

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Θέμα: Ανάλυση γενετικών και βιοχημικών παραγόντων
εμπλεκόμενων στην ανθοφορία του φυτού μεγάλης
ημέρας σπανάκι.

Βασίλειος Γ. Τσέτσος

Επιβλέπων Αναπληρωτής Καθηγητής

Ιωάννης Γούναρης

Επιτροπή:

Λέκτορας Ζήσης Μαμούρης

Καθηγητής Μιλτιάδης Βασιλακάκης

ΒΟΛΟΣ

1998



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

Αριθ. Εισ.: 18/Α

Ημερ. Εισ.: 04-08-2003

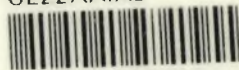
Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΓΦΖΠ

1998

ΤΣΕ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070084

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής διατριβής, οφείλω να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή του Π.Θ. κ. Γούναρη Ιωάννη για την καθοδήγηση, επίβλεψη και αμέριστη βοήθεια του καθ' όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσής της. Επίσης ευχαριστώ τους κυρίους Μαμούρη Ζήση (Λέκτορα Βιολογίας στο Π.Θ.) και Βασιλακάκη Μιλτιάδη (Καθηγητής Δενδροκομίας στο Α.Π.Θ.) που με τίμησαν με την συμμετοχή τους στην επιτροπή βαθμολόγησης της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Dr. Πετρουλέα Βασίλειο από το Ινστιτούτο Επιστημών Υλικών «Δημόκριτος» για τις αναλύσεις των φασμάτων υπέρυθρου, καθώς και το επιστημονικό προσωπικό του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων (Μ.Α.Ι.Χ.) για την ανάλυση του φασματογράφου μάζας.

Τέλος ευχαριστώ τον συνάδελφο Βουραζέρι Στράτο για τη συνεργασία και πολύτιμη βοήθεια του καθ' όλο το διάστημα εκπόνησης της διατριβής μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1. Γενικά - Άνθηση.....	5
2. Εσωτερικοί και εξωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την άνθηση.....	6
2.1 Μηχανισμός ενδογενούς ελέγχου - Νεανικότητα	6
2.2 Μηχανισμός εξωγενούς ελέγχου - περιβάλλον.....	9
2.2.1 <u>Φωτοπεριοδισμός</u>	9
2.2.2 <u>Εαρινοποίηση</u>	18
2.2.3 <u>Stress</u>	21
3. Μηχανισμοί μεταγωγής σημάτων.....	22
4. Η άνθηση ως αποτέλεσμα της γονιδιακής δράσης.....	25
4.1 Ανθικά μοντέλα	25
4.2 Αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση.....	26
4.2.1 <u>Γονιδιακή έκφραση σχετιζόμενη με την ανθική επαγωγή</u>	26
4.2.2 <u>Γονιδιακή έκφραση σχετιζόμενη με την ανθική πρόκληση</u>	27
4.3 Τωρινές και μελλοντικές προοπτικές	28
III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
1. Φυτικό υλικό - Σπανάκι.....	31
2. Μέθοδοι.....	33
3. Πειραματική διαδικασία.....	55
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59
VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	67

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο "Γενετικής φυτών" του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 1996-97. Σκοπός αυτής ήταν η ανίχνευση και ο προσδιορισμός στοιχείων που ενδεχομένως αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες όσον αφορά τον μηχανισμό της άνθησης του φυτού μεγάλης ημέρας σπανάκι.

Το πείραμα αρχικά περιελάμβανε την καλλιέργεια φυτικού υλικού-σπανάκι κάτω από ειδικές συνθήκες ημέρας και στη συνέχεια την διεξαγωγή μεθόδων όπως απομόνωση ολικού ή μιτοχονδριακού ή χλωροπλαστικού DNA καθώς και της μεθόδου TLC. Κάθε φορά πραγματοποιούνταν συγκριτικές αναλύσεις ανθισμένου με μη ανθισμένου φυτικού υλικού τα αποτελέσματα των οποίων μας οδήγησαν στην τελική συγκριτική ανάλυση μιτοχονδρίων και χλωροπλαστών με τη μέθοδο TLC.

II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικά - Άνθηση

Όπως διατύπωσε ο Murfet το 1977 η άνθηση είναι το τελικό αποτέλεσμα φυσιολογικών διεργασιών, βιοχημικών ακολουθιών και γονιδιακής δράσης με το όλο σύστημα να βρίσκεται κάτω από την επίδραση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων και της παρόδου του χρόνου.

Η έναρξη της άνθησης περιλαμβάνει καθοριστικές αλλαγές στο μοντέλο διαφοροποίησης των κορυφαίων βλαστικών μεριστωμάτων, που οδηγούν στην ανάπτυξη των ανθικών οργάνων. Έτσι η άνθηση αντιπροσωπεύει ένα πολύπλοκο σύνολο από εξειδικευμένες δομές, που διαφέρουν τόσο από τις αντίστοιχες δομές του βλαστικού σώματος του φυτού όσο και μεταξύ των διαφόρων ειδών.

Παρ' όλη όμως αυτή την πολυπλοκότητα, η άνθηση όλων των ειδών ρυθμίζεται από εσωτερικούς και εξωτερικούς παράγοντες που συγχρονίζουν την αναπαραγωγική ανάπτυξη με το περιβάλλον. Τα φυτά ανθίζουν σε ποικίλες διαφορετικές ηλικίες, πράγμα που δείχνει ότι η ηλικία (ή μέγεθος) ενός φυτού είναι ένας από τους εσωτερικούς παράγοντες που ελέγχουν την μετάβαση προς την αναπαραγωγική ανάπτυξη. Ένα δεύτερο κυρίαρχο χαρακτηριστικό της άνθησης είναι ότι, για πολλά είδη, συμβαίνει σε κάποια συγκεκριμένη εποχή του χρόνου και έτσι πρέπει να υπόκειται στον έλεγχο των εξωτερικών περιβαλλοντικών συνθηκών. Ο φωτοπεριοδισμός και η εαρινοποίηση είναι δύο από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς τέτοιων εποχιακών ανταποκρίσεων.

2 Εσωτερικοί και εξωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την άνθηση

Ο έλεγχος της ανθικής μετάβασης από ενδογενείς και περιβαλλοντικούς παράγοντες αποτελεί έναν τρόπο ζωής των φυτών, που οδηγεί στο συντονισμό της άνθησης μέσα σ' ένα πληθυσμό. Γι' αυτό και σε κάθε είδος, όσον αφορά την άνθηση, θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν τόσο το ιστορικό όσο και η βιολογία του φυτού. Επιπλέον οι εκλεκτικές πιέσεις που ασκούνται κατά το συντονισμό της άνθησης είναι τέτοιες και οι οικολογικές παράμετροι τόσο μεταβλητές και ποικίλες, που είναι πιθανόν να χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά μέσα με σκοπό το ίδιο τελικό αποτέλεσμα.

Στο κείμενο που ακολουθεί γίνεται μια προσπάθεια λεπτομερούς ανάλυσης των παραγόντων που εμπλέκονται στην άνθηση, με κύριο σκοπό την αναγνώριση των μηχανισμών στους οποίους βασίζονται οι λειτουργίες τους. Η προσπάθεια αυτή επικεντρώνεται στη συσχέτιση βιοχημικών αλλαγών και αλλαγών που αφορούν την γονιδιακή έκφραση, με την ανθική ανταπόκριση.

2.1 Μηχανισμός ενδογενούς ελέγχου - Νεανικότητα

Ένας πιθανός ορισμός της νεανικής συμπεριφοράς ενός φυτού σε σχέση με την άνθηση είναι η αδυναμία του φυτού να ανταποκριθεί σ' ένα προαγωγικό περιβαλλοντικό ερέθισμα παρά το γεγονός ότι όλες οι εξωτερικές συνθήκες ευνοούν την σεξουαλική αναπαραγωγή. Ο περιβαλλοντικός δηλαδή έλεγχος της άνθησης υπερκαλύπτεται από διάφορους παράγοντες ανάπτυξης και το φυτό διατηρεί αυτήν του την "αδυναμία" μέχρι να έλθει στην ωριμότητα.

Η ανάπτυξη των στελεχών και η παραγωγή φύλλων είναι απαραίτητα για τη λήψη του φωτός και τη φωτοσυνθετική λειτουργία του φυτού. Μέρος των φωτοσυνθετικών προϊόντων αξιοποιείται στην παραγωγή σπόρων για την εξασφάλιση της επόμενης γενιάς. Αυτή η ανάγκη σε συνδυασμό με το γενικότερο ανταγωνισμό για αξιοποιήσιμες πηγές όπως φως και θρεπτικά στοιχεία, εισάγει μια εκλεκτική πίεση που δρα με σκοπό την επέκταση της βλαστικής φάσης του φυτού.

Η διάρκεια της περιόδου νεανικότητας είναι ένα συστατικό της όλης ανταγωνιστικής στρατηγικής του φυτού και αποτελεί μέρος του γενετικού

προγραμματισμού της κάθε καλλιέργειας ή ποικιλίας. Αυτή ποικίλει μεταξύ ξυλωδών και ποωδών ειδών όπου στα ξυλώδη μπορεί να έχει διάρκεια μέχρι 30-40 χρόνια (σε κάποια δασικά είδη) ενώ στα ποώδη σπάνια υπερβαίνει τις μερικές ημέρες ή εβδομάδες.

Η ανικανότητα νεαρών φυτών να ανθίσουν μπορεί να οφείλεται σ' έναν αριθμό μηχανισμών. Αυτοί περιλαμβάνουν την αδυναμία των φύλλων να ανταποκριθούν στο μήκος ημέρας και με τη σειρά τους να επάγουν τις δεκτικές κορυφές, κληρονομικά ανίκανες να δώσουν άνθη κορυφές μέχρι κάποια συγκεκριμένη ηλικία και κορυφές που αδυνατούν να δώσουν άνθη εξαιτίας επιρροών που δέχονται από άλλα μέρη του φυτού.

◆ Σχέση των αλλαγών στο κορυφαίο μερίστωμα με το πέρασμα από την νεανικότητα στην ωριμότητα

Η επίτευξη ενός ικανοποιητικού μεγέθους είναι εν τέλει πιο σημαντική από ότι η χρονολογική ηλικία ενός φυτού όσον αφορά τον καθορισμό της μετάβασης αυτού στην ωριμότητα. Έτσι βέλτιστες συνθήκες για την ωριμότητα είναι εκείνες που επιτρέπουν την γρήγορη αύξηση του φυτού. Πάντως παρ' όλο που το μέγεθος φαίνεται να είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας, δεν είναι ακόμη γνωστό πιο συγκεκριμένο συστατικό που σχετίζεται με το μέγεθος είναι κρίσιμο.

Έχει προταθεί (Robinson and Wareing, 1969) ότι κάποια αλλαγή πρέπει να συμβαίνει στο μερίστωμα η οποία δεν είναι πάντα μη αντιστρεπτή. Μια διαφορετική υπόθεση αναφέρει την επιρροή των ριζών στην άνθηση (Schwabe, 1976). Στο φυτό *ivy* και πιθανόν και σε άλλα είδη, φαίνεται πως μια γιββερελίνη που παράγεται στη ρίζα ανέρχεται στο βλαστό με σχετικά μικρή ταχύτητα και όχι πέρα από κάποιο μήκος. Αυτή η γιββερελίνη είναι παρεμποδιστική της άνθησης (Schwabe and Al-Doori, 1973; Wareing and Frydman, 1976). Η αύξηση της απόστασης μεταξύ του κορυφαίου μεριστώματος από τις ρίζες του έχει ως αποτέλεσμα την άρση της παρεμπόδισης όπως επίσης ίδιο αποτέλεσμα έχει και η αφαίρεση των ριζών (Krekule' and Seidlova, 1973).

Επίσης ερωτηματικό αποτελεί το αν η άνθηση αποτελεί ανταπόκριση ενός σήματος το οποίο προέρχεται από άλλο σημείο του φυτού. Αποτελέσματα κάποιων πειραμάτων υποστηρίζουν αυτό το σκεπτικό. Παράδειγμα αποτελεί το φυτό *Mango mangifera* του οποίου τα νεαρά σπορόφυτα μπορούν να ανθήσουν αν μεταμοσχευτούν σε ώριμα φυτά. Σε άλλα είδη πάντως ανάλογα παραδείγματα δεν έδωσαν ίδια αποτελέσματα.

◆ Το κορυφαίο μερίστωμα σαν αποδέκτης θρεπτικών και ορμονών προερχόμενα από το φυτό

Η μετάβαση του κορυφαίου μεριστώματος στην ωριμότητα μπορεί να αποδοθεί σε αρκετούς εκπεμπόμενους παράγοντες. Σε πολλά φυτά η έκθεση σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού προκαλεί είτε παράταση της νεανικότητας είτε επάνοδο σ' αυτή. Μια βασική συνέπεια των συνθηκών χαμηλού φωτισμού είναι η μείωση της παροχής υδατανθράκων προς την κορυφή, γι' αυτό και η παροχή σε υδατάνθρακες μπορεί να θεωρηθεί ότι παίζει ρόλο στην μετάβαση από την νεανικότητα στην ωριμότητα. Μια φανερή σχέση μεταξύ της θρεπτικής κατάστασης και του σταδίου ωριμότητας είναι η επίδραση της θρέψης στο μέγεθος του κορυφαίου μεριστώματος. Όπως παρατήρησε ο Cockshull το 1985, στα χρυσάνθεμα η άνθηση δεν ξεκινά, αν πρώτα δεν επιτευχθεί ένα ελάχιστο μέγεθος του κορυφαίου μεριστώματος.

Το κορυφαίο μερίστωμα δέχεται μια ποικιλία ορμονικών παραγόντων από το υπόλοιπο φυτό μαζί με τους υδρογονάνθρακες και τα υπόλοιπα θρεπτικά στοιχεία. Η ερώτηση είναι αν κάποιος παράγοντας προάγει την μετάβαση από την νεανικότητα στην ωριμότητα. Υπάρχει ένα πλήθος πειραματικών δεδομένων που δείχνουν ότι η εφαρμογή γιββερελινών είναι ικανή να προκαλέσει άνθηση σε αρκετά κωνοφόρα είδη. Έτσι αν και τα περισσότερα κωνοφόρα είδη απαιτούν αρκετά χρόνια για να φτάσουν στην ωριμότητα εν τούτοις αυτό έγινε σε φυτά του είδους *Cupressus arizonica* που είχαν ηλικία 2 μηνών όταν ψεκάστηκαν με γιββερελίνες.

Η συμμετοχή ενδογενών γιββερελινών στον έλεγχο της άνθησης γίνεται αντιληπτή από το γεγονός ότι άλλες μεταχειρίσεις που επιτάχυναν την άνθηση στα πεύκα (π.χ. αφαίρεση ριζών, έλλειψη νερού και τροφοπενία αζώτου) συχνά είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση των γιββερελινών στα φυτά. Από την άλλη πλευρά, ενώ οι γιββερελίνες

αποτελούν παράγοντα ωριμότητας στα κωνοφόρα, η εφαρμογή αυτών στο φυτό *Hedera helix* καθώς και σε άλλα ξηλώδη αγγειόσπερμα προκαλεί επάνοδο στην κατάσταση της νεανικότητας. Έτσι οι γιββερελίνες μπορούν να είναι και παράγοντες νεανικότητας.

Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι ο ρόλος των γιββερελινών στον έλεγχο της ωριμότητας είναι περίπλοκος και πιθανότατα υπόκειται σε αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες.

2.2 Μηχανισμός εξωγενούς ελέγχου - περιβάλλον

Σχεδόν κάθε περιβαλλοντικός παράγοντας μπορεί να τροποποιήσει την άνθηση. Από την άλλη πλευρά τα φυτά μπορεί να αξιοποιούν τις διάφορες εποχιακές αλλαγές με σκοπό να διασφαλίσουν την άνθησή τους σε κατάλληλη στιγμή. Ο φωτοπεριοδισμός και η εαρινοποίηση αποτελούν κλασικά παραδείγματα τέτοιου είδους συμπεριφοράς.

Εναλλακτικά, τα φυτά μπορούν να υιοθετούν έναν πιο ευκαιριακό τρόπο αντίδρασης, στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπου η άνθηση να ενεργοποιείται με την έναρξη συγκεκριμένων συνθηκών που προκύπτουν απρόβλεπτα ή σε άτακτα χρονικά διαστήματα. Το υδατικό ή θερμικό stress, όταν συνήθως επικρατούν ήπιες κλιματικές συνθήκες ή αντίθετα η επάρκεια νερού σε συνθήκες κανονικής ξηρασίας μπορούν αντίστοιχα να σηματοδοτήσουν την έναρξη της άνθησης.

Εκτός των προηγούμενων το φως είναι ένας ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας όσον αφορά την άνθηση στα φυτά. Αποτελεί ένα πολύπλοκο ερέθισμα που ποικίλει σε διάρκεια, ένταση και φασματική σύσταση τα οποία φαίνεται ότι επηρεάζουν την άνθηση.

2.2.1 Φωτοπεριοδισμός

Γενικά

Η ικανότητα ενός οργανισμού να αντιλαμβάνεται το μήκος της ημέρας καθιστά δυνατή την πραγματοποίηση κάποιου γεγονότος σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή εμφανίζοντας έτσι εποχιακές ανταποκρίσεις. Η φωτοπερίοδος, παρουσιάζοντας προβλέψιμες αλλαγές καθ' όλο το χρόνο, με εξαίρεση τον ισημερινό όπου παραμένει

σταθερή, μας παρέχει έναν αξιόπιστο και αντικειμενικό δείκτη της εποχιακής προόδου.

Οι ανταποκρίσεις των φυτών που ελέγχονται από το μήκος της ημέρας είναι πολυάριθμες. Αυτές συμπεριλαμβάνουν την έναρξη και περαιτέρω ανάπτυξη της άνθησης, αγενής αναπαραγωγή και το μετασχηματισμό αποθηκευτικών οργάνων. Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που δείχνουν ότι όλες οι φωτοπεριοδικές ανταποκρίσεις έχουν έναν κοινό αρχικό μηχανισμό, με διακλαδιζόμενα εξειδικευμένα βιοχημικά μονοπάτια που ρυθμίζουν διαφορετικές λειτουργίες. Πάντως η φωτοπερίοδος είναι ίσως η πιο σημαντική περιβαλλοντική μεταβλητή βάση της οποίας τα φυτά ρυθμίζουν την άνθησή τους (Vince-Prue, 1975).

Με κριτήριο τις απαιτήσεις των φυτών σε μήκος ημέρας όσον αφορά την άνθησή τους διακρίνουμε τις εξής κατηγορίες:

1. Φυτά μικρής ημέρας τα οποία ανθίζουν ή επιταχύνουν την άνθησή τους μόνο όταν το μήκος της ημέρας είναι βραχύτερο από κάποια συγκεκριμένη διάρκεια που αναφέρεται ως κρίσιμο μήκος ημέρας.
2. Φυτά μεγάλης ημέρας τα οποία ανθίζουν ή επιταχύνουν¹ την άνθησή τους μόνο όταν το μήκος της ημέρας ξεπερνά και πάλι ένα κρίσιμο μήκος ημέρας.
3. Φωτοουδέτερα φυτά των οποίων η άνθηση δεν επηρεάζεται από την φωτοπερίοδο.

1. (Σύμφωνα με τους Heslop-Harrison και Heslop-Harrison (1970) η φωτοπερίοδος ελέγχει το ρυθμό προόδου προς την άνθηση)

Στον φωτοπεριοδισμό οι όροι « μικρή μέρα » ή « μεγάλη μέρα » αναφέρονται σε σχέση με το κρίσιμο μήκος μέρας και όχι βάσει την απόλυτή τους διάρκεια. Για παράδειγμα το φυτό μικρής μέρας *Xanthium strumarium* έχει κρίσιμο μήκος μέρας 15-16 ώρες, ενώ το φυτό μεγάλης μέρας *Hyoscyamus niger* έχει αντίστοιχα 11 ώρες. Μια διάρκεια ημέρας 13 ωρών θα αποτελούσε μακριά ημέρα για το *Hyoscyamus* και μικρή μέρα για το *Xanthium* ενώ παράλληλα θα ήταν επαγωγικής σημασίας και για τα δύο.

Ο φωτοπεριοδισμός επηρεάζεται από τη θερμοκρασία κατά τρόπο ώστε σε κάποια θερμοκρασία τα φυτά είναι φωτοουδέτερα ενώ σε άλλη φωτοευαίσθητα. Γενικά πάντως οι υψηλές θερμοκρασίες επιταχύνουν την άνθηση σε φυτά που μεγαλώνουν κάτω από επαγωγικά μήκη ημέρας αλλά εμποδίζεται η άνθηση τόσο σε χαμηλές θερμοκρασίες (Below 8°C in *Kalanchoe*; Schwabe, 1969) όσο και σε πολύ υψηλές (Above 30°C in *Kalanchoe*; Schwabe, 1969).

Το κρίσιμο μήκος ημέρας επηρεάζεται από την ηλικία, την καλλιέργεια, τη θερμοκρασία και την ένταση της ακτινοβολίας. Ο αριθμός των επαγωγικών ημερών επίσης επηρεάζεται από την ηλικία με τα ωριμότερα φυτά να παρουσιάζουν σταδιακή μείωση των αναγκών τους. Αυτή η παρατήρηση υπονοεί ότι η επίδραση του μήκους ημέρας ίσως αφορά την επιτάχυνση μιας διεργασίας προς την άνθηση η οποία κανονικά εξελίσσεται με αργό ρυθμό.

Έχει προταθεί (Hillman, 1962) ότι ο γενετικός έλεγχος της άνθησης είναι απλός, με κριτήριο την ευκολία παραγωγής καλλιεργειών πρώιμης και όψιμης άνθησης σ' έναν μεγάλο αριθμό ειδών. Η ύπαρξη όμως ποσοτικών αντιδράσεων υπαγορεύει το αντίθετο. Τα απλά γενετικά συστήματα δίνουν ποιοτική ποικιλομορφία ενώ το εύρος φωτοπεριοδικών αντιδράσεων σε οικότυπους, ποικιλίες και σειρές καλλιεργειών υπαγορεύει πολυγενετικό έλεγχο. Για παράδειγμα επιλογές που έγιναν στο φυτό *Silene* για περισσότερες από δύο γενεές από μια σειρά που άνθιζε μόνο μετά από 10 ή περισσότερες επαγωγικές ημέρες, έδωσαν σειρές που το 90% της άνθησης γινόταν σε 6 επαγωγικές ημέρες και άλλες που δεν άνθιζαν ακόμη και μετά από 12 (Wellensiek, 1969).

Όσον αφορά το μέρος του φυτού που λαμβάνει το μήκος της ημέρας είναι γενικά αποδεκτό πως πρόκειται για τα φύλλα. Μια από τις πιο πρόσφατες μελέτες που αφορούσε αυτό το ζήτημα έγινε από τον Knott (1934), ο οποίος έδειξε ότι έκθεση σε

επαγωγικές συνθήκες μόνο των φύλλων του φυτού μεγάλης μέρας *Spinacia oleracea*, προκάλεσε την έναρξη σχηματισμού ανθικών οργάνων. Σ' ένα πιο ακραίο πείραμα ο Zeevaart (1969) έδειξε πως φύλλα του φυτού *Perilla* μπορούσαν να επαχθούν αφού αποκολληθούν από το φυτό. Τα φύλλα αυτά με τη σειρά τους προκάλεσαν την άνθηση όταν μεταμοσχεύτηκαν σε φυτά δέκτες που διατηρούνταν κάτω από μη επαγωγικές συνθήκες.

Τέλος σχετικά με το μήκος της ημέρας, προκειμένου τα φυτά να είναι σε θέση να αντιληφθούν θα πρέπει να έχουν την ικανότητα να συσχετισούν την αλλαγή από το φως στο σκοτάδι και αντίστροφα με το εσωτερικό ρολόι. Ένας φωτοδέκτης και ένας χρονομετρητής είναι θεωρητικά απαραίτητοι και επαρκείς για έναν μηχανισμό ανίχνευσης του μήκους ημέρας.

Ο χρονομετρητής

Με σκοπό να είναι αποτελεσματικός στον καθορισμό της χρονικής στιγμής με βάση τις αλλαγές του μήκους ημέρας, ο χρονομετρικός μηχανισμός θα πρέπει να είναι ακριβής και σχετικά ανεπηρέαστος από τη θερμοκρασία. Ο Hendricks το 1960 πρότεινε πως η επαναστροφή του φυτοχρώματος στο σκοτάδι από τη μορφή P_{Fr} στη μορφή P_r , αποτελεί το μέσο με το οποίο τα φυτά μετρούν το μήκος της νύχτας με τη χρήση ενός μηχανισμού τύπου «κλειψίθρας». Μέρος της παραπάνω πρότασης ήταν ότι μια διακοπή με φως κατά τη διάρκεια μιας κατά τα άλλα επαγωγικής σκοτεινής περιόδου, θα απέτρεπε την άνθηση προκαλώντας φωτοχημικό σχηματισμό του P_{Fr} και εμποδίζοντας αυτό να πέσει κάτω από το επίπεδο που επιτρέπεται η άνθηση. Παρ' όλα αυτά, στιγμιαία πτώση των επιπέδων του P_{Fr} στην αρχή της σκοτεινής περιόδου ως αποτέλεσμα της εφαρμογής μακρινού κόκκινου φωτός είχε μόνο μικρή επίδραση στη μέτρηση της σκοτεινής περιόδου (Takimoto and Hamner, 1965; Lumsden and Vince-Prue, 1984). Τέτοια πειράματα δείχνουν ότι το φυτόχρωμα δεν είναι ο χρονομετρητής για τον φωτοπεριοδισμό αλλά, όπως εμφανίζεται παρακάτω, αλληλεπιδρά με τον χρονομετρητή.

