

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**“ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΟΦΟΡΟΥΣ
ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ “ΜΑΝΖΑΝΙΛΛΟ” &
“ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ” ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ (OLEA EUROPAEA L.) ΤΗΝ
ΧΕΙΜΕΡΙΝΗ ΠΕΡΙΟΔΟ ”**



ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Δ. ΜΠΑΝΙΑΣ

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

ΑΘΗΝΑ 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1. Φυτικό υλικό	4
1.1.1. Βοτανικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της Ελιάς.....	4
1.1.2. Η σημασία της ελαιοκαλλιέργειας.....	5
1.1.4. Ποικιλίες ελιάς	7
1.2. Το φαινόμενο της άνθησης	8
1.2.1. Οι βασικές αναπτυξιακές φάσης ενός φυτού.....	9
1.2.2. Μοριακή προσέγγιση της άνθησης.....	9
1.2.3. Μετάβαση από νεανική σε βλαστητική φάση-γονιδιακός έλεγχος.....	10
1.2.4. Γονιδιακός έλεγχος ανθικής επαγωγής.....	11
1.2.5. Μετάβαση από βλαστητική σε ανθική φάση - γονιδιακός έλεγχος.....	12
1.2.6. Γονιδιακός έλεγχος ανθικής κατασκευής.....	14
1.3. Η άνθιση στην ελιά	17
1.3.1. Οι οφθαλμοί της ελιάς	17
1.3.2. Επαγωγή-διαφοροποίηση ανθοφόρων οφθαλμών ελιάς	18
1.3.3. Παράγοντες που δύναται να επηρεάσουν την επαγωγή - διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών της ελιάς	19
1.3.4. Τα άνθη της ελιάς	22
1.4. Η πρωτεομική στη μελέτη των φυτών	24
1.4.1. Η πρωτεομική σαν εργαλείο μελέτης	24
1.4.2. Εφαρμογές πρωτεομικής στα φυτά	25
1.4.3. Η πρωτεομική στα δενδρώδη-πολυετή είδη	26
1.5. Η πρωτεομική στην ελιά	28
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
2.1. Πειραματικό υλικό	31

2.2. Εκχύλιση ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών και καθαρισμός τους	32
2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	34
2.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε κατακόρυφη πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE	37
2.4.1. Παρασκευή πηκτής.....	38
2.4.2. Χειρισμός δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (SDS-PAGE).....	41
2.4.3. Μέθοδοι χρώσης πηκτής.....	41
2.4.3.1. Χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250.....	41
2.4.3.2. Χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο.....	43
2.4.4. Υπολογισμός μοριακού μεγέθους πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	44
2.5. Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE)	46
2.5.1. Αναλυτική περιγραφή ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων.....	48
2.5.2. Χειρισμός δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων.....	52
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
3.1. Μακροσκοπική εξέταση πλάγιων οφθαλμών	54
3.2. Ανάλυση των πρωτεϊνών των πλάγιων οφθαλμών της ελιάς την περίοδο Φεβρουαρίου-Μαρτίου	55
3.2.1. Η πορεία της στάθμης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών	55
3.2.2. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σε πηκτή SDS.....	57
3.3. Συγκριτική εικόνα των πρωτεϊνών των πλάγιων οφθαλμών των δύο ποικιλιών ελιάς Manzanillo και Χαλκιδικής	64
3.3.1. Ανάλυση με SDS-PAGE.....	64
3.3.2. Ανάλυση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2-DE)	66
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	76
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	83

Το Θέμα της Μεταπτυχιακής Διατριβής στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας εγκρίθηκε στην Γενική Συνέλευση Τμήματος την 27/07/2009.

Ο Τίτλος του Θέματος όπως τροποποιήθηκε από το Εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών με το έγγραφο με Αρ. Πρωτ.226/24.06.2010 προς το Γραφείο Γραμματειακής υποστήριξης του ΠΜΣ του Τμήματος Γ. Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ, είναι:

« Μελέτη των πρωτεϊνών στους ανθοφόρους οφθαλμούς των ποικιλιών «Manzanillo» και «Χαλκιδικής» της ελιάς (*Olea europaea* L.) την χειμερινή περίοδο.»

Επιβλέπουσα: κ. Χριστίνα Κιτσάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) κ. Σ. Κίντζιος, Καθηγητής
- 2) κ. Γ. Αϊβαλάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής
- 3) κ. Χ. Κιτσάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την άμεση επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κ. Χ. Κιτσάκη, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

Η εργασία αυτή αποτελεί συνέχεια μιας σειράς μελετών του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Φυτών πάνω στο φαινόμενο της άνθησης στην ελιά, μιας καλλιέργειας με τεράστιο οικονομικό ενδιαφέρον για τη χώρα μας και όχι μόνο. Η συγκεκριμένη εργασία εστιάζεται στη μελέτη του πρωτεϊνικού χάρτη των ανθοφόρων οφθαλμών της ελιάς (*Olea europaea L.*). Το χρονικό διάστημα του πειράματος κάλυψε την περίοδο Φεβρουαρίου-Μαρτίου, περίοδος κατά την οποία λαμβάνουν χώρα κρίσιμα για την άνθηση γεγονότα στην εξέλιξη των ήδη διαφοροποιημένων πλάγιων οφθαλμών σε ανθοφόρους.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Χ. Κιτσάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου τη συγκεκριμένη μελέτη η οποία όμως δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς τη συνεχή βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές της. Επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής : Καθηγητή κ. Σ. Κίντζιο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι για τις πολύτιμες υποδείξεις τους. Ένα θερμό ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω και στις συναδέλφους Μαριάνθη και Ελένη για την βοήθεια που απλόχερα μου προσέφεραν.

Την εργασία με το συγκεκριμένο θέμα την αφιερώνω στη μνήμη του πατέρα μου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου.

Αναστάσιος Δ. Μπανιάς

Αθήνα 2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τελευταία όλο και περισσότερα ερευνητικά δεδομένα προστίθενται στο φαινόμενο της “αλλαγής φάσης” από τη βλαστική στην αναπαραγωγική φάση, τα οποία έχουν αποκαλύψει την εμπλοκή ειδικών γόνων στην αλλαγή φάσης του κορυφαίου μεριστώματος του βλαστού (TP gene στο καλαμπόκι, AGL20 και LFY σε *Arabidopsis* και *Antirrhinum*).

Στη παρούσα εργασία επιλέξαμε την προσέγγιση μέσω της αναμενόμενης διαφορετικής έκφρασης του ελέγχου της εξέλιξης πλάγιων οφθαλμών από το χειμώνα μέχρι την άνοιξη

Η προσέγγιση πραγματοποιήθηκε σε πρωτεϊνικό επίπεδο μέσω SDS-PAGE και 2-DE. Χρησιμοποιήθηκαν πλάγιοι οφθαλμοί, από δύο ποικιλίες ελιάς την Manzanillo και την Χαλκιδικής. Έγινε ανάλυση με SDS-PAGE και 2-DE πλάγιων οφθαλμών την περίοδο Φεβρουαρίου-Μαρτίου και ταυτόχρονα σύγκρισή τους στις δύο ποικιλίες.

Την περίοδο Φεβρουαρίου-Μαρτίου, η συγκέντρωση των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών ακολουθεί κυματοειδή καμπύλη με υψηλότερες τιμές την 29/2, 20/3 και χαμηλότερη την 15/2. Το γενικό πρωτεϊνικό προφίλ ήταν παρόμοιο μεταξύ των ποικιλιών. Και στις δύο ποικιλίες, απομονώθηκαν οι περισσότερες πρωτεΐνες, καλύπτοντας σχεδόν όλο το εύρος από 19 έως 164 kDa. Η περιοχή με τις περισσότερες αριθμητικά όσο και ισχυρότερα εκφραζόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες εμφανίστηκαν σχεδόν σε όλες τις ημερομηνίες και κοινές και στις δύο ποικιλίες ήταν μεταξύ 40 και 56 kDa. Οι μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες, εμφανίζονται και στις δύο ποικιλίες, αν και στην Manzanillo σε λιγότερες ημερομηνίες.

Με την προσομοίωση των 2-DE χαρτών προσδιορίστηκαν στις 29/2, 35 κηλίδες στη Manzanillo και 39 στη Χαλκιδικής ενώ στις 20/3, 37 κηλίδες στη Manzanillo και 30 στη Χαλκιδικής. Μερικές κηλίδες ήταν πιο έντονες. Διαπιστώθηκαν κηλίδες σε όλο το εύρος του pH (4-7), μερικές με το ίδιο MB και διαφορετικό p I. Και στις δύο ποικιλίες οι διαφορετικές κηλίδες ήταν περισσότερες από τις κοινές, μεταξύ των δύο δειγματοληψιών 29/2 και 20/3.

Τα δεδομένα μας για τις ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές των πρωτεϊνών εκφράζουν τον διαφοροποιημένο έλεγχο στην εξέλιξη των πλάγιων οφθαλμών της ελιάς στις διαφορετικές ημερομηνίες της περιόδου Φεβρουαρίου-Μαρτίου

ABSTRACT

Last more and more research data are added to the phenomenon of "phase change" from the vegetative to reproductive phase, which have revealed the involvement of specific genes in the change phase of the top of the shoot meristem (TP gene in corn, AGL20 and LFY in Arabidopsis and Antirrhinum).

In this work we chose the approach through the expected differential expression of the control of lateral bud development from winter to spring.

The approach was at the protein level by SDS-PAGE and 2-DE. We used lateral buds from two olive varieties, Manzanillo and Chalkidiki. Lateral buds were analyzed by SDS-PAGE and 2-DE during the period of February-March, while comparing them to the two varieties.

During February-March, the concentration of the total soluble water proteins follows a wave curve with higher values on 29/2, 20/3 and the lowest on 15/2. The overall protein profile was similar between the varieties. For both varieties most proteins were isolated, covering almost the entire range from 19 to 164 kDa. The region with the biggest number and the strongest expressed proteins, which appeared in almost all the dates and were common to both varieties was between 40 and 56 kDa. The low and high molecular weight proteins appear in both varieties, although in Manzanillo on fewer dates.

By simulating the 2-DE maps, 35 spots in Manzanillo and 39 in Chalkidiki were identified on 29/2, while 37 spots in Manzanillo and 30 in Halkidiki on 20/3. Some spots were more severe. There were spots in the whole range of pH (4-7), some with the same MB and different p I. To both varieties the different spots were more than the common ones between the two samples of 29/2 and 20/3.

Our data on the qualitative and quantitative changes in proteins express the diverse control on the development of lateral buds of the olive trees on different dates for the period February-March.

Σκοπός εργασίας

Η σημασία του δένδρου της ελιάς απορρέει κυρίως από την παραγωγή του ελαιόλαδου και των ιδιοτήτων του, και των βρώσιμων επιτραπέζιων ελιών, καθώς και των αντιοξειδωτικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων πολλών συστατικών της.

Πρόσφατες αναφορές υποστηρίζουν ότι ο σχηματισμός των ανθοφόρων οφθαλμών είναι μια διαδικασία που διακρίνεται σε δύο στάδια των οποίων τα χρονικά όρια είναι δύσκολο να καθοριστούν. Το πρώτο στάδιο καλείται επαγωγή και σε αυτό λαμβάνουν χώρα κυρίως φυσιολογικές μεταβολές και το δεύτερο διαφοροποίηση στο οποίο συμβαίνουν ανατομικές μεταβολές κατά τις οποίες σχηματίζονται οι τυπικοί ιστοί των ανθέων. Η συγκεκριμένη εργασία έχει ως σκοπό την μελέτη των διαφοροποιημένων σε ανθοφόρους οφθαλμών σε δύο ποικιλίες ελιάς (Manzanillo, Χαλκιδικής). Στην παρούσα εργασία δίνεται έμφαση στην πορεία των μεταβολών των πρωτεϊνών.

Έχοντας ως δεδομένο τον τρόπο καρποφορίας της ελιάς (παρ. 1.1), προκύπτουν για την επαγωγή της άνθησης ορισμένες προϋποθέσεις, κατά την περίοδο χειμώνα με αρχές της άνοιξης όπως η εκδήλωση της επαγωγής αυτής των οφθαλμών με διαφορετική διαφοροποιητική διαδικασία, μεταξύ των μεριστωμάτων που θα εξελιχθούν σε ανθικά και εκείνων που θα συνεχίσουν ως βλαστητικά.

Η διερεύνηση της υπόθεσης εργασίας που τέθηκε είναι δυνατή με διάφορες προσεγγίσεις. Στη παρούσα εργασία επιλέξαμε την προσέγγιση μέσω της αναμενόμενης διαφορετικής έκφρασης του ελέγχου της εξέλιξης πλάγιων οφθαλμών από το χειμώνα μέχρι την άνοιξη με :

- Σάρωση της γενικής εικόνας των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών πλάγιων οφθαλμών για το χρονικό διάστημα χειμώνας-άνοιξη με πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE),
- Διεξοδική ανάλυση του πρωτεϊνικού χάρτη των πλάγιων οφθαλμών, με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DElectrophoresis) όταν οι πλάγιοι οφθαλμοί είναι ήδη όπως είπαμε “καθορισμένοι” ως ανθοφόροι.

Το εγχείρημα αν και εκ πρώτης όψης δείχνει ιδιαίτερα ενδιαφέρον ενέχει αρκετές δυσκολίες οι οποίες έχουν να κάνουν με το καθαυτό φυτικό υλικό στο οποίο η παρουσία διαφόρων συστατικών (φαινολικών ουσιών, ελαίων κ.α) είναι ανασταλτικός παράγοντας ο οποίος δυσχεραίνει την παραλαβή πρωτεϊνών.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Φυτικό υλικό

1.1.1. Βοτανικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της Ελιάς

Άθροισμα : Σπερματόφυτα

Υποάθροισμα : Αγγειόσπερμα

Κλάση : Δικοτυλήδονα (*Magnoliatae*)

Υποκλάση : *Asteridae*

Υπερτάξη : *Lamianeae*

Τάξη : *Oleales*

Η ελιά ανήκει στην τάξη *Oleales* και στην οικογένεια *Oleaceae*, η οποία περιλαμβάνει πάνω από 25 γένη. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι τα:

Olea, *Syringa*, *Forsythia*, *Ligustrum*, *Fraxinus* και *Fhillyrea*

Το γένος *Olea* περιλαμβάνει 30 διαφορετικά είδη, με γεωγραφική εξάπλωση και στις πέντε ηπείρους. Το είδος *Olea europaea* περιλαμβάνει τρία υποείδη, το *Euromediterranea*, το *Laperrini* και το *Guspidata* και κάθε υποείδος διάφορες ποικιλίες (Ποντίκης, 1992).

Είναι δένδρο αειθαλές, πολυετές που φθάνει μέχρι ύψους 5-20 μέτρα, ξυροφυτικό που απαιτεί 30-100 mm βροχόπτωσης ετησίως. Το ελαιόδεντρο προτιμάει ήπιο καιρό κατά το χειμώνα και θερμό και σχετικά ξηρό κατά το καλοκαίρι. Ανέχεται αυξημένες θερμοκρασίες (40-42 °C) κατά το καλοκαίρι, όταν υπάρχει αρκετή διαθέσιμη υγρασία στο έδαφος. Υποφέρει το χειμώνα αλλά και την άνοιξη, αν η θερμοκρασία κατέβει στους -5 έως -6 °C. Τα φύλλα της είναι μικρά, δερματώδη καλυμμένα με παχύ στρώμα εφυμενίδας και στις δύο επιδερμίδες και με πολλά βυθισμένα στομάτια με μικρό άνοιγμα στην κάτω επιδερμίδα. Για το λόγο αυτό το ελαιόδεντρο κατατάσσεται στα ξηρόφυτα χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν έχει ανάγκη από αρδεύσεις, για μια ορθολογική εκμετάλλευση των φυτειών της. Η ελιά παρενδιαυτοφορεί (καρποφορία κάθε δεύτερο χρόνο), φαινόμενο που οφείλεται σε ένα σύνολο παραγόντων, όπως ποικιλία, κλάδεμα, λίπανση, άρδευση, μέγεθος φορτίου κατά το χρόνο της πλήρους εσοδείας κ.λ.π. (Μπαλατσούρας, 1992).

Η ελιά καρποφορεί σε ξύλο του παρελθόντος έτους από ανθοφόρους οφθαλμούς. Ειδικότερα, φέρει ξυλοφόρους (βλαστοφόρους) και ανθοφόρους οφθαλμούς. Η διάκριση μεταξύ ξυλοφόρων και ανθοφόρων οφθαλμών, μακροσκοπικά, είναι πολύ δύσκολη. Οι ξυλοφόροι οφθαλμοί απαντούν επάκρια ή πλάγια των βλαστών και οι μικτοί ανθοφόροι μόνο πλάγια αυτών. Ο ξυλοφόρος οφθαλμός εκπτυσσόμενος την άνοιξη, δίνει βλαστό επεκτάσεως ή πλάγια βλάστηση με φύλλα και ξυλοφόρους ή μικτούς ανθοφόρους οφθαλμούς στις μασχάλες αυτών. Ο ανθοφόρος οφθαλμός εκτύσσεται την άνοιξη και δίνει επάκρια βοτρυώδη ταξιανθία με άνθη, τα οποία, αν γονιμοποιηθούν, εξελίσσονται σε καρπούς. Σε μερικές ποικιλίες οι ανθοφόροι οφθαλμοί είναι μικτοί για το λόγο ότι εκτός από την ταξιανθία δίνουν και μικρά φυλλάρια. Μεγάλος αριθμός απ' τους ξυλοφόρους οφθαλμούς παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση (Ποντίκης, 1997). Η ελιά καρποφορεί σε ξύλο του παρελθόντος έτους από μικτούς ανθοφόρους οφθαλμούς. Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη σφαιρική ή ελλειψοειδής και σχηματίζεται, όπως και στα πυρηνόκαρπα (ροδακινιά, βερικοκιά και δαμασκηνιά), από ιστούς των καρπόφυλλων (Ποντίκης, 1981). Ο καρπός της ελιάς ακολουθεί τον τύπο αύξεσης κατά διπλή σιγμοειδή καμπύλη. Η αύξεση του καρπού δηλαδή πραγματοποιείται σε δύο ξεχωριστές φάσεις, οι οποίες αντιστοιχούν σε δύο σιγμοειδείς καμπύλες με παρεμβολή μιας σύντομης φάσης ανάκαμψης της αύξεσης. Ο καρπός της ελιάς επομένως αυξάνει σε τρία στάδια (ταχεία ανάπτυξη - βραδεία - ταχεία), στα οποία συμπληρώνεται η ανάπτυξη όλων των μερών του καρπού (Δροσόπουλος, 1989).

1.1.2. Η σημασία της ελαιοκαλλιέργειας

Η ελιά καλλιεργείται από αρχαιοτάτων χρόνων στις παραμεσόγειες περιοχές, ένας “πυρήνας” όπου συγκεντρώνεται το 95% περίπου της παγκόσμιας καλλιέργειας της εξαιτίας των ιδιαίτερων κλιματολογικών συνθηκών που χαρακτηρίζουν την περιοχή, όπως ήπιοι χειμώνες και θερμά, ξηρά καλοκαίρια (Δροσόπουλος, 1994).

Η ελαιοκαλλιέργεια διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην οικονομία των χωρών, όπου έχει αναπτυχθεί. Τα κυριότερα προϊόντα, που παράγονται από την καλλιέργεια της, είναι το ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές. Από τα δύο αυτά προϊόντα μεγαλύτερη διατηρητική αξία και οικονομική σημασία έχει το ελαιόλαδο. Σ' αυτά πρέπει να προστεθεί και το πυρηνέλαιο που προορίζεται για βιομηχανική χρήση. Επίσης οικονομική σημασία έχουν και κάποια υποπροϊόντα της ελιάς όπως το ξύλο και ο πυρήνας, που χρησιμοποιούνται ως καύσιμη ύλη.

Η καλλιέργεια της ελιάς σε όλη την υφήλιο καλύπτει μια έκταση περίπου 870 εκατομμυρίων στρεμμάτων, ο δε αριθμός των ελαιόδενδρων ανέρχεται σε περίπου 850 εκατομμύρια. Ετησίως παράγονται περισσότεροι από 10 εκατομμύρια τόνοι ελιάς ανά τον κόσμο, το 90% των οποίων προορίζεται για παραγωγή ελαιολάδου ενώ το υπόλοιπο 10% ως επιτραπέζιες, βρώσιμες ελιές (World Catalogue of Olive Varieties, 2000). Στην Ελλάδα είναι η πρώτη σε σπουδαιότητα δενδρώδης καλλιέργεια, αφού καταλαμβάνει σε έκταση το 15% περίπου της καλλιεργούμενης γης και το 75% των εκτάσεων που είναι φυτεμένες με δένδρα. Με την καλλιέργεια της ελιάς απασχολείται περίπου το 1/3 του αγροτικού πληθυσμού της χώρας, ενώ σε πολλές περιοχές το ελαιόλαδο αποτελεί το αποκλειστικό εισόδημα των αγροτών. Η Ελλάδα είναι η τρίτη χώρα στο κόσμο (μετά την Ισπανία και την Ιταλία) στη παραγωγή ελαιολάδου. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν γύρω στα 130 εκατομμύρια ελαιόδενδρα, ενώ ετησίως παράγονται περίπου 300 χιλ. τόνοι ελαιολάδου άριστης ποιότητας, από το οποίο 100 χιλ. τόνοι εξάγονται. Παράγονται επίσης 70 χιλ. τόνοι επιτραπέζιες ελιές από τις οποίες οι μισές εξάγονται, καθώς και 25 χιλ. τόνοι πυρηνέλαιο. Με τα προϊόντα της αυτά η ελιά συμμετέχει κάθε χρόνο κατά 2% στα συνολικά εθνικά έσοδα και κατά 15% στο εθνικό αγροτικό εισόδημα (Γεωργία-Κτηνοτροφία, 2002).

Εκτός όμως από την οικονομική παράμετρο, τα διάφορα προϊόντα της ελιάς και κυρίως το λάδι της έχουν ιδιαίτερη όπως αναφέρθηκε διατροφική και φαρμακευτική σημασία. Το ελαιόλαδο, βασικό συστατικό της λεγόμενης Μεσογειακής διαίτας, πλούσιο σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα συμβάλει στην πρόληψη των διαφόρων καρδιαγγειακών παθήσεων. Επίσης στα φύλλα της ελιάς αλλά και στον καρπό και στο λάδι περιέχονται αρκετές φαινολικές ενώσεις (ελαιοευρωπαϊνή, υδροξυτυροσόλη) και παράγωγα τους με αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (<http://www.iama.gr/ethno/mytilini/moulas.html>).

1.1.3. Ποικιλίες ελιάς

MANZANILLO

Είναι ζωνρή ποικιλία με υψηλά δέντρα και πολύ αναπτυγμένη κόμη. Οι κύριοι βραχίονες είναι ανοιχτοί και οι κλάδοι επιμηκυσμένοι και ελαφρώς κρεμάμενοι προς το έδαφος κατά τα άκρα. Γενικά η κόμη είναι αραιή, με αποτέλεσμα να αερίζεται και να φωτίζεται παντού. Ανθοφορεί άφθονα και δένει μεμονωμένους καρπούς που έχουν μέσο μέγεθος και συμμετρικό σχήμα, (στο σχήμα του καρπού οφείλει η ποικιλία και την ονομασία της). Αρχικά έχει χρώμα πράσινο με λευκά στίγματα, στο στάδιο όμως της πλήρους ωριμότητας το χρώμα γίνεται μαλανωιόδες. Ο πυρήνας είναι λίγο περισσότερο επιμηκυσμένος αναλογικά με τον καρπό, είναι μικρού μεγέθους (μικροπύρηνη ποικιλία), ελλειψοειδής ως προς το σχήμα, που καταλήγει σε μικρή άκανθα. Ευδοκμεί σε περιοχές με ήπιο κλίμα, σε εδάφη προσχωσιγενή. Ο καρπός χρησιμοποιείται ως πράσινος Ισπανικού τύπου, ενώ το τελικό προϊόν έχει άριστες οργανοληπτικές ιδιότητες (Μπαλατσούρας, 1992).

ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ

Πρόκειται για ποικιλία που καλλιεργείται κυρίως στη χερσόνησο της Χαλκιδικής. Είναι γνωστή και ως Γαϊδουρολιά, λόγω του μεγάλου σχετικά μεγέθους των καρπών. Είναι ποικιλία αδρόκαρπη, παράγουσα καρπό κυλινδροκωνικού σχήματος, που καταλήγει σε αληθοφανή θηλή. Το βάρος κατά καρπό κυμαίνεται μεταξύ 4 και 14 g, συνηθέστερα όμως μεταξύ 6 και 10. Το χρώμα της επιδερμίδας αλλάζει διαδοχικά, με την πρόοδο της ωριμάνσεως, από πράσινο σε πράσινο-κίτρινο, αχυροκίτρινο, ρόδινο και καταλήγει σε ξεθωριασμένο ερυθρόμαυρο, ποτέ όμως σε βαθύ-μαύρο. Αυτό είναι το μειονέκτημα της ποικιλίας που αποκλείει τη χρησιμοποίηση του καρπού της για την παρασκευή φυσικώς ώριμων ελιών σε άλμη. Κατά μέσο όρο 120-140 καρποί ζυγίζουν 1 Kgr, στην περίπτωση που το μέγεθος του φορτίου κατά δέντρο είναι κανονικό. Παράλληλα η σχέση σάρκας προς πυρήνα του καρπού ισούται με 10:1 κατά μέσο όρο. Η απόδοση σε λάδι είναι 19-20 % το οποίο είναι μέσης ποιότητας. Υπολογίζεται ότι η μισή παραγωγή της ποικιλίας Χαλκιδικής χρησιμοποιείται ως πράσινη Ισπανικού τύπου και η υπόλοιπη οδηγείται στα ελαιουργεία για την παραγωγή λαδιού (Μπαλατσούρας, 1992).

1.2. Το φαινόμενο της άνθησης

1.2.1. Οι βασικές αναπτυξιακές φάσεις ενός φυτού

Η άνθηση αποτελεί το βασικό στάδιο των διεργασιών της αναπαραγωγικής διαδικασίας στο βιολογικό κύκλο των ανώτερων φυτών. Θεωρείται από τα πλέον σύνθετα βιολογικά φαινόμενα αφού προϋποθέτει και περιλαμβάνει πολύπλοκες διεργασίες, οι οποίες είναι διαφορετικές από τις συνήθεις φυσιολογικές διεργασίες που εξασφαλίζουν την επιβίωση και διαίونيση καθενός φυτικού οργανισμού (δημιουργία ειδικών “αναπαραγωγικών οργάνων”, μειωτική διαίρεση για τη δημιουργία γαμετών κ.λ.π).

Οι περισσότερες πληροφορίες αναφορικά με τις διεργασίες που σχετίζονται με την αναπαραγωγική διαδικασία των φυτών έχουν ως αφετηρία το οικονομικό ενδιαφέρον των φυτών και ως εκ τούτου είναι αποτέλεσμα έρευνας φυτών οικονομικής σημασίας όπως, φυτά μεγάλης καλλιέργειας, καλλωπιστικά και αρωματικά φυτικά είδη. Από την πλευρά της βοτανικής το άνθος αποτέλεσε και αποτελεί βασικό εργαλείο μελέτης των ανώτερων φυτών.

