουν ότι αρκεί ένα πολύ μικρό ποσοστό της συνολικής φυλλικής μάζας το οποίο θα είναι επαγώμενο προκειμένου να έχουμε ανθική επαγωγή. Ακόμα είναι γνωστό ότι φύλλα σε μη επαγωγικές συνθήκες ασκούν μια αποτρεπτική επίδραση στην άνθιση τόσο στα μικρής όσο και στα μεγάλης ημέρας φυτά (Lang και Melchers, 1943, Thompson και Gutteridge, 1960). Προσπάθειες για απομόνωση ενός ιδιαίτερου «μοσχευματικού μεταβιβάσιμου αποτροπαία» (graft-transmissible inhibitor) της άνθισης(ή antiflorigen) στάθηκαν ανεπιτυχείς. Γι' αυτό κάθε υπόθεση γύρω από το φλοριγόνο πρέπει να κρατά μια ισορροπία μεταξύ των προωθητών και των ανασταλτών της άνθισης. Μέχρι τα σήμερα, παρόλο που τα ουσιαστικά δεδομένα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ένας μεταφερόμενος παράγοντας ρυθμίζει την άνθιση δεν είμαστε σε θέση να τοποθετηθούμε γύρω από τη φύση και την ουσία του.

3. 1. 6. ΕΝΔΕΧΟΜΕΝΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΝΘΙΚΗΣ ΠΡΟΤΡΟΠΗΣ

Σύμφωνα με τον Bernier (1988) η μετάβαση στην άνθιση μπορεί να περιλαμβάνει ένα πολύπλοκο σύστημα αλληλεπιδρώντων παραγόντων μεταξύ των οποίων είναι οι υδρογονάνθρακες, οι γιββεριλλίνες και οι κυτοκινίνες. Ορισμένοι απ' αυτούς τους παράγοντες μπορούν να δρουν αλυσιδωτά, αφότου ορισμένες κυτταρικές αλλαγές εμφανίζονται και πριν η ανθική προτροπή φτάσει στο ακραίο μερίστωμα (apex). Πρέπει όμως να γνωρίζουμε ότι ορισμένες φορές, αλλαγές οι οποίες συνδέονται με την άνθιση, μπορούν να προκληθούν από μεταχειρήσεις οι οποίες από μόνες τους δεν προκαλούν ανθική εγκατάσταση. Για παράδειγμα μπορούμε να αναφέρουμε ότι ένα από τα πιο πρώιμα γεγονότα που έχει παρατηρηθεί στο ακραίο βλαστικό μερίστωμα, ακολουθώντας τη φωτοπεριοδική επαγωγή, είναι η παροδική αύξηση του αριθμού των κυττάρων που υφίστανται μίτωση. Όταν στο ακραίο στελεχικό μερίστωμα του είδους *Sinapis alba* (LDP) παρέχονται κυτοκινίνες στο ακραίο στελεχικό μερίστωμα (stem apex), παρατηρείται αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας όμοια μ' αυτή που εντοπίζεται μετά από την έκθεση σε συνθήκες μεγάλης ημέρας. Οπωσδήποτε οι συνθήκες μεγάλης ημέρας επάγουν την άνθιση, δεν συμβαίνει όμως το ίδιο και με την επίδραση της κυτοκινίνης. Η κυτοκινίνη μπορεί να αποτελεί συστατικό της ανθικής προτροπής, αν και κρίνεται ανεπαρκής για να προκαλέσει άνθιση. Στο βαθμό που η ανθική προτροπή έχει περισσότερα του ενός συστατικά, τότε είναι πι-

θανή η ύπαρξη ορισμένων εξ' αυτών και σε συνθήκες που δεν επιτρέπουν την άνθιση.

Αυτό εξηγείται από το μεγάλο εύρος ουσιών και συνθηκών οι οποίες προκαλούν άνθιση. Τελειώνοντας την αναφορά στην ανθική προτροπή πρέπει να αναφερθεί ότι από πειράματα πάνω στη φυσιολογία της άνθισης φάνηκε ότι η προτροπή που εξάγεται από τα επαγόμενα φυτά έχει ιδιαίτερες ιδιότητες. Έτσι λοιπόν παραμένει πεδίο προς διερεύνηση η βιοχημική βάση της ανθικής επαγωγής.

3. 1. 7. ΑΥΤΟΝΟΜΗ ΕΠΑΓΩΓΗ (AUTONOMUS INDUCTION)

Από το 1936 ο Gregory εισηγήθηκε ότι το φυσιολογικό μονοπάτι της φυτικής ανάπτυξης είναι προς την άνθιση, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι οι μηχανισμοί ελέγχου πρωταρχικά δρουν προκειμένου να καθυστερήσουν την ανθική εγκατάσταση. Μέρος του παραπάνω σχεδίου είναι πως τα φυτά υφίστανται μια βαθμιδωτή πρόοδο προς την ανθική εγκατάσταση όσο μεγαλώνουν ηλικιακά. Για παράδειγμα μπορούμε να αναφέρουμε ότι στο είδος *Arabidopsis thaliana* η άνθιση επιταχύνεται σε συνθήκες μεγάλης ημέρας, αλλά ο αριθμός των απαιτούμενων μεγάλων ημερών για κορεσμένη επαγωγή (saturate induction) μειώνεται με την ηλικία των φυτών. Επίσης η ανθική εγκατάσταση θα λάβει χώρα εντός πέντε εβδομάδων από τη βλάστηση, όπως συμβαίνει και στα φυτά μικρής ημέρας. Για την κατανόηση των προηγούμενων βοηθά το διάγραμμα 1.

Εδώ όμως προκύπτει το ερώτημα εάν η επιτάχυνση της άνθισης σε συνθήκες μεγάλης ημέρας δρα διαμέσο του ίδιου μηχανισμού όπως τελικά η άνθιση σε συνθήκες μικρής ημέρας. Πιο απλά το ερώτημα είναι εάν η φωτοπεριοδική και η αυτόνομη επαγωγή δρουν διαμέσο του ίδιου μηχανισμού. Η φωτοπεριοδική επαγωγή, όπως είδαμε παραπάνω, εδράζεται στα φύλλα και έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταβίβαση σήματος στο ακραίο μερίστωμα. Μ' αυτό τον τρόπο η άνθιση κάτω από συνθήκες μικρής ημέρας μπορεί να περιλαμβάνει τις ίδιες αλλαγές στα φύλλα οι οποίες στα νεότερα φυτά είναι εξαρτώμενες από τις επαγωγικές φωτοπεριόδους. Σ' αυτή την περίπτωση η επαγωγή μπορεί να θεωρηθεί αυτόνομη, όταν εμφανισθεί στις μικρές ημέρες. Εναλλακτικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι η απώλεια της φωτοπεριοδικής εξάρτησης για την άνθιση μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στο ακραίο μερίστωμα κατά την πρόοδο προς την γήρανση. Τελειώνοντας πρέπει να αναφέρουμε ότι πειράματα τα οποία περιελάμβαναν εμβολιασμό (grafting) από θεωρητικά αυτόνομα επαγόμενα φύλλα δεν μπόρεσαν να καταλήξουν για το θέμα αυτό. Άρα η απόφαση πρέπει να περιμένει

την αναγνώριση από μοριακούς δείκτες για επαγωγή εάν αυτοί μπορούν να απομονωθούν.

3. 2. ΕΑΡΙΝΟΠΟΙΗΣΗ (VERNALIZATION)

3. 2. 1. ΓΕΝΙΚΑ

Η εαρινοποίηση είναι μια διαδικασία διαμέσο της οποίας προάγεται η άνθιση με την εφαρμογή χαμηλών θερμοκρασιών (cold treatment) σε σπόρους οι οποίοι έχουν απορροφήσει νερό ή σε αναπτυσσόμενα φυτά. Σπόροι οι οποίοι δεν έχουν την απαραίτητη υγρασία (dry seeds) δεν ανταποκρίνονται στην εφαρμογή χαμηλών θερμοκρασιών. Η θερμοκρασία ως γνωστών έχει άμεσα αποτελέσματα στην ανθική εγκατάσταση (floral initiation) σε ορισμένα φυτά, τα οποία όμως είναι διακριτά από την εαρινοποίηση, η οποία όπως και ο φωτοπεριοδισμός είναι ένα επαγωγικό φαινόμενο (inductive phenomenon) το οποίο επιφέρει την άνθιση μετά από μία περίοδο εφαρμογής χαμηλών θερμοκρασιών. Χωρίς την προαναφερόμενη κρύα μεταχείριση, στα φυτά που απαιτούν εαρινοποίηση, είτε αναβάλλεται η άνθιση είτε παραμένουν στη βλαστική φάση. Σε πολλές περιπτώσεις αυτά τα φυτά αναπτύσσονται σαν ροζέτες χωρίς να παρατηρείται επιμήκυνση.

Μεταξύ των φυτών υπάρχει μια διάκριση στη βάση τότε το κάθε φυτό γίνεται ευαίσθητο για εαρινοποίηση. Τα ετήσια χειμερινά είδη όπως τα ετήσια χειμερινά σιτηρά (σπέρνονται το φθινόπωρο, ανθίζουν το επόμενο καλοκαίρι) ανταποκρίνονται στις χαμηλές θερμοκρασίες πολύ νωρίς κατά τη διάρκεια του κύκλου της ζωής τους. Μπορούν να εαρινοποιηθούν πριν από τη βλάστηση αρκεί οι σπόροι να έχουν διαβραχεί. Υπάρχει και μια άλλη κατηγορία φυτών στην οποία κατά κύριο λόγο ανήκουν τα διετή (biennials), τα οποία αναπτύσσονται σαν ροζέτες την πρώτη περίοδο μετά τη σπορά και ανθίζουν το επόμενο καλοκαίρι. Στα φυτά τα οποία ανήκουν στην παραπάνω κατηγορία, η επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών, προκειμένου να εαρινοποιηθούν, αρχίζει αφού πρώτα έχουν αποκτήσει ένα ελάχιστο μέγεθος.

Η αποτελεσματικότερη τάξη θερμοκρασιών για εαρινοποίηση είναι από θερμοκρασίες οι οποίες βρίσκονται λίγο κάτω από τους 0°C έως τους 10°C. Μέσα στο παραπάνω θερμοκρασιακό εύρος υπάρχει το βέλτιστο, για εαρινοποίηση, θερμοκρασιακό εύρος το οποίο κυμαίνεται από 1°C έως 7°C (Lang, 1965). Το αποτέλεσμα από την κρύα μεταχείριση αυξάνει με την αύξηση της διάρκειας της, μέχρι που η απόκριση από μέρους του φυτού ολοκληρωθεί (is saturated). Η απόκριση

από μέρους του φυτού συνήθως απαιτεί μερικές εβδομάδες έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η ακριβής διάρκεια του παραπάνω διαστήματος ποικίλει ευρέως μεταξύ των ειδών και των ποικιλιών. Τα αποτελέσματα της εαρινοποίησης μπορούν να χαθούν στην περίπτωση που επικρατήσουν συνθήκες αποεαρινοποίησης (devernalizing conditions) όπως οι υψηλές θερμοκρασίες. Αντίθετα προς την προηγούμενη περίοδο δρα η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες οι οποίες σταθεροποιούν τα αποτελέσματα της εαρινοποίησης.

Όσο αφορά το που λαμβάνει χώρα η εαρινοποίηση οι Thomas και Vince-Prue το 1984 διατύπωσαν την άποψη ότι αυτή πραγματοποιείται στην ακραία μεριστωματική ζώνη της νέας βλάστησης. Περιορίζοντας την κρύα μεταχείριση παρατηρήθηκε άνθιση μόνο όταν το ακραίο μερίστωμα του στελέχους ψύχθηκε. Η παραπάνω διαπίστωση εμφανίζεται ιδιαίτερα ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία του υπόλοιπου φυτού. Επίσης τεμαχίζοντας την άκρη της νέας βλάστησης πραγματοποιείται μια επιτυχημένη εαρινοποίηση. Όπου δε η εαρινοποίηση των σπόρων είναι πιθανή, τεμάχια από έμβρυα αποτελούμενα από κορυφές της νέας βλάστησης είναι ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες.

3. 2. 2. Η ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΟΣ ΚΑΙ Η ΕΑΡΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ

Ο Napp-Zinn το 1984 διετύπωσε την άποψη ότι η απαίτηση για εαρίνοποίηση είναι συχνά συνδεδεμένη με την απαίτηση για μια ιδιαίτερη φωτοπερίοδος. Ο πιο κοινός συνδυασμός των δύο παραπάνω παραμέτρων είναι η απαίτηση για κρύα μεταχείριση ακολουθούμενη από την απαίτηση για μεγάλες ημέρες. Ο προηγούμενος συνδυασμός είναι αυτός που προκαλεί άνθιση στα μεγάλα γεωγραφικά πλάτη.

Όσο αφορά τη θέση της εαρίνοποίησης στην ακολουθία των γεγονότων τα οποία οδηγούν στην άνθιση, δύο τύποι αλληλεπίδρασης μεταξύ των απαιτήσεων της εαρινοποίησης και του μήκους της ημέρας εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Πιο συγκεκριμένα:

✓ στο διετή τύπο του είδους *Hyoscyamus niger* στα νεαρά φυτά μπορούμε να έχουμε φωτοπεριοδική εγκατάσταση-επαγωγή από μεγάλες ημέρες ΜΟΝΟ αφού πρώτα έχουν δεχθεί επτά ημέρες χαμηλών θερμοκρασιών. Από το παράδειγμα με τα νεαρά φυτά του είδους *Hyoscyamus niger* προκύπτει ότι η εαρινοποίηση αποτελεί το προηγούμενο βήμα, της φωτοπεριοδικής εγκατάστασης στα φύλλα, στην ακολουθία των γεγονότων που οδηγούν στην άνθιση.

✓ Στο είδος *Campanula medium* οι μικρές μέρες επιδρούν στα φύλλα υποκαθιστώντας πλήρως την εαρίνοποίηση στο κορυφαίο μερίστωμα. Σ' αυτή την περίπτωση η εαρίνοποίηση και φωτοπερίοδος εμ-

φανίζονται να δρύνε σαν εναλλακτικοί δρόμοι για την άνθιση. Η ικανότητα των μικρών ημερών να αντικαθιστούν την εαρινοποίηση, εκτός από το είδος *Campanula medium*, τη συναντάμε και σ' άλλα είδη, αν και η συγγένεια των δύο αυτών μηχανισμών είναι ακόμα άγνωστη.

Παρόλο ότι έχει κατακτηθεί ένα επίπεδο γνώσεων γύρω από την επίδραση της εαρινοποίησης στην άνθιση υπάρχουν ακόμα αναπάντητα ερωτήματα. Για παράδειγμα η έναρξη της άνθισης μπορεί να πραγματοποιηθεί στο κορυφαίο μερίστωμα χωρίς τα/το προϊόντα/προϊόν από την φωτοπεριοδική επαγωγή στα φύλλα κ.ά Απαντήσεις στα παραπάνω ερωτήματα μπορούμε να περιμένουμε αφού πρώτα γίνει στο σύνολο της κατανοητή η βιοχημεία της ανθικής διαδικασίας.

3. 2. 3. Η ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΜΦΑΝΙΖΕΤΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΑΡΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στη μελέτη των μεταβολικών διαδικασιών οι οποίες συνδέονται με την εαρινοποίηση. Τα σάκχαρα και το οξυγόνο είναι απαραίτητα προκειμένου να έχουμε αποτέλεσμα από τις χαμηλές θερμοκρασίες, και έτσι εμφανίζεται μάλλον απίθανο το ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες απλά σταματούν κάποιες μεταβολικές αντιδράσεις με αποτέλεσμα την αναχαίτηση της άνθισης. Οι απαιτήσεις σε σάκχαρα και οξυγόνο, είναι περισσότερο συνεπείς με ενεργοποίηση από μια αερόβια μεταβολική αλληλεπίδραση, το οποίο είναι ουσιαστικό για την άνθιση.

Από την άλλη πλευρά οι ρυθμοί για τις περισσότερες μεταβολικές αντιδράσεις μειώνονται με την θερμοκρασία, έτσι η ανθική εγκατάσταση-επαγωγή από χαμηλές θερμοκρασίες είναι πιθανό να είναι πιο περίπλοκη απ' ότι η απλή ενεργοποίηση από ένα μεταβολικό «μονοπάτι».

Σε μια μελέτη πάνω στο χειμερινό σιτάρι (*Triticum aestivum*) αναλύθηκαν νέες πρωτεΐνες οι οποίες εμφανίζονται μετά την εαρινοποίηση (Tegoka, 1972). Η πρωτεΐνη αντιγράφεται μετά την εαρινοποίηση μοιάζοντας με μια τυπική πρωτεΐνη του ανοιξιάτικου σιταριού το οποίο δεν απαιτεί εαρινοποίηση για να ανθίσει. Τελειώνοντας την αναφορά στην εαρινοποίηση πρέπει να αναφέρουμε ότι μελέτες του αντικειμένου με τη χρήση της Μοριακής Βιολογίας μπορούν να φωτίσουν άγνωστες πτυχές του ενδιαφέροντος αυτού θέματος.

3. 3. STRESS

Οι συνθήκες stress συχνά οδηγούν σε τροποποίηση της ισορροπίας ανάμεσα στην βλαστική και αναπαραγωγική ανάπτυξη με αποτέλεσμα την άμεση ή έμμεση επίδραση στην άνθιση. Σ' αυτό σημείο πρέπει να δώσουμε έμφαση στο σύνολο της στρατηγικής την οποία ακολουθεί το φυτό προκειμένου να αντιμετωπίσει τις συνθήκες stress:

i) το φυτό αναπτύσσει μηχανισμούς προκειμένου να ανεχθεί (tolerating) τις δυσμενείς συνθήκες. Οι Patterson et. al. το 1987 παρατήρησαν ότι το είδος *Lycopersicon esculentum* είναι ευαίσθητο στις χαμηλές θερμοκρασίες και δεν παράγει γύρη στους 10°C. Αντίθετα το είδος *Lycopersicon hirsutum*—πρόκειται για την άγρια τομάτα η οποία διακρίνεται λόγω του μεγάλου ύψους της—δεν χειροτερεύει αναπαραγωγικά σ' αυτή τη θερμοκρασία

ii) ο Miller το 1986 θεώρησε ότι υπάρχει μια άλλη ανεκτική στρατηγική από μέρους των φυτών η οποία στηρίζεται στην τροποποίηση της ανθικής μορφολογίας

iii) οι Chiariello και Gulman το 1991 διετύπωσαν την άποψη ότι υπάρχουν είδη τα οποία αντιμετωπίζουν τις συνθήκες stress διαμέσο στρατηγικών αποφυγής (avoidance strategies).

Αυτές οι στρατηγικές αν και διαφέρουν, μπορούμε να πούμε ότι γενικώς βασίζονται στην προσαρμογή του ευαίσθητου αναπαραγωγικού σταδίου σε περιόδους στις οποίες μειώνεται το stress. Δεχόμενοι ότι η έννοια του stress πρέπει πάντα να ερμηνεύεται σε σχέση με τις βέλτιστες συνθήκες για κάθε γενότυπο, μηχανισμοί όπως η εαρίνοποίηση, μπορούν να θεωρηθούν σαν στρατηγικές αποφυγής του stress.

Οι συνθήκες stress μπορούν να δράσουν άμεσα στη διαδικασία της άνθισης. Σ' ορισμένες περιπτώσεις το stress μπορεί να αποευαίσθητοποιήσει (desensitize) τα φυτά για περιβαντολλογικές συνθήκες οι οποίες κάτω από άλλες καταστάσεις θα προκαλούσαν άνθιση.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές γύρω από το ότι το υδατικό stress αντιδρά απ' ευθείας με την αναπαραγωγική διαδικασία αλλά είναι λίγες οι λεπτομερείς μελέτες. Στο είδος *Chenopodium polyspermum* σύμφωνα με τον Sotta (1978) η ριζική αφαίρεση αυξάνει την άνθιση κάτω από μη επαγωγικές συνθήκες (noninductive conditions) ενώ αντιθέτως η άμεση παροχή νερού δεν αυξάνει την άνθιση σ' αυτό το είδος. Από τα παραπάνω είναι σαφής η ύπαρξη ορισμένων ειδών στα οποία το υδατικό stress παίζει ρόλο στην άνθιση. Υπάρχουν όμως αρκετά είδη στα οποία το υδατικό stress ή δεν εμφανίζει καθόλου ή εμφανίζει μικρά αποτελέσματα στην άνθιση π.χ. ηλιολούλουδο.