Οι οργανισμοί κανονικά υποβάλλονται σε ημερήσιους κύκλους φωτός και σκοταδιού και τόσο τα ζώα όσο και τα φυτά συχνά εμφανίζουν μια ρυθμική συμπεριφορά σε σχέση με αυτές τις αλλαγές (Brady, 1982; Sweeney, 1987). Όταν οι οργανισμοί μεταφέρονται από ημερήσιους κύκλους φωτός / σκότους σε συνεχές

σκοτάδι ή σε συνεχή χαμηλής έντασης φωτισμό, πολλοί από αυτούς τους ρυθμούς συνεχίζουν να εκφράζονται, τουλάχιστον για κάποιο χρονικό διάστημα. Κάτω από τέτοιες σταθερές καταστάσεις η περιοδικότητα του ρυθμού είναι περίπου 24 ώρες και γι' αυτό χρησιμοποιείται ο όρος «κικκάδιος». Λόγω του ότι συνεχίζουν να εμφανίζονται σε περιβάλλον συνεχούς φωτισμού ή σκότους, αυτοί οι «κικκάδιοι» ρυθμοί δεν μπορεί να αποτελούν άμεσες ανταποκρίσεις της παρουσίας ή απουσίας φωτός αλλά πρέπει να βασίζονται σ' έναν ενδογενή «βηματοδότη» που είναι αυτό-διατηρούμενος. Αυτός ο «βηματοδότης» συχνά καλείται ενδογενής ταλαντωτής (ρολόι).

Η εναλλακτική λοιπόν υπόθεση είναι ότι ο χρονισμός βασίζεται σ' έναν «κικκάδιο» ρυθμό της φωτοευαισθησίας (Lumsden, 1991). Στα φυτά μικρής μέρας (*heporodium rubum*, *Pharbitis nil* και *Glycine max*) αυτή η ρυθμικότητα εμφανίζεται κατά τη διακοπή μιας μακράς σκοτεινής περιόδου με βραχείς φωτεινούς παλμούς σε διάφορες στιγμές. Ο ρυθμός που παρατηρείται έχει μια ελευθέρα κυμαινόμενη περιοδικότητα περίπου 24 ωρών, υφίσταται αλλαγή «φάσης» από συνθήκες μικρής μέρας και είναι ανεπηρέαστος από τη θερμοκρασία (Thomas and Vince-Prue, 1984). Αυτά αποτελούν διαγνωστικά χαρακτηριστικά «κικκάδιων» ρυθμών. Στα φυτά μεγάλης ημέρας η ρυθμικότητα εμφανίζεται κατά τη διάρκεια μεταχείρισης με παρατεταμένο φωτισμό και παρατηρείται ως «κικκάδιος» ρυθμός ανταποκρινόμενος στη μεταβολή του λόγου $P_{Ff} : P_r$.

Ο φωτοδέκτης

Πριν αναφερθούμε στον φωτοδέκτη θα ήταν χρήσιμο να γίνει κατανοητός ο ρόλος του φωτός στην φωτοπεριοδική επαγωγή. Το θέμα είναι περίπλοκο διότι δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι υπάρχει ένας απλός μηχανισμός βάσει του οποίου γίνεται η λήψη του μήκους ημέρας. Ο Vince-Prue (1983) ταξινόμησε τα φυτά είτε ως σκοτο-κυρίαρχα, όπου το μήκος της σκοτεινής περιόδου αποτελεί τον αποφασιστικό παράγοντα και έτσι οι συνθήκες φωτισμού κατά τη διάρκεια της φωτοπεριόδου έχουν ισχυρή επίδραση πάνω στην ανθική ανταπόκριση. Τα περισσότερα φυτά μεγάλης ημέρας είναι φωτο-κυρίαρχα.

Στα φωτο-κυρίαρχα φυτά οι συνθήκες φωτισμού κατά τη διάρκεια της φωτοπεριόδου είναι κρίσιμες. Οι επιδράσεις φαίνονται πιο καθαρά όταν μικρές μέρες

επεκτείνονται σε μεγάλες χρησιμοποιώντας διαφορετικής ποιότητας φωτισμό. Έτσι φως πλούσιο σε μακρινό κόκκινο είναι πιο αποτελεσματικό όσον αφορά την προαγωγή της άνθησης. Το λειτουργικό φάσμα για νυχτερινά διαλύματα τόσο στα φυτά μικρής όσο και στα φυτά μεγάλης μέρας παρουσιάζει μέγιστο στα 730nm, πράγμα που σημαίνει ότι το φυτόχρωμα είναι ο φωτοδέκτης. Το λειτουργικό φάσμα για την προαγωγή της άνθησης μέσω της φωτοπεριόδου στα φυτά μεγάλης ημέρας εμφανίζει μέγιστα κοντά στα 710-720nm, παρόμοια δηλαδή με το λειτουργικό μέγιστο της υψηλής έντασης ανταπόκριση (High Irridance Response) του φυτοχρώματος στα φυτάρια χωρίς χλωροφύλλη. Η HIR πιστεύεται πως μεσολαβεί από φυτόχρωμα τύπου I που είναι ασταθές στο φως όπως και το P_{Fr}. Το λειτουργικό φάσμα για επιμήκυνση της ημέρας στο σιτάρι εμφανίζει μέγιστα στα 600nm και 720nm (Carr-Smith et al., 1989). Παράλληλες μετρήσεις με ανοσοκαθίζηση δείχνουν ότι το μέγιστο στα 720nm συσχετίζεται με το επίπεδο του τύπου I φυτοχρώματος P_{Fr} (Carr-Smith, 1990). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν και πάλι ότι το φυτόχρωμα είναι ο φωτοδέκτης και επιπλέον ότι πιθανότατα εμπλέκεται τόσο το φωτοσταθερό (τύπου II που δίνει μέγιστο στα 660nm) όσο και το ασταθές (τύπου I με μέγιστο στα 720nm φυτόχρωμα.

Είναι γνωστό ότι το φυτόχρωμα επηρεάζει έναν αριθμό φυσιολογικών και αναπτυξιακών διεργασιών σε φυτά που εξαρτώνται από το ασβέστιο (Herpler and Wayne, 1985). Έχει δειχθεί πως το P_{Fr} ενισχύει την εκροή ιόντων Ca²⁺ από απομονωμένα μιτοχόδρια (Roux et al., 1981) καθώς και την εισροή ιόντων Ca²⁺ κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης (Dreyer and Weisenseel, 1979). Ένα πρόσφατο μοντέλο (Goto et al., 1985) προτείνει ότι ένας αυτοδιατηρούμενος «κιρκάδιος» ταλαντωτής ενεργοποιείται με μια φωτο-εξαρτώμενη κινητοποίηση Ca²⁺ μέσα στο κυτόπλασμα, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί ακαριαία ένα σύμπλοκο Ca²⁺-καλμοδουλίνης. Ως δεύτερος αγγελιοφόρος το Ca²⁺-καλμοδουλίνη μπορεί να εμπλέκεται στα μοριακά γεγονότα που αποτελούν την βάση για τη δράση των αυξητικών ουσιών (Kelly, 1984; Dieter, 1984). Είναι επιπλέον γνωστό ότι ενεργοποιεί έναν αριθμό ενζύμων όπως πρωτείνες, κινάσες και φωσφατάσες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον σ' αυτή τη συζήτηση αποτελεί η αναφορά ότι το Ca²⁺-καλμοδουλίνη ενεργοποίησε τη φωσφορυλίωση μιας H⁺-ATPάσης σε ρίζες καλαμποκιού (Zocchi et

al., 1983) καθώς και η αναφορά της ανάγκης για Ca^{2+} κατά τη διάρκεια της παρεμπόδισης του ανοίγματος των στομάτων από αμψισικό οξύ (De Silva et al., 1985). Έτσι, εφ' όσον τόσο οι κινήσεις των φύλλων όσο και οι στοματικές αποκρίσεις λειτουργούν με ροή ιόντων πιθανώς βασιζόμενη σε H^+ -αντλίες, μπορεί να υπάρχει ένας κοινός μηχανισμός που να εμπλέκει Ca^{2+} και καλμοδουλίνη μέσα στο «κικκάδιο» σύστημα μέτρησης χρόνου στα φυτά.

Το ότι το φυτόχρωμα μπορεί να δράσει στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης έχει από καιρό προταθεί βάσει φυσιολογικών πειραμάτων (Mohr, 1972) και έχει προσφάτως επιδειχθεί με την έμμεση χρήση τεχνικών μοριακού υβριδισμού (Gollmer and Apel, 1983; Stiekema et al., 1983). Πάντως δεν είναι γνωστό αν η δράση του φυτοχρώματος είναι άμεση ή έμμεση εφ' όσον μπορεί να επηρεάζει την κατάσταση των κυτταρικών μεμβρανών (Marpe, 1977) που με τη σειρά τους μπορεί να οδηγούν σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης.

Το ανθικό ερέθισμα

Το μήκος ημέρας λαμβάνεται στα φύλλα και αν αυτό είναι ευνοϊκό αρχίζει μια ακολουθία γεγονότων που οδηγεί σε αλλαγές στο κορυφαίο μερίστωμα. Βάση αυτού ο Chailakhayan (1936) συμπέρανε ότι η άνθηση στο κορυφαίο μερίστωμα συμβαίνει ως ανταπόκριση σ' ένα εκπεμπόμενο ερέθισμα το οποίο προέρχεται από το φύλλο. Γι' αυτό το ερέθισμα εισήγαγε τον όρο "φλοριγόνο" (florigen).

Πειράματα που περιλάμβαναν εμβολιασμούς μεταξύ φυτών με διαφορετικές απαιτήσεις σε μήκος ημέρας (Lang, 1965) καθώς και φωτο-ουδέτερων ποικιλιών (Lang et al., 1977; Lang, 1980), έδειξαν ότι πρέπει να υπάρχει ένα κοινό μονοπάτι ή αριθμός μονοπατιών (Bernier, 1984) που οδηγούν στην άνθηση. Επίσης το ανθικό ερέθισμα ή φλοριγόνο εμφανίζεται ως κοινό τελικό προϊόν σε πολλά είδη αυτό διαφαίνεται από πετυχημένες μεταδώσεις του ανθικού ερεθίσματος μέσω εμβολιασμών μεταξύ μελών από διαφορετικά είδη, γένη ή ακόμη και οικογένειες. Επιπλέον, η ταξινομική συγγένεια μεταξύ φυτών με διαφορετικές απαιτήσεις σε μήκος ημέρας, ακόμη και μεταξύ καλλιεργειών του ίδιου είδους, προτείνει την ύπαρξη ενός κοινού μηχανισμού με διαφορές μόνο όσον αφορά την ποσότητα και όχι την ποιότητα αντίδρασης, τόσο σε μικρής ή μεγάλης μέρας φυτά όσο και σε φωτο-ουδέτερα.

Στοιχεία που προέκυψαν από πειράματα εμβολιασμών και μελέτες φυσιολογίας, έδειξαν ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό φυλλικού ιστού, σε σχέση με την ολική φυλλική μάζα, είναι απαραίτητο για την ανθική επαγωγή. Αυτό σε συνδυασμό με το ότι η παραγωγή στα φύλλα ενός βιοχημικού σήματος που δρα σ' ένα απόμακρο μέρος όπως το κορυφαίο μερίστωμα, ικανοποιούν δύο σημαντικά κριτήρια των ορμονικών επιδράσεων. Οι μέχρι σήμερα πολυάριθμες προσπάθειες για την απομόνωση και χαρακτηρισμό αυτής της υποθετικής ορμόνης δεν είχαν αποτελέσματα. Οι προσπάθειες αυτές κινήθηκαν στις εξής κατευθύνσεις:

α) λήψη εκχυλισμάτων από φυλλικό ιστό κάτω από επαγωγικές συνθήκες και έλεγχος ικανότητας αυτών να προκαλέσουν άνθηση σε μη επαγμένα φυτά.

β) εκχύλιση και ανάλυση χυμού του φλοιώματος από επαγμένα φυτά.

Σε ορισμένες μελέτες, εκχυλίσματα μιας από των παραπάνω πηγών αναφέρθηκαν ότι επάγουν την άνθηση σε πειραματικά φυτά, αλλά αυτά τα αποτελέσματα δεν αναπαράχθηκαν με ακρίβεια (Zeevaart and Boyer, 1987).

Επίσης ένας σημαντικός όγκος στοιχείων αναφέρουν πώς όταν φύλλα αφέθηκαν σε μη επαγωγικούς κύκλους ημέρας/νύχτας, παρουσιάστηκε μια παρεμποδιστική επίδραση της άνθησης τόσο σε μικρής όσο και σε μεγάλης ημέρας φυτά (Lang and Melchers, 1943; Thompson and Gutteridge, 1960). Πάλι όμως προσπάθειες να απομονωθεί ένας συγκεκριμένος εμβολιο-εκπεμπόμενος παρεμποδιστής της άνθησης ή αντι-φλοριγόνο, ήταν ανεπιτυχής.

Έτσι αυτό που διαφαίνεται είναι ότι κάθε υπόθεση φλοριγόνου πρέπει μάλλον να συμπεριλαμβάνει μια ισορροπία μεταξύ προαγωγέων και παρεμποδιστών.

♦ Το ανθικό ερέθισμα μπορεί να έχει μερικά συστατικά

Η μετάβαση στην άνθηση μπορεί να περιλαμβάνει ένα πολύπλοκο σύστημα αλληλεπιδρώντων παραγόντων συμπεριλαμβανομένου, μεταξύ άλλων, υδατάνθρακες, γιββερελίνες και κυτοκινίνες (Bernier, 1988). Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες μπορεί να δρουν αλυσιδωτά, εφόσον κάποιες κυτταρικές αλλαγές προκύπτουν πριν την άφιξη του ανθικού ερεθίσματος στο κορυφαίο μερίστωμα. Ορισμένες φορές αλλαγές που κανονικά συνδέονται με την άνθηση, μπορούν να προκληθούν από μεταχειρίσεις που από μόνες τους δεν μπορούν να προκαλέσουν έναρξης της άνθησης. Για παράδειγμα, ένα από τα πιο πρώιμα γεγονότα που παρατηρούνται στο κορυφαίο

βλαστικό μερίστωμα και που ακολουθεί τη φωτοπεριοδική επαγωγή, είναι μια μεταβατική αύξηση του αριθμού των κυττάρων που υφίστανται μίτωση. Όταν εφαρμοστούν κιτοκινίνες στο κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα του μακράς ημέρας φυτού *Sinapis alba*, προκαλούν μια αύξηση της μιτοτικής δραστηριότητας παρόμοια με αυτή που προκαλεί η έκθεση του φυτού σε μεγάλη ημέρα. Παρόλα αυτά όμως η μεγάλη ημέρα επάγει την άνθηση αλλά η κιτοκινίνη όχι. Έτσι η κιτοκινίνη μπορεί να αποτελεί ένα συστατικό του ανθικού ερεθίσματος.

Αν το ανθικό ερέθισμα τελικά έχει περισσότερα του ενός συστατικά, είναι πιθανόν να μη χρειάζεται όλοι οι παράγοντες να είναι απόντες σε συνθήκες που δεν επιτρέπουν την άνθηση. Αυτό θα εξηγούσε το ευρύ φάσμα ουσιών και καταστάσεων που μπορούν να προκαλέσουν άνθηση.

Τέλος, πολυάριθμα φυσιολογικά πειράματα δείχνουν ότι το εξαγόμενο ερέθισμα από επαγμένα φύλλα έχει κάποιες συγκεκριμένες ιδιότητες. Παραμένει λοιπόν υπό διερεύνηση η βιοχημική βάση της ανθικής επαγωγής.

Αυτόνομη επαγωγή

Ο Gregory (1936) εισηγήθηκε πως το κανονικό μονοπάτι της ανάπτυξης του φυτού είναι η άνθηση υπονοώντας έτσι ότι οι μηχανισμοί ελέγχου λειτουργούν κυρίως καθυστερώντας την έναρξη της άνθησης. Μέρος αυτής της προοπτικής αποτελεί η θεώρηση πως τα φυτά επιτυγχάνουν μια σταδιακή πρόοδο προς την έναρξη της άνθησης τους καθώς μεγαλώνουν σε ηλικία. Για παράδειγμα, στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η άνθηση επιταχύνεται από μεγάλες ημέρες αλλά ο αριθμός των μεγάλων ημερών που απαιτείται για την ολοκλήρωση της επαγωγής μειώνεται όσο το φυτό μεγαλώνει σε ηλικία. Έτσι η έναρξη της άνθησης θα γίνει μέσα σε πέντε εβδομάδες από τη βλάστηση, ακόμη και σε συνθήκες μικρής ημέρας.

Προκύπτει όμως το ερώτημα αν η επιτάχυνση της άνθησης σε μεγάλες ημέρες δρα μέσω του ίδιου μηχανισμού με τον οποίο προκύπτει η άνθηση σε μικρές ημέρες. Δηλαδή αν τόσο η φωτοπεριοδική όσο και η αυτόνομη επαγωγή βασίζονται στον ίδιο μηχανισμό.

Η φωτοπεριοδική επαγωγή βασίζεται στο φύλλο και έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή ενός σήματος προς το κορυφαίο μερίστωμα. Έτσι λοιπόν η άνθηση σε μικρές

ημέρες μπορεί να περιλαμβάνει τις ίδιες αλλαγές στο φύλλο οι οποίες σε πιο νεαρά φυτά εξαρτώνται από επαγωγικές φωτοπεριόδους. Σ' αυτή την περίπτωση μπορεί να θεωρηθεί ότι η επαγωγή προκύπτει αυτόνομα σε μικρές ημέρες. Εναλλακτικά η απώλεια της φωτοπεριοδικής εξάρτησης για άνθηση μπορεί να έχει ως συνέπεια αλλαγές στο ίδιο το κορυφαίο μερίστωμα καθώς αυτό γηράσκει. Πάντως πειράματα που περιελάμβαναν εμβολιασμούς θεωρητικά αυτόνομα επαγόμενων φύλλων δεν κατέληξαν σε συμπέρασμα για το θέμα αυτό.

2.2.2 Εαρινοποίηση

Εαρινοποίηση είναι η διαδικασία προαγωγής της άνθησης μέσω μεταχειρίσεων με χαμηλές θερμοκρασίες είτε σε σπόρους που έχουν απορροφήσει νερό είτε σε αναπτυσσόμενα φυτά. Οι ξηροί σπόροι δεν ανταποκρίνονται στην εαρινοποίηση. Η θερμοκρασία έχει και άμεσα αποτελέσματα πάνω στην έναρξη της άνθησης σε κάποια φυτά. Τα αποτελέσματα αυτά όμως μπορούν να διαχωριστούν από την εαρινοποίηση που, όπως και ο φωτοπεριοδισμός, είναι ένα επαγωγικό φαινόμενο το οποίο όμως οδηγεί στην άνθηση κάποιο χρονικό διάστημα μετά την έναρξη των χαμηλών θερμοκρασιών. Όταν τα φυτά που είναι απαιτητικά όσον αφορά την εαρινοποίηση, δεν δεχτούν την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών εμφανίζουν μια καθυστέρηση της άνθησης ή παραμένουν στη βλαστική φάση. Σε πολλές περιπτώσεις τέτοια φυτά μεγαλώνουν σαν ροζέτες χωρίς να παρουσιάζουν επιμήκυνση του βλαστού.

Τα φυτά παρουσιάζουν μια σημαντική διαφοροποίηση όσον αφορά την ηλικία στην οποία γίνονται ευαίσθητα στην εαρινοποίηση. Ετήσια χειμερινά είδη όπως τα χειμερινά σιτηρά (τα οποία σπέρνονται το φθινόπωρο και ανθίζουν το επόμενο καλοκαίρι) ανταποκρίνονται στις χαμηλές θερμοκρασίες πολύ νωρίς στον κύκλο της ζωής τους. Έτσι μπορούν να εαρινοποιηθούν πριν τη βλάστηση αρκεί οι σπόροι να έχουν απορροφήσει ικανοποιητικά νερό. Τα υπόλοιπα φυτά, μαζί με τα περισσότερα διετή (τα οποία κατά τον πρώτο χρόνο αναπτύσσονται σαν ροζέτες και ανθίζουν το επόμενο καλοκαίρι.) πρέπει να αποκτήσουν ένα ελάχιστο μέγεθος πριν γίνουν ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες της εαρινοποίησης.

Το αποτελεσματικό θερμοκρασιακό εύρος της εαρινοποίησης ξεκινά λίγο κάτω από το σημείο τήξης και φτάνει μέχρι τους 10⁰C, με ένα πιο διαδεδομένο όμως

βέλτιστο μεταξύ 1-7⁰C (Lang, 1965). Το αποτέλεσμα των χαμηλών θερμοκρασιών αυξάνει με τη διάρκεια της εφαρμογής αυτών, μέχρι η ανταπόκριση να ολοκληρωθεί. Αυτή η ανταπόκριση συνήθως απαιτεί κάποιες εβδομάδες έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες αλλά η ακριβής διάρκεια της ποικίλει μεταξύ των ειδών και των ποικιλιών. Τα αποτελέσματα της εαρινοποίησης μπορεί να χαθούν με έκθεση σε συνθήκες από-εαρινοποίησης όπως για παράδειγμα υψηλές θερμοκρασίες, αλλά όμως όσο μεγαλύτερης διάρκειας είναι η έκθεση στις χαμηλές θερμοκρασίες τόσο πιο μόνιμα είναι τα αποτελέσματά τους. Τα αντίθετα αποτελέσματα της από-εαρινοποίησης κατά τη μείωση και της εαρινοποίησης κατά τη μίτωση, μπορεί να σημαίνουν τροποποιήσεις του DNA μέσω της διεργασίας μεθυλίωσης ή απομεθυλίωσης της κυτοσίνης (σαν να αποτελεί αυτή μέρος του μηχανισμού εαρινοποίησης).

Η διεργασία της εαρινοποίησης φαίνεται να λαμβάνει χώρα κυρίως στις μεριστωματικές ζώνες του κορυφαίου βλαστικού μεριστώματος (Thomas and Vince-Prue, 1984). Τοπική ψυχρή μεταχείριση του κορυφαίου βλαστικού μεριστώματος προκάλεσε άνθηση και μάλιστα ανεξάρτητα της θερμοκρασίας του υπόλοιπου φυτού. Επίσης απομονωμένες άκρες της νέας βλάστησης εαρινοποιήθηκαν επιτυχώς και, όπου η εαρινοποίηση των σπόρων είναι εφικτή, κομμάτια εμβρύων τα οποία περιείχαν την βλαστική κορυφή έδειξαν να είναι ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες.

♦ Ο φωτοπεριοδισμός και η εαρινοποίηση μπορεί να αλληλεπιδρούν

Μια απαίτηση για εαρινοποίηση συχνά συνδέεται με μια απαίτηση για συγκεκριμένη φωτοπερίοδο (Napp-Zinn, 1984). Ο πιο κοινός συνδυασμός περιλαμβάνει μια μεταχείριση με χαμηλές θερμοκρασίες η οποία να ακολουθείται από μεγάλες ημέρες. Αυτός είναι ένας συνδυασμός που θα οδηγούσε σε άνθηση νωρίς το καλοκαίρι σε μεγάλα γεωγραφικά πλάτη. Πάντως, πολλοί άλλοι συνδυασμοί έχουν αναφερθεί.

Σε σχέση με τη θέση που καταλαμβάνει η εαρινοποίηση στην αλληλουχία των γεγονότων που οδηγούν στην άνθηση, δύο τύποι αλληλεπίδρασης μεταξύ εαρινοποίησης και αναγκών για μήκος ημέρας παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον:

- Στη διετή μορφή του φυτού *Hyoscyamus niger*, τα νεαρά φυτά μπορούν φωτοπεριοδικά να επαχθούν από μεγάλες ημέρες μόνο αφού έχουν δεχτεί τουλάχιστον επτά ημέρες χαμηλών θερμοκρασιών. Έτσι φαίνεται πως η εαρινοποίηση του κορυφαίου μεριστώματος αποτελεί ένα από τα πρώτα βήματα, σε σχέση με τη φωτοπεριοδική επαγωγή στα φύλλα, στην ακολουθία των γεγονότων που οδηγούν στην άνθηση.
- Στο φυτό *Campanula medium*, μικρές ημέρες μπορούν να υποκαταστήσουν πλήρως την εαρινοποίηση του κορυφαίου μεριστώματος. Σ' αυτή την περίπτωση η εαρινοποίηση και η φωτοπερίοδος φαίνεται πως αποτελούν εναλλακτικά μονοπάτια της άνθησης. Η ικανότητα των μικρών ημερών να υποκαθιστούν την εαρινοποίηση παρουσιάζεται σε αρκετά άλλα είδη, όμως η σχέση μεταξύ των δυο αυτών διεργασιών δεν είναι ακόμη γνωστή.

