

Πτυχιακή εργασία

**«Ηλεκτροφορητική Ανάλυση των Πρωτεϊνών των
Σπόρων Πιπεριάς και Μελιτζάνας,
σε Σχέση με την Ηλικία και
τις Συνθήκες Αποθήκευσης των Σπόρων»**

Φοιτητής : Σκλαβενίτης Αθανάσιος

**Τριμελής Επιτροπή : Καθηγητής Γούλας Χρήστος
Επίκουρος Καθ. Κουρέας Δημήτριος
Λέκτορας Χα Αβραάμ**

Βόλος 2002

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Πτυχιακή εργασία

«Ηλεκτροφορητική Ανάλυση των Πρωτεϊνών των
Σπόρων Πιπεριάς και Μελιτζάνας,
σε Σχέση με την Ηλικία και
τις Συνθήκες Αποθήκευσης των Σπόρων»

Φοιτητής : Σκλαβενίτης Αθανάσιος

Τριμελής Επιτροπή : Καθηγητής Γούλας Χρήστος
Επίκουρος Καθ. Κουρέας Δημήτριος
Λέκτορας Χα Αβραάμ

Βόλος 2002



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

Αριθ. Εισ.: 50/1
Ημερ. Εισ.: 26-08-2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΓΦΖΠ
2002
ΣΚΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070105

Πρόλογος

Το πειραματικό σκέλος της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε από τον Φεβρουάριο του 2001 έως τον Νοέμβριο του 2001 στο εργαστήριο της Λαχανοκομίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής και Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με το εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του ίδιου Τμήματος.

Κατά τη διάρκεια της, είχα την τιμή να συνεργαστώ με αξιόλογους επιστήμονες, οι οποίοι με στήριξαν στην προσπάθειά μου, δίνοντας μου την κατάλληλη καθοδήγηση προκειμένου να την υλοποιήσω.

Ιδιαίτερα, όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Λέκτορα Καθηγητή κ. Α. Χα, για την καθοριστική συμβολή του στη διαμόρφωση και υλοποίηση αυτής της εργασίας, δίνοντας τις πολύτιμες συμβουλές του και διαθέτοντας τον χρόνο του στη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ. Κουρέτα, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις καθοριστικές συμβουλές και υποδείξεις του, την μεγίστης σπουδαιότητας παραχώρηση του εργαστηρίου του, καθώς και για την διόρθωση των χειρογράφων.

Τον Καθηγητή κ. Ι. Γούλα, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις υποδείξεις, την ηθική συμπαράσταση προς το πρόσωπο μου, καθώς και για την διόρθωση των χειρόγραφων.

Τον μεταπτυχιακό φοιτητή κ. Δ. Ντάκη, για την από μέρους του εθελούσια καθοδήγηση μου αναφορικά με το πειραματικό σκέλος της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών. Καθώς και για την διάθεση των σημειώσεών του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κ. Δραγογιάννη και όλους όσους με στήριξαν στην έως σήμερα σταδιοδρομία μου.

Βόλος 2002

Αθανάσιος Σκλαβενίτης

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 3

1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 4

1.Α ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΝΟΙΑ ΚΑΙ ΤΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΠΟΡΟΥ	4
1.Α.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΠΟΡΟΥ	4
1.Α.2 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΜΕ ΣΠΟΡΟ	5
1.Α.3 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΠΟΡΩΝ	8
1.Α.4 Η ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΩΝ ΣΠΟΡΩΝ	9
1.Α.5 ΣΠΟΡΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ ΚΑΙ ΠΙΠΕΡΙΑΣ	10
1.Β ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	12
1.Β.1 ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΑΜΙΕΥΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	12
1.Β.2 Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	12
1.Β.3 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ	14
1.Β.4 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	15
1.Β.5 ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ	18
1.Β.6 ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΑΠΟΚΛΙΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΡΤΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΠΟΡΟΥ	19

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 21

2.Α. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.Α.1 ΥΛΙΚΑ	21
2.Α.1.1 Συσκευές	21
2.Α.1.2 Αναλώσιμα	21
2.Α.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	22

2.A.2.1 Συλλογή και διατήρηση των σπόρων πιπεριάς και μελιτζάνας	22
2.A.2.2 Έλεγχος της βλαστικότητας	24
2.A.2.3 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης γνωστής ποσότητας πρωτεΐνης	25
2.A.2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών, υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα	25
2.A.2.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε συνθήκες μετουσίωσης, σε πηκτώματα πολυακρίλαμιδίου	27
2.B ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
2.B.1 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΒΛΑΣΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΙΠΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ	31
2.B.2 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ	42
2.B.2.1 Ποσότητα πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα των δειγμάτων πιπεριάς και μελιτζάνας βάση της πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης	43
2.B.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΝΑΓΩΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	46
3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	47
4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

Εισαγωγή

Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η μελέτη της βλαστικής ικανότητας, της ταχύτητας βλαστικότητας, του μέσου χρόνου βλαστικότητας καθώς και της πρωτεϊνικής έκφρασης σε συγκεκριμένα είδη σπόρων πιπεριάς και μελιτζάνας. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν οι ποικιλίες E3 και Yolo Wonder από την πιπεριά και οι ποικιλίες EMI και Long Negro από την μελιτζάνα. Ακόμα, οι σπόροι από κάθε ποικιλία είχαν προηγουμένως αποθηκευτεί για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα (10 περίπου έτη), άλλοι μεν στους 5°C και άλλοι δε στους 25°C . Επίσης, η παρούσα προπτυχιακή εργασία έχει ως στόχο την χρησιμοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης για την συσχέτιση της θερμοκρασίας αποθήκευσης με την βλαστική ικανότητα καθώς και για την συσχέτιση γήρανσης σπόρου και βλαστικής ικανότητας με την ελαττωμένη παρουσία ή απουσία πρωτεϊνών ανάμεσα στα δείγματα.

Για την υλοποίηση των παραπάνω πραγματοποιήθηκαν, σε συνοπτική περιγραφή, τα ακόλουθα βήματα:

Αρχικά, ελέγχθηκε η βλαστική τους ικανότητα σε εργαστηριακές συνθήκες. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ψυχειοκλίσβανος (προβλαστήριο) περιοχής θερμοκρασίας 25°C , $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Με τις μετρήσεις υπολογίστηκαν η ταχύτητα και ο μέσος χρόνος βλαστικότητας.

Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της δυοδιάστατης ηλεκτροφόρησης σε πηκτή για την παρουσίαση της πρωτεϊνικής έκφρασης. Η τεχνική αυτή προσφέρει την δυνατότητα διαχωρισμού των πρωτεϊνών, του ελέγχου της καθαρότητας τους και του υπολογισμού του μοριακού τους βάρους.

Τέλος, είχαμε σύγκριση της πρωτεϊνικής έκφρασης και των εργαστηριακών αποτελεσμάτων, για την εξαγωγή συμπερασμάτων ή υποθέσεων αναφορικά με την πιθανή σχέση ανάμεσα στην γήρανση του σπόρου, την βλαστικότητα και παρουσία ή απουσία πρωτεϊνών ανάμεσα στα δείγματα.

1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Α Γενικές πληροφορίες αναφορικά με την έννοια και τη σημασία του σπόρου

1.Α.1 Προέλευση σπόρου

Στην Ελλάδα σήμερα δεν γίνεται επίσημα σποροπαραγωγή στα λαχανικά και δεν διατίθενται σπόροι λαχανικών από οποιαδήποτε κυβερνητική υπηρεσία. Ο σπόρος των καλλιεργούμενων ποικιλιών λαχανικών προέρχεται, αφενός μεν από ιδιωτική επιτόπια σποροπαραγωγή και παραγωγή από τον ίδιο τον λαχανοκαλλιεργητή, αφετέρου δε εισάγεται από το εξωτερικό, Ευρώπη, Αμερική, Ιαπωνία κ.α, μέσω αντιπροσώπων (εισαγωγέων). Στην περίπτωση των εισαγωγών ο σπόρος διατίθεται στους παραγωγούς είτε απευθείας από τους εισαγωγείς, είτε μέσω των κατά τόπους καταστημάτων γεωργικών ειδών. Θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι οι σπόροι που εισάγονται από την Ευρώπη και ιδιαίτερα από την Ολλανδία, η οποία αποτελεί ίσως την πιο σημαντική χώρα που εμπορεύεται σπόρους λαχανικών, δεν παράγονται όλοι στη Ολλανδία αλλά σε διάφορες χώρες όπως την Αφρική, υπό την επίβλεψη ή όχι των Ολλανδών. Αυτό γίνεται για κλιματικούς λόγους σποροπαραγωγής όπως επίσης και για οικονομικούς λόγους, δηλ. κόστους παραγωγής, οι Ολλανδοί αναλαμβάνουν την τεχνογνωσία, την προμήθεια των γενετικών υλικών, τη συσκευασία και εμπορία των σπόρων.

Για τους εισαγόμενους σπόρους των λαχανικών δεν έχει εφαρμοστεί μέχρι σήμερα καμία νομοθεσία που να καθορίζει την διαδικασία εισαγωγής, αξιολόγηση ποικιλιών, επιλογής και εγγραφής σε «εθνικό κατάλογο» αυτών που αποδεικνύονται κατάλληλες για καλλιέργεια με επιτυχία στα διάφορα διαμερίσματα της χώρας. Η απουσία μέχρι σήμερα, επίσημου κρατικού μηχανισμού για τον έλεγχο των εισαγόμενων ποικιλιών, δημιούργησε στο παρελθόν και δημιουργεί προβλήματα. Δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις ολικής αποτυχίας, που σε τελική ανάλυση ζημιώνει τον παραγωγό και κλονίζει την εμπιστοσύνη του προς τον εισαγωγέα και τον εισαγόμενο σπόρο.

Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι κάποια αξιολόγηση ποικιλιών λαχανικών γίνεται τα τελευταία χρόνια στους σταθμούς έρευνας που βρίσκονται σε διάφορες περιοχές της χώρας, και με λαχανικά που καλλιεργούνται κυρίως στα θερμοκήπια, αλλά τα αποτελέσματα αυτά των δοκιμών δεν βλέπουν το φως της δημοσιότητας για να ενημερώνονται όλοι οι ενδιαφερόμενοι. Το Υπουργείο Γεωργίας αποφάσισε την ίδρυση Ινστιτούτου Ελέγχου Ποικιλιών καλλιεργούμενων φυτών, γιατί επισήμανε την αναγκαιότητα του ελέγχου, της αξιολόγησης και εγγραφής σε έναν "εθνικό κατάλογο ειδών και ποικιλιών" των φυτικών ειδών που δημιουργήθηκαν στην Ελλάδα ή εισάγονται από το εξωτερικό, με σκοπό την αναπαραγωγή ή παραγωγή προς εμπορία. Σαν πρώτο βήμα αξιολογήθηκαν και εγγράφηκαν στον "Εθνικό κατάλογο ειδών και ποικιλιών" φυτά μεγάλης καλλιέργειας, σιτάρι, βαμβάκι, καπνός, τεύτλα κ.λ.π., ώστε να ενημερώνεται ο καλλιεργητής αναφορικά με τις ποικιλίες που θα μπορούσε να καλλιεργήσει με επιτυχία. Θα πρέπει πάντοτε να προτιμάται και να αγοράζεται ο καλός ποιοτικά σπόρος, έστω και αν έχει υψηλή τιμή και όχι ο φτηνός για να γίνεται οικονομία. Ο φτηνός σπόρος μπορεί να κοστίσει τελικά πολύ ακριβά στον παραγωγό.

1.A.2 Πολλαπλασιασμός με σπόρο

Τα λαχανικά πολλαπλασιάζονται είτε με σπόρο, οπότε γίνεται λόγος για εγγενή πολλαπλασιασμό, είτε με άλλα πολλαπλασιαστικά όργανα (κόνδυλοι, ριζώματα, βολβοί κ.λ.π.), που αποτελεί τον αγενή πολλαπλασιασμό των λαχανικών. Όλα τα λαχανικά πολλαπλασιάζονται με σπόρο, αν και ορισμένα για διάφορους λόγους (κλιματικούς, οικονομικούς, ποιότητας κ.λ.π.) στην πράξη πολλαπλασιάζονται αγενώς. Για να εξασφαλιστεί η επιτυχία κατά τον πολλαπλασιασμό των λαχανικών με σπόρο θα πρέπει ο τελευταίος να έχει τα πιο κάτω χαρακτηριστικά:

1. Να είναι καθαρός
2. Να έχει καλή βλαστική ή φυτρωτική ικανότητα
3. Να είναι υγιής
4. Να έχει καλό μέγεθος για το είδος
5. Να αντιπροσωπεύει την ποικιλία

Στη συνέχεια επεξηγούνται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας καλός σπόρος.

1. Καθαρότητα του σπόρου

Οι σπόροι των λαχανικών που κυκλοφορούν στο εμπόριο πρέπει να είναι απαλλαγμένα από ξυλαράκια, πέτρες, χώμα, σπόρους ζιζανίων ή σπόρους άλλων καλλιεργούμενων ειδών.

2. Βλαστικότητα του σπόρου

Ο όρος βλαστικότητα χρησιμοποιείτε για να εκφράσει το ποσοστό των ζωντανών σπόρων, που είναι σε θέση κάτω από ορισμένες ευνοϊκές συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία, υγρασία, φως κ.τ.λ.) να δώσουν φυτά. Ο έλεγχος για τον υπολογισμό του αριθμού των ζωντανών σπορών (βλαστικότητα %) γίνεται σε εργαστήρια, κάτω από ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού.

Στενά συνδεδεμένη με την βλαστικότητά του σπόρου και επίσης εξίσου σημαντική, είναι και η ζωτικότητα του σπόρου, δηλ. η ικανότητα του σπόρου να παράγει γρήγορα, κανονικό, δυνατό και ζωηρό φυτό. Καλή ζωτικότητα έχουν οι σπόροι που δεν παρουσιάζουν κανένα πρόβλημα στο έμβρυο, έχουν ωριμάσει πλήρως στο μητρικό φυτό, αποθηκεύτηκαν σε ευνοϊκές συνθήκες και είναι φρέσκοι. Γενικά, σπόροι που έχουν κάποια ηλικία δεν βλαστάνουν τόσο καλά όσο οι σπόροι που έχουν συγκομιστεί πρόσφατα και όταν ακόμη ηλικιωμένοι σπόροι βλαστήσουν, τα φυτά αυτά αποτυγχάνουν συνήθως να μεγαλώσουν ικανοποιητικά, γιατί δεν έχουν τη δύναμη να παράγουν κανονική ρίζα και βλαστό.

Παράγοντες που επηρεάζουν την βλαστικότητα του σπόρου

Ένας από τους λόγους που αποτυγχάνουν οι σπόροι να βλαστήσουν είναι, γιατί δεν έχουν ζωντανό έμβρυο. Αυτό οφείλεται είτε σε ελλιπή γονιμοποίηση του άνθους είτε γιατί ο γονιμοποιημένος σπόρος για κάποιο λόγο, δεν έχει εξελιχθεί κανονικά. Οι πιο πολλοί από τους σπόρους αυτούς απομακρύνονται κατά τη διαδικασία του καθαρισμού του σπόρου πριν από το πακετάρισμα για πώληση, επειδή παραμένουν συνήθως μικροί και ελαφροί.

Ένας πιο συνηθισμένος λόγος που έχει σαν αποτέλεσμα την αποτυχία στη βλάστηση του σπόρου, είναι η ύπαρξη ανωμαλίας, ή μη, συμπλήρωση της ανάπτυξης του εμβρύου. Το τελευταίο συναντάται συχνά στο καρότο, μαϊντανό, σέλινο και οι σπόροι θα

πρέπει να υποστούν μια παραπέρα εξέλιξη κατά την αποθήκευση, πριν καταστούν ικανοί για βλάστηση. Στις περιπτώσεις αυτές, η βλάστηση συνήθως καθυστερεί, και κατά συνέπεια ο σπόρος στο έδαφος γίνεται πιο ευπρόσβλητος από ασθένειες και έντομα.

Μερικοί σπόροι αποτυγχάνουν να βλαστήσουν, ή και εάν βλαστήσουν αποτυγχάνουν να μεγαλώσουν γρήγορα, γιατί έχουν προσβληθεί από κάποια ασθένεια ή έντομα.

Οι σπόροι επίσης, μερικών λαχανικών παρουσιάζουν δυσκολίες στη βλάστηση τους, γιατί πρέπει να επικρατούν ιδιαίτερες συνθήκες πριν ή κατά την βλάστηση τους. Για παράδειγμα, οι σπόροι αρκετών ποικίλων σέλινου χρειάζονται φως για να βλαστήσουν, και δεν βλαστάνουν στο σκοτάδι ή εάν παραχωθούν στο έδαφος.

Ακόμη ένα συνηθισμένο αίτιο φτωχής βλαστικότητας είναι η μεγάλη ηλικία του σπόρου, όπως έχει τονιστεί και πιο πριν.

3. Υγιεινή κατάσταση και προστασία του σπόρου

Είναι γνωστό ότι ο σπόρος μπορεί να φέρει παρασιτικούς οργανισμούς όπως μύκητες, βακτήρια, ιούς και έντομα, στην επιφάνεια ή και μέσα του. Με την κατάλληλη μεταχείριση του σπόρου εμποδίζεται η προσβολή από τις διάφορες ασθένειες, καθώς επίσης καταπολεμούνται οι ασθένειες που έχουν προσβάλει το σπόρο. Επομένως, δύο είναι γενικά οι κατηγορίες μεταχείρισης του σπόρου των λαχανικών.

Η πρώτη μεταχείριση είναι προστατευτική και εφαρμόζεται στην επιφάνεια του σπόρου για να τον προστατεύσει από τις πρώιμες σήψεις, τις τήξεις και τους άλλους μικροοργανισμούς καθώς και τα έντομα του εδάφους, και έτσι να περιφρουρηθεί η παραγωγή και να περιοριστούν οι κίνδυνοι αποτυχίας από τυχόν προσβολή του σπόρου. Τα πιο διαδεδομένα φάρμακα για τη μεταχείριση αυτή είναι τα μυκητοκτόνα Thiram και Captan, που χρησιμοποιούνται είτε υπό μορφή σκόνης ή διαλύματος και τα εντομοκτόνα Diazinon και Lindane.

Η δεύτερη μεταχείριση είναι θεραπευτική, και έχει σκοπό να εξοντώσει τα αίτια της παθογένεσης που βρίσκονται πάνω ή μέσα στον σπόρο. Για την καταστροφή των παθογόνων εφαρμόζονται δύο κυρίως μέθοδοι, η **θερμοκρασία** που εφαρμόζεται με εμβάπτιση του σπόρου σε ζεστό νερό και αποτελεί την κύρια μέθοδο και με **χημικές ουσίες**, όπως ανεπτύχθη προηγουμένως και συνήθως χρησιμοποιούνται για προστατευτικούς σκοπούς.

4. Μέγεθος σπόρου

Ενδιαφέρει τόσο το απόλυτο μέγεθος του σπόρου, όσο και η ομοιομορφία στο μέγεθος. Έχει βρεθεί ότι οι μεγάλοι σπόροι δίνουν πιο πρώιμη και πιο ομοιόμορφη παραγωγή. Σε ορισμένα όμως λαχανικά που οι κοτυληδόνες εξέρχονται με τη βλάστηση από το έδαφος, οι μεγάλοι σπόροι σε συνδυασμό με το βαρύ έδαφος μπορεί να αποτελέσουν αιτία απωλειών στη βλάστηση. Η ομοιομορφία στο μέγεθος του σπόρου βοηθά στη μηχανική σπορά, στην ομοιόμορφη ανάπτυξη και ταυτόχρονη καρποφορία των φυτών και στην περίπτωση, των φυλλωδών λαχανικών επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ομοιομορφία στο μέγεθος των προϊόντων.