Προσθετικά στα όσα έχουν αναφερθεί όσο αφορά την γενική συνέπεια του stress θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι υπάρχουν ορισμένα αναπτυξιακά στάδια τα οποία μπορεί να έχουν ιδιαίτερη ευαισθησία. Η μεριστωματική διαφοροποίηση, η σπορογένεση και η δημιουργία γαμετών είναι ιδιαίτερα τρωτά στάδια. Το stress στα προαναφερθέντα στάδια δρα προκειμένου να μεταβάλει την περίοδο της άνθισης ή προκαλώντας στειρότητα ή αποβολή ανθικών οργάνων (abortion).

Τα παραπάνω άμεσα αποτελέσματα μπορεί να προκληθούν από μια σειρά-αλληλουχία stress μεταξύ των οποίων μπορεί να περιλαμβάνονται το υδατικό stress, η έκθεση σε UV-B ακτινοβολία, σε χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες ή σε μολυσμένο περιβάλλον. Γενικά θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι το stress από τη μια πλευρά παίζει ένα ρόλο ο οποίος τότε προάγει και τότε αναχαιτίζει την άνθιση αλλά από την άλλη, τις περισσότερες φορές αποτελεί τροποποιητικό στοιχείο ασκώντας μια ποσοτική επίδραση στα στάδια της ανθικής εγκατάστασης και ανάπτυξης προκαλώντας αλλαγές στην παραγωγή συστατικών.

Σε όμοια συμπεράσματα μπορούμε να οδηγηθούμε αν μελετήσουμε ή δεχθούμε τη σημαντικότητα της θρέψης. Σε ορισμένα είδη η διαθεσιμότητα της Ν-ούχου θρέψης βρίσκεται σε στενή σχέση με την άνθιση, αλλά αυτή η διαπίστωση δεν αποτελεί γενικό κανόνα για την πλειοψηφία των ειδών. Όπως διαπίστωσαν οι Bernier et. al. το 1981, βασιζόμενοι στα φυτά *Lemna* και *Chrysanthemum*, τα ιχνοστοιχεία και ιδιαίτερα ο χαλκός και ο σίδηρος, παίζουν και αυτά ρόλο στην ανθική εγκατάσταση, αν και τόσο οι μηχανισμοί όσο και η θέση αυτών δεν είναι ακόμα γνωστή.

4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΩΝ (MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION)

4. 1. ΓΕΝΙΚΑ

Σ' αυτή την παράγραφο θα γίνει μία συνοπτική παρουσίαση των πιθανών μηχανισμών διαμέσο των οποίων τα σήματα, για τα οποία μιλήσαμε αρχικά, μεταφέρονται εντός ή μεταξύ των κυττάρων και των οργάνων και για τις πιθανές μοριακές αλλαγές οι οποίες μπορούν κατόπιν να εμφανισθούν.

Τα φυτά, είναι γνωστό ότι πρόκειται για στατικούς οργανισμούς, οι οποίοι πρέπει να έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται και να αποκρίνονται (respond) σε περιβαντολλογικές συνθήκες-φωτισμού, θερμοκρασίας, θρεπτικής κατάστασης, υδατικής κατάστασης κ.ά-οι

οποίες έχουν πολύ μεγαλύτερο εύρος απ' αυτές που έχουν να αντιμετωπίσουν τα ζώα. Είναι λοιπόν πιθανό ότι οι μηχανισμοί, μέσω των οποίων το φυτό εμφανίζει τις αντιδράσεις του και τις συντονίζει, είναι διαφορετικοί απ' αυτούς των ζώων.

Σε αντίθεση με ότι υπάρχει στα ζώα, στα φυτά απουσιάζει το συντονιστικό-νευρικό κέντρο των βιοχημικών αντιδράσεων (central coordinating nervous system). Αντί αυτού σύμφωνα με τους Blowers και Trewavas (1989) υπάρχουν τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές. Αυτές είναι:

- *το περιβάλλον γύρω από το φυτό
- *το περιβάλλον έξω από την κυτταρική περιοχή, ό,τι βρίσκεται μεταξύ επιδερμίδας και πλασματικής μεμβράνης (μεσοκυτάριοι χώροι)
- *ο όγκος εντός της πλασματικής μεμβράνης.

Η κάθε μία από τις παραπάνω περιοχές, δρα ανταγωνιστικά σε σχέση με τις υπόλοιπες στην αναζήτηση των απαραίτητων πηγών και έχει την ικανότητα να αντιδρά αυτόνομα σε κάθε ερέθισμα.

Πιο συγκεκριμένα σ' αυτό το κομμάτι θα προσπαθήσουμε να εξερευνήσουμε μερικά από τα βιοχημικά στάδια, τα οποία μπορούν να εμφανισθούν ακολουθώντας ένα αρχικό σήμα και τα οποία οδηγούν σε αποτελέσματα πάνω στην γονιδιακή έκφραση, την ενζυμική δράση κ.ά.

Τέλος όσο αφορά τις αποκρίσεις (responses) των φυτών, αυτές μπορούν να διαιρεθούν σε βραχείας περιόδου διεγερτικά (excitatory) γεγονότα και σε μακράς περιόδου αναπτυξιακές αποκρίσεις. Οι δύο παραπάνω τύποι μπορούν να βρεθούν σε λειτουργίες οι οποίες σχετίζονται με την άνθιση.

4. 2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΣΤΑ ΦΥΤΑ (CELLULAR SIGNALLING IN PLANTS)

Στα φυτά όπως και στα ζώα τα εξωτερικά σήματα που δέχονται απαιτούν μεταγωγή και ενίσχυση (amplification), ενώ οι αποκρίσεις των φυτών σ' αυτά ανήκουν στις δύο προαναφερθείσες κατηγορίες. Στα φυτά η δράση των διαφόρων περιβαντολογικών σημάτων είναι πιο άμεση απ' ότι στα ζώα και μπορούν να θεωρηθούν ως τα κύρια στοιχεία ενός «μονοπατιού» (pathway) μεταγωγής σημάτων.

Τα ερωτήματα τα οποία προκύπτουν σ' αυτό το σημείο σχετίζονται με το πως γίνονται αντιληπτά τα περισσότερα από τα εξωτερικά σήματα, καθώς και με τη φύση της μεταγωγικής διαδικασίας, οδηγώντας στην τελική απόκριση από μέρους του φυτού. Το ερώτημα αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον όταν απαιτείται το ερέθισμα (stimulus) να είναι πα-

ρούσα για μεγάλο χρονικό διάστημα προκειμένου να κάνει την εμφάνιση της η απόκριση του φυτού σ' αυτή.

4. 3. ΠΙΘΑΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΩΓΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ(POTENTIAL COMPONENTS OF PLANT TRANSDUCTION PATHWAYS)

Ασβέστιο

Από τα μέχρι σήμερα στοιχεία γίνεται σαφές ότι τα ιόντα ασβεστίου Ca^{2+} εμπλέκονται σ' ένα πλήθος παρατηρήσιμων φυσιολογικών αντιδράσεων π.χ κυτταροδιαίρεση, καθώς επίσης ότι είναι απαραίτητα για κάποιες άλλες π.χ ενεργοποίηση ενζύμων, βλάστηση (Herpler και Wayne, 1985). Επίσης συχνά αποτελεί τον τελεστή (effector) για το φωτεινό ερέθισμα και τις αυξητικές ουσίες των φυτών.

Περιστασιακές μαρτυρίες γύρω από τη δράση του ασβεστίου έρχονται από μελέτες που χρησιμοποιούν φορείς ιόντων ασβεστίου και συστατικά τα οποία φράζουν τα κανάλια ασβεστίου όπως το nifedepine και το verapamil. Οι παραπάνω ουσίες εμποδίζουν την κίνηση κάποιων φυλλαρίων στο είδος *Cassia fasciculata*, αλλά δεν έχουν αποτέλεσμα πάνω σε κινήσεις διαμεσολαβούμενες από το μπλε φως (blue-light mediated movements)(Robin et. al.1990). Στην *Albizzia* η εξωτερική εφαρμογή ασβεστίου ή φορέων ιόντων ασβεστίου είχε τα ίδια αποτελέσματα που προκαλεί το κόκκινο, δηλαδή κλείσιμο των φυλλαρίων.

Πρόσφατα δόθηκε η δυνατότητα, με τη χρήση διαφόρων τεχνικών, για τη μέτρηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Gilroy et. al.,1986, Bush and Jones, 1987, Mc Ainsch et. al, 1990). Με τη χρήση των παραπάνω τεχνικών, φάνηκε ότι η εφαρμογή ABA σε απομονωμένα καταφρακτικά κύτταρα αύξησε την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου προ του κλεισίματος των στομάτων (Mc Ainsch et. al,1990). Επίσης με την εφαρμογή ABA σε κομμάτι κολεοπτύλης επιτεύχθει η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και η ανύψωση του pH. Η εφαρμογή 2,4D είχε τα ίδια αποτελέσματα όσο αφορά το ασβέστιο αλλά αντίθετα όσο αφορά το pH (Cehring et. al, 1990a). Αυτό το οποίο παραμένει ακόμα ασαφές είναι η προέλευση του ασβεστίου το οποίο προκάλεσε την αύξηση που παρατηρήθηκε. Αυτή μπορεί να οφείλεται σε άνοιγμα των καναλιών ασβεστίου ή σε απελευθέρωση ασβεστίου από εσωτερικές αποθήκες του. Μεγάλα αποθέματα ασβεστίου συναντάμε στα κενοτόπια (vacuole). Σύμφωνα με τους Alexandre et. al το 1990 το ασβέστιο ελευθερώνεται από τα κενοτόπια από την ουσία IP3 (τριφωσφο-ινοσιτόλη).

Πρωτεΐνες:κινάσες

Σύμφωνα με τους Zhang et. al, (1990) μια αλληλουχία βημάτων, τα οποία έπονται της αύξησης του ασβεστίου, για την οποία μιλήσαμε παραπάνω, μπορεί να περιλαμβάνουν ενεργοποίηση της καλμοδουλίνης και των κινασών. Το προηγούμενο παρατηρείται, αν και το ασβέστιο έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει απ' ευθείας την κίνηση των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση, μέσω της ενεργοποίησης ενός αριθμού διαφορετικών συμπλόκων ασβεστίου-συνδεδεμένων επηρεαστών (calcium-binding effectors).

Αυξητικές ουσίες

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου κάποιο ερέθισμα ή κάποια αλλαγή στις συνθήκες, μπορεί να επιφέρει αλλαγή στην αυξίνη ή σε άλλες αυξητικές ουσίες δεν είναι ακόμα γνωστός. Η απομόνωση των γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της αυξίνης αποδεικνύεται απαραίτητη. Μ' αυτό τον τρόπο θα μπορούσαμε να πούμε εάν συγκεκριμένες-ιδιαίτερες καταστάσεις επιδρούν στο επίπεδο της αυξίνης επηρεάζοντας τη βιοσύνθεση της ή εάν η έκφραση συγκεκριμένων ρυθμιστικών γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ουσιών οι οποίες με τη σειρά τους ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται είτε στο μεταβολισμό είτε στη βιοσύνθεση της αυξίνης.

pH

Οι αλλαγές στο κυτοσολικό pH (cytosolic pH) μπορεί να αποτελούν το πρώτο βήμα της μεταγωγής ενός σήματος. Αυτές μπορεί να είναι αποτέλεσμα, για παράδειγμα, της ενεργοποίησης της plasma membrane H⁺-ATPase. Ανεξαρτήτως πάντως του αιτίου-ερεθίσματος, η όποια αλλαγή στο pH έχει την ικανότητα να επιδρά σε μεγάλο εύρος κυτταρικών ενζύμων. Επίσης, εφ' όσον δεν είναι αρκετά εξειδικευμένο για να ληφθεί ως σήμα και εφ' όσον οι μεταβολικές οδοί προκαλέσουν κάποιες αλλαγές στο pH, αυτό μπορεί να δρα συνεργιστικά με άλλους παράγοντες όπως π.χ το ασβέστιο.

cAMP(κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη)

Η cAMP έχει ανιχνευθεί στα φυτά αν και δεν υπάρχουν αναφορές για μια cAMP εξαρτώμενη πρωτεΐνη κινάση. Η cAMP μπορεί να δρα και με άλλους τρόπους. Σε πρόσφατες μελέτες η cAMP φέρεται να εμπλέκεται στις γρήγορες-ταχείς αποκρίσεις όπως το άνοιγμα των φυλλαρίων στο είδος *Cassia fasciculata* λόγω του μπλε φωτός (Rodlin et. al,1990) και στο άνοιγμα των στομάτων στο είδος *Vicia faba* (Curvetto και Delmastro,1990).

5. Η ΑΝΘΙΣΗ ΩΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Από τις μέχρι σήμερα μελέτες γύρω από τα γονίδια τα οποία επιδρούν στην άνθιση, τα αποτελέσματα αφορούν ένα πολύ περιορισμένο αριθμό ειδών π.χ σιτάρι, μπιζέλι. Επίσης, τα αποτελέσματα αυτά έχουν μεγάλο βαθμό αβεβαιότητας, η μείωση του οποίου πρέπει να αποτελέσει στόχο των μελλοντικών ερευνών. Σ' αυτή την ενότητα παρουσιάζονται στοιχεία από τις μέχρι σήμερα μελέτες τα οποία μπορεί να έχουν ευρύτερο ενδιαφέρον.

5. 1. ΑΝΘΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

Δύο είναι τα σημεία τα οποία αναδεικνύονται ξεκάθαρα από τις γενετικές μελέτες:

i) φαίνεται ότι η άποψη για την ύπαρξη ενός ανθικού παρεμποδιστή, ο οποίος παίζει κρίσιμο ρόλο, ίσως ρόλο ρυθμιστικό (στρόφιγγας /pivot) στην ανθική διαδικασία, έχει πολύ ισχυρές βάσεις προκειμένου να γίνει αποδεκτή

ii) τόσο στο σιτάρι όσο και στην *Arabidopsis* εμφανίζονται μαρτυρίες σύμφωνα με τις οποίες υπάρχουν γονίδια τα οποία επηρεάζουν την άνθιση και τα οποία δρουν ανεξάρτητα από βασικές περιβαντολογικές μεταβλητές (μήκος ημέρας /θερμοκρασία).

Χρησιμοποιώντας τα δύο παραπάνω σημεία σαν αρχή, το απλούστερο ανθικό μοντέλο το οποίο θα μπορούσε να προταθεί είναι εκείνο στο οποίο υπάρχει ένα κεντρικό ανθικό μονοπάτι ρυθμιζόμενο από έναν αριθμό γονιδίων τα οποία κυρίως δρουν χωρίς την άμεση επίδραση του περιβάλλοντος. Γονίδια τα οποία δεν είναι κομμάτι αυτού του μονοπατιού παράγουν παρεμποδιστές οι οποίοι μπορεί είτε να καταστείλουν (suppress) τη δράση των γονιδίων στο μονοπάτι είτε να αποενεργοποιήσουν τα προϊόντα των γονιδίων του μονοπατιού. Με τη σειρά τους αυτά τα παρεμποδιστικά γονίδια μπορεί να υποταχθούν σε άλλους παρεμποδιστές ή κατασταλτικά γονίδια και/ή σε περιβαντολογικούς ελέγχους όπως το μήκος της ημέρας ή η θερμοκρασία.

Η ύπαρξη ενός κεντρικού συστατικού μονοπατιού (constitutive) μονοπατιού για την άνθιση, στο παραπάνω μοντέλο, προσδίδει σ' αυτό μια πασιφανής αδυναμία. Ενδεχόμενες μη λειτουργικές μεταλλάξεις στα γονίδια του μονοπατιού θα οδηγούσαν σε αποτυχία την όποιαδή-

ποτε προσπάθεια για άνθιση. Έτσι είναι πιθανό, πολλαπλά μονοπάτια ή πολλαπλά γονιδιακά αντίγραφα να εμπλέκονται στην άνθιση, προκειμένου να προλαμβάνονται περιπτώσεις μη λειτουργικών μεταλλάξεων εντός του μονοπατιού.

5. 2. ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ

Σύμφωνα με τον Evans (1971) η ρύθμιση της ανθικής μεταγωγής μπορεί να προκύψει σε δύο βασικές μεταγωγές:

- i) την ανθική επαγωγή (floral induction) και
- ii) την ανθική πρόκληση (floral evocation).

Η ανθική επαγωγή αναφέρεται σε διαδικασία εμφανιζόμενη στα φύλλα σαν αποτέλεσμα της παραγωγής και της μεταφοράς μιας ανθικής προτροπής. Η ανθική πρόκληση αναφέρεται στη διαδικασία που προκύπτει στο ακραίο βλαστικό μερίστωμα ακολουθώντας τη λήψη μιας μετακινούμενης προτροπής. Έτσι οι δύο προηγούμενες διαδικασίες μπορούν να διαχωρισθούν κατά διαστήματα (spatial) ή προσωρινά (temporally).

5. 2. 1. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΘΙΚΗ ΕΠΑΓΩΓΗ

Η βιοχημική διαδικασία η οποία καταλήγει στην παραγωγή ανθικής προτροπής μπορεί να ρυθμίζεται στο επίπεδο της γονιδιακής μεταγραφής ή από ένα εύρος-αριθμό (range) μετα-μεταγραφικών (posttranscriptional) διαδικασιών στις οποίες περιλαμβάνονται η επεξεργασία ή η σταθεροποίηση του mRNA, η έναρξη ή η επιμήκυνση της μετάφρασης και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αρκετές μελέτες έχουν τοποθετήσει, άμεσα ή έμμεσα, τη συνεισφορά των αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση, όσο αφορά τη μεταγωγή, της διαμεσολαβούμενης από το φυτόχρωμα, αντίληψης του μήκους της ημέρας, στην παραγωγή ανθικού ερεθίσματος.

Οι αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση συναντώνται στα παρακάτω επίπεδα:

- i) Αλλαγές στην πρωτεϊνική σύνθεση. Από πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν από τον Magushige το 1962 φάνηκαν ξεκάθαρες διαφορές στην πρωτεϊνική σύνθεση ανάμεσα στα φύλλα και στα άνθη καθώς επίσης ανάμεσα σε βλαστικές και αναπαραγωγικές κορυφές. Σε άλλες μελέτες στις οποίες εξετάστηκε η πρωτεϊνική σύνθεση σε φυτά «μικρής ημέρας» (impatiens) παρατηρήθηκε μια αύξηση της συνολικής φυλλικής πρωτεΐνης, καθώς επίσης και η παρουσία στο στέλεχος

ενός νέου πολυπεπτιδίου μετά από ένα απλό φωτο-επαγωγικό κύκλο (Sawhney et. al, 1976)

ii) Αλλαγές στη σύνθεση mR.N.A. Οι Yoshida et.al το 1967 εξέτασαν το περιεχόμενο από επαγμένες και μη κοτυληδόνες του είδους *Pharbitis nil*. Απ' αυτή την ανάλυση προέκυψε ότι το περιεχόμενο άθροισμα γουανίνης και κυτοσίνης (G+C), στο κλάσμα του mR.N.A μειώθηκε κατά την ανθική επαγωγή. Επίσης ο Warm το 1984 παρατήρησε αλλαγές στη σύνθεση του mR.N.A οι οποίες ακολουθούσαν την ανθική επαγωγή στο είδος *Hyoscyamus niger*.