Ορισμένα φυτά κυρίως ετήσια έχουν τη δυνατότητα να ανθήσουν μέσα σε λίγες εβδομάδες από τη βλάστησή τους (*Arabidopsis thaliana*). Αντίθετα στα πολυετή μεσολαβεί ένα διάστημα αρκετών χρόνων το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να ξεπεράσει και τα είκοσι χρόνια όπως για παράδειγμα στα δασικά είδη, πριν αυτά αποκτήσουν τη φυσική δυνατότητα να παράγουν άνθη. Η διαφορά αυτή μεταξύ των διαφόρων φυτικών ειδών υποδηλώνει ότι μια σειρά παραγόντων, τόσο ενδογενών στο φυτό όσο και περιβαλλοντικών υπεισέρχονται στον έλεγχο της άνθησης. Μια από τις πλέον εδραιωμένες αρχές που διέπουν το φαινόμενο της άνθησης είναι το γεγονός ότι, δεν θα καταστεί ποτέ δυνατόν ένα φυτό να ανθοφορήσει εάν προηγουμένως τα βλαστητικά μεριστώματα δεν “μετατραπούν” σε αναπαραγωγικά ή ανθικά. Το σύνολο των γεγονότων που “επάγουν” ένα κορυφαίο μερίστωμα σε ανθικό καλείται ανθική επαγωγή (floral evocation). Ο βιολογικός κύκλος των ανώτερων φυτών περιλαμβάνει :

1. Νεανική βλαστητική φάση
2. Ενήλικη βλαστητική φάση
3. Ενήλικη αναπαραγωγική φάση και
4. ΑΝΘΗΣΗ

Η μετάβαση από τη μία φάση στην άλλη είναι γνωστή με διάφορους όρους όπως αλλαγή φάσης, (Saure, 2001).

Η βασική διαφορά μεταξύ νεανικής και ενήλικης φάσης είναι ότι μόνο στη δεύτερη υπάρχει δυνατότητα δημιουργίας αναπαραγωγικών ιστών (οφθαλμοί→άνθη). Η ενηλικίωση προχωρά από τη βάση του βλαστού προς την κορυφή του και συνήθως συνοδεύεται από αλλαγές σε βοτανικά χαρακτηριστικά, όπως είναι το σχήμα των φύλλων. (π.χ κισσός) (Taiz and Zeiger, 2002; Saure, 2001).

Η διάρκεια του σταδίου της νεανικότητας διαφέρει από είδος σε είδος και εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων. Κατ' αρχήν από τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου (μικρότερης διάρκειας στα ετήσια και μεγαλύτερης στα πολυετή), την ίδια τη δυναμική του φυτού (μέγεθος, φυλλική επιφάνεια) καθώς και από τις συνθήκες ανάπτυξης, αφού σε συνθήκες καταπόνησης επιμηκύνεται. Συνδυασμός των πιο πάνω παραγόντων επιφέρει αλλαγές κυρίως σε ορμονικό και θρεπτικό επίπεδο, αλλαγές που πυροδοτούν την μετάβαση στην ενήλικη βλαστητική φάση. Από την άλλη, η μετάβαση από την ενήλικη βλαστητική στην αναπαραγωγική φάση επάγεται από περιβαλλοντικά κυρίως ερεθίσματα, όπως είναι η φωτοπερίοδος και θερμοκρασία. Από τη στιγμή που το φυτό και σε ορισμένες περιπτώσεις το ίδιο το μερίστωμα δεχθεί τέτοιου τύπου ερεθίσματα, τότε αυτό επάγεται σε ανθικό, οπότε και η άνθηση είναι πλέον γεγονός (Saure, 2001).

1.2.2. Μοριακή προσέγγιση της άνθησης

Η μοριακή προσέγγιση των διεργασιών που σχετίζονται με την άνθηση στηριγμένη κατά βάση σε φυτά μοντέλα έχει επικεντρωθεί κυρίως στη μελέτη ελέγχου:

- i. Της αλλαγής φάσης από τη νεανική στην ενήλικη φάση (*Zea mays*)
- ii. Του χρόνου της άνθησης (*Arabidopsis*)
- iii. Της χωροταξικής κατανομής των ανθικών σπονδυλωμάτων (*Arabidopsis*, *Antirrhinum*)

Τα στοιχεία αυτά παρατίθενται στη συνέχεια.

Τα πολυετή φυτά δεν αποτελούν ελκυστικό πεδίο έρευνας της άνθησης, λόγω του μακρού χρόνου που απαιτείται για την απόκτηση πειραματικού φυτικού υλικού. Για παράδειγμα, ενώ το είδος *Arabidopsis* ολοκληρώνει το βιολογικό του κύκλο σε δύο μήνες και με δυνατότητα ελεγχόμενων συνθηκών, τα περισσότερα καρποφόρα-

πολυετή και στην προκειμένη περίπτωση η ελιά που αποτελεί και το φυτικό υλικό της παρούσας εργασίας απαιτούν 4-5 χρόνια για να περάσουν από τη νεανική στην ενήλικη αναπαραγωγική φάση και σε *in vivo* συνθήκες με ότι επακόλουθα μπορεί αυτό να έχει.

Στην περίπτωση των πολυετών φυτών που βρίσκονται στην ενήλικη αναπαραγωγική φάση ο έλεγχος της άνθησης, σαν αποτέλεσμα των συνολικών διεργασιών του φυτού καταλήγει να εντοπίζεται στη νέα βλάστηση του τρέχοντος έτους (πυρηνόκαρπα), στη βλάστηση του παρελθόντος έτους (ελιά) ή ακόμη και σε βλαστούς ηλικίας δύο ετών (φιστικιά). Στους βλαστούς αυτούς βρίσκονται τα κορυφαία μεριστώματα τα οποία σε πολλά φυτικά είδη είναι βλαστητικά και μόνο υπό ορισμένες προϋποθέσεις δύναται να μετατραπούν και να καθοριστούν σε αναπαραγωγικά.

1.2.3. Μετάβαση από νεανική σε βλαστητική φάση-Γονιδιακός έλεγχος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η μετάβαση από την νεανική στην ενήλικη φάση επηρεάζεται τόσο από περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ φωτοπερίοδος, θερμοκρασία), όσο και από ενδογενείς όπως το θρεπτικό και ορμονικό επίπεδο του φυτού. Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια γονιδιακής προσέγγισης του φαινομένου, μέσω ανάλυσης μεταλλάξεων που επιδρούν στο χρόνο αλλαγής φάσης. Μεταλλάξεις αυτού του τύπου αποδίδονται με τον όρο “ετεροχρονικές μεταλλάξεις”, δηλώνοντας τη δυνατότητα αναγνώρισης συγκεκριμένων γονιδίων ρυθμιστών της νεανικής φάσης. (Taiz and Zeiger, 1998).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα έρευνας αποτελεί το καλαμπόκι. Συγκεκριμένα στην ετεροχρονική μετάλλαξη *teopod (tp)*: *tp1*, *tp2* και *tp3* παρατηρήθηκε ότι όργανα του φυτού όπως φύλλα παρουσίαζαν νεανικά χαρακτηριστικά παρά το γεγονός ότι φέρονταν σε ενήλικους βλαστούς. Επιπλέον, ενώ τα φυτά μάρτυρες δοθέντος χρόνου όδευαν προς άνθηση, στα *tp* φυτά θηλυκά και αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα εξελίσσονταν σε φυλλικές κατασκευές. Θεωρείται λοιπόν ότι η συγκεκριμένη οικογένεια γονιδίων επηρεάζει άμεσα τη μετάβαση από την νεανική στην ενήλικη βλαστητική φάση, αλλά όχι την μετάβαση στην επόμενη αναπαραγωγική φάση (Taiz and Zeiger, 1998)

1.2.4. Γονιδιακός έλεγχος ανθικής επαγωγής

Η ανθική επαγωγή και κατ' επέκταση η διαδικασία σχηματισμού των ανθέων αποτελεί ίσως την πιο σημαντική και παράλληλα την πιο δραματική αναπτυξιακή αλλαγή στη διάρκεια του βιολογικού κύκλου των φυτών.

Τα άνθη αποτελούν πολύπλοκα όργανα τα οποία διαφέρουν ουσιαστικά από το υπόλοιπο φυτικό σώμα, τόσο σε μορφή όσο και σε λειτουργίες. Ακόμη και σε πολύ πρώιμα στάδια της ανάπτυξής τους τα ανθικά μεριστώματα είναι δυνατόν να διακριθούν από τα βλαστητικά. Ανατομικά το πέρασμα από τη βλαστητική στην αναπαραγωγική (ανθική) φάση χαρακτηρίζεται από ραγδαία αύξηση των κυτταροδιαιρέσεων στην κεντρική ζώνη του μεριστώματος. Αντίθετα, σε εκείνα τα μεριστώματα που παραμένουν σε βλαστητική μορφή ο κύκλος των κυτταροδιαιρέσεων ολοκληρώνεται πολύ πιο αργά.

Πρόσφατες σχετικά γενετικές και μοριακές μελέτες (*Arabidopsis*, *Antirrhinum*) έχουν αναγνωρίσει ένα δίκτυο γονιδίων ελέγχου της ανθικής επαγωγής. Θεωρείται πλέον ότι τρεις είναι οι βασικές κατηγορίες γονιδίων που ρυθμίζουν την ανθική διαφοροποίηση :

Floral organ identity genes, Cadastral genes και Meristem identity genes

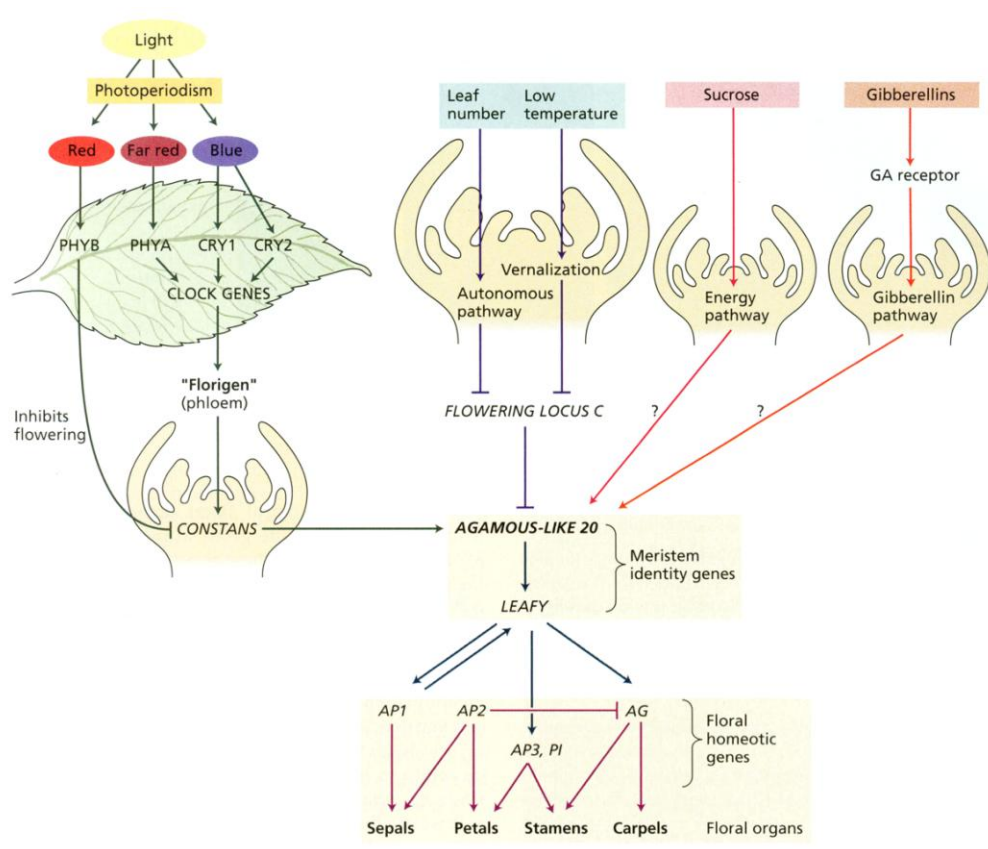
- i. Floral organ identity genes ή Homeotics genes : ελέγχουν άμεσα την κατασκευή των ανθικών σπονδυλωμάτων. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ανήκουν σε μια διευρυμένη οικογένεια γονιδίων (MADs-box genes) και πιθανόν ελέγχουν την έκφραση άλλων γονιδίων των οποίων τα προϊόντα εμπλέκονται στο σχηματισμό και/ή στη λειτουργία των ανθικών ιστών.
- ii. Cadastral genes : ελεγκτικός ο ρόλος τους, θέτοντας όρια στην έκφραση των floral organ identity genes
- iii. Meristem identity genes : η έκφρασή τους ερμηνεύεται σαν το αποτέλεσμα της αντίδρασης του φυτικού οργανισμού στα διάφορα ενδογενή και περιβαλλοντικά σήματα. Είναι εκείνα τα γονίδια που ενεργοποιούν τα floral organ identity genes. (Taiz and Zeiger, 2002)

1.2.5. Μετάβαση από βλαστική σε ανθική φάση - γονιδιακός έλεγχος

Είναι πλέον αποδεδειγμένο ερευνητικά ότι η μετάβαση από τη βλαστική στην ανθική φάση ή η επαγωγή της άνθησης αποτελεί ένα πολυσύνθετο φαινόμενο, που απαιτεί για την εκδήλωση του ένα σύνολο ενδογενών και όχι μόνο αλληλεπιδρώντων παραγόντων. Έρευνες των τελευταίων ετών (*Arabidopsis*, *Antirrhinum*) έχουν συγκλίνει στη παραδοχή της ύπαρξης τεσσάρων διακριτών μοριακών-γενετικών μονοπατιών ελέγχου της άνθησης. Στην εικόνα 1.1, αποδίδεται μια απλοποιημένη μορφή των τεσσάρων μονοπατιών.

- i. Το *φωτοπεριοδικό* μονοπάτι περιλαμβάνει τους τέσσερις φωτοδέκτες (PHYA, PHYB, CRY1 και CRY2) οι οποίοι σε συνδυασμό με κερκαδικούς ρυθμούς προωθούν την έκφραση του γονιδίου CONSTANS (CO). Το εν λόγω γονίδιο κωδικοποιεί ένα zinc-finger μεταγραφικό παράγοντα που προωθεί την άνθηση δια μέσου αύξησης της έκφρασης των meristem identity genes AGAMOUS-LIKE 20 (AGL20) και LEAFY (LFY).
- ii. Στο διπλό *αυτόνομο* μονοπάτι / μονοπάτι *εαρινοποίησης* η άνθηση λαμβάνει χώρα ως αντίδραση σε ενδογενή σήματα όπως είναι ο αριθμός των παραγόμενων φύλλων και η επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών αντίστοιχα. Και οι δύο οδοί δρουν μέσω παρεμπόδισης της έκφρασης του γονιδίου FLOWERING LOCUS C (FLC), ενός γονιδίου αναστολέα των κρίσιμων για την άνθηση γονιδίων AGL20 και LFY.
- iii. Το *ενεργειακό* μονοπάτι αντανακλά τη μεταβολική κατάσταση του φυτού. Στόχοι και πάλι αποτελούν τα γονίδια AGL20 και LFY, ωστόσο πολύ λίγα είναι γνωστά για τον τρόπο δράσης του συγκεκριμένου μονοπατιού.
- iv. Το τελευταίο μονοπάτι, αυτό των *γιββερελλινών* φαίνεται να ενεργοποιείται είτε για πρόωμη άνθηση είτε στην περίπτωση μη επαγωγίμων φωτοπεριοδικά ημερών. Πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι σε κάποια φυτά το μονοπάτι της εαρινοποίησης πραγματοποιείται μέσω γιββερελλινών. Ωστόσο στο *Arabidopsis* τα δύο μονοπάτια λειτουργούν ανεξάρτητα, αφού γονότυποι στους οποίους έχει μπλοκαριστεί το μονοπάτι βιοσύνθεσης των γιββερελλινών συνεχίζουν να αντιδρούν στην εαρινοποίηση. Η ιδέα του να θεωρηθούν οι Gas florigen είχε απορριφθεί από νωρίς γιατί δεν καλύπτει τα χαρακτηριστικά του διακινήσιμου χαρακτήρα του florigen και μάλιστα μεταξύ LDPs και SDPs. Ωστόσο σε μερικά

αγροστώδη οι GA5 και GA6 λειτουργούν σαν διακινούμενα από τα φύλλα προς το κορυφαίο μερίστωμα σήματα. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι GAs προωθούν την άνθηση στο είδος *Arabidopsis* μέσω ενεργοποίησης του γονιδίου LFY που καθορίζει την ταυτότητα του ανθικού μεριστώματος, χωρίς να ρυθμίζει την έκφραση του FT, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μονοπάτια του FT και των GAs λειτουργούν ανεξάρτητα. Οι στόχοι του σήματος του μονοπατιού των γιββερελλινών είναι αφενός το γονίδιο LFY, αφετέρου το γονίδιο SOC (Suppressor of Overexpression of CONSTANS), γνωστού και ως AGAMOYS-LIKE 20 (AGL20). Η εξωγενής εφαρμογή GAs είναι δυνατόν να επάγει την άνθηση τόσο σε φυτά που αναπτύσσονται σε μη επαγωγίμο φωτοπεριοδικά περιβάλλον, όσο και σε φυτά που δεν έχουν συμπληρώσει τις ανάγκες τους σε ψύχος. Όσον αφορά το αιθυλένιο και τα παράγωγα του ο ρόλος τους στην επαγωγή της άνθησης δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος καθώς σε ορισμένα είδη λειτουργεί προωθητικά (*Ananas comosus*) ενώ σε άλλα την εμποδίζει (*Bromeliaceae*).



Εικόνα 1.1 : Συνοπτική απεικόνιση των τεσσάρων μονοπατιών ελέγχου της ανθικής επαγωγής στο γένος *Arabidopsis*. (Lack and Evans, 2002).

Βλέπουμε επομένως ότι και τα τέσσερα μονοπάτια συγκλίνουν στην έκφραση του γονιδίου “κλειδί” για την άνθηση AGL20, ρόλος του οποίου είναι η ενοποίηση των διαφόρων σημάτων σε μια κοινή έξοδο. Έχει παρατηρηθεί ραγδαία αύξηση στην έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου μέσα σε λίγες μόνο ώρες σε μεριστώματα φυτών από τη στιγμή που εκτέθηκαν σε επαγωγίμες φωτοπεριοδικά συνθήκες. Στο όλο σύστημα φαίνεται ότι υπάρχει κάποιος πλεονασμός, αφού σε *agl20* μεταλλάξεις δεν αναστέλλεται πλήρως η άνθηση παρά μόνο καθυστερεί σημαντικά, υποδηλώνοντας ότι κάποια άλλα γονίδια αναλαμβάνουν το ρόλο του σε μια τέτοια περίπτωση.

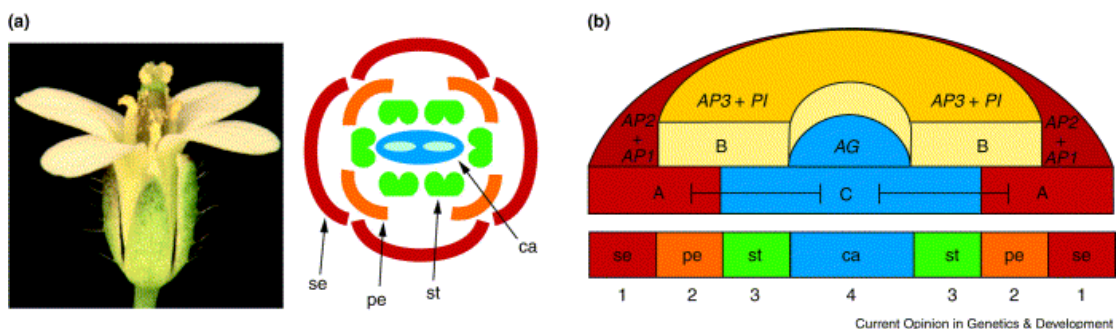
Συνοπτικά, στο *Arabidopsis* τα γονίδια AGL20, LFY και APETALA1 θεωρούνται κλειδιά στην εγκαθίδρυση της άνθησης. Το AGL20 παίζει σημαίνοντα ρόλο στην επαγωγή του φαινομένου, η έκφραση του οποίου πυροδοτεί την ενεργοποίηση των γονιδίων LFY και APETALA1, η σχέση των οποίων είναι αμφίδρομη. Όταν η μετάβαση στην αναπαραγωγική φάση έχει εγκατασταθεί αναλαμβάνουν ρόλο τα floral organ identity genes για την κατασκευή των ανθέων (Taiz and Zeiger, 2002).

Φαίνεται όμως ότι υπάρχει ισχυρή παραλλακτικότητα μεταξύ των ειδών για το πώς τα διάφορα ομόλογα γονίδια εκείνων που αναφέρθηκαν ανωτέρω, αλληλεπιδρούν με άλλα γονίδια για τη μετάβαση στην αναπαραγωγική φάση. Για παράδειγμα, ενώ στο *Arabidopsis* η υπερέκφραση του γονιδίου επιταχύνει την άνθηση, στο γένος *Populus* υπερέκφραση του αντίστοιχου ομόλογου γονιδίου PTLF δεν προκάλεσε ανάλογα αποτελέσματα. Αντίθετα, υπερέκφραση του PTLF σε φυτά *Arabidopsis* οδήγησε σε πρόωρη άνθηση. (Rottmann et al, 2000).

1.2.6. Γονιδιακός έλεγχος ανθικής κατασκευής (floral organ identity genes)

Μια από τις πλέον αποδεκτές αρχές στο πεδίο της ανθικής κατασκευής είναι το μοντέλο ABC. Η συγκεκριμένη θεωρία προτάθηκε στα 1990 μετά από έρευνα στα γένη *Arabidopsis* και *Antirrhinum*. Ωστόσο φαίνεται να ισχύει σε μια μεγάλη ποικιλία αγγειόσπερμων ειδών (μονοκότυλα και δικότυλα) συμπεριλαμβανομένων και οικονομικής σημασίας καλλιεργούμενων φυτών, όπως είναι ο αραβόσιτος και το ρύζι, καθώς και εν μέρει σε ορισμένα πολυετή όπως το γένος *Populus* στο οποίο έχουν απομονωθεί ομόλογα γονίδια ανάλογης λειτουργίας (Brunner et al, 2000).

Το άνθος του είδους *Arabidopsis* όπως και των περισσότερων αγγειόσπερμων περιλαμβάνει τέσσερα είδη σπονδυλωμάτων τα οποία είναι οργανωμένα σε ισάριθμους ομόκεντρους δακτυλίους. Ο 1^{ος} εξωτερικός δακτύλιος αποτελείται από τα σέπαλα, ο 2^{ος} περιλαμβάνει τα πέταλα, ο 3^{ος} τους στήμονες και ο 4^{ος} εσωτερικός τον ύπερο (καρπόφυλλα). Σύμφωνα με το μοντέλο ABC τρεις κατηγορίες floral organ identity genes (A, B και C), δρουν είτε μοναδιαία είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους για την εξειδικευμένη κατασκευή των τεσσάρων ανθικών σπονδυλωμάτων. Συγκεκριμένα στο είδος *Arabidopsis* ο τύπος A περιλαμβάνει τα γονίδια APETALA1(AP1) και APETALA2(AP2), ο τύπος B τα APETALA3(AP3) και PISTILLATA(PI) και ο τύπος C το γονίδιο AGAMOUS(AG). Στο 1^ο δακτύλιο η μεμονωμένη έκφραση γονιδίων τύπου A(AP1) έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό των σέπαλων. Στο 2^ο δακτύλιο η συνδυασμένη έκφραση τύπου A(AP2) και B(AP3/PI) προδιαγράφει το σχηματισμό των πετάλων. Ο σχηματισμός των στήμονων στο 3^ο δακτύλιο αποδίδεται στη ταυτόχρονη έκφραση γονιδίων τύπου B(AP3/PI) και C(AG), ενώ εκείνος του υπέρου στο 4^ο δακτύλιο στη δράση μόνο γονιδίων τύπου C(AG) (Goto et al, 2001, Εικόνα 1.2).

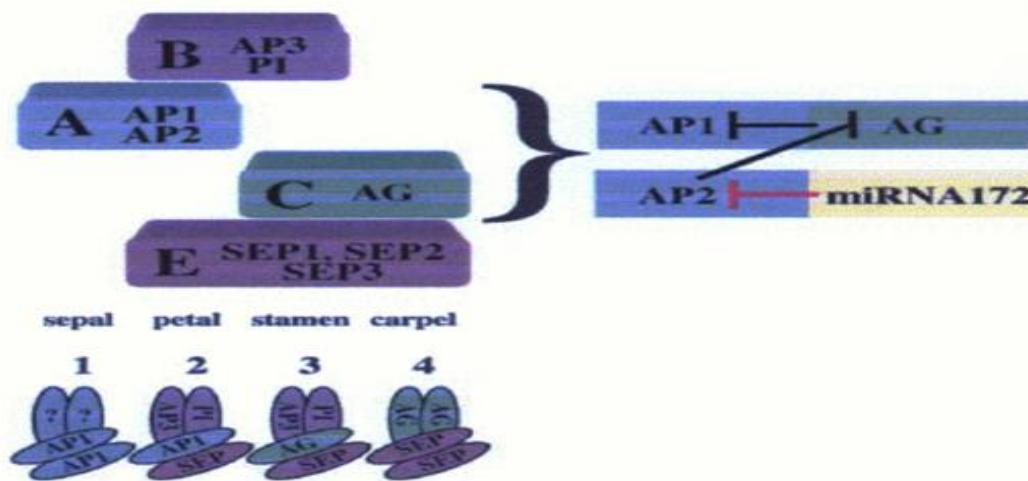


Εικόνα 1.2 : (α) άνθος *Arabidopsis*, (β) διαγραμματική απεικόνιση μοντέλου ABC. (Taiz and Zeiger, 2002).

Η αναγνώριση των floral organ identity genes πραγματοποιήθηκε δια μέσου μεταλλάξεων οι οποίες είχαν σαν αποτέλεσμα τη δραματική αλλαγή του ανθικού φαινοτύπου, ανά δύο γειτονικούς δακτυλίους συγκριτικά με εκείνον του αγρίου τύπου. Παρατηρήθηκε ότι η απώλεια δράσης των γονιδίων τύπου A είχε σαν αποτέλεσμα στον 1^ο δακτύλιο να σχηματίζονται στίγματα αντί για σέπαλα και στο 2^ο δακτύλιο στήμονες αντί για πέταλα. Η μετάλλαξη γονιδίων τύπου B οδηγούσε στο σχηματισμό σέπαλων αντί για πέταλα στο 2^ο δακτύλιο και στίγμάτων στη θέση των στήμονων στο 3^ο δακτύλιο, ενώ φυτά με ag μετάλλαξη σχημάτιζαν πέταλα αντί για στήμονες στο 3^ο

δακτύλιο και σέπαλα στη θέση των στιγμάτων στον 4^ο δακτύλιο. Μια επιπλέον παραδοχή του μοντέλου είναι η ανταγωνιστική δράση μεταξύ των A και C τάξεων. Αποδίδεται σε αυτές τις κατηγορίες γονιδίων ιδιότητες *cadastral genes*, όπου η έκφραση της μιας αναχαιτίζει τη δράση της άλλης. Δηλαδή, σε απουσία της τάξης A οι τέσσερις ανθικοί δακτύλιοι καταλαμβάνονται αποκλειστικά από σπονδυλώματα που οφείλονται σε δράση της τάξης C (Taiz and Zeiger, 2002).

Η κεντρική θεωρία του μοντέλου ABC όπως αυτή περιγράφηκε πιο πάνω, επιβεβαιώνεται σε μια μεγάλη ποικιλία φυτών. Ωστόσο μελέτες καταδεικνύουν τη συμμετοχή και επιπλέον γονιδίων στη διαδικασία της ανθικής κατασκευής. Σύμφωνα με τους Pelaz et al (2000) και μια τέταρτη κατηγορία γονιδίων, τα γονίδια *SEPALLATA* (*SEP1/2/3*) που αναφέρεται ως κατηγορία E εμπλέκεται στη κατασκευή των πετάλων, στημόνων και στιγμάτων. Πιο συγκεκριμένα είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των B και C τάξεων. Νεότερα δεδομένα ενισχύουν την άποψη ότι οι MADS πρωτεΐνες λειτουργούν σε σύμπλοκα μεγαλύτερα από διμερή και το πιθανότερο είναι να λειτουργούν σε τετραμερή σύμπλοκα.