◆ Εμφάνιση μιας ανάγκης για σύνθεση πρωτεϊνών κατά την εαρινοποίηση

Μένουν ακόμη πολλά να διευκρινιστούν σχετικά με τις μεταβολικές διεργασίες που συνδέονται με την εαρινοποίηση. Τόσο τα σάκχαρα όσο και το οξυγόνο είναι απαραίτητα για τη δράση των χαμηλών θερμοκρασιών. Έτσι φαίνεται απίθανο οι χαμηλές θερμοκρασίες απλά να σταματούν κάποιες μεταβολικές αντιδράσεις που παρεμποδίζουν την άνθηση. Οι ανάγκες για σάκχαρα και οξυγόνο δείχνουν την ενεργοποίηση μιας αερόβιας μεταβολικής αντίδρασης που είναι απαραίτητη για την άνθηση.

Από την άλλη βέβαια πλευρά, οι ρυθμοί των περισσότερων μεταβολικών αντιδράσεων μειώνονται με τη θερμοκρασία, πράγμα που σημαίνει ότι η επαγωγή της άνθησης μέσω χαμηλών θερμοκρασιών είναι πιθανότατα πιο πολύπλοκη από ότι μια απλή ενεργοποίηση ενός μεταβολικού μονοπατιού.

Μια μελέτη πάνω στο χειμερινό σιτάρι (*Triticum aestivum*) έδειξε την εμφάνιση νέων πρωτεϊνών μετά την εαρινοποίηση (Teroaka, 1972). Το πρωτεϊνικό μοντέλο που προέκυψε μετά την εαρινοποίηση είχε μεγάλες ομοιότητες με αυτό του ανοιξιότικου σιταριού το οποίο δεν χρειάζεται εαρινοποίηση για να ανθίσει.

2.2.3 Stress

Οι συνθήκες stress συχνά οδηγούν σε τροποποίηση της ισορροπίας μεταξύ της βλαστικής και της αναπαραγωγικής ανάπτυξης, που περιλαμβάνει άμεση ή έμμεση επίδραση στην άνθηση. Σ' αυτό το σημείο κρίνεται απαραίτητο να δοθεί έμφαση στην όλη στρατηγική που ακολουθεί το φυτό ώστε να αντιμετωπίσει συνθήκες stress.

Μια στρατηγική είναι η ανάπτυξη μηχανισμών για ανοχή των δυσμενών συνθηκών. Παράδειγμα αποτελεί το φυτό *Lycopersicon esculentum* που είναι ευαίσθητο σε χαμηλές θερμοκρασίες και δεν παράγει γύρη στους 10°C ενώ το φυτό *Lycopersicon hirsutum*, ένα άγριο είδος τομάτας από μεγάλα υψόμετρα, δεν ζημιώνεται αναπαραγωγικά στην ίδια θερμοκρασία (Patterson et al., 1987).

Μια άλλη στρατηγική ανοχής είναι οι τροποποιήσεις της ανθικής μορφολογίας (Miller, 1986).

Άλλα είδη αντιμετωπίζουν το stress με διάφορες στρατηγικές αποφυγής οι οποίες, αν και διαφέρουν μεταξύ τους, γενικά βασίζονται στην τοποθέτηση των αναπαραγωγικά ευαίσθητων σταδίων σε περιόδους μειωμένου stress (Chiariello and Gulman, 1991). Έτσι αν δεχτούμε ότι το stress πρέπει πάντοτε να ορίζεται σχετικά με τις βέλτιστες συνθήκες για έναν συγκεκριμένο γενότυπο, τότε μηχανισμοί όπως η εαρινοποίηση μπορούν να θεωρηθούν ως στρατηγικές για αποφυγή του stress.

Υπάρχουν αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία ότι το υδατικό stress μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα με την αναπαραγωγική διαδικασία αλλά είναι όμως λίγες οι εκτενής μελέτες. Σ' ένα παράδειγμα, η αφαίρεση των ριζών, στο φυτό *Chenopodium polysperium*, προώθησε την άνθηση κάτω από μη επαγωγικές συνθήκες, ενώ άμεση εφαρμογή νερού παρεμπόδισε την άνθηση (Sotta, 1978). Ως αντίθεση όμως υπάρχουν πολλά είδη (όπως ο ηλίανθος) στα οποία το υδατικό stress επηρεάζει την άνθηση τους λίγο ως καθόλου.

Επιπρόσθετα των γενικών ανταποκρίσεων στο stress συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια του φυτού παρουσιάζουν ιδιαίτερες ευαισθησίες. Η μεριστωματική διαφοροποίηση, η σπορογέννεση και η γαμετογέννεση είναι ιδιαίτερα ευάλωτες διεργασίες. Το stress σ' αυτά τα στάδια οδηγεί σε αλλαγή του χρόνου άνθησης, σε στειρότητα ή σε αποβολή των ανθικών οργάνων. Αυτές οι άμεσες επιδράσεις μπορούν

να προκύψουν από ένα εύρος συνθηκών stress όπως υδατικό stress, ακτινοβολία UV-B, υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες και ατμοσφαιρική μόλυνση. Έτσι γενικά το stress άλλοτε παίζει αποφασιστικό ρόλο στη διέγερση ή στην παρεμπόδιση της άνθησης, άλλα στις περισσότερες των περιπτώσεων αποτελεί ένα τροποποιητικό στοιχείο, που ασκεί μια ποσοτική επιρροή πάνω στα στάδια της ανθικής έναρξης και ανάπτυξης διαφοροποιώντας τα αναμενόμενα συστατικά.

Παρόμοια συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν για τη σημαντικότητα της θρέψης. Σε κάποια είδη η διαθεσιμότητα του αζώτου είναι στενά συνδεδεμένη με την ανθική ανταπόκριση αλλά αυτό δεν συμβαίνει στην πλειοψηφία των ειδών. Τα ιχνοστοιχεία, ιδιαίτερα ο χαλκός και ο σίδηρος, παίζουν κάποιο ρόλο στην επαγωγή, όπως φαίνεται από τις αντιδράσεις των φυτών *Lemna* και *Chrysanthemum* (Bernier et al., 1981), παρόλο που ο μηχανισμός ή η θέση της δράσης τους παραμένει άγνωστη.

3. Μηχανισμοί μεταγωγής σημάτων

α) Γενικά

Πολλά στάδια της ανθικής διαδικασίας προκύπτουν ως αντίδραση σε εξωτερικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα και σε σήματα που μεταφέρονται από ένα μέρος του φυτού σε κάποιο άλλο. Εδώ υπογραμμίζονται οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους τέτοια σήματα εκπέμπονται μέσα ή μεταξύ κυττάρων και οργάνων καθώς και οι μοριακές αλλαγές που μπορεί να προκύπτουν.

Τα φυτά ως στατικοί οργανισμοί πρέπει να είναι σε θέση να προσαρμόζονται και να ανταποκρίνονται σε περιβαλλοντικές παραμέτρους συμπεριλαμβανομένου του φωτός, της θερμοκρασίας, των θρεπτικών στοιχείων κ.λ.π. Λόγω της απουσίας ενός κεντρικού, συντονιστικού νευρικού συστήματος τα μεμονωμένα μέρη του φυτού συναγωνίζονται για τις διαθέσιμες πηγές και ανταποκρίνονται χωριστά στα διάφορα ερεθίσματα. Αντιθέτως μπορούν να διακριθούν τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές (Blowers and Trewavas, 1989): i) Το περιβάλλον γύρω από το φυτό

ii) Οι μεσοκυττάριοι χώροι

iii) Ο όγκος εντός της πλασματικής μεμβράνης.

Πιο συγκεκριμένα σ' αυτή την παράγραφο θα αναφερθούμε σε μερικά βιοχημικά στάδια που μπορεί να προκύψουν ως συνέπεια της λήψης ενός σήματος και μπορεί να οδηγούν σε επιδράσεις της γονιδιακής έκφρασης, ενεργοποίηση ενζύμων κ.λ.π. Οι αντιδράσεις θα χωριστούν σε βραχείας περιόδου διεγέρσεις και μακράς περιόδου αναπτυξιακές αντιδράσεις. Και οι δύο τύποι μπορούν να εντοπιστούν σε λειτουργίες που σχετίζονται με την άνθηση.

β) Κυτταρική επικοινωνία στα φυτά

Στα φυτά, όπως και στα ζώα, τα εξωτερικά σήματα απαιτούν μεταγωγή και ενίσχυση. Επιπλέον η δράση τους πάνω στα φυτά είναι πιο άμεση από ότι στα ζώα και μπορούν έτσι να θεωρηθούν ως τα κύρια στοιχεία ενός μονοπατιού σημάτων.

Παρόλα αυτά δεν είναι ακόμη κατανοητό πως λαμβάνονται τα περισσότερα των εξωτερικών σημάτων και ποια είναι η φύση της διεργασίας ζεύξης/μεταγωγής που οδηγεί στην τελική αντίδραση, ιδιαίτερα όταν το ερέθισμα απαιτείται να είναι παρόν για μεγάλο χρονικό διάστημα ουτοσώστε να διεγερθεί μια αντίδραση.

γ) Πιθανά συστατικά μεταγωγικών μονοπατιών στα φυτά

Ασβέστιο

Υπάρχουν ουσιαστικά στοιχεία που δείχνουν ότι το ασβέστιο εμπλέκεται σ' έναν αριθμό παρατηρήσιμων φυσιολογικών διεργασιών των φυτών (όπως η κυτταροδιαίρεση), είναι απαραίτητο για κάποιες άλλες (όπως ενεργοποίηση ενζύμων, βλάστηση) (Helper and Wayne, 1985), και συχνά αποτελεί τον τελεστή για το φωτεινό ερέθισμα και για τις αυξητικές ουσίες των φυτών.

Μελέτες έγιναν χρησιμοποιώντας φορείς ιόντων ασβεστίου καθώς και ουσίες όπως verapamil και nifedepine που φράσσουν κανάλια ασβεστίου. Αυτές εμπόδισαν την κίνηση κάποιων φυλλαρίων της *Cassia Fasiculata* άλλα δεν είχαν αποτέλεσμα σε κινήσεις που προκαλούνται από μπλε φως (Roblin et al., 1990). Στο φυτό *Albizzia* μια εξωτερική παροχή ασβεστίου ή φορέων ιόντων ασβεστίου εξομοίωσε το κλείσιμο των φυλλαρίων που προκαλείτε από κόκκινο φως.

Τελευταία εφαρμόζονται τεχνικές για την άμεση μέτρηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Gilroy et al., 1986, Bush and Jones, 1987, Mc Ainsh et al., 1990). Βάση αυτών έχει δειχθεί ότι η εφαρμογή αμπισισικού οξέως (ABA) σε απομονωμένα καταφρακτικά κύτταρα αυξάνει την εσωτερική συγκέντρωση ασβεστίου και μάλιστα

αυτή προηγείται του κλεισίματος των στομάτων (Mc Ainsh et al., 1990). Επίσης ABA εφαρμοζόμενο σε κομμάτι κολεοπτύλης αύξησε την συγκέντρωση ενδοκυτταρικού ασβεστίου και επιπλέον ανύψωσε το pH ενώ το 2,4D αύξησε το ασβέστιο άλλα προκάλεσε μείωση του pH (Gehring et al., 1990a).

Είναι όμως ακόμη ασαφές αν οι αυξήσεις του ενδοκυτταρικού ασβεστίου οφείλονται στο άνοιγμα των καναλιών ασβεστίου ή λόγω ελευθέρωσής του από εσωτερικά αποθέματα. Στα φυτά τα κενοτόπια περιέχουν τα μεγαλύτερα αποθέματα. Έχει επίσης δειχθεί ότι το ασβέστιο ελευθερώνεται από τα κενοτόπια με την ουσία IP₃ (inositol trisphosphate) (Alexandre et al., 1990).

Πρωτεΐνες - κινάσες

Αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου συνεπάγεται μια ακολουθία βημάτων που μπορεί να περιλαμβάνουν ενεργοποίηση καλμοδουλίνης και πρωτεϊνών κινασών. Το ασβέστιο πάντως ρυθμίζει απ' ευθείας την κίνηση των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση και αυτό προκύπτει μέσω της ενεργοποίησης ενός αριθμού διαφορετικών τελεστών που προσδένονται με αυτό.

Ουσίες αύξησης

Το πως κάποιο ερέθισμα ή κάποια αλλαγή στις συνθήκες μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή στην αυξίνη ή σε άλλες αυξητικές ουσίες δεν είναι ακόμη γνωστό. Ίσως είναι απαραίτητη η απομόνωση των γονιδίων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση αυξίνης. Αυτό, για παράδειγμα, θα καθιστούσε δυνατό να καθοριστεί αν συγκεκριμένες καταστάσεις προκαλούν αλλαγές στα επίπεδα αυξίνης επηρεάζοντας την βιοσύνθεση της ή αν έκφραση κάποιων συγκεκριμένων ρυθμιστικών γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ουσιών που με την σειρά τους ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται είτε στο μεταβολισμό είτε στη βιοσύνθεση της αυξίνης.

pH

Άλλος μηχανισμός που μπορεί να αποτελεί το πρώτο βήμα της μεταγωγής σήματος είναι αλλαγές του κυτοσολικού pH ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης, για παράδειγμα, H⁺-ATP_{ase} της πλασματικής μεμβράνης. Ανεξάρτητα πάντως του ερεθίσματος, η οποιαδήποτε αλλαγή στο pH έχει τη δυνατότητα να επηρεάζει ένα μεγάλο εύρος ενζύμων.

Εφόσον το pH δεν είναι αρκετά εξειδικευμένο ώστε να ληφθεί ως σήμα, καθ' ότι και οι διάφορες μεταβολικές δραστηριότητες είναι σε θέση να προκαλούν κάποιες αλλαγές του pH, μπορεί να δρα συνεργιστικά με άλλους παράγοντες όπως π.χ. το ασβέστιο.

c-AMP

Αν και η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσύνη (c-AMP) έχει ανιχνευθεί στα φυτά δεν υπάρχουν αναφορές για μια c-AMP εξαρτώμενη πρωτεΐνη κινάση. Πάντως η c-AMP μπορεί να ενεργεί με διαφορετικούς τρόπους όπως πρόσδεση με το DNA και όπως πρόσφατες μελέτες δείχνουν ίσως να εμπλέκεται σε σχετικά γρήγορες αντιδράσεις, όπως το άνοιγμα των φυλλαρίων της *Cassia Fasiculata* (Roblin et al., 1990) με επαγωγή πάνω σε μπλε φως και άνοιγμα στομάτων της *Vicia faba* (Curvetto and Delmastro, 1990).

4. Η άνθηση ως αποτέλεσμα της γονιδιακής δράσης

Η γνώση του γενετικού ελέγχου της άνθησης δεν είναι εκτενής και μόνο μερικά είδη έχουν μελετηθεί λεπτομερώς. Μάλιστα επειδή η παραλλακτικότητα του χρόνου άνθησης ενδιαφέρει κατά κύριο λόγο τη σποροπαραγωγή, ο κύριος όγκος των μελετών έχει επικεντρωθεί στα φυτά μεγάλης καλλιέργειας (σιτάρι, μπιζέλι). Σ' αυτή την ενότητα λοιπόν γίνεται μια παρουσίαση γενικών συμπερασμάτων από τις μέχρι σήμερα έρευνες.

4.1 Ανθικά μοντέλα

Δύο κύρια σημεία προβάλλουν καθαρά από αυτές τις γενετικές μελέτες. Πρώτον υπάρχουν σαφείς ενδείξεις που οδηγούν στην αποδοχή ενός ανθικού παρεμποδιστή που έχει κρίσιμο και ίσως ρυθμιστικό ρόλο κατά την ανθική διεργασία. Δεύτερον διαφαίνεται πως τόσο στο σιτάρι όσο και στο φυτό *Arabidopsis* υπάρχουν γονίδια που επηρεάζουν την άνθηση και δρουν ανεξάρτητα από τις κύριες περιβαλλοντικές μεταβλητές που είναι το μήκος της ημέρας και η θερμοκρασία.

Χρησιμοποιώντας αυτά τα δύο σημεία ως βάση το απλούστερο ανθικό μοντέλο είναι αυτό που περιλαμβάνει ένα κεντρικό ανθικό μονοπάτι που ρυθμίζεται από έναν

αριθμό γονιδίων τα οποία κυρίως δρουν χωρίς την άμεση επίδραση του περιβάλλοντος. Γονίδια που δεν λαμβάνουν μέρος σ' αυτό το μονοπάτι, παράγουν παρεμποδιστές που είτε καταστέλλουν τη δράση γονιδίων εντός του μονοπατιού είτε αλληλεπιδρούν με τα προϊόντα των τελευταίων. Με τη σειρά τους αυτά τα παρεμποδιστικά γονίδια μπορεί να ελέγχονται από άλλα παρεμποδιστικά ή κατασταλτικά γονίδια και/ή από περιβαλλοντικές παραμέτρους όπως φωτοπερίοδος ή θερμοκρασία.

Η ύπαρξη όμως ενός κεντρικού ανθικού μονοπατιού θα έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία άνθησης στην περίπτωση εμφάνισης μη λειτουργικών μεταλλάξεων σε γονίδια που βρίσκονται μέσα στο μονοπάτι. Εναλλακτικά, πολλαπλά μονοπάτια ή πολλαπλά αντίγραφα γονιδίων μπορεί να εμπλέκονται στην άνθηση έτσι ώστε να προλαμβάνονται περιπτώσεις μη λειτουργικών μεταλλάξεων εντός του μονοπατιού.

4.2 Αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση

Η ρύθμιση της ανθικής μετάβασης προκύπτει με δύο μεταβάσεις κλειδιά που είναι η ανθική επαγωγή και η ανθική πρόκληση. Από αυτές η ανθική επαγωγή αναφέρεται στο σύνολο των διεργασιών που συμβαίνουν στα φύλλα και έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή και μεταβίβαση ενός ανθικού ερεθίσματος, ενώ η ανθική πρόκληση αναφέρεται στο σύνολο των διεργασιών που συμβαίνουν στα κορυφαία μεριστώματα των οφθαλμών ως αποτέλεσμα της λήψης του μεταβιβαζόμενου ερεθίσματος (Evans, 1971). Έτσι οι διαδικασίες της ανθικής επαγωγής και πρόκλησης διαχωρίζονται τόσο χρονικά όσο και προσορινά.

4.2.1 Γονιδιακή έκφραση σχετιζόμενη με την ανθική επαγωγή

Οι βιοχημικές διεργασίες που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή του ανθικού ερεθίσματος, μπορούν να ρυθμιστούν είτε στο επίπεδο της γονιδιακής μεταγραφής είτε από ένα εύρος μετα-μεταγραφικών διεργασιών που περιλαμβάνουν επεξεργασία ή σταθεροποίηση mRNA, έναρξη ή επιμήκυνση της μεταγραφής ή μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις. Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναδείξει, άμεσα ή έμμεσα, την συνεισφορά των αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση όσον αφορά τη μεταγραφή του

λαμβανόμενου από το φυτόχρωμα μήκους ημέρας προς την παραγωγή του ανθικού ερεθίσματος.

Οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση συναντώνται στα παρακάτω επίπεδα:

♦ Αλλαγές στην πρωτεϊνική σύνθεση

Από πειράματα πάνω σε διάφορα όργανα του φυτού *Pharbitis nil* (Marushige and Marushige 1962b) βρέθηκαν σαφείς διαφορές στη σύνθεση πρωτεϊνών μεταξύ φύλλων και λουλουδιών και μεταξύ βλαστικών και αναπαραγωγικών κορυφαίων μεριστωμάτων.

Άλλες μελέτες που εξέτασαν την πρωτεϊνική σύνθεση στο φυτό *Impatiens*, αναφέρουν μια αύξηση του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου στα φύλλα όπως και την παρουσία στο στέλεχος ενός νέου πολυπεπτιδίου μετά από έναν φωτοεπαγωγικό κύκλο (Sawhney et al, 1976).

♦ Αλλαγές στην σύνθεση του mRNA

Οι Yoshida et al. (1967) εξέτασαν το περιεχόμενο RNA σε επαγμένες και μη επαγμένες κοτυληδόνες του φυτού *Pharbitis nil*, όπου βρήκαν το περιεχόμενο άθροισμα σε G και C κλασμάτων RNA να μειώνεται κατά την ανθική επαγωγή.

Ο Warm (1984) ανέφερε αλλαγές στην σύνθεση του mRNA που ακολουθούν την ανθική επαγωγή του φυτού μεγάλης ημέρας *Hyoscyamus niger*.

4.2.2 Γονιδιακή έκφραση σχετιζόμενη με την ανθική πρόκληση

Ο ρόλος των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης είναι σημαντικός και κατά τη διεργασία της ανθικής πρόκλησης. Αυτό διαφαίνεται στα παρακάτω επίπεδα:

♦ Ιστοχημικές μελέτες στο ακραίο βλαστικό μερίστωμα

Κυττολογικές και ιστοχημικές μελέτες βλαστικών και αναπαραγωγικών μεριστωμάτων έχουν δώσει στοιχεία που προβάλλουν μια αύξηση της βιοσύνθεσης νουκλεϊνικών οξέων κατά την φωτοπεριοδική ανθική επαγωγή.

Οι ανατομικές και κυττολογικές αλλαγές που συνοδεύουν τη μετάβαση προς την άνθηση, μελετήθηκαν για τρία μικρής ημέρας είδη: *Pharbitis nil*, *Xanthium strumarium* και *Chenopodium rubrum* (Gifford, 1963). Σ' αυτά τα είδη που διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους, παρατηρήθηκε αύξηση της μιτοτικής δραστηριότητας καθώς

επίσης αύξηση της συγκέντρωσης RNA και πρωτεϊνών κατά τη φωτοπεριοδική ανθική επαγωγή.

Μια πρόσφατη έρευνα που συνδύασε ιστοχημικές αναλύσεις και αυτοραδιογραφία της ^3H -ουριδίνης που συσσωματώνεται στο RNA, με σκοπό να εξετασθεί η μετάβαση στην άνθηση του κορυφαίου μεριστώματος στο φυτό *Pharbitis nil* (Bonner et al., 1991). Αυτή η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση της σύνθεσης RNA στο πλευρικό μερίστωμα, που πιθανώς περιλαμβάνει αλλαγές στη συσσώρευση συγκεκριμένου mRNA, ήταν ένα από τα πρώτα γεγονότα της ανθικής πρόκλησης που ξεκινούσε 16-20 ώρες μετά την έναρξη της επαγωγικής σκοτεινής περιόδου.

- Αλλαγές στην πρωτεϊνική σύνθεση

Μια μελέτη που εξέτασε τις πρώιμα συντιθέμενες πρωτεΐνες στο κορυφαίο μερίστωμα του φυτού *Sinapis alba* (Lyndon et al., 1983) έδειξε αλλαγές στην πολυπεπτιδική σύνθεση μετά περίπου 50 ώρες από μια επαγωγική μεταχείριση μακριάς ημέρας. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η άνθηση στο κορυφαίο μερίστωμα περιλαμβάνει αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση.

- Αλλαγές στην σύνθεση του mRNA

Μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε το φυτό μεγάλης ημέρας *Sinapis alba*, αναφέρουν μια αύξηση της σύνθεσης RNA στο κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα κατά τη διάρκεια της μετάβασης προς την άνθηση (Bronchart et al., 1970).

4.3 Τωρινές και μελλοντικές προοπτικές

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος όσον αφορά την κατανόηση των μοριακών συμβάντων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ανθικής μορφογένεσης. Αυτό οφείλεται στην εφαρμογή πολύπλοκων τεχνικών μοριακής γενετικής. Χρησιμοποιώντας δε αυτές τις μεθόδους έχει απομονωθεί ένας αριθμός ομοιοτικών γονιδίων που ρυθμίζουν την ανθική μετάβαση και την οργανογένεση.

Τα ομοιοτικά γονίδια έχουν απομονωθεί από έναν αριθμό ειδών, σε μερικά από τα οποία παρουσιάζουν μια εμφανή εξελικτική ποικιλότητα και αυτό σημαίνει ότι παίζουν ένα κύριο ρόλο στον έλεγχο της ανθικής ανάπτυξης. Πιστεύεται ότι τα ομοιοτικά γονίδια παράγουν μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν τη γονιδιακή

έκφραση και φαίνεται πως υπάρχουν τόσο ποικίλες αλληλεπιδράσεις όσο και ιεραρχικός έλεγχος μεταξύ των προϊόντων τους.

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Φυτικό υλικό - Σπανάκι

Το σπανάκι απαντά μόνο καλλιεργούμενο, δεν έχει βρεθεί αυτοφυές. Πιθανόν να κατάγεται από χώρες της κεντρικής και ανατολικής Ασίας και (κατά τον De Candolle) να προήλθε από το *Spinacia tetrandra*, είδος το οποίο αυτοφύεται στην περιοχή αυτή της Ασίας. Στην Ευρώπη εισήχθη κατά των 15^ο αιώνα.

Ταξινόμηση - Περιγραφή του φυτού

Το σπανάκι - *Spinacia oleracea* - ανήκει στην οικογένεια *Chenopodiaceae* και έχει $2n=12$ ή $4n=24$ χρωμοσώματα. Αποτελεί φυτό ψυχρής εποχής, ετήσιο, ποώδες και χρησιμοποιείται ως λαχανικό. Είναι ανθεκτικό στον παγετό και έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 15-18 °C και όχι μεγαλύτερη των 24 °C.

Ο βλαστός του είναι σαρκώδης και τα φύλλα του σαρκώδη, απλά, μεγάλα, σχεδόν παράρριζα. Φύονται κατ'εναλλαγή και έχουν επιφάνεια επίπεδη ή κυματοειδής ανάλογα με την ποικιλία ενώ περιέχουν περίπου 93 % νερό, 2 % πρωτεΐνες και 3 % υδατάνθρακες..