5. 2. 2. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΘΙΚΗ ΠΡΟΚΛΗΣΗ

Οι αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο και στην ανθική πρόκληση (floral evocation). Αυτό είναι εμφανές στα παρακάτω επίπεδα:

i) **Ιστοχημικές μελέτες στο ακραίο βλαστικό μερίστωμα.** Από κυτολογικές και ιστοχημικές μελέτες στα βλαστικά και αναπαραγωγικά μεριστώματα φάνηκε ότι η βιοσύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων ενισχύεται παράλληλα /σε συμφωνία (in concert) με τη φωτοπεριοδική ανθική επαγωγή. Οι ανατομικές και κυτολογικές αλλαγές οι οποίες συνοδεύουν τη μετάβαση στην άνθιση μελετήθηκαν για τρία είδη «μικρής ημέρας» τα οποία διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους. Αυτά ήταν το *Pharbitis nil*, το *Xanthium strumarium* και το *Chenopodium rubrum* (Gifford, 1963). Γι' αυτά τα τρία είδη φάνηκε ότι υπάρχει μια αύξηση στη μιτωτική δραστηριότητα καθώς επίσης και στις συγκεντρώσεις του R.N.A και των πρωτεϊνών κατά την φωτοπεριοδική ανθική επαγωγή. Πρόσφατη μελέτη συνδύασε τις ιστοχημικές αναλύσεις και την αυτοραδιογραφία της ^3H -ουριδίνης η οποία συσσωματώνεται πάνω στο R.N.A, με σκοπό να εξετάσει την μετάβαση στην άνθιση στο ακραίο μερίστωμα (apex) του είδους *Pharbitis nil* (Bonner et. al, 1991). Η μελέτη αυτή κατέληξε στο ότι η ενεργοποίηση της σύνθεσης R.N.A στο πλάγιο μερίστωμα (rib meristem), πιθανώς να περιλαμβάνει αλλαγές στη συσσώρευση συγκεκριμένου mR.N.A, το οποίο ήταν ένα από τα πρώιμα γεγονότα στην ανθική πρόκληση, ξεκινώντας περίπου 16-20 ώρες από την έναρξη της επαγωγικής σκοτεινής περιόδου.

ii) **Αλλαγές στην πρωτεϊνική σύνθεση.** Σύμφωνα με τους Lyndon et. al (1983), μετά από την εξέταση των πρώιμα συντιθέμενων πρωτεϊνών στο ακραίο κορυφαίο μερίστωμα (apex) του *Sinapis alba*, παρατήρηθηκε το εξής: μετά από 50 ώρες, στις οποίες επικρατούσαν συνθήκες

επαγωγικής μεγάλης μέρας, εντοπίστηκαν αλλαγές στην πολυπεπτιδική σύνθεση οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η πραγμάτωση της άνθισης, στο ακραίο κορυφαίο μερίστωμα, περιλαμβάνει αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση.

iii) **Αλλαγές στη σύνθεση mR.N.A.** Σε μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε το *Sinapis alba*, φυτό «μεγάλης ημέρας», παρατηρήθηκε μια αύξηση στη σύνθεση R.N.A στο κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα κατά τη διάρκεια μετάβασης στην άνθιση (Bronchart et. al, 1970).

5. 3. ΤΩΡΙΝΕΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση μοριακών συμβάντων τα οποία εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ανθικής μορφογένεσης. Μεγάλη συνεισφορά στη παραπάνω πρόοδο έχει η εφαρμογή πολύπλοκων τεχνικών της μοριακής γενετικής (molecular genetics). Απ' αυτές τις μεθόδους έγινε δυνατή η απομόνωση ενός αριθμού «ομοιοτικών γονιδίων» (homeotic genes) τα οποία ρυθμίζουν την ανθική μετάβαση και οργανογένεση.

Μέχρι σήμερα τα ομοιοτικά γονίδια έχουν απομονωθεί σε ορισμένα φυτικά είδη και μερικά απ' αυτά δείχνουν εμφανή εξελικτική ποικιλότητα (evolutionary diversity) πράγμα το οποίο επιβεβαιώνει τον κεντρικό ρόλο –των γονιδίων αυτών –στον έλεγχο της ανθικής εξέλιξης. Σήμερα θεωρείται ότι τα ομοιοτικά γονίδια παράγουν παράγοντες μεταγραφής οι οποίοι ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Μεταξύ των προϊόντων των ομοιοτικών γονιδίων παρατηρούνται τόσο ποικίλες αλληλεπιδράσεις όσο και ιεραρχικός έλεγχος.



B. ΥΑΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ : ΧΡΥΣΑΝΘΕΜΟ (CHRYSANTHEMUM SPP.)

1. 1. ΓΕΝΙΚΑ-ΚΛΙΜΑΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

1. 1. 1. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΙΣΜΟ

Το χρυσάνθεμο είναι φυτό υποχρεωτικά μικρής ημέρας, γεγονός που περιόριζε μέχρι και πριν από μερικές δεκαετίες την καλλιέργεια του μόνο στη φθινοπωρινή περίοδο οπότε και ανθίζει φυσιολογικά. Πιο απλά η άνθιση του χρυσανθέμου ρυθμίζεται από το μήκος της ημέρας ή πιο σωστά από το μήκος της νύκτας. Ενώ όλες οι ποικιλίες αρχίζουν τη διαφοροποίηση του βλαστοφόρου οφθαλμού σε ανθοφόρο κάτω από το ίδιο καθεστώς μικρής μέρας (ή μεγάλης νύχτας), όμως διαφέρουν στο χρόνο που χρειάζεται από τότε που αρχίζει το καθεστώς μικρής μέρας μέχρι να ανθίσουν. Αυτό το χρονικό διάστημα μπορεί να είναι 6,7,8,15 εβδομάδες. Τα χρυσάνθεμα δεν ανθίζουν όταν το μήκος της ημέρας είναι μεγαλύτερο από κάποιο όριο που λέγεται κρίσιμη φωτοπερίοδος ή κριτικό μήκος ημέρας που για το χρυσάνθεμο είναι 14,5 ώρες. Η παραπάνω φωτοπερίοδος αφορά μόνο την εγκατάσταση-δημιουργία- της ανθικής καταβολής. Στην περίπτωση του χρυσάνθεμου υπάρχει και κρίσιμη φωτοπερίοδος για τη μετέπειτα ανάπτυξη του ανθοφόρου, η οποία είναι 13,5 ώρες. Δηλαδή όταν η περίοδος φωτισμού διαρκεί 14,5 έως 13,5 ώρες γίνεται μεν εγκατάσταση της ανθικής καταβολής, δεν αναπτύσσεται όμως το άνθος, αν η διάρκεια της ημέρας δεν γίνει μικρότερη από 13,5 ώρες. Ακόμα πρέπει να σημειωθεί ότι όταν προσπαθούμε να επιτύχουμε τεχνητά μικρή μέρα θα πρέπει να μην επιτρέπεται η ύπαρξη φωτισμού μεγαλύτερου των 10-20 Lux κάτω από το υλικό κάλυψης, όταν χρησιμοποιείται χειροκίνητη κάλυψη-αποκάλυψη. Αυτό γιατί τα ηλικιωμένα φύλλα της βάσης του φυτού θεωρούνται περισσότερο ενεργά και φορείς κάποιου ορμονικού παράγοντα που ευθύνεται για την άνθιση.

1. 1. 2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Το χρυσάνθεμο είναι τόσο ευαίσθητο στη θερμοκρασία ώστε ακόμα και η θερμοκρασία που αναπτύσσονται τα φυτά επηρεάζει την άνθιση των φυτών που προέρχονται από αυτά. Η θερμοκρασία νύκτας που

ευνοεί την άνθιση είναι 16°C. Ανάλογα με την αντίδραση των ποικιλιών στη θερμοκρασία μπορούν να καταταγούν στις παρακάτω κατηγορίες:

-**Ουδέτερες ποικιλίες:** δεν έχουν προβλήματα στην άνθιση και αυτή επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 10°C και 27°C. Έντονη άνθιση παρατηρείται στους 15,5°C.

-**Θερμοθετικές ποικιλίες:** η ανθική καταβολή μπορεί να εγκατασταθεί αλλά δεν αναπτύσσεται εφόσον η θερμοκρασία κατέβει στους 16°C.

-**Θερμοαρνητικές ποικιλίες:** δεν ανθίζουν σε θερμοκρασίες πάνω από τους 16°C.

1. 2. ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

1. 2. 1. ΑΝΘΟΣ

Τα άνθη είναι κεφαλές, μονήρη ή κατά ταξιανθία κορύμβου, μονά σαν μαργαρίτες ή διπλά με πολλές σειρές ανθιδίων (πετάλων), αρωματικά και είναι διακοσμητικά τόσο για το σχήμα και το μέγεθος τους (διάμετρος μέχρι 20cm), όσο και για τα ποικίλα τους χρώματα, όπως το λευκό, το κίτρινο, το πορτοκαλί, το ρόδινο, το λιλιά, το μωβ κ. ά.

1. 2. 2. ΦΥΛΛΑ

Τα φύλλα είναι μεγάλα, διαστάσεων 8-10cm μήκος και 6-8cm πλάτος, χρώματος βαθύ πράσινου. Είναι σχήματος λογχοειδούς, πριονωτά, λεία ή χνοώδη.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2. 1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΙΚΟΥ (cp) ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ (mt) DNA /RNA

Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες έχουν το δικό τους γενετικό υλικό. Με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο αρχικά απομονώνονται οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια και κατόπιν το DNA/RNA τους. (cp και mt αντίστοιχα)

2. 1. 1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ DNA /RNA ΑΥΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ (cp DNA/RNA)

α) Λαμβάνονται 10-30g φυτικού ιστού π.χ. φύλλα, βλαστοί τα οποία ομογενοποιούνται σε μπλέντερ (φωτ.1) αφού προστεθούν 100ml «Buffer απομόνωσης» (50mM Tris, 10mM EDTA, 300mM Μανιτόλη, 0,2% w/v PVP-40, 20mM Β-μερκαπτεθανόλη) ανά 10g φυτικού ιστού. Το μπλέντερ ενεργοποιείται 3-5 φορές για 5 δευτερόλεπτα την κάθε φορά. Μετά την ομογενοποίηση, φιλτράρεται το προϊόν, είτε διαμέσου στρωμάτων τυρόπανου είτε διαμέσου στρώματος Miracloth είτε με τη χρήση συρμάτινου πορώδους υλικού το οποίο επιτρέπει τη διέλευση των χλωροπλαστών. (φωτ. 1)

β) Το εκχύλισμα μεταφέρεται σε κατάλληλη φυγοκεντρική φιάλη-οβίδα (φωτ. 2) προκειμένου να γίνει φυγοκέντριση με τη βοήθεια της φυγόκεντρου τύπου CENTRIKON T-124 μάρκας KONTRON INSTRUMENTS (φωτ. 3) στην οποία έχουμε τοποθετήσει το ρότορα A 6,14-Rmax=14,6. (φωτ. 4) Τοποθετείται η οβίδα, αφού πρώτα έχει ζυγιστεί, στο ρότορα. Μαζί τοποθετείται οβίδα στην οποία υπάρχει νερό. Τοποθετείται έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η ισορροπία του ρότορα. Ακολουθούν οι παρακάτω φυγοκεντρίσεις:

-1^η φυγοκέντριση: για 5 λεπτά στα 200 x g. Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης έχει δημιουργηθεί ίζημα το οποίο περιέχει άμυλο, πυρήνες και άσπαστα κύτταρα. Το υπερκείμενο, στο οποίο παραμένουν αιωρούμενα μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες, μεταφέρεται σε νέα οβίδα και ακολουθεί νέα φυγοκέντριση.

-2^η φυγοκέντριση: για 10 λεπτά στα 4000 x g. Το ίζημα μετά το πέρας αυτής της φυγοκέντρισης περιέχει χλωροπλάστες. Αφού μεταφερθεί το υπερκείμενο σε νέα οβίδα, το ίζημα επαναιωρείται με 1ml «TE buffer». Μεταφέρεται ο μισός από τον αρχικό όγκο του αιωρήματος σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. (φωτ. 2) Εδώ πρέπει να αναφέρουμε ότι τόσο για τη διάρκεια όσο και για τα g οι τιμές που δίνονται είναι ενδεικτικές. Ορισμένες φορές κρίνεται σκόπιμη η τροποποίηση των τιμών προκειμένου να επιτευχθούν οι στόχοι της κάθε φυγοκέντρισης. Αυτά ισχύουν τόσο για τις φυγοκεντρίσεις που προαναφέραμε όσο και γι' αυτές που θα ακολουθήσουν.

γ) Στο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα προστίθεται φαινόλη σε ίσο ή μισό όγκο προς τον αρχικό. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται το σπάσιμο των μεμβρανών, πράγμα που έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση πρωτεϊνών, άλλων οργανικών συστατικών και φαινολικών ουσιών. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 3 λεπτά στα 12000 x g στη μι-

κροφυγόκεντρο τύπου FORCE 16 μάρκας Techne CAMBRIDGE.(φωτ. 5) Μετά τη φυγοκέντριση παρατηρείται διαχωρισμός του διαλύματος σε δύο φάσεις: στην υποκείμενη θα συναντήσουμε τη φαινόλη και διάφορα οργανικά συστατικά, ενώ στην υπερκείμενη υπάρχει DNA/RNA. Μεταξύ των φάσεων αυτών δημιουργείται πρωτεϊνική στιβάδα. Το υπερκείμενο της παραπάνω φυγοκέντρισης μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα στον οποίο προστίθεται μέχρι πληρώσεως φαινόλη κορεσμένη με «Tris buffer» 1M. Κατόπιν γίνεται φυγοκέντριση για 3 λεπτά στα 12000 x g, στη μικροφυγόκεντρο, ώστε να διαχωρισθούν οι δύο φάσεις. Το υπερκείμενο διάλυμα, που θα προκύψει μετά την παραπάνω φυγοκέντριση, μεταφέρεται σε ένα νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα στον οποίο γίνεται προσθήκη χλωροφορμίου μέχρι πληρώσεως. Με το χλωροφόρμιο επιτυγχάνουμε την απομάκρυνση τυχόν ποσότητας φαινόλης καθώς επίσης και την απομάκρυνση ορισμένων πρωτεϊνών. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 λεπτά στα 12000 x g ώστε να διαχωρισθούν οι φάσεις.

δ) Λαμβάνεται ένας νέος μικροφυγοκεντρικός σωλήνας στον οποίο προστίθονται τα εξής:

i) 0,2gr DEAE cellulose για δέσμευση των DNA/RNA

ii) 500μl «TE buffer» (10mM Tris, 1mM EDTA) pH=8,0

iii) το υπερκείμενο διάλυμα από την προηγούμενη φυγοκέντριση.

Αναδεύουμε καλά. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 12000 x g για να καθιζάνει η DEAE cellulose με ότι έχει δεσμεύσει. Μετά το πέρας των 5 λεπτών απομακρύνεται το υπερκείμενο διάλυμα και γίνεται προσθήκη 1ml «TE buffer» pH=8,0. Ακολουθεί ανακίνηση και φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 12000 x g. Μετά το πέρας των 5 λεπτών επαναλαμβάνεται για μία ακόμα φορά η παραπάνω διαδικασία.

ε) Απομακρύνεται το υπερκείμενο διάλυμα και κατόπιν προστίθονται τα εξής στο παραπάνω μικροφυγοκεντρικό σωλήνα:

i) 200μl διαλύματος NaCl (5M)—στο νέο διάλυμα η συγκέντρωση του NaCl θα ανέλθει στο 1M με σκοπό την απελευθέρωση ουσιών από το DEAE cellulose

ii) «TE buffer» pH=8,0 μέχρι συνολικού όγκου 1ml.

Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 12000 x g. Το υπερκείμενο από την προηγούμενη φυγοκέντριση μεταφέρεται—ογκομετρείται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Εν' συνεχεία γίνεται προσθήκη είτε κρύας αιθανόλης σε όγκο 2,5 φορές μεγαλύτερο από τον όγκο του προηγούμενου διαλύματος είτε ισοπροπανόλη σε ίσο όγκο. Κατόπιν τοποθετείται για 60λεπτά στους -20°C. Η παραπάνω επεξεργασία δημιουργεί όξινο περιβάλλον με αυξημένη συγκέντρωση αλάτων και

χαμηλή θερμοκρασία. Τα τυχόν DNA/RNA που υπάρχουν χάνουν το αρνητικό τους φορτίο (οι υδροξυ-ομάδες τους δεν είναι λόγω του pH ιονισμένες) και συσσωματώνονται σε μεγαλύτερα σωματίδια.

στ) Μετά το πέρας των 60 λεπτών τα τυχόν DNA/RNA καθιζάνουν με τη διενέργεια φυγοκέντρισης για 15 λεπτά στα 12000 x g. Κατόπιν τοποθετείται, ο μικροφυγοκεντρικός σωλήνας, ανάποδα πάνω σε απορροφητικό χαρτί προκειμένου να στεγνώσει. Αμέσως μετά ακολουθεί πλύσιμο των τοιχωμάτων με κρύα αιθανόλη ή καθαρό οινόπνευμα για την απομάκρυνση του εναπομείναντος νερού (περιστροφή του μικροφυγοκεντρικού σωλήνα 4-5 φορές σε πλάγια θέση). Κατόπιν αδειάζετε η αιθανόλη και τοποθετείται ο μικροφυγοκεντρικός σωλήνας σε θέση για να στεγνώσει.

ζ) Προστίθενται 30μl «TE buffer» pH=8,0 και γίνεται ανάμιξη-πλύσιμο (pipeting) στα πλάγια τοιχώματα για να συγκεντρωθεί όλο το υλικό στον πυθμένα του μικροφυγοκεντρικού σωλήνα. Το περιεχόμενο του παραπάνω σωλήνα διατηρείται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στην ηλεκτροφόρηση.

2. 1. 2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ DNA/RNA ΑΥΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ (mt DNA/RNA)

Ακολουθείται η ίδια μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε στο μέρος Α προκειμένου να απομονωθούν αρχικά οι χλωροπλάστες και κατόπιν το DNA αυτών. Υπάρχει μόνο μια διαφορά: επειδή τα μιτοχόνδρια είναι πιο ελαφρά από τους χλωροπλάστες απαιτείται η φυγοκέντριση του υπερκείμενου διαλύματος το οποίο προκύπτει από τη 2^η φυγοκέντριση ώστε να καθιζάνουν τα μιτοχόνδρια τα οποία αιωρούνται. Η φυγοκέντριση γίνεται για 10 λεπτά στα 15000 x g.

2. 1. 3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΙΚΟΥ(cp) ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ(mt) DNA/RNA (τροποποιημένη διαδικασία)

α. Εφαρμόζοντας το στάδιο (α) από το πρωτόκολλο «ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA» λαμβάνουμε 500μl μιτοχόνδρια και ομοίως χλωροπλάστες.

β. Εκχυλίζεται το παραπάνω δείγμα χρησιμοποιώντας ίσο όγκο φαινόλης κορεσμένης με «Tris buffer» 1M προκειμένου να σπάσουν οι μεμβράνες και να απομακρυνθούν πρωτεΐνες, οργανικά συστατικά και φαινολικές ουσίες. Μετά φυγοκεντρείται το δείγμα για 5λεπτά στις

12000 x g. Από το διαχωρισμό που προκαλείται από τη φυγοκέντριση, στην υποκείμενη φάση συγκεντρώνεται η φαινόλη και διάφορα οργανικά συστατικά, ενώ στην υπερκείμενη το υδατικό διάλυμα DNA/RNA.