5. Πιστότητα του σπόρου στην ποικιλία

Δεν είναι δυνατόν, βλέποντας το σπόρο να αντιληφθεί κανείς εάν αποδίδει ή όχι την ποικιλία. Η μόνη εγγύηση είναι η αξιοπιστία στον έμπορο και τον σποροπαραγωγικό οίκο. Στο εξωτερικό, εάν ο παραγωγός πάρει λανθασμένη ποικιλία ο σποροπαραγωγικός οίκος είναι υποχρεωμένος μόνο να επιστρέψει την αξία του σπόρου.

1.A.3 Αποθήκευση σπόρων

Οι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά τη μακροζωία του σπόρου, είναι:

- α) Η πλήρης ωρίμανση του στο σποροπαραγωγικό φυτό
- β) Η καλή ξήρανση δηλ. χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία
- γ) Η χαμηλή θερμοκρασία
- δ) Ο γενετικός παράγοντας

Θα πρέπει να τονιστεί ότι από τη στιγμή που συγκομίζεται ο σπόρος από το σποροπαραγωγικό φυτό αρχίζει να φθίνει, και τελικά πεθαίνει, εάν αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η έρευνα έχει δείξει ότι υπάρχουν διαφορές, όσον αφορά το χρόνο που παρέρχεται από την συγκομιδή μέχρι την καταστροφή του σπόρου, στα διάφορα λαχανικά. Για παράδειγμα, οι σπόροι του κρεμμυδιού χάνουν πιο γρήγορα την ικανότητα τους για βλάστηση, σε σύγκριση με τους σπόρους της τομάτας (Χρήστος Μ.Ολύμπιος, 1996).

Οι σπόροι των περισσότερων λαχανικών θα βλαστήσουν μετά από 2-3 ή και περισσότερα χρόνια αποθήκευσης εφόσον έχουν ωριμάσει κανονικά, η περιεκτικότητά τους σε υγρασία είναι χαμηλή και η υγρασία και θερμοκρασία του χώρου αποθήκευσης

ευρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα. Εάν όμως οι σπόροι αποθηκευτούν κάτω από συνθήκες υψηλής υγρασίας και θερμοκρασίας, συνήθως αποτυγχάνουν να βλαστήσουν ακόμη και μετά από ολιγόχρονη αποθήκευση πριν την σπορά, έστω και αν οι σπόροι είναι φρέσκοι.

Όσον αφορά τη θερμοκρασία έχει βρεθεί γενικά, ότι για κάθε 5⁰C που ανυψώνεται η θερμοκρασία πάνω από 0⁰C, ο ωφέλιμος χρόνος αποθήκευσης του σπόρου μειώνεται στο μισό. Αυτό σημαίνει ότι εάν κανονικά ο σπόρος διατηρείται ζωντανός για 10 χρόνια όταν αποθηκεύεται στους 5⁰C, η ζωή του περιορίζεται στα 5 χρόνια όταν αποθηκευτεί στους 10⁰C και μόνο 1 χρόνο όταν αποθηκευτεί στους 21⁰C, δηλ, στη θερμοκρασία δωματίου (Χρήστος Μ.Ολύμπιος, 1996).

Όσον αφορά τη διακύμανση της υγρασίας του σπόρου, έχει βρεθεί ότι για κάθε αύξηση στην υγρασία του σπόρου ίση με το 1%, πάνω από το 5%, και μέχρι το 14%, η ζωή του σπόρου μειώνεται στο μισό. Αυτό σημαίνει, ότι εάν ο σπόρος διατηρείται ζωντανός για 10 χρόνια με περιεκτικότητα σε υγρασία 8% η ζωή του περιορίζεται στα 5 χρόνια εάν η υγρασία ανέβει στο 9%.

Παρόλο που η έρευνα έχει καθορίσει πώς πρέπει να αποθηκεύονται οι σπόροι για να διατηρούνται ζωντανοί για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμη η παραγωγή σπόρων με σταθερή και διαρκή υψηλή ποιότητα, που θα βλαστάνουν καλά κάτω από όλες στις συνθήκες. Σημειώνεται, ότι έχει επισημανθεί, ότι υπάρχουν μερικά σποροπαραγωγικά χρόνια που είναι καλύτερα από άλλα, όσον αφορά τη διατήρηση της βλαστικότητας των σπόρων. Η ποιότητα του σπόρου των λαχανικών βελτιώνεται και με τον διαχωρισμό και αφαίρεση των μικρών σπόρων, που συνήθως έχουν φτωχή βλαστική ικανότητα σε σύγκριση με τους μεγαλύτερους, χωρίς αυτό να εγγυάται ότι θα βλαστήσουν όλοι οι μεγάλοι σπόροι ή ότι θα διατηρηθούν ζωντανοί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

1.A.4 Η γήρανση των σπόρων

Το πρόβλημα της γήρανσης των σπόρων είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια και συνδέεται άμεσα με το θέμα της αποθήκευσης τους. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ακόμη και στην νεολιθική εποχή οι σπόροι που προορίζονταν για σπορά, αποθηκεύονταν χωριστά από αυτούς που ήταν για κατανάλωση. Ο Θεόφραστος (372/70 -288/86 π.Χ.) σχολίασε

την ενόχληση των αποθηκευμένων σπόρων από τους εχθρούς τους και παρατήρησε επίσης ότι μερικοί σπόροι (π.χ. κρεμμύδι) έχαναν τη βιωσιμότητα τους πιο γρήγορα σε σχέση με άλλους (π.χ. κέχρο). Γενικά, ο Θεόφραστος θεωρούσε τους σπόρους με ηλικία ενός έτους πιο κατάλληλους για σπορά, ενώ οι σπόροι τεσσάρων ετών θεωρούνταν άχρηστοι.

Η γήρανση των σπόρων προκαλεί αλλαγές στη φυσιολογία και στη δομή τους που δημιουργούν:

(α) Πτώση στη ζωτικότητα

(β) Πτώση στη βλαστική δύναμη

(γ) Αλλαγές στην ανάπτυξη και την παραγωγή

Η πορεία της γήρανσης στους σπόρους, όπως και σε όλους ζωντανούς ιστούς, είναι στενά δεμένη με το μεταβολισμό των κυττάρων. Η αποδόμηση των ιστών που συσχετίζονται με τη γήρανση δεν είναι ένα τυχαίο φαινόμενο κάποιων ανεξέλεγκτων χημικών αντιδράσεων. Αντιθέτως, αποτελείται από μια σειρά ειδικών αντιδράσεων που ελέγχονται συστηματικά από ένζυμα ώστε τα προϊόντα της μιας αντίδρασης γίνονται το υπόστρωμα για το επόμενο αποσυνθετικό βήμα και με κατεύθυνση πάντα προς την τελική αποβίωση του οργανισμού.

Το σημείο στο οποίο η γήρανση των σπόρων των περισσότερων ειδών διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από τη γήρανση άλλων ιστών ή οργανισμών, είναι το ότι οι ιστοί των σπόρων διατηρούν την μεταβολική τους ολοκληρότητα κάτω από συνθήκες χαμηλής υγρασίας, στις οποίες άλλοι οργανισμοί συνήθως δεν επιβιώνουν.

Τέλος διακρίνονται τρία στάδια στην απορρόφηση υγρασίας από την ατμόσφαιρα. Στο πρώτο η περιεκτικότητα των σπόρων σε νερό αυξάνεται σχετικά γρήγορα με αύξηση της σχετικής υγρασίας του περιβάλλοντος μέχρι περίπου 15% (Στάδιο I). Μετάξυ 15% και 60% Σ.Υ. περίπου, η αύξηση στην περιεκτικότητα των σπόρων σε νερό αυξάνεται σχετικά λίγο (Στάδιο II), ενώ σε Σ.Υ. πάνω από 60% η απορρόφηση της υγρασίας είναι πάλι μεγάλη (Στάδιο III).

1.A.5 Σποροπαραγωγή μελιτζάνας και πιπεριάς

Στην μελιτζάνα γίνεται κατά κανόνα αυτογονιμοποίηση, αλλά και η διασταύρωση με τα έντομα δεν είναι ασυνήθιστη. Προκειμένου για καλλιέργεια σποροπαραγωγής είναι

επομένως ευνόητη η ανάγκη απομόνωσης αυτής από άλλες καλλιέργειες του είδους, τηρουμένων γι' αυτό αποστάσεων τουλάχιστον 200m.

Ο έλεγχος της καλλιέργειας σποροπαραγωγής είναι απαραίτητος και πρέπει να επαναλαμβάνεται μέχρι την εποχή της συγκομιδής. Κατ' αυτόν απομακρύνονται εγκαίρως από τον αγρό όλα τα ανεπιθύμητα φυτά, τα ασθενή και τα διαφέροντα από τον τύπο της καλλιεργούμενης ποικιλίας.

Οι καρποί από τους οποίους θα ληφθεί σπόρος, συγκομίζονται τελείως ώριμοι, όταν έχουν αποκτηθεί κίτρινο ή κίτρινο-καφέ χρώμα στις συνηθισμένες ποικιλίες. Στη συνέχεια κόβονται κατά μήκος ή τεμαχίζονται μηχανικά και αφαιρείται ο σπόρος με τα χεριά (μέσα σε νερό), ο οποίος κατόπιν ξηραίνεται υπό σκιά και διατηρείται σε χώρο ξηρό και αεριζόμενο. Εφόσον είναι ανάγκη, μπορεί να γίνει συγκομιδή και μη τελείως ώριμων καρπών, αυτοί όμως διατηρούνται επί μερικές ημέρες για να ωριμάσει ο σπόρος. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι ο σπόρος είναι δυνατό να βλαστήσει μέσα στον ώριμο καρπό, εάν ο τελευταίος διατηρηθεί επί πολύ είτε επί του φυτού είτε και μετά τη συγκομιδή.

Υπό καλές συνθήκες ο σπόρος διατηρεί τη βλαστική του ικανότητα επί 5-7 έτη.

Από ένα στρέμμα ειδικής καλλιέργειας σποροπαραγωγής λαμβάνονται 10 ή και περισσότερα χιλιόγραμμα σπόρου. Σε ένα γραμμάριο περιέχονται περίπου 250 σπόροι.

Για την παραγωγή σπόρου πιπεριάς από μια ποικιλία είναι απαραίτητη η απομόνωση της, δηλαδή η καλλιέργεια της μακριά από άλλη ποικιλία (τουλάχιστον 200m).

Σε μια τέτοια καλλιέργεια σποροπαραγωγής τα φυτάρια πρέπει να είναι υγιή και να παρουσιάζουν τους χαρακτήρες της χρησιμοποιούμενης ποικιλίας. Ο έλεγχος στον αγρό και η απόρριψη-εκρίζωση των ανεπιθύμητων φυτών, των ασθενών ή μη αντιπροσωπευτικών της ποικιλίας, γίνεται τουλάχιστον από της περιόδου του σχηματισμού των καρπών και επαναλαμβάνεται συνήθως επί τρεις ή τέσσερις φορές.

Η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιείται στο στάδιο της πλήρους ωρίμασης, τμηματικώς. Ο εξαγόμενος σπόρος απλώνεται για να στεγνώσει υπό σκιά και διατηρείται σε ξηρά και δροσερό περιβάλλον, όπου η βλαστική του ικανότητα μπορεί να διατηρηθεί επί 4 περίπου έτη.

Από ένα χιλιόγραμμο καρπών λαμβάνονται 15 περίπου γραμμάρια σπόρου, σε ένα δε γραμμάριο περιλαμβάνονται 150-200 σπόροι (Κ. Γ. Δημητράκης, 1998).

1.Β Γενικές πληροφορίες αναφορικά με τις πρωτεΐνες

1.Β.1 Αποδόμηση των αποταμιευμένων πρωτεϊνών

Στα σπέρματα οι αποταμιευμένες πρωτεΐνες διασπώνται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα κατά την διάρκεια της βλάστησης, σε διαλυτά αζωτούχα συστατικά, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιούνται από διάφορα μέρη του εμβρύου. Μερικές από τις πρωτεΐνες και της πεπτιδάσες βρίσκονται στα ξηρά σπέρματα, ενώ άλλες εμφανίζονται κατά την βλάστηση. Γενικώς τα ένζυμα με πρωτεολική δραστηριότητα, που αναπτύσσονται στις κοτυληδόνες ή το ενδοσπέρμιο, είναι παρόμοια προς εκείνα, που βρίσκονται σε άλλους φυτικούς ιστούς.

Οι πρωτεΐνες υδρολύονται σε ολιγοπεπτίδια και αμινοξέα με τα ένζυμα πεπτιδάσες. Μερικά αμινοξέα μεταφέρονται μέσω του διαλύματος προς το έμβρυο, ενώ πολλά μεταφέρονται ως αμύδια. Στα σημεία αύξησης του πτεριδίου και ριζιδίου τα αμύδια απαμινώνονται και τα αμινοξέα χρησιμοποιούνται για να συνθέσουν δομικές πρωτεΐνες και ένζυμα.

Επομένως η ελάττωση στην αποταμίευση των πρωτεϊνών συνοδεύεται από αύξηση σε αμινοξέα και αμύδια, και ακολουθείται από σύνθεση νέων πρωτεϊνών στο αυξανόμενο μέρος του εμβρύου. Ελάχιστο άζωτο συγκεντρώνεται σε αποταμιευτικές θέσεις λόγω της ταχείας σύνθεσης των νέων πρωτεϊνών στο αναπτυσσόμενο έμβρυο που καταναλώνει τα διαθέσιμα αζωτούχα συστατικά.

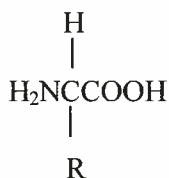
1.Β.2 Η δομή των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα σύμπλοκα μόρια τα οποία συμμετέχουν σε τρεις σημαντικές λειτουργίες:

- I. αποτελούν τα δομικά μόρια του κυττάρου,
- II. είναι βιολογικοί καταλύτες των βιοχημικών αντιδράσεων, και
- III. παρέχουν την δυνατότητα κυτταρικής και ενδοκυτταρικής κίνησης.

Παρά τις διαφορετικές λειτουργίες που επιτελούν, οι πρωτεΐνες έχουν παρόμοια δομή και αποτελούνται από μία ή περισσότερες αλυσίδες. Δομικές μονάδες των αλυσίδων αυτών είναι τα αμινοξέα. Όλα έχουν μία καρβοξυλική ($-\text{COOH}$) και μία αμινική ($-\text{NH}_2$)

NH₂) ομάδα συνδεδεμένες σε ένα κοινό άτομο άνθρακα (α-C). Η πλευρική αλυσίδα R είναι διαφορετική για κάθε αμινοξύ:



Οι πρωτεΐνες σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς αποτελούνται από συνδυασμό είκοσι μόνων αμινοξέων. Τα 19 από τα 20 αμινοξέα έχουν την δομή που αναφέρθηκε προηγουμένως, ενώ η προλίνη αποτελεί εξαίρεση στον κανόνα αυτό διότι σχηματίζει ένα δακτύλιο στον οποίο συμμετέχει και το κεντρικό άτομο άνθρακα. Οι ιδιότητες των διαφόρων αμινοξέων στηρίζονται στην χημική σύσταση των πλευρικών τους αλυσίδων. Τα βασικά π.χ. αμινοξέα (λυσίνη, αργινίνη) περιέχουν στην πλευρική αλυσίδα μία πρόσθετη αμινομάδα, ενώ τα όξινα αμινοξέα (γλουταμινικό οξύ, ασπαρτικό οξύ) περιέχουν ένα επιπλέον καρβοξύλιο. Λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας της καρβοξυλικής και της αμινικής ομάδας τα αμινοξέα έχουν θετικό και αρνητικό φορτίο. Τα αμινοξέα διακρίνονται επίσης σε υδρόφοβα και υδρόφιλα. Στα υδρόφιλα αμινοξέα περιλαμβάνονται εκείνα τα οποία έχουν στην πλευρική τους αλυσίδα μια ακόμα ελεύθερη αμινική ή καρβοξυλική ομάδα.

Η συμπύκνωση των αμινοξέων και η δημιουργία πρωτεϊνών γίνεται με τέτοια τρόπο ώστε η όξινη ομάδα του ενός αμινοξέος να αντιδρά με την βασική ομάδα του άλλου, με ταυτόχρονη απώλεια ενός μορίου H₂O. Έτσι τα δύο αμινοξέα ενώνονται με τον σχηματισμό ενός αμιδίου -NH-CO-. Ο δεσμός αυτός καλείται πεπτιδικός δεσμός. Συνδυασμός δύο αμινοξέων δημιουργεί ένα διπεπτίδιο, τριών ένα τριπεπτίδιο, ενώ συνδυασμός λίγων ή πολλών αμινοξέων δημιουργεί τα ολιγοπεπτίδια και πολυπεπτίδια αντίστοιχα.

Ο συνδυασμός των αμινοξέων και η διαμόρφωση τους στο χώρο δημιουργεί διαφορετικές πρωτεϊνικές δομές. Έτσι, η αλληλουχία των αμινοξέων σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελεί την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης και έχει μεγάλη σημασία διότι

καθορίζει τις άλλες διαμορφώσεις των πρωτεϊνών. Στη δευτεροταγή δομή, η πολυπεπτιδική αλυσίδα σχηματίζει αναδιπλώσεις οι οποίες συγκρατούνται στον χώρο με υδρογονικούς δεσμούς. Στη τριτοταγή δομή η πολυπεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται γύρω από τον εαυτό της και διαμορφώνεται έτσι στο χώρο ώστε στην διαμόρφωση αυτή παίζουν σημαντικό ρόλο και οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων. Η τριτοταγής δομή καθορίζει πολλές βιολογικές ιδιότητες των πρωτεϊνών όπως π.χ. την ενζυμική δράση και την αντιγονικότητα. Στην τεταρτοταγή δομή δεν μετέχει μόνο μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, όπως γίνεται στις προηγούμενες δομές, αλλά δύο ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με ασθενείς μη ομοιοπολικούς δεσμούς.

1.B.3 Πρωτεϊνική σύνθεση

Τα γονίδια που κωδικεύουν για πρωτεΐνες μεταγράφονται στο αγγελιοφόρο RNA (m-RNA).

Το mRNA κινείται από τον πυρήνα προς το κυτόπλασμα και εκεί διαβάζεται προς μία κατεύθυνση με αρχή πάντα το άκρον του 5' υδροξυλικού δεσμού, από ένα ή περισσότερα ριβοσώματα. Το ριβόσωμα χρησιμεύει για την ανάγνωση του mRNA και την ένωση του κωδικωνίου του mRNA με το αντικωδικόνιο του tRNA. Η ένωση γίνεται σε μια ειδική θέση πάνω στο ριβόσωμα που λέγεται θέση προσδέσεως. Στο ριβόσωμα υπάρχει και η θέση αυξήσεως όπου τα αμινοξέα, που διαδοχικά μεταφέρονται από τα μόρια του tRNA, ενώνονται και σχηματίζουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα.

Η πρόσδεση του αμινοξέως στο ειδικό για αυτό μόριο του tRNA γίνεται με την μεσολάβηση ενός ειδικού ενζύμου κατά ένα τρόπο που ονομάζεται ενεργοποίηση ή φόρτωση. Το φορτωμένο με το αμινοξύ tRNA βρίσκει στο mRNA μια θέση όπου οι τρεις βάσεις από το αντικωδικόνιο του tRNA μπορούν να σχηματίσουν ζεύγη με της βάσεις από το κωδόν του mRNA. Κατ' αυτόν τον τρόπο τα αμινοξέα από το κυτόπλασμα έρχονται στην θέση προσδέσεως του ριβοσώματος το ένα μετά το άλλο με την σειρά που μετέγραψε το mRNA από το DNA. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα σχηματίζεται στη θέση αυξήσεως του ριβοσώματος με την βοήθεια ενζύμων που ενώνουν αμινικές ομάδες με καρβοξυλικές ομάδες των διαδοχικών αμινοξέων. Το μόριο του tRNA τότε ελευθερώνεται τόσο από το αμινοξύ που μετέφερε όσο και από το mRNA και επιστρέφει στο κυτόπλασμα για νέα φόρτιση ενώ το ριβόσωμα προχωρεί σε νέα θέση του mRNA.