Το φυτό έχει αβαθές ριζικό σύστημα με τον κύριο όγκο του σε βάθος 45-60 cm. Στον αυχένα σχηματίζεται αρχικά ένας μικρός βλαστός με φύλλα, που στηρίζονται στο έδαφος, και έπειτα αναπτύσσεται ο βλαστός.

Το σπανάκι είναι κατά κανόνα δίοικο, αλλά υπάρχουν και φυτά με άνθη ερμαφρόδιτα ή και μονόοικα δίκλινα. Το φύλο των φυτών αναγνωρίζεται μετά την έκπτυξη του ανθικού στελέχους, το οποίο εμφανίζεται κάτω από συνθήκες μακράς φωτοπεριόδου και αποκτά ύψος ενός περίπου μέτρου.

Τα άνθη είναι ανεμόφιλα, μικρά, αφανή, ακτινόμορφα, πρασινωπά, μονογλαμυδικά και στερούνται στεφάνης. Φέρονται πάνω σε ταξιανθίες μασχαλιαίες ή επάκριες τα άρρενα. Τα καθαρά αρσενικά φυτά σχηματίζουν, πάνω στο ψηλότερο τμήμα των ανθικών τους στελεχών, φύλλα συνήθως μικρά, ενώ τα θηλυκά ή αρσενικοθήλυκα φέρουν μέχρι και την άκρη των στελεχών φύλλα πλήρως ανεπτυγμένα.

Σε κάθε ανθικό κλάδο η άνθηση γίνεται διαδοχικά και γενικά τα αρσενικά φυτά ανθίζουν πριν από τα θηλυκά, ενώ όταν συμπληρώσουν την άνθηση τους ξηραίνονται.

Των θηλυκών φυτών τα άνθη διατηρούνται επιδεικτικά επικονιάσεως για αρκετές ημέρες.

Τα αρρενα άνθη έχουν 4-5 σέπαλα και 4-5 στήμονες, τα δε θήλεα έχουν περιάνθιο κυπελλοειδές με 2-5 δόντια και 4 στύλους οι οποίοι συμφύονται στη βάση τους. Η ωοθήκη είναι επιφυής, μονόχωρη και περιέχει μια καμπυλότροπη σπερμοβλάστη.

Κάθε άνθος γονιμοποιούμενο δίνει ένα σπέρμα που περικλείεται από στοιχεία του κάλυκα και φέρει περιφερειακά ένα σπειροειδές έμβρυο, το οποίο περιβάλλει το ενδοσπέρμιο.

Ο καρπός (ή σπόρος) είναι κάρυο, σκληρός, σφαιροειδής ή με ανώμαλη επιφάνεια, με ή χωρίς αγκάθια ανάλογα με την ποικιλία. Βάση του τελευταίου χαρακτηριστικού διακρίνεται το σπανάκι στις παρακάτω βοτανικές ποικιλίες:

α) *S. ol.* Var *tirica* με καρπό ακανθώδη.

β) *S. ol.* Var *glabra* με καρπό χωρίς αγκάθια.

2. Μέθοδοι

Διαδικασία απομόνωσης ολικού DNA

Τα επόμενα έξι στάδια περιγράφουν έναν από τους δύο εναλλακτικούς τρόπους ενάρξεως της διαδικασίας απομόνωσης.

1) Παίρνουμε 15 gr φυτικού ιστού τα οποία τα τοποθετούμε σε συσκευή blender (φωτογραφία 4) μαζί με 150 ml buffer απομόνωσης. Ομογενοποιούμε το δείγμα ενεργοποιώντας την συσκευή τέσσερις διαδοχικές φορές διάρκειας πέντε δευτερολέπτων.

Το buffer απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκε στον πρώτο τρόπο της παρούσας διαδικασίας είναι όμοιο με αυτό που σε άλλο σημείο αναφέρετε ως buffer απομόνωσης μιτοχονδρίων και χλωροπλαστών. Σκοπός αυτής της ενέργειας είναι μέσα από τη διαδικασία απομόνωσης ολικού DNA να συλλέξουμε παράλληλα και τα παραπάνω οργανίδια για μελλοντική χρήση τους.

Έτσι το buffer απομόνωσης περιέχει 50 mM Tris το οποίο ρυθμίζει το pH του διαλύματος στο 7,5, 10 mM EDTA που δεσμεύει δισθενή κατιόντα αδρανοποιώντας εμμέσως τις DNAσες, 300 mM Μαννιτόλη η οποία διατηρεί άθικτα μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες κάνοντας το διάλυμα ισοοσμωτικό με το εσωτερικό των οργανιδίων, 0,2 % $\frac{w}{v}$ PVP-40 που δεσμεύει φαινολικές ουσίες οι οποίες αντιδρούν με το DNA και 20 mM Β-μερκαπταιθανόλη για να διατηρηθεί το περιβάλλον αναγωγικό ώστε να αποτρέπονται οξειδώσεις.

2) Διηθούμε το δείγμα δια μέσω συρμάτινου πλέγματος (φωτογραφία 4) για τη απομάκρυνση μη ομογενοποιημένων ιστών και τοποθετούμε σε φυγοκεντρικό σωλήνα (φωτογραφία 5) κατάλληλη για το ρότορα A 6,14 (φωτογραφία 6). Ο τελευταίος έχει μέγιστη ακτίνα $R_{\max}=14$ cm στην οποία αναφέρονται εκτιμήσεις και ρυθμίσεις που γίνονται παρακάτω.

3) Ρυθμίζουμε τη διάταξη της φωτογραφίας 7 (τύπος CENTRIKON T-124 εταιρίας KONTRON instruments) στις 1000 στροφές / λεπτό, τη θερμοκρασία στους 4 °C και το διορθωτικό συντελεστή compensation στο 5. Το τελευταίο προκύπτει βάση σχεδιαγράμματος με γνώμονα τη θερμοκρασία και τις στροφές / λεπτό.

Θέτουμε τελευταίο το χρονοδιακόπτη στα 10 λεπτά και αρχίζουμε τη φυγοκέντρωση. Κατά τη διάρκεια λειτουργίας της διάταξης επιτυγχάνεται καθίζηση του αμύλου, των πυρήνων και των άθικτων κυττάρων.

4) Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα. Ρυθμίζουμε τη διάταξη στις 5000 στροφές / λεπτό, το διορθωτικό συντελεστή compensation στο 3,5 και το χρονοδιακόπτη στα 10 λεπτά. Αρχίζουμε την φυγοκέντρωση.

Κατά τη διάρκεια λειτουργίας της διάταξης επιτυγχάνεται πλέον μέγιστη επιτάχυνση 4000 g, που αντιστοιχεί στην R_{max} ρότορα, η οποία προκαλεί καθίζηση των χλωροπλαστών.

5) Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα και επαναιωρούμε το ίζημα των χλωροπλαστών με 1 ml TE buffer pH 8 που περιέχει 10mM Tris, 1mM EDTA ενώ στην συνέχεια το αποθηκεύουμε στους -20 °C.

Ρυθμίζουμε τη διάταξη στις 9000 στροφές / λεπτό, το διορθωτικό συντελεστή compensation στο 0,5 και το χρονοδιακόπτη στα 10 λεπτά για να αρχίσουμε τη φυγοκέντρωση.

Τώρα επιτυγχάνοντας μέγιστη επιτάχυνση 15000 g προκαλούμε την καθίζηση των μιτοχονδρίων.

6) Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέα φυγοκεντρικό σωλήνα και επαναιωρούμε το ίζημα των μιτοχονδρίων με 1 ml TE buffer pH=8 ενώ στην συνέχεια το αποθηκεύουμε στους -20 °C.

Ακολουθούν δύο στάδια που περιγράφουν τον δεύτερο εναλλακτικό τρόπο ενάρξεως της διαδικασίας απομόνωσης. Στο τέλος και αυτών οι ακολουθίες των μεταχειρίσεων συγκλίνουν.

Παίρνουμε 25 gr φυτικού ιστού τα οποία τοποθετούμε σε συσκευή blender μαζί με 110 ml buffer απομόνωσης ολικού DNA που διαφέρει από το buffer απομόνωσης οργανιδίων στο ότι δεν περιέχει Μαννιτόλη και δεν περιέχει PVP-40, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του είναι 100 mM Tris, 10 mM EDTA και 50 mM Β- Μερκαπταιθανόλη. Ομογενοποιούμε το δείγμα ενεργοποιώντας τη συσκευή τέσσερις διαδοχικές φορές διάρκειας πέντε δευτερολέπτων.

2) Διηθούμε το δείγμα δια μέσω συρμάτινου πλέγματος για την απομάκρυνση μη ομογενοποιημένων ιστών και τοποθετούμε σε φυγοκεντρικό σωλήνα κατάλληλη για το ρότορα A 6,14.

1) προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου και εκχυλίζουμε με ανάδευση. Το χλωροφόρμιο θα απομακρύνει λιπίδια, χρωστικές και μερικές πρωτεΐνες σπάζοντας τις μεμβράνες.

Φυγοκεντρούμε στις 9000 στροφές / λεπτό, για 10 λεπτά στους 4⁰C

Αυτές οι ρυθμίσεις είχαν προκύψει και από το στάδιο 5 του πρώτου τρόπου ενώ η τιμή της θερμοκρασίας διατηρήθηκε πάντοτε σταθερή.

Επιτυγχάνοντας λοιπόν τιμή μέγιστης επιτάχυνσης ίση με 15000g διαχωρίζουμε τις δύο φάσεις. Η κατώτερη (χλωροφόρμιο) περιέχει λιπίδια, χρωστικές και πρωτεΐνες ενώ για το δεύτερο επιπλέον καθίζηση αμύλου, άθικτων κυττάρων, πυρήνων, χλωροπλαστών και μιτοχονδρίων.

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης έχει επέλθει διαχωρισμός των δύο φάσεων με την υποκείμενη να περιέχει το χλωροφόρμιο και τα καθιζάνοντα συστατικά και την υπερκείμενη την υδατική φάση με το εν διαλύσει DNA. Μεταξύ των δύο φάσεων σχηματίζεται μια πρωτεϊνική στοιβάδα.

3) Συλλέγουμε προσεκτικά το υπερκείμενο σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα στην οποία τοποθετούμε 0,5 gr DEAE Cellulose για να δεσμεύσει το DNA. Ανακινούμε για το σκοπό αυτό πάνω στη συσκευή της φωτογραφίας 12 και για χρόνο 10 λεπτών.

- 4) Στην συνέχεια υπάρχουν δύο επιλογές:
- i) Φυγοκεντρούμε στις 8500 στροφές / λεπτό (13500g) για 5 λεπτά με σκοπό να καθιζήσει ως ίζημα η DEAE Cellulose. Χύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα και επαναιωρούμε το ίζημα με 0,5 ml TE buffer pH=8. Μεταφέρουμε το δείγμα σε σωλήνα μικροφυγόκεντρο (φωτογραφία 5) και πληρώνουμε με το προηγούμενο buffer.
 - ii) Φιλτράρουμε το διάλυμα δια μέσω διηθητικού χαρτιού (φωτογραφία 3), αποξύνουμε το εναπόθεμα με μια μικρή σπάτουλα και το τοποθετούμε σε σωλήνα μικροφυγόκεντρο. Φυγοκεντρούμε στη μικροφυγόκεντρο (φωτογραφία 9) στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 5 λεπτά, πετούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα της DEAE Cellulose με την προσθήκη TE buffer pH=8 μέχρι πλήρωσης. Για την προσθήκη μικρών όγκων διαλυμάτων χρησιμοποιούμε τις μικροπιπέτες της φωτογραφίας 8.
- 5) Προσθέτουμε 10 μl stock 50 μgr / μl RNAσης και αφήνουμε για χρονικό διάστημα 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την καταστροφή του RNA.
- 6) Φυγοκεντρούμε στους 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 5 λεπτά και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- 7) Ακολουθούν έξι επαναλαμβανόμενες πλύσεις με TE buffer που περιέχει σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl. Αρχικά προσθέτουμε 34 μl 5 M NaCl και TE buffer pH=8 μέχρι πλήρωσης όπου επιτυγχάνουμε τελική συγκέντρωση NaCl ίση με 100 mM. Επαναιωρούμε το ίζημα και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 14000 στροφές / λεπτό (14000g) για 5 λεπτά. Κρατάμε το υπερκείμενο σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και προχωρούμε στους λοιπούς πέντε κύκλους χρησιμοποιώντας πάντα το ίδιο ίζημα. Έτσι συνεχίζουμε με 68 μl, 136 μl, 204 μl, 272 μl και 340 μl από 5 M NaCl πληρώνοντας με TE buffer pH=8 όπου

επιτυγχάνουμε αντίστοιχες τελικές συγκεντρώσεις NaCl ίσες με 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM και 1000 mM.

Λαμβάνουμε λοιπόν έξι μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες που ο κάθε ένας τους περιέχει το υπερκείμενο διάλυμα που προκύπτει μετά από κάθε φυγοκέντρηση και φέρει σήμανση με την αντίστοιχη τελική συγκέντρωση NaCl.

Η αύξηση της συγκέντρωσης NaCl έχει σκοπό την σταδιακή αποδέσμευση ουσιών από την DEAE Cellulose. Προχωρούμε σε ίδιες μεταχειρίσεις για κάθε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα.

8) Σε καθ' ένα προσθέτουμε ίσο όγκο κρύας ισοπροπανόλης ή κρύα αιθανόλη μέχρι πλήρωσης και αφήνουμε για 30 λεπτά στους -20°C .

Κάτω από αυτές τις συνθήκες όξινου pH, χαμηλής θερμοκρασίας και αυξημένης συγκέντρωσης αλάτων το DNA βγαίνει από το διάλυμα. Χάνει δηλαδή το αρνητικό του φορτίο επειδή οι υδροξύλ-ομάδες του δεν είναι πλέον, λόγω του pH, ιονισμένες και το DNA συσσωματώνεται σε μεγαλύτερα σωματίδια.

9) Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 15 λεπτά όπου το DNA καθιζάνει ως ίζημα. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αναποδογυρίζουμε τους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες πάνω σε χαρτί για να στεγνώσουν.

10) Πλένουμε με μικρή ποσότητα κρύας αιθανόλης ή καθαρού οινόπνευματος, περιστρέφοντας πλάγια τους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες 4 φορές και τους ξαναγυρίζουμε ανάποδα πάνω σε χαρτί για να στεγνώσουν. Έτσι απομακρύνεται και εναπομένει νερό.

11) Επαναιωρούμε το DNA με 100 μl 0,5 X TBE πλένοντας ταυτόχρονα και τα γύρω τοιχώματα για να συγκεντρώσουμε τυχόν εκεί εβρισκόμενο υλικό.

Το 0,5 X TBE προκύπτει από 20 μέρη H_2O και 1 μέρος 10 X TBE που περιέχει 200 mM Tris, 200 mM Βορικό οξύ και 20 mM EDTA.

12) Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης κορεσμένη με 1 M Tris buffer και φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 10 λεπτά.

Επέρχεται διαχωρισμός των δύο φάσεων με την υποκείμενη να περιλαμβάνει τη φαινόλη και την RNAση και την υπερκείμενη το υδατικό διάλυμα με το DNA.

13) Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και εφαρμόζουμε ακόμη μια καθίζηση του DNA με προσθήκη ίσου όγκου κρύας ισοπροπανόλης ή κρύα αιθανόλη μέχρι πλήρωσης. Τοποθετούμε για 30 λεπτά στους -20°C .

14) Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 10 λεπτά. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και πλένουμε με κρύα αιθανόλη ή καθαρό οινόπνευμα. Αναποδογυρίζουμε τους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες σε χαρτί για να στεγνώσουν.

15) Επαναιωρούμε το DNA με 50 μl TE buffer $\text{pH}=8$ και αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -20°C μέχρι περαιτέρω χρησιμοποίησής τους.

Διαδικασία απομόνωσης μιτοχονδριακού και γλωροπλαστικού DNA/RNA

1) Παίρνουμε 15 gr φυτικού ιστού τα οποία τοποθετούμε σε συσκευή blender (φωτογραφία 4) μαζί με 150 ml buffer απομόνωσης. Ομογενοποιούμε το δείγμα ενεργοποιώντας τη συσκευή τέσσερις διαδοχικές φορές διάρκειας πέντε δευτερολέπτων.

Το buffer απομόνωσης περιέχει 50 mM Tris το οποίο ρυθμίζει το pH του διαλύματος στο 7,5, 10 mM EDTA που δεσμεύει δισθενή κατιόντα αδρανοποιώντας εμέσως τις DNAσες, 300 mM Μαννιτόλη η οποία διατηρεί άθικτα μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες κάνοντας το διάλυμα ισοοσμωτικό με το εσωτερικό των οργανιδίων, 0,2 % w/v PVP-40 που δεσμεύει φαινολικές ουσίες οι οποίες αντιδρούν με το DNA

και 20 mM Β-μερκαπταιθανόλη για να διατηρηθεί το περιβάλλον αναγωγικό ώστε να αποτρέπονται οξειδώσεις.

2) Διηθούμε το δείγμα δια μέσω συρμάτινου πλέγματος (φωτογραφία 4) για την απομάκρυνση μη ομογενοποιημένων ιστών και τοποθετούμε σε φυγοκεντρικό σωλήνα (φωτογραφία 5) κατάλληλη για το ρότορα A 6,14 (φωτογραφία 6). Ο τελευταίος έχει μέγιστη ακτίνα $R_{max}=14$ cm στην οποία αναφέρονται εκτιμήσεις και ρυθμίσεις που γίνονται παρακάτω.

3) Ρυθμίζουμε τη διάταξη της φωτογραφίας 7 (τύπος CENTRIKON T-124 εταιρίας KONTRON instruments) στις 1000 στροφές / λεπτό (150g), τη θερμοκρασία στους 4 °C και το διορθωτικό συντελεστή compensation στο 5. Το τελευταίο προκύπτει βάση σχεδιαγράμματος με γνώμονα τη θερμοκρασία και τις στροφές / λεπτό.

Θέτουμε τελευταίο το χρονοδιακόπτη στα 10 λεπτά και αρχίζουμε τη φυγοκέντρηση. Κατά τη διάρκεια λειτουργίας της διάταξης επιτυγχάνεται καθίζηση του αμύλου, των πυρήνων και των άθικτων κυττάρων. Στο υπερκείμενο παραμένουν αιωρούμενα μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες.

4) Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα. Ρυθμίζουμε τη διάταξη στις 5000 στροφές / λεπτό, το διορθωτικό συντελεστή compensation στο 3,5 και το χρονοδιακόπτη στα 10 λεπτά. Αρχίζουμε την φυγοκέντρηση.

Κατά τη διάρκεια λειτουργίας της διάταξης επιτυγχάνεται πλέον μέγιστη επιτάχυνση 4000 g, που αντιστοιχεί στην R_{max} ρότορα, η οποία προκαλεί καθίζηση των χλωροπλαστών.

5) Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέα φυγοκεντρικό σωλήνα και επαναιωρούμε το ίζημα των χλωροπλαστών με 1 ml TE buffer pH=8 που περιέχει 10 mM Tris και 1 mM EDTA ενώ στην συνέχεια το μεταφέρουμε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα (φωτογραφία 5). Ρυθμίζουμε τη διάταξη στις 9000 στροφές / λεπτό, το διορθωτικό

συντελεστή compensation στο 0,5 και το χρονοδιακόπτη στα 10 λεπτά για να αρχίσουμε τη φυγοκέντρωση.

Τώρα επιτυγχάνοντας μέγιστη επιτάχυνση 15000 g προκαλούμε την καθίζηση των μιτοχονδρίων.

6) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των μιτοχονδρίων με 1ml TE buffer pH=8 ενώ στη συνέχεια το μεταφέρουμε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα.

Στο εξής οι ακολουθίες των μεταχειρίσεων αφορούν τόσο το δείγμα των χλωροπλαστών όσο και αυτό των μιτοχονδρίων ενώ για την προσθήκη μικρών όγκων διαλυμάτων χρησιμοποιούμε τις μικροπιπέτες της φωτογραφίας 8.

7) Στη μισή ποσότητα δείγματος (500 ml) προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης κορεσμένης με 1 M Tris buffer και HCl για pH 8,1. Εκχυλίζουμε με ανάδευση.

Αποφεύγοντας βίαιες κινήσεις ώστε να διατηρηθεί άθικτο το DNA, αποσκοπούμε στο να σπάσουν οι μεμβράνες και να απομακρυνθούν πρωτεΐνες, άλλα οργανικά συστατικά και φαινολικές ουσίες.

8) Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό για 3 λεπτά στη διάταξη μικροφυγόκεντρου (φωτογραφία 9). Επέρχεται διαχωρισμός των δύο φάσεων με την υποκείμενη να περιλαμβάνει την φαινόλη και διάφορα οργανικά συστατικά και την υπερκείμενη το υδατικό διάλυμα με τα DNA/RNA. Μεταξύ τους σχηματίζεται μια πρωτεϊνική στοιβάδα.

9) Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα όπου προσθέτουμε φαινόλη κορεσμένη με 1 M Tris buffer και HCl για pH 8,1 μέχρι πληρώσεως και εκχυλίζουμε αναδεύοντας.

10) Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 3 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι φάσεις του διαλύματος.

- 11) Συλλέγουμε και πάλι το υπερκείμενο σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα στον οποίο προσθέτουμε τώρα χλωροφόρμιο μέχρι πλήρωσης και εκχυλίζουμε αναδεύοντας. Επιτυγχάνουμε κατ' αυτόν τον τρόπο απομάκρυνση ιχνών φαινόλης καθώς και αποσύνδεση, απομάκρυνση ορισμένων πρωτεϊνών.

- 12) Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 10 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι φάσεις του διαλύματος.

- 13) Συλλέγουμε και πάλι το υπερκείμενο σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα όπου προσθέτουμε 500 μl TE buffer pH=8 και 0,2 gr DEAE Cellulose. Η τελευταία θα δεσμεύσει τα DNA/RNA από το υδατικό διάλυμα γι' αυτό και αναδεύουμε καλά. Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 5 λεπτά ώστε να καθιζήσει η DEAE Cellulose.

- 14) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml TE buffer pH=8, επαναιωρούμε και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό για 5 λεπτά. Επαναλαμβάνουμε ακόμη μια φορά τον προηγούμενο κύκλο.

- 15) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, επαναιωρούμε το ίζημα προσθέτοντας 200 μl 5 M NaCl και TE buffer pH=7,15, που περιέχει 10 mM Tris και 2 mM EDTA, μέχρι τελικού όγκου 1ml.
Έτσι επιτυγχάνουμε συγκέντρωση NaCl ίση με 1000 mM που προκαλεί απελευθέρωση ουσιών από την DEAE Cellulose στο υδατικό διάλυμα.
Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 5 λεπτά.

- 16) Ογκομετρούμε το υπερκείμενο σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και προσθέτουμε ίσο όγκο κρύας ισοπροπανόλης ή κρύα αιθανόλη μέχρι πλήρωσης. Αφήνουμε τα δείγματα για 60 λεπτά στους -20 °C.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες όξινου pH, χαμηλής θερμοκρασίας και αυξημένης συγκέντρωσης αλάτων τα DNA/RNA βγαίνουν από το διάλυμα. Χάνουν δηλαδή το αρνητικό τους φορτίο επειδή οι υδροξύλο-ομάδες τους δεν είναι πλέον, λόγω του pH, ιονισμένες και συσσωματώνονται σε μεγαλύτερα σωματίδια.

17) Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 15 λεπτά όπου τα DNA/RNA καθιζάνουν ως ίζημα. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αναποδογυρίζουμε τους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες πάνω σε χαρτί για να στεγνώσουν

18) Πλένουμε με μικρή ποσότητα κρύας αιθανόλης ή καθαρού οίνοπνεύματος, περιστρέφοντας πλάγια τους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες 4 φορές και τους ξαναγυρίζουμε ανάποδα πάνω σε χαρτί για να στεγνώσουν. Έτσι απομακρύνεται και εναπομένει νερό

19) Επαναιωρούμε το ίζημα DNA/RNA με 30μl TE buffer pH=7,15 πλένοντας ταυτόχρονα και τα γύρω τοιχώματα για να συγκεντρώσουμε τυχόν εκεί εβρισκόμενο υλικό.

Αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -20°C μέχρι περαιτέρω χρησιμοποίησή τους.

Τροποποιημένη διαδικασία απομόνωσης μιτοχονδριακού και γλωροπλαστικού DNA/RNA

1) Παίρνουμε 15 gr φυτικού ιστού τα οποία τοποθετούμε σε συσκευή blender (φωτογραφία 4) μαζί με 150 ml buffer απομόνωσης. Ομογενοποιούμε το δείγμα ενεργοποιώντας τη συσκευή τέσσερις διαδοχικές φορές διάρκειας πέντε δευτερολέπτων.

Το buffer απομόνωσης περιέχει 50 mM Tris το οποίο ρυθμίζει το pH του διαλύματος στο 7,5, 10 mM EDTA που δεσμεύει δισθενή κατιόντα αδρανοποιώντας εμέσως τις DNAσες, 300 mM Μαννιτόλη η οποία διατηρεί άθικτα μιτοχόνδρια και

χλωροπλάστες κάνοντας το διάλυμα ισοοσμωτικό με το εσωτερικό των οργανιδίων, 0,2 % w/v PVP-40 που δεσμεύει φαινολικές ουσίες οι οποίες αντιδρούν με το DNA και 20 mM Β-μερκαπταιθανόλη για να διατηρηθεί το περιβάλλον αναγωγικό ώστε να αποτρέπονται οξειδώσεις.