γ. Λαμβάνεται το υπερκείμενο ογκομετρείται και μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Στο μισό όγκο από το παραπάνω γίνεται προσθήκη εκχυλιστικού διαλύματος «φαινόλης-χλωροφορμίου». Μ' αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 λεπτά στα 12000 x g. Κατόπιν ογκομετρείται το υπερκείμενο και γίνεται προσθήκη διαλύματος NaCl 5M σε όγκο ίσο με το 1/10 του αρχικού. Εν' συνεχεία ογκομετρείται το νέο υλικό και προστίθεται ίσος όγκος κρύας ισοπροπανόλης. Μ' αυτό τον τρόπο, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, επιτυγχάνεται η συσσωμάτωση των DNA/RNA δίνοντας μεγαλύτερα σωματίδια. Κατόπιν τοποθετείται για 60min στους -20°C .

δ) Μετά το πέρας των 60 λεπτών γίνεται φυγοκέντριση για 15 λεπτά στα 12000 x g προκειμένου να επιτύχουμε την καθίζηση των DNA/RNA. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και αναποδογυρίζεται ο μικροφυγοκεντρικός σωλήνας σε απορροφητικό χαρτί για να στεγνώσει. Αν υπάρχουν σταγονίδια νερού στα τοιχώματα του μικροφυγοκεντρικού σωλήνα πλένονται με καθαρό οινόπνευμα ή κρύα αιθανόλη και τοποθετείται όπως πριν για να στεγνώσει.

ε) Επαναιωρείται το ίζημα -DNA/RNA- σε 100μl «TE buffer» pH=8,0. Κατόπιν τοποθετείται το δείγμα στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για ηλεκτροφόρηση, κατά την οποία χρησιμοποιούνται 20μl δείγματος.

2. 2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

α) Λαμβάνονται 15gr φυτικού ιστού-φύλλα ή άνθη-τα οποία τοποθετούνται σε συσκευή ομογενοποίησης-μπλέντερ μαζί με 150gr «buffer απομόνωσης». Η συσκευή ενεργοποιείται 3-5 φορές για 5 δευτερόλεπτα την κάθε φορά. Εν' συνεχεία γίνεται διήθηση του μίγματος, για την απομάκρυνση μη ομογενοποιημένων ιστών, με τη χρήση μεταλλικού πλέγματος. Το εκχύλισμα μεταφέρεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα-«οβίδα», η οποία τοποθετείται στη συσκευή φυγοκέντρισης. Ακολουθούν οι παρακάτω φυγοκεντρίσεις:

1^η φυγοκέντριση: για 10 λεπτά στα 200 x g με αποτέλεσμα την καθίζηση άσπαστων κυττάρων κ.ά ενώ το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα.

2^η φυγοκέντριση: για 10 λεπτά στα 4000 x g με αποτέλεσμα την καθίζηση των χλωροπλαστών, ενώ το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε νέο σωλήνα.

3^η φυγοκέντριση: για 10 λεπτά στα 15000 x g με αποτέλεσμα την καθίζηση των μιτοχονδρίων. Σ' αυτό το σημείο θα πρέπει να πούμε ότι τα ίζηματα μετά τη 2^η και τη 3^η φυγοκέντριση επανεωρούνται με 1ml «TE buffer» pH=8,0 και αποθηκεύονται στους -20°C προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τη λήψη μιτοχονδριακού και χλωροπλαστικού DNA/RNA με εφαρμογή του προηγούμενου πρωτοκόλου.

β) Στο υπερκείμενο διάλυμα που προέκυψε από την 3^η φυγοκέντριση προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου το οποίο έχει την ιδιότητα να αποσυνδέει και να απομακρύνει ορισμένες πρωτεΐνες, χρωστικές και λιπίδια σπάζοντας τις μεμβράνες. Ακολουθεί ανακίνηση και φυγοκέντριση για 10 λεπτά στα 15000 x g. Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης στο υπερκείμενο διάλυμα υπάρχει το εν' διαλύσει DNA ενώ στην υποκείμενη φάση χλωροφόρμιο, λιπίδια, χρωστικές και πρωτεΐνες. Μεταξύ των παραπάνω φάσεων σχηματίζεται μια πρωτεϊνική στοιβάδα. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο προστίθονται και 0,5gr DEAE cellulose το οποίο συλλέγει-δεσμεύει το εν' διαλύσει DNA. Ακολουθεί ανακίνηση με τη βοήθεια της συσκευής η οποία φαίνεται στη φωτογραφία 6.



γ) Εν' συνεχεία μπορεί να γίνει χρήση μίας εκ' των δύο παρακάτω τεχνικών. Υπενθυμίζεται ότι η δεύτερη κρίνεται πιο αποτελεσματική.

i) Γίνεται φυγοκέντριση του παραπάνω διαλύματος για 5 λεπτά στις 12000 x g προκειμένου να καθιζήσει η DEAE cellulose. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου το ίζημα επαναιωρείται με 0,5ml «TE buffer» pH=8,0. Το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και προστίθονται σ' αυτόν 10ml διαλύματος RNAσης συγκέντρωσης C=50μl/μl προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν μόρια RNA τα οποία υπάρχουν. Το διάλυμα ανακινείται κατά διαστήματα για περίοδο 30 λεπτών.

ii) Το διάλυμα που έχει προκύψει από το (β) στάδιο διέρχεται μέσα από διηθητικό χαρτί.(φωτ. 7) Μετά τη διήθηση, στο χαρτί, παραμένει ουσία η οποία συγκεντρώνεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 12000 x g. Το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνεται. Κατόπιν προστίθονται 10ml διαλύματος RNAσης συγκέντρωσης C=50μl/μl και «TE buffer» pH=8,0 μέχρι

πλήρωσης. Το διάλυμα ανακινείται κατά διαστήματα για περίοδο 30λεπτών.

δ) Μετά το πέρας των 30λεπτών γίνεται φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 12000 x g. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθείται η κάτωθι διαδικασία:

i) προστίθονται 34μl διαλύματος NaCl 5M και «TE buffer» pH=8,0 μέχρι πλήρωσης. Συγκέντρωση NaCl στον τελικό όγκο: 100mM. Ανακίνηση και κατόπιν φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 14000 x g. Μετά τη φυγοκέντριση το υπερκείμενο μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα (Α).

ii) Στη στερεά φάση, η οποία παραμένει στο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα, προστίθονται 68μl διαλύματος NaCl 5M και «TE buffer» pH=8,0 μέχρι πλήρωσης. Συγκέντρωση NaCl στον τελικό όγκο: 200mM. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως στο (i). Το υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντριση μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα (Β).

iii) Τώρα προστίθονται 136μl δ/τος NaCl 5M και «TE buffer» μέχρι πλήρωσης. Συγκέντρωση NaCl στον τελικό όγκο: 400mM. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία και το υπερκείμενο, μετά τη φυγοκέντριση, μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα (Γ).

iv) Προστίθονται 204μl δ/τος NaCl 5M και «TE buffer» μέχρι πλήρωσης. Συγκέντρωση NaCl στον τελικό όγκο: 600mM. Ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία και το υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντριση μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα (Δ).

v) Προστίθονται 272μl διαλύματος NaCl 5M και «TE buffer» μέχρι πλήρωσης. Συγκέντρωση NaCl στον τελικό όγκο: 800mM. Απ' αυτό το στάδιο προκύπτει ο μικροφυγοκεντρικό σωλήνας (Ε).

vi) Προστίθονται 340μl δ/τος NaCl 5M και «TE buffer» μέχρι πλήρωσης. Συγκέντρωση NaCl στον τελικό όγκο: 1000mM. Απ' αυτό το στάδιο προκύπτει διάλυμα το οποίο τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα (ΣΤ).

Από την παραπάνω διαδικασία επιδιώκεται να αναγνωρίσουμε εκείνη την τελική συγκέντρωση NaCl στην οποία γίνεται πιο αποτελεσματική η αποδέσμευση των ουσιών από την DEAE cellulose και ιδιαίτερα του DNA. Στους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες Α,Β,Γ,Δ,Ε,ΣΤ προστίθεται κρύα ισοπροπανόλη σε ίσο όγκο προς το διάλυμα που βρίσκεται εντός τους. Κατόπιν τοποθετούνται για 30 λεπτά στους -20°C. Μ' αυτή την επεξεργασία στοχεύουμε στην απώλεια του αρνητικού φορτίου του DNA και τη συσσωμάτωση του σε μεγαλύτερα σωματίδια. Πιο

συγκεκριμένα οι υδροξυ-ομάδες δεν είναι πλέον ιονισμένες λόγω του pH.

ε) Μετά την έξοδο από τους -20°C ακολουθεί φυγοκέντριση για 15 λεπτά στα $12000 \times g$ προκειμένου να επιταχύνουμε την καθίζηση τυχόν κομματιών DNA. Εν' συνεχεία απομακρύνεται το υπερκείμενο και τοποθετούνται οι μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες για στέγνωμα. Ακολουθεί πλύσιμο των μικροφυγοκεντρικών σωλήνων με κρύα αιθανόλη ή καθαρό οινόπνευμα για την απομάκρυνση του νερού και τοποθετούνται για στέγνωμα. Κατόπιν γίνεται προσθήκη $100\mu\text{l}$ « $0,5 \times \text{TBE}$ buffer» (200mM Tris, 20mM EDTA, 200mM Βορικό οξύ) με σκοπό την επαναιώρηση του περιεχομένου των μικροφυγοκεντρικών σωλήνων. Επίσης προστίθεται φαινόλη κορεσμένη με «Tris buffer» 1M προκειμένου να απομακρυνθούν πρωτεΐνες και κυρίως η RNAση. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 λεπτά στα $12000 \times g$. Το υπερκείμενο υδατικό διάλυμα, με το DNA, μετά τη φυγοκέντριση μεταφέρεται από κάθε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα σ' έναν νέο μαζί με κρύα αιθανόλη ή ισοπροπανόλη σε όγκο ίσο μ' αυτόν του υπερκείμενου, με σκοπό την επίτευξη νέας καθίζησης του DNA. Οι έξι νέοι μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες τοποθετούνται στους -20°C για 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 30 λεπτών γίνεται φυγοκέντριση για 10 λεπτά στα $12000 \times g$. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, πλένεται με καθαρό οινόπνευμα ο κάθε μικροφυγοκεντρικός σωλήνας και το περιεχόμενο επανεωρείται με $50\mu\text{l}$ «TE buffer» $\text{pH}=8,0$.

Προκειμένου να διατηρηθεί το περιεχόμενο τους τοποθετούνται στους -20°C .

2. 3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία από τις περισσότερο χρησιμοποιημένες τεχνικές διαχωρισμού μακρομορίων, αλλά και ολόκληρων κυττάρων. Αρχικά ο όρος ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την μετακίνηση φορτισμένων ηλεκτρικά σωματιδίων δια μέσω ενός υγρού ή ημιστερεού μέσου κάτω από την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Σήμερα ο όρος χρησιμοποιείται για οποιαδήποτε τεχνική με την οποία διαχωρίζονται οι ουσίες ενός μείγματος, όταν υποστούν την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, με βάση το καθαρό ηλεκτρικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα τους, ανεξάρτητα από το είδος του υλικού, δια μέσω του οποίου θα κινηθούν και θα γίνει ο διαχωρισμός. **Η αρχή λειτουργίας της ηλεκτροφόρησης είναι απλή:** όταν δύο ηλεκτρόδια εμβαπτισθούν σε ένα διάλυμα ενός ηλεκτρολύτη μέσα στο οποίο βρίσκονται διαλυμένα φορτισμένα μόρια μίγματος ουσιών και

αυτά συνδεθούν με μια πηγή ηλεκτρικού πεδίου, τότε τα φορτισμένα μόρια κάτω από την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, θα κινηθούν προς τα ηλεκτρόδια (πόλους). Τα θετικώς φορτισμένα μόρια θα κινηθούν προς τον αρνητικό πόλο (κάθοδος), ενώ τα αρνητικά φορτισμένα μόρια θα κινηθούν προς το θετικό πόλο (άνοδος) με ταχύτητες που είναι ανάλογες του μεγέθους του ηλεκτρικού φορτίου που φέρουν και της έντασης του πεδίου που εφαρμόζεται. Οι ταχύτητες μετακίνησης των ουσιών, στην αρχή είναι αυξανόμενες αλλά γρήγορα φτάνουν σε μια μέγιστη σταθερή τιμή, διαφορετική για κάθε ουσία, λόγω των δυνάμεων τριβής που αναπτύσσονται. Τελικά οι τιμές της μέγιστη ταχύτητας μετακίνησης δεν εξαρτώνται μόνο από το φορτίο και την ένταση του πεδίου αλλά και από το μέγεθος- τα μικρότερα πάνε μακρύτερα-και το σχήμα των μορίων και το είδος-δομή του υλικού δια μέσω του οποίου κινούνται. Έτσι λοιπόν, ακόμη και μόρια με το ίδιο μέγεθος φορτίου αλλά με διαφορετικό Μοριακό Βάρος θα κινηθούν προς τον αντίστοιχο πόλο με διαφορετική ταχύτητα.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήγμα-gel ακρυλαμίδης για το διαχωρισμό κομματιών-τμημάτων νουκλεϊνικών οξέων (DNA-RNA) Η ακρυλαμίδη είναι υλικό μορίων τα οποία μπορούν να πολυμερισθούν σε μακρές αλυσίδες. Οι αλυσίδες αυτές διασυνδέονται μεταξύ τους με μόρια δις-ακρυλαμίδης, δίνοντας πήγμα. Εφαρμόζοντας τάση στα άκρα του gel τα διάφορων μεγεθών τμήματα DNA θα κινηθούν προς τον (+) πόλο λόγω του αρνητικού τους φορτίου. Τα μεγάλα κομμάτια DNA λόγω του μεγέθους τους δεν θα προχωρήσουν πολύ στους πόρους του πηγματος σε αντίθεση με τα μικρά.

Παρασκευή πηγματος-gel ακρυλαμίδης. Το πήγμα ακρυλαμίδης πήζει ανάμεσα σε δύο γυάλινες πλάκες διαστάσεων που θέλουμε να έχει το πήγμα. Δύο τέτοιες πλάκες μπαίνουν αντίθετα η μία από την άλλη, αφού πρώτα έχουν πληθεί καλά κατά τα προτίμηση με ακετόνη, με πλαστικά ορθογώνια ελάσματα διατρέχοντα δύο ή τρεις από τις πλευρές τους. Αυτά χρησιμεύουν για να κρατούν τις πλάκες σε απόσταση. Τοποθετείται η διάταξη πλάκες- ελάσματα σε συσκευή, η οποία θα την κρατήσει στη κατακόρυφη θέση.(φωτ. 8) Κατόπιν προσθέτουμε σε ποτήρι ζέσεως τα παρακάτω συστατικά, προκειμένου να παρασκευαστεί gel όγκου 30ml:

- 1)10ml δ/μα 30% w/v ακρυλαμίδης και 1% w/v δις-ακρυλαμίδης
- 2)10ml «10×TBE buffer»
- 3) 17ml H₂O
- 4) 100μl TEMED (αποτελεί καταλύτη της αντίδρασης πολυμερισμού)

5) 200μl υδατικού διαλύματος 10% w/v περσουλφουρικού αμμωνίου ArSO_4 (δημιουργεί ελεύθερες ρίζες απαραίτητες για την αντίδραση πολυμερισμού).

Το TEMED ή το ArSO_4 προστίθονται τελευταία. Πολυμερισμός γίνεται όταν προστεθούν και τα δύο. Το μίγμα προστίθεται αμέσως μετά την παρασκευή του ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες. Κατόπιν στην άνω πλευρά του πήγματος εφαρμόζουμε έλασμα-εκμαγείο για τη δημιουργία κελιών-wells στα οποία θα προσθέσουμε το προς ηλεκτροφόρηση υλικό. Παρατηρήθηκε ότι η παραμονή του μίγματος για χρόνο 45 λεπτών στους 30°C ευνοεί την ταχύτερη πήξη του. Το πήγμα μπορεί να διατηρηθεί μέχρι τη χρησιμοποίηση του στους -4°C . Προτείνεται η μεσολάβηση, τουλάχιστον 24ώρες από την παρασκευή μέχρι τη χρήση του.

Πριν την έναρξη της ηλεκτροφόρησης μεταφέρεται το πήγμα, το οποίο βρίσκεται ανάμεσα στις πλάκες, στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. (φωτ. 9α/β) Κατόπιν ετοιμάζονται τα δείγματα που θα τοποθετηθούν στα κελιά-wells. Αυτά αποτελούνται από 15-20μl του υλικού προς ηλεκτροφόρηση και 3μl «10×DNA loading buffer» (50% Γλυκερόλη, 10% «10 X TBE buffer», 1-2 σταγόνες «μπλε της βρωμοφαινόλης») προκειμένου το δείγμα να γίνει πιο βαρύ και κατά συνέπεια να χρησιμοποιείται ευκολότερα. Αφού τοποθετηθούν τα δείγματα στα κελιά γίνεται προσθήκη «0,5×TBE electrophoresis buffer» (προέρχεται από την αραιώση-20 φορές-του «10XTBE buffer») στις θέσεις που προβλέπεται. Κατόπιν συνδέεται η συσκευή με μια πηγή ηλεκτρικού ρεύματος στην οποία ρυθμίζεται η τάση (V) και η ένταση (A) του ηλεκτρικού ρεύματος που διοχετεύεται στα άκρα του gel. Η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται όταν η χρωστική-μπλε βρωμοφαινόλης-φτάσει στο άκρο του πήγματος. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, διακόπτεται η παροχή ηλεκτρικού ρεύματος, απομακρύνεται το «0,5×TBE electrophoresis buffer» και ξεκινά η διαδικασία ανίχνευσης επιθυμητών στοιχείων στο gel (steaning).

Ανίχνευση ουσιών σε gel ακρυλαμίδης (steaning). Με τον όρο «steaning» εννοούμε την επεξεργασία που υφίστανται το «πήγμα ηλεκτροφόρησης», μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, προκειμένου να γίνουν ορατά τα τμήματα του υλικού το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση π.χ. «μπάντες» DNA. Παρακάτω παρουσιάζονται δύο τεχνικές για steaning. Πρέπει να σημειωθεί ότι η δεύτερη τεχνική είναι 5 φορές πιο ευαίσθητη από την πρώτη.

A) Μέθοδος ελευθέρων ιόντων AgNO_3

α) το πήγμα τοποθετείται σε γυάλινο ή πλαστικό δοχείο, αφού πρώτα απομακρυνθεί από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, το οποίο βρί-

σκεται πάνω σε κινούμενη πλατφόρμα-*shaker* (φωτ. 6), μέσα στο οποίο θα προχωρήσει η όλη τεχνική.

β) πλύση με «buffer μεθανόλης-οξικό οξύ» (40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 30 λεπτά

γ) πλύση με απεσταγμένο νερό για 1 λεπτό

δ) πλύση με διάλυμα AgNO_3 12mM για 30 λεπτά

ε) διαδοχικές πλύσεις με απεσταγμένο νερό για 10 λεπτά

στ) πλύση με υδατικό διάλυμα το οποίο περιέχει 29gr/lit NaCO_3 και 185gr/lit HCHO .

B) Μέθοδος διαμινικού συμπλέγματος αργύρου (Ag) και αμμωνίας (NH_3)

α) αρχικά επαναλαμβάνονται τα τρία πρώτα στάδια της μεθόδου Α).

β) πλύση με υδατικό διάλυμα $\text{AgNO}_3/\text{NH}_4\text{OH}$ για 15 λεπτά

γ) πλύση με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά

δ) πλύση με υδατικό διάλυμα $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{HCHO}$ (0,5% w/v $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5% v/v HCHO) μέχρι να γίνει ορατό το υλικό.

Μετά την ολοκλήρωση και των δύο μεθόδων όπως περιγράφηκαν παραπάνω μπορεί να τοποθετηθεί το πήγμα πάνω σε πηγή φυσικού φωτός και να φωτογραφηθεί.

Ο ρόλος των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στο steaning.