Εικόνα 1.3 : Διαγραμματική απεικόνιση μοντέλου ABCE. A, B, C και E είναι τέσσερις δραστηριότητες που βρίσκονται παρακείμενα του άνθους. Οι τέσσερις αυτές δραστηριότητες απαιτείται να λειτουργήσουν συνδυαστικά για να διευκρινιστεί η ταυτότητα των τεσσάρων οργάνων στο λουλούδι. σέπαλα, πέταλα, στήμονες και ύπερος. Μια δεύτερη σημαντική πτυχή του μοντέλου ABC είναι ότι η A και C δραστηριότητες είναι αμοιβαία κατασταλτικά. Οι ειδικές μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων τάξης A και C και οι ρυθμιστικές σχέσεις τους φαίνονται στα δεξιά. Η πλειοψηφία των ABC γονίδια κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες πρωτεϊνών MADS. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες MADS λειτουργούν μαζί σε σύμπλοκα μεγαλύτερα από ένα διμερή Το "ABCE" μοντέλο απαιτεί ότι τετραμερείς MADS πρωτεΐνες καθορίζουν την ταυτότητα οργάνων (φαίνονται ως χρωματιστά ωοειδή). Αλληλεπιδράσεις που αποδεδειγμένα είναι απευθείας σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα γονίδια της κάθε μιας από τις 4 ομάδες ομοιοτικών γόνων (MADS box genes) και τα τετραμερή που δημιουργούν το κάθε σπονδύλωμα. Παρουσιάζεται επίσης η ανταγωνιστική σχέση της ομάδας A (AP1, AP2) και C (AG). Τα νέα στοιχεία επομένως είναι δύο : Ότι σε κάθε σπονδύλωμα έχουμε τετραμερή σύμπλοκα και ότι στα τετραμερή των πετάλων, των στημόνων και του υπέρου συμμετέχει και η ομάδα E (SEPALATA) . Πάνω δεξιά σημειώνεται η ανταγωνιστική σχέση των A και C ομάδων.

Όσον αφορά για το γένος *Arabidopsis* ισχύει πλέον το αναθεωρημένο ABCE μοντέλο, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται με ομόλογα γονίδια στην τομάτα και την πετούνια (Jack, 2004).

1.3. Η άνθιση στην ελιά

1.3.1. Οι οφθαλμοί της ελιάς

Η ελιά φέρει ξυλοφόρους και ανθοφόρους οφθαλμούς. Οι πρώτοι είναι μικρότεροι και πιο κωνικοί, ενώ οι δεύτεροι περισσότερο εξογκωμένοι στο μέσο και υποσφαιρικοί, ωστόσο οι διάκριση τους μακροσκοπικά είναι πολύ δύσκολη. Οι οφθαλμοί της ελιάς είναι γυμνοί, δηλαδή στερούνται του προστατευτικού από λέπια καλύμματος, που παρατηρείται στους οφθαλμούς των λοιπών καρποφόρων φυλλοβόλων δένδρων. Οι ξυλοφόροι οφθαλμοί φέρονται επάκρια ή πλάγια των βλαστών και οι ανθοφόροι μόνο πλάγια αυτών. Οι ξυλοφόροι όταν εκπτυχθούν την άνοιξη δίνουν βλαστό επεκτάσεως ή πλάγια βλάστηση με φύλλα και ξυλοφόρους ή ανθοφόρους οφθαλμούς στις μασχάλες αυτών. Οι ανθοφόροι εκπτυσσόμενοι την άνοιξη δίνουν μικροί βλάστηση φυλλοφόρα ή άφυλλη, η οποία φέρει επάκρια βοτρυώδη ταξιανθία με άνθη, τα οποία αν γονιμοποιηθούν εξελίσσονται σε καρπούς.

1.3.2. Επαγωγή-διαφοροποίηση ανθοφόρων οφθαλμών ελιάς

Ο σχηματισμός των ανθοφόρων οφθαλμών είναι μία μακρά διαδικασία που απαιτεί το μετασχηματισμό του κορυφαίου μεριστώματος του οφθαλμού το οποίο είναι αδιαφοροποίητο σε πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης, προς μία κατασκευή που φέρει άνθη. Η διαδικασία αυτή συνήθως χωρίζεται σε δύο στάδια: κατά τη διάρκεια του πρώτου, που καλείται **επαγωγική φάση**, ο οφθαλμός υφίσταται μία σειρά εσωτερικών και εξωτερικών επιδράσεων οι οποίες ακολουθούνται από βιοχημικές μεταβολές στην κορυφή του οφθαλμού και έχουν ως συνέπεια το σχηματισμό αναπαραγωγικών καταβολών. Η φάση αυτή είναι **μη αντιστρεπτή φάση** και δηλώνει εκείνη την κατάσταση του οφθαλμού, η οποία έχει δύο οντογενετικές δυνατότητες, ή να εξελιχθεί σε ανθοφόρο οφθαλμό ή να μην υποστεί περαιτέρω εξέλιξη. Ο οφθαλμός θεωρείται ότι έχει επαχθεί όταν τελειώσει η μη αντιστρεπτή φάση, η δεύτερη φάση καλείται **διαφοροποίηση**. Πρόκειται απλά για μία ανατομική φάση, κατά τη διάρκεια της οποίας σχηματίζονται οι χαρακτηριστικοί ιστοί της ανθικής κατασκευής, ενώ ολοκληρώνεται λίγο πριν την ανθοφορία. Ο χρόνος που λαμβάνει χώρα η επαγωγή των οφθαλμών είναι δύσκολο να προσδιοριστεί διότι οι τροποποιήσεις που εμπλέκονται στο στάδιο αυτό είναι φυσιολογικές που εγκαθίστανται βαθμιαία σε διαφορετικούς χρόνους στα διάφορα τμήματα της κόμης του δένδρου και όχι ανατομικές όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και κατά συνέπεια δεν μπορούν να ανιχνευθούν μικροσκοπικά. Ωστόσο για την ανθική διαφοροποίηση (**επαγωγική φάση + διαφοροποίηση**) μπορεί να καθιερωθεί σαν κανόνας ότι: τα φυλλοβόλα είδη ξεκινούν την ανθική διαφοροποίηση κατά την διάρκεια της περιόδου ανάπτυξης τους, η οποία προηγείται της άνθησης (Καλοκαίρι-Φθινόπωρο) και ολοκληρώνουν τη διαδικασία αυτή λίγες εβδομάδες πριν την άνθηση. Αντίθετα στα αιθαλή είδη η ανθική διαφοροποίηση ξεκινά αργότερα (Φθινόπωρο-Χειμώνα) αλλά ολοκληρώνεται στον ίδιο χρόνο με τα φυλλοβόλα (Fabbri and Benelli, 2000).

1.3.3. Παράγοντες που δύναται να επηρεάσουν την επαγωγή - διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών της ελιάς

Οι ανθοφόροι οφθαλμοί εμφανίζονται σαν μεριστώματα που το φυτό με τον ένα ή τον άλλο τρόπο τα αγνοεί κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Φαίνεται λοιπόν ότι το φυτό χωρίζει τους υπάρχοντες οφθαλμούς σε δύο ομάδες με κριτήρια που ακόμη είναι υπό πλήρη έρευνα αν και παράγοντες όπως, η θέση των οφθαλμών στο βλαστό, η φωτεινή ακτινοβολία, το φορτίο, το υδατικό ισοζύγιο και η θρέψη του φυτού πιθανόν να είναι καθοριστικοί (Fabbri and Alerci, 1999).

Η διαφοροποίηση των οφθαλμών της ελιάς γίνεται πολύ αργότερα, απ' ότι σε άλλα οπωροφόρα δένδρα. Στα μέσα του αιώνα επικρατούσε η αντίληψη ότι η διαφοροποίηση των οφθαλμών γίνεται 40-60 ημέρες πριν από την ανθοφορία (Morettini, 1950; Hartman, 1951), ενώ κατά τον Almeida (1940) και Πανέτσο (1958) λαμβάνει χώρα 90 ημέρες πριν από την ανθοφορία. Για τη διαφοροποίηση των οφθαλμών το ελαιόδενδρο είναι αναγκαίο να δεχτεί την επίδραση επαρκούς ψύχους για μια περίοδο, η οποία διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως εαρινοποίηση. Οι Hackett και Hartman (1967) απέδειξαν το σημαντικό ρόλο που παίζουν οι θερμοκρασίες κάτω των 13 °C, κυρίως από το Δεκέμβριο μέχρι το Φεβρουάριο, στο σχηματισμό των ανθικών καταβολών της ελιάς. Ιδανική θερμοκρασία για την καλύτερη εκδήλωση της άνθησης είναι 10-13 °C και σε ορισμένες περιπτώσεις μεταξύ 7 και 16 °C. Κάτω από 4 °C και πάνω από 18 °C δεν υφίσταται ερέθισμα για προτροπή της άνθησης. Η έκθεση στις χαμηλές θερμοκρασίες δεν θα πρέπει να είναι μικρότερη από 7 εβδομάδες και για μεγαλύτερη σιγουριά η έκθεση θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 9-10 εβδομάδες (Hackett and Hartman, 1967; Porlingis, 1972). Ωστόσο πιο πρόσφατα πειραματικά δεδομένα προτείνουν ότι η διαφοροποίηση των οφθαλμών λαμβάνει χώρα προγενέστερα του χειμερινού λήθαργου (Fernandez-Escobar et al., 1992; Navarro et al., 1990; Pinney and Polito, 1990; Strutte and Martin, 1986). Η τελευταία υπόθεση υποστηρίζεται επιπλέον από τους Rallo και Martin (1991), οι οποίοι θεωρούν ότι το χειμερινό ψύχος στην ελιά χρειάζεται για να ελευθερωθούν οι οφθαλμοί από τη ληθαργική κατάσταση, παρά για να προάγει την ανθική επαγωγή.

Όταν η διαφοροποίηση έχει αρχίσει να συντελείται σχηματίζονται σε αυτά οι καταβολές των διαφόρων ανθικών ιστών, πρώτα τα πέταλα και τα σέπαλα, μετά οι στήμονες και τέλος ο ύπερος.

Ο De Almeida (1940) θέτει ως δεδομένο ότι, όταν σχηματιστούν οι καταβολές των βρακτίων τα οποία καλύπτουν την κορυφαία τριάδα της ταξιανθίας, τότε μόνο οι οφθαλμοί μπορούν να διαφοροποιηθούν σε άνθος.

Ο Hartman (1951) θεωρεί χρόνο μη-αντιστρέψιμης ανθικής διαφοροποίησης την στιγμή που σε μία κατά μήκος τομή του οφθαλμού μπορεί να ανιχνευθεί η διεύρυνση-πάχυνση της κορυφής του προς μία επίπεδη κωνική μάζα, η οποία φέρει τέσσερα αρχέγονα σέπαλα τα οποία εμφανίζονται σαν μικροσκοπικά εξογκώματα στις πλευρές της κορυφής του. Στην κεντρική Καλιφόρνια ο μετασχηματισμός αυτός λαμβάνει χώρα τον Μάρτιο, περίπου ένα μήνα πριν την ανάδυση της ταξιανθίας και δύο μήνες πριν την πλήρη άνθηση.

Ο Mazzolani (1951, 1955), επίσης τοποθέτησε την διαφοροποίηση μεταξύ τέλους Φεβρουαρίου και μέσα Μαρτίου, ενώ για μεμονωμένο οφθαλμό υποτίθεται ότι η διαδικασία δεν διαρκεί περισσότερο από οχτώ εβδομάδες. Τα εναρκτήρια σημάδια διαφοροποίησης για τον Mazzolani είναι η αύξηση της κυρτότητας της κορυφής και ο σχηματισμός των βράκτιων που την καλύπτουν.

Ωστόσο οι περισσότεροι ερευνητές δεν εξέτασαν την πιθανότητα ο οφθαλμός να διέρχεται ένα πρώιμο στάδιο διαφοροποίησης ή πρό-διαφοροποίηση. Οι περισσότερες μελέτες βασίστηκαν μόνο σε δείγματα που συλλέχθηκαν τον Χειμώνα και την Άνοιξη και σπανίως σε δείγματα από τα τέλη του Φθινοπώρου.

Σύμφωνα με τον Troncoso (1967) του οποίου τα αποτελέσματα συμφωνούν με παλιότερες διαπιστώσεις του Mazzolani (1951), η διαφοροποίηση ξεκινά στα μέσα-Φεβρουαρίου όταν στους ανθοφόρους οφθαλμούς σχηματίζεται ένα ζευγάρι καταβολών. Οι καταβολές αυτές σε αντίθεση με εκείνες των ξυλοφόρων οφθαλμών είναι περισσότερο αναπτυγμένες και ελαφρώς υψηλότερες από την κορυφή του οφθαλμού, αλλά ποτέ τόσο πολύ ώστε να την καλύπτουν και να την περιφράσουν. Παραμένουν μικρές και από αυτές θα προκύψουν τελικά τα βράκτια της κορυφής τα οποία στη συνέχεια θα εκφυλιστούν. Η διαφοροποίηση συνεχίζεται με την ανάπτυξη

και άλλων μεριστωματικών κατασκευών στις μασχάλες των βράκτιων, 1 έως 2 κόμβους κάτω από την κορυφή. Η κύρια κορυφή του οφθαλμού συνεχίζει να διαφοροποιείται καθώς διαιρείται σε τρία τμήματα, από τα οποία το κεντρικό είναι περισσότερο εμφανές. Έτσι παράγεται μία "τριάδα" διακριτών κορυφών που όμως δεν διαφέρουν πολύ από την κύρια κορυφή, από την οποία και προήλθαν. Η ίδια διαδικασία λαμβάνει χώρα και στους υπόλοιπους κόμβους, αν και μερικοί περνούν κατευθείαν στο σχηματισμό ανθικών καταβολών.

Οι Badr et al (1970) μελετώντας την άνθηση στην ελιά παρατήρησαν ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές σε γιββερελλικά παράγωγα κατά τη διάρκεια της εαρινοποίησης στους πλάγιους μόνο οφθαλμούς (πιθανά ανθοφόροι) αλλά όχι στους επάκριους (πιθανά ξυλοφόροι). Τουλάχιστον δύο τύποι τέτοιων παραγώγων ανιχνεύθηκαν σε πλάγιους οφθαλμούς, τα επίπεδα των οποίων αυξάνονταν σταδιακά κατά τη διάρκεια των χαμηλών θερμοκρασιών πλησιάζοντας το μέγιστο λίγο πριν την άνθηση, ενώ κατά τη διάρκεια της η ανίχνευση τους δεν ήταν δυνατή. Ενδεχομένως λοιπόν το θερμικό ερέθισμα του χειμώνα στην επαγωγή της άνθησης να επιδρά μέσω της μεταβολής του ορμονικού ισοζυγίου, ιδιαίτερα μεταξύ προωθητών της άνθησης όπως οι GAs και κάποιων αναστολέων της.

Το φαινόμενο της παρενιαυτοφορίας χαρακτηρίζει αρκετά καρποφόρα είδη, συμπεριλαμβανομένης σε αυτά και της ελιάς. Η εναλλαγή αυτή, μιας χρονιάς μεγάλης καρποφορίας με μια πολύ μικρής αποδίδεται από πολλούς ερευνητές στο μικρό αριθμό οφθαλμών που επάγονται σε ανθοφόρους τη χρονιά μεγάλης καρποφορίας. Ο ακριβής μηχανισμός του φαινομένου είναι σχεδόν άγνωστος, ελέγχεται όμως πιθανά από περιβαλλοντικούς παράγοντες και ενδογενή σήματα (Bernier, 1988; Monselise and Goldschmidt, 1982). Άλλωστε στη κοινή γεωργική πρακτική η εξισορρόπηση των δύο ετών γίνεται με μείωση του φορτίου τη χρονιά πλήρους καρποφορίας. Οι Chand και Cain(1967) παρατήρησαν σε ποικιλίες μηλιάς ότι η παρουσία σπερμάτων στους καρπούς επιδρούσε αρνητικά στην άνθηση της επόμενης περιόδου. Ανάλογα περίπου αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν από τους Stute και Martin (1986) στην ελιά, όπου η απομάκρυνση των καρπών πριν τη σκλήρυνση του ενδοκαρπίου (Ιούλιο), είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του αριθμού των οφθαλμών που επάγονταν σε ανθοφόρους για την επόμενη καλλιεργητική περίοδο. Πιθανά λοιπόν, ουσίες που

συντίθενται από τους καρπούς και μεταφέρονται στα μεριστώματα να δρουν παρεμποδιστικά για τη ανθική τους εξέλιξη.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, σαφής ενδείξεις για το χρόνο και τις ιδιαίτερες συνθήκες που λαμβάνει χώρα η επαγωγή κάποιων οφθαλμών σε ανθοφόρους, τόσο στην ελιά όσο και σε άλλα πολυετή είδη, δεν υπάρχουν. Κατά τους Pinney και Polito (1990) η επαγωγή των οφθαλμών της ελιάς σε ανθοφόρους πραγματοποιείται πριν την επικράτηση των χαμηλών θερμοκρασιών του χειμώνα (Νοέμβριο), ενώ η ανάγκη για εαρινοποίηση είναι κρίσιμη στο σπάσιμο του λήθαργου των ήδη “καθορισμένων” οφθαλμών και μόνο. Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξαν λίγο αργότερα και οι Rallo και Martin (1991). Κατά άλλους ερευνητές (Fernandez-Escobar and Benlloch, 1992) ο χρόνος επαγωγής τοποθετείται ακόμη πιο νωρίς, την περίοδο σκλήρυνσης του ενδοκαρπίου (αρχές Ιουλίου), θεωρώντας ότι η μετέπειτα από το στάδιο αυτό σύνθεση γιββερελλινών από τον καρπό παρεμποδίζει την επιπλέον επαγωγή οφθαλμών σε ανθοφόρους.

1.3.4. Τα άνθη της ελιάς

Τα άνθη της ελιάς όπως αναφέρθηκε φέρονται κατά βοτρυώδεις ταξιανθίες στις μασχάλες των φύλλων σε βλαστούς της προηγούμενης βλαστικής περιόδου. Τα άνθη είναι περίγυνα, μικρά, λευκοκίτρινα με βραχύ ποδίσκο. Ο κάλυκας είναι κυπελλοειδής και αποτελείται από τέσσερα σέπαλα που έχουν υποστεί ολική ή μερική σύμφυση. Η στεφάνη είναι σωληνοειδής και αποτελείται συνήθως από τέσσερα πέταλα, αν και μερικές ποικιλίες φέρουν πέντε πέταλα. Η στεφάνη των τέλειων ανθέων απορρίπτεται μόλις γίνει η γονιμοποίηση. Οι στήμονες αποτελούνται από κοντό νήμα που φέρει στη κορυφή νεφρόμορφους ανθήρες. Ο ύπερος αποτελείται από μία δίχωρη ωοθήκη, ένα βραχύ στύλο και ένα δίλοβο κεφαλωτό στίγμα. Κάθε καρπόφυλλο έχει δύο σπερματικές βλάστες, δηλαδή συνολικά υπάρχουν τέσσερις σπερματικές βλάστες. Παρόλο που σε ένα φυσιολογικό ύπερο, όλες οι σπερματικές βλάστες είναι ικανές να αναπτυχθούν και να γονιμοποιηθούν, συνήθως γονιμοποιείται μόνο η μία, η οποία εξελίσσεται σε σπέρμα του καρπού, ενώ οι υπόλοιπες εκφυλίζονται. Γενικά η ανθοφορία είναι άφθονη. Τα άνθη της ελιάς διακρίνονται σε τρεις τύπους:

- **Τέλεια (perfect) άνθη**, που έχουν ανεπτυγμένους τους στήμονες και τον ύπερο, δηλαδή είναι μονόκλινα ερμαφρόδιτα.
- **Ατελή στημονοφόρα (staninate) άνθη**, που έχουν ανεπτυγμένους μόνο τους στήμονες και τελείως ατροφικό ύπερο.
- **Ατελή άνθη με πυρωμένο (aborted) ύπερο**, τα οποία έχουν ατροφικό στίγμα και ατροφική ωοθήκη χωρίς ωάρια. Οι δύο τελευταίες κατηγορίες περιλαμβάνουν ανδρομόνοικα άνθη (Guevas et al, 1999; Μπαλατσούρας, 1986; Uriu, 1959).

Στα τέλεια άνθη ο ύπερος γεμίζει σχεδόν ολόκληρο το χώρο του ανθικού σωλήνα, έχει χρώμα ανοικτοπράσινο όταν το άνθος είναι κλειστό και βαθυπράσινο όταν ανοίξει.

Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία η απόρριψη του υπέρου συντελείται καθ'όλο το διάστημα της ανάπτυξης του υπέρου: περίπου 20 % των πυρωμένων υπέρων απορρίπτονται πολύ νωρίς, δηλαδή δεν αναπτύσσονται καθόλου, ακόμη και πριν την ανύψωση του γυναικείου αρχέγονου, στο 67 % των περιπτώσεων η απόρριψη συνέβη ένα μήνα περίπου προ της άνθησης όταν ο όγκος του υπέρου αύξανα ραγδαία (Guevas et al., 1999).

Ως πλήρη άνθηση θεωρείται το στάδιο, στο οποίο πάνω από το 50 % των ανθοφόρων βλαστών και πάνω από το 70 % των ταξιανθιών έχουν πάνω από το 50 % των ανθέων τους ανοιχτά (Rappoport and Rallo, 1991). Κατά τον Hartman (1951) η πλήρης άνθηση πραγματοποιείται το Μάη. Στην Ελλάδα η πλήρης άνθηση της ελιάς μπορεί να λάβει χώρα από τα τέλη του Απρίλη και να συνεχιστεί ως το Μάιο. Αυτό εξαρτάται από την ποικιλία, την περιοχή και τις κλιματικές συνθήκες.

1.4. Η πρωτεομική στη μελέτη των φυτών

1.4.1. Η πρωτεομική σαν εργαλείο μελέτης

Με τις διάφορες τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια στον ευρύτερο τομέα της μοριακής βιολογίας δεν επιτυγχάνεται μόνο ο προσδιορισμός της έκφρασης κάποιων γονιδίων αλλά και η μελέτη των προϊόντων τους, δηλαδή των ίδιων των πρωτεϊνών, των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων καθώς και του μεταβολικού προφίλ στο οποίο συμμετέχουν αλλά και δημιουργούν. Το σύνολο αυτών των πληροφοριών αποτέλεσε τη βάση για την ανάπτυξη μοντέρνων συστημάτων βιολογίας, στα οποία αποδίδεται ο όρος πρωτεομική, με σκοπό την κατανόηση της εξέλιξης, ανάπτυξης και προσαρμοστικότητας των οργανισμών (Bolwell and Slabas, 2004).

Η πρωτεομική αποτελεί πλέον ένα ισχυρότατο εργαλείο τόσο στη μελέτη της βιολογίας των φυτών στη προκειμένη περίπτωση, αλλά και σε άλλους κλάδους όπως είναι η ιατρική, η ζωολογία και η μικροβιολογία, με βασικό στόχο την αποκρυπτογράφηση της λειτουργίας και του ρόλου των διαφόρων γονιδίων γνωστής ή ακόμη και άγνωστης αλληλουχίας που εκφράζονται σε ένα οργανισμό.

Η ολοκλήρωση της αλληλούχισης ολόκληρων γονιδιωμάτων (*Arabidopsis*: 2000, ρύζι: σχεδόν έχει ολοκληρωθεί) σε συνδυασμό με τη διαθεσιμότητα ενός μεγάλου αριθμού ESTs (Expressed Sequence Tag sequences) έχει ανοίξει νέες προοπτικές στη μελέτη των βιολογικών φαινομένων και της πολυσύνθετης λειτουργίας τους σε διάφορα επίπεδα. Επιπλέον η συσσώρευση και κατανόηση ενός μεγάλου αριθμού πληροφοριών για νουκλεϊκά οξέα έχει καταστήσει δυνατή την ανάπτυξη τεχνικών (DNA chips, protein chips) για παράλληλη ανάλυση πλήθους μεταφραφημάτων και πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά οι μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των γονιδίων που οδηγούν στην απόδοση ενός ή περισσότερων πρωτεϊνικών προϊόντων δεν είναι δυνατόν να μελετηθούν σε επίπεδο cDNA. Απαιτείται η πρωτεομική προσέγγιση για τη διερεύνηση τέτοιου τύπου λειτουργικών αναλύσεων (π.χ στον ανθρώπινο οργανισμό υπολογίζεται ότι 30000 γονίδια μεταφράζονται σε περίπου 90000 πρωτεΐνες). Η εφαρμογή ευαίσθητων και γρήγορων τεχνικών αναγνώρισης πρωτεϊνών (Mass spectrometry, MS) και η συνεχώς βελτιούμενη περιγραφική μέθοδος ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2-DE), αποτελούν ένα

σημαντικό πρώτο εργαλείο στη πρωτεομική προσέγγιση των φυτικών και όχι μόνον βιολογικών διεργασιών. Φυσικά έχουν αναπτυχθεί ανανεωμένες και συνδυαστικές εκδόσεις των παραπάνω τεχνικών για πιο αντικειμενικά αποτελέσματα όπως, multi-dimensional protein identification technology (MudPIT), ποσοτικές τεχνικές σήμανσης των πρωτεϊνικών μορίων (two dimensional different gel electrophoresis, 2D-DIGE) κ.α. Στο σημείο αυτό η χρήση κατάλληλων λογισμικών προγραμμάτων (MALDI TOF) είναι απολύτως αναγκαία για την ανάλυση της πληθώρας των πληροφοριών και στοιχείων που θα προκύψουν (Canovas et al, 2004; Thiellement, 1999).

1.4.2. Εφαρμογές πρωτεομικής στα φυτά

Η κλασική πρωτεομική ανάλυση (2-DE, MS) στο τομέα των φυτών χρησιμοποιείται κυρίως για τον έλεγχο και τη μελέτη των αναπτυξιακών σταδίων από τα οποία διέρχεται το φυτό κατά τη διάρκεια του βιολογικού του κύκλου (βλάστηση, ανάπτυξη) και την επίδραση που έχουν τα διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα στο πρωτεϊνικό προφίλ του οργανισμού. Επιπλέον βρίσκει εφαρμογή στη σύγκριση καθαρών σειρών, ειδών και γενών με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο όπως επίσης και στον εντοπισμό πρωτεϊνών σαν αποτέλεσμα μεταλλάξεων. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων φυτών-μικροβίων όπως είναι φυτά της οικογένειας *Leguminosae* με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (*Rhizobiaceae*) και οι αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων μικροοργανισμών αποτελούν εξίσου πεδία ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, με το οικονομικό στοιχείο άμεσα συνδεδεμένο στην γεωργική πρακτική.

Φυσικά υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί και δυσκολίες στη ανάλυση του πρωτεόματος ενός φυτικού οργάνου ή ιστού παρά την πληθώρα τεχνολογιών και αντιδραστηρίων. Οι δυσκολίες αυτές επικεντρώνονται κυρίως στην προετοιμασία του δείγματος και σχετίζονται αφενός με την ακαμψία των κυτταρικών τοιχωμάτων αφετέρου με την ύπαρξη ουσιών οι οποίες αποδομούν-καταστρέφουν τα πρωτεϊνικά μόρια. Γι' αυτό ακόμη και σήμερα η πρωτεομική προσέγγιση των φυτών βασίζεται κυρίως σε φυτά μοντέλα γνωστού γονιδιώματος (*Arabidopsis*, ρύζι) καθώς και σε φυτά που κατά κόρον χρησιμοποιούνται στην έρευνα (δημητριακά, *Lotus japonicus*, *Medicago sativa*).

Για παράδειγμα οι Koller et al. (2002) συνδυάζοντας 2-DE και υγρή χρωματογραφία (LC) ανέλυσαν το πρωτέωμα σε ρίζα, φύλλα και σπόρους ρυζιού. Ο χάρτης εμφάνισε περισσότερες από 2500 πρωτεΐνες εκ των οποίων 189 ήταν κοινές και στους τρεις ιστούς, γεγονός που υποδηλώνει εξειδίκευση αρκετών μορίων σε ιστοειδικό επίπεδο ή το γεγονός της χαμηλής γενετικής εξάρτησης των βασικών μεταβολικών μονοπατιών στα ενδιάμεσα και δευτερογενή στάδια βιοχημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα εξειδικευμένα σε κάποιους ιστούς. Όπως ήδη αναφέρθηκε με τα διάφορα εργαλεία της πρωτεομικής είναι δυνατόν να μελετηθεί η επίδραση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων στο φυτικό οργανισμό. Οι Sule et al (2004) παρατήρησαν διαφορές μεταξύ δύο ποικιλιών κριθαριού (*Hordeum vulgare*) στο τρόπο έκφρασης κάποιων μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (HSPs), που πιθανά να αποτελούν μάρτυρες θερμικής καταπόνησης και κατά συνέπεια ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο είδος.