2) Διηθούμε το δείγμα δια μέσω συρμάτινου πλέγματος (φωτογραφία 4) για την απομάκρυνση μη ομογενοποιημένων ιστών και τοποθετούμε σε φυγοκεντρικό σωλήνα (φωτογραφία 5) κατάλληλη για το ρότορα A 6,14 (φωτογραφία 6). Ο τελευταίος έχει μέγιστη ακτίνα $R_{max}=14$ cm στην οποία αναφέρονται εκτιμήσεις και ρυθμίσεις που γίνονται παρακάτω.



3) Ρυθμίζουμε τη διάταξη της φωτογραφίας 7 (τύπος CENTRIKON T-124 εταιρίας KONTRON instruments) στις 1000 στροφές / λεπτό (150g), τη θερμοκρασία στους 4 °C και το διορθωτικό συντελεστή compensation στο 5. Το τελευταίο προκύπτει βάση σχεδιαγράμματος με γνώμονα τη θερμοκρασία και τις στροφές / λεπτό.

Θέτουμε τελευταίο το χρονοδιακόπτη στα 10 λεπτά και αρχίζουμε τη φυγοκέντρωση. Κατά τη διάρκεια λειτουργίας της διάταξης επιτυγχάνεται καθίζηση του αμύλου, των πυρήνων και των άθικτων κυττάρων. Στο υπερκείμενο παραμένουν αιωρούμενα μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες.

4) Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα. Ρυθμίζουμε τη διάταξη στις 5000 στροφές / λεπτό, το διορθωτικό συντελεστή compensation στο 3,5 και το χρονοδιακόπτη στα 10 λεπτά. Αρχίζουμε την φυγοκέντρωση.

Κατά τη διάρκεια λειτουργίας της διάταξης επιτυγχάνεται πλέον μέγιστη επιτάχυνση 4000 g, που αντιστοιχεί στην R_{max} ρότορα, η οποία προκαλεί καθίζηση των χλωροπλαστών.

5) Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα και επαναϊωρούμε το ίζημα των χλωροπλαστών με 1 ml TE buffer pH=8 που περιέχει 10 mM Tris και 1

mM EDTA ενώ στην συνέχεια το μεταφέρουμε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα (φωτογραφία 5).

Ρυθμίζουμε τη διάταξη στις 9000 στροφές / λεπτό, το διορθωτικό συντελεστή compensation στο 0,5 και το χρονοδιακόπτη στα 10 λεπτά για να αρχίσουμε τη φυγοκέντρωση.

Τώρα επιτυγχάνοντας μέγιστη επιτάχυνση 15000 g προκαλούμε την καθίζηση των μιτοχονδρίων.

6) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των μιτοχονδρίων με 1ml TE buffer pH=8 ενώ στην συνέχεια το μεταφέρουμε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα.

Στο εξής οι ακολουθίες των μεταχειρίσεων αφορούν τόσο το δείγμα των χλωροπλαστών όσο και αυτό των μιτοχονδρίων ενώ για την προσθήκη μικρών όγκων διαλυμάτων χρησιμοποιούμε τις μικροπιπέτες της φωτογραφίας 8.

7) Στη μισή ποσότητα δείγματος (500 ml) προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης κορεσμένης με 1 M Tris buffer και HCl για pH 8,1. Εκχυλίζουμε με ανάδευση.

Αποφεύγοντας βίαιες κινήσεις ώστε να διατηρηθεί άθικτο το DNA, αποσκοπούμε στο να σπάσουν οι μεμβράνες και να απομακρυνθούν πρωτεΐνες, άλλα οργανικά συστατικά και φαινολικές ουσίες.

8) Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 5 λεπτά στη διάταξη μικροφυγόκεντρου (φωτογραφία 9). Επέρχεται διαχωρισμός των δύο φάσεων με την υποκείμενη να περιλαμβάνει την φαινόλη και διάφορα οργανικά συστατικά και την υπερκείμενη το υδατικό διάλυμα με τα DNA/RNA. Μεταξύ τους σχηματίζεται μια πρωτεϊνική στοιβάδα.

9) Ογκομετρώ το υπερκείμενο σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα όπου προσθέτω ίση με το μισό αρχικό όγκο ποσότητα εκχυλιστικού διαλύματος. Το τελευταίο περιέχει σε ίση αναλογία χλωροφόρμιο και φαινόλη κορεσμένη με 1 M Tris buffer.

Αναδεύοντας έχουμε απομάκρυνση πρωτεϊνών.

- 10) Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 10 λεπτά και συλλέγουμε την υπερκείμενη υδατική φάση που περιέχει τα DNA/RNA σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα.
- 11) Προσθέτουμε ίση με το ένα δέκατο του αρχικού όγκου ποσότητα από διάλυμα 5 M NaCl, ίσο όγκο κρύας ισοπροπανόλης και αφήνουμε για 60 λεπτά στους -20°C . Κάτω από αυτές τις συνθήκες όξινου pH, χαμηλής θερμοκρασίας και αυξημένης συγκέντρωσης αλάτων τα DNA/RNA βγαίνουν από το διάλυμα. Χάνουν δηλαδή το αρνητικό τους φορτίο επειδή οι υδροξύλο-ομάδες τους δεν είναι πλέον, λόγω του pH, ιονισμένες και συσσωματώνονται σε μεγαλύτερα σωματίδια.
- 12) Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 15 λεπτά όπου τα DNA/RNA καθιζάνουν ως ίζημα. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αναποδογυρίζουμε τους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες πάνω σε χαρτί για να στεγνώσουν.
- 13) Πλένουμε με μικρή ποσότητα κρύας αιθανόλης ή καθαρού οινόπνευματος, περιστρέφοντας πλάγια τους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες 4 φορές και τους ξαναγυρίζουμε ανάποδα πάνω σε χαρτί για να στεγνώσουν. Έτσι απομακρύνεται και εναπομείναι νερό.
- 14) Επαναιωρούμε το ίζημα DNA/RNA με 100μl TE buffer pH=8 πλένοντας ταυτόχρονα και τα γύρω τοιχώματα για να συγκεντρώσουμε τυχόν εκεί εβρισκόμενο υλικό.
Αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -20°C μέχρι περαιτέρω χρησιμοποίησή τους.

Τεχνική χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας

Απομονώνουμε χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια όπως έχει είδη αναφερθεί στις σελίδες 42-44. Συνεχίζουμε ως εξής:

1) Στη μισή ποσότητα δείγματος προσθέτω ίσο όγκο χλωροφόρμιο και εκχυλίζω αναδεύοντας. Έτσι απομακρύνονται πρωτεΐνες και άλλες οργανικές ουσίες ενώ στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό (12000g) για 5 λεπτά.

Διαχωρίζονται οι δύο φάσεις με την υποκείμενη να περιλαμβάνει το χλωροφόρμιο και άλλα οργανικά συστατικά και μια πρωτεϊνική στοιβάδα να την χωρίζει με την υπερκείμενη υδατική φάση.

2) Απομακρύνω το υπερκείμενο και την πρωτεϊνική μεμβράνη για να αφήσω στη συνέχεια το χλωροφόρμιο να εξατμιστεί και να έχουμε συμπύκνωση του δείγματος.

Μετά την πλήρη εξάτμιση μπορούμε είτε να αποθηκεύσουμε στους -20°C είτε να συνεχίσουμε τα παρακάτω βήματα.

3) Επαναιωρούμε το δείγμα με 100 ml χλωροφόρμιο και φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές / λεπτό για 5 λεπτά με σκοπό να συσσωματωθούν εναπομένουσες πρωτεΐνες και να σχηματίσουν μια μάζα την οποία θα αποφύγουμε κατά τη λήψη του δείγματος.

4) Πάνω σε πλάκα TLC 20x20 με επίστρωση silica gel 60 F254 και σε απόσταση τουλάχιστον 1,5 cm από την άκρη της τοποθετώ πάνω σε ευθεία γραμμή όλα τα δείγματα.

Χρησιμοποιώντας μικροπιπέτα (φωτογραφία 8) εφαρμόζουμε τμηματικά και στο ίδιο σημείο, για κάθε δείγμα, όλη την ποσότητα αφήνοντας κάθε φορά να εξατμιστεί και σχηματίζοντας τελικά μια κηλίδα.

5) Αφού στεγνώσουν όλα τα δείγματα βάζουμε οριζόντια την πλάκα μέσα σε δεξαμενή που περιέχει 300 ml μίγματος ανάπτυξης αποτελούμενο από 3 μέρη

εξάνιο και 1 μέρος αιθυλοξικό οξύ, με το κάτω μέρος της πλάκας λίγο βυθισμένο στο παραπάνω μίγμα.

- 6) Αφήνουμε το μέτωπο του μίγματος ανάπτυξης να ανέλθει στα $\frac{3}{4}$ της πλάκας (χρόνος περίπου 45 λεπτών) και μετά την βγάζουμε από τη δεξαμενή και την αφήνουμε να στεγνώσει.
- 7) Σημειώνουμε τις τιμές Rf και το χρώμα όλων των συστατικών που μπορούμε να ανιχνεύσουμε στο ορατό φάσμα καθώς επίσης τιμές Rf για ουσίες που φθορίζουν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.
- Η τιμή Rf είναι ο λόγος της απόστασης που διανύθηκε από το συστατικό προς την απόσταση που διανύθηκε από το μέτωπο του μίγματος ανάπτυξης.

Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήγμα ακρυλαμίδης

- 1) Τοποθετούμε τις γυάλινες πλάκες διαστάσεων 10×9 cm την μία αντίθετη της άλλης, με πλαστικά ορθογώνια ελάσματα να διατρέχουν ακραία τις δύο μικρότερες πλευρές τους. Στερεώνουμε και στεγανοποιούμε την κατασκευή αυτή μέσα στη διάταξη της φωτογραφίας 10.

Αναμιγνύουμε ακρυλαμίδη, δις - ακρυλαμίδη, IOXTBE, H₂O, TEMED και περσουλφικό αμμώνιο (ArSO₄) σε ποσότητες ανάλογα με το πόσο πυκνό θέλουμε να είναι το πήγμα και πόσο γρήγορα να υποστεί πήξη (οι αναλογίες αναφέρονται στο παράρτημα). Τα χύνουμε μέσα στις πλάκες και τοποθετούμε το οδοντωτό ορθογώνιο πλαίσιο πριν πήξουν.

Η ακρυλαμίδη είναι υλικό μορίων που μπορούν να πολυμεριστούν σε μακριές αλυσίδες οι οποίες έχουν την δυνατότητα να διασυνδεθούν με μόρια δις -ακρυλαμίδης δίνοντας πορώδες πήγμα (gel). Η ακρυλαμίδη δεν πολυμερίζεται όταν βρίσκεται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα επειδή ο μηχανισμός πολυμερισμού λειτουργεί με ελεύθερες ρίζες, τις οποίες δημιουργεί το ArSO₄, που αδρανοποιούνται όταν αντιδρούν με O₂. Γι' αυτό πρέπει να περιέχεται σε δοχείο όπως ο χώρος ανάμεσα από τις γυάλινες πλάκες. Το TEMED λειτουργεί ως καταλύτης μειώνοντας την ενεργειακή

στάθμη της αντίδρασης, που σε συνδυασμό με υψηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος (30 °C) έχει ως αποτέλεσμα την ολοκλήρωση του πολυμερισμού μέσα σε ελάχιστο χρόνο. Έτσι, τοποθετούμε είτε το TEMED είτε το ArSO_4 τελευταίο. Επίσης, μαζί με τα υλικά του gel μπορούμε να προσθέσουμε 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) αν θέλουμε να εξετάσουμε σημεία πρόσδεσής του με μόρια DNA τα οποία φθορίζουν κάτω από υπεριώδες φωτισμό.

Αφού πήξει το gel μπορούμε είτε να το αποθηκεύσουμε στους 4°C τυλίγοντάς το με πλαστικό για αποφυγή απώλειας υγρασίας είτε να το χρησιμοποιήσουμε.

2) Τοποθετούμε τις γυάλινες πλάκες με το gel και τα πλαστικά ελάσματα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (φωτογραφία 11) αφού προηγουμένως στεγανοποιήσουμε με βαζελίνη κατά μήκος του ελαστικού στηρίγματος. Αφαιρούμε το ορθογώνιο πλαίσιο όπου στη θέση του έχουν σχηματιστεί ορθογώνιες εμβυθύνσεις (wells).

3) Πληρούμε την πάνω και κάτω δεξαμενή της συσκευής με 0,5XTBE. Απομακρύνουμε τυχόν φυσαλίδες αέρα.

4) Τοποθετούμε 10XDNA loading buffer σε ποσότητα δείγματος, αναδεύουμε και την τοποθετούμε μέσα σε κάποιο well (τα ποσά αναφέρονται σε επόμενα κεφάλαια).

Το 10XDNA loading buffer περιέχει κατά το ήμισυ γλυκερόλη 50 % που κάνει το δείγμα βαρύτερο του ηλεκτρολύτη 0,5XTBE ώστε να βυθίζεται μέσα σ' αυτόν, 10 % 10XTBE και μία ελάχιστη ποσότητα χρωστικής μπλε της βρομοφαινόλης.

5) Βάζουμε το καπάκι και ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 120 Volts. Η ηλεκτροφόρηση σταματά όταν το μέτωπο που σχηματίζει η χρωστική, η οποία κινείται πιο γρήγορα μπροστά από το DNA, φτάσει το κάτω άκρο του gel (περίπου 90 λεπτά).

Κατά την ηλεκτροφόρηση το DNA κινείται, διαμέσου των πόρων του πήγματος, σαν επιμήκες νήμα με άξονα παράλληλο του ηλεκτρικού πεδίου και με κατεύθυνση

προς τον θετικό πόλο της ηλεκτρικής πηγής, Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του αρνητικού φορτίου που διατηρούν οι υδροξυλ - ομάδες του μέσα σε ηλεκτρολύτες με αλκαλικό pH όπως το TBE (pH 8,0 - 8,3).

Η απόσταση που θα διανύσει κάθε μόριο DNA εξαρτάται από το λόγο ηλεκτρικής έλξης / τριβής όπου τόσο η τριβή του μορίου κατά την κίνησή του όσο και το φορτίο του εξαρτώνται από το μέγεθός του. Αν έχουμε αρχικά προσθέσει βρωμιούχο αιθίδιο τοποθετούμε το gel κάτω από κάμερα και λαμβάνουμε φωτογραφία κάτω από υπεριώδες φως.

Μέθοδοι ανίχνευσης DNA με νιτρικό άργυρο (AgNO_3)

α) Μέθοδος ελεύθερων ιόντων νιτρικού αργύρου.

- 1) Αποχωρίζουμε τις γυάλινες πλάκες με μια σπάτουλα. Αναποδογυρίζουμε την πλάκα που συγκράτησε το gel και με τη σπάτουλα το βοηθούμε να αποχωριστεί και να πέσει σε διάλυμα που περιέχει 40 % μεθανόλη, 10 % οξικό οξύ και 50 % H_2O . Ανακινούμε για 30 λεπτά (συσκευή φωτογραφίας 12). Το οξικό οξύ συσσωματώνει το DNA για να παραμείνει στο gel, ενώ η μεθανόλη διασυνδέεται με το DNA δημιουργώντας επιπλέον θέσεις πρόσδεσης για τον νιτρικό άργυρο.
- 2) Αποχύνουμε το προηγούμενο διάλυμα σταθεροποίησης και απομακρύνουμε υπολείμματα του με ενός λεπτού πλύση σε H_2O .
- 3) Αποχύνουμε το H_2O και προσθέτουμε διάλυμα που περιέχει 12 mM AgNO_3 κάνοντας πλύση για 30 λεπτά. Ο άργυρος προσδέεται στα σημεία που υπάρχει υλικό.
- 4) Αποχύνουμε τον AgNO_3 και την περίσσια του κάνοντας 3 διαδοχικές πλύσεις, διάρκειας 10 λεπτών, με H_2O .

- 5) Αποχύνουμε και το τελευταίο H_2O και κάνουμε πλύση με εμφανιστικό διάλυμα που περιέχει 29 gr / l Na_2CO_3 και 185 ml / l φορμαλδεύδη. Το διάλυμα αυτό οξειδώνει τον άργυρο σε μεταλλικό άργυρο με αποτέλεσμα την εμφάνιση χρώματος. Η αλλαγή γίνεται γρήγορα.
- 6) Μόλις πάρουμε ικανοποιητικό χρώμα και πριν μαυρίσει όλο το gel αποχύνουμε το εμφανιστικό διάλυμα και σταματούμε την αντίδραση οξείδωσης με διάλυμα που περιέχει 5 % οξικό οξύ.
- 7) Τοποθετούμε το gel κάτω από κάμερα και λαμβάνουμε φωτογραφία κάτω από ορατό φως.

β) Μέθοδος διαμινικού συμπλόκου αργύρου με αμμωνία.

- 1) Αποχωρίζουμε τις γυάλινες πλάκες με μια σπάτουλα. Αναποδογυρίζουμε την πλάκα που συγκράτησε το gel και με τη σπάτουλα το βοηθούμε να αποχωριστεί και να πέσει σε διάλυμα που περιέχει 40 % μεθανόλη, 10 % οξικό οξύ και 50 % H_2O . Ανακινούμε για 30 λεπτά (συσκευή φωτογραφίας 12). Το οξικό οξύ συσσωματώνει το DNA για να παραμείνει στο gel, ενώ η μεθανόλη διασυνδέεται με το DNA δημιουργώντας επιπλέον θέσεις πρόσδεσης για τον νιτρικό άργυρο.
- 2) Αποχύνουμε το προηγούμενο διάλυμα σταθεροποίησης και απομακρύνουμε υπολείμματα του με 15 λεπτών πλύση σε H_2O .
- 3) Αποχύνουμε το H_2O και προσθέτουμε διάλυμα $AgNO_3 / NH_4OH$ κάνοντας πλύση για 15 λεπτά (η παρασκευή του διαλύματος αυτού αναφέρετε στο παράρτημα). Με το σύμπλοκο του αυτό ο άργυρος μπορεί να προσδεθεί πιο αποτελεσματικά κάνοντας τη μέθοδο πιο ευαίσθητη.

- 4) Αποχύνουμε το παραπάνω διάλυμα και την περίσσια του με 5 λεπτών πλύση σε H_2O .
- 5) Αποχύνουμε το H_2O και κάνουμε πλύση με εμφανιστικό διάλυμα που περιέχει 0,5 % w/v κιτρικό νάτριο ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O \cdot 2H_2O$) και 0,5 % v/v φορμαλδεύδη.
Το διάλυμα αυτό οξειδώνει τον άργυρο σε μεταλλικό άργυρο με αποτέλεσμα την εμφάνιση χρώματος. Η αλλαγή εδώ είναι πιο αργή και εύκολα ελεγχόμενη.
- 6) Μόλις πάρουμε ικανοποιητικό χρώμα και πριν μαυρίσει όλο το gel αποποχύνουμε το εμφανιστικό διάλυμα και σταματούμε την αντίδραση οξείδωσης με διάλυμα που περιέχει 5 % οξικό οξύ.
- 7) Τοποθετούμε το gel κάτω από κάμερα και λαμβάνουμε φωτογραφία κάτω από ορατό φως.

Παρασκευή διαλυμάτων

Buffer απομόνωσης

$V_{\tau}=500\text{ml}$		final concentrations
<u>25ml</u>	1M Tris pH=7	50mM
<u>10ml</u>	500mM EDTA	10mM
<u>27gr</u>	Μαννιτόλη (MB=180)	300mM
<u>1gr</u>	PVP-40	0.2%w/v
<u>800μl</u>	10mM Β-μερκαπταιθανόλη(MB=78)	20mM

Buffer απομόνωσης ολικού DNA

$V_{\tau}=250\text{ml}$		final concentrations
<u>25ml</u>	1M Tris pH=7	100mM
<u>10ml</u>	500mM EDTA	10mM
<u>1ml</u>	10mM Β-μερκαπταιθανόλη(MB=78)	50mM

10xTBE

$V_{\tau}=1000\text{ml}$		final concentrations
<u>24gr</u>	Tris (MB=121)	200mM
<u>12gr</u>	Βορικό οξύ (MB=62)	200mM
<u>7.4gr</u>	EDTA (MB=370)	20mM

Το pH διορθώνεται προς αλκαλικό με Tris και προς όξινο με βορικό οξύ.

TE buffer pH=8

$V_{\tau}=100\text{ml}$		final concentrations
1ml	Tris pH=8	10mM
0,2ml	EDTA	1mM

Το pH ρυθμίζεται με προσθήκη HCl και χρησιμοποίηση pHμέτρου.

TE buffer pH=7.15

$V_{\tau}=1.5\text{ml}$		final concentrations
<u>15μl</u>	1M Tris pH=7.15	10mM
<u>6μl</u>	0.5M EDTA	2mM

Εκχύλιση φαινόλης

--Ζεσταίνουμε (ξεπαγώνουμε) τη φαινόλη στους 65°C

--Τοποθετούμε σε 100ml από τα 500ml αυτής 50ml 1M Tris pH=8.2 και ανακατεύουμε

--Διαχωρίζουμε τις φάσεις και μετρούμε το pH. Επαναλαμβάνουμε μέχρι τιμής 8 όπου και αφήνουμε λίγη από την επάνω επιφάνεια να περάσει.

10xDNA loading buffer

$V_{\tau}=1\text{ml}$

<u>500</u> μl	Γλυκερόλη 50%
<u>100</u> μl	10xTBE
<u>400</u> μl	H ₂ O
+	(ένα ακούμπισμα με μπλε της βρομοφαινόλης)

Μίγμα ανάπτυξης για TLC

$V_{\tau}=300\text{ml}$

<u>225</u> ml	Εξάνιο
<u>75</u> ml	Αιθυλοξικό οξύ

Gel ηλεκτροφόρησης (10% ακρυλαμίδη)

$V_{\tau}=30\text{ml}$

<u>10</u> ml	stock 30% ακρυλαμίδη, 1% δισακρυλαμίδη
<u>3</u> ml	10xTBE
<u>50</u> μl	TEMED
<u>17</u> ml	H ₂ O
* <u>100</u> μl	10% ApSO ₄ (0.1gr/ml H ₂ O)

*(το βάζουμε τελευταίο ή το TEMED γιατί αρχίζουν τον πολυμερισμό)

0.5xTBE

1 μέρος 10xTBE με 20 μέρη H₂O

40%/10%

$V_{\tau}=500\text{ml}$		final concentrations
<u>200</u> ml	Μεθανόλη	40%
<u>50</u> ml	Οξικό οξύ	10%
<u>250</u> ml	H ₂ O	50%

AgNO₃/NH₄OH

--Κατασκευάζουμε ένα διάλυμα: 5ml 25% NH₄OH

<u>0.4</u> gr	NaOH
<u>100</u> ml	H ₂ O

στο οποίο προσθέτουμε σταδιακά ένα διάλυμα: $\frac{1.6\text{gr}}{100\text{ml}}$ AgNO_3
 H_2O .

$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /Φορμαλδεύδη

$V_T=500\text{ml}$

2.5gr

$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2.5ml

Φορμαλδεύδη

Stock RNAσης

10μgr (0,01gr ανά ml H_2O) RNAση/μl H_2O

Stock ακρυλαμίδης

Στα 100ml H_2O 30gr ακρυλαμίδα 1gr δισακρυλαμίδα

Συντομογραφίες

ApSO_4	Περσουλφουρικό αμμώνιο
DEAE	Διαθυλαμινοαιθυλ
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
PVP	Polivinyll pyrrolidone
TBE	Tris Βορικό οξύ EDTA
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris [hydroxymethyl]aminomethane

3. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά έγινε προμήθεια πολλαπλασιαστικού υλικού, σπόροι σπανακιού, από κατάστημα της περιοχής Βόλου. Οι σπόροι φυτεύτηκαν ανά ομάδες των πέντε σε συνολικά είκοσι γλάστρες προκειμένου να ληφθούν υγιή φυτά. Κατόπιν τοποθετήθηκαν σε θάλαμο (φωτογραφία 1) στον οποίο επικράτησαν οι εξής συνθήκες:

- i. Απουσία φωτισμού.
- ii. Συνεχείς θερμοκρασία 23⁰C

Με τις παραπάνω συνθήκες εξασφαλίστηκε η βλάστηση του σπανακιού και η ταχεία φύτρωση μέσα σε 6 ημέρες. Στο διάστημα αυτό εφαρμοζόταν συχνά ποτίσματα με σκοπό να διατηρηθεί το χώμα υγρό.

Αμέσως μετά και αφού η βλάστηση των σπόρων έφτασε σε ικανοποιητικό επίπεδο (80-90 %), έγινε αλλαγή των συνθηκών μέσα στο θάλαμο ως εξής:

- i. Πλήρης φωτισμός κατά τη διάρκεια της ημέρας με λάμπες φθορισμού.
- ii. Διάρκεια ημέρας 8 ώρες.
- iii. Θερμοκρασία ημέρας: 18⁰C.
- iv. Θερμοκρασία νύχτας: 15⁰C.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες τα φυτά παρέμειναν για 50 ημέρες. Κατόπιν οι μισές γλάστρες μεταφέρθηκαν σε νέο θάλαμο (φωτογραφία 2) και τέθηκαν υπό συνθήκες που ευνοούσαν την αναπαραγωγική ανάπτυξη-άνθηση του που ήταν:

- i. Πλήρης φωτισμός κατά τη διάρκεια της ημέρας με λάμπες φθορισμού.
- ii. Διάρκεια ημέρας 16 ώρες.
- iii. Θερμοκρασία ημέρας: 20⁰C.
- iv. Θερμοκρασία νύχτας: 17⁰C.