-το οξικό οξύ χρησιμοποιείται για τη συσσωμάτωση του υλικού και την παραμονή του στο πήγμα

-η μεθανόλη προσδένεται στο υλικό μας (DNA/RNA) και δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για το AgNO_3 αργότερα

-οι ουσίες NaCO_3 και $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ οξειδώνουν τον άργυρο, που έχει ήδη προσδεθεί, σε μεταλλικό άργυρο με αποτέλεσμα το τυχόν υλικό το οποίο υπάρχει εντός του πηγματος αποκτά σκούρο χρώμα

-οι πλύσεις με νερό γίνονται προκειμένου να απομακρυνθεί ο άργυρος από ακατάλληλες θέσεις

-το διάλυμα 5% οξικού οξέως σταματά την περαιτέρω οξείδωση του αργύρου, η οποία δίδει το σκούρο χρώμα στο πήγμα.

2. 4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (TLC)

Με τη μέθοδο αυτή επιδιώκεται η ανίχνευση φθοριζουσών ουσιών σ' ένα δείγμα π.χ χλωροπλάστες, μιτοχόνδρια κ.λ.π Για την εφαρμογή της τεχνικής TLC ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

α) Λαμβάνονται 500ml δείγματος π.χ χλωροπλάστες, μιτοχόνδρια κ.λ.π και μεταφέρονται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Σ' αυτό το σωλήνα γίνεται προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου. Εν' συνεχεία γίνεται φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 12000 x g. Στην υποκείμενη φάση μετά τη φυγοκέντριση υπάρχει χλωροφόρμιο και οργανικά συστατικά. Μεταξύ της υπερκείμενης υδατικής και της υποκείμενης φάσης υπάρχει πρωτεϊνική στοιβάδα. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και οι μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες παραμένουν ανοικτοί προκειμένου να εξατμισθεί το χλωροφόρμιο και να συμπυκνωθεί το δείγμα. Η παραπάνω διαδικασία επιταχύνεται με την παραμονή των μικροφυγοκεντρικών σωλήνων στους -20°C για λίγα λεπτά.

β) Εν' συνεχεία, με τη βοήθεια πιπέτας Paster, μεταφέρεται ποσότητα από το υλικό που κατακάθησε, μετά τη φυγοκέντριση, σε πλάκα T.L.C 20x20cm με επίστρωση silica gel 60 F254. (φωτ. 10) Τοποθετείται όσο το δυνατόν περισσότερο υλικό γιατί δεν γνωρίζουμε την ποσότητα των ουσιών που είναι προς ανίχνευση. Η τοποθέτηση των δειγμάτων γίνεται κατά μήκος μιας νοητής γραμμής παράλληλης προς την κάτω πλευρά και σε απόσταση 1,5cm απ' αυτή (σχ. 1). Αφού τα δείγματα έχουν πλήρως απορροφηθεί από το υλικό της TLC-πλάκας αυτή τοποθετείται σε δεξαμενή-δοχείο που περιέχει 400ml μίγματος ανάπτυξης(φωτ.11/σχ. 2) το οποίο μπορεί να αποτελείται από:

- i) βενζένιο και μεθανόλη 19:1v/v ή
- ii) χλωροφόρμιο ή
- iii) αιθυλοξικό οξύ και κυκλοεξάνιο 1:1v/v ή
- iv) αιθυλοξικό οξύ και εξάνιο 1:3 v/v

Η πλευρά της πλάκας που έχει τα δείγματα τοποθετείται στο μίγμα ανάπτυξης το οποίο κινούμενο με τριχοειδή δράση μέσα στη πλάκα-προς τα πάνω- συμπαρασύρει τις ουσίες του δείγματος. Αφήνεται το μέτωπο του δείγματος να φτάσει σχεδόν μέχρι την πάνω πλευρά της πλάκας.

γ) Κατόπιν γίνεται παρατήρηση των συστατικών σε φυσικό διάχυτο φως-μη φθορίζων. Εν' συνεχεία τοποθετείται η πλάκα πάνω σε πηγή UV-ακτινοβολίας για την ανίχνευση φθορίζουσων ουσιών. Για κάθε ουσία σημειώνεται το χρώμα της και η τιμή του συντελεστή Rf. Σαν τιμή Rf ορίζεται ο λόγος της απόστασης που διάνυσε το συστατικό προς την απόσταση που διανύθηκε από το μέτωπο του μίγματος ανάπτυξης. **σημείωση:** μπορεί αρχικά η πλάκα να τοποθετηθεί σε μίγμα ανάπτυξης Α π.χ αιθυλοξικό οξύ-εξάνιο 1:3, να ληφθούν παρατηρή-

σεις και εν' συνεχεία να τοποθετηθεί σε άλλο μίγμα ανάπτυξης π.χ χλωροφόρμιο και ομοίως να ληφθούν παρατηρήσεις.

2. 5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ BUFFERS-ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Για την παρασκευή των διαλυμάτων τα οποία αναφέρθησαν στα παραπάνω πρωτόκολλα απαιτούνται τα εξής:

- πιπέτες για τη μεταφορά μικροόγκων μεταξύ των δοχείων (φωτ.12)
- ζυγαριά για το ζύγισμα στερεών ουσιών (φωτ.13)
- ηλεκτρονικό pHμετρο για τον ακριβή προσδιορισμό-διόρθωση του pH των διαλυμάτων (φωτ.14)
- μικρός δονητής-ανακινητής για την ανακίνηση των διαλυμάτων εντός των μικροφυγοκεντρικών σωλήνων.

1. Buffer Απομόνωσης Μιτοχονδρίων και Χλωροπλαστών

συστατικά	τελική συγκέντρωση
Tris 1M pH=7	50mM
EDTA 500Mm	10mM
Μανιτόλη MB=180	300mM
PVP-40	0,2%w/v
B-μερκαπτεθανόλη 10mM MB=78	20mM

Τέλος γίνεται προσθήκη απεσταγμένου νερού.

Ο ρόλος των συστατικών του παραπάνω buffer:

«Tris buffer»: ρυθμίζει το pH του διαλύματος

«EDTA»: δεσμεύει τα δισθενή ιόντα αδρανοποιώντας τις DNAσες

«Μανιτόλη»: διατηρεί τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες άθικτους

«PVP-40»: δεσμεύει τις φαινολικές ουσίες οι οποίες αντιδρούν με το DNA

«B-μερκαπτεθανόλη»: διατηρεί το περιβάλλον αναγωγικό για την αποφυγή οξειδώσεων

2. Buffer 10XT.B.E. pH ε [8,0-8,3]

συστατικά	Τελική συγκέντρωση
Tris MB=121	200mM
Βορικό οξύ MB=62	200mM
EDTA MB=370	20,0mM

Τέλος γίνεται προσθήκη απεσταγμένου νερού. Κατόπιν ακολουθεί ρύθμιση του pH ώστε pH=8,0-8,3. Αν pH>8,3 τότε προσθέτουμε

βορικό οξύ. Σε αντίθετη περίπτωση προστίθεται Tris. Ο ρόλος των συστατικών του παραπάνω buffer:

«Tris»: διατηρεί το pH σταθερό

«Βορικό οξύ»: διατηρεί το pH σταθερό και χρησιμοποιείται σαν κατιόν

«EDTA»: χρησιμοποιείται για την πρόσδεση των δισθενών ιόντων προκειμένου να μην καταστρέφεται το DNA από τις DNAσες οι οποίες χρειάζονται δισθενή ιόντα

3. Buffer T.E pH=8

συστατικά	Τελική συγκέντρωση
Tris pH=8,0 1M	10mM
EDTA MB=370 500mM	1mM

Τέλος γίνεται προσθήκη απεσταγμένου νερού. Ακολουθεί ρύθμιση-διόρθωση του pH με HCl.

4. Buffer CH₃OH/CH₃COOH

συστατικά	τελική συγκέντρωση
μεθανόλη CH ₃ OH	40%
οξικό οξύ CH ₃ COOH	10%

Τέλος γίνεται προσθήκη απεσταγμένου νερού.

5. Διάλυμα AgNO₃/NH₄OH

- Αρχικά παρασκευάζεται όγκος υδατικού διαλύματος AgNO₃(MB=170) ώστε η συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα να είναι 0,05M
- Κατόπιν παρασκευάζεται ίσος προς το παραπάνω όγκος υδατικού διαλύματος NH₄OH/NaOH, ώστε η συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα να είναι για το NH₄OH 0,625%v/v και για το NaOH 0,05M. Υπενθυμίζεται ότι το NH₄OH προφυλάσει τον AgNO₃ από το μαύρισμα.
- Το τελικό διάλυμα προκύπτει από την προσθήκη του πρώτου στο δεύτερο. ΠΡΟΣΟΧΗ!! αν γίνει το αντίθετο μπορεί να προκληθεί έκρηξη.

6. Διάλυμα C₆H₅Na₃O₇•5H₂O/HCHO

συστατικά	τελική συγκέντρωση
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ •2H ₂ O	0,5%w/v
HCHO	0,5%v/v

7. Διάλυμα ArSO_4

Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται-έστω 1ml-με τη διάλυση 0,1gr σε 1ml απεσταγμένου νερού.

8. Φαινόλη κορεσμένη με 1M Tris buffer pH=8,0

⇒ Αρχικά λαμβάνεται καθαρή κρυσταλλική φαινόλη αποσταγμένη στους 160°C , η οποία συνήθως αποθηκεύεται στους -20°C σε φιάλες με N_2 προς αποφυγή δημιουργίας προϊόντων οξείδωσης.

⇒ Αφήνεται σε υδατόλουτρο (68°C) για να προκληθεί τήξη.

⇒ Δημιουργείται διάλυμα Tris όγκου 500ml με την ανάμειξη 50ml διαλύματος Tris 1M pH=8,0 και 450ml απεσταγμένου νερού.

⇒ Λαμβάνονται 100ml φαινόλης και αναμιγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος Tris. Ακολουθεί ανακίνηση και κατόπιν ηρεμία προκειμένου να διαχωρισθούν οι φάσεις. Λαμβάνουμε την κάτω φάση και μετράμε το pH της.

⇒ Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία μέχρι το pH αποκτήσει την τιμή 8.

⇒ Κατόπιν προσθέτουμε στρώμα από το υπερκείμενο buffer εκχυλίσεως καθώς και μερκαπτεθανόλη.

⇒ Η φαινόλη αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C . Είναι χρήσιμη για 1 μήνα.

9. 10 x DNA loading buffer

συστατικά	τελική συγκέντρωση
γλυκερόλη	50%
10 x TBE buffer	10%
μπλε της βρωμοφαινόλης	1-2 σταγόνες

Επεξήγηση συντομογραφιών:

Tris: Tris[hydroxymethyl]aminomethane

EDTA: ethylenediamine tetra acetic acid

PVP: polivinyl pyrrolidone

TEMED: N, N, 'N, 'N-Tetramethylethylenediamine

DEAE: Διαθυλαμινοαιθυλ-

TE: Tris EDTA

TBE: Tris Boric acid EDTA

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά έγινε προμήθεια έρριζων μοσχευμάτων χρυσανθέμων από την περιοχή Σερρών. Τα μοσχεύματα εγκαταστάθηκαν σε 20 γλάστρες προκειμένου να ληφθούν υγιή φυτά. Κατόπιν τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο (φωτ. 15) στον οποίο επικρατούσαν οι εξής συνθήκες:

- i) πλήρης φωτισμός
- ii) διάρκεια ημέρας 16 ώρες και
- iii) θερμοκρασία ημέρας: 18°C, θερμοκρασία σκότους: 16°C Με τις παραπάνω συνθήκες εξασφαλίζεται η βλαστική ανάπτυξη των χρυσανθέμων και η ομαλή εγκατάστασή τους στις γλάστρες. Στα φυτά εφαρμόζονταν συχνά ποτίσματα με μικρή ποσότητα νερού. Τα φυτά παρέμειναν στις παραπάνω συνθήκες για 70 ημέρες.

Κατόπιν οι μισές γλάστρες μεταφέρθηκαν σε νέο θάλαμο και τέθηκαν κάτω από συνθήκες οι οποίες ευνοούν την εγκατάσταση ανθικής καταβολής, αρχικά, και κατόπιν σε συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη των ανθέων. Τέτοιες συνθήκες είναι:

- i) πλήρης φωτισμός
- ii) διάρκεια ημέρας: 14 ώρες για 2 εβδομάδες (εγκατάσταση ανθικής καταβολής)

διάρκεια ημέρας: 8 ώρες (ανάπτυξη ανθέων)

- iii) θερμοκρασία ημέρας: 21°C και θερμοκρασία νύκτας: 16°C Οι υπόλοιπες γλάστρες παρέμειναν στις αρχικές συνθήκες.

Από τα φυτά που βρίσκονταν σε συνθήκες μεγάλης ημέρας ελήφθησαν φύλλα από τη βάση του φυτού προκειμένου να απομονωθεί χλωροπλαστικό και μιτοχονδριακό DNA. Από τα χρυσάνθεμα τα οποία βρίσκονταν σε μικρή ημέρα ελήφθησαν φύλλα από τη βάση προκειμένου να γίνουν οι ίδιες απομονώσεις. Επίσης ελήφθησαν πέταλα από άνθη για απομόνωση DNA από χρωμοπλάστες και μιτοχόνδρια.

Εν' συνεχεία χρησιμοποιώντας το ίδιο υλικό έγινε απομόνωση ολικού DNA.

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε απομόνωση μιτοχονδριακού και χλωροπλαστικού DNA με βάση το τροποποιημένο πρωτόκολλο απομόνωσης των παραπάνω. Το υλικό το οποίο συλλέχθηκε από τις απομονώσεις υπέστη ηλεκτροφόρηση σε πήγμα ακρυλαμίδης προκειμένου να γίνουν ορατές τυχόν διαφορές στο DNA των φυτών με άνθη και εκείνων χωρίς άνθη. Προκειμένου να διευρύνουμε το πεδίο αναζήτησης γύρω από τα αίτια της άνθισης έγινε χρήση της τεχνικής της «χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας» (TLC) για μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες. Τέλος ακολούθησε ανάλογη σύγκριση των αποτελεσμάτων.



Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε πρώτη φάση έγιναν απομονώσεις μιταχονδριακού και χλωροπλαστικού DNA/RNA καθώς επίσης και ολικού DNA. Οι απομονώσεις αυτές έγιναν από φύλλα και πέταλα ανθισμένων χρυσανθέμων και από φύλλα χρυσανθέμων τα οποία δεν έχουν δεχθεί συνθήκες οι οποίες να προάγουν την άνθιση. Τα φύλλα ελήφθησαν από τα χαμηλότερα τμήματα του στελέχους των χρυσανθέμων μιας και ήδη έχει διατυπωθεί η υπόνοια για την ύπαρξη ενός ορμονικού παράγοντα, ο οποίος επιδρά στην άνθιση, σ' αυτά τα φύλλα. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε με την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων κάνοντας διαχωρισμό μεταξύ αυτών που ελήφθησαν από χρυσάνθεμα με άνθη και εκείνων χωρίς άνθη.

Η πρώτη ηλεκτροφόρηση έγινε με δείγματα ολικού DNA και με κυμαινόμενη συγκέντρωση NaCl από 600mM έως 1000mM προκειμένου να αναγνωρίσουμε την βέλτιστη συγκέντρωση NaCl για την αποδέσμευση ουσιών (και DNA) από την DEAE cellulose. Τα αποτελέσματα όπως φαίνονται στη φωτογραφία 16 δεν δίνουν κάποιες σημαντικές διαφορές. Το μόνο το οποίο θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε είναι η ύπαρξη δύο κατακόρυφων μπαντών στο δείγμα 8 το οποίο προέρχεται από τα φύλλα των φυτών με άνθη και τελική συγκέντρωση NaCl 1000mM. Αυτές οι μπάντες δεν εμφανίζονται στα φυτά χωρίς άνθη. Με την χρήση των συγκεκριμένων δειγμάτων έγιναν και άλλες ηλεκτροφορήσεις οι οποίες δεν επιβεβαίωσαν την παραπάνω παρατήρηση. Για τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζεται σε μικρό ή μεγάλο βαθμό ενιαίο σκούρο χρώμα (smear) το οποίο μπορεί να οφείλεται στην αποδέσμευση ανεπιθύμητων ουσιών από τη DEAE cellulose.

Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι προκειμένου να ελαχιστοποιήσουμε την επίδραση των τεχνικών στα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έγινε χρήση της μεθόδου «του διαμινικού συμπλόκου αργύρου και αμμωνίας» ή οποία είναι και η πλέον ευαίσθητη.

Εν' συνεχεία έγινε ηλεκτροφόρηση σε δείγματα DNA/RNA από μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες. Τα αποτελέσματα απ' αυτή την ηλεκτροφόρηση φαίνονται στη φωτογραφία 17. Εδώ τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν καμιά αξιοσημείωτη ιδιαιτερότητα. Σε όλα τα δείγματα εμφανίζεται smear.

Σ' αυτό το σημείο γεννιόνται δύο ερωτήματα γύρω από την αδυναμία των μέχρι στιγμής πειραμάτων μας να δώσουν αποτελέσματα:

- i) υπάρχει σφάλμα στις τεχνικές της απομόνωσης και της ηλεκτροφόρησης; ή
- ii) υπάρχουν διαφορές μεταξύ των DNA/RNA στα ανθισμένα και μη χρυσάνθεμα;

Πιθανό είναι να ισχύει το (i) μιας και το (ii) δεν μπορούμε ούτε να το επιβεβαιώσουμε ούτε να το απορρίψουμε με τα μέχρι στιγμής δεδομέ-

να. Πιο συγκεκριμένα το πρόβλημα εντοπίζεται στην αποφυγή εκροής από την DEAEcellulose ανεπιθύμητων ουσιών.

Προκειμένου να αναζητήσουμε τις διαφορές μεταξύ των ανθισμένων και μη χρυσανθέμων προχωρήσαμε στην εφαρμογή της «Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας-TLC» για δείγματα από μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες.

Στις φωτογραφίες 18α, β οι οποίες ελήφθησαν από την πλάκα TLC είναι ευδιάκριτη η ύπαρξη μιας φθορίζουσας ουσίας ($R_f=12,7/13,0$) στους χλωροπλάστες των φύλλων των χρυσανθέμων με άνθη. Αντίστοιχη ουσία στα χρυσάνθεμα χωρίς άνθη δεν εμφανίζεται. Αυτή η ουσία απομακρύνθηκε από την πλάκα και εστάλει στο Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων για να ληφθεί το φάσμα της από φασματογράφο μάζας. (βλ. παράρτημα) Επίσης ο Dr. Πετρούλεας Βασιλίας έστειλε το φάσμα του υπέρυθρου γι' αυτή την ουσία. (βλ. παράρτημα)

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα παραπάνω φάσματα είναι τα εξής:

➤ πρόκειται για μια *αλειφατική ένωση* με Μοριακό Βάρος 284. Η «*βασική κορυφή*» η οποία βρίσκεται μέσα στο μόριο έχει Μοριακό Βάρος 118. Επίσης καταλαβαίνουμε ότι η ένωση περιέχει O2.

➤ το μέγιστο απορρόφησης στο υπέρυθρο βρίσκεται στα 225nm ενώ υπάρχει μια ακόμα κορυφή μεταξύ των 270 έως 280nm.

➤ από το φάσμα του υπέρυθρου προέρχονται τα πιο σημαντικά στοιχεία:

i) η ευρείας έκτασης μπάντα στα 3360cm^{-1} δηλώνει την ύπαρξη -OH ομάδας. Επίσης κάνει σαφείς την ύπαρξη πολυμερών αλυσίδων των μορίων της ένωσης με δεσμούς υδρογόνου. Ακόμη μπορούμε να συμπεράνουμε ότι δεν υπάρχουν ακόρεστοι δεσμοί αλλά μόνο sp^3 -υβριδισμένοι δεσμοί μεταξύ άνθρακα και υδρογόνου.

ii) στην περιοχή $2500\text{-}3000\text{cm}^{-1}$ υπάρχουν δύο ζεύγη μπαντών ($2520\text{cm}^{-1}/2597\text{cm}^{-1}$) και ($2835\text{cm}^{-1}/2940\text{cm}^{-1}$). Φαίνεται λοιπόν πιθανή η ύπαρξη ενός εξαμερούς δακτυλίου μιας και παραπάνω είχαμε Παρατηρήσει την ύπαρξη σταθερής δομής εντός του μορίου της ένωσης.