1.4.3. Η πρωτεομική στα δενδρώδη-πολυετή είδη

Τα πολυετή φυτά περιλαμβάνουν μια μεγάλη ομάδα αγγειόσπερμων και γυμνόσπερμων ειδών με οικονομικό ενδιαφέρον, τα οποία παίζουν κρίσιμο ρόλο τόσο στη ζωή του ίδιου του ανθρώπου όσο και στη λειτουργία του οικοσυστήματος. Ανεξαρτήτως όμως του οικονομικού και οικολογικού τους ενδιαφέροντος η μοριακή, βιοχημική και φυσιολογική τους μελέτη περιορίστηκε και εξακολουθεί να είναι περιορισμένη λόγω διαφόρων παραγόντων όπως είναι το μεγάλο φυσικό τους μέγεθος, το συνήθως μεγάλο γένομα, η μεγάλη διάρκεια βιολογικού κύκλου, η δυσκολία γενετικού μετασχηματισμού καθώς και η δυσκολία παρασκευής δειγμάτων για μοριακές και βιοχημικές αναλύσεις συγκριτικά με ετήσια είδη. Για παράδειγμα η απομόνωση DNA/πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα δύσκολη εξαιτίας της παρουσίας πολυσακχαριτών, χρωστικών, λιπιδίων και φαινολικών ουσιών ιδιαίτερα από λιγνινοποιημένους ιστούς. Παρόλο αυτά έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες πρωτεομικής μελέτης των φυτών αυτών που απέβλεπαν κυρίως στη καταγραφή του γενικότερου πρωτεϊνικού χάρτη στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια και την αντίδραση τους σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης.

Τα τελευταία χρόνια η μοριακή έρευνα των πολυετών φυτών έχει αποκτήσει κατ'αντιστοιχία με τα ετήσια δύο φυτά μοντέλα, τη λεύκα (*Populus*) για τα αγγειόσπερμα και το πεύκο (*Pinus*) για τα γυμνόσπερμα, με επικρατέστερο όμως για ευκολία έρευνας το πρώτο εξαιτίας του σχετικά μικρού γονιδιώματος (~450-550 Mbp, *Arabidopsis*~100-150 Mbp) και της σχετικής ευκολίας μετασχηματισμού του με *Agrobacterium*. Στα παραπάνω φυτά μοντέλα οι όποιες λειτουργικές γενοματικές προσεγγίσεις έχουν γίνει (όπως αρκετά μεγάλης κλίμακας ESTs, έκφραση γονιδίων και πρωτεομικές προσεγγίσεις) θεωρείται ότι θα επιτρέψουν μελλοντικά την εξειδικευμένη αναγνώριση γονιδίων/πρωτεϊνών που συγκεκριμένα εμπλέκονται σε σημαντικά βιολογικά φαινόμενα των πολυετών φυτών. (Canovas et al, 2004).

Παρά τις όποιες δυσκολίες παρουσιάσουν τα πολυετή φυτά ως προς τη μοριακή τους μελέτη (γονιδιακό/πρωτεϊνικό επίπεδο), ορισμένα φαινόμενα που απολήγουν σε τεράστιο οικονομικό ενδιαφέρον για τον άνθρωπο είναι δυνατόν να μελετηθούν εκτενώς και να κατανοηθούν, κατά βάση σε τέτοια είδη. Για παράδειγμα ο σχηματισμός του ξύλου, ενός υλικού ευρέως χρησιμοποιούμενο από τον άνθρωπο, αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα. Οι Mijnsbrugge et al. (2000) ερεύνησαν σε πρωτεϊνικό επίπεδο το σχηματισμό του ξύλου στο γένος *Populus*, τόσο για τη καταγραφή και τη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων πρωτεϊνών όσο και για τη μελέτη της λειτουργίας και των αλληλεπιδράσεων των διαφόρων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη συγκεκριμένη διαδικασία. Κάνοντας χρήση της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων προσδιόρισαν αρκετά πρωτεϊνικά μόρια, είτε με μικροαλληλούχιση είτε με σύγκριση ESTs (Poplar EST database). Πρωτεΐνες που εξειδικευμένα εκφράζονται στο ξύλο αναγνωρίστηκαν με σύγκριση των 2-DE προφίλ μεταξύ φλοιού, νεαρού και ώριμου ξύλου.

1.5. Η πρωτεομική στην ελιά

Κατά την πορεία ανάπτυξης των φυτών, τα κύτταρα υφίστανται μεταβολές στο σχήμα, στη χημική σύνθεση και στην πρωτεϊνική σύστασή τους, οι οποίες συνήθως είναι μη αναστρέψιμες. Είναι γνωστό ότι οι λειτουργίες των πρωτεϊνών (οι οποίες σχετίζονται με τη δομή τους) ποικίλουν. Ορισμένες πρωτεΐνες είναι ένζυμα, άλλες είναι δομικές, ενώ κάποιες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων. Για τους λόγους αυτούς οι πρωτεΐνες αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα του μηχανισμού που είναι υπεύθυνος για τη διαίρεση, ανάπτυξη και διαφοροποίηση των αναπτυσσόμενων κυττάρων (Day, 1996).

Το ποσοστό των πρωτεϊνών στον ελαιόκαρπο είναι μικρό και φθάνει στο 1.5% περίπου του βάρους της ελαιόμαζας. Η σημασία τους όμως είναι μεγάλη τόσο για τη διατροφή του ανθρώπου όσο και για την ανάπτυξη των επιθυμητών γαλακτοβάκιλλων, αν ληφθεί υπόψη ότι τα συστατικά τους, τα αμινοξέα, είναι ουσιώδη.

Η χρήση βιολογικών δεικτών (DNA, πρωτεϊνών) για την ταξινόμηση και το διαχωρισμό των ποικιλιών διαφόρων δένδρων, μεταξύ των οποίων και της ελιάς είναι ευρύτατα διαδεδομένα τα τελευταία χρόνια (Weisman et al. 1977, Fabbri et al. 1995, Bogani et al. 1994). Οι περισσότερες εργασίες χρησιμοποιούν ιστούς φύλλων, ενώ λίγες έχουν εστιάσει σε ανθικά όργανα (ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών των γυρεοκόκκων -Hilali et al., 1995, έλεγχος ισοενζυματικής ποικιλότητας 155 ποικιλιών σε πέντε ενζυμικά συστήματα με SDS PAGE ηλεκτροφόρηση δειγμάτων γύρης - Trujillo et al., 1995). Τα πλεονεκτήματα της ανάλυσης των πρωτεϊνών σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους που βασίζονται σε μορφολογικά κριτήρια είναι ότι διαχωρίζει πλήρως τις ποικιλίες καθώς αποτελεί μία ταχεία και ευαίσθητη μέθοδο, η οποία είναι ανεξάρτητη από περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Όσον αφορά στο ρόλο των πρωτεϊνών στη φυσιολογία της άνθησης αυτός δεν έχει ερευνηθεί διεξοδικά και γι' αυτό δεν έχει αποσαφηνιστεί. Λίγες είναι οι εργασίες που αναφέρονται στις πρωτεΐνες κατά την άνθηση. Σε μια πρόσφατη εργασία (Bouranis et al 1999) αναφέρεται ότι οι ταξιανθίες της ελιάς συμπεριφέρονται ως

"καταβόθρες" των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, παρατήρησαν αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών από την όγδοη έως την τρίτη εβδομάδα πριν από την πλήρη άνθηση, ενώ από την τρίτη μέχρι την πρώτη εβδομάδα από την πλήρη άνθηση δραστηκή μείωση. Την εβδομάδα πριν την πλήρη άνθηση οι ολικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες παρουσίαζαν και νέα σημαντική αύξηση η οποία όμως συνοδεύτηκε από πτωτική πορεία μέχρι την τρίτη εβδομάδα από την πλήρη άνθηση.

Η ελιά όπως ισχύει και για τα περισσότερα πολυετή, ελάχιστα έχει μελετηθεί ως προς τους μεταβολικούς μηχανισμούς που διέπουν τη βιολογία τους. Οι Garcia et. al (2000), μελετώντας το πρωτεϊνικό προφίλ (SDS-PAGE) διαφορετικής ηλικίας ιστών (φύλλα, φλοιό και οφθαλμούς) διαφόρων ποικιλιών-κλώνων ελιάς προσπάθησαν να προσεγγίσουν το φαινόμενο της "αλλαγής φάσης" από νεανική σε βλαστητική κατάσταση, έχοντας ως υπόβαθρο αναφορές σε άλλα φυτικά είδη (*Hedera helix*, *Castanea sativa*) όπου η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων συνδέονταν με το συγκεκριμένο φαινόμενο. Αρχικά με τον υπολογισμό της στάθμης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, παρατηρήθηκε αισθητή διαφορά μεταξύ νεαρών και ώριμων φύλλων, είτε αυτά προέρχονταν από ανήλικους (375 και 450 $\mu\text{g/g}$ NB ιστού) είτε από ενήλικους μορφολογικά βλαστούς (750 και 950 $\mu\text{g/g}$ NB ιστού). Σε ανάλογα δείγματα φλοιού δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ ανήλικης και ενήλικης φάσης. Με την επιπλέον SDS-PAGE ανάλυση δεν προέκυψαν τόσο σημαντικές διαφορές στο πρωτεϊνικό προφίλ μεταξύ ανήλικων και ενήλικων ιστών και ιδιαίτερα στα φύλλα, όσο διαφορές μεταξύ διαφορετικού τύπου ιστών. Η διαφορά μεταξύ ιδίου τύπου ανήλικων και ενήλικων ιστών ήταν περισσότερο ποσοτική, δηλαδή ως προς το επίπεδο έκφρασης κάποιων πρωτεϊνικών ομάδων. Συγκεκριμένα, μια ομάδα πρωτεϊνών με μοριακό μέγεθος 29 kDa, εμφάνιζε μεγαλύτερα ποσοστά έκφρασης σε νεανικούς ιστούς, ενώ αντίθετα μια άλλη μεγέθους 35 kDa εμφανιζόταν με μεγαλύτερη ένταση σε ιστούς με ενήλικα χαρακτηριστικά. Ποσοτικές διαφορές υπήρξαν και στην έκφραση άλλων πρωτεϊνών (63 kDa), επειδή όμως η επαναληψιμότητα μεταξύ των διαφόρων ποικιλιών δεν ήταν σταθερή και επιπλέον δεν παρατηρήθηκε σε δείγματα οφθαλμών, θεωρήθηκε ως εξειδικευμένη των συγκεκριμένων ποικιλιών από τις οποίες απομονώθηκε.

Μολονότι, πολλά και απλά πρωτόκολλα εφαρμόζονται επιτυχώς σε πολλά φυτικά είδη, στην περίπτωση της ελιάς δεν ισχύει κάτι τέτοιο λόγω της ιδιαίτερης σύστασης των ιστών της σε ουσίες (νουκλεϊκά οξέα, φαινολών, λιπών, χρωστικών κ.α.) που αλληλεπιδρούν με τα πρωτεϊνικά μόρια, επηρεάζοντας εν τέλει την 2-DE.

Οι Wang et al. (2003), ανέπτυξαν ένα πρωτόκολλο καθαρισμού δειγμάτων φύλλων ελιάς για ανάλυση με 2-DE. Τα βασικά του χαρακτηριστικά ήταν: (i) το εκτεταμένο ξέπλυμα του ιστού με οργανικούς διαλύτες (ακετόνη), για την απομάκρυνση λιπιδίων και χρωστικών, (ii) ξέπλυμα με οργανικό/υδατικό διάλυμα τριχλωροοξικού οξέος (TCA) για την απομάκρυνση διαφόρων υδατοδιαλυτών συστατικών, και (iii) εκχύλιση των πρωτεϊνών με διάλυμα φαινόλης για το διαχωρισμό τους από νουκλεϊκά οξέα και κατακρήμνιση τους με οξικό αμμώνιο. Οι διάφορες παραλλαγές του πρωτοκόλλου στη συγκεκριμένη εργασία απέδωσαν ένα μέγιστο αριθμό 156 πρωτεϊνικών κηλίδων. Σύμφωνα με τους συγγραφείς η τελική εικόνα των πηκτών (1-DE και 2-DE) ήταν αρκετά καλής ποιότητας, επιτρέποντας τη σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων.

Η ίδια σχεδόν ερευνητική ομάδα (Wang et al, 2004) έχοντας ήδη γνώση τη δυσκολία ανάλυσης με 2-DE ορισμένων φυτών (ελιά) επικέντρωσε στην προσπάθεια βελτίωσης πρωτοκόλλων, με εφαρμογή πιο ήπιων συνθηκών για την παραλαβή των πρωτεϊνών και παράλληλα τη μέγιστη δυνατή απομάκρυνση εκείνων των ουσιών που περιέχονται στο δείγμα και επηρεάζουν αρνητικά την 2-DE ανάλυση. Είναι γνωστό ότι μια τέτοια κατηγορία συστατικών είναι τα λίπη. Χρησιμοποιώντας ως φυτικό υλικό σπόρους του είδους *Ricinus communis L*, ιστοί μεγάλης περιεκτικότητας σε λίπη, προσάρμοσαν ένα αρκετά τροποποιημένο πρωτόκολλο από εκείνο της προηγούμενης εργασίας τους. Τα βασικά του χαρακτηριστικά ήταν: (i) απομάκρυνση των λιπών με μίγμα χλωροφόρμιου/μεθανόλης, και (ii) κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με διάλυμα TCA/ακετόνης, μια μέθοδος κατακρήμνισης που κατά κόρον χρησιμοποιείται έναντι άλλων. Από τη νέα εφαρμογή προέκυψε αφενός μεν πιο καθαρή εικόνα των πηκτών, αφετέρου δε η επαναληψιμότητα μεταξύ ανεξάρτητων πειραμάτων να πλησιάζει το 98%. Σύμφωνα πάντα με τους ίδιους, το ίδιο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε με ανάλογα αποτελέσματα και σε άλλα είδη όπως *Olea europaea*, *Helianthus annuus*, *Brassica napus* και *Sesamum indicum*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικό υλικό

Στη παρούσα εργασία προκειμένου να μελετηθεί η εικόνα των πρωτεϊνών των οφθαλμών κατά το στάδιο της διαφοροποίησης χρησιμοποιήθηκε ως φυτικό υλικό, πλάγιοι οφθαλμοί της ελιάς.

Το Πείραμα πραγματοποιήθηκε στον Ελαιώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στο Βοτανικό. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ποικιλίες οι Manzanillo και Χαλκιδικής. Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν σε εβδομαδιαία διαστήματα τις πρωινές ώρες (08.00 έως 10:00 π.μ. περίπου) από τις αρχές Φεβρουαρίου μέχρι την έκπτυξη των οφθαλμών, τέλος Μάρτη.

Συλλέγονταν ανθοφόροι βλαστοί μήκους 15-20 cm συμμετρικά κατανεμημένοι σε όλη την κόμη του δένδρου. Από τους βλαστούς αυτούς παραλαμβάνονταν οι πλάγιοι οφθαλμοί (νωπού βάρους 2gr περίπου). Η παραλαβή και νέκρωση των ιστών γινόταν σε υγρό άζωτο, η λειοτριβήση γίνονταν επίσης με τη βοήθεια υγρού αζώτου σε προψυγμένα γουδί και γουδοχέρι. Οι λειοτριβημένοι ιστοί διατηρούνταν στους -80°C μέχρι και τη χρήση τους.

Παράλληλα παραλαμβάνονταν τμήματα από την κεντρική περιοχή των βλαστών τα οποία διατηρούνταν σε FAA για την μακροσκοπική μελέτη της εξέλιξης των οφθαλμών.

2.2. Εκχύλιση ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών & καθαρισμός τους

Η παραλαβή και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών από τους οφθαλμούς της ελιάς πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των Garcia et al. (1999), Süle et al. (2004), Wang et al (2004) και Ανδρεάδης (2006) , μερικώς τροποποιημένα.

Η πορεία για την εκχύλιση των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών έχει ως εξής:

1. Συγκεκριμένη ποσότητα ιστού ο οποίος συντηρούταν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ λειοτριβόταν με υγρό άζωτο.
2. Στον ομογενοποιημένο ιστό προσθέταμε δεκαπλάσιο όγκο, σε σχέση με το βάρος του, διαλύματος εκχύλισης και γινόταν ανάδευση του μίγματος για 60 min στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (vortexing).
3. Ακολουθούσε φυγοκέντριση σε 19000 g για 30 min στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ και παραλαβή της υπερκείμενης φάσης.
4. Σε x ml εκχυλίσματος προσθέταμε x ml χλωροφόρμιο/μεθανόλη (2:1) και αναμιγνύαμε με vortexing για 30 sec. Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών γινόταν με προσθήκη στο μίγμα x ml 10% TCA-0.07% β-μερκαπτοεθανόλη σε ακετόνη και επώαση στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 60 min ή overnight.
5. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούταν σε 10000 g για 6 min στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ οπότε και γινόταν διαχωρισμός τριών φάσεων.
6. Η ανώτερη υδάτινη απορρίπτονταν ενώ η κατώτερη οργανική και η ενδιάμεση αναμιγνύονταν και ξεπλένονταν τρεις φορές με $2x$ ml υδατικού διαλύματος 10 % TCA και μια φορά με $5x$ ml ddH₂O (σε κάθε ξέπλυμα απορρίπτονταν η ανώτερη φάση, αναμιγνύονταν οι άλλες δύο και φυγοκεντρούταν ως άνω).
7. Η τελική παραλαβή των πρωτεϊνών υπό μορφή ιζήματος γινόταν μετά από ένα ξέπλυμα με $10x$ ml απόλυτη ακετόνη.
8. Το δείγμα επωάζονταν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 15 min και ακολουθούσε φυγοκέντριση με τις πιο πάνω συνθήκες.
9. Το ίζημα πρωτεϊνών αφυδατώνονταν σε ήπιο ρεύμα αέρα και διατηρούνταν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι και τη χρήση του.

(Όλα τα διαλύματα βρίσκονταν σε θερμοκρασία πάγου κατά τη χρήση τους)

- Διαλύματα για την παραλαβή και τον καθαρισμό των πρωτεϊνών.

1) Διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών (50 mM βορικό νάτριο, 50 mM ασκορβικό οξύ, pH 9, 1% β-μερκαπτοεθανόλη, 1% PVP διαλυτή, 1% PVP αδιάλυτη, 10 mM PMSF).

Ζυγίζαμε 1 g PVP διαλυτή και τη διαλύαμε σε 70 ml ddH₂O. Προσθέταμε 1.0064 g βορικό νάτριο, 0.8806 g ασκορβικό οξύ και γινόταν ρύθμιση του pH στο 9 με 5.8 % NH₄OH. Προσθέταμε 1 ml β-μερκαπτοεθανόλη και συμπληρώναμε με ddH₂O σε τελικό όγκο 100 ml. Το διάλυμα συντηρούταν στους 4 °C. Πριν τη χρήση του προσθέταμε 1 g PVP αδιάλυτη και 10 mM PMSF.

2) Διάλυμα χλωροφόρμιου/μεθανόλης (2:1).

Για 200 ml διαλύματος αναμιγνύαμε 140 ml χλωροφόρμιο και 70 ml μεθανόλη.

3) Διάλυμα 10% TCA-0.07% β-μερκαπτοαιθανόλη σε ακετόνη.

Ζυγίζαμε 10 gr TCA και τα διαλύαμε σε 100 ml ακετόνη. Στη συνέχεια προσθέταμε 70 μl β-μερκαπτοαιθανόλη.

4) Υδατικό διάλυμα 10 % TCA.

Ζυγίζαμε 10 gr TCA και τα διαλύαμε σε 100 ml ddH₂O.

5) Διάλυμα ακετόνης-0.07% β-μερκαπτοαιθανόλη.

Σε 100 ml ακετόνης προσθέταμε 70 μl β-μερκαπτοαιθανόλη.

2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει μήκος κύματος απορρόφησης όταν αυτή δεσμεύεται σε μια πρωτεΐνη σε όξινο περιβάλλον. Σε ελεύθερη μορφή η χρωστική απορροφά στα 465 nm ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική στα 595 nm (Bradford, 1976, Bearden, 1978).

Πίνακας 2.1. Σειρά πρότυπων διαλυμάτων BSA για την καμπύλη αναφοράς στη φωτομέτρηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

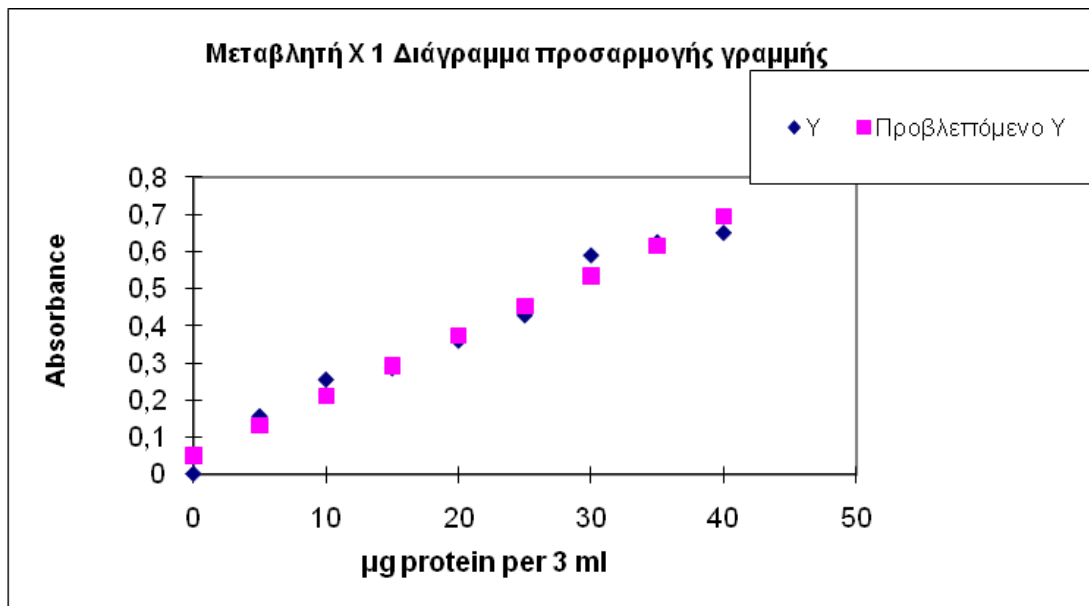
tube	Διάλυμα A (μl)	Συγκ/ση BSA στην κυψελίδα(μg)	Διάλυμα B (μl)	Όγκος A+B (μl)	Αντιδραστήριο Bradford (μl)	Τελικός όγκος στη κυψελίδα (ml)
0	0	0	1500	1500	1500	3
1	50	5	1450	»	»	»
2	100	10	1400	»	»	»
3	150	15	1350	»	»	»
4	200	20	1300	»	»	»
5	250	25	1250	»	»	»
6	300	30	1200	»	»	»
7	350	35	1150	»	»	»
8	400	40	1100	»	»	»

Πραγματοποιούνταν τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση.

Γινόταν μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm μετά την πάροδο 5 min από την προσθήκη του αντιδραστηρίου Bradford και κατασκευάζονταν η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Πίνακας 2.2. Μετρήσεις των απορροφήσεων διαλυμάτων BSA στα 595 nm.

A/A	BSA (1/10)διά- λυμα(μl)	BSA μg/3ml	Buffer Διάλυμα (μl)	Coomassie Διάλυμα (μl)	Επανάληψη 1	Επανάληψη 2	Επανάληψη 3	Mean Absorbance
0	0	0	1500	1500	0	0	0	0
1	50	5	1450	1500	0,135	0,177	0,155	0,15566667
2	100	10	1400	1500	0,324	0,248	0,192	0,255
3	150	15	1350	1500	0,337	0,246	0,273	0,285
4	200	20	1300	1500	0,349	0,365	0,367	0,36033333
5	250	25	1250	1500	0,432	0,433	0,421	0,42866667
6	300	30	1200	1500	0,606	0,588	0,579	0,591
7	350	35	1150	1500	0,556	0,631	0,693	0,62666667
8	400	40	1100	1500	0,668	0,668	0,619	0,65166667



$$\Psi=0,016119X+0,050289$$

Διάγραμμα 2.1. : Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών.

Με ανάλογο τρόπο γινόταν και η μέτρηση των δειγμάτων, η απορρόφηση των οποίων ανάγονταν τελικά σε συγκέντρωση με τη βοήθεια της καμπύλης και της εξίσωσης που προέκυπτε. Η συγκέντρωση ανάγονταν σε μg πρωτεΐνης / g NB ιστού.

2.3.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων BSA.

Φτιάχναμε την παρακάτω σειρά διαλυμάτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml.

Τα διαλύματα που απαιτούνταν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών προκειμένου να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς ήταν : πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης βοδιού (Bovine Serum Albumin-BSA), φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα και αντιδραστήριο Bradford-Coomassie Brilliant Blue G-250.

1) Μητρικό διάλυμα BSA

Ζυγίζαμε \underline{x} ποσότητα (μεταξύ 10 και 20 mg) BSA και τη διαλύαμε σε \underline{x} ml διπλά απεσταγμένο νερό (ddH_2O). Το διάλυμα αυτό διατηρούνταν στους -20°C .

2) Διάλυμα A

Διαλύαμε 600 μl μητρικού διαλύματος BSA με ddH_2O σε ένα τελικό όγκο 6000 μl , οπότε και προέκυπτε μία αραιώση 1/10. Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι 10 μg BSA/100 μl ddH_2O .

3) Διάλυμα B ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1M, pH 7.0)

K_2HPO_4 , 1 M : Ζυγίζαμε 17.418 g K_2HPO_4 και τα διαλύαμε σε τελικό όγκο 100 ml με ddH_2O

KH_2PO_4 , 1 M : Ζυγίζαμε 13.609 g KH_2PO_4 και τα διαλύαμε σε τελικό όγκο 100 ml με ddH_2O

Το πυκνό φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (1 M) προέκυπτε με ανάμιξη 61.2 ml K_2HPO_4 1M και 38.8 ml KH_2PO_4 1M. Γινόταν ρύθμιση του pH στο 7.0 .

Για την παρασκευή 50 mM φωφορικού ρυθμιστικού διαλύματος διαλύαμε 50 ml πυκνού φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (1 M) σε τελικό όγκο 1000 ml με ddH₂O.

4) Αντιδραστήριο Bradford (0.01 % w/v Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.7 % w/v αιθανόλη, 8.5 % w/v φωσφορικό οξύ)

Ζυγίζαμε 100 mg χρωστικής και τα διαλύαμε σε 50 ml υδατικού διαλύματος αιθανόλης (95 % v/v). Έπειτα προσθέταμε 100 ml πυκνού φωσφορικού οξέος (85 % w/v). Το διάλυμα που προέκυπτε αποτελούσε το πυκνό αντιδραστήριο Bradford και διατηρούνταν σε αδιάφανο σκεύος σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν τη χρήση του συμπληρώναμε με ddH₂O σε τελικό όγκο 1 L και διηθούσαμε.

2.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε κατακόρυφη πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) είναι μια ηλεκτροφορητική μέθοδος με την οποία πολυπεπίδια διαχωρίζονται ανάλογα με τη μοριακή τους μάζα, σε πηχτή η οποία προκύπτει από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου παρουσία SDS (sodium dodecyl sulfate).

Το SDS αποτελεί μόριο με μια υδρόφοβη αλυσίδα και μια αρνητικά φορτισμένη κεφαλή. Ο ρόλος του στην διαδικασία της ηλεκτροφόρησης είναι η αποδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων, προσδίδοντας σε αυτά την ίδια πυκνότητα φορτίου, έτσι ώστε η κινητικότητα τους στα πηγματα, λόγω της επίδρασης του εφαρμοζόμενου πεδίου, να εξαρτάται αποκλειστικά από τη μοριακή τους μάζα. Το SDS δεσμεύεται ισχυρά στις πρωτεΐνες σε αναλογία 1.4g SDS/g πρωτεΐνης ή 1 μόριο SDS/2 αμινοξέα, προκαλώντας την αποδιάταξη τους.