Όταν το ριβόσωμα φτάσει στο τέλος του εντολοδόχου RNA, ή ερμηνεία του γενετικού κώδικα σε μια διαδοχική σειρά αμινοξέων έχει ολοκληρωθεί. Η αλυσίδα αυτή των αμινοξέων αναδιπλώνεται, ενώνεται με διάφορους δεσμούς, που σταθεροποιούν τις αναδιπλώσεις, και επιτυγχάνει την τελική της δομή.

Η δομή αυτή δίνει για την κάθε πρωτεΐνη μια συγκεκριμένη διάταξη στον χώρο και έτσι κάθε ένζυμο έχει το δικό του ανάγλυφο σχήμα. Γι' αυτό είναι ειδικευμένο για καθορισμένες αντιδράσεις όπως ένα κλειδί είναι για μια, τη συγκεκριμένη γι' αυτό κλειδαριά. Κάθε αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης επηρεάζει, καταστρέφει ή τροποποιεί την ενζυματική δραστηριότητα της.

Είναι αυτονόητο ότι για να σχηματιστεί μια πρωτεΐνη χρειάζεται στα κύτταρο να υπάρχουν, εκτός από τον γενετικό της κώδικα και τα ανάλογα ένζυμα, όλα τα αμινοξέα που περιλαμβάνονται στο μόριο της. Επίσης γονίδια γνωστά ως ρυθμιστικά ελέγχουν την έναρξη, το πέρας ή την ποσότητα κατά την σύνθεση της πρωτεΐνης.

Η διαδικασία της σύνθεσης των πρωτεϊνών, εκτός από ορισμένα ένζυμα που είναι διαφορετικά, είναι σε γενικές γραμμές παρόμοια στους προκαρυωτικούς και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Θα πρέπει ίσως να αναφερθούμε σε μια διαφορά. Τα βακτήρια δεν διαθέτουν πυρηνική μεμβράνη και τα ριβοσώματα βρίσκονται πολύ κοντά στο DNA. Έτσι κατά την μεταγραφή καθώς το άκρο 5' του mRNA μεγαλώνει, μπορεί να προσκολληθεί αμέσως στο ριβόσωμα και να αρχίσει η μετάφραση του. Έχουμε δηλαδή, ταυτόχρονη μεταγραφή και μετάφραση.

1.B.4 Κατάταξη των πρωτεϊνών

Η συστηματική κατάταξη των μερικών εκατοντάδων χιλιάδων πρωτεϊνών από όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, θα ήταν δυνατή μόνο αν γνωρίζαμε την πρωτοταγή και τριτοταγή δομή τους. Ωστόσο κάτι τέτοιο είναι τελείως ανέφικτο. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιώντας διάφορα κριτήρια, έχει καταρτιστεί ένας σχετικά μεγάλος σχημάτων κατάταξης τους, η παρουσίαση των οποίων επιχειρείται παρακάτω.

A. Με βάση το κριτήριο της ενζυμικής δράσης κατατάσσονται σε ενζυμικές και μη ενζυμικές.

B. Με βάση την προέλευση τους κατατάσσονται σε βακτηριακές, φυτικές, ζωικές, κ.α.

Γ. Οι πρωτεΐνες ενός ζωικού οργανισμού κατατάσσονται σε πρωτεΐνες αίματος, γάλακτος, εγκεφαλονωτιαίου μυελού, μυϊκού ιστού κ.α.

Δ. Με βάση τη μορφή του μορίου τους και την διαλυτότητα τους στο νερό κατατάσσονται:

1. Σε αδιάλυτες ινώδεις πρωτεΐνες ή σκληροπρωτεΐνες. Το μόριο των πρωτεϊνών αυτών έχει μορφή ίνας και πρακτικά είναι αδιάλυτες στο νερό. Σε αυτές ανήκουν η φιβροίνη του μεταξιού, το κολλαγόνο που απαντάται στον συνδετικό ιστό και η κερατίνη που απαντάται στα φτερά των πουλιών, στα κέρατα, στα νύχια, στις τρίχες, κ.α.

2. Σφαιροπρωτεΐνες. Τις ονομάζουμε έτσι λόγω της σφαιρικής ή ωοειδούς μορφής του μορίου τους. Είναι υδατοδιαλυτές στο νερό ή σε αραιά αλατούχα διαλύματα. Σε αυτές ανήκουν:

α) Οι αλβουμίνες που είναι υδατιδιαλυτές ακόμη και σε απεσταγμένο νερό. Έχουν ελαφρώς όξινο χαρακτήρα.

β) Οι γλοβουλίνες που είναι αδιάλυτες στο νερό, αλλά διαλυτές σε αραιά αλατούχα διαλύματα.

γ) Οι προταμίνες και ιστόνες που είναι εύκολα διαλυτές στο νερό και είναι ιδιαίτερα μικρού μοριακού βάρους. Χαρακτηρίζεται από τον έντονο αλκαλικό χαρακτήρα του μορίου τους, με ισοηλεκτρικό σημείο περίπου σε $pH = 11$. Την ιδιότητα τους αυτή οφείλουν στο μεγάλο ποσοστό συμμετοχής στη σύσταση του μορίου τους των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη (μέχρι 90% σε μερικές περιπτώσεις). Λόγω των ελεύθερων θετικών φορτίων που φέρουν, σχηματίζουν εύκολα ιονικούς δεσμούς με μόρια που φέρουν αντίθετο ηλεκτρικό φορτίο. Ειδικότερα οι ιστόνες βρίσκονται συνδεδεμένες με το DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων.

δ) Οι γλοβίνες ή σφαιρίνες που διακρίνονται από τις προηγούμενες λόγω της αυξημένης συμμετοχής της ιστιδίνης στο μόριο τους. Σε αυτές ανήκει το πρωτεϊνικό τμήμα της αιμογλοβίνης και της μυογλοβίνης.

ε) Οι προλαμίνες χαρακτηρίζονται από την διαλυτότητα τους σε αλκοολούχα διαλύματα. Περιέχουν υψηλά ποσοστά γλουταμικού οξέος, γλουταμί-

νης, καθώς και ασπαραγίνης. Αντίθετα η περιεκτικότητά τους σε λυσίνη είναι πολύ μικρή, όπως συμβαίνει π.χ. στην πρωτεΐνη γλιαδίνη του σιταριού.

στ) Οι γλουτελίνες. Και αυτές, όπως οι προηγούμενες, είναι φυτικής προέλευσης. Είναι διαλυτές σε όξινα ή αλκαλικά αλατούχα διαλύματα, αλλά αδιάλυτες σε αλατούχα διαλύματα ουδέτερου pH. Είναι πλούσιες σε γλουταμικό οξύ, προλίνη και αργινίνη.

Ε. Με βάση την σύσταση του μορίου τους κατατάσσονται:

1. Σε απλές ή ολοπρωτεΐνες όταν το μόριο τους αποτελείται μόνο από αμινοξέα, και
2. Σε ετεροπρωτεΐνες ή συζευγμένες πρωτεΐνες ή σύνθετες όταν το μόριο τους περιέχει πέρα από το πρωτεϊνικό τμήμα και ένα μη πρωτεϊνικό συστατικό. Τα δύο συστατικά συνήθως συνδέονται με ισχυρό δεσμό. Η μη πρωτεϊνική ομάδα είναι δυνατό να είναι υδατάνθρακας, λιπίδιο, νουκλεικό οξύ, μεταλλικό ιόν, χρωμογενές, ή φωσφορική ομάδα. Αντίστοιχα τα προκύπτοντα μόρια αναφέρονται ως γλυκοπρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες, νουκλεοπρωτεΐνες, μεταλλοπρωτεΐνες, χρωμοπρωτεΐνες και φωσφοπρωτεΐνες.

ΣΤ. Με βάση το βιολογικό τους ρόλο κατατάσσονται:

1. Σε ένζυμα που είναι βιολογικοί καταλύτες και καταλύουν σχεδόν το σύνολο των αντιδράσεων ενός οργανισμού, δυναμική έκφραση των οποίων είναι η ζωή.
2. Σε αποθηκευτικές πρωτεΐνες όπως η γλιαδίνη του καρπού του σιταριού, η οβαλβουμίνη του αυγού, η καζεΐνη του γάλακτος. Με την μορφή αυτή οι οργανισμοί αποθηκεύουν μεταβολική ενέργεια και αμινοξέα για να καλύψουν τις ανάγκες του αναπτυσσόμενου εμβρύου και του νεογνού.
3. Σε τοξίνες όπως η γκοσσυπίνη και η ρυκίνη. Οι πρωτεΐνες αυτές σε πολύ μικρές ποσότητες είναι τοξικές για τους ανώτερους ζωικούς οργανισμούς.
4. Σε ορμόνες όπως η ινσουλίνη του παγκρέατος που ρυθμίζει το σύνολο του μεταβολισμού των τροφών, η σωματοτροπίνη, μια ορμόνη της ανάπτυξης, κ.α.
5. Σε πρωτεΐνες του μυϊκού συστήματος όπως η ακτίνη και η μυοσίνη, δύο κύρια συστατικά του μυϊκού ιστού.
6. Σε πρωτεΐνες μεταφοράς δηλαδή πρωτεΐνες που είναι ικανές να δεσμεύουν και να μεταφέρουν διάφορες ομάδες. Κυριότεροι αντιπρόσωποι, η αιμοσφαιρίνη των

ερυθροκυττάρων των σπονδυλωτών που μεταφέρει το οξυγόνο από τους πνεύμονες στους ιστούς και η μυογλοβίνη, επίσης μεταφορέας οξυγόνου στους ιστούς και στη λέμφο.

7. Σε δομικές πρωτεΐνες. Μερικές ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, όπως π.χ. η ακτίνη, σχηματίζουν ίνες, το σύνολο των οποίων δημιουργούν ένα τρισδιάστατο δομικό πλέγμα που καθορίζει το σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων και το οποίο επίσης συμμετέχει στην κίνηση και τη μετακίνηση τους. Οι εξωκυτταρικές δομικές πρωτεΐνες επίσης συνδέουν ισχυρά τα κύτταρα των ιστών και των οργάνων μεταξύ τους, ενώ παράλληλα δημιουργούν το απαραίτητο δομικό πλέγμα μέσα στο οποίο τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν. Οι περισσότερες δομικές πρωτεΐνες είναι συνήθως συσσωματώματα απλών πολυπεπτιδικών αλυσίδων που συνδέονται μεταξύ τους με ασθενείς ή ισχυρούς δεσμούς. Στα σπονδυλωτά το κολλαγόνο είναι η κυριότερη εξωκυτταρική πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού και του σκελετού. Επίσης στις δομικές πρωτεΐνες ανήκουν η ελαστίνη, η α-κερατίνη, η φιβροΐνη του μεταξιού, η εκτασίνη του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, κ.α.

8. Σε πρωτεΐνες του προστατευτικού ιστού και των αμυντικών μηχανισμών των οργανισμών. Στην ομάδα ανήκουν η θρομβίνη και το φιβρινογόνο του αίματος που βοηθούν στην πήξη του και έτσι εμποδίζονται απώλειες του από διάφορες πληγές. Επίσης ανήκουν τα αντισώματα ή γ-γλοβουλίνες ή ανοσογλοβουλίνες. Τα αντισώματα είναι συστατικά του συστήματος αναγνώρισης και απομάκρυνσης ξένων προς τον οργανισμό σωμάτων, όπως διάφορα μόρια μεγάλου μοριακού βάρους, βακτήρια, ιοί ή άλλοι μικροοργανισμοί, ή ακόμα και μεταμοσχεθέντα όργανα.

1.B.5 Σπουδαιότητα του προφίλ των πρωτεϊνών στην αναγνώριση της γενετικής καθαρότητας

Η γενετική καθαρότητα των υβριδιακών σπόρων είναι εξαιρετικής σπουδαιότητας για την ποιότητα του παραγόμενου καρπού αλλά και για την σοδιά. Ως εκ τούτου οι αγρότες οφείλουν να προμηθεύονται γενετικά πιστοποιημένο σπόρο. Ένας τρόπος εκπλήρωσης τούτου είναι η εφαρμογή ενός αποτελεσματικού τρόπου ελέγχου της γενετικής καθαρότητας του σπόρου που διοχετεύεται στην αγορά. Σύνηθες μέθοδος είναι ο

έλεγχος ανάπτυξης, ο οποίος χρησιμοποιείτε για να εντοπίσουμε τους μη επιθυμητούς τύπους αναφορικά με της διαφορές που παρατηρούνται στα χαρακτηριστικά των φυτών. Δυστυχώς όμως η διαδικασία αυτή είναι χρονοβόρα ακριβή και απαιτεί εντατική εργασία. Εξάλλου αν δεν πραγματοποιείτε σε μη καλλιεργητικοί περίοδο τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα μόνο την επόμενη καλλιεργητικοί περίοδο, πράγμα που περιορίζει την χρηστική της αξία αφού οι περισσότεροι σπόροι έχουν πωληθεί και χρησιμοποιηθεί. Συνεπώς για να είναι αποτελεσματική μια μέθοδος αξιολόγησης της γενετικής καθαρότητας πρέπει τα αποτελέσματα να είναι διαθέσιμα προτού οι σπόροι πωληθούν. Η ανάγκη αυτή οδήγησε στην αναζήτηση ενός εύχρηστου τρόπου ελέγχου με απώτερο στόχο την γενετική πιστοποίηση των σπόρων.

Την πλειοψηφία αυτών των κριτηρίων τελικά ήρθε να καλύψει η ανακάλυψη και η δημιουργία των προφίλ των πρωτεϊνών. Σήμερα τα προφίλ των πρωτεϊνών βρίσκονται σε καθημερινή χρήση και είναι ευρέως αποδεκτά ως ένα εύχρηστο εργαλείο για τον προσδιορισμό της γενετικής ταυτότητας της εκάστοτε ποικιλίας σπόρου. Η επιτυχία τους είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με των παρατηρούμενο πολυμορφισμό των πρωτεϊνών των σπόρων (Kumar, J., Agrawal, R.L., Kumar, A. And Gang, G.K. (2001), Seed Sci. And Technol., 29, 647-652).

1.B.6 Αναφορές σχετικά με τους παράγοντες που προκαλούν αποκλίσεις στην αρτιότητα της γενετικής σύστασης του σπόρου

Οι επιφερόμενες γενετικές παρεκκλίσεις στους γηρασμένους σπόρους είναι γνωστές από την εποχή κατά την οποία ο Navashin (1933a,b) δημοσίευσε της παρατηρήσεις του πάνω σε φυτά τα οποία είχαν προέλθει από την βλάστηση ηλικιωμένων σπόρων.

Ακολούθησαν αρκετές άλλες δημοσιεύσεις που αφορούσαν το φαινόμενο αυτό, όπως από τους Ashton 1956, Barton 1961, Roberts 1972,1973, Murata 1979, roos 1980. Στην προαναφερθείσα μελέτη, ο Navashon (1936b), δημοσίευσε ότι πέραν του 80% των φυτών που είχαν προέλθει από γηρασμένο σπόρο, παρουσίαζαν γενετικές παρεκκλίσεις. Μελέτησε φυτά ηλικίας δύο περίπου μηνών τα οποία είχαν προέλθει από σπόρο ηλικίας 6-7 ετών. Ο σπόρος ο οποίος χρησιμοποιήθηκε είχε σαν αποτέλεσμα την

ανάπτυξη φτωχών, αδύναμων και κυρίως μη φυσιολογικών σποροφύτων (Navashin 1933a).

Επιπρόσθετα οι Abdalla και Roberts (1968), μελέτησαν τις επιπτώσεις της θερμοκρασίας αποθήκευσης, της υγρασίας και του οξυγόνου πάνω στον γενότυπο σπόρων κριθαριού και φασολιού. Τα τελικά συμπεράσματα τους ήταν, για όλες σχεδόν, ότι καθώς περιορίζονταν η βλαστική ικανότητα, το ποσοστό γενετικής παρέκκλισης από το φυσιολογικό αυξάνονταν.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.A. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

2.A.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την περάτωση της πειραματικής διαδικασίας διαχωρίζονται σε συσκευές και αναλώσιμα:

2.A.1.1 Συσκευές

1. Ζυγός ακριβείας - ηλεκτρονικός της εταιρίας ADAM EQUIPMENT
2. Ομογενοποιητής της εταιρίας IKA LABORTECHNIC.
3. Συσκευή φυγοκέντρισης UNIVERSAL 16 R της εταιρίας HETTICH.
4. Συσκευή ρυθμικής ανακίνησης δειγμάτων τύπου VORTEX.
5. Υδατόλουτρο της εταιρίας MEMMERT.
6. Φασματοφωτόμετρο U-1500 της εταιρίας HITACHI.
7. Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης της εταιρίας MAJOR SCIENCE
8. Ψυχειοκλίβανος (προβλαστήριο)

2.A.1.2 Αναλώσιμα

1. Απεσταγμένο νερό
2. Trk – lysis byffer της εταιρίας Omega Biotec Inc.
3. Μερκαπτοαιθανόλη της εταιρίας SIGMA.
4. Αιθανόλη 95% pro-analysis.
5. DEPC – treated water της εταιρίας Omega Biotec Inc.
6. Trizol Reagent της εταιρίας CIBCO BRL.
7. CHLOROFORM της εταιρίας MERCK.
8. 2-Propanol της εταιρίας MERCK.
9. Χλωριούχο μαγνήσιο ($Mg\ Cl_2\ 6\ H_2O$) της εταιρίας MERCK.
10. Tris της εταιρίας MERCK.
11. Υδροχλωρικό οξύ της εταιρίας MERCK.
12. Phenol της εταιρίας MERCK.

13. EDTA της εταιρίας SIGMA.
14. Dnase L (1 unit / λ) της εταιρίας CLONTECH.
15. MMLV Reverse Transcriptase (200units / λ) της εταιρίας CLONTECH.
16. 5X First- -Strand Buffer της εταιρίας CLONTECH.
17. Ακρυλαμίδα της εταιρίας SIGMA.
18. Bis - ακρυλαμίδα της εταιρίας SIGMA.
19. Ουρία της εταιρίας Riedel de Haen.
20. TEMED (τετραμεθυλαιθυλαιδιαμίνη N,N,N,N) της εταιρίας MERCK.
21. Υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) της εταιρίας SIGMA.
22. Οξικό οξύ της εταιρίας Riedel de Haen.
23. Νιτρικός άργυρος της εταιρίας SIGMA.
24. Βρωμιούχο αιθίλιο της εταιρίας MERCK.
25. Φορμαλδεΰδη της εταιρίας MERCK.
26. Μάρτυρας (1300 db) της εταιρίας Biolab.
27. Αλβουμίνη.
28. Κυανούν της βρωμοφαινόλης της εταιρίας SIGMA.
29. Γλυκίνη (Aminoacetic acid) της εταιρίας SIGMA.
30. Γλυκερίνη της εταιρίας MERCK.
31. Γλουταραλδεΰδη της εταιρίας MERCK.
32. Ανθρακικό ασβέστιο της εταιρίας Riedel de Haen.
33. Νατριούχο άλας του θειικού δωδεκυλίου (Sodium Dodecyl Sulfate SDS) της εταιρίας MERCK.
34. Χλωριούχο Νάτριο της εταιρίας Riedel de Haen.
35. Petri.