Στα φυτά εφαρμοζόταν συχνά ποτίσματα ώστε να αναπληρώνεται η υγρασία του εδάφους. Από τα φυτά που βρισκόταν σε συνθήκες μικρής ημέρας ελήφθησαν φύλλα και από αυτά που βρισκόταν σε συνθήκες μεγάλης ημέρας ελήφθησαν φύλλα και άνθη, τα οποία αποτέλεσαν το πειραματικό υλικό για απομονώσεις DNA/RNA ολικού, μιταχονδριακού, χλωροπλαστικού καθώς και για τη μέθοδο χρωματογραφίας TLC (Μέθοδοι οι οποίες προαναφέρθηκαν).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Αρχικά έγιναν απομονώσεις ολικού DNA/RNA, εφόσον στην διαδικασία απομόνωσης DNA δεν υπήρχε το στάδιο 5 όπου γίνεται προσθήκη RNAσης. Επί πλέον στην ίδια διαδικασία το στάδιο 7 δεν περιελάμβανε έξι επαναλαμβανόμενες πλύσεις με σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl αλλά μόνο μια όπου η συγκέντρωση του NaCl ρυθμιζόταν στα 1000 mM. Κατ' αυτόν τον τρόπο όμως μετά την ηλεκτροφόρηση και την ανίχνευση βάση της μεθόδου ελευθέρων ιόντων νιτρικού αργύρου η εμφάνιση η οποία παίρναμε ήταν δυσδιάκριτη και ενιαίου σκούρου χρώματος (smear) (φωτογραφία 13). Αυτό θεωρήθηκε πως οφειλόταν σε πολυάριθμα τεμαχίδια RNA και στην αποδέσμευση ανεπιθύμητων ουσιών από την DEAE Cellulose, γι' αυτό και έγιναν οι παραπάνω ρυθμίσεις. Μια επιπλέον αλλαγή ήταν αυτή της μεθόδου ανίχνευσης με νιτρικό άργυρο όπου χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά η μέθοδος διαμινικού συμπλόκου αργύρου με αμμωνία λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας και πιο εύκολου ελέγχου που παρουσιάζει.

Εφαρμόζοντας όλα τα παραπάνω, όπως αναλυτικά αναφέρονται σε προηγούμενο σημείο, έγινε μια δοκιμαστική εμφάνιση δειγμάτων με τελική συγκέντρωση NaCl 400 mM, τόσο από φυτά με άνθη όσο και από φυτά χωρίς άνθη (φωτογραφία 14). Κατόπιν τούτου αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν για την συγκριτική ανάλυση τα δείγματα με τελική συγκέντρωση NaCl 600, 800 και 1000 mM (αφού στα 400 mM παρουσιάστηκε το ίδιο πρόβλημα-smear). Από τα αποτελέσματα στην φωτογραφία 15, δεν φαίνονται διαφορές στο ολικό DNA μεταξύ ανθισμένων και μη φυτών.

Κατόπιν έγιναν απομονώσεις DNA/RNA από μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες. Εδώ αρχικά χρησιμοποιήθηκε η αντίστοιχη διαδικασία απομόνωσης DNA/RNA αλλά επειδή μια τροποποίηση αυτής έδωσε πιο διακριτά αποτελέσματα τελικά χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη διαδικασία. Από την εμφάνιση της συγκριτικής ανάλυσης μεταξύ ανθισμένων και μη ανθισμένων φυτών (φωτογραφία 16), φάνηκαν διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων οργανιδίων. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος TLC όπου κάτω από ορατό φως δεν έδειξε σημαντικές διαφορές (φωτογραφία 17), ενώ κάτω από υπέρυθρο φως (φωτογραφία 18) εμφανίστηκε μια ουσία με Rf 12.5/13 (πίνακας 1) στους χλωροπλάστες των ανθισμένων φυτών που δεν υπήρχε στους

χλωροπλάστες των μη ανθισμένων φυτών. Η ανάλυση του φασματογράφου μάζας (πίνακας 2 & διάγραμμα 1) έδειξε πως πρόκειται για μια αλειφατική ένωση με μοριακό βάρος 284 η οποία περιέχει μια πιο σταθερή μορφή μέσα στο μόριο με μοριακό βάρος 256 και επίσης περιέχει οξυγόνο. Από το φάσμα απορρόφησης (διάγραμμα 2) φαίνεται πως έχει μέγιστο απορρόφησης στο υπέρυθρο γύρο στα 225 nm και μια δεύτερη κορυφή στα 273 nm. Από το φάσμα υπέρυθρου (διάγραμμα 3), λαμβάνοντας υπόψιν και τις προηγούμενες ενδείξεις, φθάνουμε στο συμπέρασμα ότι η ουσία μας είναι αλκοόλη. Το O-H δηλώνει καθαρά η ευρεία μπάντα στα 3360 cm^{-1} , η οποία επιπλέον δηλώνει πως τα μόρια της ένωσης σχηματίζουν πολυμερείς αλυσίδες με δεσμούς. Επιπλέον δεν υπάρχουν ακόρεστοι δεσμοί, δηλαδή υπάρχουν μόνο sp^3 -υβριδισμένοι δεσμοί μεταξύ άνθρακα και υδρογόνου. Η θέση και η μορφή των δύο ζευγών μπάντων 2940 cm^{-1} , 2835 cm^{-1} και 2597 cm^{-1} , 2520 cm^{-1} αντίστοιχα, δηλώνει την πιθανή ύπαρξη εξαμερούς δακτυλίου πράγμα που ενισχύεται από προηγούμενη διαπίστωση μιας σταθερής δομής μικρότερου μοριακού βάρους μέσα στο μόριο. Η μπάντα στα 1451 cm^{-1} οφείλεται σε CH_2 και CH_3 του μορίου ενώ η μπάντα γύρο στα 700 cm^{-1} οφείλεται σε αλυσίδα $-(\text{CH}_2)_n-$ όπου $n \geq 4$. Το ζεύγος μπαντών 1030 cm^{-1} , 1112 cm^{-1} που οφείλεται σε δεσμούς C-O, O-H αντίστοιχα δείχνει πως η αλκοόλη είναι πιθανότατα πρωτοταγής.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

- ALEXANDRE, J., LESSALLES, J. P. AND KADO, R. T. (1990). Opening of Ca^{+2} channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* 343, 567-570.
- BERNIER, G. (1984). The factors controlling floral evocation: an overview. In *Light and the Flowering Process* (D. Vince-Prue, B. Thomas and K. Cockshull, Eds), pp. 277-294. London, Academic Press.
- BERNIER, G. (1988). The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 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.
- BRADY, J., ed (1982). *Biological Timekeeping*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- BRONCHART, R., BERNIER, G., KINET, J. M. AND HAVELANGE, 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. L. (1987). Measurement of cytoplasmic calcium in alcurone photoplasts using indo 1 and fura 2. *Cell Calcium* 8, 455-472.
- CARR-SMITH, H. D. (1990). The control of flowering in the long day plant wheat (*Triticum aestivum* L.) and the role of phytochrome. PhD Thessis, University of Reanding

- CARR-SMITH, H. D., THOMAS, B. AND JOHNSON, C. B. (1989). An action spectrum for the effect of continuous light on flowering in wheat. *Planta* 179, 428-432.
- CHAILAKHAYAN, M. KH. (1936). New facts in support of the hormonal theory of plant development. *Doclady of the Academy of Sciences, USSR* 13, 79-83.
- CHIARIELLO, N. R. AND GULMAN, S. L. (1991). Stress effects on plant reproduction. In: Money, H. A., Winner, W. E. And Pell, E. J. (eds), *Response of plants to Multiple Stresses*. Academic Press Inc., San Diego, pp. 162-188.
- CIRO CIUFOLINI. Λαχανοκομία κηπευτική γενική και ειδική. Εκδ. ψιχάλου.
- 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'-cyclic monophosphate. *Plant Physiology and Biochemistry* 28, 367-378.
- DESILVA, D. L. R., COX, R. C., HETHERINGTON, A. M. AND MANSFIELD, T. A. (1985). Suggested involvement of calcium and calmodulin in the responses of stomata to abscisic acid. *New Phytology* 101, 555-563.
- DIETER, P. (1984). Calmodulin and calmodulin-mediated processes in plants. *Plant Cell Environment* 7, 371-380.
- DREYER, E. M. AND WEISENSEELE, M. H. (1979). Phytochrome mediated uptake of calcium in *Mougeotia* cells. *Planta* 146, 31-39.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 87, 9645-9649.
- 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.
- GOLLMER, I. AND APEL, K. (1983). The phytochrome-controlled accumulation of mRNA sequences encoding the light-harvesting chlorophyll a/b protein of barley (*Hordeum vulgare* L.) *European Journal of Biochemistry* 133, 309-313.
- GOTO, K., LAVAL-MARTIN, D. L. AND EDMUNDS, L. N. Jr. (1985). Biochemical modeling of an autonomously oscillatory circadian clock in *Euglena*. *Science* 228, 1284-1288.
- GREGORY, G. G. (1936) The effect of the length of the day on the flowering of plants. *Scientific Horticulture* 4, 143-154.
- HEDRICKS, 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.
- HEPLER, P. K. AND WAYNE, R. O. (1985). Calcium and plant development. *Annual Review of Plant Physiology* 36, 397-439.
- HESLOP-HARRISON, J. AND HESLOP-HARRISON, Y. (1970). The state of the apex and the response to induction in *Cannabis sativa*. In *Cellular and Molecular Aspects of Floral Induction* (G. Bernier, ED.), pp. 3-26. London, Longman.
- HILLMAN, W. S. (1962). *The Physiology of Flowering*, New York, Holt, Rinehart and Winston.
- KELLY, G. J. (1984). Calcium, calmodulin and the action of plant hormones. *Trends in Biochemical Sciences* 97, 4-5.
- KNOTT, J. E. (1934). Effect of a localized photoperiod on spinach. *Proceedings of the American Horticultural Society* 31, 152-154.
- KREKULE, J. AND SEIDLOVA, F. (1973). Treatments that enhance flowering in the post-inductive period of a short-day plant, *Chenopodium rubrum*. *Annals of Botany*, 37, 615-623.

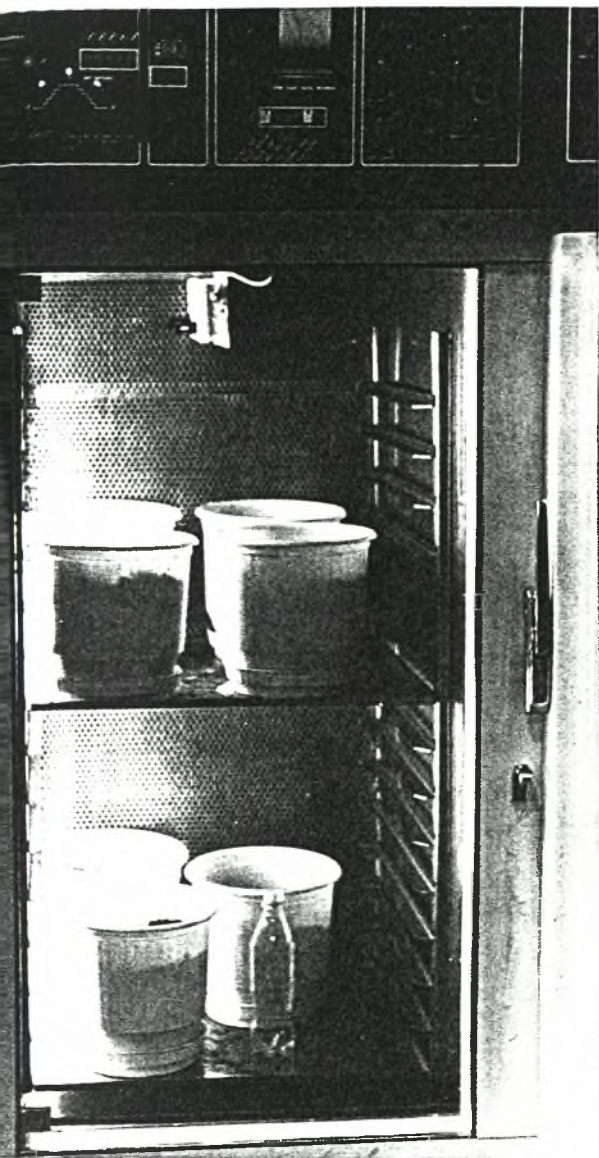
- LANG, A. (1965). Physiology of flower initiation. In *Encyclopedia of Plant Physiology* (W. Ruhland, Ed.), Vol. XV/I, pp. 1380-1536. Berlin, Springer Verlag.
- LANG, A. (1980). Inhibition of flowering in long-day plants. In *Plant Growth Substances* (F. Skoog, Ed.), pp.310-322. Berlin, Springer Verlag.
- LANG, A. AND MELCHERS, G. (1943). Die photoperiodische Reaktion von *Hyoscyamus niger*, *Planta* 33, 653-702.
- LANG, A., CHAILAKHYAN, M. KH. AND FROLOVA, I. A. (1977). Promotion and inhibition of flower formation in a day-neutral plant in grafts with a short-day plant and a long-day plant. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 74, 2412-2416.
- 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., JACQMANT, A. AND BERNIER, G. (1983). Changes in protein composition of the shoot meristem during floral evocation in *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum* 59, 476-480.
- MARME', D. (1977). Phytochrome: Membranes as possible sites of primary action. *Annual Review of Plant Physiology* 28, 173-198.
- MARUSHIGE, K. AND MARUSHIGE, Y. (1962b). An electrophoretic study of tissue extracts from leaf and flower in *Pharbitis nil* Chois. *Plant and Cell Physiology* 3, 319-322.
- MCAINSH, M. R., BROWNLEE, C. AND HETHERINGTON, A. M. (1990). Abscisic acid-induced elevation of cell cytosolic Ca^{+2} precedes stomatal closure. *Nature* 343, 186-188.
- MILLER, G. E. (1986). Pubescence, floral temperature and fecundity in species of *Puya* (Bromeliaceae) in the Ecuadorian Andes. *Oecologia* 70, 155-160.
- MOHR, H. (1972). *Lectures on Photomorphogenesis* Berlin, Springer Verlag.
- MURFET, I. C. (1977). Environmental interaction and the genetics of flowering. *Annual Review of Plant Physiology* 28, 253-278.

- NAPP-ZINN, K. (1984). Light and vernalization. In.: Light and the Flowering Process, Vince Prue, D., Thomas, B., and Cockshull, K. E., eds., pp. 75-88. Academic Press, London.
- PATTERSON, B. D., MUTTON, L., PAUL, R. E. AND NGUYEN, V. Q. (1987). Tomato pollen development-stages sensitive to chilling and natural environment for the selection of resistant genotypes. *Plant, Cell and Environment* 10, 363-368.
- ROBINSON, L. W. AND WAREING, P. F. (1969). Experiments on the juvenile-adult phase change in some woody species. *New Phytologist*, 68, 67-68.
- ROBLIN, G., FLEURAT-LESSARD, P., EVERAT-BOURBOULOUX, A, BONMORT, J. AND MOYEN, C. (1990). Phytochrome- and blue-pigment mediated leaf movements: experimental approach in the signal transduction. *Photochemistry and Photobiology* 52, 197-202.
- ROUX, S. J., MCENTIRE, K., SLOCUM, R., CEDEL, T. E. AND HALE, C. II (1981). Phytochrome induces photoreversible calcium fluxes in a purified mitochondrial fraction from oats. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 78, 283-287.
- 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.
- SCHWABE, W. W. (1969). *Kalanchoe blossfeldiana* Poellniz. In *The Induction of Flowering* (L. T. Evans, Ed.), pp. 226-246. Melbourne, Macmillan.
- SCHWABE, W. W. (1976). Applied aspects of juvenility and some theoretical consideration. *Acta Horticulturae* 56, 45-56.
- SCHWABE, W. W. AND AL-DOORI, A. (1973). Analysis of a juvenile-like condition affecting flowering in the blackcurrant (*Ribes nigrum*). *Journal of Experimental Botany* 24, 969-981.
- SOTTA, B. (1978). Interaction du photoperiodisme et des effets de la zeatine, du saccharose et de Peau dans la floraison du *Chenopodium polyspermum*. *Physiologia Plantarum* 43, 337-342.

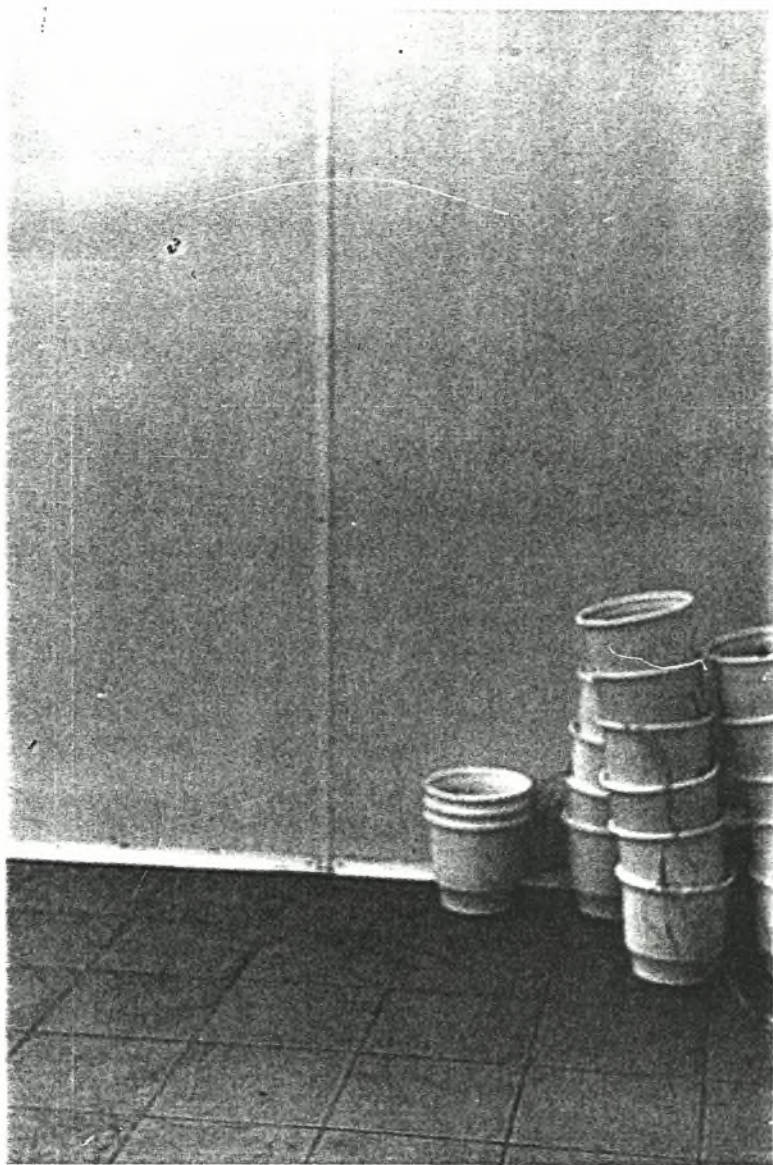
- STIEKEMA, W. J., WIMPEE, C. F., SILVERTHORNE, J. AND TOBIN, E. M. (1983). Phytochrome control of the expression of to nuclear genes encoding for chloroplast proteins in *Lemna gibba* L. G3. *Plant Physiology* 72, 717-724.
- SWEENEY, B. M. (1987). *Rhythmic Phenomena in Plants*. Academic Press, San Diego.
- 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. in: Wilkins, M. B. (ed), *Advanced Plant Physiology*. Pitman Publishing Ltd, London, pp. 408-439.
- THOMAS, B. AND VINCE PRUE, D. (1984). Juvenility, photoperiodism and vernalization. In: *Advanced Plant Physiology*, Wilkins, M. B., ed., pp. 408-439. Pitman, London.
- 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*. McGraw Hill, Maidenhead.
- VINCE PRUE, D. (1983). Photomorphogenesis and flowering. In: Shropshire, W. Jr and Mohr, H. (eds), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 16b. Photomorphogenesis*. Spriger Verlag, New York, pp. 458-490
- WAREING, P. F. AND FRYIDMAN, V. M. (1976). General aspects of phase-change with special reference to *Hedera helix* L. *Acta Horticulturae* 56, 57-69.
- 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.
- WELLENSIEK, S. J. (1969). *Silene armeria* L. In *The Induction of Flowering* (L. T. Evans, Ed.), pp. 350-363. Melbourne, Macmillan.

- YOSHIDA, K., UNEMURA, K., YOSHINAGA, K. AND OOTA, Y. (1967). Specific RNA from photoperiodically induced cotyledons of *Pharbitis nil*. *Plant and Cell Physiology* 8, 97-108.
- ZEEVAART, J. A. D. (1969). *Perilla*. In: Evans, L. T. (ed), *The Induction of Flowering*. MacMillan, Melbourne, pp. 116-155.
- ZEEVAART, J. A. D., AND BOYER, G. L. (1987). Photoperiodic intuction and the floral stimulus in *Perilla*. In: *Manipulation of Flowering*, Atherton, J. G., ed., pp. 269-277. Butterworths, London.
- ZOCCHI, G., ROGERS, S. A. AND HANSON, J. B. (1983). Inhibition of proton pumping in corn roots is associated with increased phosphorylation of membrne proteins. *Plant Science Letters* 31, 215-221.
- ΒΑΡΔΑΒΑΚΗΣ, Μ. (1993). Συστηματική βοτανική (κρυπτόγαμα-σπερματόφυτα). Τόμος Ι, έκδοση τρίτη. Εκδ. Σαλονικίδης.
- ΓΟΥΝΑΡΗΣ, Ι. (1995). Πανεπιστημιακές παραδόσεις Μοριακής βιολογίας.
- ΓΟΥΝΑΡΗΣ, Ι. (1996). Γενετική μηχανική
- ΔΗΜΗΤΡΑΚΗ, Κ. Γ. Λαχανοκομία. Εκδ. «Ανθοκηπουρική».
- ΛΟΛΑΣ ΠΕΤΡΟΣ (1993). Φωτομορφογένεση-φυτόχρωμα. Φυσιολογία φυτού (σημειώσεις).
- ΟΛΥΜΠΙΟΣ, Χ. Μ. (1996). Στοιχεία γενικής και ειδικής λαχανοκομίας.

VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Φωτογραφία 1



Φωτογραφία 2

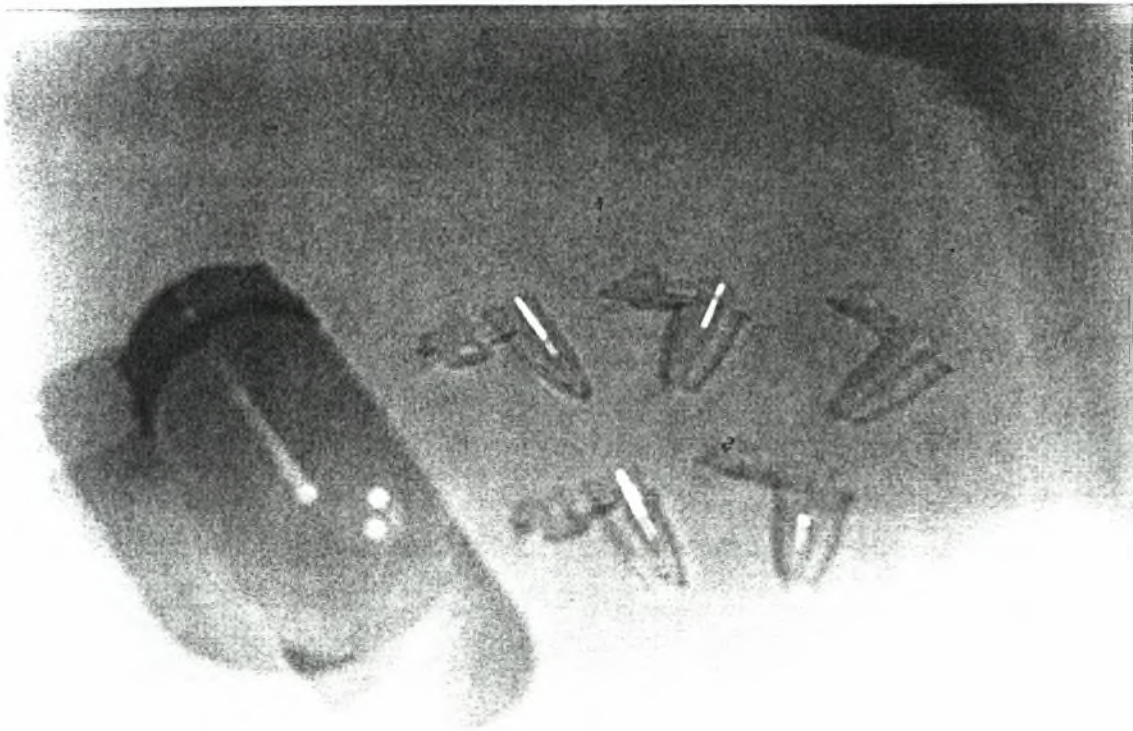


Φωτογραφία 3



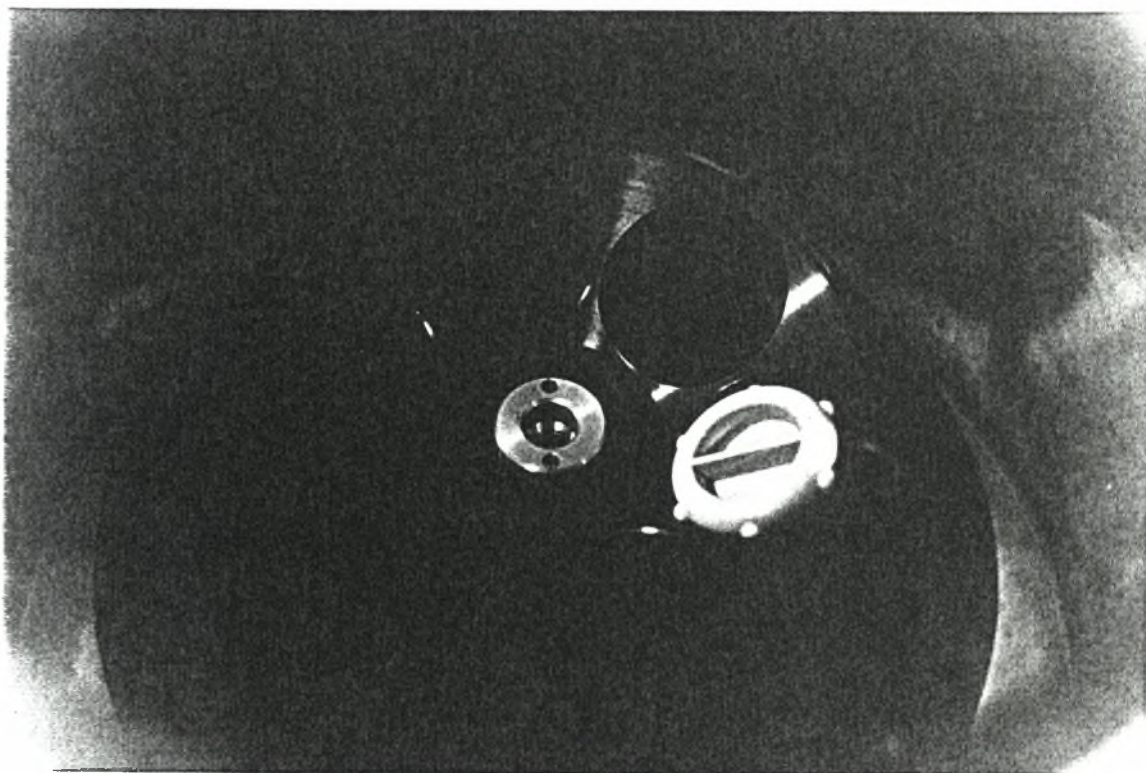
Φωτογραφία 4.