Η ηλεκτροφόρηση των διαφόρων δειγμάτων σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου πραγματοποιήθηκε σε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων (Laemmli, 1970).

2.4.1. Παρασκευή πηκτής

Η πορεία για την παρασκευή της πηκτής έχει ως εξής:

Πηκτή διαχωρισμού (12.5 % T)

1. Σε κωνική φιάλη απαέρωσης θέταμε 25 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου.
2. Προσθέταμε 15 ml ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής διαχωρισμού και 600 μl διαλύματος 10% SDS.
3. Το μίγμα στη συνέχεια αραιώνονταν με 24 ml ddH₂O και υποβάλλονταν σε απαέρωση με τη βοήθεια αντλίας νερού για 5 min περίπου.
4. Προσθέταμε 300 μl διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου, 20 μl TEMED και αναδεύαμε για όσο το δυνατόν καλύτερη ομοιογένεια του διαλύματος.
5. Παραλαμβάναμε το διάλυμα με χειρουργική σύριγγα και κάναμε προσεκτικά την έγχυση στην κασέτα ώστε να μη σχηματιστούν φυσαλίδες αέρα, μέχρι ενός επιπέδου 1 cm περίπου κάτω από το επίπεδο της χτένας οριοθέτησης των πηγαδιών.
6. Καλύπταμε την κορυφή της πηκτής με 0.5 ml διαλύματος βουτανόλης κορεσμένης με νερό για οριζοντίωση της επιφάνειας υποδοχής της πηκτής επιστοίβαξης και αφήναμε να πολυμεριστεί για 1^{1/2} h περίπου σε θερμοκρασία δωματίου.

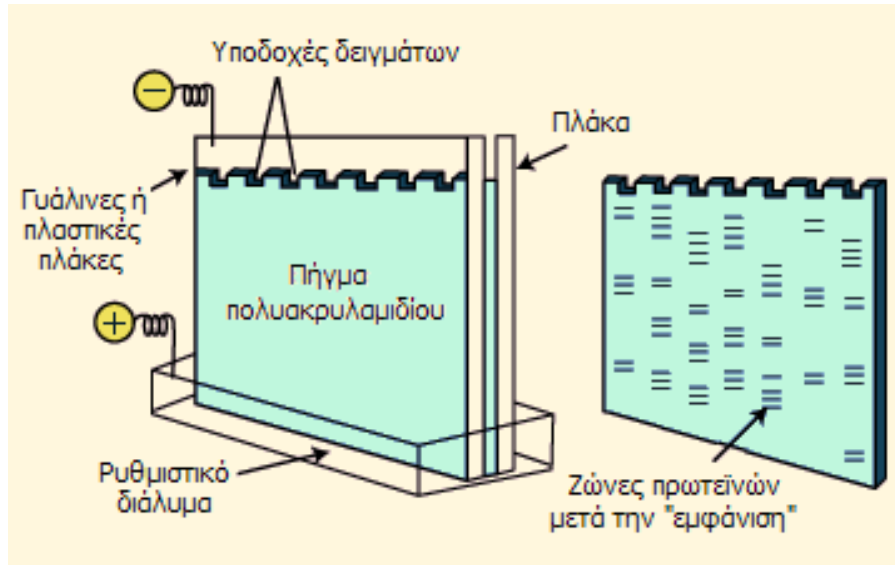
Για όση ώρα προετοιμάζαμε την πηκτή επιστοίβαξης αντικαθιστούσαμε το διάλυμα βουτανόλης με 1 ml διαλύματος κάλυψης πηκτής διαχωρισμού.

Πηκτή επιστοίβαξης (4 % T)

7. Σε κωνική φιάλη απαέρωσης θέταμε 1.76 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου.
8. Προσθέταμε 3.32 ml ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής επιστοίβαξης και 132 μl διαλύματος 10% SDS.
9. Το μίγμα στη συνέχεια αραιώνονταν με 8.12 ml ddH₂O και υποβάλλονταν σε απαέρωση με τη βοήθεια αντλίας νερού για 5 min περίπου.
10. Προσθέταμε 66.8 μl διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου, 6.6 μl TEMED και αναδεύαμε για όσο το δυνατόν καλύτερη ομοιογένεια του διαλύματος.
11. Παραλαμβάναμε το διάλυμα με χειρουργική σύριγγα και κάναμε προσεκτικά την έγχυση στην κορυφή της πηκτής διαχωρισμού, αφού προηγουμένως

είχαμε απομακρύνει την ποσότητα διαλύματος κάλυψης και είχαμε ξεπλύνει δύο φορές με ddH₂O και μία φορά με διάλυμα πηκτής επιστοιβάξης.

12. Άμεσα τοποθετούσαμε κατάλληλο υποδοχέα (χτένα) στην κορυφή της πηκτής ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια-θέσεις των δειγμάτων και αφήναμε να πολυμεριστεί overnight στους 4 °C.



Εικόνα 2.1. : Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε κατακόρυφη πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στη παρούσα εργασία, στηρίχτηκε στο προτεινόμενο από τη Hoefler (1994). Η πηκτή ήταν 12,5% Τα ομοιογενής και οι διαστάσεις της πηκτής ήταν 1.5 x 140 x 160 mm.

- Διαλύματα για την παρασκευή της πηκτής

- 1) Διάλυμα ακρυλαμιδίου/N',N-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο (30.8 % T-2.7 % C_{Bis})

Ζυγίζαμε 60 g ακρυλαμιδίου και τα διαλύαμε σε 150 ml ddH₂O. Κατόπιν προσθέταμε 1,6 g N',N-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο και συμπληρώναμε σε τελικό όγκο 200 ml με ddH₂O. Το διάλυμα διηθούνταν και συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο στους 4°C.

2) Διάλυμα 10 % w/v υπερθειϊκού αμμωνίου (APS)

Ζυγίζαμε 100 mg υπερθειϊκού αμμωνίου και τα διαλύαμε σε τελικό όγκο 1 ml με ddH₂O. Το διάλυμα παρασκευαζόταν κάθε φορά πριν από τη χρήση του.

3) Διάλυμα 10 % w/v SDS

Ζυγίζαμε 10 g SDS και τα διαλύαμε σε τελικό όγκο 100 ml με ddH₂O. Το διάλυμα διηθούνταν και συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου.

4) Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

Ζυγίζαμε 36.3 g Tris και τα διαλύαμε σε 150 ml ddH₂O. Ρυθμίζαμε το pH στο 8.8 με πυκνό HCl και συμπληρώναμε σε τελικό όγκο 200 ml με ddH₂O. Το διάλυμα διηθούνταν και συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο στους 4°C.

5) Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)

Ζυγίζαμε 12 g Tris και τα διαλύαμε σε 150 ml ddH₂O. Ρυθμίζαμε το pH στο 6.8 με πυκνό HCl και συμπληρώναμε σε τελικό όγκο 200 ml με ddH₂O. Το διάλυμα διηθούνταν και συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο στους 4°C.

6) Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0.1% SDS)

Για την παρασκευή πυκνού ρυθμιστικού διαλύματος (10X) ζυγίζαμε 144 g γλυκίνη και τα διαλύαμε σε 0.5 L ddH₂O. Στη συνέχεια προσθέταμε 30.3 g Tris, 10 g SDS και συμπληρώναμε σε τελικό όγκο 1L. Το διάλυμα συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν τη χρήση του αραιώνονταν 1/10 με απιονισμένο νερό.

7) Διάλυμα βουτανόλης κορεσμένη με νερό

Αναμιγνύαμε 50 ml βουτανόλης με 5 ml ddH₂O. Χρησιμοποιούταν η ανώτερη φάση για την οριζοντίωση της πηκτής διαχωρισμού.

8) Διάλυμα κάλυψης πηκτής διαχωρισμού (0.375 M Tris-HCl, 0.1% SDS, pH 8.8)

Σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής διαχωρισμού προσθέταμε 1 ml διαλύματος 10 % w/v SDS. Συμπληρώναμε σε τελικό όγκο 100 ml με ddH₂O. Το διάλυμα συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο στους 4°C.

2.4.2. Χειρισμός δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (SDS-PAGE)

Τα δείγματα, συγκέντρωσης 50 µg πρωτεΐνης, διαλύονταν σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης στο οποίο προσθέτονταν ως μάρτυρας μετώπου η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (0.02 %w/v) και αναδεύονταν για 1h περίπου στους 4°C για πλήρη επαναδιάλυση. Ακολούθως γινόταν φυγοκέντριση σε 14000 g για 5 min στους 4°C, παραλαμβάνονταν η υπερκείμενη φάση, η οποία θερμαίνονταν στη συνέχεια στους 90-100 °C για 5 min. Αφού τα δείγματα κρύωναν εισάγονταν στα κανάλια της πηκτής και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν σε σταθερή ένταση 20 mA, τάση 250 V για 4 h περίπου. Πραγματοποιήθηκαν τρεις ηλεκτροφορήσεις για κάθε δείγμα.

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (8M ουρία, 62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% β-μερκαπτοεθανόλη, 10% γλυκερόλη).

Ζυγίζαμε 48 g ουρία και τα διαλύαμε σε 40 ml ddH₂O. Προσθέταμε 6.25 ml 1M Tris-HCl, pH 6.8, 2 g SDS, 5 ml β-μερκαπτοεθανόλη, 10 ml γλυκερόλη και συμπληρώναμε με ddH₂O σε τελικό όγκο 100 ml. Το διάλυμα συντηρούταν στους -20 °C σε ποσότητες των 2 ml.

2.4.3. Μέθοδοι χρώσης πηκτής

2.4.3.1. Χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250

Η χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250 βασίζεται στη μη-εξειδικευμένη πρόσδεση των μορίων της χρωστικής στα μόρια των πρωτεϊνών. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται μετά από ηλεκτροφόρηση για τη βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών.

- Διαδικασία χρωματισμού της πηκτής

Με τη λήξη του προγράμματος ηλεκτροφόρησης μεταφέραμε άμεσα τη πηκτή σε επαρκή ποσότητα διαλύματος προσήλωσης όπου και επωάζονταν για 20 min. Ακολούθως, ξεπλέναμε με απιονισμένο νερό και την μεταφέραμε στο διάλυμα της χρωστικής για μία περίπου ώρα. Ο αποχρωματισμός της πηκτής γινόταν με τακτή ανανέωση του διαλύματος αποχρωματισμού, μέχρις του επιθυμητού οπτικού αποτελέσματος.

Τα απαιτούμενα διαλύματα καθώς και η πορεία χρωματισμού της πηκτής είχαν ως εξής (Sigma, 1994):

- Διαλύματα χρώσης της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250

1) Διάλυμα προσήλωσης (11.5 % τρίχλωροοξικό οξύ, 3.46 % 5-σουλφοσαλικυλικό οξύ)

Σε τελικό όγκο 1L απιονισμένο νερό διαλύαμε 115 g τρίχλωροοξικό οξύ και 34.6 g 5-σουλφοσαλικυλικό οξύ.

2) Διάλυμα χρωστικής (0.25 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 % μεθανόλη, 7 % οξικό οξύ)

Σε 450 ml μεθανόλης διαλύονταν 2.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250. Το μίγμα διηθούταν και προσθέταμε 35 ml οξικό οξύ. Συμπληρώναμε σε τελικό όγκο 1 L με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου (Sigma, 2003).

3) Διάλυμα αποχρωματισμού (25 % μεθανόλη, 5 % οξικό οξύ)

Για 1 L του παραπάνω διαλύματος αναμιγνύαμε 250 ml μεθανόλης, 50 ml οξικό οξύ και 700 ml απιονισμένο νερό.

2.4.3.2. Χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο

Η χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO_3) βασίζεται στην εξειδικευμένη δέσμευση των ιόντων σιδήρου στις σουλφιδρικές και καρβοξυλικές ομάδες των πρωτεϊνικών μορίων. Αποτελεί μια υπερευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης πρωτεϊνών, 10-100 φορές πιο ευαίσθητη από τη χρώση με Coomassie Blue.

- Διαδικασία χρωματισμού της πηκτής

Με τη λήξη του προγράμματος ηλεκτροφόρησης ή ακόμη και μετά τον αποχρωματισμό της Coomassie Blue, μεταφέραμε τη πηκτή σε επαρκή ποσότητα διαλύματος προσήλωσης I για 20 min. Ξεπλέναμε με το διάλυμα πλύσης για 10 min και ακολουθούσε επώαση στο διάλυμα προσήλωσης II για άλλα 10 min. Ξεπλέναμε δύο φορές για 10 min με το διάλυμα πλύσης. Στη συνέχεια τοποθετούσαμε τη πηκτή στο διάλυμα εξισορρόπησης για 1 min (ακριβώς) και αφού ξεπλέναμε τρεις φορές για 20 sec (ακριβώς) με απιονισμένο νερό γινόταν **επώαση στο διάλυμα χρώσης για 20 min**. Ακολουθούσε δύο φορές ξέπλυμα για 20 sec (ακριβώς) με απιονισμένο νερό και επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης μέχρις ότου εμφανίζονταν οι πρωτεϊνικές ζώνες. Η διακοπή της αντίδρασης γινόταν με το διάλυμα οξικού οξέος, για 10 min. Τέλος, η πηκτή ξεπλένονταν δύο φορές για 5 min με απιονισμένο νερό, και η πηκτή τοποθετούνταν στο διάλυμα αποθήκευσης

- Διαλύματα χρώσης της πηκτής με νιτρικό άργυρο

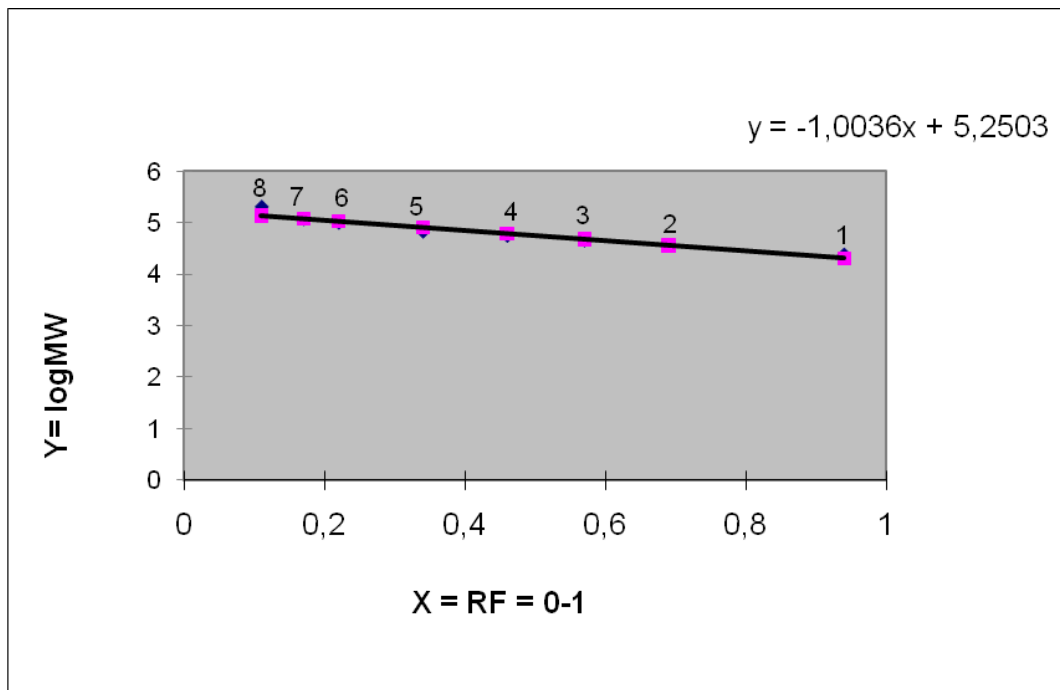
- 1) Διάλυμα προσήλωσης : 50% v/v μεθανόλη, 5% v/v οξικό οξύ σε απιονισμένο νερό.
- 2) Διάλυμα πλύσης : 50% v/v μεθανόλη σε απιονισμένο νερό.
- 3) Διάλυμα εξισορρόπησης : Διαλύσαμε 0.2 gr $\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2$ σε 1 l απιονισμένο νερό.
- 4) Διάλυμα χρωστικής : Διαλύσαμε 1g AgNO_3 σε 1 l απιονισμένο νερό.
- 5) Διάλυμα ανάπτυξης : Σε τελικό όγκο 1 l απιονισμένο νερό διαλύσαμε 20 g Na_2CO_3 και προσθέταμε 400 μl φορμαλδεύδη (0,04% v/v).
- 6) Διάλυμα διακοπής αντίδρασης : 5% v/v οξικό οξύ.
- 7) Διάλυμα αποθήκευσης : 1% v/v οξικό οξύ.

2.4.4. Υπολογισμός μοριακού μεγέθους πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνικών μορίων αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά στο πεδίο ερευνάς τους. Για τον προσδιορισμό του παράλληλα με τα δείγματα διαχωρίζεται στην πηκτή και ομάδα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού μεγέθους. Με βάση αυτά τα μοριακά μεγέθη κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με την οποία υπολογίζονται τα μοριακά μεγέθη των πρωτεϊνών που περιέχονται στο δείγμα. Η κατασκευή της καμπύλης βασίζεται στον προσδιορισμό ενός δείκτη που είναι γνωστός ως σχετική κινητικότητα (Rf) και ισούται με το λόγο:

$$Rf = \frac{\text{Μετανάστευση πρωτεΐνης}}{\text{Μετανάστευση μετώπου χρωστικής}}$$

Τα πειραματικά μας δεδομένα έδωσαν την παρακάτω καμπύλη αναφοράς.



Διάγραμμα 2.2: Rf μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους μαρτύρων. (στοιχεία Πίνακα 2.3.)

Πίνακας 2.3. Πρωτεΐνες Μάρτυρα στην πηκτή (καμπύλη διαγράμματος 2.2)

Αρ.σημείου καμπύλης	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	MW(kDa)
8	Myosin	140
7	B-Galactosidase	120
6	Phosphorylase b	106
5	Albumin, bovine serum	82
4	Glutamic Dehydrogenase	61
3	Ovalbumin	47
2	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase	35
1	Trypsin Inhibitor	20

Πίνακας 2.4.. Πρωτεΐνες δείγματος

MANZANILLO				
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΕΣ	ΔΕΙΓΜΑ 2	M.O.ΣΥΓΚ./1000mg	ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΙΓΜ	SUMPLE BUFFER
			.	
7/2/2008	0,501	30,95422	15,50806422	7,75403211
15/2/2008	0,51	12,884341	6,57101391	3,285506955
22/2/2008	0,508	44,78729667	22,75194671	11,37597335
29/2/2008	0,501	56,19414667	28,15326748	14,07663374
7/3/2008	0,501	56,19412667	28,15325746	14,07662873
14/3/2008	0,501	31,78714667	15,92536048	7,96268024
20/3/2008	0,508	128,0391	65,0438628	32,5219314

ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ				
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΕΣ	ΔΕΙΓΜΑ2	M.O.ΣΥΓΚ./1000mg	ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΙΓΜ.	SUMPLE BUFFER
7/2/2008	0,505	12,90430667	6,516674867	3,258337433
15/2/2008	0,536	3,3986	1,8216496	0,9108248
22/2/2008	1,043	100,3567767	104,6721181	52,33605903
29/2/2008	0,501	133,73236	66,99991236	33,49995618
7/3/2008	0,503	103,10287	51,86074361	25,93037181
14/3/2008	0,501	88,73869333	44,45808536	22,22904268
20/3/2008	0,503	153,1662267	77,04261201	38,52130601

2.5. Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων(2-DE)

Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-Dimensional Electrophoresis) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών σε πηκτή με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI) σε πρώτη διάσταση και ακολουθεί σε δεύτερη διάσταση ο διαχωρισμός τους με βάση το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης. Το αποτέλεσμα είναι κηλίδες (spots) διασκορπισμένες στο πήκτωμα, με την κάθε μία να αντιπροσωπεύει μόνο μία πρωτεΐνη του αρχικού δείγματος. Με τον τρόπο λοιπόν αυτό καθίσταται δυνατός ο διαχωρισμός εκατοντάδων διαφορετικών πρωτεϊνών. Αναφέρεται ότι ο αριθμός των κηλίδων που μπορεί να ανιχνευθεί σε ένα χάρτη δύο-διαστάσεων είναι δυνατόν να ξεπεράσει τις 1000.

Πρόκειται για μία αρκετά ευαίσθητη τεχνική διαχωρισμού πρωτεϊνικών μορίων και απαιτεί τον ανάλογο εξοπλισμό (συσκευές, αντιδραστήρια). Η 1^η διάσταση (IEF) πραγματοποιείται σε ειδική πηκτή σε μορφή αφυδατωμένης λωρίδας (IPG strip, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) ενώ η 2^η διάσταση (SDS-PAGE) σε κοινή πηκτή η οποία παρασκευάζεται στο εργαστήριο με τον τρόπο που περιγράψαμε σε προηγούμενη παράγραφο. Θα πρέπει επίσης να αναφέρουμε ότι σαν μέθοδος είναι αρκετά χρονοβόρα, αφού διαρκεί από 2-3 ημέρες.

Τα επιπλέον διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, πέρα από εκείνα που αναφέρθηκαν στην απλή διάσταση SDS-PAGE καθώς και η αναλυτική διαδικασία εφαρμογής της συγκεκριμένης μεθόδου ήταν: (Amersham Biosciences, 2004; Carpentier et al, 2005; Giavalisco et al, 2005; Natarajan et al, 2005; Shaw and Riederer, 2003; Finnie and Svensson, 2002).

- 1) Διάλυμα ενυδάτωσης των IPG strip (9.5 M ουρία, 2% CHAPS, 2% IPG buffer, 20 mM διθειοθρεϊτόλη)

Ζυγίζαμε 14.25 g ουρίας και τα διαλύαμε σε 15 ml ddH₂O. Κατόπιν προσθέταμε 0.5 g CHAPS, 500 μl IPG buffer ανάλογου εύρους pH με εκείνο των IPG Strips, προσθέτουμε ίχνη bromophenol-blue και συμπληρώναμε με ddH₂O σε τελικό όγκο 25 ml. Το διάλυμα συντηρούταν στους -20 °C σε ποσότητες των 2 ml. Πριν

τη χρήση του προσθέταμε 7 mg διθειοθρεϊτόλης (DTT) / 2.5 ml του παραπάνω διαλύματος.

2) Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (0.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

Ζυγίζαμε 12 g Tris και τα διαλύαμε σε 150 ml ddH₂O. Ρυθμίζαμε το pH στο 8.8 με πυκνό HCl και συμπληρώναμε σε τελικό όγκο 200 ml με ddH₂O. Το διάλυμα διηθούνταν και συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο στους 4°C.

3) Μητρικό διάλυμα εξισορρόπησης των IPG strip (50mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M ουρία, 30 % γλυκερόλη, 2 % SDS)

Ζυγίζαμε 72.07 g ουρία και τα διαλύαμε σε 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης. Προσθέταμε 69 ml γλυκερόλης, 4 g SDS και συμπληρώναμε με ddH₂O σε τελικό όγκο 200 ml. Το διάλυμα συντηρούταν στους -20 °C σε ποσότητες των 20 ml.

Λίγο πριν τη χρήση τους φτιάχναμε τα παρακάτω δύο τελικά διαλύματα εξισορρόπησης:

- No1 : Σε 10 ml μητρικού διαλύματος εξισορρόπησης διαλύαμε 100 mg DTT.
- No2 : Σε 10 ml μητρικού διαλύματος εξισορρόπησης διαλύαμε 250 mg ιοδοακεταμίδιο (IAA) και ίχνη μπλε της βρωμοφαινόλης.

4) Διάλυμα ακινητοποίησης των IPG strip στη 2^η διάσταση (0.125 M Tris-HCl, 0.5 % αγαρόζη, 0.1 % SDS).

Ζυγίζαμε 0.2 g αγαρόζη και τα διαλύαμε με θέρμανση σε 20 ml dd H₂O. Προσθέταμε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής επιστοίβαξης, 400 μl 10 % SDS και συμπληρώναμε με ddH₂O σε τελικό όγκο 40 ml. Το διάλυμα συντηρούταν στους 4 °C σε ποσότητες των 2 ml.

2.5.1. Αναλυτική περιγραφή του πρωτοκόλλου της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων

1^η ημέρα : Ενυδάτωση των Immobiline Dry Strip

- 1) Αφού οριζοντιώναμε τον ειδικό δίσκο ενυδάτωσης με τους κοχλίες και το αλφάδι που φέρει ενσωματωμένα τοποθετούσαμε στα αυλάκια υποδοχής των IPG strip κατάλληλη ποσότητα διαλύματος ενυδάτωσης η οποία εξαρτώνταν από το μήκος των Strip :

Πίνακας 2.5. Αντιστοιχία όγκου δ/τος ενυδάτωσης (μl) και μήκους IPG strip (cm)

Μήκος IPG strip (cm)	Όγκος δ/τος ενυδάτωσης (μl) / αυλάκι
7	125
11	200
12	250
18	340

- 2) Αφαιρούσαμε με προσοχή από τα IPG strips την προστατευτική μεμβράνη και τα τοποθετούσαμε ένα σε κάθε αυλάκι με την πλευρά της πηκτής να κοιτάζει προς τα κάτω και την όξινη άκρη (+) απέναντι από την κλίμακα αρίθμησης του δίσκου. Δινόταν ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην εγκλωβίζονταν φυσαλίδες αέρα μεταξύ IPG strip και διαλύματος ενυδάτωσης.
- 3) Καλύπταμε κάθε IPG strip με 2-3 ml Dry Strip Cover Fluid προκειμένου να παρεμποδιστεί η εξάτμιση του διαλύματος ενυδάτωσης και η κρυσταλοποίηση της ουρίας.
- 4) Αφήναμε για ενυδάτωση τουλάχιστον 10 h ή μέχρι την επομένη σε θερμοκρασία δωματίου.

* Το πρωτόκολλο προτείνει δύο εναλλακτικές πορείες. Στη μία περίπτωση στο στάδιο της ενυδάτωσης είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί η εισαγωγή του δείγματος, αφού προηγουμένως διαλυθεί σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος ενυδάτωσης. Στην άλλη περίπτωση η τοποθέτηση του δείγματος γινότανε με sample cups.

2^η ημέρα : 1^η διάσταση – Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)

Η ισοηλεκτρική εστίαση πραγματοποιούνταν σε οριζόντια ψυχόμενη συσκευή ηλεκτροφόρησης τύπου Multiphor II (Amersham Biosciences).

Προετοιμασία εξοπλισμού ηλεκτροφόρησης

- 1) Ρυθμίζαμε το τροφοδοτικό ψύξης στους 15-20 °C και οριζοντιώναμε την πλάκα της συσκευής ηλεκτροφόρησης με τους ειδικούς κοχλίες που φέρονται στη βάση της.
- 2) Καλύπταμε την ψυχόμενη κεραμική επιφάνεια με 3-4 ml Dry Strip Cover Fluid και τοποθετούσαμε με προσοχή τον ειδικό δίσκο (Immobiline Dry Strip tray) υποδοχής των strip, έτσι ώστε να μην εγκλωβίζονται μεγάλες φυσαλίδες αέρα μεταξύ τους.
- 3) Συνδέαμε τις ηλεκτρικές υποδοχές του δίσκου με τις αντίστοιχες της συσκευής Multiphor II.
- 4) Ρίχναμε περίπου 10 ml DryStrip Cover Fluid εντός του δίσκου και τοποθετούσαμε την ειδική μεμβράνη οριζοντίωσης-ακινητοποίησης (Immobiline strip aligner) των IPG strip.
- 5) Κόβαμε δύο IEF Electrode Strips μήκους 11cm το καθένα, ανεξάρτητα από τον αριθμό των IPG strip που θα χρησιμοποιούσαμε. Τα τοποθετούσαμε σε επίπεδη, καθαρή επιφάνεια και τα διαβρέχαμε με 0.5 ml dd H₂O. Κατόπιν απομακρύναμε οποιαδήποτε περίσσεια νερού καλύπτοντας τα με απορροφητικό χαρτί.
- 6) Καθαρίζαμε με σχολαστικότητα τα ηλεκτρόδια της συσκευής καθώς επίσης και τους υποδοχείς των δειγμάτων (sample cups) με dd H₂O.