2.A.2 Μέθοδοι

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι ακόλουθες:

2.A.2.1 Συλλογή και διατήρηση των σπόρων πιπεριάς και μελιτζάνας

Για την υλοποίηση αυτής της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν σπόροι πιπεριάς και μελιτζάνας οι οποίοι είχαν συγκομιστεί από το έτος 1987 έως το έτος 1992, καθώς και το έτος 2000. Οι σπόροι οι οποίοι συγκομίστηκαν άνηκαν στις ποικιλίες EMI και Long Negro για την μελιτζάνα, E₃ και Yolo Wonder για την πιπεριά.

Επιπλέον μετά την συγκομιδή τους, οι σπόροι αποθηκεύτηκαν άλλοι μεν στους 25⁰C και άλλοι δε στους 5⁰C, συγκεκριμένα:

ΠΙΝ. 1 Δεδομένα ως προς την ονομασία, την ποικιλία, την εποχή συγκομιδής και την θερμοκρασία αποθήκευσης των δειγμάτων μελιτζάνας

Ονομασία Δείγματος	Ποικιλία Μελιτζάνας	Ημερομηνία Συγκομιδής	Θερμοκρασία Αποθήκευσης
M1	EMI	30-8-1989	25 ⁰ C
M2	EMI	12-10-1989	25 ⁰ C
M3	EMI	4-9-1990	25 ⁰ C
M4	EMI	5-11-1990	25 ⁰ C
M5	EMI	1991	25 ⁰ C
M6	EMI	8-6-1992	25 ⁰ C
M7	EMI	1992	25 ⁰ C
M8	EMI	19-7-1988	5 ⁰ C
M9	EMI	23-8-1988	5 ⁰ C
M10	EMI	20-9-1988	5 ⁰ C
M11	EMI	4-9-1990	5 ⁰ C
M12	EMI	5-11-1990	5 ⁰ C
M13	EMI	1991	5 ⁰ C
M14	EMI	8-6-1992	5 ⁰ C
M15	EMI	23-7-1992	5 ⁰ C
M16	Long Negro	22-8-1989	25 ⁰ C
M17	Long Negro	2-10-1989	25 ⁰ C
M18	Long Negro	18-8-1989	5 ⁰ C
M19	Long Negro	30-7-1990	25 ⁰ C
M20	Long Negro	30-8-1990	25 ⁰ C
M21	Long Negro	17-9-1990	25 ⁰ C
M22	Long Negro	17-10-1990	25 ⁰ C
M23	Long Negro	30-7-1990	5 ⁰ C
M24	Long Negro	30-8-1990	5 ⁰ C
M25	Long Negro	17-9-1990	5 ⁰ C
M26	Long Negro	17-10-1990	5 ⁰ C
M27	Long Negro	1991	25 ⁰ C
M28	Long Negro	1991	5 ⁰ C
M29	Long Negro	1992	25 ⁰ C
M30	Long Negro	1992	25 ⁰ C
M31	Long Negro	2000	25 ⁰ C

ΠΙΝ. 2 Δεδομένα ως προς την ονομασία, την ποικιλία, την εποχή συγκομιδής και την θερμοκρασία αποθήκευσης των δειγμάτων πιπεριάς.

Ονομασία Δείγματος	Ποικιλία Πιπεριάς	Ημερομηνία Συγκομιδής	Θερμοκρασία Αποθήκευσης
Π1	E ₃	13-8-1987	25 °C
Π2	E ₃	9-10-1987	25 °C
Π3	E ₃	1987	5 °C
Π4	E ₃	2-8-1989	25 °C
Π5	E ₃	20-9-1990	25 °C
Π6	E ₃	20-9-1990	25 °C
Π7	E ₃	4-9-1990	5 °C
Π8	E ₃	7-11-1992	25 °C
Π9	Yolo Wonder	1988	25 °C
Π10	Yolo Wonder	2-10-1989	25 °C
Π11	Yolo Wonder	13-9-1990	25 °C
Π12	Yolo Wonder	1995	25 °C
Π13	Yolo Wonder	2000	25 °C
Π14	E ₃	2000	25 °C

2.A.2.2 Έλεγχος της βλαστικότητας

Η διαδικασία ελέγχου της βλαστικότητας των δειγμάτων πιπεριάς και μελιτζάνας πραγματοποιήθηκε σε ψυχειοκλίβανο (προβλαστήριο) περιοχής θερμοκρασίας 25 °C, ± 0,5 °C.

Για την εκπλήρωση της διαδικασίας ελέγχου της βλαστικότητας χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα petri για κάθε δείγμα, στο καθένα από τα οποία τοποθετήθηκαν 50 σπόροι. Ως υπόστρωμα σε κάθε petri χρησιμοποιήθηκαν τρία φύλλα διηθητικού χαρτιού, ενώ είχαμε και την προσθήκη μυκητοκτόνου Benlate (benomyl 50% και βοηθητικές ουσίες 47,37%), σε αναλογία 0,8gr προς 1lt νερό. Η αναγκαιότητα χρησιμοποίησής του μυκητοκτόνου ήταν επιβεβλημένη καθώς μερικά δείγματα παρουσίαζαν σημαντικό πρόβλημα προσβολής από μύκητες.

Τα δείγματα χωρίσθηκαν σε δύο ισάριθμες παρτίδες. Η πρώτη παρτίδα τοποθετήθηκε στο προβλαστήριο από τις 23 Μαρτίου 2001 έως τις 3 Απριλίου 2001, ενώ η δεύτερη από τις 15 Απριλίου 2001 έως τις 26 Απριλίου 2001. Η παρακολούθηση της βλαστικότητας έγινε από την 3^η έως την 12^η ημέρα, σύμφωνα με τον κανονισμό της ISTA.

Τέλος τα αποτελέσματα της βλαστικής ικανότητας τα οποία βρέθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του μέσου χρόνου βλαστικότητας, σε ημέρες, κα-

θώς και της ταχύτητας βλαστικότητας, τα οποία δίδονται αντιστοίχως από τις σχέσεις $\bar{D} = \Sigma(D \cdot n) / \Sigma n$ και $R = 1/\bar{D}$.

Όπου: $\Sigma(D \cdot n)$ είναι το άθροισμα των γινομένων, καθένα από τα οποία προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό της ημέρας επί τον αριθμό των σπόρων που φύτεψαν την εν' λόγο ημέρα.

Σn είναι το άθροισμα των σπόρων που φύτεψαν συνολικά.

2.A.2.3 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης γνωστής ποσότητας πρωτεΐνης

Στην προκειμένη περίπτωση είχαμε ως στόχο τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς κάποιου διαλύματος γνωστής ποσότητας πρωτεΐνης, με την χρήση του φασματοφωτόμετρου ώστε η εν' λόγο καμπύλη να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό αγνώστων ποσοτήτων πρωτεΐνης σε δείγμα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αλβουμίνης περιεκτικότητας 10 mg/ml.

Ακολουθήσαμε την μέθοδο Bradford. Παρασκευάσαμε 100 ml πυκνής χρωστικής, η οποία περιέχει 0,05 g Coomassie blue, 15 ml μεθανόλης 95%, 65 ml φωσφορικού οξέος 85% και 20 ml απεσταγμένο νερό. Στη μεθανόλη διαλύθηκε η χρωστική Coomassie blue και στη συνέχεια προστέθηκε το φωσφορικό οξύ και το απεσταγμένο νερό.

Η πυκνή αυτή χρωστική αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:5 πριν τον υπολογισμό της ποσότητας των πρωτεϊνών.

Εν συνεχεία τοποθετήσαμε τις ποσότητες της αλβουμίνης (10μl, 20μl, 50μl, 100μl, 120μl) σε 5 ml αραιωμένης χρωστικής και σε καθαρό σωληνάκι αντίστοιχα, καθώς και τυφλό χωρίς αλβουμίνη με 10μl νερό, και μετρήσαμε την απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο στα 595 nm. Τέλος τα αποτελέσματα τοποθετήθηκαν σε μιλιμετρέ χαρτί ώστε να έχουμε την γραφική απεικόνιση της πρότυπης καμπύλης

2.A.2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών, υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα

Σκοπός αυτού του σκέλους, ήταν η απομόνωση της πρωτεΐνης του κυτταροπλάσματος συγκεκριμένου δείγματος και με την βοήθεια του φασματοφωτόμετρου η μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm. Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη της αλβουμίνης υπολογίσαμε την ποσότητα των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα.

Για την υλοποίηση των παραπάνω επιλέχθηκαν 5 σπόροι με τα φύτρα τους από κάθε δείγμα (M5, M9, M10, M11, M13, M14, M15, M23, M24, M25, M28, M31, Π3, Π5, Π14) και συντηρήθηκαν στους -20°C . Εδώ καλό θα ήταν να αναφερθεί ότι για την συνέχιση της διαδικασίας επιλέχθηκαν τα δείγματα τα οποία είχαν τουλάχιστον 20% βλαστικότητα και προσέχοντας να υπάρχει αντιπροσωπευτικότητα ως προς τις ποικιλίες της πιπεριάς και της μελιτζάνας. Η πεντάδα σπόρων κάθε δείγματος είχε περίπου το ίδιο μήκος. Εν συνεχεία οι σπόροι κάθε δείγματος τοποθετήθηκαν σε ειδικό δοχείο της συσκευής ομογενοποίησης μαζί με 100μl ή 250μl Sample-Buffer (Tris-HCl 50 mM σε pH 7,5 και 0,9% NaCl) αναλογικά με το μέγεθος των σπόρων κάθε δείγματος:

ΠΙΝ. 3 Ποσότητα Sample- Buffer (Tris-HCl mM σε pH 7,5 και 0,9% NaCl) που προστέθηκε σε κάθε δείγμα μελιτζάνας, για την εκπλήρωση της διαδικασίας ομογενοποίησης.

Δείγματα	Sample-Buffer (Tris-HCl 50 mM σε pH 7.5 και 0.9% NaCl)
M5	100μl
M9	100μl
M10	100μl
M11	100μl
M13	250μl
M14	100μl
M15	100μl
M23	250μl
M24	100μl
M25	250μl
M28	100μl
M31	250μl

ΠΙΝ. 4 Ποσότητα Sample- Buffer (Tris-HCl mM σε pH 7,5 και 0,9% NaCl) που προστέθηκε σε κάθε δείγμα πιπεριάς, για την εκπλήρωση της διαδικασίας ομογενοποίησης.

Δείγματα	Sample-Buffer (Tris-HCl 50 mM σε pH 7.5 και 0.9% NaCl)
Π3	250μl
Π5	250μl
Π14	250μl

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία ομογενοποίησης, με την βοήθεια ηλεκτροκίνητου περιστρεφόμενου γουδιού (10 φορές περίπου), τα δείγματα φυγοκεντρείθηκαν για 10 λεπτά στις 5000 στροφές και σε 4 °C. Σκοπός της φυγοκέντρωσης ήταν η απομάκρυνση των κυτταρικών μεμβρανών, των πυρήνων και των μιτοχονδρίων τα οποία ελήφθησαν υπό μορφή ιζήματος μετά την φυγοκέντρωση. Το υπερκείμενο που συλλέχθηκε τοποθετήθηκε στην κατάψυξη στους -20 °C και αποτελεί το κυτταρόπλασμα το οποίο μας ενδιέφερε. Ενώ το ίζημα από κάθε δείγμα, το οποίο περιείχε στο μεγαλύτερο μέρος του πυρήνες και ονομάζεται πυρηνικό κλάσμα, τοποθετήθηκε επίσης στην κατάψυξη στη θερμοκρασία των -20 °C.

Τέλος, επιλέχθηκαν 2 σωλήνες για κάθε δείγμα, στον καθένα από τους οποίους τοποθετήθηκαν 5μl και 10μl κυτταροπλάσματος του κάθε δείγματος αντίστοιχα, καθώς και 5ml αραιωμένης χρωστικής (1:5) Coomassie blue. Το τυφλό δηλαδή ο μάρτυρας περιείχε μόνο 5ml αραιωμένης χρωστικής. Ακολούθησε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο στα 595nm όπου βρέθηκαν οι αντίστοιχες τιμές απορρόφησης.

Τις τιμές απορρόφησης της οποίες βρήκαμε τις τοποθετήσαμε πάνω στην πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης και υπολογίσαμε τα αντίστοιχα μg πρωτεΐνης, ενώ ξέροντας τον αρχικό όγκο του δείγματος υπολογίσαμε την συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα τα οποία βρήκαμε βάση της πρότυπης καμπύλης μας φανερώνουν την ποσότητα σε μl που πρέπει να πάρω από κάθε δείγμα ώστε να έχω πάντα 20μg πρωτεΐνης.

2.A.2.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε συνθήκες μετουσίωσης, σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδιου

Η τεχνική αυτή προσφέρει τη δυνατότητα διαχωρισμού των πρωτεϊνών, του ελέγχου της καθαρότητας τους και του υπολογισμού του μοριακού τους βάρους. Η μετουσίωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με την χρήση του απορρυπαντικού νατριούχου άλατος του θειικού δωδεκιλίου (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) και θέρμανση. Με τον τρόπο αυτό προκαλείτε αποδιάταξη των πρωτεϊνών που οφείλεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH το SDS περιβάλλει τις πρωτεΐνες με συνέπεια αυτές να αποκτούν αρνητικό φορτίο. Αποτέλεσμα αυτού είναι πώς όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο οι πρωτεΐνες μετακινούνται προς την άνοδο. Η κινητικότητα τους εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες με το μικρότερο μοριακό βάρος

είναι αυτές που κινούνται γρηγορότερα. Η τάση του ρεύματος παίζει σημαντικό ρόλο στην ταχύτητα της μετανάστευσης των πρωτεϊνών στο πήκτωμα. Επιθυμούμε να μην είναι πολύ μεγάλη, έτσι ώστε οι ζώνες των πρωτεϊνών που σχηματίζονται κατά την ηλεκτροφόρηση να διαχωρίζονται σωστά και να μην διαχέονται οι πρωτεΐνες στην πλάκα ηλεκτροφόρησης.

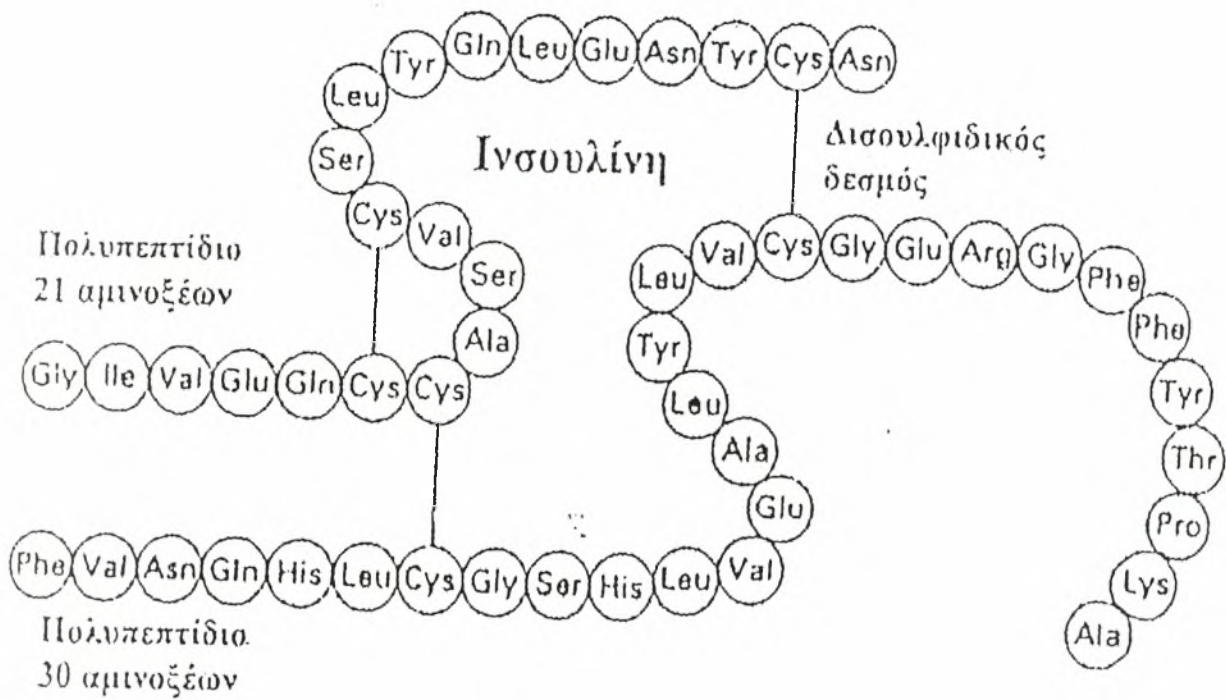
Το πήκτωμα παλυακρυλαμιδίου είναι 15% στη σύνθεση του. Η πλάκα του πηκτώματος είχε διαστάσεις 16,5 x 14,5 x 0,15 εκατοστά. Το πήκτωμα δημιουργήθηκε με πολυμερισμό και του N, N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμιδίου (bis) (25 ml). Το bis σε αναλογία 0,8: 30 ως προς το ακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται στο πλέγμα σαν σύνδεσμος των αλυσίδων του ακρυλαμιδίου. Στο πήκτωμα επίσης προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl 1,5M pH 8,8 (24 ml), SDS 0,1 %, 45 μl TEMED, το οποίο χρησιμεύει στην μετάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού οι οποίες εμφανίζονται λόγω της παρουσίας του καταλύτη, 600μl υπερθεϊκού αμμωνίου 10% (APS), το οποίο παίζει τον ρόλο του καταλύτη και απεσταγμένο νερό έως ότου ο τελικός όγκος του μίγματος γίνει 50ml.

Το μίγμα τοποθετήθηκε μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών ηλεκτροφόρησης μέχρι 2-3 περίπου cm κάτω από την επιφάνεια και διατηρήθηκε για τρεις περίπου ώρες μέχρι να πήξει.

Απαιτείται η χρήση γαντιών όταν δουλεύουμε το ακρυλαμίδιο, λόγω του ότι αυτό είναι νευροτοξικό. Το πολυμερισμένο ακρυλαμίδιο δεν είναι τοξικό, εκτός και αν υπάρχει ακρυλαμίδιο το οποίο δεν πολυμερίστηκε.

Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα διαλύθηκαν σε δύο ρυθμιστικά διαλύματα (Sample-Buffer) τα οποία χαρακτηρίζονταν από την ύπαρξη ή μη της μερκαπταιθανόλης, δηλαδή σε αναγωγικές ή μη αναγωγικές συνθήκες. Η μερκαπταιθανόλη χρησιμοποιείται διότι διασπά τους σουλφιδικούς δεσμούς και επιτρέπει τον διαχωρισμό των υπομονάδων της πρωτεΐνης, αν υπάρχουν (Σχήμα 1) Το ένα ρυθμιστικό διάλυμα (αναγωγικές συνθήκες) περιείχε Tris-HCl τελικής συγκέντρωσης 0,06M και pH 6,8, 3% SDS, 10% γλυκερίνη, 5% μερκαπταιθανόλη, 0,05% κυανού της βρωμοφαινόλης (BPB), ενώ το άλλο (μη αναγωγικές συνθήκες) περιείχε ακριβώς τα ίδια συστατικά εκτός της μερκαπταιθανόλης. Τα διαλύματα των πρωτεϊνών που περιείχουν την μερκαπταιθανόλη θερμάνθηκαν στους 100 °C για περίπου πέντε λεπτά, έτσι ώστε να ανοίξουν οι δομές των πρωτεϊνών και να διαχωριστούν οι υπομονάδες τους.

Σχήμα 1: Δισουλφιδικοί δεσμοί στην πρωτεΐνη ινσουλίνη. Με την διάσπαση τους, παρουσία μερκαπταιθανόλης και θέρμανσης, η πρωτεΐνη θα αποδομηθεί στις υπομονάδες από τις οποίες αποτελείται.



Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα δείγματα στις υποδοχές του πηκτώματος, που δημιουργήθηκαν με ειδικές χτένες για τον σκοπό αυτό και ηλεκτροφορήθηκαν σε ρεύμα σταθερής έντασης 25mA για 3 – 4 περίπου ώρες. Υπολογίσαμε περίπου γύρω στα 20μg πρωτεΐνης βάση της πρότυπης καμπύλης και συμπληρώσαμε με (sample-buffer) μέχρι τα 10μl σε κάθε πηγάδι. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running-buffer) αποτελούταν από 14,4 γραμμάρια γλυκίνης, 3,03 γραμμάρια Tris και ένα γραμμάριο SDS, σε απεσταγμένο νερό για ένα λίτρο διαλύματος. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη αλβουμίνη σε συγκέντρωση 0,5 μl/ml πάντα στην αρχή και στο τέλος των δειγμάτων.

Για την στερέωση, τη χρώση και τον αποχρωματισμό της πλάκας ηλεκτροφόρησης έγιναν τα εξής βήματα:

- 1) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα που περιείχε 50% μεθανόλη και 10% οξικού οξέος. Η διάρκεια της εμβάπτισης ήταν 30 λεπτά, σε διαρκή ανακίνηση.
- 2) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα που περιείχε 5% μεθανόλη και 7% οξικό οξύ. Η διάρκεια της εμβάπτισης ήταν 30 λεπτά, σε διαρκή ανακίνηση.
- 3) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα που περιείχε 10% γλουταραλδεύδη. Η διάρκεια της εμβάπτισης ήταν 30 λεπτά σε διαρκή ανακίνηση.
- 4) Ξέπλυμα του πηκτώματος σε απεσταγμένο νερό (dd-H₂O), όπου και παρέμεινε για χρονικό διάστημα από δύο ώρες έως και όλη την νύχτα.
- 5) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα DDT, τελικής συγκέντρωσης 5μg/ml. Η διάρκεια της εμβάπτισης ήταν 30 λεπτά, σε διαρκή ανακίνηση.
- 6) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα νιτρικού αργύρου 0,1%. Η διάρκεια της εμβάπτισης ήταν 30 λεπτά, σε διαρκή ανακίνηση.
- 7) Γρήγορο ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό δύο φορές (dd-H₂O).
- 8) Γρήγορο ξέπλυμα μία φορά με 250ml εμφανιστικού υγρού (developer). Το διάλυμα αυτό περιείχε 500ml απεσταγμένο νερό (dd-H₂O), 500μl φορμαλδεύδης 37% και 15g ανθρακικού νατρίου.
- 9) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε 250ml εμφανιστικού υγρού (developer), έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες ηλεκτροφόρησης, με διαρκή ανακίνηση.
- 10) Μετά την εμφάνιση των ζωνών προσθέσαμε στο εμφανιστικό υγρό διάλυμα που περιείχε 5ml οξικού οξέος και 45ml απεσταγμένο νερό (dd-H₂O), (σύνολο 50 ml) για το σταμάτημα της χρώσης.
- 11) Ξέπλυμα του πηκτώματος 2-3 φορές με απεσταγμένο νερό (dd-H₂O), τοποθέτηση του σε ζελατίνα και διατήρηση του στο ψυγείο.

Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους έγινε με βάση την ηλεκτροφορητική κινητικότητα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες.



2.Β ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.Β.1 Μετρήσεις βλαστικής ικανότητας των δειγμάτων πιπεριάς και μελιτζάνας

Ακολουθώντας την διαδικασία κατά των τρόπο που περιγράφηκε σε προηγούμενο κομμάτι του κεφαλαίου προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα ως προς την βλαστική ικανότητα, το μέσο χρόνο βλαστικότητας και την ταχύτητα της βλαστικότητας:

ΠΙΝ. 5 Αποτελέσματα δειγμάτων μελιτζάνας, όπου:

- Đ, ο μέσος χρόνος βλαστικότητας (προέκυψε από τον μέσο όρο των τεσσάρων τιμών κάθε δείγματος, μια για κάθε επανάληψη. Η τιμή της κάθε επανάληψης προέρχονταν από τον λόγο $\Sigma(D)/\Sigma n$).
- R, η ταχύτητα βλαστικότητας (προέκυψε από τον μέσο όρο των τεσσάρων τιμών των επαναλήψεων).
- B, η βλαστική ικανότητα (προέκυψε από τον μέσο όρο των τεσσάρων τιμών των επαναλήψεων).

Δείγματα	Đ (Μέσος Χρόνος Βλαστικότητας)	R (Ταχύτητα Βλαστικότητας)	B (Βλαστικότητα)
M1	2,500	0,025	0,5%
M2	0,000	0,000	0,0%
M3	5,000	0,055	1,0%
M4	5,000	0,164	2,0%
M5	11,400	0,286	60,5%
M6	11,420	0,088	17,5%
M7	3,000	0,020	0,5%
M8	8,110	0,070	14,0%
M9	8,070	0,127	71,5%
M10	9,950	0,102	58,0%
M11	6,810	0,147	19,5%
M12	7,790	0,118	9,5%
M13	9,343	0,109	46,5%
M14	7,190	0,140	35,5%
M15	8,940	0,113	44,5%
M16	4,000	0,060	3,0%
M17	2,500	0,025	1,0%
M18	10,45	0,056	11,0%
M19	0,000	0,000	0,0%
M20	0,000	0,000	0,0%
M21	3,000	0,084	1,0%

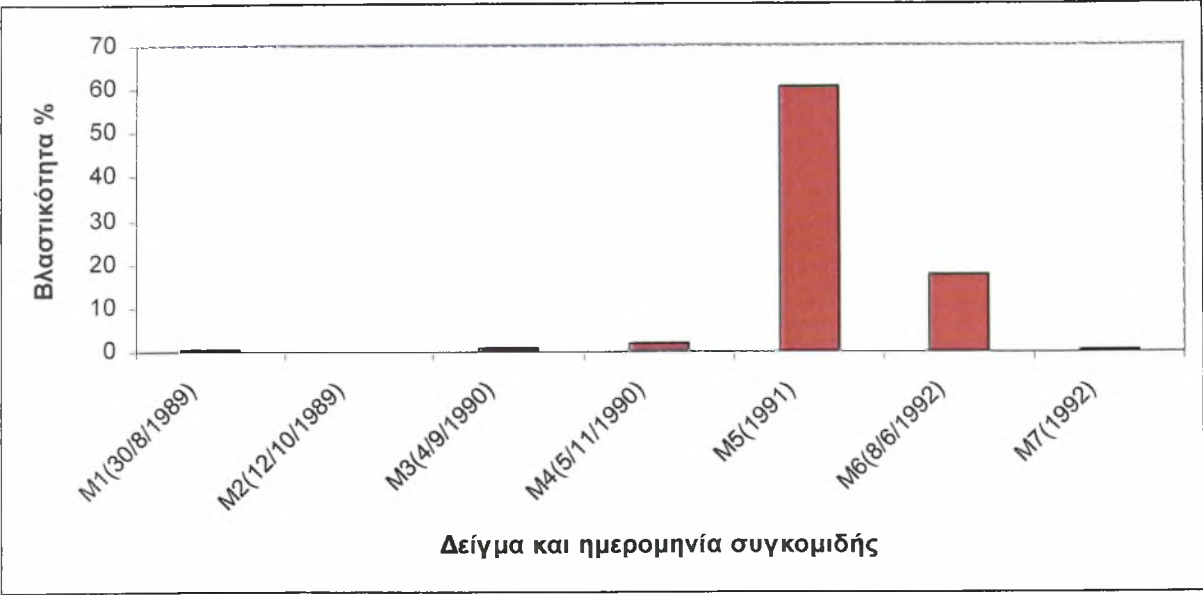
M22	1,250	0,063	0,5%
M23	9,500	0,106	42,5%
M24	7,340	0,137	78,5%
M25	8,660	0,116	68,5%
M26	10,660	0,094	13,0%
M27	10,570	0,095	6,0%
M28	9,560	0,106	56,0%
M29	8,125	0,070	2,0%
M30	5,500	0,046	1,0%
M31	9,360	0,107	94,0%

ΠΙΝ. 6 Αποτελέσματα δειγμάτων πιπεριάς, όπου:

- D̄**, ο μέσος χρόνος βλαστικότητας λόγος (προέκυψε από τον μέσο όρο των τεσσάρων τιμών κάθε δείγματος, μια για κάθε επανάληψη. Η τιμή της κάθε επανάληψης προέρχονταν από τον λόγο $\Sigma(D \cdot n) / \Sigma n$).
- R**, η ταχύτητα βλαστικότητας (προέκυψε από τον μέσο όρο των τεσσάρων τιμών των επαναλήψεων).
- B**, η βλαστική ικανότητα (προέκυψε από τον μέσο όρο των τεσσάρων τιμών των επαναλήψεων).

Δείγματα	D̄ (Μέσος Χρόνος Βλαστικότητας)	R (Ταχύτητα Βλαστικότητας)	B (Βλαστικότητα)
Π1	5,270	0,020	11,0%
Π2	8,270	0,068	6,3%
Π3	8,700	0,115	72,0%
Π4	0,000	0,000	0,0%
Π5	9,000	0,110	20,0%
Π6	0,000	0,000	0,0%
Π7	0,000	0,000	0,0%
Π8	3,500	0,070	1,0%
Π9	3,250	0,170	3,0%
Π10	8,650	0,116	16,0%
Π11	4,300	0,024	4,0%
Π12	4,600	0,024	6,5%
Π13	11,600	0,087	14,0%
Π14	10,090	0,100	76,0%

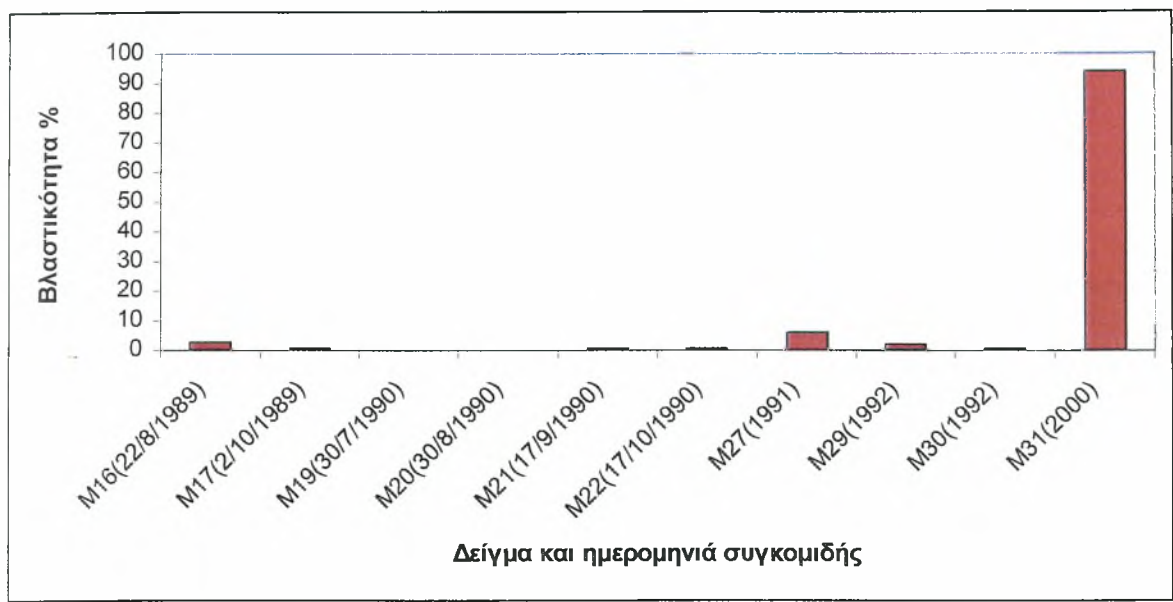
Γράφημα 1. Γραφική απεικόνιση της βλαστικότητας για τα δείγματα της μελιτζάνας (EMI), τα οποία είχαν αποθηκευτή στους 25⁰C.



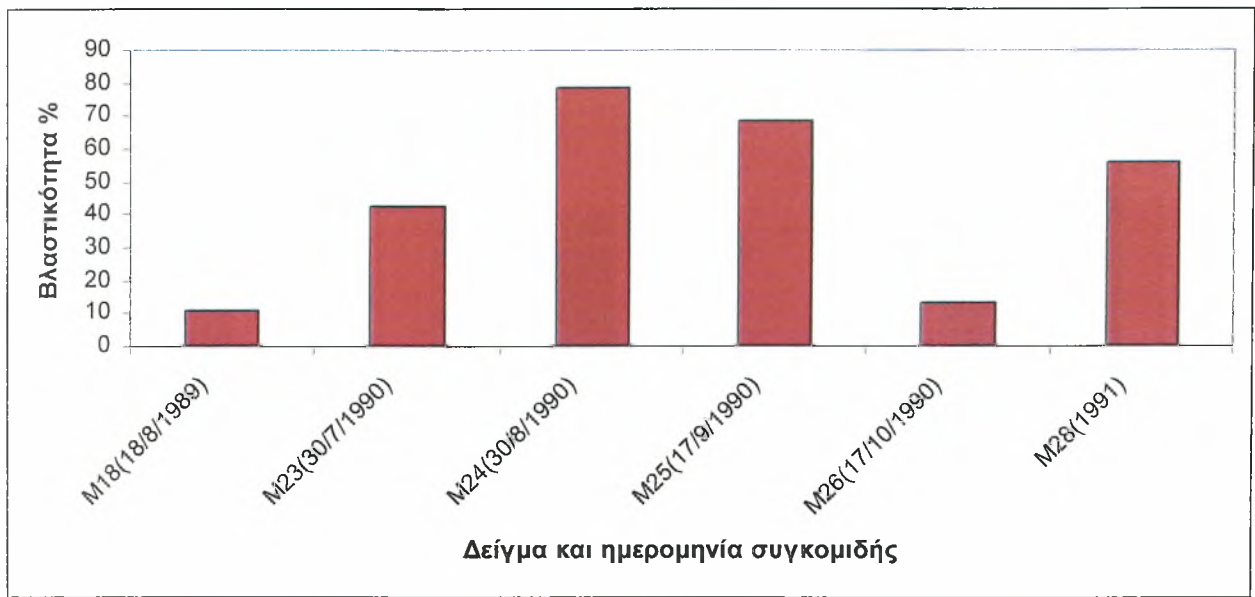
Γράφημα 2. Γραφική απεικόνιση της βλαστικότητας για τα δείγματα της μελιτζάνας (EMI), τα οποία είχαν αποθηκευτή στους 5⁰C.



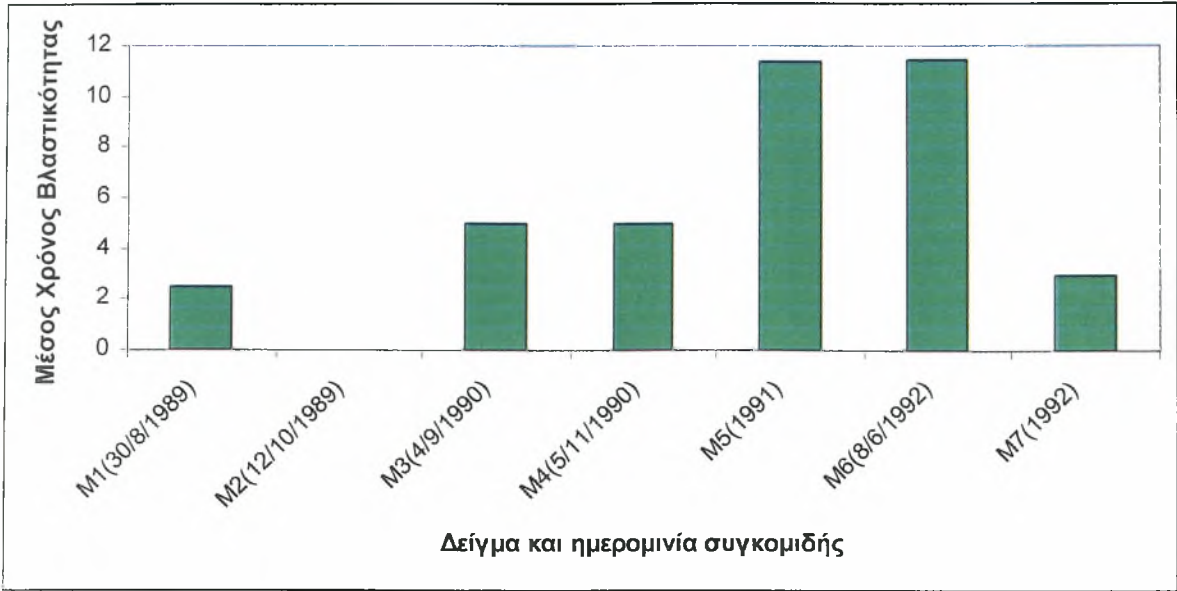
Γράφημα 3. Γραφική απεικόνιση της βλαστικότητας για τα δείγματα της μελιτζάνας (Long Negro), τα οποία είχαν αποθηκευτή στους 25⁰C.



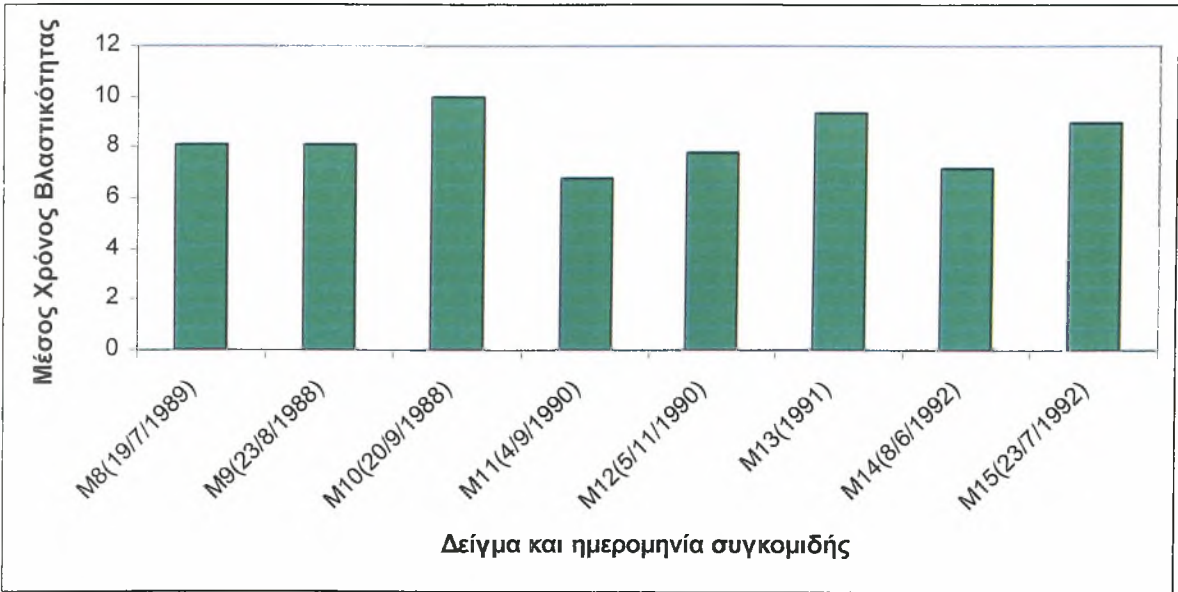
Γράφημα 4. Γραφική απεικόνιση της βλαστικότητας για τα δείγματα της μελιτζάνας (Long Negro), τα οποία είχαν αποθηκευτή στους 5⁰C.