Δεξιά είναι το συρμάτινο πλέγμα και αριστερά το μπλέντερ

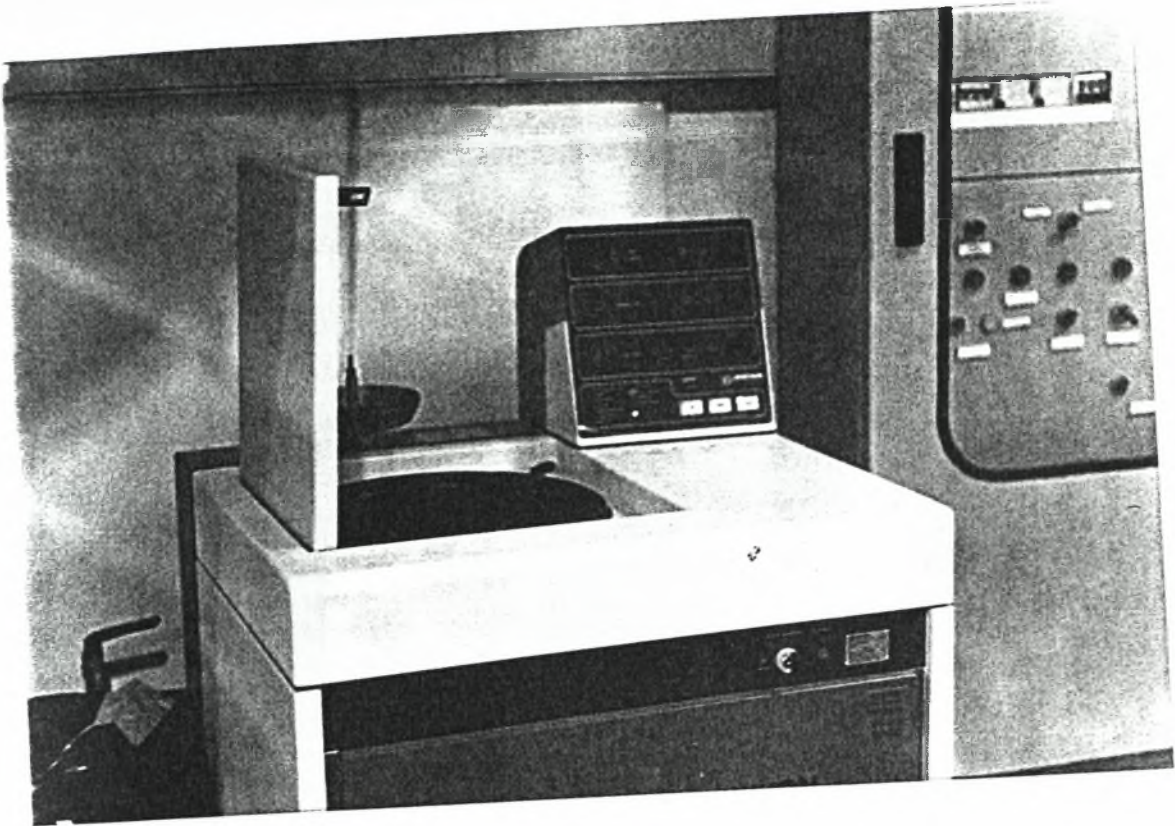


Φωτογραφία 5

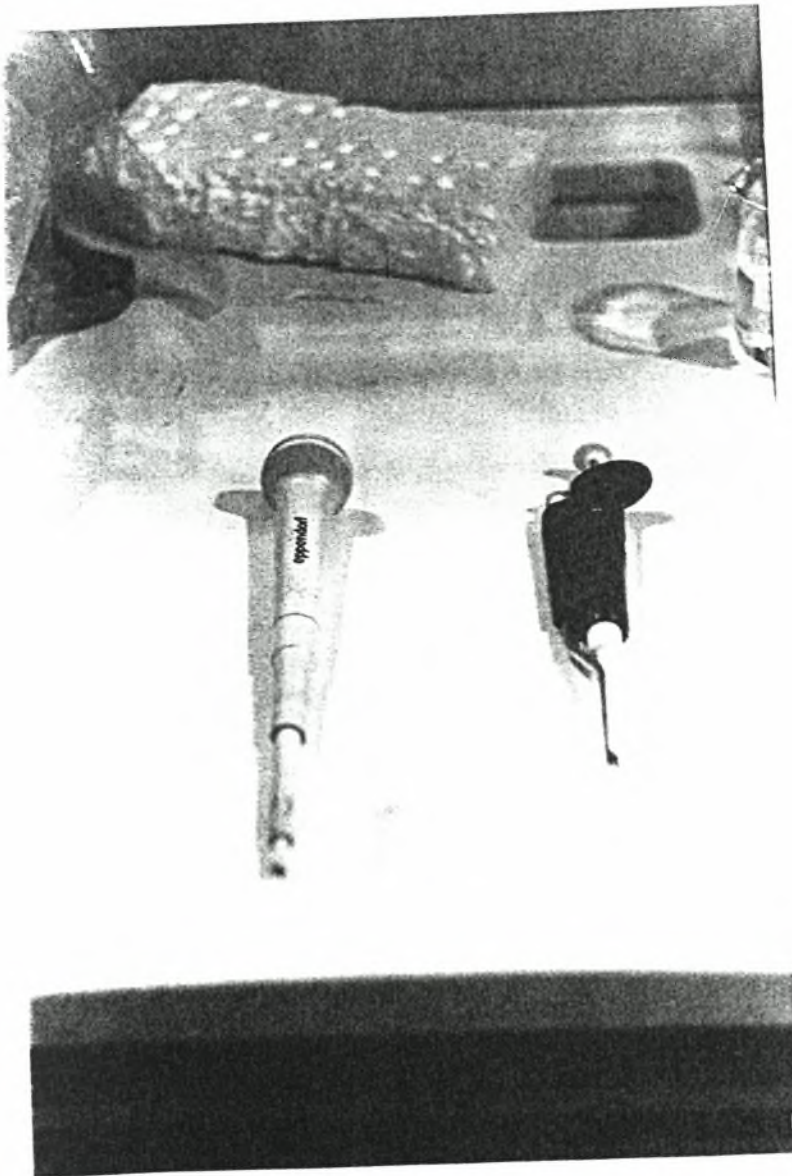
Δεξιά είναι μερικοί μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες και αριστερά ένας φυγοκεντρικός σωλήνας



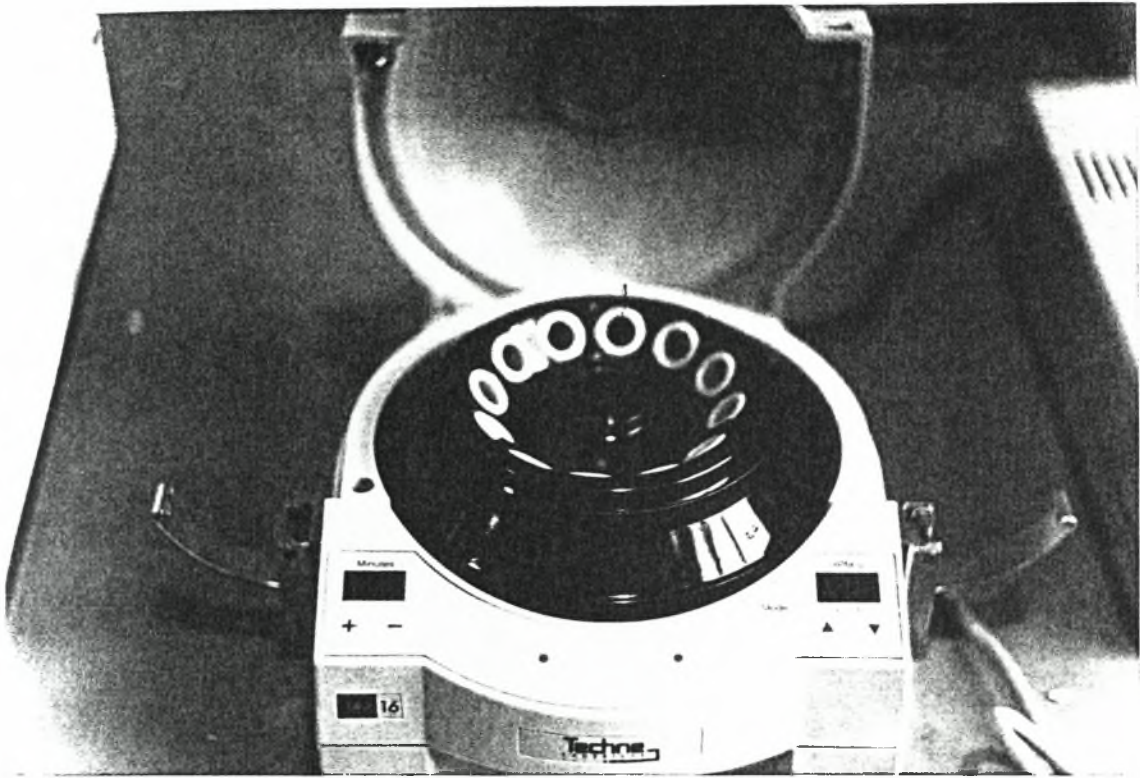
Φωτογραφία 6



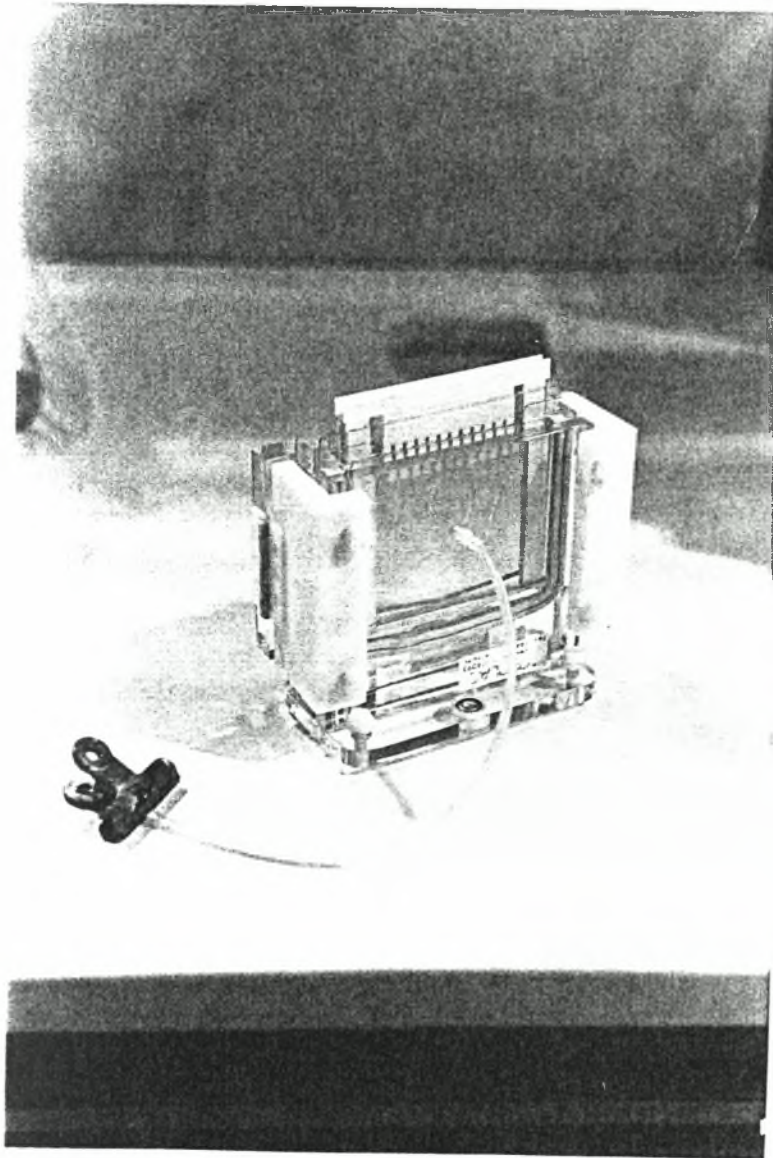
Φωτογραφία 7



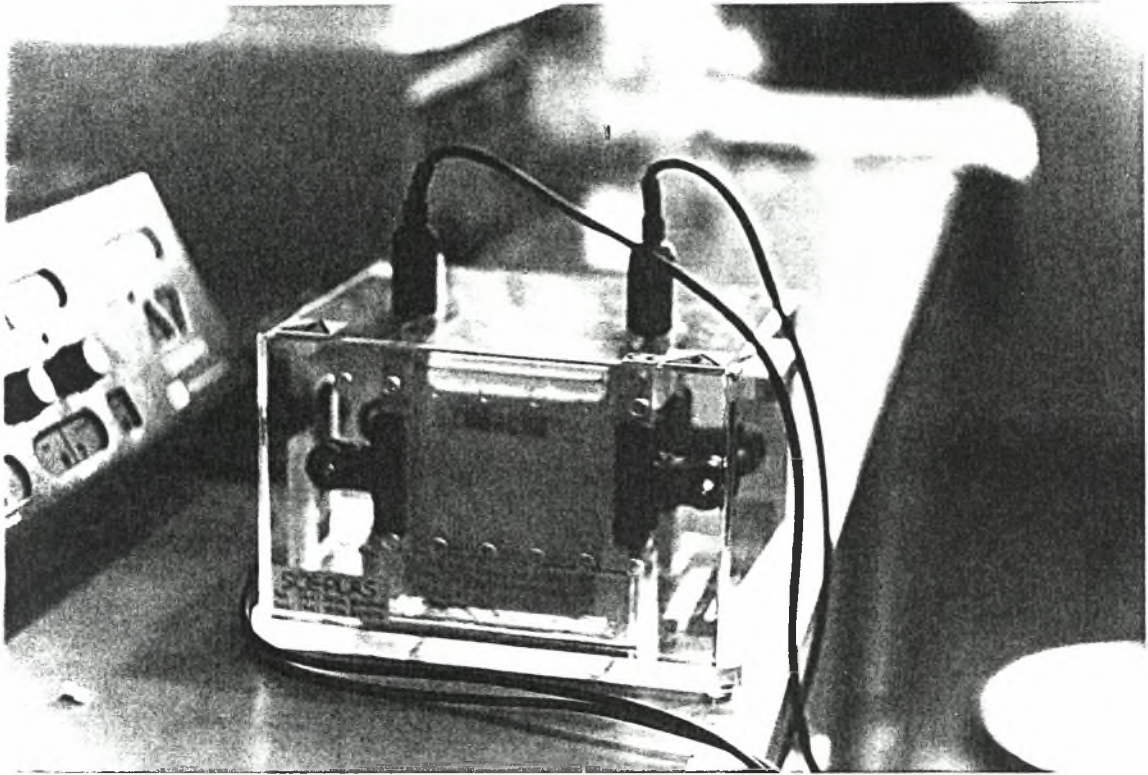
Φωτογραφία 8



Φωτογραφία 9



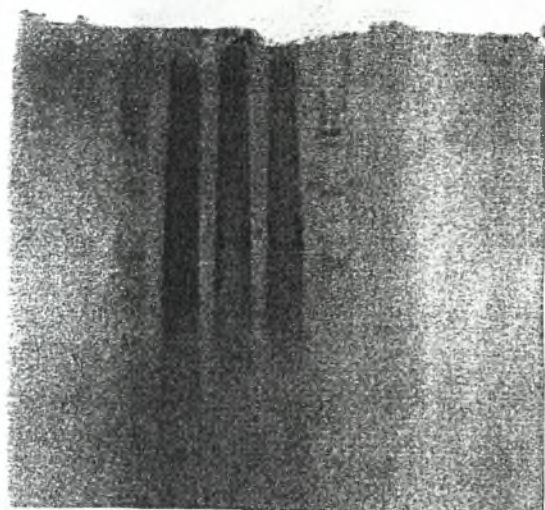
Φωτογραφία 10



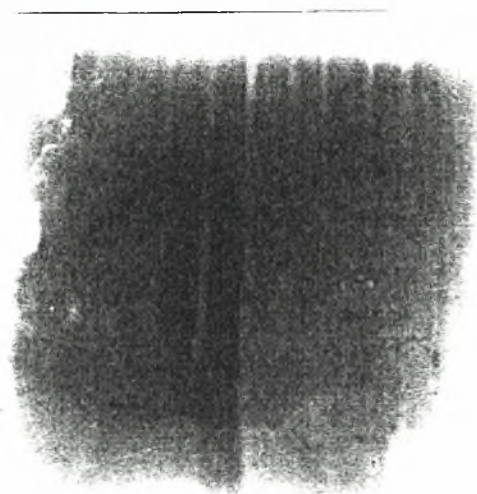
Φωτογραφία 11



Φωτογραφία 12



Φωτογραφία 13

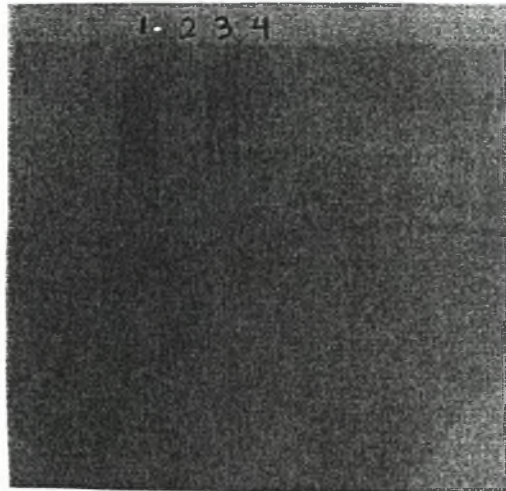


Φωτογραφία 14



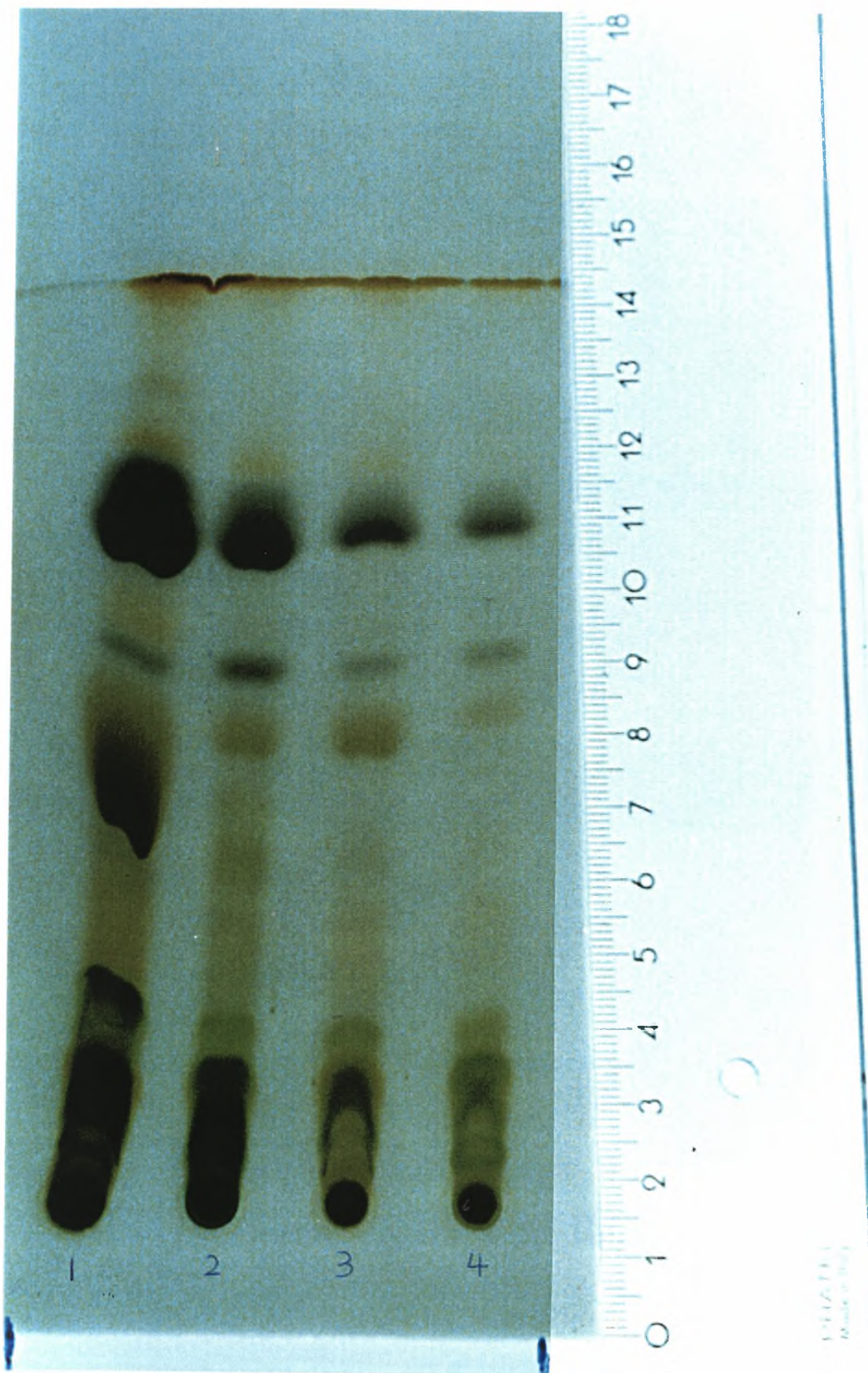
Φωτογραφία 15

1. δείγμα από φυτό χωρίς άνθη με τελική συγκέντρωση NaCl 600mM.
2. δείγμα από φυτό με άνθη με τελική συγκέντρωση NaCl 600mM.
3. δείγμα από φυτό χωρίς άνθη με τελική συγκέντρωση NaCl 800mM.
4. δείγμα από φυτό με άνθη με τελική συγκέντρωση NaCl 800mM.
5. δείγμα από φυτό χωρίς άνθη με τελική συγκέντρωση NaCl 1000mM.
6. δείγμα από φυτό με άνθη με τελική συγκέντρωση NaCl 1000mM.