Τοποθέτηση των Immobiline DryStrip

- 1) Αφού απομακρύναμε από τα ενυδατωμένα πλέον strip την οποιαδήποτε περίσσεια διαλύματος ενυδάτωσης με διηθητικό χαρτί βρεγμένο με ddH₂O για 2-3 min, τα μεταφέραμε με προσοχή στα αυλάκια που φέρει η μεμβράνη οριζοντίωσης-ακινητοποίησης με την πλευρά της πηκτής προς τα πάνω.

Ο προσανατολισμός των strip ήταν τέτοιος ώστε η όξινη περιοχή (+) (κόκκινο χρώμα) να βρίσκεται προς την άνοδο ενώ η βασική (-) (μαύρο χρώμα) στην κάθοδο.

- 2) Τοποθετούνταν τα ενυδατωμένα IEF Electrode Strips εγκάρσια στα δύο άκρα των strip και κατόπιν στο αντίστοιχο ύψος τα ανάλογα ηλεκτρόδια ανόδου και καθόδου.
- 3) Ρίχναμε περίπου 200-300 ml Dry Strip Cover Fluid μέσα στο δίσκο ώστε να καλυφθούν πλήρως τα IPG strip.
- 4) Θέταμε τις κατάλληλες παραμέτρους ρεύματος για την έναρξη της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης. Για IPG strip μήκους 13 cm και εύρους pH 4-7 η συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν:

	V	mA	W	Vh
Φάση 1	300	1	5	1
Φάση 2	300	1	5	1800
Φάση 3	3500	1	5	17500
Φάση 4	3500	1	5	19250

3^η ημέρα : 2^η διάσταση – SDS PAGE

Εξισορρόπηση των IPG strip

- 1) Αφού ολοκληρωνόταν το πρόγραμμα της ισοηλεκτρικής εστίασης παραλαμβάναμε τα IPG strip για τη διαδικασία εξισορρόπησης η οποία πραγματοποιούνταν σε δύο στάδια:
 - i. Τοποθετούσαμε το strip σε 10 ml διαλύματος εξισορρόπησης No 1 και αφήναμε για επώαση με ταυτόχρονη ανάδευση για 15 min τουλάχιστον.
 - ii. Στο δεύτερο στάδιο απορρίπταμε το διάλυμα No1 και προσθέταμε 10 ml διαλύματος εξισορρόπησης No2. Αφήναμε για επώαση με ταυτόχρονη ανάδευση επίσης για 15 min τουλάχιστον.

Στην περίπτωση που τα IPG strip δεν επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν αμέσως για τη 2^η διάσταση συντηρούνταν στους -80 °C, πριν την διαδικασία εξισορρόπησης.

- 2) Μετά και την δεύτερη εξισορρόπηση μεταφέραμε τα strips πάνω σε βρεγμένο με dd H₂O διηθητικό χαρτί για 10 min για την απομάκρυνση περίσσειας διαλυμάτων εξισορρόπησης.

2^η διάσταση – SDS PAGE

Η 2^η διάσταση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί τόσο σε οριζόντια όσο και σε κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση

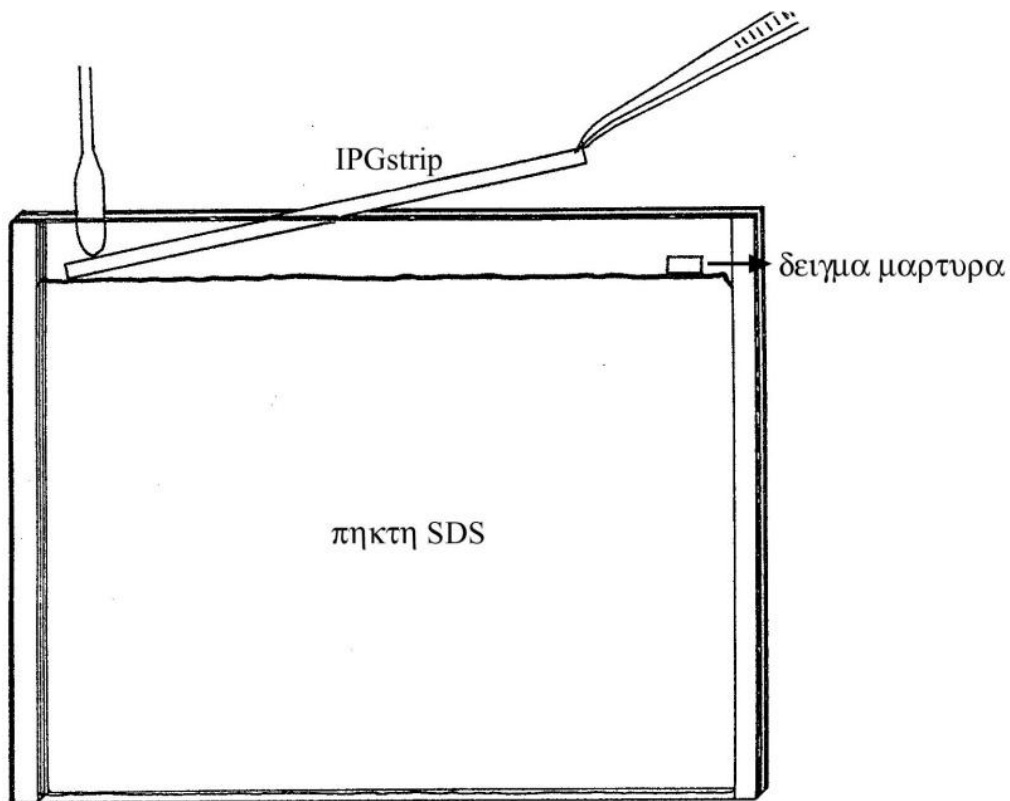
Η πηκτή SDS που χρησιμοποιήθηκε για τη 2^η διάσταση ήταν παρόμοιας σύστασης και παρασκευαζόταν κατά τον ίδιο τρόπο που περιγράψαμε στην προηγούμενη παράγραφο. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι δεν διέθετε περιοχή επιστοίβαξης, και το πάχος της ήταν 0,8mm. Η περιοχή διαχωρισμού έφθανε μέχρι ενός επιπέδου 0.5 cm περίπου κάτω από την κορυφή των γυάλινων πλακιδίων.

Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μεγαλύτερη περιοχή διαχωρισμού των πρωτεϊνών καθώς και ευκολία στην τοποθέτηση του IPG strip μεταξύ των γυάλινων πλακιδίων. Η τοποθέτηση των IPG strip γινόταν ως εξής :

1) Με τη βοήθεια μιας τσιμπίδας τοποθετούσαμε την μία άκρη του IPG strip μεταξύ των γυάλινων πλακών (σαν σφήνα) και στη συνέχεια με μια σπάτουλα πιέσαμε το strip προς τα κάτω ώστε να έρθει σε πλήρη επαφή με τη πηκτή διαχωρισμού. Στην περίπτωση που εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα μεταξύ strip και πηκτής δεν θα υπάρξει μεταφορά πρωτεϊνών από τη μία διάσταση στην άλλη στα συγκεκριμένα σημεία. Το δείγμα μαρτύρων τοποθετούνταν με sample piece στο περιθώριο μεταξύ IPG strip και spacer.

2) Ακινητοποιούσαμε- ασφαλίσαμε το IPG strip με διάλυμα 0.5 % αγαρόζης μέχρι ενός ύψους 2 mm πάνω από το strip.

3) Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν σε σταθερή ένταση 20 mA, για 1½-2 ώρες περίπου.



Εικόνα 2.2. : Τοποθέτηση του IPG strip στη πηκτή 2^{ης} διάστασης σε κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Η χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο γινόταν όπως περιγράφεται στην απλή SDS-PAGE ανάλυση.

2.5.2. Χειρισμός δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

Τα δείγματα διαλύονταν σε κατάλληλο όγκο διαλύματος ενυδάτωσης και αναδεύονταν για τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου για πλήρη επαναδιάλυση. Ακολούθως γινόταν φυγοκέντριση σε 15000 g για 15 min στους 15 °C και παραλαμβάνονταν η υπερκείμενη φάση. Σε κάθε δείγμα προσθέτονταν ως μάρτυρας μετώπου η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (0.02 % w/v). Κατάλληλη ποσότητα δείγματος χρησιμοποιούνταν για την προσθήκη στη φάση της ενυδάτωσης των IPG strip

2.5.3. Επιλογή πρωτεϊνών δειγμάτων

Επιλέξαμε δείγματα από την 29/2/08 και την 20/3/08 και στις δύο ποικιλίες ώστε να έχουμε επαρκή πρωτεΐνη δειγμάτων και στις δύο ημερομηνίες. Έτσι είχαμε τελικά δείγματα από την MANZANILLO στις 29/2/08 : 105 µgr και στις 20/3/08 : 56 µgr και από την ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ στις 29/2/08 : 119 µgr και στις 20/3/08 : 90 µgr. Από αυτά χρησιμοποιήσαμε 100 µgr από κάθε δείγμα.

Πίνακας 2.6. Πρωτεΐνες δειγμάτων

MANZANILLO				
ΗΜ/ΝΙΑ	ΔΕΙΓΜΑ 3	Μ.Ο.ΣΥΓΚ./1000mg	ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΙΓΜ.	SUMPLE BUFFER
7/2/2008	0	30,95422	0	0
15/2/2008	0	12,884341	0	0
22/2/2008	0	44,78729667	0	0
29/2/2008	1,002	56,19414667	56,30653496	28,15326748
7/3/2008	0,887	56,19412667	49,84419035	24,92209518
14/3/2008	0,618	31,78714667	19,64445664	9,82222832
20/3/2008	0,293	128,0391	37,5154563	18,75772815

ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ				
ΗΜ/ΝΙΑ	ΔΕΙΓΜΑ 3	Μ.Ο.ΣΥΓΚ./1000mg	ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΙΓΜ.	SUMPLE BUFFER
7/2/2008	0,5	12,90430667	6,452153333	3,226076667
15/2/2008	0,549	3,3986	1,8658314	0,9329157
22/2/2008	0	100,3567767	0	0
29/2/2008	0,507	133,73236	67,80230652	33,90115326
7/3/2008	0,505	103,10287	52,06694935	26,03347468
14/3/2008	0,5	88,73869333	44,36934667	22,18467333
20/3/2008	0,305	153,1662267	46,71569913	23,35784957

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.2. Ανάλυση των πρωτεϊνών των πλάγιων οφθαλμών της ελιάς την περίοδο Φεβρουαρίου-Μαρτίου.

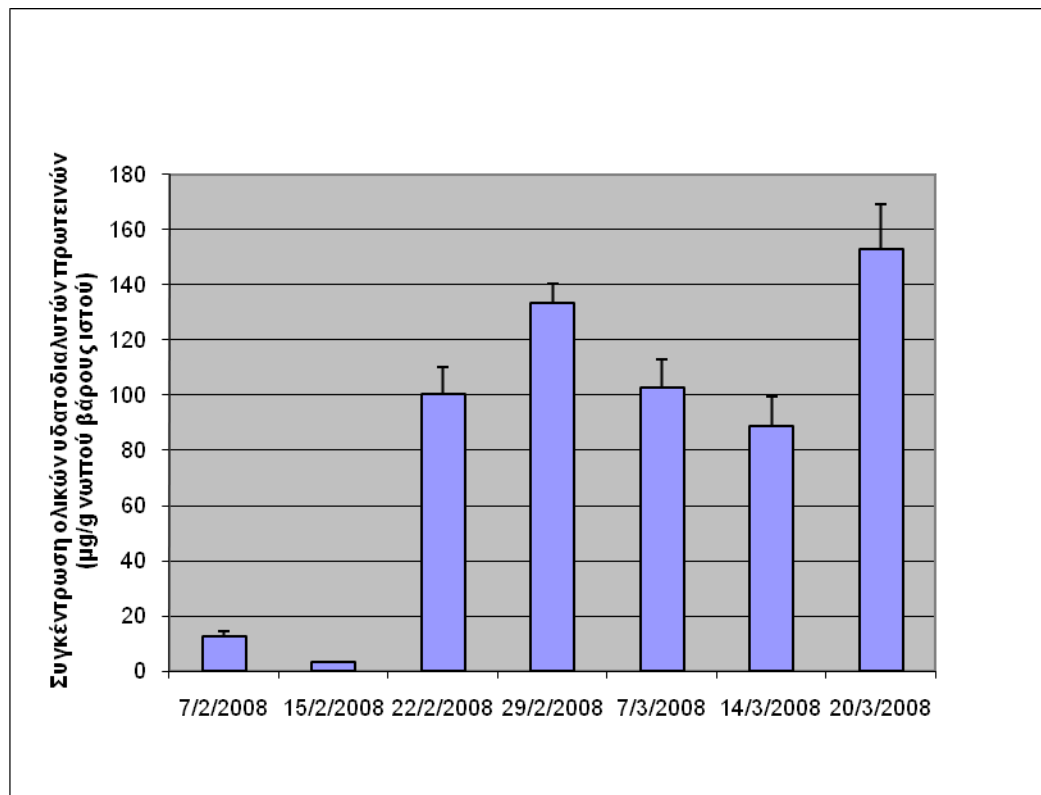
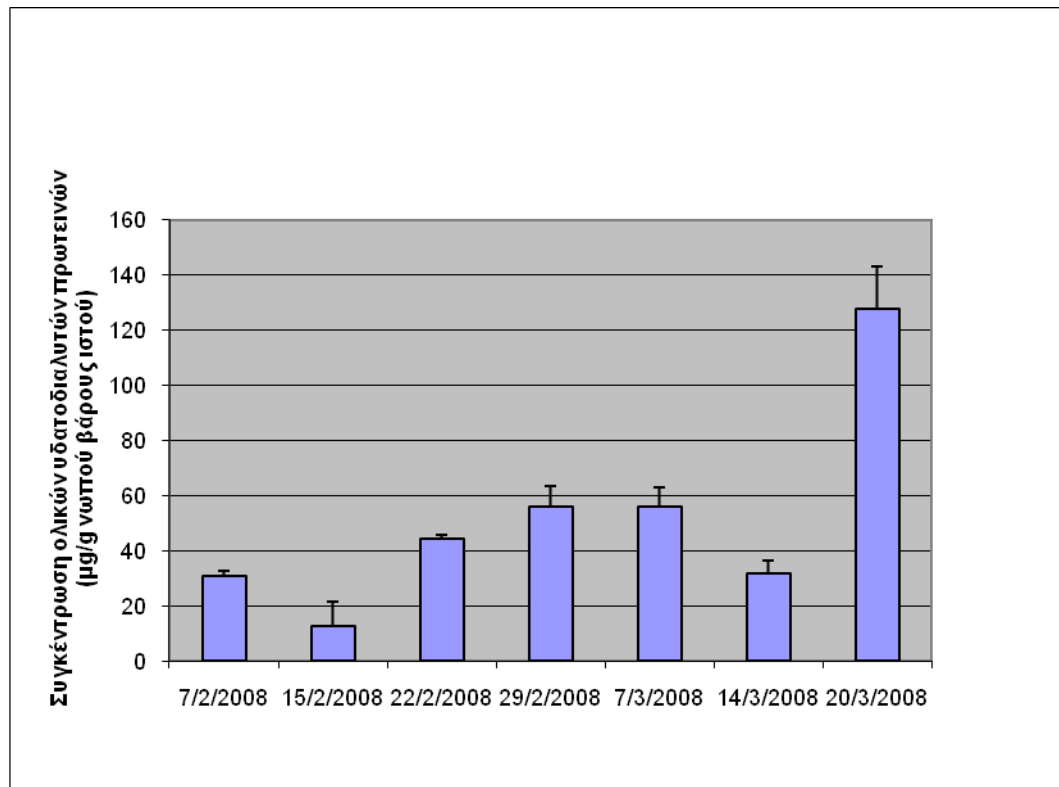
3.2.1. Η πορεία της στάθμης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών

Στους πλάγιους οφθαλμούς της ποικιλίας **MANZANILLO**, η στάθμη των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών για το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου κυμάνθηκε μεταξύ 13 $\mu\text{g/g}$ νωπού βάρους ιστού (15/2) και 128 $\mu\text{g/g}$ νωπού βάρους ιστού (20/3). Η ανάλυση της παράλλαξης έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφόρων ημερομηνιών δειγματοληψιών. Η γενική εικόνα της καμπύλης είναι κυματοειδής με ελάχιστα στις 15/2 και στις 14/3. (13 μg NB και 32 μg NB αντίστοιχα). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών διατηρείται σε σταθερά σχετικά επίπεδα (~ 44 $\mu\text{g/g}$ νωπού βάρους ιστού), από 22/2 έως 7/3, η μέγιστη τιμή παρατηρήθηκε στις 20/3 (~ 128 $\mu\text{g/g}$ νωπού βάρους ιστού).

Στους πλάγιους οφθαλμούς της ποικιλίας **ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ**, η στάθμη των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών για το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου κυμάνθηκε μεταξύ 3 $\mu\text{g/g}$ νωπού βάρους ιστού (15/2) και 153 $\mu\text{g/g}$ νωπού βάρους ιστού (20/3). Η ανάλυση της παράλλαξης έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφόρων ημερομηνιών δειγματοληψιών. Η γενική τάση δείχνει ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο συγκεκριμένο τύπο οφθαλμών διατηρείται σε σταθερά σχετικά επίπεδα (~ 106 $\mu\text{g/g}$ νωπού βάρους ιστού), από 22/2 έως 14/3. Η γενική εικόνα της καμπύλης είναι κυματοειδής με ελάχιστα στις 15/2 και στις 14/3. Σημαντική αύξηση σημειώνεται στις 20/3 (~ 153 $\mu\text{g/g}$ νωπού βάρους ιστού).

Η στάθμη των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στους πλάγιους οφθαλμούς ποικιλίας **ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ**, διατηρήθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από εκείνη της ποικιλίας **MANZANILLO**, (πλην δύο περιπτώσεων, στις 7/2 και 15/2). Και στις δύο ποικιλίες η μέγιστη συγκέντρωση σημειώθηκε την 20/3. Προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ποικιλιών, όσον αφορά το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο. Ωστόσο οι καμπύλες των αυξομειώσεων σε σχέση με το χρόνο ήταν ανάλογες.

Η πορεία της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών (όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford) παρουσιάζεται στο διάγραμμα 3.1.



Διάγραμμα 3.1 : Η πορεία της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στους πλάγιους οφθαλμούς της ελιάς, (MANZANILLO, ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ) την περίοδο Φεβρουαρίου-Μαρτίου

3.2.2. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σε πηκτή SDS

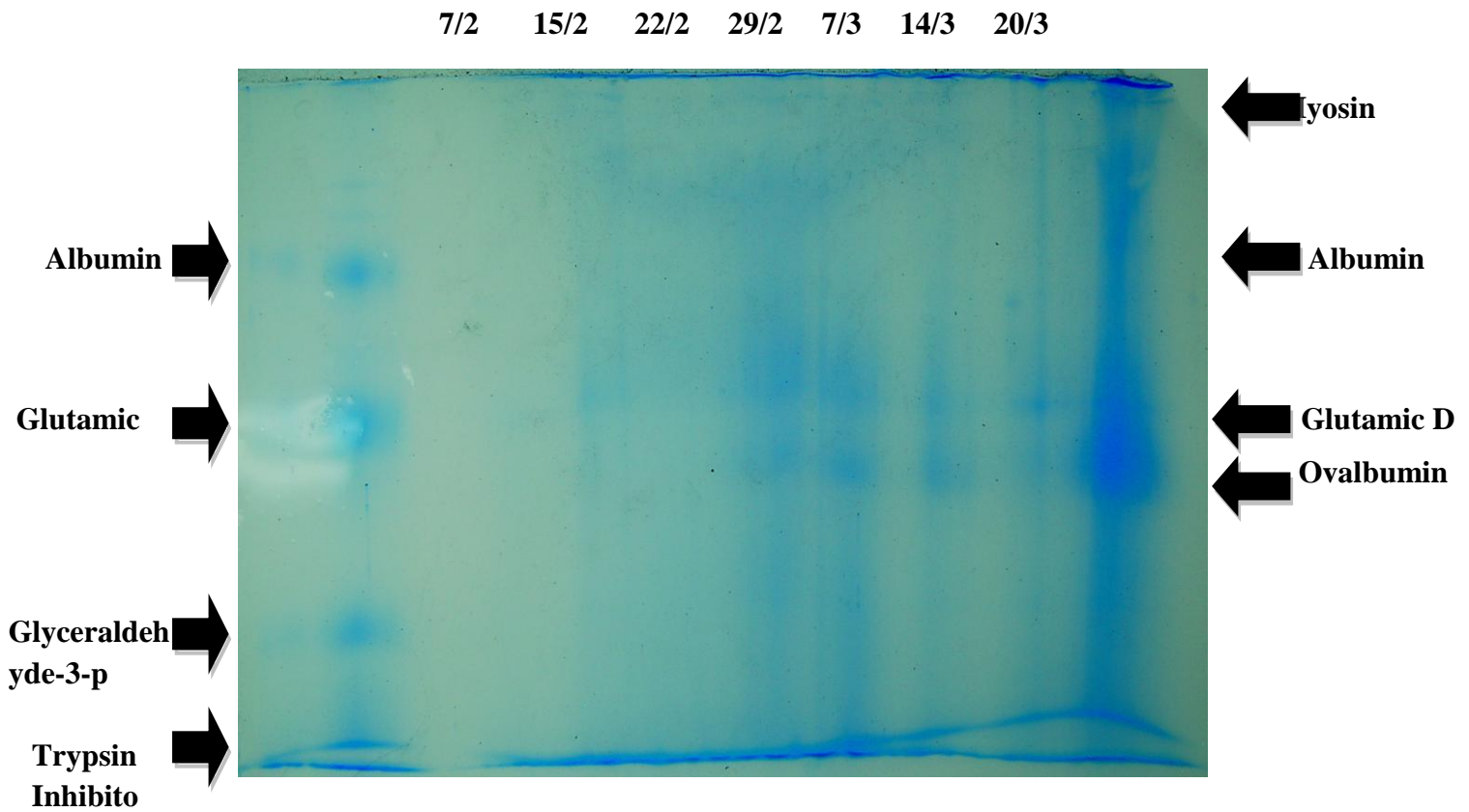
Στους πλάγιους οφθαλμούς της ποικιλίας MANZANILLO, ο αριθμός των εμφανών πρωτεϊνικών ζωνών που αποκαλύφθηκε με τη μέθοδο SDS-PAGE κυμάνθηκε από 1 έως 5 για το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου. (Εικόνα 3.1).

Το μοριακό βάρος (Πίνακας 3.1.2) των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν κυμάνθηκε από 20 έως 144 kDa. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες και εντονότερες ζώνες βρίσκονταν στη περιοχή από 43 έως 125 kDa. Τρεις μόνο πρωτεΐνες έδειχναν να εμφανίζονται σε όλα σχεδόν τα δείγματα. Ειδικότερα, μία με μοριακό βάρος περίπου 44 kDa, μια δεύτερη περίπου 56 kDa, και μια τρίτη περίπου 122 kDa. Επιπλέον δύο πολύ καλά ευδιάκριτες ζώνες με μοριακά βάρη περίπου 22 και 82 kDa εμφανίστηκαν στις 22/2 και 29/2. Τρεις μεγάλου μοριακού βάρους (131,137,144 kDa) εμφανίστηκαν στις 20/3/08 οι οποίες ήταν έντονες. Στα χαμηλά μοριακά βάρη, εντοπίστηκαν δύο πρωτεΐνες (22, 29 και 20 kDa περίπου).

Οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες (5) αποκαλύφθηκαν κατά τις ημερομηνίες 22/2 και 29/2, και λίγο λιγότερες στις 7/2 και 20/3. Ωστόσο η περίοδος 22/2 έως 20/3 μπορούμε να πούμε ότι χαρακτηρίζονταν από μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών ζωνών οι οποίες είχαν παρόμοια μοριακά βάρη στις ημερομηνίες αυτές (εξαιρέση αποτέλεσε η 20/3 όπου εμφανίστηκαν τρεις ζώνες με μεγαλύτερα μοριακά βάρη). Κατά τις ημερομηνίες 7/2 και 15/2 απουσίαζαν οι πέντε μεγαλύτερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες (82, 122, 131, 137 και 144 kDa). Απουσία των τεσσάρων μεγαλύτερων πρωτεϊνών (122, 131, 137 και 144 kDa) παρατηρήθηκε και κατά την 14/3. Την 7/2 εμφανίζεται η πρωτεΐνη με μέγεθος 29 kDa, η οποία και δεν ανιχνεύθηκε σε καμία άλλη ημερομηνία, κατά τη διάρκεια της μελέτης.

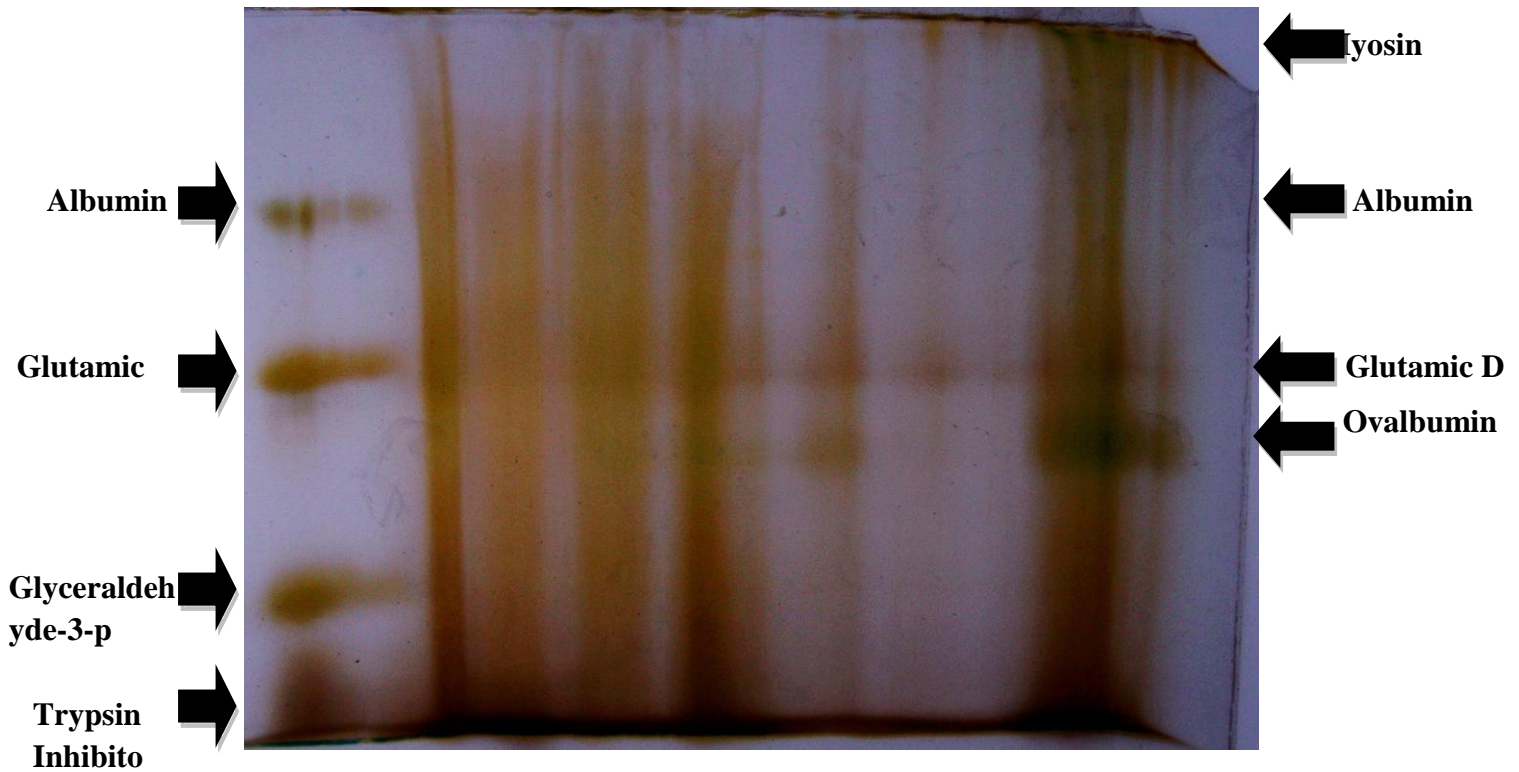
Πίνακας 3.1. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών ζωνών (kDa) που απομονώθηκαν στους πλάγιους οφθαλμούς της MANZANILLO, για το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου.