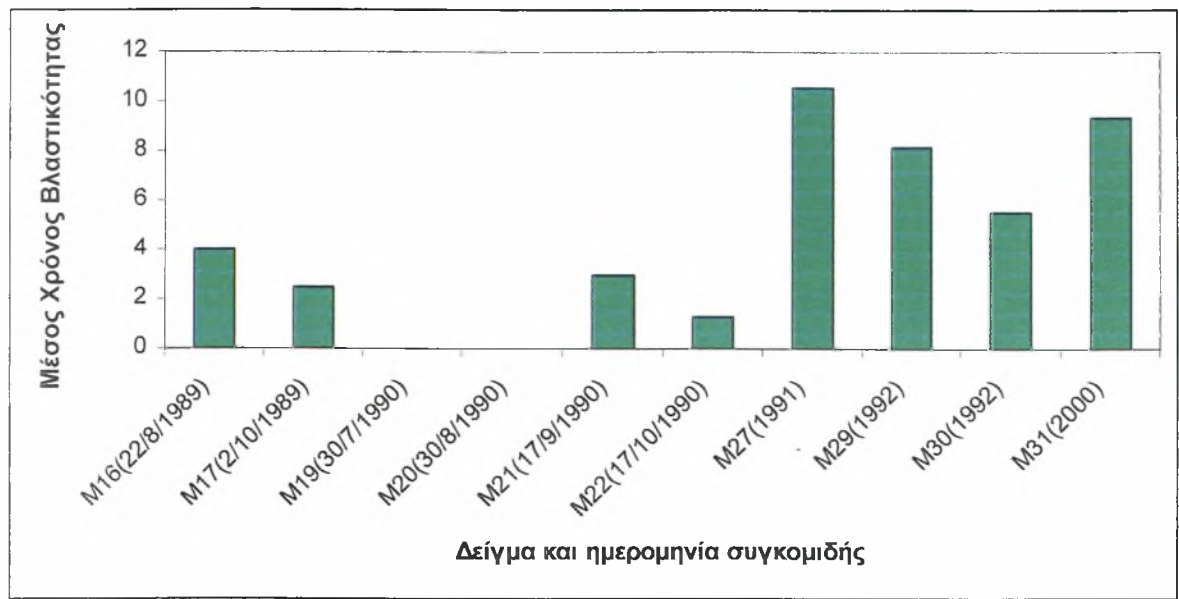
Γράφημα 5. Γραφική απεικόνιση του Μέσου Χρόνου Βλαστικότητας (\bar{D}), για τα δείγματα της μελιτζάνας (EMI), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 25°C.



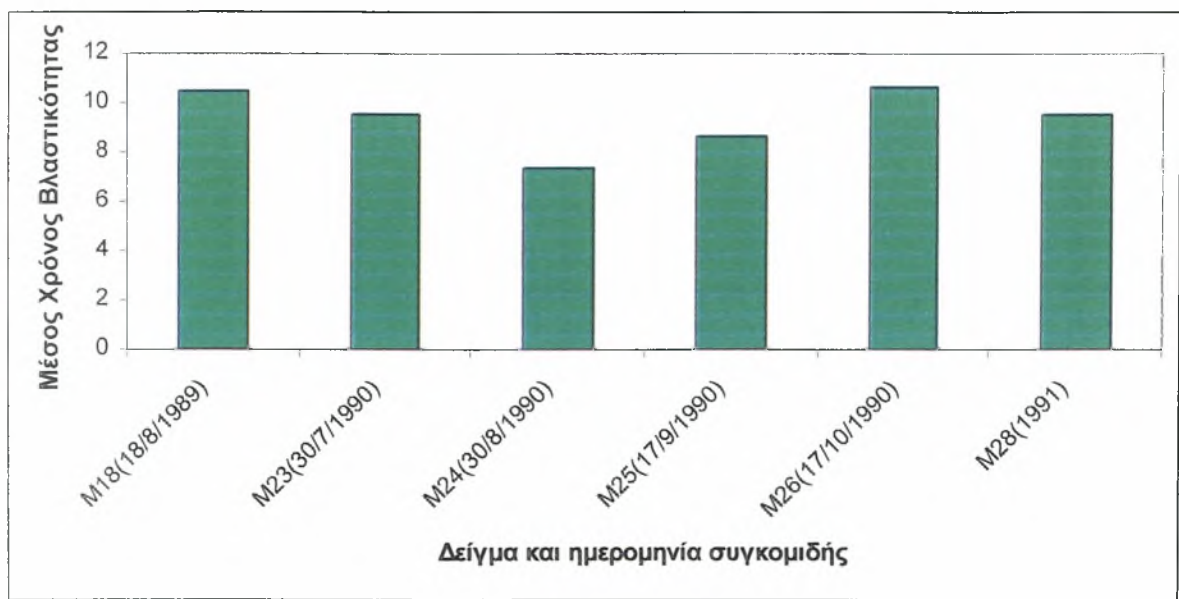
Γράφημα 6. Γραφική απεικόνιση του Μέσου Χρόνου Βλαστικότητας (\bar{D}), για τα δείγματα της μελιτζάνας (EMI), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 5°C.



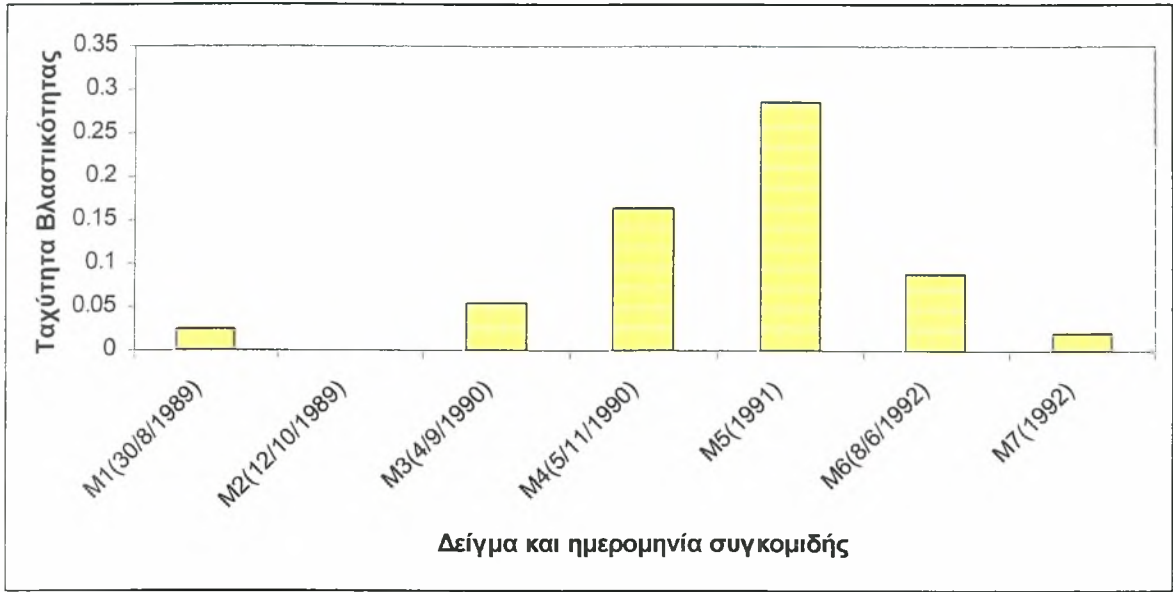
Γράφημα 7. Γραφική απεικόνιση του Μέσου Χρόνου Βλαστικότητας (\bar{D}), για τα δείγματα της μελιτζάνας (Long Negro), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 25⁰C.



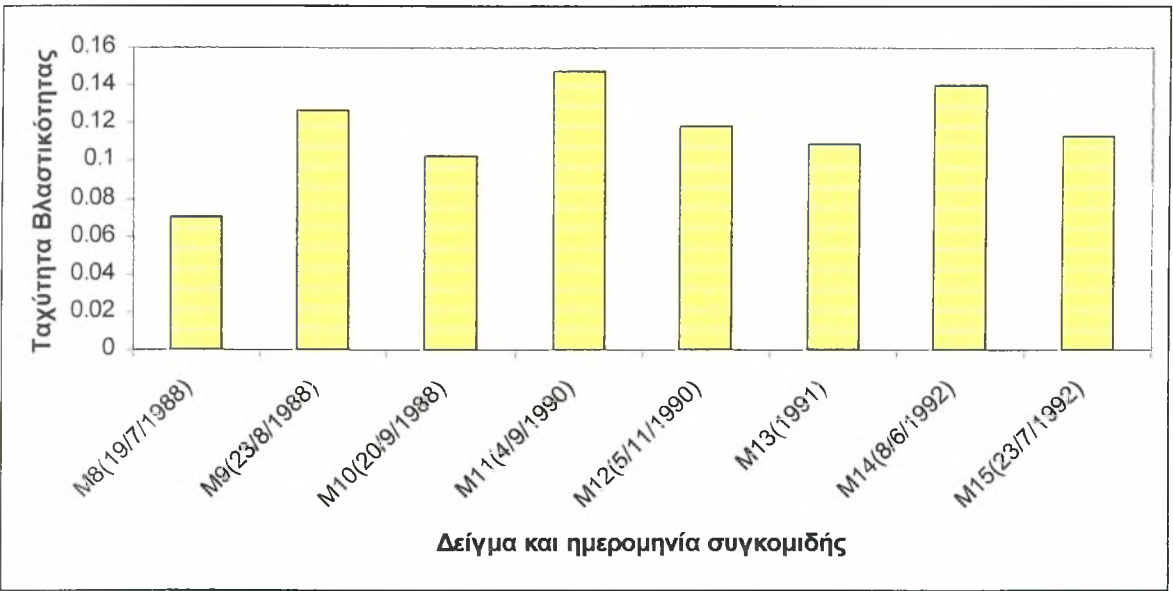
Γράφημα 8. Γραφική απεικόνιση του Μέσου Χρόνου Βλαστικότητας (\bar{D}), για τα δείγματα της μελιτζάνας (Long Negro), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 5⁰C.



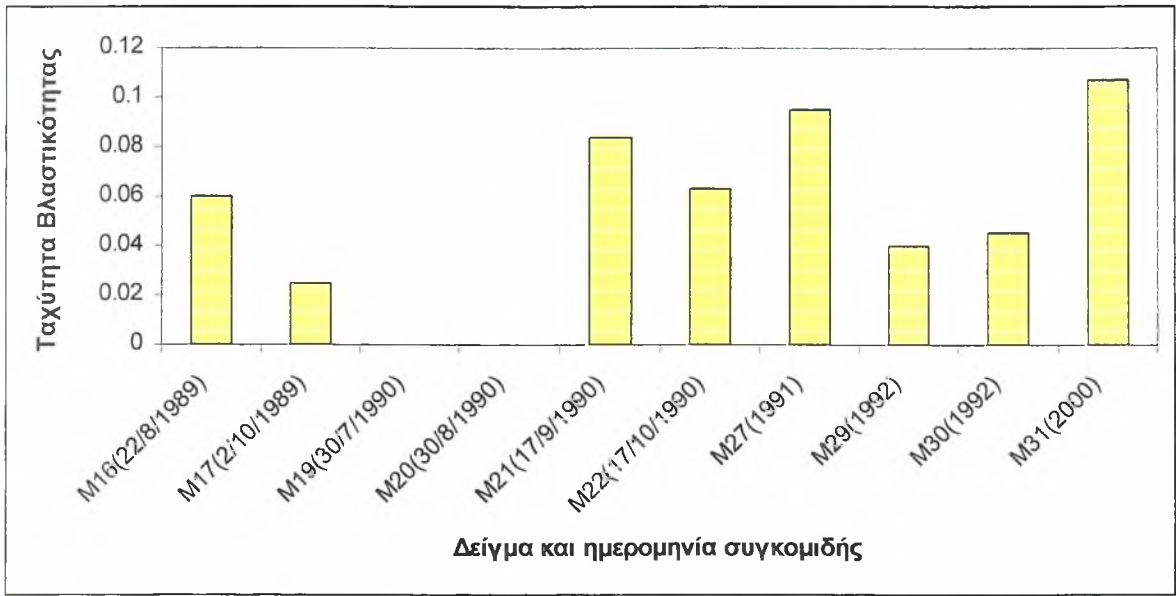
Γράφημα 9. Γραφική απεικόνιση της Ταχύτητας Βλαστικότητας (R), για τα δείγματα της μελιτζάνας (EMI), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 25⁰C.



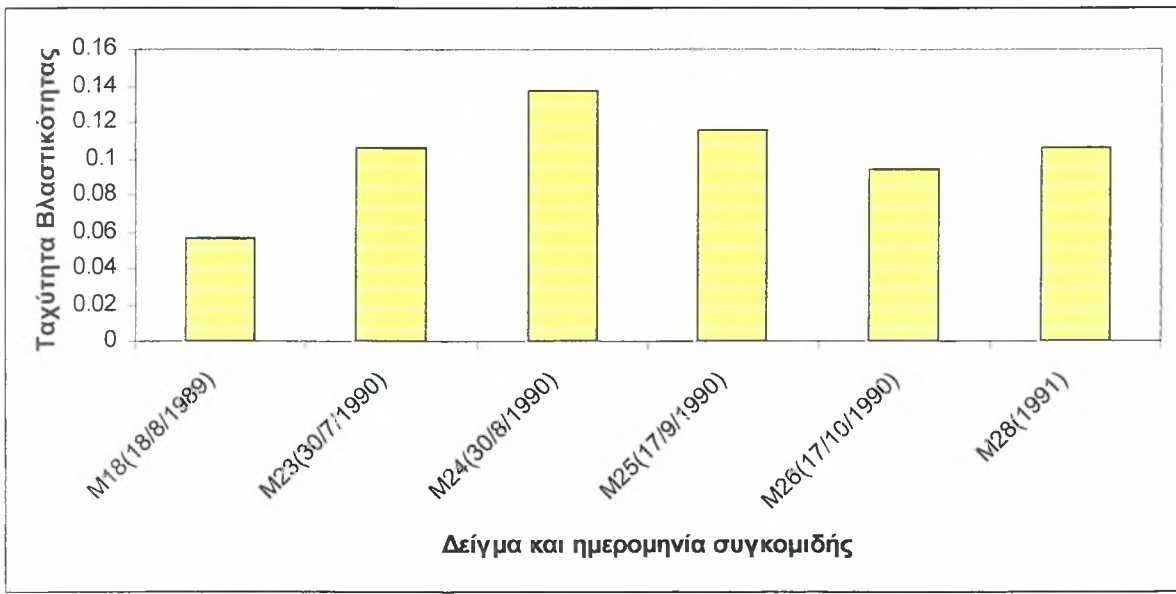
Γράφημα 10. Γραφική απεικόνιση της Ταχύτητας Βλαστικότητας (R), για τα δείγματα της μελιτζάνας (EMI), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 5⁰C.



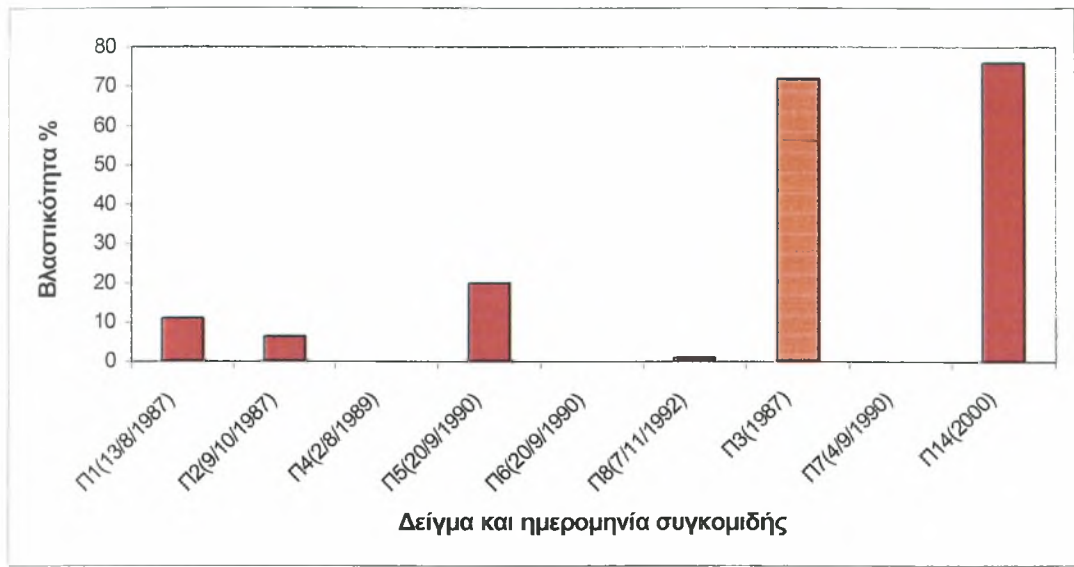
Γράφημα 11. Γραφική απεικόνιση της Ταχύτητας Βλαστικότητας (R), για τα δείγματα της μελιτζάνας (Long Negro), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 25⁰C.



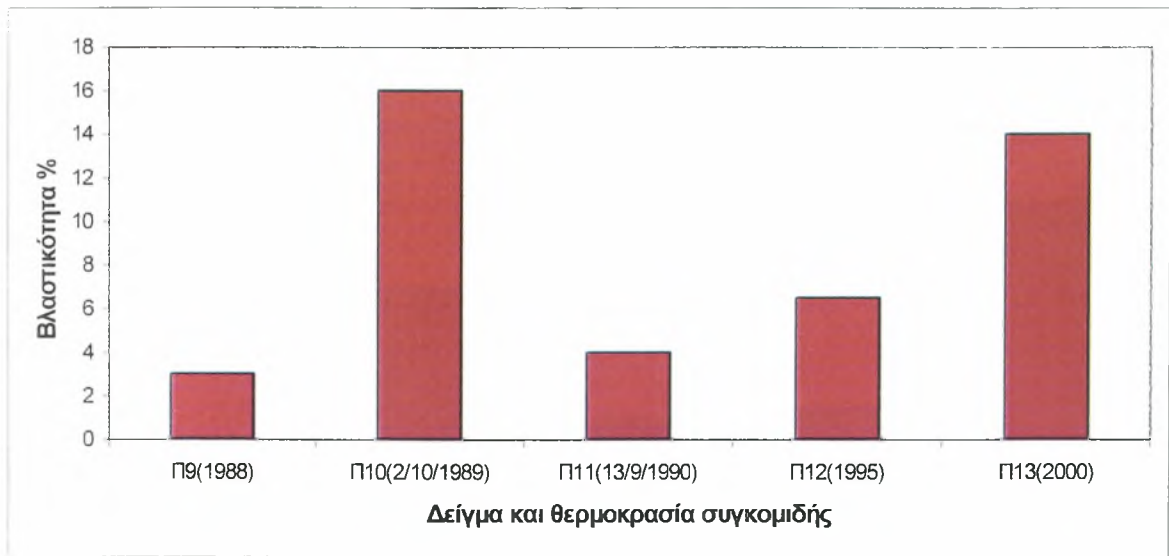
Γράφημα 12. Γραφική απεικόνιση της Ταχύτητας Βλαστικότητας (R), για τα δείγματα της μελιτζάνας (Long Negro), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 5⁰C.