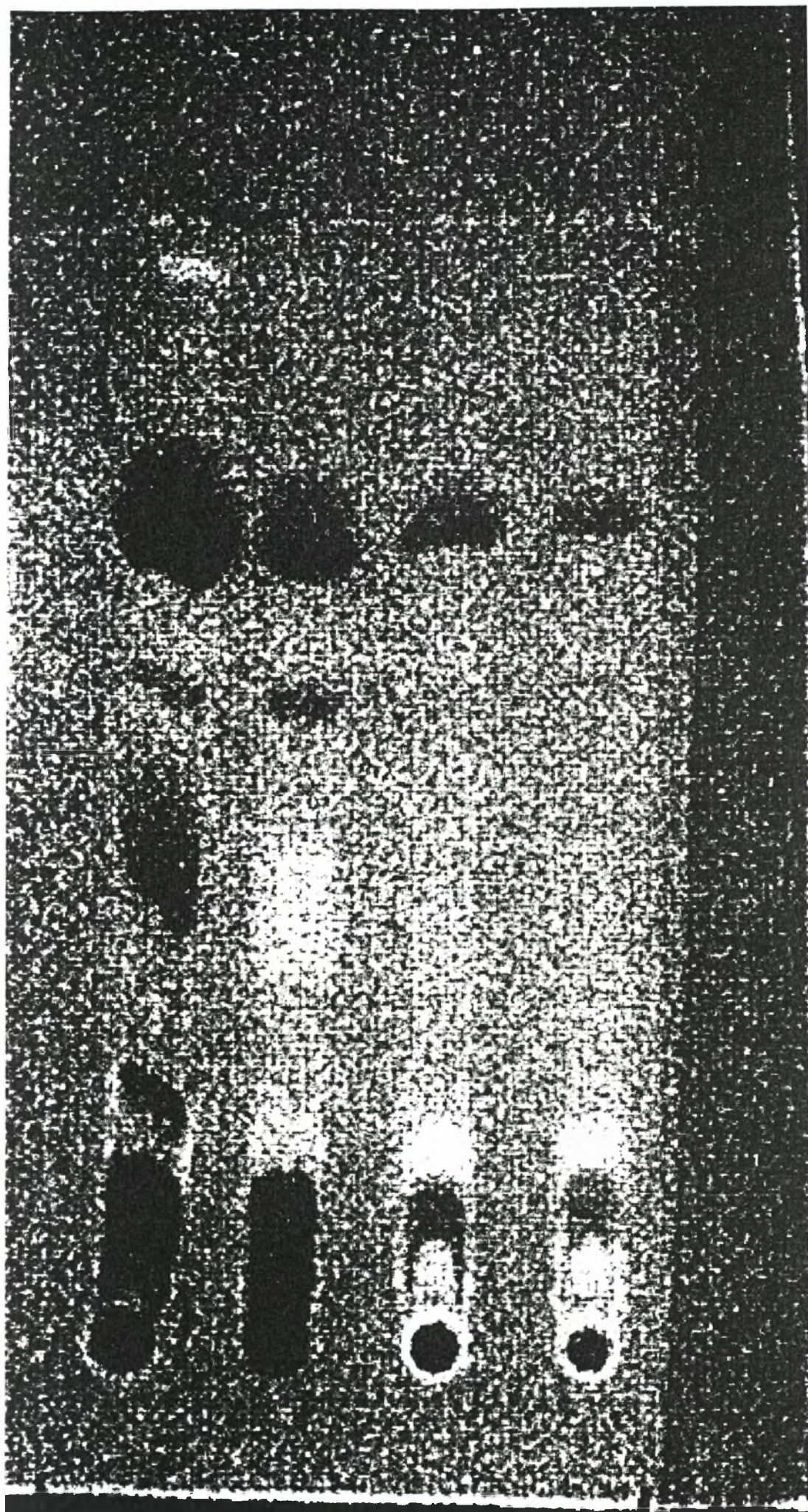


Φωτογραφία 16

1. δείγμα από χλωροπλάστες φυτού χωρίς άνθη
2. δείγμα από χλωροπλάστες φυτού με άνθη
3. δείγμα από μιτοχόνδρια φυτού χωρίς άνθη
4. δείγμα από μιτοχόνδρια φυτού με άνθη



Φωτογραφία 17



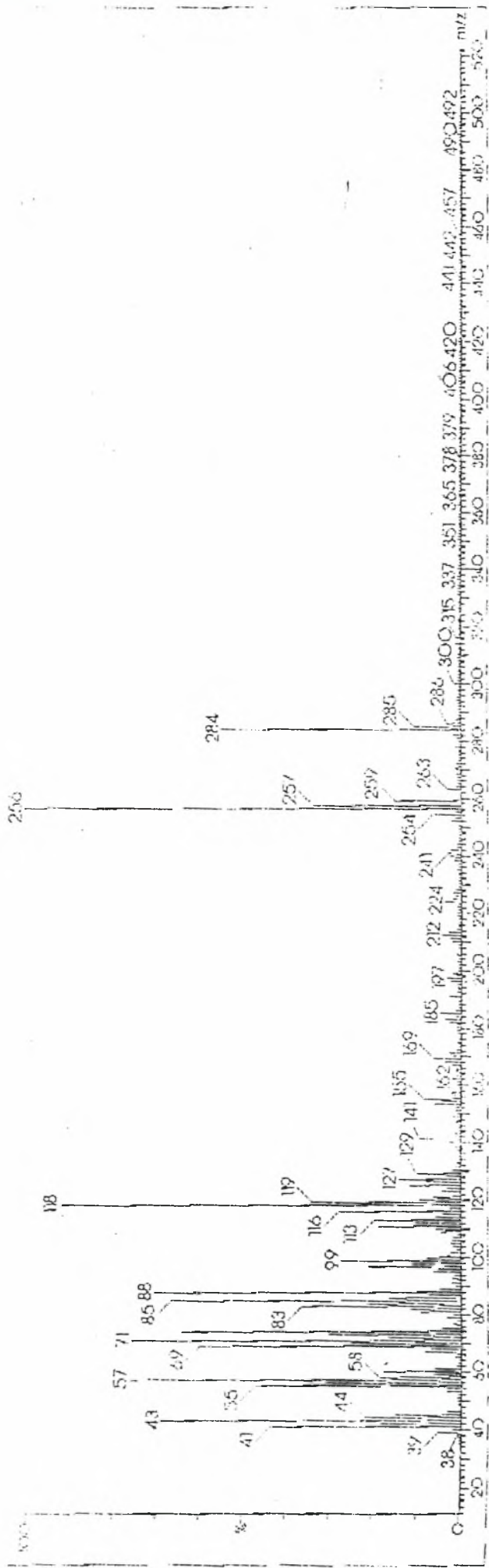
Φωτογραφία 18

Πίνακας 1. Τιμές Rf			
1	2	3	4
Χλωροπλάστες από ανθισμένα φυτά	Χλωροπλάστες από μη ανθισμένα φυτά	Μιτοχόνδρια από ανθισμένα φυτά	Μιτοχόνδρια από μη ανθισμένα φυτά
0,7/13	0,7/13	-	0.7/13
1,3/13	1,3/13	1/13 IR	1/13 IR
2/13	2/13	2/13	2/13
2,5/13	2,5/13	2.5/13*	2.5/13*
-	5.7/13 IR	-	-
6,7/13	6,7/13	6,7/13	6,7/13
7,5/13	7,5/13	7,5/13	7,5/13
9,5/13	9,5/13	9,5/13	9,5/13
10,4/13	10,4/13	10,4/13	-
11,3/13	-	-	-
12,5/13 IR	-	-	-

* Οι μπάντες αυτές εμφανίζονται τόσο στο ορατό όσο και στο υπέρυθρο φως.

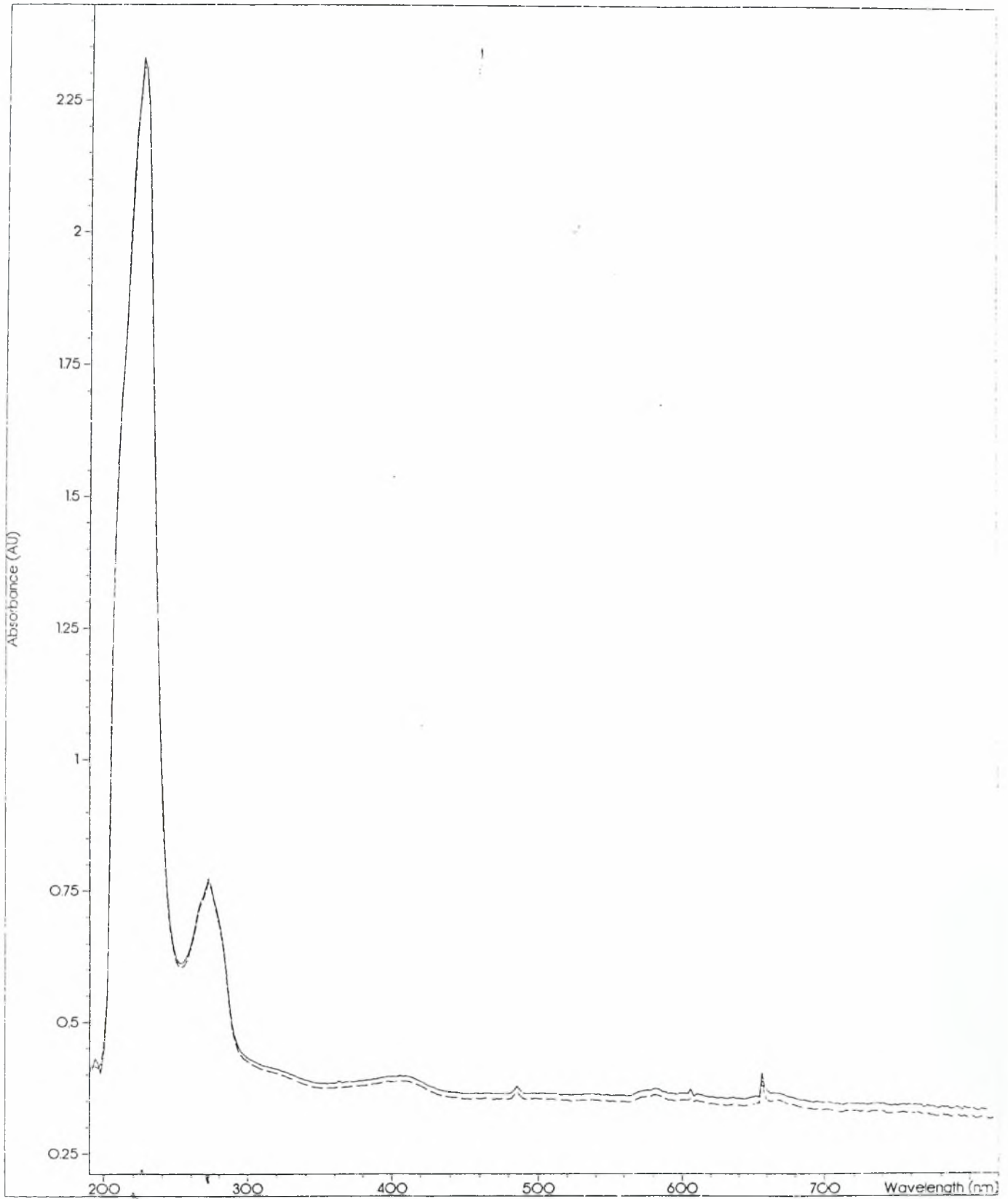
VG TRIO 2000 MASSLYNX DATA SYSTEM

CHLORSPM 31 (0.542)															Scan E+		
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten
1	35	1.76e3	0.04	0.00	90	125	4.55e5	11.33	0.66	179	215	6.34e3	0.16	0.01	268	310	4.86e3
2	36	6.78e3	0.17	0.01	91	126	3.07e5	7.65	0.45	180	216	1.04e4	0.26	0.02	269	311	1.44e3
3	37	7.94e3	0.20	0.01	92	127	5.49e5	13.67	0.80	181	217	9.66e3	0.24	0.01	270	312	1.22e4
4	38	1.34e4	0.33	0.02	93	128	1.10e5	2.73	0.16	182	218	4.61e3	0.11	0.01	271	313	4.80e3
5	39	1.89e5	4.72	0.28	94	129	3.93e5	9.80	0.57	183	219	2.23e4	0.55	0.03	272	314	2.71e4
6	40	5.99e4	1.49	0.09	95	130	6.14e4	1.53	0.09	184	220	1.22e4	0.30	0.02	273	315	1.13e4
7	41	1.74e6	43.27	2.53	96	131	2.15e4	0.54	0.03	185	221	1.22e4	0.30	0.02	274	316	8.19e3
8	42	7.21e5	17.96	1.05	97	132	2.12e4	0.53	0.03	186	222	2.07e4	0.52	0.03	275	317	3.30e3
9	43	2.75e6	68.57	4.01	98	133	2.25e4	0.56	0.03	187	223	1.16e4	0.29	0.02	276	318	2.06e3
10	44	8.64e5	21.53	1.26	99	134	1.27e4	0.32	0.02	188	224	1.40e5	3.49	0.20	277	319	4.10e3
11	45	6.27e5	15.61	0.91	100	135	4.30e4	1.07	0.06	189	225	5.96e4	1.49	0.09	278	320	5.12e3
12	47	1.12e5	2.78	0.16	101	136	2.59e4	0.64	0.04	190	226	4.22e4	1.05	0.06	279	321	2.26e3
13	48	3.04e3	0.08	0.00	102	137	5.07e4	1.26	0.07	191	227	5.35e4	1.33	0.08	280	322	9.66e3
14	49	3.04e3	0.08	0.00	103	138	3.97e4	0.99	0.06	192	228	3.64e4	0.91	0.05	281	323	9.66e3
15	50	1.19e4	0.30	0.02	104	139	1.21e5	3.01	0.18	193	229	7.49e3	0.19	0.01	282	324	4.67e3
16	51	1.87e4	0.47	0.03	105	140	1.27e5	3.16	0.19	194	230	1.08e4	0.27	0.02	283	325	2.05e3
17	52	1.02e4	0.26	0.01	106	141	3.60e5	8.98	0.53	195	231	6.14e3	0.15	0.01	284	326	2.77e3
18	53	1.08e5	2.68	0.16	107	142	5.84e4	1.45	0.09	196	232	5.12e3	0.13	0.01	285	327	1.13e3
19	54	1.09e5	2.70	0.16	108	143	7.17e4	1.79	0.10	197	233	7.49e3	0.19	0.01	286	328	7.74e3
20	55	1.88e6	46.94	2.75	109	144	3.23e4	0.80	0.05	198	234	4.99e3	0.12	0.01	287	329	2.88e3
21	56	1.23e6	30.61	1.79	110	145	1.43e4	0.36	0.02	199	235	1.21e4	0.30	0.02	288	330	2.93e3
22	57	3.05e6	75.92	4.44	111	146	1.84e4	0.46	0.03	200	236	1.12e4	0.28	0.02	289	331	2.86e3
23	58	7.33e5	18.27	1.07	112	147	3.71e4	0.92	0.05	201	237	1.06e4	0.26	0.02	290	332	3.04e3
24	59	2.43e5	6.05	0.35	113	148	8.19e3	0.20	0.01	202	238	4.61e4	1.15	0.07	291	333	2.69e3
25	60	6.92e5	17.24	1.01	114	149	7.27e4	1.81	0.11	203	239	5.09e4	1.27	0.07	292	334	3.38e3
26	61	2.28e5	5.69	0.33	115	150	1.74e4	0.43	0.03	204	240	8.19e4	2.04	0.12	293	335	1.68e3
27	62	2.66e4	0.66	0.04	116	151	3.38e4	0.84	0.05	205	241	9.22e4	2.30	0.13	294	336	7.23e3
28	63	9.79e3	0.24	0.01	117	152	3.43e4	0.85	0.05	206	242	8.09e4	2.02	0.12	295	337	9.02e3
29	64	5.06e3	0.13	0.01	118	153	2.33e5	5.82	0.34	207	243	1.69e4	0.42	0.02	296	338	4.80e3
30	65	3.64e4	0.91	0.05	119	154	1.89e5	4.72	0.28	208	244	1.69e4	0.42	0.02	297	339	2.22e3
31	66	2.59e4	0.64	0.04	120	155	3.24e5	8.06	0.47	209	245	7.17e3	0.18	0.01	298	340	2.54e3
32	67	3.15e5	7.86	0.46	121	156	5.22e4	1.30	0.08	210	246	2.83e3	0.07	0.00	299	341	2.61e3
33	68	2.56e5	6.38	0.37	122	157	7.58e4	1.89	0.11	211	247	6.66e3	0.17	0.01	300	342	1.90e3
34	69	2.39e6	59.59	3.49	123	158	2.25e4	0.56	0.03	212	248	5.44e3	0.14	0.01	301	343	1.82e3
35	70	9.99e5	24.90	1.46	124	159	1.32e4	0.33	0.02	213	249	7.36e3	0.18	0.01	302	344	1.94e3
36	71	3.03e6	75.51	4.42	125	160	1.63e4	0.41	0.02	214	250	7.49e3	0.19	0.01	303	345	2.34e3
37	72	6.51e5	16.22	0.95	126	161	1.63e4	0.41	0.02	215	252	8.50e4	2.12	0.12	304	346	2.27e3
38	73	1.20e6	29.80	1.74	127	162	6.40e4	1.59	0.09	216	253	4.07e4	1.01	0.06	305	347	1.95e3
39	74	2.56e6	63.67	3.72	128	163	2.51e4	0.63	0.04	217	254	2.47e5	6.15	0.36	306	348	2.90e3
40	75	1.59e5	3.95	0.23	129	164	1.12e4	0.28	0.02	218	255	3.30e4	0.82	0.05	307	349	1.86e3
41	76	3.33e4	0.83	0.05	130	165	2.64e4	0.66	0.04	219	256	4.01e6	0.00	0.00	308	350	5.12e3
42	77	5.38e4	1.34	0.08	131	166	2.53e4	0.63	0.04	220	257	1.34e6	33.47	1.96	309	351	6.46e3
43	78	1.72e4	0.43	0.02	132	167	6.66e4	1.66	0.10	221	259	5.90e5	14.69	0.86	310	352	4.48e3
44	79	1.08e5	2.68	0.16	133	168	1.34e5	3.34	0.20	222	263	1.12e5	2.78	0.16	311	354	1.97e3
45	80	4.94e4	1.23	0.07	134	169	2.32e5	5.79	0.34	223	264	2.36e4	0.59	0.03	312	355	1.81e3
46	81	3.56e5	8.88	0.52	135	170	5.02e4	1.25	0.07	224	265	9.66e3	0.24	0.01	313	356	1.39e3
47	82	4.46e5	11.12	0.65	136	171	1.02e5	2.55	0.15	225	266	1.89e4	0.47	0.03	314	356	1.79e3
48	83	1.44e6	35.92	2.10	137	172	2.61e4	0.65	0.04	226	267	2.41e4	0.60	0.04	315	357	1.44e3
49	84	8.44e5	21.02	1.23	138	173	9.86e3	0.25	0.01	227	268	2.43e4	0.61	0.04	316	358	2.42e3
50	85	2.65e6	66.12	3.87	139	174	1.33e4	0.33	0.02	228	269	7.04e3	0.18	0.01	317	359	1.66e3
51	86	6.43e5	16.02	0.94	140	175	2.00e4	0.50	0.03	229	270	4.56e4	1.14	0.07	318	360	2.08e3
52	87	2.87e5	7.14	0.42	141	176	5.70e3	0.14	0.01	230	271	1.01e4	0.25	0.01	319	361	1.95e3
53	88	2.82e6	70.20	4.11	142	177	1.69e4	0.42	0.02	231	272	2.74e4	0.68	0.04	320	362	3.07e3
54	89	1.80e5	4.49	0.26	143	178	9.22e3	0.23	0.01	232	273	8.00e3	0.20	0.01	321	363	1.65e3
55	90	3.10e4	0.77	0.05	144	179	2.05e4	0.51	0.03	233	274	3.89e3	0.10	0.01	322	364	4.80e3
56	91	6.35e4	1.58	0.09	145	180	1.72e4	0.43	0.02	234	275	4.35e3	0.11	0.01	323	365	5.57e3
57	92	1.87e4	0.47	0.03	146	181	2.15e4	0.54	0.03	235	276	3.81e3	0.09	0.01	324	366	4.05e3
58	93	6.45e4	1.61	0.09	147	182	9.11e4	2.27	0.13	236	277	6.21e3	0.15	0.01	325	367	2.51e3
59	94	4.66e4	1.16	0.07	148	183	1.30e5	3.24	0.19	237	278	3.76e4	0.94	0.05	326	368	1.87e3
60	95	2.37e5	5.89	0.34	149	184	3.58e4	0.89	0.05	238	279	1.11e4	0.28	0.02	327	369	1.44e3
61	96	1.96e5	4.87	0.29	150	185	1.78e5	4.44	0.26	239	280	2.05e4	0.51	0.03	328	370	1.73e3
62	97	8.31e5	20.71	1.21	151	186	3.00e4	0.75	0.04	240	281	1.87e4	0.47	0.03	329	371	1.66e3
63	98	4.30e5	10.71	0.63	152	187	9.22e3	0.23	0.01	241	282	6.48e4	1.61	0.09	330	373	2.50e3
64	99	1.08e6	26.94	1.58	153	188	9.22e3	0.23	0.01	242	284	2.20e6	54.69	3.20	331	374	1.31e3
65	100	3.03e5	7.55	0.44	154	189	1.13e4	0.28	0.02	243	285	4.10e5	10.20	0.60	332	374	1.73e3
66	101	1.11e5	2.76	0.16	155	191	9.11e4	2.27	0.13	244	286	1.16e5	2.88	0.17	333	375	1.70e3
67	102	7.68e4	1.91	0.11	156	192	2.02e4	0.50	0.03	245	287	3.38e4	0.84	0.05	334	376	2.10e3
68	103	3.20e4	0.80	0.05	157	193	1.54e4	0.38	0.02	246	288	1.72e4	0.43	0.02	335	377	1.78e3
69	104	5.53e4	1.38	0.08	158	194	2.23e4	0.55	0.03	247	289	6.34e3	0.16	0.01	336	378	5.76e3
70	105	7.78e4	1.94	0.11	159	195	1.97e4	0.49	0.03	248	290	4.29e3	0.11	0.01	337	379	4.67e3
71	106	6.27e4	1.56	0.09	160	196	8.40e4	2.09	0.12	249	291	6.21e3	0.15	0.01	338	380	2.98e3
72	107	5.15e4	1.28	0.07	161	197	1.15e5	2.86	0.17	250	292	6.08e3	0.15	0.01	339	381	1.49e3
73	108	2.66e4	0.66	0.04	162	198	3.38e4	0.84	0.05								



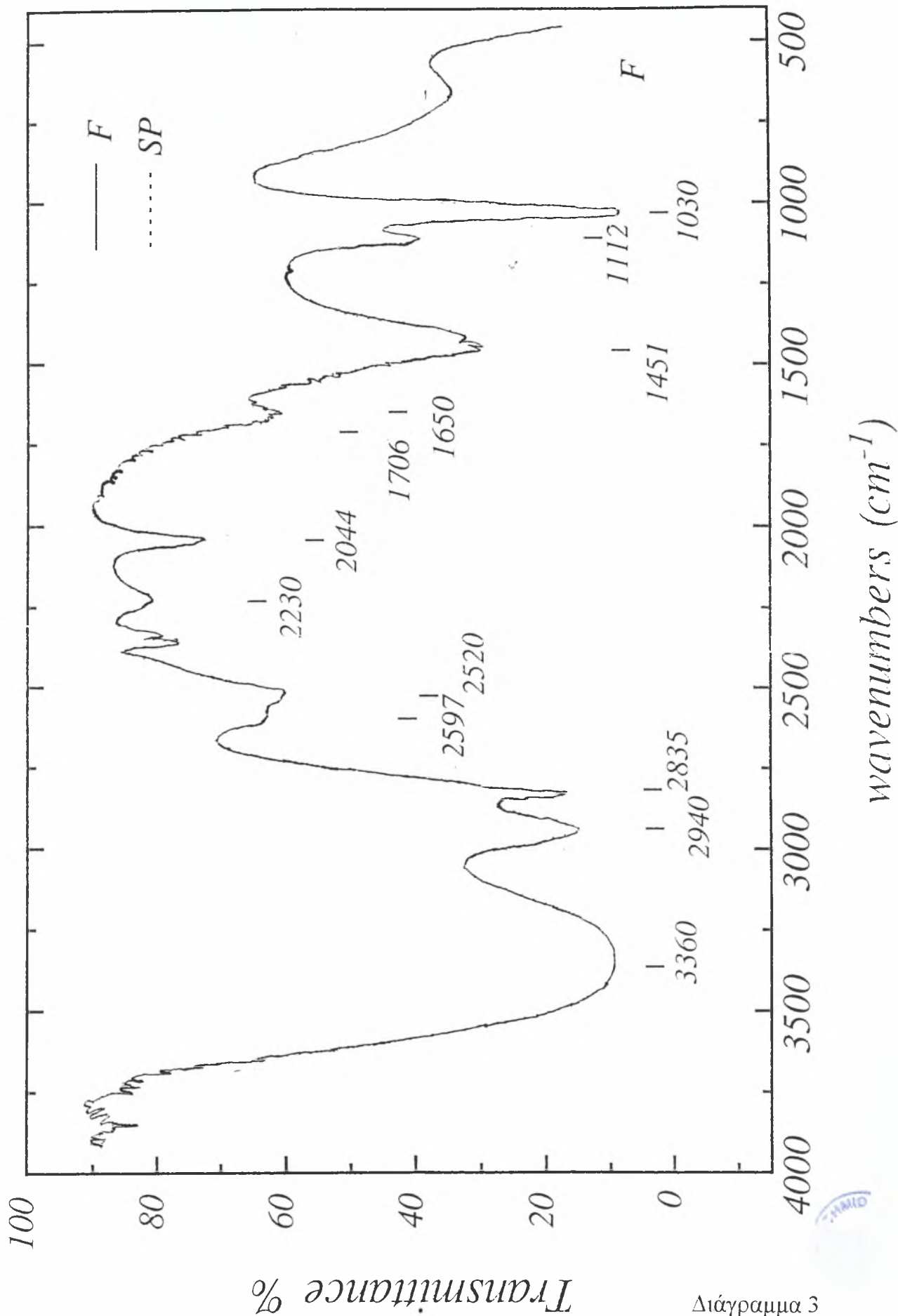
Διάγραμμα 1

Overlaid Sample Spectra



*** End ***

Διάγραμμα 2



Διάγραμμα 3