A/A	7/2/08	15/2/08	22/2/08	29/2/08	7/3/08	14/3/08	20/3/08	M.O.MW
1							144	144
2							137	137
3							131	131
4							125	125
5			122	122				122
6					117			117
7			81	82				81,5
8	55	54	56	56	56	56		55,5
9			44	43	44	47		44,5
10	29							29
11			23	20				21,5



Εικόνα 3.1.α. Πρωτεϊνικές ζώνες που εντοπίστηκαν σε ιστούς πλάγιων οφθαλμών Manzanillo σε χρωματισμό coomassie στο διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου. Φορτώθηκαν 50 μ gr πρωτεΐνης σε κάθε πηγάδι πηχτής. Χρησιμοποιήθηκαν Sigma SDS page markers, High (36 – 205 kDa) και Low (14 – 66 kDa) molecular weights, σε πηχτή 12,5%T.

7/2 15/2 22/2 29/2 7/3 14/3 20/3



Εικόνα 3.1.β. Πρωτεϊνικές ζώνες που εντοπίστηκαν σε ιστούς πλάγιων οφθαλμών *Manzanillo* σε χρωματισμό με Νιτρικό Άργυρο στο διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου. Φορτώθηκαν 50 μ gr πρωτεΐνης σε κάθε πηγάδι πηχτής. Χρησιμοποιήθηκαν *Sigma SDS page markers, High (36 – 205 kDa)* και *Low (14 – 66 kDa) molecular weights*, σε πηχτή 12,5%T.

Στους πλάγιους οφθαλμούς της ποικιλίας ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ, ο αριθμός των εμφανών πρωτεϊνικών ζωνών που αποκαλύφθηκε με τη μέθοδο SDS-PAGE κυμάνθηκε από 2 έως 6 για το χρονικό διάστημα 7/2/08 έως 20/3/08. (Εικόνα 3.2.).

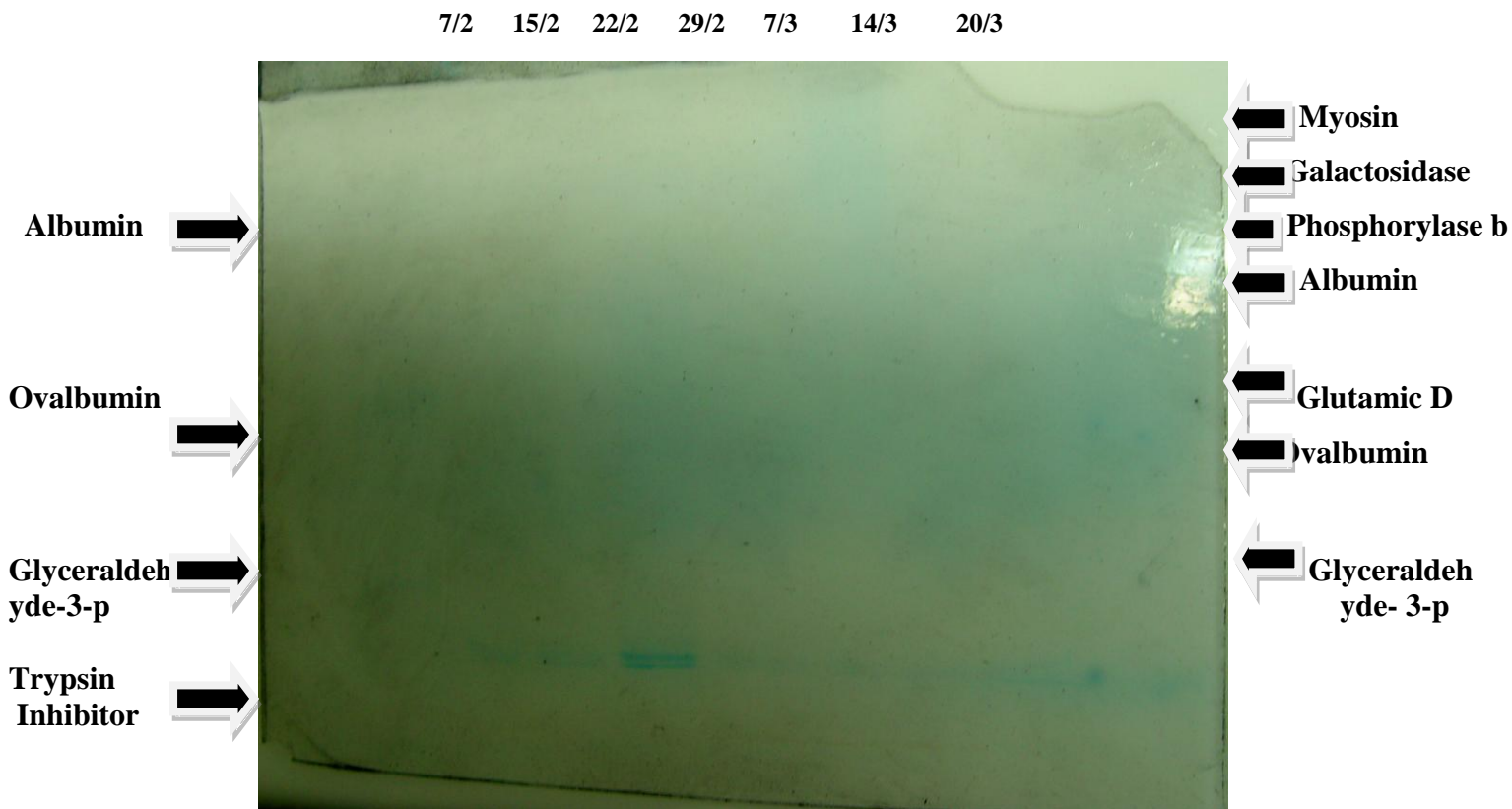
Το μοριακό βάρος (Πίνακας 3.2.2) των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν κυμάνθηκε από 19 έως 164 kDa. Τέσσερις πρωτεΐνες έδειχναν να εμφανίζονται σε όλα σχεδόν τα δείγματα, Μία με μοριακό βάρος περίπου 20 kDa, μια δεύτερη 28 kDa, μια τρίτη 51 kDa και μια 160 kDa. Επιπλέον δύο πολύ καλά ευδιάκριτες ζώνες με μοριακά βάρη 42 και 150 kDa εμφανίστηκαν σε τρεις και δυο ημερομηνίες αντίστοιχα. Στα χαμηλά μοριακά βάρη, εντοπίστηκε μια πρωτεΐνη σε μια ημερομηνία με μοριακό βάρος 32 kDa, και στα μεγάλα μοριακά βάρη δύο πρωτεΐνες μια με μοριακό βάρος 110 και μια με 125 kDa (στις 7/3 και 29/2 αντίστοιχα).

Οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες (5,6) αποκαλύφθηκαν κατά τις ημερομηνίες 15/2 έως και 7/3, λιγότερες (3) στις 14/3 και 20/3 και οι λιγότερες (2) στις 7/2. Ωστόσο η περίοδος 15/2 έως 20/3 μπορούμε να πούμε ότι χαρακτηρίζονταν από μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών ζωνών οι οποίες είχαν παρόμοια μοριακά βάρη.

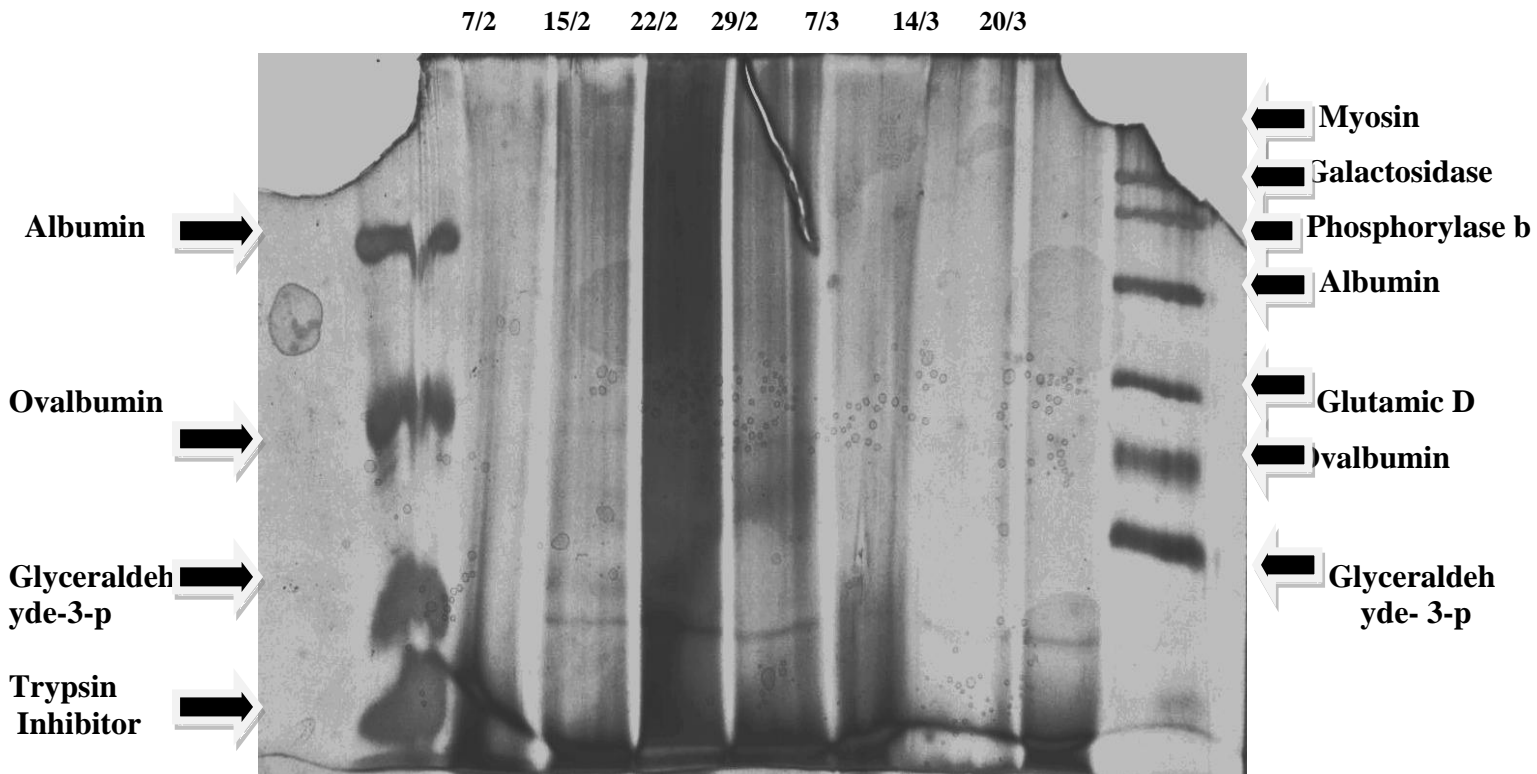
Κατά την 7/2 παρατηρήθηκαν μόνο οι πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 23 και 147 kDa. Την 15/2 εμφανίζεται η πρωτεΐνη με μέγεθος 32 kDa, την 29/2 η πρωτεΐνη με μέγεθος 125 kDa και την 7/3 η πρωτεΐνη με μέγεθος 110 kDa οι οποίες και δεν ανιχνεύθηκαν σε καμία άλλη ημερομηνία, κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Πίνακας 3.2. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών ζωνών (kDa) που απομονώθηκαν στους πλάγιους οφθαλμούς της ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ, για το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου.

A/A	7/2/08	15/2/08	22/2/08	29/2/08	7/3/08	14/3/08	20/3/08	M.O.MW
1			160	157	164			160
2	147	152						150
3				125				125
4					110			110
5		53	51	52	53	51	49	51
6		44	39	43				42
7		32						32
8		29	29	28	30	28	27	28
9	23	20	20	19	20	21	20	20



Εικόνα 3.2.α. Πρωτεϊνικές ζώνες που εντοπίστηκαν σε ιστούς πλάγιων οφθαλμών Χαλκιδικής σε χρωματισμό coomassie στο διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου. Φορτώθηκαν 50 μgr πρωτεΐνης σε κάθε πηγάδι πηχτής. Χρησιμοποιήθηκαν Sigma SDS page markers, High (36 – 205 kDa) και Low (14 – 66 kDa) molecular weights, σε πηχτή 12,5%T.



Εικόνα 3.2.β. Πρωτεϊνικές ζώνες που εντοπίστηκαν σε ιστούς πλάγιων οφθαλμών Χαλκιδικής σε χρωματισμό με Νιτρικό Άργυρο στο διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου. Φορτώθηκαν 50 μ gr πρωτεΐνης σε κάθε πηγάδι πηχτής. Χρησιμοποιήθηκαν Sigma SDS page markers, High (36 – 205 kDa) και Low (14 – 66 kDa) molecular weights, σε πηχτή 12,5%T.

3.3. Συγκριτική εικόνα των πρωτεϊνών των πλάγιων οφθαλμών των δύο ποικιλιών ελιάς Manzanillo και Χαλκιδικής

3.3.1. Ανάλυση με SDS-PAGE

Στο σύνολο των ηλεκτροφορημάτων απομονώθηκε μια ποικιλία πρωτεϊνικών ζωνών-ομάδων, Και στις δύο ποικιλίες, απομονώθηκαν οι περισσότερες πρωτεΐνες, καλύπτοντας σχεδόν όλο το εύρος από 19 έως 164 kDa.

Η περιοχή με τις περισσότερες αριθμητικά όσο και ισχυρότερα εκφραζόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες εμφανίστηκαν σχεδόν σε όλες τις ημερομηνίες και κοινές και στις δύο ποικιλίες ήταν μεταξύ 40 και 56 kDa. Ωστόσο, εκατέρωθεν παρουσιάστηκαν ζώνες οι οποίες όμως στην MANZANILLO, περιορίστηκαν σε ορισμένες μόνο ημερομηνίες, ενώ στην ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ, οι πολύ μικρού και πολύ μεγάλου μοριακού βάρους, σχεδόν σε όλες ημερομηνίες.

Από εκείνες τις πρωτεΐνες που εμφανίστηκαν σχεδόν σε όλες τις ημερομηνίες, το υψηλότερο επίπεδο έκφρασης παρουσίαζε εκείνη με μέγεθος περίπου 54 kDa, και στις δυο ποικιλίες. Επιπλέον, δύο πρωτεΐνες με μεγέθη περίπου 44 και 54 kDa εμφανίζονται πολύ καθαρά (15/2 έως 14/3) καθώς επίσης και δύο μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνες των περίπου 29 και 21 kDa. Ιδιαίτερη διαφορά παρουσιάζουν οι πολύ μικρού και πολύ μεγάλου μοριακού βάρους, που στην MANZANILLO είτε απουσιάζουν είτε εμφανίζονται με αισθητά μικρότερη ένταση από την ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ.

Ειδικότερα στους πλάγιους οφθαλμούς και των δυο ποικιλιών, δείχνει να εκφράζονται ισχυρά δύο πρωτεΐνες των 44 και 54 kDa περίπου οι οποίες ανιχνεύτηκαν κυρίως στην περίοδο από 15/2 έως 14/3.

Στην MANZANILLO εμφανίζονται πολλές πρωτεϊνικές ζώνες μεγάλου MB προς τα τέλη Μαρτίου (20/3).

Στην ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ εμφανίζονται πρωτεϊνικές ζώνες μεγάλου MB σε πολλές ημερομηνίες (7/2, 15/2, 22/2, 7/3).

Οι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, εμφανίζονται και στις δύο ποικιλίες, αν και στην MANZANILLO σε λιγότερες ημερομηνίες.

Πίνακας 3.3. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών ζωνών (kDa) στους πλάγιους οφθαλμούς δύο ποικιλιών (Manzanillo, Χαλκιδικής) της ελιάς την περίοδο Φεβρουαρίου-Μαρτίου.

MW πρωτεϊνικών ζωνών (kDa)

A/A	MANZANILLO	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ
1		160 (3)
2	150 (2)	
3	144 (1)	
4	137 (1)	
5	131 (1)	
6	125 (1)	125 (1)
7	122 (2)	
8	117 (1)	
9		110 (1)
10	81,5 (2)	
11	55,5 (6)	51 (6)
12	44,5 (4)	42 (3)
13		32 (1)
14	29 (1)	28 (6)
15	21,5(2)	20 (7)

3.3.2. Ανάλυση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2-DE)

Η τελική μελέτη των πλάγιων οφθαλμών της ελιάς, περιελάμβανε όπως προείπαμε ανάλυση με ηλεκτροφόρηση δύο-διαστάσεων. Η 2-DE πραγματοποιήθηκε σε IPG strip pH 4-7, μήκους 11 cm όσον αφορά τη 1^η διάσταση ενώ η 2^η σε 12.5 % T πηκτή κατακόρυφης συσκευής, πάχους 0,8 mm και παράλληλα με τα strips SDS page markers.

Τα τελικά ηλεκτροφορήματα χρωματίστηκαν με νιτρικό άργυρο. Στην **Εικόνα 3.3.1 α), β), και 3.3.2. α), β)**, παρουσιάζονται οι πηκτές ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων 2-DE στις οποίες σημειώνονται οι κηλίδες που διαπιστώθηκαν κατά την επεξεργασία με το Photoshop.

Για τη 2-DE επιλέξαμε ημερομηνίες που είχαν περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες στην SDS page, δηλαδή τις 29/2 και 20/3.

Η 2-DE ανάλυση με το Photoshop αποκάλυψε περίπου ίσο αριθμό πρωτεϊνικών κηλίδων την 29/2 και στις δύο ποικιλίες. Και στις δύο περιπτώσεις όμως διαπιστώθηκαν κηλίδες σε όλο το εύρος του pH (4-7). Ως προς τα μοριακά βάρη (δεύτερη διάσταση) οι πρωτεΐνες αναπτύχθηκαν στην περιοχή από 18 έως 159 kDa για την 29/2 και από 18 έως 88 kDa για την 20/3/08 και για τις δύο ποικιλίες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι εμφανίζονται πάρα πολλές κηλίδες με μικρά μοριακά βάρη, κάτι το οποίο ήταν αρκετά περιορισμένο στην SDS-PAGE ανάλυση.

Το σύνολο των πρωτεϊνικών κηλίδων που καταφέραμε να μετρήσουμε ήταν σχετικά μικρό και στις δύο περιπτώσεις και στις δύο ποικιλίες. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν στις 29/2, 35 κηλίδες στη ΜΑΝΖΑΝΙΑΛΟ και 39 στη ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ ενώ στις 20/3, 37 κηλίδες στη ΜΑΝΖΑΝΙΑΛΟ και 30 στη ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ. (**Πίνακας 3.4**)

Πίνακας 3.4: Οι συντεταγμένες (MB/PI) των πρωτεϊνικών κηλίδων που παρατηρήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE). (Με κόκκινο οι πιο έντονες πρωτεϊνικές κηλίδες).

MANZANILLO α)		MANZANILLO β)		ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ α)		ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ β)	
29/2		20/3		29/2		20/3	
A/K	MB(KDa)/PI	A/K	MB(KDa)/PI	A/K	MB(KDa)/PI	A/K	MB(KDa)/PI
22	159/5,66	26	68/5,02	22	157/6,34	1	88/4,30
13	154/5,36	27	62/5,03	21	132/6,47	3	73/4,52
12	154/5,02	28	50/4,69	17	120/5,12	12	72/5,66
11	153/4,94	29	45/4,69	19	116/6,06	2	68/4,12
10	150/4,89	6	42/4,28	20	106/6,34	11	67/5,32
2	145/4,23	5	38/4,63	16	101/5,29	4	64/4,46
8	140/4,56	4	30/4,43	1	92/4,88	19	58/5,68
7	138/4,60	13	26/5,00	2	91/4,98	20	55/5,72
6	137/4,62	36	26/4,69	18	86/5,98	25	54/6,90
9	136/4,55	31	25/5,95	4	78/4,96	9	54/4,93
3	133/4,37	30	24/6,01	3	73/4,67	10	53/4,97
14	130/4,99	8	24/4,11	9	72/5,43	13	52/5,52
5	129/4,53	32	23/6,76	23	67/5,64	18	51/5,99
4	126/4,52	18	23/6,35	8	67/5,39	5	50/4,60
1	126/4,08	11	23/4,94	6	65/4,90	14	46/5,49
19	119/5,36	12	23/4,83	7	64/4,97	6	40/4,65
18	115/5,28	7	23/4,26	5	61/4,62	15	35/5,18
20	114/5,46	14	22/5,41	28	58/6,20	7	35/4,68
15	112/4,76	17	21/6,10	27	55/6,66	22	33/6,93
21	108/5,38	16	21/6,01	24	50/5,91	23	33/6,68
23	107/5,97	15	21/5,86	14	49/4,83	16	33/5,15
16	90/4,23	33	21/5,27	13	47/4,80	30	31/6,14
17	65/4,70	34	21/5,19	26	46/6,20	29	30/5,76
35	26/6,45	35	21/5,06	11	45/4,68	28	30/5,47
33	25/6,07	2	21/4,42	12	44/4,77	8	30/4,72
32	24/5,77	37	20/4,32	10	43/4,65	27	28/5,40
30	24/5,55	20	19/6,09	31	41/5,30	21	26/6,47
27	23/4,97	21	19/5,88	15	41/5,17	17	26/4,98
24	22/4,08	24	19/5,56	29	39/6,56	24	25/6,31
34	19/6,32	23	19/5,44	25	39/5,96	26	22/4,71
29	19/5,23	10	19/4,98	30	34/5,09		
25	19/4,57	25	19/4,74	32	28/5,38		
31	18/5,64	1	19/4,51	35	25/6,71		
28	18/5,11	3	19/4,39	34	25/6,57		
26	18/4,79	19	18/6,18	39	22/6,69		
		22	18/5,37	33	22/6,50		
		9	18/4,15	36	20/6,78		
				37	19/6,74		
				38	19/6,50		
ΣΥΝΟΛΟ ΚΗΛΙΔΩΝ							
35		37		39		30	

Στην πηκτή ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων παρατηρήθηκαν κάποιες πρωτεϊνικές κηλίδες πιο έντονες από τις υπόλοιπες. (παρουσιάζονται με κόκκινο στον **Πίνακα 3.4**)

Παρατηρήθηκαν κάποιες κοινές πρωτεϊνικές κηλίδες κατά την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE) μεταξύ των πηκτών των δύο ημερομηνιών δειγματοληψίας. Στην MANZANILLO οι πηκτές των ημερομηνιών 29/12 και 20/3 είχαν σε 7(εφτά) MB 12(δώδεκα) και 22(είκοσι δύο) αντίστοιχα κοινές πρωτεϊνικές κηλίδες. Στην ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ μεταξύ των πηκτών των ημερομηνιών 29/12 και 20/3 οι κοινές πρωτεϊνικές κηλίδες ήταν σε 11(έντεκα) MB 13(δέκα τρείς) και 11(έντεκα) αντίστοιχα. (**Πίνακας 3.5**). Επίσης πρέπει να σημειώσουμε ότι είναι αρκετές οι σειρές των πρωτεϊνικών κηλίδων που απομονώθηκαν στο ίδιο μοριακό βάρος ακόμα και στην ίδια ημερομηνία και ποικιλία.

Πίνακας 3.5 : Οι συντεταγμένες (MB/PI) των κοινών πρωτεϊνικών κηλίδων του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των πλάγιων οφθαλμών MANZANILLO που παρατηρήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE) στις ημερομηνίες α) 29/2, β) 20/3 και ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ στις ημερομηνίες α) 29/2, β) 20/3.

MW/pI

MANZANILLO 29/2	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ 29/2	
18/4,15-6,18 19/4,39-6,32 22/4,08-5,41 23/4,26-6,76 24/4,11-6,01 25/5,95-6,07 26/4,69-6,45		MANZANILLO 20/3
	22/4,71-6,69 25/6,31-6,71 28/5,38-5,40 46/5,49-6,20 50/4,60-5,91 55/5,72-6,66 58/5,68-6,20 64/4,46-4,97 67/5,39-5,64 72/5,43-5,66 73/4,52-4,67	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ 20/3

Οι πηκτές ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2-DE) μεταξύ των παραπάνω ημερομηνιών, παρουσίασαν και κάποιες διαφορετικές πρωτεϊνικές κηλίδες. Στην Manzanillo οι πηκτές των ημερομηνιών 29/2 και 20/3 σε 21(είκοσι ένα) MB είχαν 23(είκοσι τρεις) και σε 9(εννιά) MB 15(δέκα πέντε) διαφορετικές πρωτεϊνικές κηλίδες αντίστοιχα. Στην Χαλκιδικής μεταξύ των πηκτών των ημερομηνιών 29/12 και 20/3 ήταν σε 22(είκοσι δύο) MB 25(είκοσι πέντε) και σε 12(δώδεκα) MB 19 (δέκα εννιά) αντίστοιχα οι διαφορετικές πρωτεϊνικές κηλίδες. (Πίνακας 3.6)

Πίνακας 3.6 : Οι συντεταγμένες (MB/PI) των διαφορετικών πρωτεϊνικών κηλίδων που παρατηρήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων 2-DE στην MANZANILLO στις ημερομηνίες. α) 29/2, β) 20/3 και ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ στις ημερομηνίες α) 29/2, β) 20/3.

MANZANILLO α)	MANZANILLO β)	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ α)	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ β)
29/2	20/3	29/2	20/3
159/5,66	68/5,02	157/6,34	88/4,30
154/5,36	62/5,03	132/6,47	68/4,12
154/5,02	50/4,69	120/5,12	54/6,90
153/4,94	45/4,69	116/6,06	54/4,93
150/4,89	42/4,28	106/6,34	53/4,97
145/4,23	38/4,63	101/5,29	52/5,52
140/4,56	30/4,43	92/4,88	51/5,99
138/4,60	21/6,10	91/4,98	40/4,65
137/4,62	21/6,01	86/5,98	35/5,18
136/4,55	21/5,86	78/4,96	35/4,68
133/4,37	21/5,27	65/4,90	33/6,93
130/4,99	21/5,19	61/4,62	33/6,68
129/4,53	21/5,06	49/4,83	33/5,15
126/4,52	21/4,42	47/4,80	31/6,14
126/4,08	20/4,32	45/4,68	30/5,76
119/5,36		44/4,77	30/5,47
115/5,28		43/4,65	30/4,72
114/5,46		41/5,30	26/6,47
112/4,76		41/5,17	26/4,98
108/5,38		39/6,56	
107/5,97		39/5,96	
90/4,23		34/5,09	
65/4,70		20/6,78	
		19/6,74	
		19/6,50	

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η γενική εικόνα της καμπύλης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στους πλάγιους οφθαλμούς είναι κυματοειδής με υψηλό στις 29/2 και 20/3, ελάχιστα στις 15/2 και στις 14/3 και ανάλογες αυξομειώσεις και στις δύο ποικιλίες.
2. Η μέγιστη συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών και στις δύο ποικιλίες σημειώθηκε την 20/3 (~ 128 μg/g νωπού βάρους ιστού στην Manzanillo και ~ 153 μg/g νωπού βάρους ιστού στην Χαλκιδικής).
3. Στους πλάγιους οφθαλμούς, ο αριθμός των εμφανών πρωτεϊνικών ζωνών που αποκαλύφθηκε με τη μέθοδο SDS-PAGE κυμάνθηκε από 1 έως 5 της ποικιλίας Manzanillo και από 2 έως 6 της ποικιλίας Χαλκιδικής για το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου.
4. Στην Manzanillo και στην Χαλκιδικής η περίοδος 22/2 έως 20/3 μπορούμε να πούμε ότι χαρακτηρίζονταν από μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών ζωνών οι οποίες είχαν παρόμοια μοριακά βάρη.
5. Στο σύνολο των ηλεκτροφορημάτων απομονώθηκε μια ποικιλία πρωτεϊνικών ζωνών-ομάδων, Και στις δύο ποικιλίες, απομονώθηκαν οι περισσότερες πρωτεΐνες, καλύπτοντας σχεδόν όλο το εύρος από 19 έως 164 kDa.
6. Η περιοχή με τις περισσότερες αριθμητικά όσο και ισχυρότερα εκφραζόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες εμφανίστηκαν σχεδόν σε όλες τις ημερομηνίες και κοινές και στις δύο ποικιλίες ήταν μεταξύ 40 και 56 kDa.
7. Ειδικότερα στους πλάγιους οφθαλμούς και των δυο ποικιλιών, δείχνει να εκφράζονται ισχυρά δύο πρωτεΐνες των 44 και 54 kDa περίπου οι οποίες ανιχνεύτηκαν κυρίως στην περίοδο από 15/2 έως 14/3, καθώς επίσης και δύο μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνες των περίπου 29 και 21 kDa.
8. Στην Manzanillo εμφανίζονται πολλές πρωτεϊνικές ζώνες μεγάλου MB προς τα τέλη Μαρτίου (20/3). Στην Χαλκιδικής εμφανίζονται πρωτεϊνικές ζώνες μεγάλου MB σε πολλές ημερομηνίες (7/2, 15/2, 22/2, 7/3). Οι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, εμφανίζονται και στις δύο ποικιλίες, αν και στην Manzanillo σε λιγότερες ημερομηνίες.