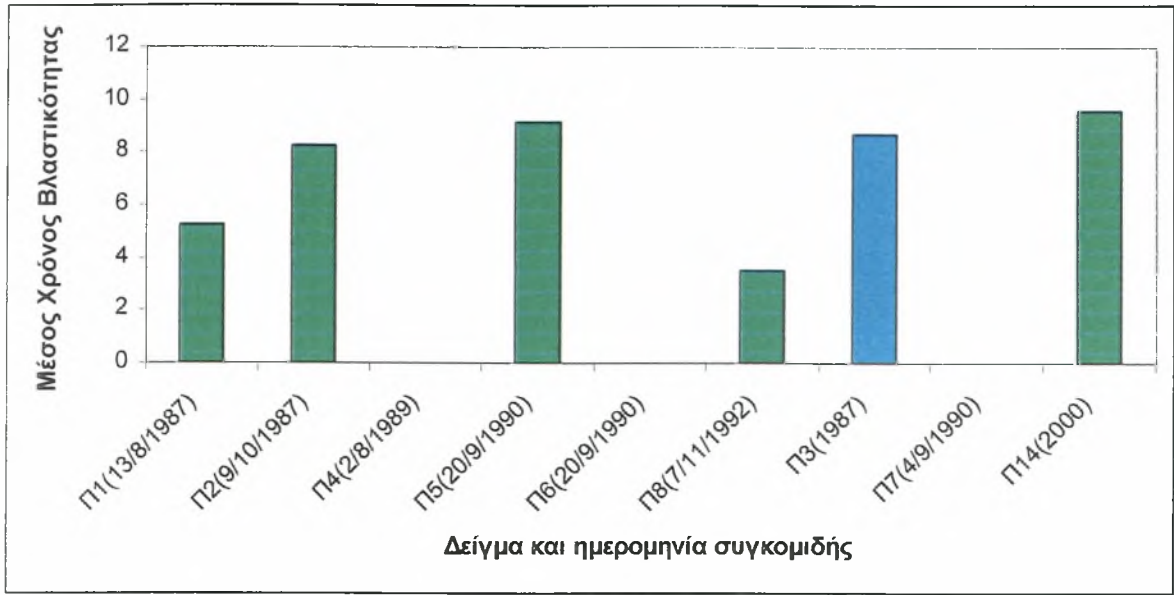
Γράφημα 13. Γραφική απεικόνιση της βλαστικότητας για τα δείγματα της πιπεριάς (Ε₃), τα οποία είχαν αποθηκευτή στους 25⁰C (Π1, Π2, Π4, Π5, Π6, Π8, Π14) και στους 5⁰C (Π3, Π7).



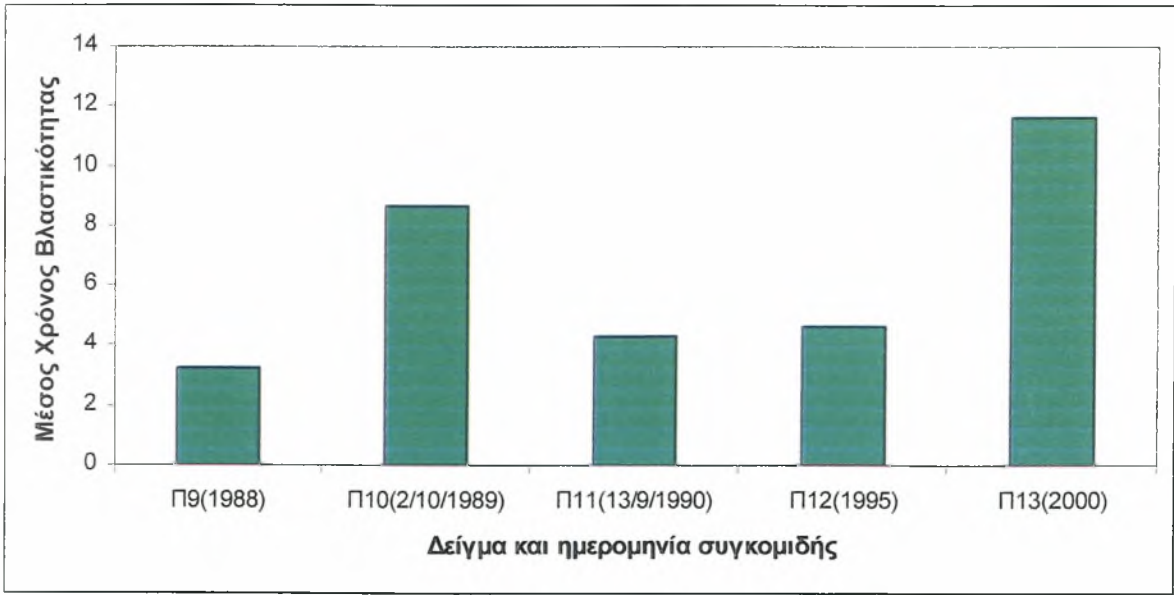
Γράφημα 14. Γραφική απεικόνιση της βλαστικότητας για τα δείγματα της πιπεριάς (Yolo Wonder), τα οποία είχαν αποθηκευτή στους 25⁰C (Π9, Π10, Π11, Π12, Π13).



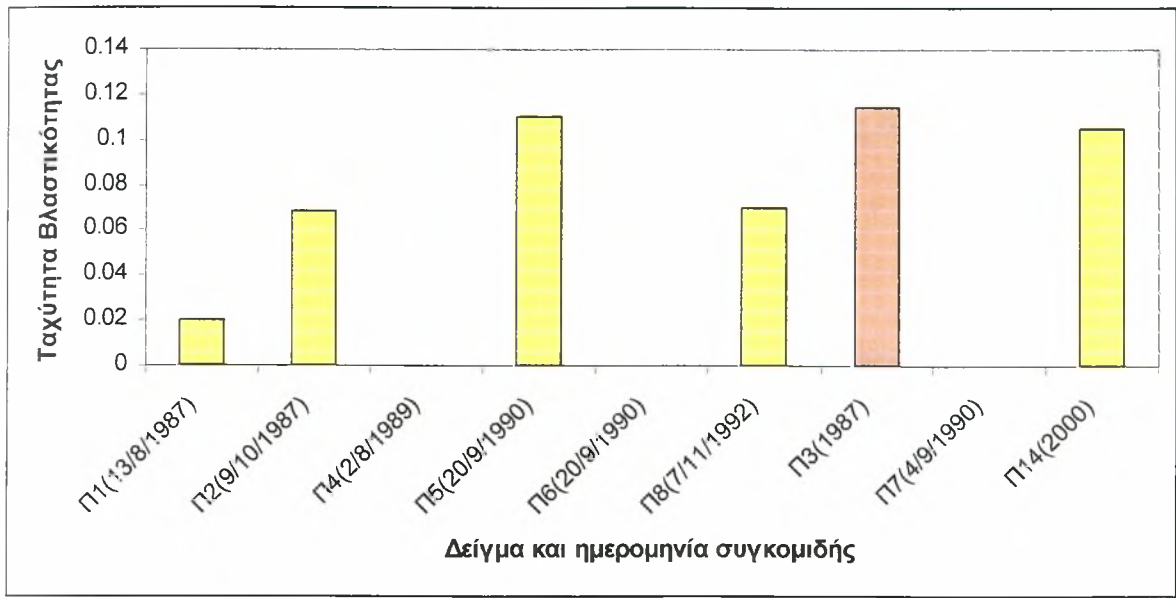
Γράφημα 15. Γραφική απεικόνιση του Μέσου Χρόνου Βλαστικότητας (\bar{D}), για τα δείγματα της πιπεριάς (E_3), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους $25^{\circ}C$ (Π1, Π2, Π4, Π5, Π6, Π8, Π14) και στους $5^{\circ}C$ (Π3, Π7).



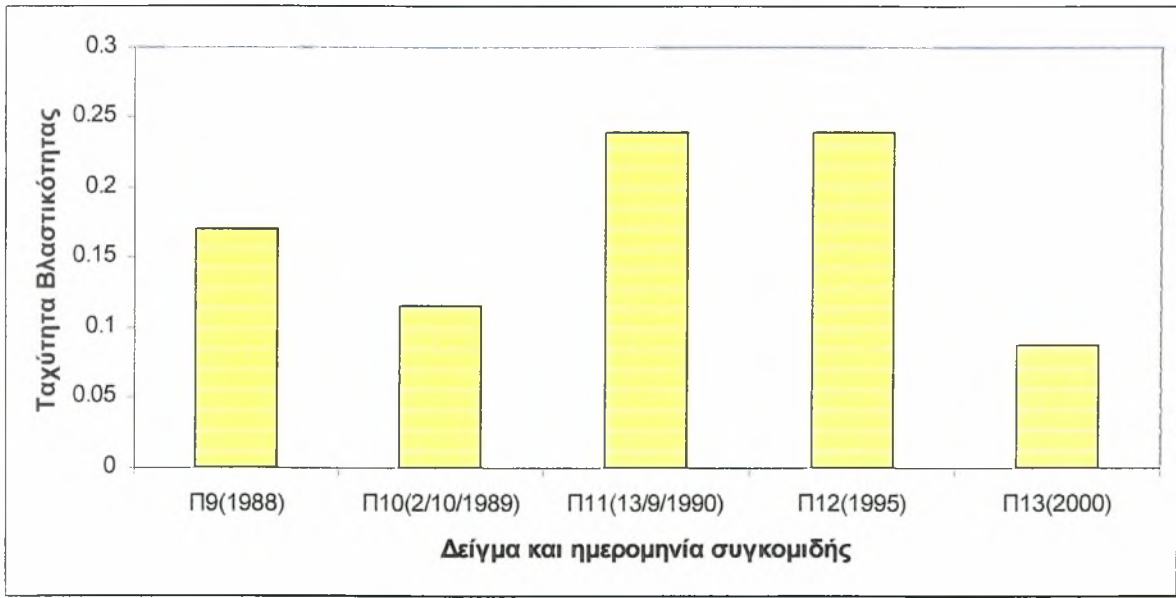
Γράφημα 16. Γραφική απεικόνιση του Μέσου Χρόνου Βλαστικότητας (\bar{D}), για τα δείγματα της πιπεριάς (Yolo Wonder), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους $25^{\circ}C$ (Π9, Π10, Π11, Π12, Π13).



Γράφημα 17. Γραφική απεικόνιση της Ταχύτητας Βλαστικότητας (R), για τα δείγματα της πιπεριάς (E₃), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 25⁰C (Π1, Π2, Π4, Π5, Π6, Π8, Π14) και στους 5⁰C (Π3, Π7).



Γράφημα 18. Γραφική απεικόνιση της Ταχύτητας Βλαστικότητας (R), για τα δείγματα της πιπεριάς (Yolo Wonder), τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 25 ⁰C (Π9, Π10, Π11, Π12, Π13).



Εδώ καλό θα ήταν να αναφερθεί ότι η επιλογή των δειγμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εμφάνιση του προφίλ των πρωτεϊνών με την διαδικασία της Ηλεκτροφόρησης σε συνθήκες μετουσίωσης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, έγινε με κριτήριο το ποσοστό βλαστικής ικανότητας (τουλάχιστον 20% βλαστικότητα), την αντιπροσωπευτικότητα ως προς την θερμοκρασία αποθήκευσης αλλά και την κατά το δυνατόν χρησιμοποίηση της ίδια ποικιλίας αντιστοίχως στα δείγματα της πιπεριάς και της μελιτζάνας.

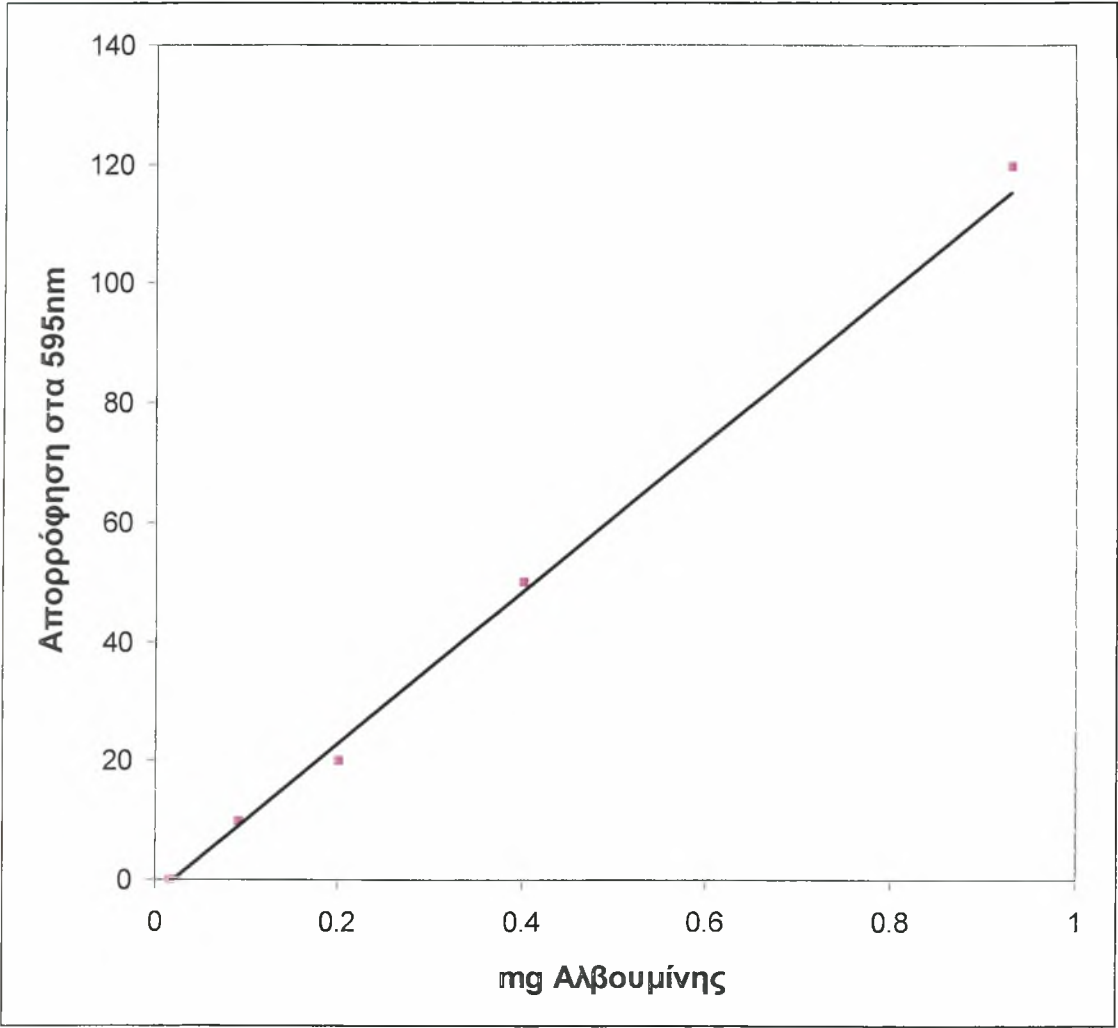
2.B.2 Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

Για τον υπολογισμό των ποσοτήτων πρωτεΐνης στα διάφορα διαλύματα με την χρήση του φασματοφωτόμετρου έπρεπε να κατασκευασθεί κάποια καμπύλη αναφοράς (πρότυπη καμπύλη), κάποιου διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε για αυτό τον σκοπό αλβουμίνη περιεκτικότητας 10 mg/ml.

ΠΙΝ. 7 Οι τιμές απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο 595 nm (A_{595}) διαφόρων ποσοτήτων αλβουμίνης 10 mg/ml

Ποσότητες διαλύματος σε μg	Απορρόφηση στα 595 nm
0	0
10	0,09
20	0,2
50	0,4
100	0,85
120	0,93

Σχήμα 2. Γραφική απεικόνιση πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης.



2.B.2.1 Ποσότητα πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα των δειγμάτων πιπεριάς και μελιτζάνας βάση της πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης

Αφού ακολουθήθηκε η διαδικασία παρασκευής κυτταροπλάσματος από τα φύτρα σπόρων των δειγμάτων της πιπεριάς και της μελιτζάνας, κατά τον τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως με την βοήθεια συσκευής ομογενοποίησης και συσκευής φυγοκέντρισης, εξήχθησαν τα εξής αποτελέσματα αναφορικά με την απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο στα 595 nm (A_{595}) (μέθοδος Bradford) και την ποσότητα της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα καθενός από τα δείγματα:

ΠΙΝ. 8 Απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο στα 595nm (A₅₉₅) για 5μl και 10μl κυτταροπλάσματος από κάθε δείγμα μελιτζάνας.

Δείγματα	Απορρόφηση στα 595nm (A ₅₉₅) για 5μl	Απορρόφηση στα 595nm (A ₅₉₅) για 10μl
M5	0,26	0,48
M9	0,25	0,43
M10	0,03	0,05
M11	0,07	0,13
M13	0,04	0,08
M14	0,02	0,05
M15	0,03	0,07
M23	0,03	0,06
M24	0,16	0,3
M25	0,05	0,12
M28	0,06	0,1
M31	0,04	0,8

ΠΙΝ. 9 Απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο στα 595nm (A₅₉₅) για 5μl και 10μl κυτταροπλάσματος από κάθε δείγμα πιπεριάς.

Δείγματα	Απορρόφηση στα 595nm (A ₅₉₅) για 5μl	Απορρόφηση στα 595nm (A ₅₉₅) για 10μl
Π3	0,16	0,33
Π5	0,16	0,31
Π14	0,12	0,26

ΠΙΝ. 10 Ποσότητα σε μl, στην οποία περιέχονται σε 20μg πρωτεΐνης κυτταροπλάσματος από κάθε δείγμα μελιτζάνας.

Δείγματα	Ποσότητα κυτταροπλάσματος σε μl
M5	3
M9	4
M10	36
M11	13
M13	24
M14	44
M15	29
M23	33
M24	6
M25	17
M28	17
M31	24

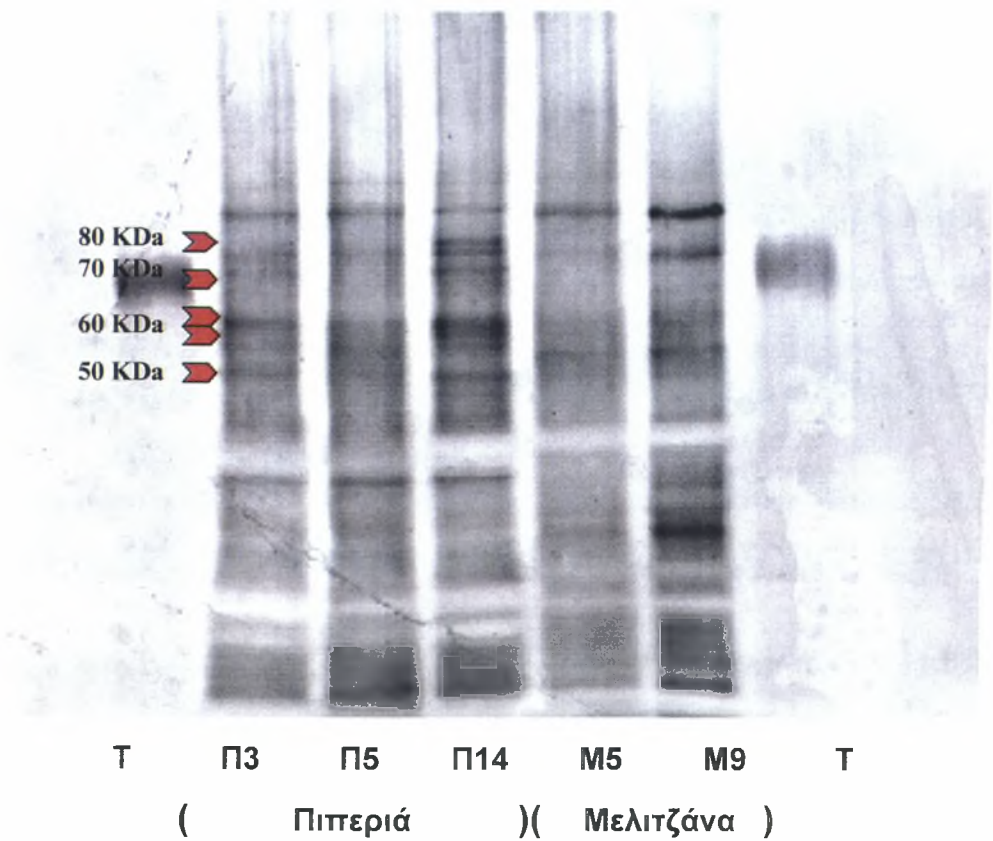
ΠΙΝ. 11 Ποσότητα σε μl, στην οποία περιέχονται 20μg πρωτεΐνης κυτταροπλάσματος από κάθε δείγμα πιπεριάς.