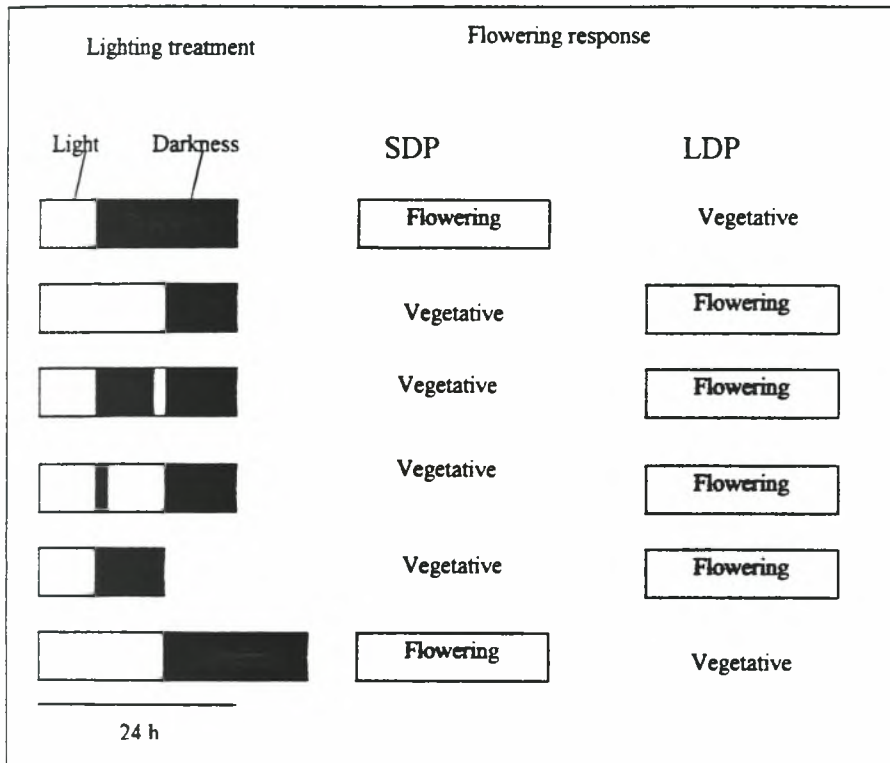
iii) στην περιοχή $1500\text{-}700\text{cm}^{-1}$ παρατηρούνται συνήθως πολυάριθμες απορροφήσεις που οφείλονται συνήθως σε δονήσεις τάσεως και κάμψεως απλών δεσμών, καθώς και σε διεγέρσεις ολόκληρων μορίων. Οι περισσότερες απ' αυτές τις απορροφήσεις έχουν μικρή διαγνωστική αξία, αλλά στο σύνολό τους είναι χαρακτηριστικές για κάθε συγκεκριμένη ένωση, γι' αυτό και το τμήμα αυτό του φάσματος ονομάζεται «*περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος*»

(Αλεξάνδρου, Ν. Ε., Βάρβογλη, Α. Γ., 1993). Με βάση τα παραπάνω στη περιοχή αυτή συναντάμε μία μπάντα στα 1451cm^{-1} η οποία πιθανώς οφείλεται σε CH_2 και CH_3 . Η μπάντα στα $600\text{-}700\text{cm}^{-1}$ σε αλυσίδα $-(\text{CH}_2)_n-$ με $n \geq 4$. Τέλος οι μπάντες 1030 και 1112cm^{-1} οφείλονται σε δεσμούς C-O και O-H αντίστοιχα.

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω καταλήγω στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μια πρωτοταγή αλκοόλη με γενικό τύπο RCH_2OH η οποία συναντάται στους γλωροπλάστες των φύλλων από ανθισμένα φυτά και η οποία ενδέχεται να παίζει κάποιο ρόλο στην πρόκληση της άνθισης μιας και δεν εμφανίζεται στα μη ανθισμένα φυτά.

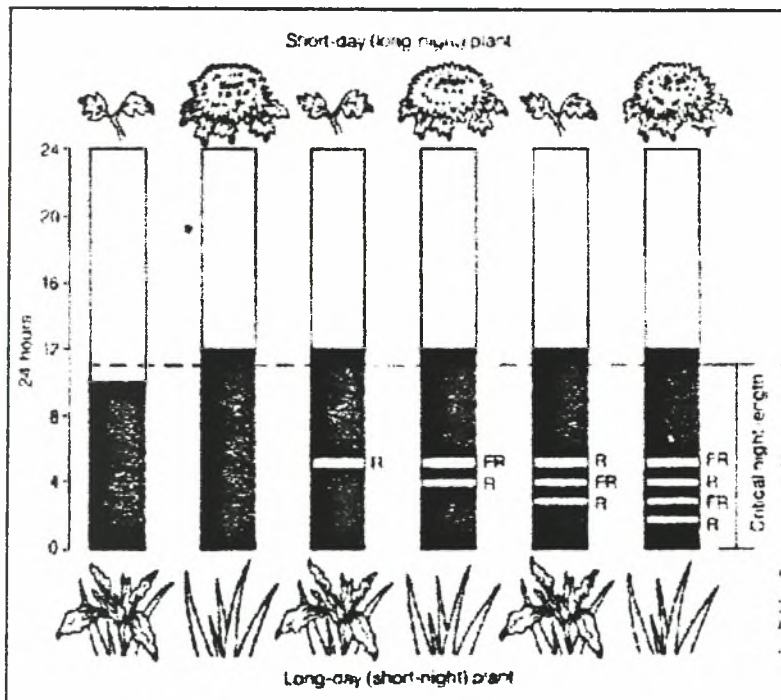


Δ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



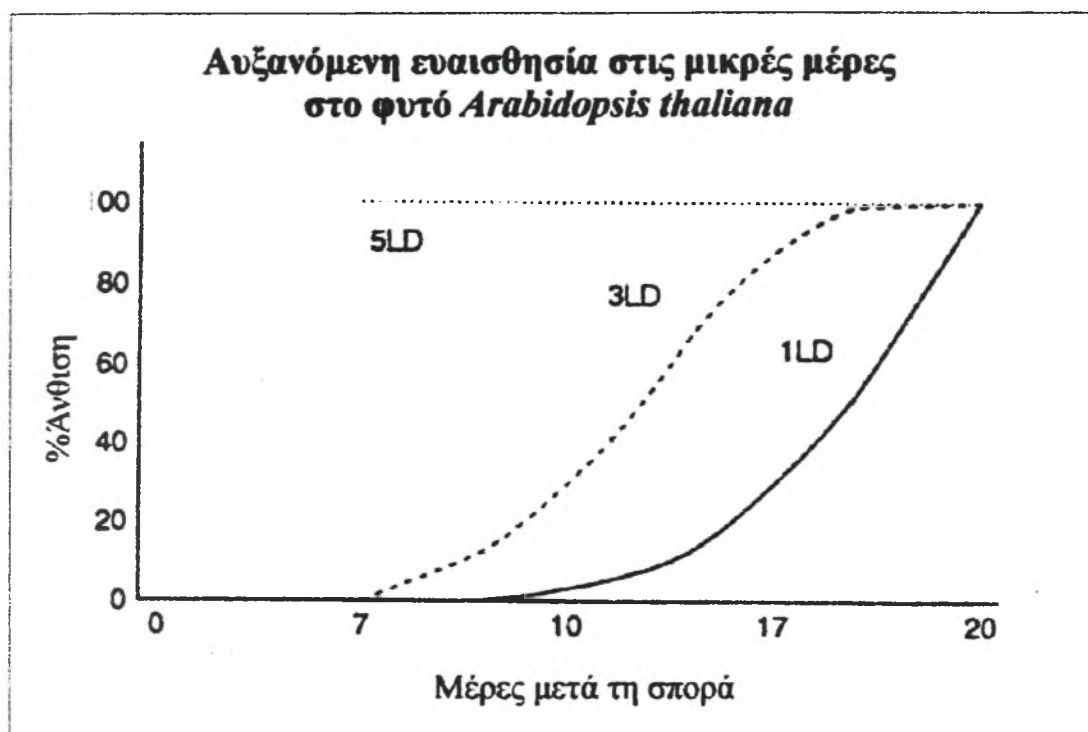
Πίνακας 1

Εμφάνιση των αποτελεσμάτων της σκοτεινής περιόδου στην άνθιση. Φαίνεται ότι στο σύνολο των φυτών η κρίσιμη περίοδο όσο αφορά την άνθιση είναι η σκοτεινή.



Πίνακας 2

Έλεγχος της άνθισης από ερυθρό και υπέρυθρο φως. Η χρήση ερυθρού φωτισμού στα διαλείμματα της σκοτεινής φάσης είναι η πλέον αποτελεσματική. Στα “μεγάλης ημέρας φυτά” - LDP προάγεται η άνθιση εκτός αν υπάρξει επόμενο διάλειμμα



Διάγραμμα 1

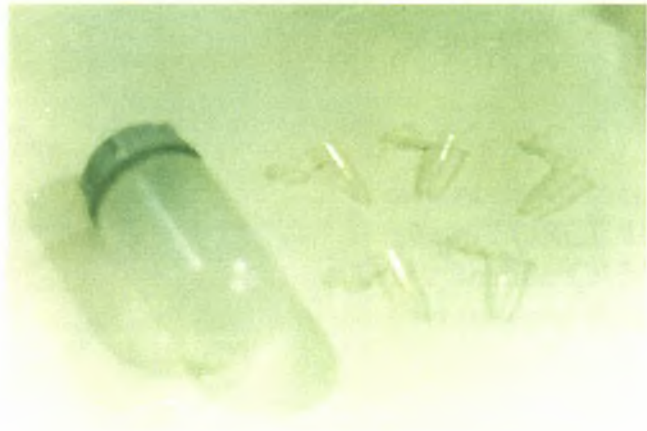
Η απόκριση του *Arabidopsis thaliana* σε 1, 3 ή 5 μικρές ημέρες δωσμένες σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. (Αδημοσίευτα στοιχεία από τους Mozley & Thomas)



Φωτ. 1:

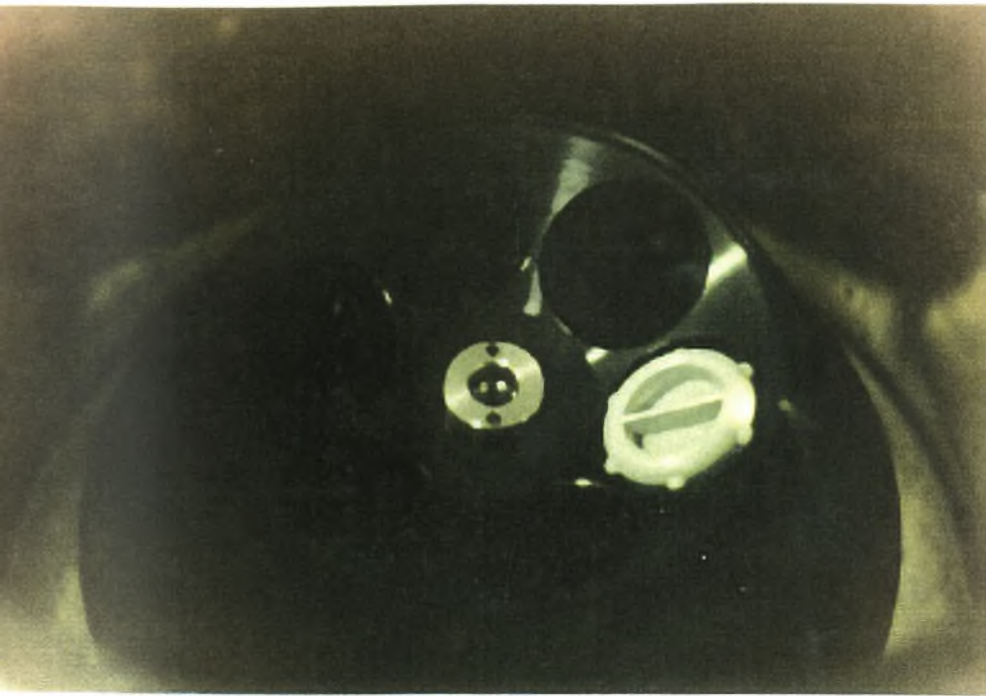
Ηλεκτρικός Ομογενοποιητής (μπλέντερ), αριστερά και δοχείο συγκέντρωσης διαλύματος μετά το πέρασμα μίγματος από συρμάτινο πλέγμα, δεξιά.

Φωτ. 2
Φυγοκεντρικοί
σωλήνες 2 μεγεθών

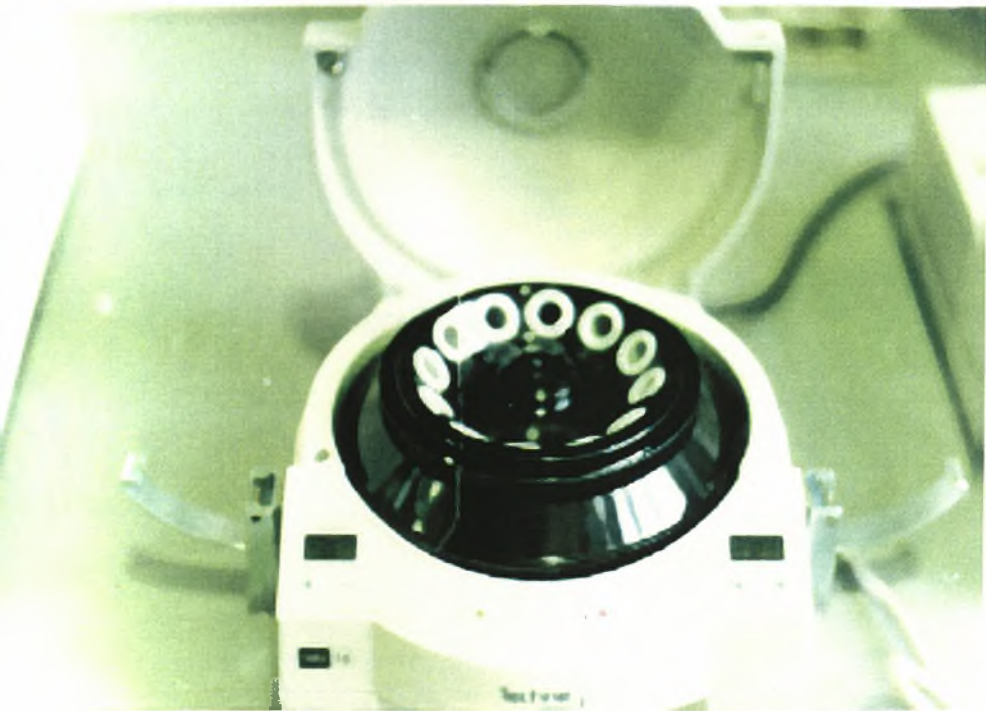


Φωτ. 3

Φυγόκεντρος τύπου
CENTRIKON T-124 της
KONTRON INSTRUMENTS
(για μεγάλους όγκους)



Φωτ. 4
Ρότορας Α 6, 14
 $R_{max} = 14,6cm$



Φωτ. 5
Μικροφυγόκεντρος
τύπου FORCE 16
της Techne CAMBRIDGE
(για μικρούς όγκους)

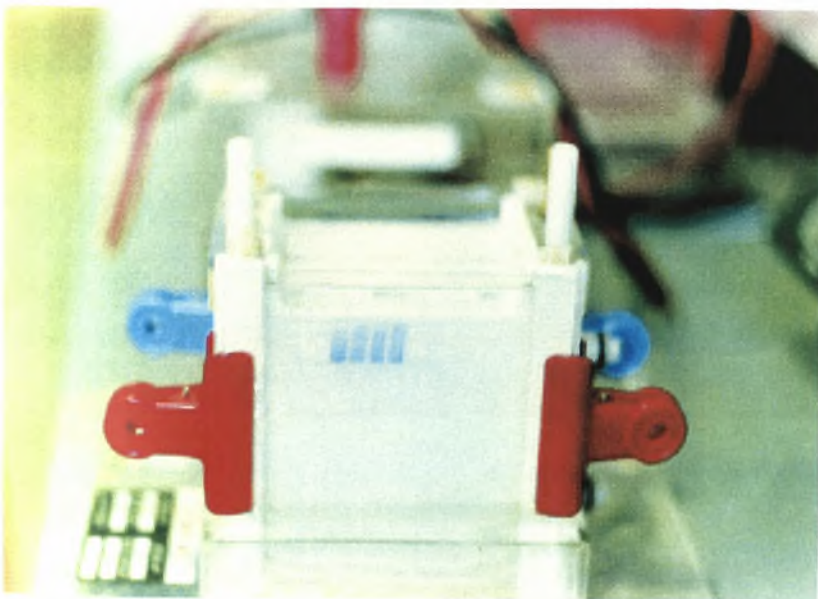
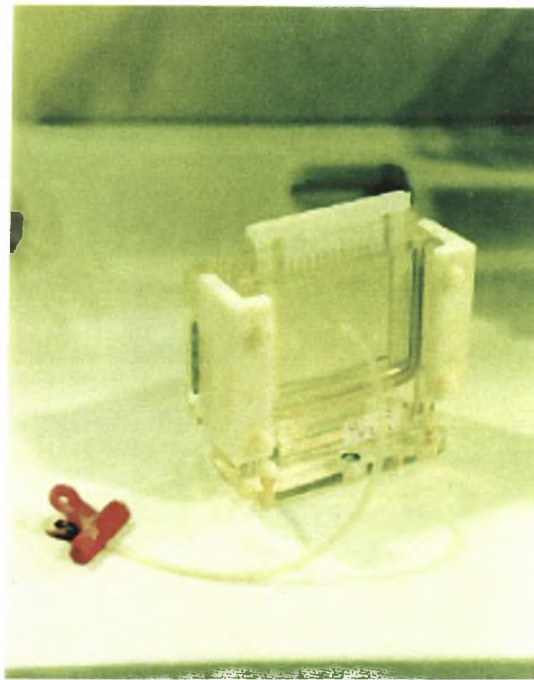


Φωτ. 6
Συσκευή - πλατφόρμα
ανακίνησης και ανάδευσης

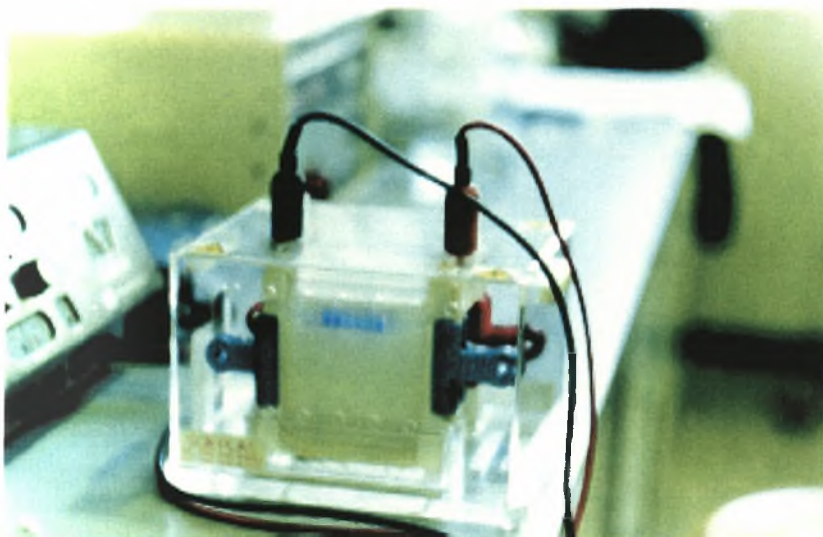


Φωτ. 7
Διάταξη διήθησης
διαλυμάτων

Φωτ. 8
Συσκευή παρασκευής
πήγματος - gel
ακρυλαμίδης

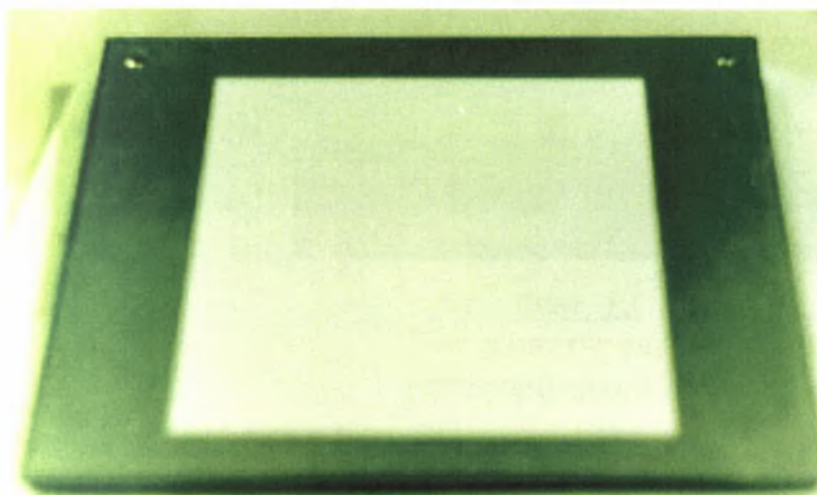


Φωτ. 9α
Συσκευή ηλεκτροφόρησης
πριν την έναρξη της
ηλεκτροφόρησης



Φωτ. 9β

Συσκευή ηλεκτροφόρησης
μετά την έναρξη της
ηλεκτροφόρησης



Φωτ. 10

Πλάκα TLC 20X20cm
με επίστρωση silica gel
60 F254



Φωτ. 11

Δοχείο εντός του
οποίου βρίσκεται
πλάκα TLC



Φωτ. 12
Πιπέτες για
μεταφορά μικροόγκων



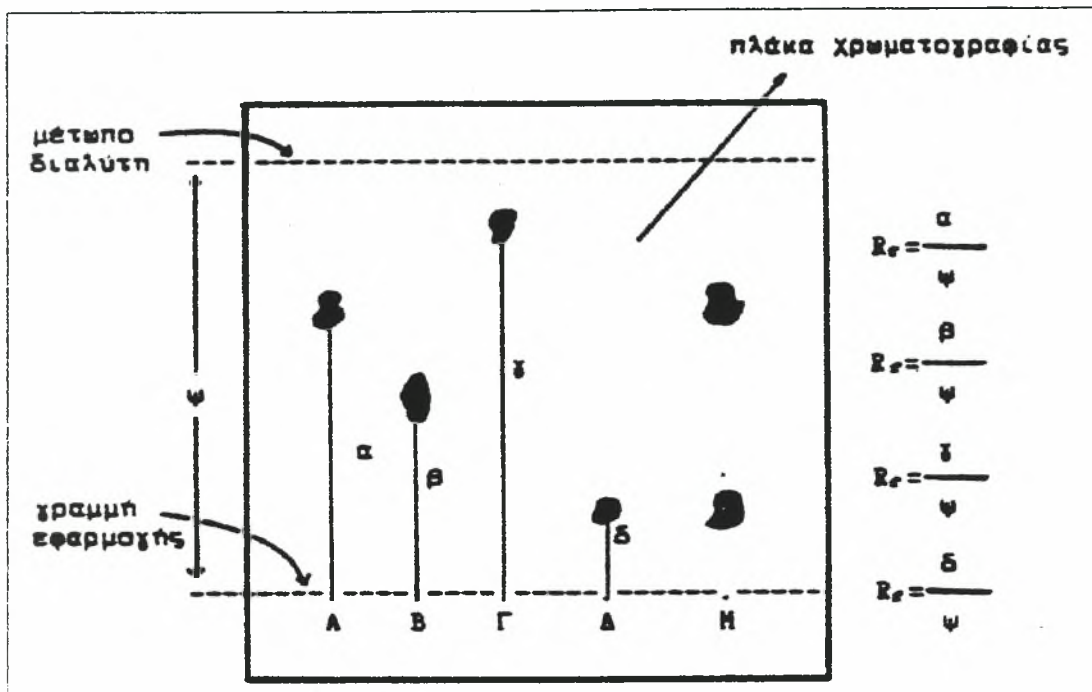
Φωτ.13
Ηλεκτρονική ζυγαριά



Φωτ. 14
Ηλεκτρονικό
ΡΗ μέτρο

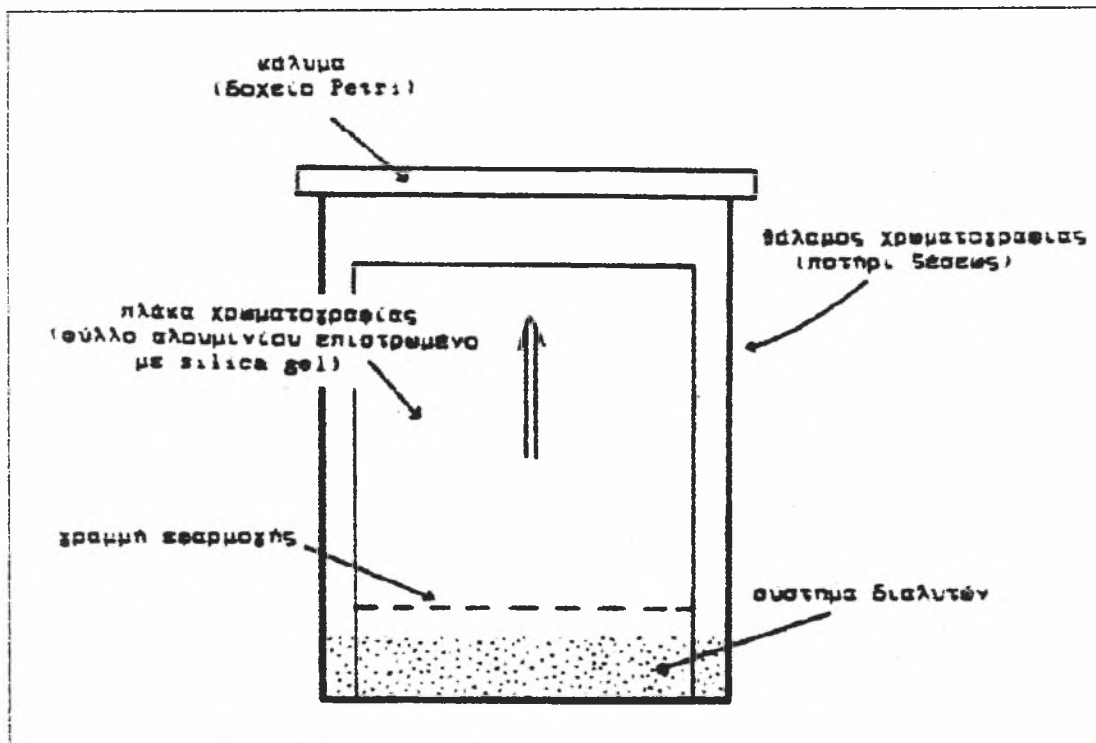


Φωτ. 15
Άποψη του θαλάμου
που καλλιεργήθηκαν
τα φυτά



Σχέδιο 1

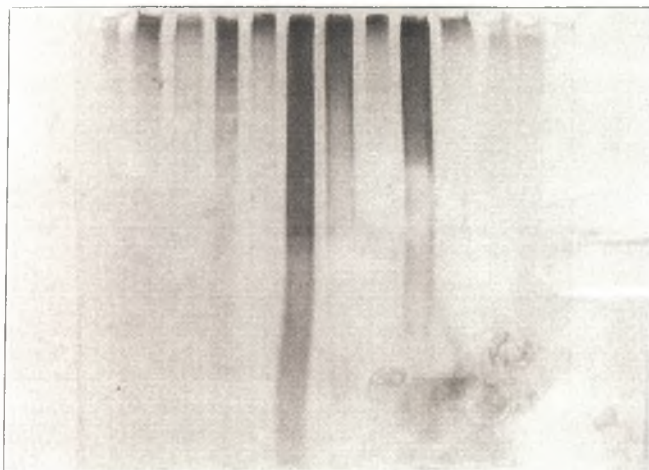
Απεικόνιση της τοποθέτησης του υλικού
πάνω σε πλάκα χρωματογραφίας



Σχέδιο 2

Τα απαραίτητα συστατικά ενός απλού συστήματος
χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας

1 2 3 4 5 6 7 8 9



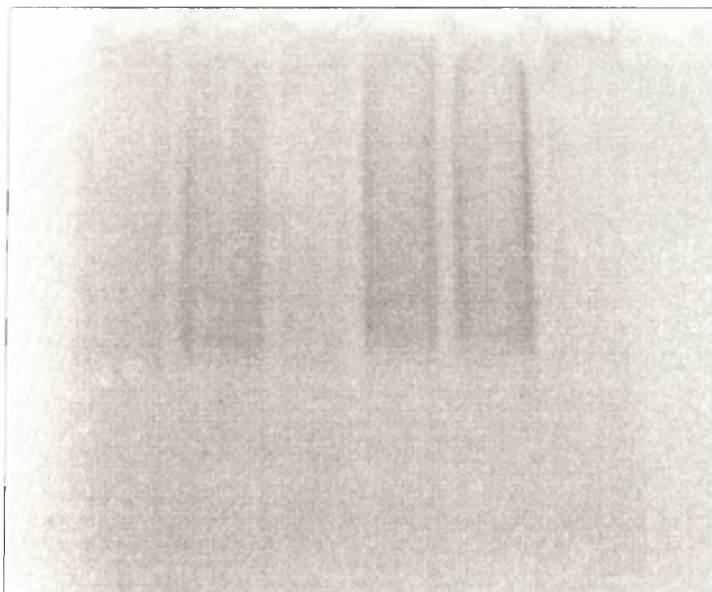
Φωτ. 16
Πήγμα από την 1η ηλεκτροφόρηση
με δείγματα ολικού DNA

Υπόμνημα Φωτ. 16

Τα δείγματα προέρχονται :

- | | |
|-----------------------------------|---------------|
| 1 από φύλλα από μη ανθισμένα φυτά | - 600mM NaCl |
| 2 από φύλλα από ανθισμένα φυτά | - 600mM NaCl |
| 3 από πέταλα | - 600mM NaCl |
| 4 από φύλλα από μη ανθισμένα | - 800mM NaCl |
| 5 από φύλλα από ανθισμένα φυτά | - 800mM NaCl |
| 6 από πέταλα | - 800mM NaCl |
| 7 από φύλλα από μη ανθισμένα φυτά | - 1000mM NaCl |
| 8 από φύλλα από ανθισμένα φυτά | - 1000mM NaCl |
| 9 από πέταλα | - 1000mM NaCl |

1 2 3 4 5 6

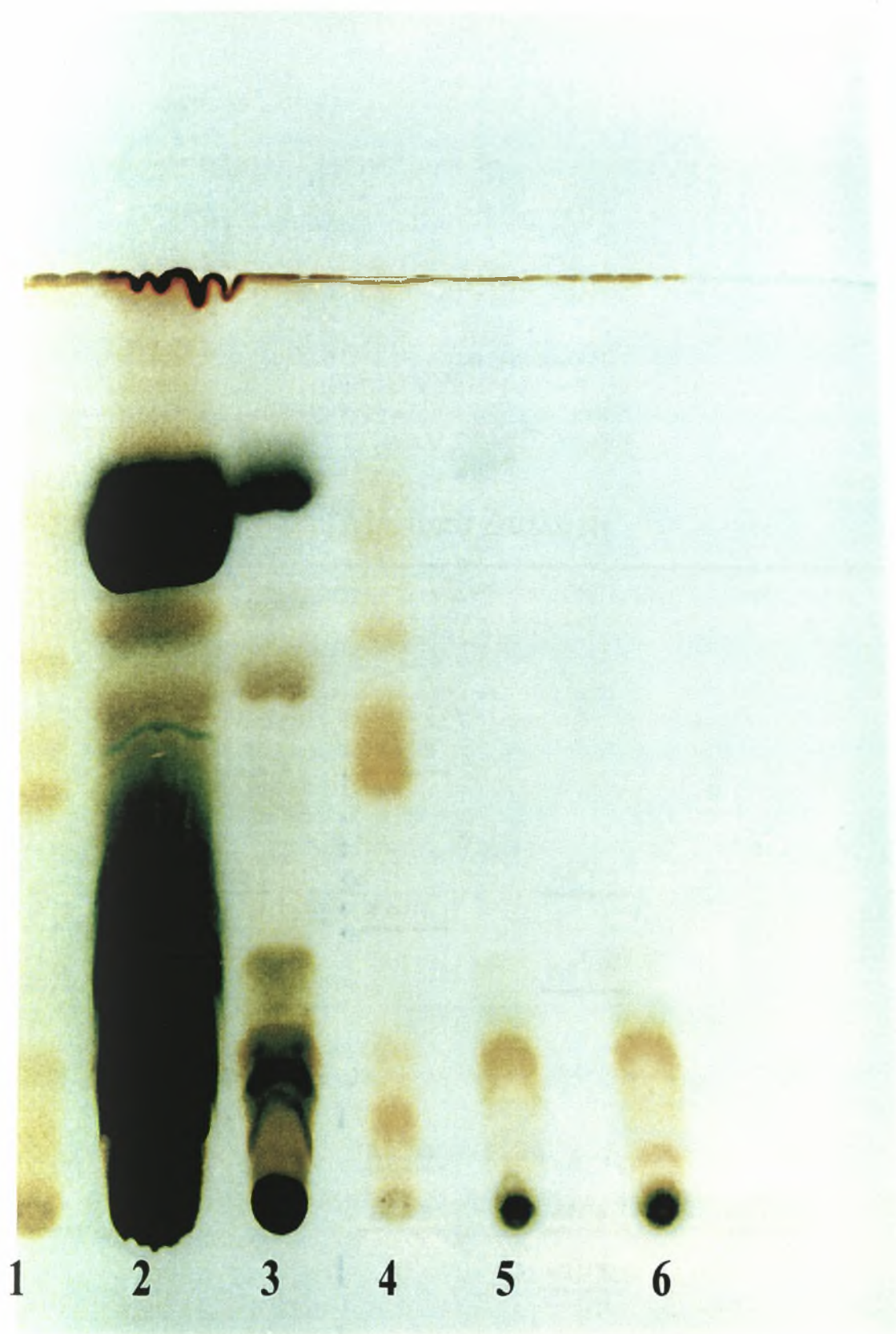


Φωτ. 17
Πήγμα από τη 2η ηλεκτροφόρηση
με δείγματα μιτοχονδριακού και
χλωροπλαστικού DNA

Υπόμνημα Φωτ. 17

Τα δείγματα προέρχονται :

- 1 από χρωμοπλάστες πετάλων
- 2 από χλωροπλάστες φύλλων ανθισμένων φυτών
- 3 από χλωροπλάστες φύλλων φυτών χωρίς άνθη
- 4 από μιτοχόνδρια πετάλων
- 5 από μιτοχόνδρια φύλλων ανθισμένων φυτών
- 6 από μιτοχόνδρια φύλλων φυτών χωρίς άνθη



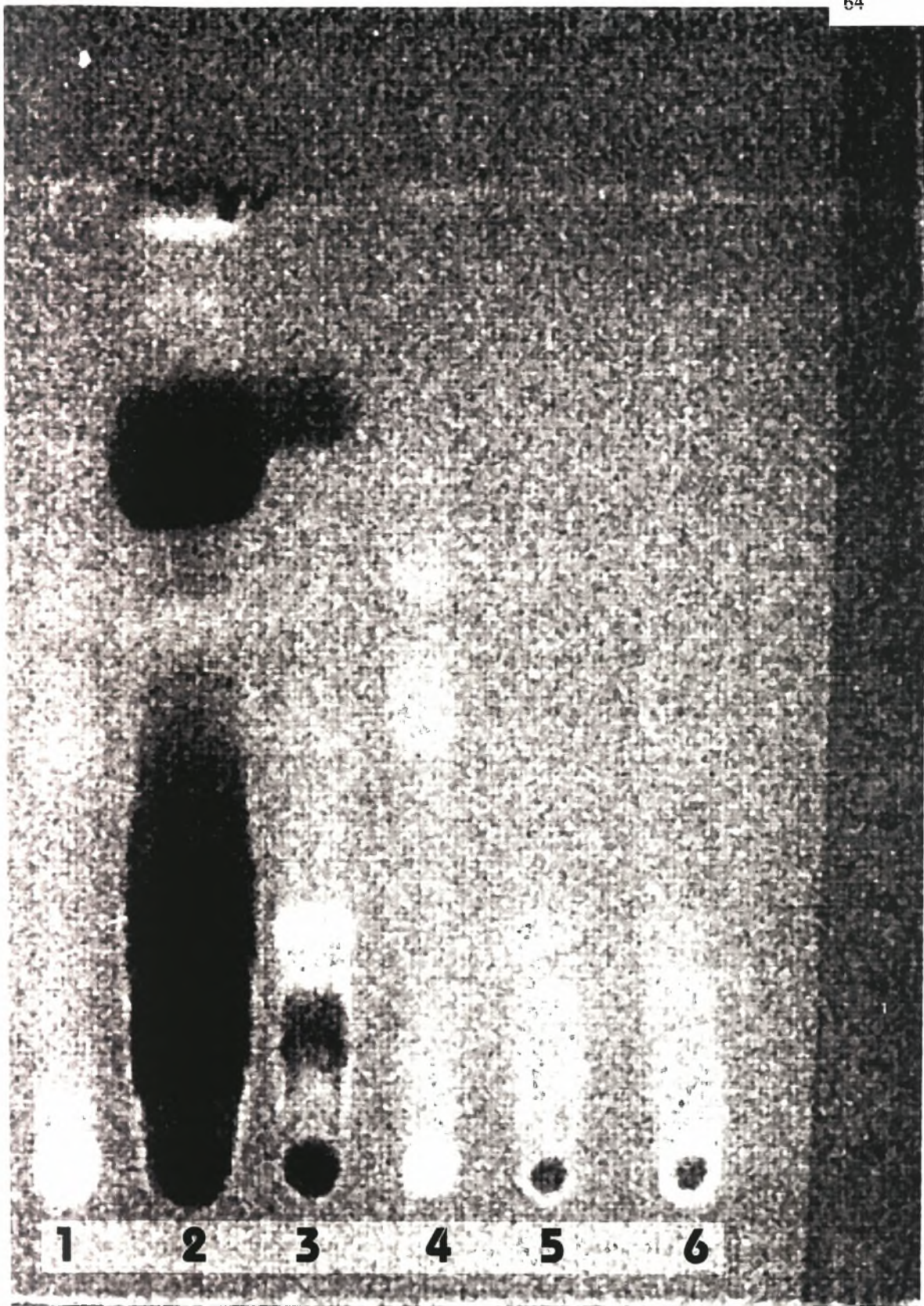
Φωτ. 18α

Απεικόνιση της πλάκας TLC που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία (υπό φυσικού φωτός)

Μέτωπο Διαλύτη

<u>*12.7/13</u>					
	<u>9,6/13</u>	<u>9,6/13</u>			
	<u>7,6/13</u>		<u>7,6*/13</u>		
<u>7,0*/13</u>	<u>6,7/13</u>	<u>7,0/13</u>			
<u>6,0*/13</u>			<u>6,0*/13</u>		
		<u>5,0*/13</u>			
<u>2,0/13</u>		<u>2,0/13</u>	<u>2,0/13</u>	<u>2,0*/13</u>	<u>2,0*/13</u>
			<u>1,0/13</u>		<u>0,8*/13</u>
1	2	3	4	5	6

Παρουσίαση των τιμών Rf για κάθε ουσία που φαίνεται στην πλάκα TLC της φωτογραφίας 18α



Φωτ. 18β

Απεικόνιση των πλάτης TLC που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία (υπό υπέρυθρο φως)