Δείγματα	Ποσότητα κυτταροπλάσματος σε μl
Π3	5
Π5	5
Π14	7

Εδώ καλό θα ήταν να αναφερθεί ότι τα δείγματα τα οποία εν’ τέλη χρησιμοποιήθηκαν στην διαδικασία ηλεκτροφόρησης ήταν τα Π3, Π5, Π14, Μ5 και Μ9. Η επιλογή αυτή των δειγμάτων οφείλονταν αποκλειστικά στο γεγονός ότι σε καθένα από τα πηγάδια του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου μπορούσαμε να φορτώσουμε ποσότητα μόλις 10μl, στα οποία 10μl έπρεπε να περιλαμβάνεται και τουλάχιστον 1μl χρωστικής. Συνεπώς είχαμε την δυνατότητα να τοποθετήσουμε σε κάθε πηγάδι το μέγιστο μέχρι 9μl από κάθε δείγμα και στα οποία έπρεπε να έχουμε πάντα ποσότητα πρωτεΐνης ίση με 20μg. Την προϋπόθεση αυτή δεν κάλυπταν όλα τα δείγματα, στα περισσότερα από τα οποία η ποσότητα των 20μg πρωτεΐνης επιτυγχάνονταν πέραν των 9μl.

2.B.3 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε αναγωγικές συνθήκες

Σχήμα 3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κυτταροπλάσματος σε πηκτή πολυακρυλαμίδου. Περιλαμβάνει δείγματα πιπεριάς (ποικιλία: E₃) και δείγματα μελιτζάνας (ποικιλία: EMI).



Όπου: T, ο μάρτυρας δεξιά και αριστερά (αλβουμίνη σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml)
P3, πιπεριά ποικιλίας E₃, που συγκομίσθηκε το 1987 και αποθηκεύτηκε στους 5⁰C, για 14 περίπου χρόνια.
P5, πιπεριά ποικιλίας E₃, που συγκομίσθηκε 20-9-1990 και αποθηκεύτηκε στους 25⁰C, για 11 περίπου χρόνια.
P14, πιπεριά ποικιλίας E₃, που συγκομίσθηκε το 2000 και διατηρήθηκε για μικρό διάστημα στους 25⁰C, για 15 μήνες.
M5, μελιτζάνα ποικιλίας EMI, που συγκομίσθηκε το 1991 και αποθηκεύτηκε στους 25⁰C, για 10 περίπου χρόνια.
M9, μελιτζάνα ποικιλίας EMI, που συγκομίσθηκε 23-8-1988 και αποθηκεύτηκε στους 5⁰C, για 13 περίπου χρόνια.

3 Συμπεράσματα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η παρούσα προπτυχιακή εργασία είχε δύο βασικά κομμάτια αναφορικά με το πειραματικό σκέλος. Στο πρώτο κομμάτι ελέγχθηκε η βλαστική ικανότητα των σπόρων της πιπεριάς (ποικιλίες: Υόλο και E₃) και της μελιτζάνας (ποικιλίες: EMI και Long Negro), οι οποίοι προηγουμένως είχαν αποθηκευτεί είτε σε θερμοκρασία 5°C, είτε σε θερμοκρασία 25°C.

Συγκεκριμένα, αναφορικά με την μελιτζάνα από τα 31 δείγματα τα 15 (M1 έως M15) ανήκαν στην ποικιλία EMI, άλλα 16 δείγματα (M16 έως M31) ανήκαν στην ποικιλία Long Negro.

Από τα 15 δείγματα της ποικιλίας EMI είχαμε 7 δείγματα αποθηκευμένα στους 25°C και 8 δείγματα αποθηκευμένα στους 5°C.

Στα 7 δείγματα των 25°C ένα μόνο ξεπέρασε το 20% βλαστικότητα (M5-60,5%), ένα το προσέγγισε (M6-17,5%) και τα υπόλοιπα είχαν χαμηλότερη από 10% βλαστικότητα.

Στα 8 δείγματα των 5°C, 5 ξεπέρασαν το 20% βλαστικότητα (M9-71,5% / M10-58% / M13-46,5% / M14-35,5% / M15-44,5%) και ένα το προσέγγισε (M11-19,5%).

Συνεπώς, τα αποθηκευμένα στους 5°C δείγματα της ποικιλίας EMI διατήρησαν την βλαστική τους ικανότητα καλύτερα σε σύγκριση με των 25°C.

Από τα δείγματα της ποικιλίας Long Negro είχαμε 10 δείγματα αποθηκευμένα στους 5°C και 6 δείγματα αποθηκευμένα στους 25°C.

Στα 10 δείγματα των 25°C όλα σχεδόν είχαν βλαστικότητα χαμηλότερη από 10%, εκτός από το δείγμα του 2000 (M31) που είχε 94% βλαστικότητα.

Στα 6 δείγματα των 5°C τα 4 είχαν πάνω από 20% βλαστικότητα (M23-42,5% / M24-78,5% / M25-68,5% / M28-56%).

Συνεπώς, και για τα δείγματα της ποικιλίας Long Negro θα μπορούσαμε να πούμε ότι αυτά τα οποία αποθηκεύτηκαν στους 5°C διατήρησαν την βλαστική τους ικανότητα καλύτερα από αυτά τα οποία αποθηκεύτηκαν στους 25°C.

Τέλος από τα αποτελέσματα τα οποία βρέθηκαν για το R (ταχύτητα της βλαστικότητας), διακρίνουμε συγκριτικά μεγαλύτερες τιμές στους 5°C από ότι στους 25°C και για την EMI αλλά και για την Long Negro. Τούτο σημαίνει ότι είχαμε ταχύτερη βλάστηση των σπόρων που είχαν αποθηκευτεί στους 5°C. Ενώ για το \bar{D} (μέσος

χρόνος βλαστικότητας), διακρίνουμε συγκριτικά μεγαλύτερες τιμές στους 5°C και για τις δύο ποικιλίες, δηλαδή μικρότερο χρόνο βλάστησης.

Αναφορικά με την πιπεριά από τα 14 δείγματα, τα 9 (Π1 έως Π8 και Π14) ανήκαν στην ποικιλία E₃, ενώ τα υπόλοιπα 5 (Π9 έως Π13) ανήκαν στην ποικιλία Yolo.

Από τα 9 δείγματα της ποικιλίας E₃, είχαμε 7 δείγματα αποθηκευμένα στους 25°C και 2 αποθηκευμένα στους 5°C.

Στα 7 δείγματα των 25°C, από τα οποία ένα δείγμα (Π14) αποτελούσε σπόρο του 2000, μόνο τα δύο ξεπέρασαν το 20% βλαστικότητα (Π5-20% / Π14-76%).

Στα 2 δείγματα των 5°C, είχαμε ένα υψηλής βλαστικότητας (Π3-72%) και ένα μηδενικής (Π7-0%).

Συνεπώς, και εδώ θα μπορούσαμε να πούμε, αλλά όχι με τόσο μεγάλη σιγουριά λόγω του μικρότερου αριθμού δειγμάτων στους 5°C, ότι τα δείγματα διατηρούν την βλαστική τους ικανότητα καλύτερα στους 5°C από ότι στους 25°C.

Δυστυχώς για την ποικιλία Yolo δεν μπορούμε να οδηγηθούμε σε κάποιο αποτέλεσμα αναφορικά με την σύγκριση βλαστικότητας και θερμοκρασίας αποθήκευσης καθώς δεν υπήρχαν δείγματα αποθηκευμένα στους 5°C. Γενικά όμως και εδώ είχαμε πολύ χαμηλές βλαστικότητες στους 25°C. Το ίδιο ισχύει και ως προς τις παραμέτρους \bar{D} (Μέσος Χρόνος Βλαστικότητας) και R (Ταχύτητα Βλαστικότητας).

Τέλος για την ποικιλία E₃ παρατηρούμε από τα αποτελέσματα ότι για το δείγμα Π3 των 5°C οι τιμές των \bar{D} (Μέσος Χρόνος Βλαστικότητας) και R (Ταχύτητα Βλαστικότητας) προσεγγίζουν ή ξεπερνούν τις αντίστοιχες των δειγμάτων στους 25°C. Φυσικά η παρουσία αποτελεσμάτων μόνο από ένα δείγμα των 5°C (Π3) δεν μπορεί να οδηγήσει, ως προς αυτές τις παραμέτρους, σε ασφαλή συμπεράσματα. Εντούτοις τα προαναφερθέντα αποτελούν μια ισχυρή ένδειξη.

Στο δεύτερο κομμάτι της εργασίας επιλέχθηκαν δείγματα σπόρων πιπεριάς και μελιτζάνας, με κριτήρια την ύπαρξη κοινής ποικιλίας (E₃ και EMI αντίστοιχα), βλαστικότητας τουλάχιστον 20%, καθώς και εκπροσωπών και από τους 5°C αλλά και από τους 25°C. Και παρουσιάστηκε μέσω της SDS-ηλεκτροφόρησης το προφίλ των πρωτεϊνών καθενός από τα δείγματα.

Παρατηρώντας και συγκρίνοντας τα προφίλ των πρωτεϊνών των δειγμάτων της πιπεριάς, διακρίναμε πέντε διαφορές τις οποίες επισημάναμε με πέντε χαρακτηριστικά βέλη.

Στην περίπτωση του πρώτου βέλους (**80 KDa**), διαπιστώνουμε ότι στην στήλη Π14 υπάρχει μια πρωτεΐνη η οποία απουσιάζει από τις στήλες Π3 και Π5.

Στην περίπτωση του δεύτερου βέλους (**70 KDa**), η πρωτεΐνη είναι παρούσα στις δύο στήλες (Π3, Π14), όμως διαφέρει ως προς την ένταση παρουσίας. Συγκεκριμένα στην στήλη Π3 υπάρχει, υπολείπεται όμως της Π14 κατά πολύ.

Στην περίπτωση του τρίτου βέλους (**60 KDa**), η πρωτεΐνη είναι παρούσα και στις τρεις στήλες (Π3, Π5, Π14), όμως διαφέρει ως προς την ένταση παρουσίας. Συγκεκριμένα στην στήλη Π5 διακρίνεται αμυδρά, στην στήλη Π3 λίγο πιο έντονα και στην στήλη Π14 αρκετά πιο έντονα.

Στην περίπτωση του τετάρτου βέλους (**60 KDa**), διαπιστώνουμε ότι στην στήλη Π14 υπάρχει μια πρωτεΐνη η οποία απουσιάζει από τις στήλες Π3 και Π5.

Στην περίπτωση του πέμπτου βέλους τέλος (**50 KDa**), υπάρχει επίσης διαφορά ως προς την ένταση παρουσίας της πρωτεΐνης. Στην στήλη Π14 είναι έντονη, στην στήλη Π5 μόλις που διακρίνεται και στην στήλη Π3 η παρουσία είναι ελάχιστη πιο διακριτή.

Παρατηρώντας τα προαναφερθέντα και συγκρίνοντας τα θα μπορούσαμε να οδηγηθούμε σε κάποια υποθετικά συμπεράσματα αναφορικά με τον βαθμό σύνδεσης γήρανσης σπόρου, βλαστικότητας και απουσίας ή ελλιπής παρουσίας ορισμένων πρωτεϊνών, ειδικότερα:

1. Το γεγονός της απουσίας ορισμένων πρωτεϊνών (**80 KDa** και **60 KDa**) από την στήλη Π5 (25⁰C) και από την στήλη Π3 (5⁰C) και η παρουσία τους μόνο στην στήλη Π14 (2000).
2. Το γεγονός της απουσίας μιας πρωτεΐνης (**70 KDa**) από την στήλη Π5, ενώ είναι παρούσα στην στήλη Π14 και ασθενέστερα στην στήλη Π3.
3. Αλλά και το γεγονός της παρουσίας των υπόλοιπων δύο πρωτεϊνών (**60 KDa** και **50 KDa**), ισχυρότερα στην στήλη Π14, ασθενέστερα στην στήλη Π3 και αμυδρά στην στήλη Π5.

Ίσως να οφείλεται στην γήρανση των σπόρων, η οποία είναι εντονότερη στους 25⁰C από ότι στους 5⁰C. Και να εκδηλώνεται αυτή η σταδιακή μείωση των πρωτεϊνών ή η οριστική απώλεια τους, μέσω της μειωμένης βλαστικής ικανότητας, δεδομένου ότι στην στήλη Π3 είχαμε το προφίλ σπόρου πιπεριάς βλαστικής ικανότητας 72%, στην στήλη Π5 το προφίλ σπόρου πιπεριάς βλαστικής ικανότητας 20% και στην στήλη Π14 το προφίλ σπόρου πιπεριάς του 2000 και βλαστικής ικανότητας 76%.

4 Βιβλιογραφία

- Abdalla, F.H. and Roberts, E.H. (1968). Ann. Bot. 32, 119-136.
- Abdalla, F.H. and Roberts, E.H. (1969). Ann. Bot. 33, 153-167.
- Alberts Bray, Jonhnson Lewis, Raff Roberts Walter (2000). Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας. Εισαγωγή στην Μοριακή Βιολογία του Κυττάρου.
- Αρσενάκης, Μ. (1999) Μοριακή Βιολογία (Σημειώσεις).
- Ashton, T. (1956). In: The storage of Seed for Maintenance of Viability (E.B. Owen, e.d.), pp. 34-38, Commonwealth Agric. Bureaux, Farnham Royal, Bucks, England.
- Avanzi, S., Innocenti, A.M. and Tagliasacchi, A.M. (1969). Mut. Res. 7, 199-203.
- Avery, A.G. and Blakeslee, A.F. (1936). Am. Nat. 70, 36-37.
- Barnabas, B. And Rajki, E. (1976). Euphytica 25, 747-752.
- Barton, L.V. (1961). Seed Preservation and Longevity. pp. 1-215, Intercience, New York.
- Blakeslee, A.F. (1954). Ann> N.Y. Acad. Sci. 57, 488-490.
- Blakeslee, A.F. and Avery, A.G. (1934). Am. Nat. 68,466.
- Cai, Q. and Bullen, M.R. (1992). Identification of timothy cultivars by SDS-PGA analysis of seed storge proteins. Canadian Journal of Plant Science, 72, 1215-1222.
- Cartledge, J.L. and Blakeslee. A.F. (1933). Science 78, 523.
- Cartledge, J.L. and Blakeslee. A.F. (1933). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 21, 597-600.
- Cartledge, J.L. and Blakeslee. A.F. (1933). Science 81, 492-493.

- Γούλας, Χ.Κ. (1994), Γενετική Φυτών (Πανεπιστημιακές Παραδόσεις).
- Γούλας, Χ.Κ. (1994), Σποροπαραγωγή-Τεχνολογία Σπόρων (Πανεπ. Παραδόσεις).
- Corsi, G. And Avanzi, S. (1969). *Mut. Res.* 7, 349-355.
- Cooke, R.J. (1988). Electrophoresis in plant testing and breeding. *Advanced in Electrophoresis*, 2, 171-261.
- Dadlani, M. And Varier, A. (1993). Electrophoresis for variety identification. *Technical Bulletin, Division of Seed Science and Technology, I.A.R.I., New Delhi.*
- Dubinin, N.P. and Dubinina, L.G. (1968). *Genetika* 4, 5-23 (*Soviet Genetics* 4, 1139-1152).
- Διαμαντίδη, Γ. (1988), Εισαγωγή στη Βιοχημεία
- Finkle, B.J. and Ulrich, J.M. (1978). In: *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress* (P.H. Li and A.Sakai, eds.), pp.373-388, Academic Pres, Inc., New York-London.
- Ferguson, J.M. and Grabe, D. F. (1984). Segregation of annual and perennial species of ryegrass by gel electrophoresis of seed proteins, *Journal of Seed Technology*, 9, 137-149.
- Ferguson, J.M. and Grabe, D. F. (1986). Identification of cultivars of perennial ryegrass by SDS-PAGE of seed proteins. *Crop Science*, 26, 170-176.
- Giles, N. (1940). *Genetics* 25, 69-87.
- Harrison, B.J. (1966). *J. Nat. Inst. Agric. Bot.* 10, 644-663.
- Harrison, B.J and McLeish, J. (1954). *Nature* 173, 593-594.
- Θωμόπουλου, Γ.Α. (1986) Εισαγωγή στη Βιολογία Κυττάρου
- ISTA (1993). *International Rules for Seed Testing, Seed Science and Technology*, 21, Supplement, p. 228.
- Ι.Τσέκος-Ε.Κουκόλη Βοτανική (1988)

- Καραταγλής, Σ., (1992), Φυσιολογία Φυτών.
- Ladizinsky, G. and Hymowitz, T. (1979). Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theoretical and Applied Genetics*, 54, 145-151.
- Λόλας, Π.Χ., (1999), Φυσιολογία Φυτών (Πανεπιστημιακές Παραδόσεις).
- Μαμούρης, Ζ.Δ., (1996), Στοιχεία Γενικής Βιολογίας (Ι-ΙΙ).
- Μαμούρης, Ζ.Δ., (1997), Εισαγωγή στην Γενετική.
- Metakovsky, E.V., Novoselskaya, A.Y. Kopus, M. M., Sobko, T.A. and sozinov, A. A. (1984). Blocks of gliadin components in winter wheat detected by one-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Theoretical and Applied Genetics*, 67, 559-568.
- Meier-Ewert, S., Maier, E., Ahmadi, A., Curtiw, J., and Lechrach, H. (1993). An automated approach to generating expressed sequence catalogues. *Nature* 361:375-376.
- Morikawa, T. And Inomata, N. (1978). *Jap. J. Breed.* 28, 320-328.
- National Academy of Sciences (1972). *Genetic Vulnerability of Major Crops*, pp. 1-307, National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- Orlova, N.N. (1967). *Genetica* 3(11), 15-25 (*Soviet Genetics* 3(11), 7-12).
- Orlova, N.N. and Nikitina, V.I. (1968). *Genetica* 4(9), 24-32 (*Soviet Genetics* 4, 1153-1158).
- Παπαθανασίου, Γ.Α. (1988), Γεωργική Γενετική.
- Rao, T.N., Narker, Y.S. and Patil V.D. (1990). Identification of cultivars of cotton by SDS-PAGE of soluble proteins, *Plant Varieties Seed*, 3, 7-13.
- Roberts, E.H. (1972). In: *Viability of seed* (E.H. Roberts, ed.), pp. 253-306. Chapman and Hall Ltd., London.

- Roberts, E.H. (1973). Seed Sci. Technol. 1, 515-527.
- Schrader, A. And Kaltofen, H. (1987), Biology.
- Schkwarnikow, P.K. (1937). Genetika 19, 188-199.
- Smith, D.B. and Payne, P.I. (1984). A procedure for the routine determination of electrophoretic band patterns of barley and malt endosperm proteins. Journal of the National Institute of Agriculture Botany, 16, 487-498.
- Smith, J.S.C. and Smith, O.S. (1992). Finger printing of crop varieties. Advanced in Agronomy, 47, 85-140.
- Timothy, D.H. and Goodman, M.M. (1979),. In: The Plant Seed: Development, Preservation, and Germination (I. Rubenstein, R.L. Philips and C.E. Green), pp. 171-200, Academy Press, Inc., New York, London.
- Vega, M.P., (1993). Biochemical characterization of population in: Plant Breeding, Chapman and Hall, London.
- Villiers, T.A. (1973). In: Seed Ecology (W. Heydecker, ed.), pp. 265-288, Butterworths, London.
- Villiers, T.A. (1974). Plant Physio. 53, 875-878.
- Villiers, T.A. (1975). In: Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow, pp. 297-315.
- Weir, B.S., 1990. Genetic data analysis. Methods for discrete population genetics data. Sinauer Association, Sunderland, Massachusetts.
- Withers, L.A. (1980). Tissue Culture Storage for Genetic Conservation. IBPGR Report, pp. 1-89, IBPGR Secretariat, Rome.
- Yamaguchi, H., Naito, T. And Tatara, A. (1978). Jap. J. Genetics 53, 133-135.