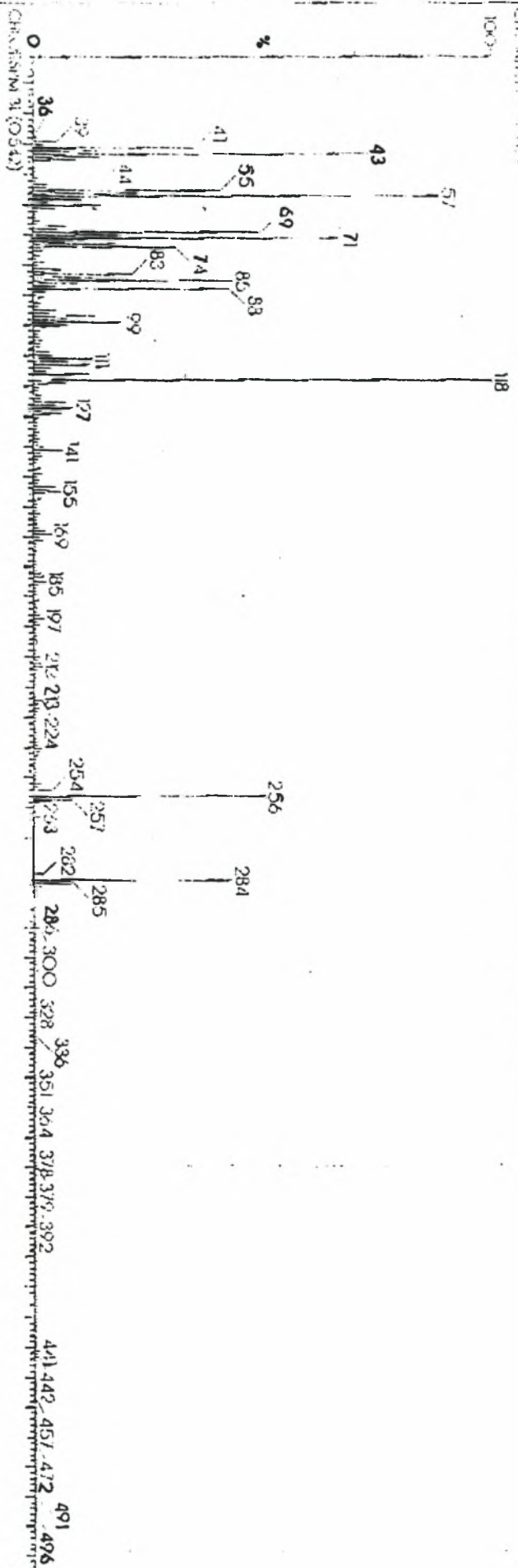
Υπόμνημα φωτ. 18α/β Τα δείγματα προέρχονται από :

1. χρωμοπλάστες από άνθη
2. χλωροπλάστες από φύλλα φυτών με άνθη
3. χλωροπλάστες από φύλλα φυτών χωρίς άνθη
4. μιτοχόνδρια από άνθη
5. μιτοχόνδρια από φύλλα φυτών με άνθη
6. Μιτοχόνδρια από φύλλα φυτών χωρίς άνθη

GOUNARIS ET MEONI

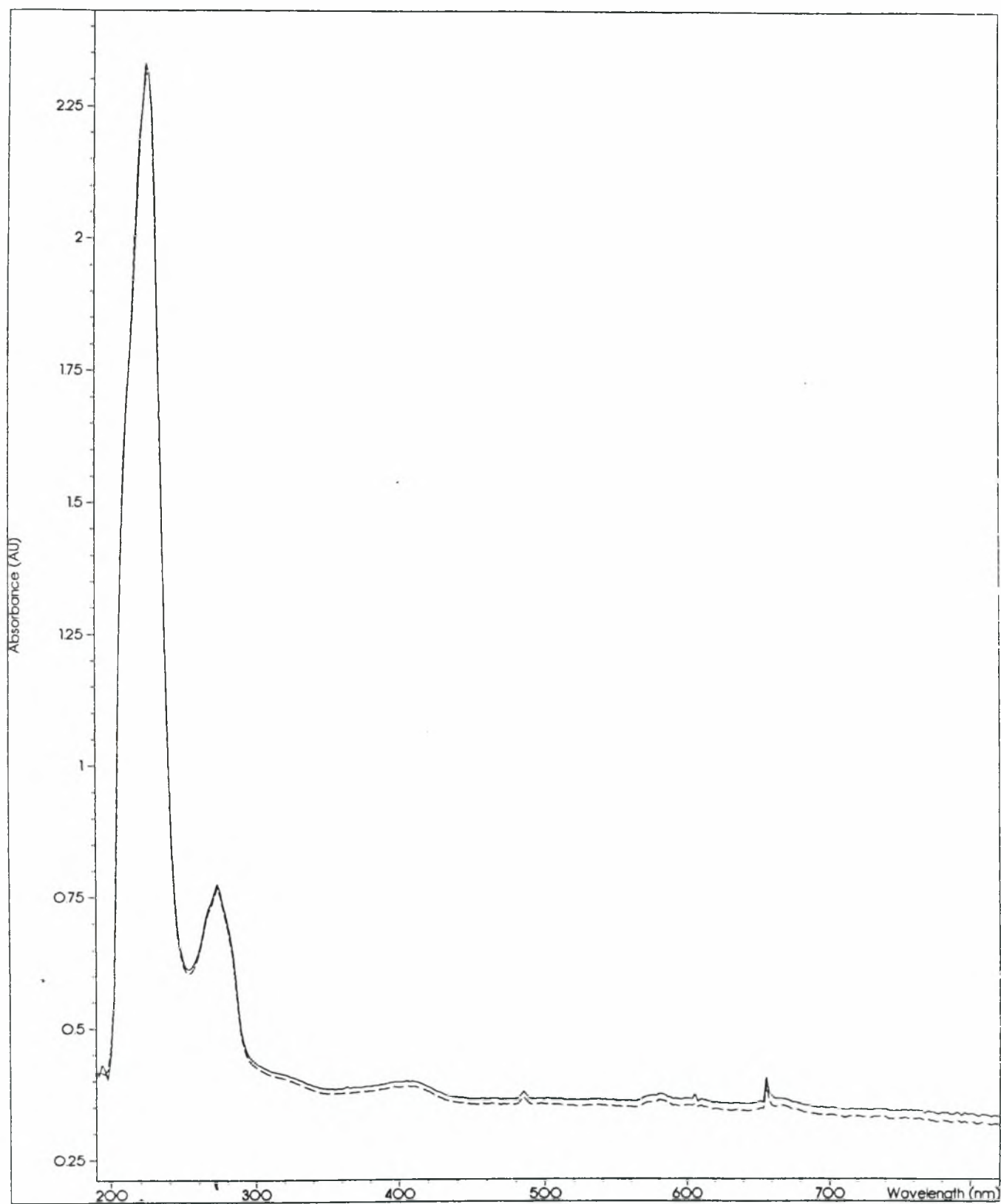
GC TRIIO 2000 MASSLYNX DATA SYSTEM

03 Dec 1997



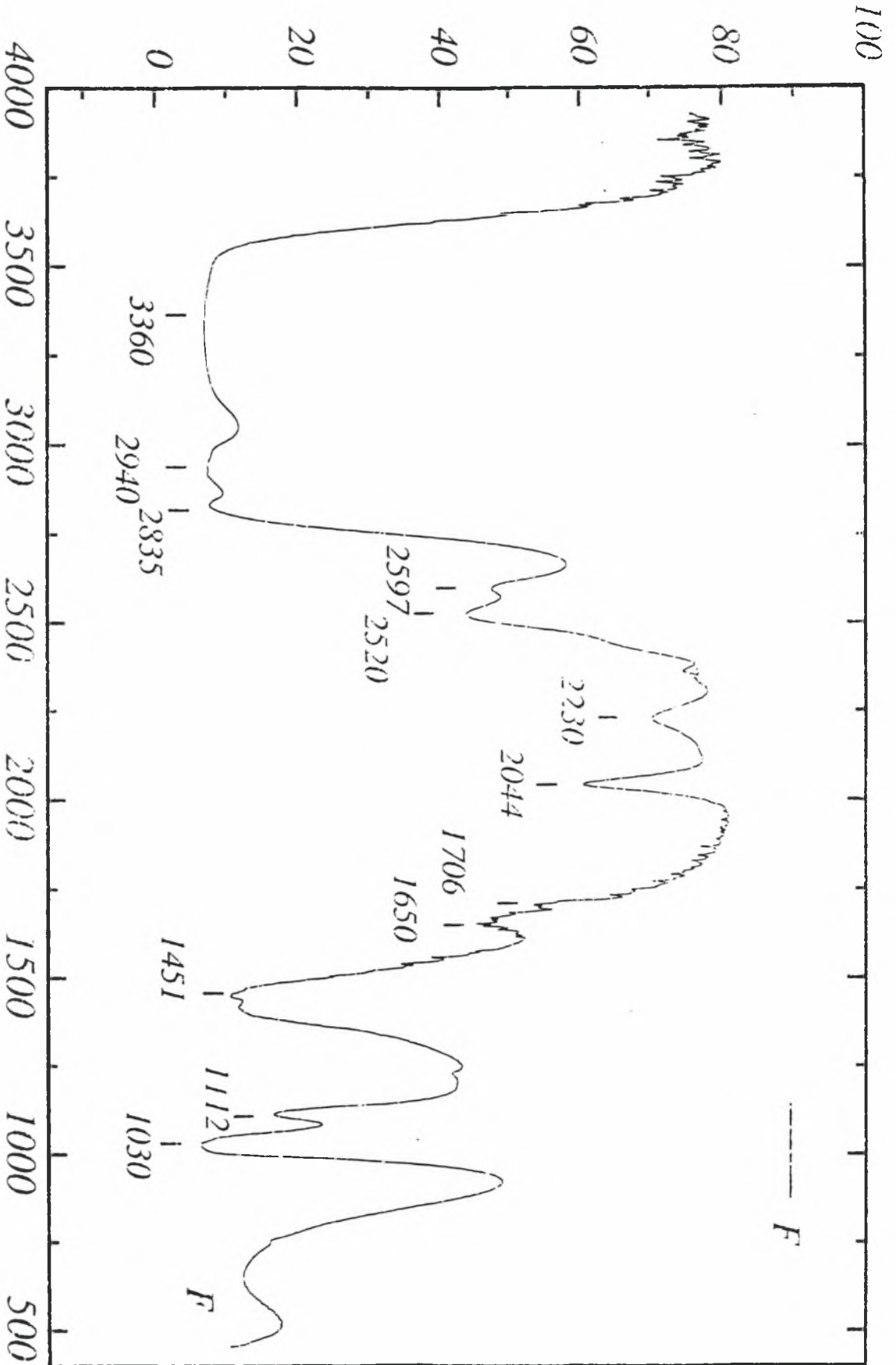
Φάσμα μαζών

Overlaid Sample Spectra



*** End ***

Transmittance %



Wavenumbers (cm⁻¹)

Φάσμα υπέρυθρου



Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΔIEΘNH

- ◆ BERNIER, G. (1988) The control of floral evocation and morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39, 175-219.
- ◆ BERNIER, G., KINET, J-M. AND SACHS, R.M. (1981) *The Physiology of Flowering. Vol. 1. The Initiation of Flowers*. CRC Press Inc., Boca Raton.
- ◆ BLOWERS, D. P. AND TREWAVAS, A. J. (1989) Second messengers: their existence and relationship to protein kinases. In: Boss, W.F. and Morre, D. J. (eds), *Second Messengers in Plant Growth and Development*. Alan R. Liss Inc., New York, pp. 1-28.
- ◆ BONNER, B.A., GIFFORD, E.M. AND REED, N. M. (1991) Differential RNA synthesis in the shoot apex of *Pharbitis nil* during floral evocation. *American Journal of Botany* 78, 401-407.
- ◆ BRONCHART, R., BERNIER, G., KINET, J. M. AND HAVE-LANCE, A. (1970) RNA synthesis in the cells of the apical meristem of *Sinapis alba* during transition from the vegetative to the reproductive condition. *Planta* 91, 255-269.
- ◆ BUSH, D. S. AND JONES, R. I. (1987) Measurement of cytoplasmic calcium in aleurone protoplasts using indo 1 and fura 2. *Cell Calcium* 8, 455-472.
- ◆ CHAILAKHAYAN, M KH. (1936) New facts in support of the hormonal theory of plant development. *Doklady of the Academy of Science, USSR* 13, 79-83.
- ◆ CHIARIELLO, N. R. AND GULMAN, S. L. (1991) Stress effects on plant reproduction. In: Mooney, H. A., Winner, W. E. and Pell, E. J. (eds) , *Response of Plants to Multiple Stresses*. Academic Press Inc., San Diego, pp. 162-188.
- ◆ COCKSHULL, K. E. (1985) *Chrysanthemum morifolium*. In: Handbook of Flowering , Halevy, A. H., ed., Vol. II, pp.238-257. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- ◆ CURVETTO, N. AND DELMASTRO, S. (1990) A biochemical and physiological proposal for stomatal movement: possible involvement

of adenosine 3', 5'-cyclimonophosphate. *Plant Physiology and Biochemistry* 28, 367-378.

- ◆ EVANS, L. T. (1971) Flower induction and the florigen concept. *Annual Review of Plant Physiology* 22, 365-394.
- ◆ GEHRING, C. A., IRVING, H. R. AND PARISH, R.W. (1990a) Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proceeding of the National Academy of Science, USA* 87, 9675-9649.
- ◆ GIFFORD, E. M. JR (1963) Developmental studies of vegetative and floral meristems. *Meristems and Differentiation, Brookhaven Symposium in Biology* 16, 126-137.
- ◆ GILROY, S., HUGHES, W. A. AND TREWAVAS, A. J. (1986) The measurement of intracellular calcium in protoplasts from higher plant cells. *FEBS Letters* 199, 217-221.
- ◆ GREGORY, G. G. (1963) The effect of the length of the day on the flowering of plants. *Scientific Horticulture* 4, 143-145.
- ◆ HACKETT, W. P., AND SRINIVASAN, C. (1985) *Hedera helix* and *Hedera canariensis*. In: Handbook of Flowering, Halevy, A. H., ed., Vol. III, pp. 89-97. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- ◆ HENDRICKS, S. B. (1960) Rate of change of phytochrome as an essential factor determining photoperiodism in plants. *Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology* 25, 245-248.
- ◆ HEPLER, P. K. AND WAYNE, R. O. (1985) Calcium and plant development. *Annual Review of Plant Physiology* 36, 397-439.
- ◆ LANG, A. (1985) Physiology of flower initiation. In: Ruhland, W. (ed.), *Encyclopedia of Plant Physiology* Vol. 15. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 1380-1536.
- ◆ LANG, A. AND MELCHERS, G. (1943) Die photoperiodische Reaktion von *Hyoscyamus niger*. *Planta* 33, 653-702.
- ◆ LUMSDEN, P. J. (1991) Circadian rhythms and phytochrome. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 351-371.
- ◆ LUMSDEN, P.J. AND VINCE-PRUE, D. (1984) The perception of dusk signals in photoperiodic time measurement. *Physiologia Plantarum* 60, 427-432.
- ◆ LYNDON, R. F., JACQMAND, A. AND BERNIER, G. (1983) Changes in protein composition of the shoot meristem during floral evocation in *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum* 59, 476-480.

- ◆ Mc AINSH, M. R., BROWNLEE, C. AND HETHERINGTON, A.M. (1990) Abscisic acid-induced elevation of cell cytosolic Ca²⁺ precedes stomatal closure. *Nature* 343, 186-188.
- ◆ MILLER, G. A. (1986) Pubescence, floral temperature and fecundity in species of *Puya* (Bromeliaceae) in the Ecuadorian Andes. *Oecologia* 70, 155-160.
- ◆ NAPP ZINN, K. (1984) Light and vernalization. In: Vince-Prue, D., Thomas, B. and Cockshull, K. E. (eds), *Light and Flowering Process*. Academic Press, London, pp. 75-88.
- ◆ PATTERSON, B. D., MUTTON, L., PAUL, R. E. AND NGUYEN, V. Q. (1987) Tomato pollen development stages sensitive to chilling and a natural environment for the selection of resistant genotypes. *Plant, Cell and Environment* 10, 363-368.
- ◆ PHARIS, R. P., EVANS, L. T., KING, R. W., AND MANDER, L. N. (1987) Gibberellins, endogenous and applied, in relation to flower induction in the long day plant *Lolium temulentum*. *Plant Physiol.* 84: 1132-1138.
- ◆ SAWHNEY, S., SAWHNEY, N. AND NANDA, K. K. (1976) Gel electrophoresis studies of proteins in photo-induced and vegetative plants of *Impatiens balsamina*. *Plant and Cell Physiology* 17, 751-755.
- ◆ SOTTA, B. (1978) Interaction du photoperiodisme et des effets de la zeatine, du saccharose et de l'eau dans la floraison du *Chenopodium polyspermum* 43, 337-342.
- ◆ TAKIMOTO, A. AND HAMNER, K. C. (1965) Effect of far-red light and its interaction with red light in the photoperiodic response in *Pharbitis nil*. *Plant Physiology* 40, 859-864.
- ◆ TEROAKA, H. (1972) Proteins of wheat embryos in the period of vernalization. *Plant Cell Physiol* 8: 87-95.
- ◆ THOMAS, B. AND VINCE-PRUE, D. (1984) Juvenility, photoperiodism and vernalization: Wilkins, M. B. (ed.), *Advanced Plant Physiology*. Pitman Publishing Ltd, London, pp. 408-439.
- ◆ THOMPSON, P. A. AND GUTTERIDGE, C. G. (1960) The role of leaves as inhibitors of flower induction in strawberry. *Annals of Botany* 24, 482-490.
- ◆ VINCE-PRUE, D. (1975) *Photoperiodism in Plants*. Mc Graw Hill, Maidenhead.
- ◆ VINCE-PRUE, D. (1983) Photomorphogenesis and flowering. In: Shropshire, W. Jr and Mohr, H. (eds), *Encyclopedia of Plant Physi-*

ology, New Series, Vol. 16B. Photomorphogenesis. Springer Verlag, New York, pp. 458-490.

- ◆ WARM, E. (1984) Changes in the composition of *In vitro* translated leaf mRNA caused by photoperiodic flower induction of *Hyoscyamus niger*. *Physiologia Plantarum*. 61, 344-350.
- ◆ YOSHIDA, K., UNEMURA, K., YOSHINAGA, K., OOTA, Y. (1967) Specific RNA from photoperiodically induce cotyledons of *Pharbitis nil*. *Plant and Cell Physiology* 8, 97-108.
- ◆ ZEEVAART, J. A. D., AND BOYER, G. L. (1987) Photoperiodic induction and the floral stimulus in *Perilla*. In: *Manipulation of Flowering*, Atherton, J. G., ed., pp. 269-277. Butterworths, London.
- ◆ ZEEVAART, J. A. D. (1969) *Perilla*. In: Evans, L. T. (ed.), *The Induction of Flowering*. Mac Millan, Melbourne, pp. 116-155.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- ◆ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ, Ν. Ε., ΚΑΙ ΒΑΡΒΟΓΛΗ, Α. Γ. (1993) *Οργανική Χημεία* σελ.66,123
- ◆ ΓΟΥΝΑΡΗ, Ι., (1996) *Γενετική Μηχανική*
- ◆ ΓΟΥΝΑΡΗ, Ι., (1995) *Πανεπιστημιακές Παραδόσεις Μοριακής Βιολογίας*
- ◆ ΔΙΑΜΑΝΤΙΔΗΣ, Γ., (1990) *Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας*, 43, 46-48.
- ◆ ΛΟΛΑΣ, Π., (1993) Φωτομορφογένεση-Φυτόχρωμα. *Φυσιολογία Φυτού-Σημειώσεις*, 119
- ◆ ΜΑΛΟΥΠΙΑ, Ε., (1997) Χρυσάνθεμο. *Σημειώσεις Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου*, 56-87