9. Με την 2-DE ανάλυση το σύνολο των πρωτεϊνικών κηλίδων που καταφέραμε να μετρήσουμε ήταν σχετικά μικρό και στις δύο περιπτώσεις και στις δύο ποικιλίες από άλλα φυτά. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν στις 29/2, 35 κηλίδες στη Manzanillo και 39 στη Χαλκιδικής ενώ στις 20/3, 37 κηλίδες στη Manzanillo και 30 στη Χαλκιδικής.
10. Σε όλες τις περιπτώσεις το σύνολο σχεδόν των πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται από χαμηλές τιμές pIs, που κυμαίνονται από 4 έως 7. Σε όλες όμως τις περιπτώσεις όμως διαπιστώθηκαν κηλίδες σε όλο το εύρος του pH (4-7).
11. Παρατηρήθηκαν κάποιες κοινές και κάποιες διαφορετικές πρωτεϊνικές κηλίδες κατά την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE) μεταξύ των δύο ημερομηνιών δειγματοληψίας. Και στις δύο ποικιλίες οι διαφορετικές ήταν περισσότερες από τις κοινές.
12. Πρέπει να σημειώσουμε ότι είναι αρκετές οι σειρές των πρωτεϊνικών κηλίδων που απομονώθηκαν στο ίδιο μοριακό βάρος ακόμα και στην ίδια ημερομηνία και ποικιλία, αλλά με διαφορετικό pI.
13. Η οριζόντια διάταξη (κατά μήκος του pI) πλήθους κηλίδων σε διάφορα μοριακά βάρη πιθανά να αντιπροσωπεύει την ανάλυση σε επιμέρους ισομορφές των ζωνών που απομονώθηκαν στην SDS-PAGE.
14. Στην πηκτή ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων παρατηρήθηκαν κάποιες πρωτεϊνικές κηλίδες πιο έντονες από τις υπόλοιπες. Η διαφορετικότητα της έντασης των κηλίδων πιθανόν είναι απόρροια της αφθονίας κάποιων πρωτεϊνών είτε δομικές είναι αυτές είτε κάποια ένζυμα. Επίσης η διαφορετική χρώση με coomassie ή με νιτρικό άργυρο δεν μπορεί να αποκλειστεί.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών της ελιάς κατά τη διάρκεια του χειμώνα είναι αυστηρά συνδεδεμένη με την άνθηση κατά τη διάρκεια της άνοιξης και με την παραγωγή καρπών κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου-χειμώνα. Οι πλάγιοι οφθαλμοί (μασχάλες των φύλλων) της νέας βλάστησης είναι μεριστώματα ικανά να μετατραπούν σε αναπαραγωγικά. Η μετατροπή ενός βλαστητικού μεριστώματος σε αναπαραγωγικό είναι μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει αλλαγές στο πρότυπο της μορφογένεσης και της διαφοροποίησης των κυττάρων στο κορυφαίο μερίστωμα των οφθαλμών (Kitsaki et al., 2010).

Έχει ήδη διαπιστωθεί η ύπαρξη γόνων που ελέγχουν τη μετάβαση από τη νεανική στην ενήλικη φάση (TEOPOD genes στο καλαμπόκι), την αλλαγή φάσης του μεριστώματος από βλαστητική σε αναπαραγωγική (LEAFY και AGAMOUS genes στα *Arabidopsis* και *Antirrhinum*) καθώς και το χρόνο της άνθησης (flowering time genes). Οι γόνοι αυτοί προφανώς εκφράζονται σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

Στην περίπτωση της ελιάς στα ενήλικα φυτά υπάρχουν δύο είδη βλαστών : οι λαίμαργοι (βλαστοφόροι με μεγάλα μεσογονάτια, μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία, N, κ.λ.π) οι οποίοι στη πραγματικότητα βρίσκονται στη νεανική φάση και σπάνια αλλάζουν φάση και οι εν δυνάμει ανθοφόροι βλαστοί (Fabbri and Benelli., 2000; Bouranis et al., 2004). Οι βλαστοί της δεύτερης κατηγορίας, θα πρέπει να θεωρηθούν ότι είναι ενήλικοι και μπορούν να εισέλθουν στην ενήλικη αναπαραγωγική φάση όταν οι πλάγιοι οφθαλμοί τους μετατραπούν από βλαστοφόροι (vegetative) σε ανθοφόρους (reproductive). Είναι γνωστό για την ελιά, ότι οι οφθαλμοί της όταν καθοριστούν σε ανθοφόρους (determined) δεν μπορεί να αλλάξουν φάση (Fabbri and Benelli., 2000).

Υπήρχε παλαιότερα έντονη συζήτηση για το χρόνο ανθικής επαγωγής της ελιάς. Σύμφωνα με τους Fernandez-Escobar και Benlloch (1992) ο χρόνος επαγωγής των πλάγιων οφθαλμών της ελιάς σε ανθοφόρους τοποθετείται περίπου την περίοδο σκλήρυνσης του ενδοκαρπίου (αρχές Ιουλίου). Κατά τους Pinney και Polito (1990), Rallo και Martin (1991) το αντίστοιχο γεγονός πραγματοποιείται πριν την επικράτηση των χαμηλών θερμοκρασιών του χειμώνα (Νοέμβριο). Ωστόσο παλαιότερα και νεότερα δεδομένα ενισχύουν την άποψη ότι οι οφθαλμοί της ελιάς διαφοροποιούνται

πριν το φθινόπωρο (Andreini et al, 2008 ; Malik and Bradford, 2006; Piney and Polito, 1990).

Τα δέντρα που χρησιμοποιήσαμε είναι σε ενήλικη φάση. Οι πλάγιοι οφθαλμοί είναι εν δυνάμει ανθικά μεριστώματα. Αναμένεται να εξελιχθούν σε ταξιανθίες.

Η ερμηνεία των δεδομένων μας θα στηριχθεί στο δεδομένο ότι την περίοδο Φεβρουαρίου-Μαρτίου οι πλάγιοι οφθαλμοί είναι διαφοροποιημένοι σε ανθοφόρους.

Οι διαφοροποιητικές διεργασίες και οι κυτταροδιαιρέσεις στα μεριστωματικά κύτταρα των ανθοφόρων οφθαλμών της ελιάς αρχίζουν αρκετά νωρίς το χειμώνα (Ιανουάριο), πολύ πριν την έναρξη εκπτώξεις των οφθαλμών (τέλη Μαρτίου) (πτυχιακή μελέτη Ανδρεάδη Ε., 2001).

Από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, διαπιστώθηκε ότι η στάθμη στους πλάγιους οφθαλμούς την 29/2 και 20/3 διατηρείται σε σχετικά υψηλά επίπεδα. Επιπλέον στην SDS-PAGE ανάλυση και για της ίδιες ημερομηνίες παρατηρείται μεγάλος αριθμός πρωτεϊνικών ζωνών σε σχέση με άλλες ημερομηνίες. Στην SDS-PAGE ανάλυση χρησιμοποιήσαμε 50 μγρ πρωτεΐνης από τα δείγματα σε όλες τις ημερομηνίες. Οι περισσότερες ζώνες που βρήκαμε στις 29/2 και 20/3 μπορεί να συνδέονται με τις διαφοροποιητικές διεργασίες και κυτταροδιαιρέσεις στα μεριστωματικά κύτταρα των ανθοφόρων οφθαλμών Αυτό ίσως υποδηλώνει ότι την περίοδο αυτή στους πλάγιους οφθαλμούς να συμβαίνουν γεγονότα τα οποία δεν συνέβαιναν προγενέστερα, η πραγματοποίηση των οποίων προϋποθέτει την παρουσία κάποιων ειδικών πρωτεϊνών. (Ανδρεάδης, 2006).

Στην μελέτη μας στην περίοδο από αρχές Φεβρουαρίου έως τέλος Μαρτίου εμφανίζεται κυματοειδής μορφή και στις δύο ποικιλίες. Η μη συνεχής εμφάνιση των νέων ζωνών αποδίδεται σε μεριστωματική δραστηριότητα. Τέτοιες πρωτεΐνες οι οποίες περιοδικά συσσωρεύονται και εξαφανίζονται σε διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου είναι πιθανόν οι κυκλίνες (Buchanan et al., 2000) και οι πρωτεϊνικές κινάσες (Chen et al., 2009). Οι Smalle και Vierstra (2004) αναφέρουν συσσώρευση πρωτεϊνικής κινάσης και άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών στο *Dimocarpus longan* σε ανθοφόρους οφθαλμούς.

Η γενική εικόνα των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την SDS-PAGE ανάλυση είναι παρόμοια με εκείνη των Garcia et. al. (2000). Ότι δηλαδή τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών κυμαίνονται σε περιοχές με χαμηλά μοριακά βάρη. Υπάρχουν

τρεις πρωτεϊνικές ζώνες οι οποίες εμφανίζονται σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Αυτές οι πρωτεΐνες θα πρέπει να σχετίζονται με μεταβολικές διεργασίες που συμβαίνουν στα μεριστώματα αυτά σε όλη τη διάρκεια της μελέτης μας.

Ωστόσο αυτό που είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ιδιαίτερα την περίοδο τέλη Φεβρουαρίου- τέλη Μαρτίου εμφανίζονται νέες πρωτεϊνικές ζώνες. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την υψηλή στάθμη που διαπιστώσαμε στις ολικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες (αποτελέσματα από την Bearden) καθώς και τη σχετικά διαφοροποιημένη μακροσκοπική εικόνα των οφθαλμών στα τέλη Μαρτίου σε σχέση με τα τέλη Φεβρουαρίου υποδηλώνει ότι την περίοδο αυτή πραγματοποιούνται ιδιαίτερα σημαντικές διεργασίες στους πλάγιους οφθαλμούς.

Ο αριθμός των πρωτεϊνικών κηλίδων που προσδιορίστηκαν είναι πολύ μικρός συγκρινόμενος με δεδομένα άλλων φυτικών ειδών. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν στις 29/2, 35 κηλίδες στη MANZANILLO και 39 στη ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ ενώ στις 20/3, 37 κηλίδες στη MANZANILLO και 30 στη ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ. Ωστόσο τα δικά μας αποτελέσματα είναι παραπλήσια με εκείνα που αναφέρει ο Ανδρεάδης (2006) επίσης για τους οφθαλμούς της ελιάς, (περίπου 50 κηλίδες) ενώ οι Wang et al. (2003) αναφέρουν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό κηλίδων (περίπου 150) σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς. Τα δεδομένα αυτά δεν είναι αντιφατικά για το λόγο ότι στην περίπτωση των οφθαλμών το φυτικό υλικό είναι πολύ περιορισμένο (ξεκινάμε με περίπου 0,5 gr NB οφθαλμών) ενώ σε άλλους ιστούς έχουμε δυνατότητα χρησιμοποίησης μεγαλύτερης ποσότητας φυτικού υλικού. Στην περίπτωση της μικρότερης ποσότητας φυτικού υλικού το ποσοστό απωλειών στη διαδικασία καθαρισμού είναι προφανώς μεγαλύτερο συγκριτικά με την περίπτωση χρήσης μεγαλύτερης ποσότητας φυτικού υλικού. Ο πολύ μικρός αριθμός κηλίδων που ως τώρα έχουν αναφερθεί για ανάλυση ιστών ελιάς (Ανδρεάδης, Wang et al., 2003, παραπάνω αποτελέσματα) συγκριτικά με άλλης προέλευσης φυτικών ιστών (οι Ahsan και Komatsu, 2009 σε φύλλα σόγιας ανιχνεύτηκαν 500 πρωτεϊνικές κηλίδες με 2-DE ανάλυση) είναι βεβαίως απόρροια και του πρωτοκόλλου καθαρισμού που πρέπει να ακολουθηθεί ώστε να καταλήξουμε σε αξιολογήσιμα αποτελέσματα. Είναι χαρακτηριστικό ότι ο Ανδρεάδης χρησιμοποιώντας παρόμοιο πρωτόκολλο σε ρίζες καλαμποκιού προσδιόρισε περί τις 350 κηλίδες με την 2-DE ανάλυση.

Αναφέρθηκε ήδη στα αποτελέσματα ότι η 2-DE στους πλάγιους οφθαλμούς της ελιάς έγινε σε δύο ημερομηνίες 29/2 και 20/3. Υπάρχει βεβαίως κάποια

επιφύλαξη για το πόσο το ποσοστό των απωλειών πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία καθαρισμού των δειγμάτων είναι παρόμοιο σε όλες τις περιπτώσεις λόγω των δυσχερειών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Με την παραδοχή ότι αυτές ήταν παρόμοιες θα πρέπει να σημειώσουμε ότι και εδώ (όπως και από την SDS ανάλυση) προκύπτει το συμπέρασμα ότι και διαφορετικές διεργασίες συμβαίνουν στους μήνες Φεβρουάριο-Μάρτιο στους πλάγιους οφθαλμούς της ελιάς (πέρα από τις βασικές μεταβολικές διεργασίες). Πράγματι διαπιστώθηκαν αρκετές διαφορετικές κηλίδες στις αναλύσεις των πλάγιων οφθαλμών στις δύο διαφορετικές ημερομηνίες.

Στην περίοδο πάντως του Μαρτίου οι πλάγιοι οφθαλμοί φαίνεται να έχουν μπει σε άλλη μεταβολική κατάσταση όπως προκύπτει και από την μακροσκοπική εικόνα των οφθαλμών.

Η οριζόντια διάταξη (κατά μήκος του pI) πλήθους κηλίδων με ίδια μοριακά βάρη πιθανά να αντιπροσωπεύει την ανάλυση των ζωνών που απομονώθηκαν στην SDS-PAGE σε επιμέρους ισομορφές.

Η διαφορετικότητα της έντασης των κηλίδων το πιθανότερο είναι απόρροια της μεγάλης ποσότητας κάποιων πρωτεϊνών είτε δομικές είναι αυτές είτε ένζυμα (το ενδεχόμενο διαφοροποιημένης χρώσης με την coomassie ή με το νιτρικό άργυρο επίσης δεν μπορεί να αποκλεισθεί.).

Κλείνοντας το σχολιασμό των αποτελεσμάτων μας θα μπορούσαμε να συνοψίσουμε στα εξής συμπεράσματα για την παρούσα εργασία.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Ανδρεάδης, Ε. Χ. 2006.** Πρωτεϊνικός χάρτης των οφθαλμών της Ελιάς (*Olea europaea L.*), (Μεταπτυχιακή μελέτη).
2. **Γεωργία-Κτηνοτροφία . 2002.** Τεύχος 3 : Ελαιοκομία
3. **Μπαλατσούρας, Γ.Δ. 1992.** Η ελιά - καλλιέργεια με σύγχρονες μεθόδους, Εκδόσεις Πελεκάνος, Αθήνα, ISBN: 960-400-034-9.
4. **Ποντίκης, Κ. 2000.** Ειδική Δενδροκομία Ελαιοκομία, Εκδόσεις Α. Σταμούλη, Αθήνα, ISBN: 960-351-311-3.
5. **Ποντίκης, Κ. 1992.** Ελαιοκομία, Εκδόσεις Α. Σταμούλη, Πειραιάς,
6. **Τσάγκαρης, Γ.Θ. 2008.** Πρωτεομική: Νέες τεχνολογικές τάσεις, Bioresearch 50-55.
7. **Ahsan, N. and Komatsu, S. 2009.** Comparative analyses of the proteomes of leaves and flowers at various stages of development reveal organspecific functional differentiation of proteins in soybean. *Proteomics* 2009, 9: 4889–4907.
8. **Andreini, L., Bartolini, S., Guivarc'h, A., Chriqui, D. and Vitagliano, C. 2008.** Histological and immunohistological studies on flower induction in the olive tree (*Olea europae*). *Plant Biol.* 10:588-595.
9. **Badr, S. A., Hartman, T. H. and Martin, G. C. 1970.** Endogenous gibberelins and inhibitors in relation to flower induction and inflorescence development in the olive. *Plant Physiology.* 46: 674-679.
10. **Bearden, J. C. 1977.** Quantitation of submicrogram quantities of protein by improved protein-dye binding assay. *Biocchimica et Biophysica Acta.* 533: 525-529.
11. **Bernier, G. 1988.** The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 39: 175-219.
12. **Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.
13. **Brown, D., Campbell, R.C and Schreder, W.R., 1962.** Temperatures and olive yields. *California Agriculture.* 16 (6): 7-8.
14. **Canovas, F., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H. and Rissignol, M. 2004.** Plant proteome analysis. *Proteomics.* 4: 285-298.

15. **Carpentier, C. S., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R. and Panis, B. 2005.** Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*. 5: 2497-2507.
16. **Chand, B. G. and Cain, J. C. 1967.** The effect of seed formation on subsequent flowering in apple. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 91: 63-68.
17. **Chen, S., Liu, H., Chen, W., Xie, D. and Zheng, S. 2009.** Proteomic analysis of differentially expressed proteins in longan flowering reversion buds. *Sci. Hort.* 122: 275–280
18. **Crawford, K. and Zambryski, P. 1999.** Phylem transport: Are you chaperoned? *Curr. Biol.* 9: R281-R285.
19. **Deng, M.Q, Zhao, L.H. and Zhu, C.J. 1988.** The relation of flower bud differentiation in olive to climate and new shoot growth. *Scientia Silvae Sinica*. 24: 393-8.
20. **Fabbri, A. and Alerci, L. 1999.** Reproductive and vegetative bud differentiation in *Olea europaea L.* *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 74 : 522-527.
21. **Fabbri, A. and Benelli C. 2000.** Flower bud induction and differentiation in olive. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 75 (2): 131-141.
22. **Fernandez-Escobar, R., Benlloch, M., Navaro, C. and Martin, G. C. 1992.** The time of floral induction in the olive. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 304-307.
23. **Finnie, C. and Svensson, B. 2002.** Proteolysis during the isoelectric focusing step of two-dimensional gel electrophoresis may be a common problem. *Analytical Biochemistry*. 311: 182-186.
24. **Garcia, J. L., Avidan, N., Troncoso, A., Sarmiento, R. and Lavee, S. 2000.** Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Scientia Horticulturae*. 85: 271-284.
25. **Giavalisco, P., Nordhoff, E., Kreitler, T., Kloppel, K-D., Lehrach, H., Klose, J. and Gobom J. 2005.** Proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. *Proteomics*. 5: 0000-0000.

26. **Gisel, A., Hempel, F. D., Barella, S. and Zambryski, P. 2002.** Leaf-to-shoot apex movement of symplastic tracer is restricted coincident with flowering Arabidopsis. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA. 99: 1713-1717.
27. **Hacket, W. P. and Hartman, H. T. 1967.** The influence of temperature on floral initiation in the olive. Plant Physiology. 20: 430-436.
28. **Hacket, W. P. and Hartman, H. T. 1964.** Inflorescence formation in olive as influenced by low temperature, photoperiod and leaf area. Botanica Gazette. 125 (1): 65-72.
29. **Hacket, W. P. and Hartman, H. T. 1963.** Morphological development of buds of olive aw related to temperature requirement for inflorescence formation. Botanica Gazette. 124: 383-387.
30. **Hartman, H. T. 1953.** Effect of winter chilling on fruitfulness and vegetative growth in the olive. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 62: 184-190.
31. **Hartman, H. T., 1951.** Time of floral differentiation of the olive in California. Botanica Gazette. 112: 323-327.
32. **Kitsaki, C. K., Andreadis, E. and Bouranis, D. L. 2010.** Developmental events in differentiating floral buds of four olive (*Olea europaea L.*) cultivars during late winter to early spring. Flora. 205: 599-607.
33. **Koller, A., Washburn, M. P., Lange, B. M., Andom, N. L., Deciu, C., Haynes, P. A., Hays, L., Schieltz, D., Ulaszek, R., Wie, J., Wolters, D. and Yates, J. R. 2002.** Proteomics survey of metabolic pathways in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99: 11969-11974.
34. **Lack A.J. and Evans D.E. 2002.** Instant Notes, Plant Biology, BIOS Scientific Publishers Limited, UK, ISBN: 1 85996 1975.
35. **Laemli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
36. **Liebler, D. C., 2002.** Introduction to proteomics, Humana Press, New Jersey, ISBN: 0-89603-991-9 (HC).
37. **Malik, S.A. and Bradford, G.M. 2006.** Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in "Arbequina" olives. Sci. Hortic. 110: 274-278.
38. **Mijnsbrugge, V. K., Meyermans, H., Montagu, M., Bauw, G. and Boerjan, W. 2000.** Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. Planta . 210: 589-598.

- 39. Minella A. and Deidda P. 1968.** Le esigenze in freddo dell'olivo. Relazioni tra caratteristiche termiche invernali e cascola preantesi delle gemme, aborto dell'ovario ed allegagione. Studi sassaresi. Sez III, Annali Facolta di Agraria Universita Sassari. 16:386-405.
- 40. Monselise, S. P. and Goldschmidt, E. E. 1982.** Alternate bearing in fruit trees. Hort. Rev. 4: 128-173.
- 41. Natarajan , S., Xu, C., Caperna, J. T. and Garrett, W. M. 2005.** Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. Analytical Biochemistry. 342: 214-220.
- 42. O'Neill, S. D. and Roberts, G. A. 2002.** Plant reproduction, Annual Plant Reviews, Volume 6, Sheffield Academic Press, U.K., ISBN 1-84127-226-4 / ISSN 1460-1494.
- 43. Pinney, K. and Polito ,V.S. 1990.** Flower initiation in "Manzanillo" olive. Acta Hort. 286,203-205.
- 44. Porlingis, I. C. and Therios, I.H. 1979.** The effect of the level of temperature on inflorescence induction, number of flowers per inflorescence and pistil development in the olive tree. In Ann. Agric. For School Aristotelian University of Thessaloniki, vol 22. Pp. 250-255.
- 45. Porlingis, I. C. 1972.** The effect of fall and winter temperatures on inflorescence and fruit production of several Greek olive cultivars (*Olea europaea* L.). Annals of the Agricultural and Forestry School, Aristotelian University of Thessaloniki. 15: 311-328.
- 46. Rallo, L. and Martin, G. C. 1991.** The role of chilling in releasing olive floral buds from dormancy. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116: 1058-1062.
- 47. Saupe, D. S. 2001.** Flowering.<http://employees.csbsju.edu/ssaupe/biol327/flowering.ht>
- 48. Shaw, M. M and Riederer, B. M. 2003.** Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. Proteomics. 3: 1408-1417.
- 49. Sholokhova, V.A. and Vilde, E.I. 1980.** Study of relationship between organogenesis and air temperature in olive varieties. Introduction and breeding of subtropical fruit and nut crops. The All-Union V.1. Lenin Academy of Agricultural Science. The State Nikita Botanical Gardens. 80: 30-41.
- 50. Simson, R. J. 2003.** Proteins and proteomics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, ISBN: 0-87969-553-6.

51. **Smalle, J. and Vierstra, R.D. 2004.** The ubiquitin 26s proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 55: 555–590.
52. **Stute, G. W. and Martin, G. C. 1986.** Effect of killing the seed on return bloom of olive. *Scientia Horticultute.* 29: 107-113.
53. **Sule, A., Vanrobaeys, F., Hajos, G., Beeumen, V. J. and Devreese, B. 2004.** Proteomic analysis of small heat sock protein isoforms in barley shoots. *Phytochemistry.* 65: 1853-1863.
54. **Taiz, L. and Zeiger, E. 2002.** *Plant Physiology*, Publisher: Sinauer Associates, 3rd edition, USA, ISBN: 0878938230.
55. **Vlasic, A. 1981.** La temperature invernal y la productividad del olivo. *Olea* 12: 51-2.
56. **Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S. and Cresti, M. 2003.** Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis.* 24: 2369-2375.
57. **Wang, W., Vignani, R., Scali, M., Sensi, E., Tiberi, P. and Cresti M. 2004.** Removal of lipids contaminants by organic solvents from oilseed protein extract prior to electrophoresis. *Analytical biochemistry.* 329: 139-141.
58. **World Catalogue of Olive Varieties. 2000.**
59. **Amersham Biosciences, 2004.** 2-D Electrophoresis, Principles and methods.
60. **Hoefler, 1994.** Protein electrophoresis application guide.
61. **Sigma, 2003.** Biochemicals and reagents.
62. **Sigma, 1994.** Electrophoresis.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Δείγματα- Νωπό βάρος λειοτριβημένου ιστού (σκόνη) gr.

	MANZANILLO				ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ			
	1	2	3	4	1	2	3	4
07/2/08	0,501	0,497	0,832	0,309	0,5	0,505	0,302	1,8
15/2/08	0,31	0,502	0,51	1,25	0,3	0,536	0,549	2,462
22/2/08	0,299	0,508	0,505	1,006	0,301	0,507	0,536	2,288
29/2/08	0,302	0,501	0,501	1,621	0,302	0,501	0,507	1,697
07/3/08	0,302	0,5	0,501	0,922	0,302	0,503	0,505	3,178
14/3/08	0,301	0,501	0,5	0,632	0,3	0,501	0,5	4,435
20/3/08	0,3	0,501	0,508	0,327	0,305	0,503	0,503	1,102

Πίνακας 2. Μ.Ο Συγκεντρώσεων μg πρωτεΐνης/1000 mg N.B. ιστού

MANZANILLO

HM/ NIA	Αναγωγή στα 1000mg I	Αναγωγή στα 1000mg II	Αναγωγή στα 1000mg III	Μ.Ο.	Τ.Σ.
7/2/2008	32,98533	26,892	32,98533	30,95422	2,03111
15/2/2008	29,72624	6,3597	2,567083	12,88434	8,491823
22/2/2008	42,76263	46,6639	44,93536	44,7873	1,12863
29/2/2008	71,00815	50,4662	47,10809	56,19415	7,470168
7/3/2008	66,66268	58,0707	43,849	56,19413	6,652246
14/3/2008	27,5536	41,3407	26,46714	31,78715	4,787062
20/3/2008	156,8311	120,428	106,8582	128,0391	14,91944

ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ

HM/ NIA	Αναγωγή στα 1000mg I	Αναγωγή στα 1000mg II	Αναγωγή στα 1000mg III	Μ.Ο.	Τ.Σ.
7/2/2008	16,07287	12,27059	10,36946	12,90431	1,676645
15/2/2008	3,3986	3,3986	3,3986	3,3986	0
22/2/2008	115,5659	103,5253	81,97909	100,3568	9,824261
29/2/2008	147,2516	125,0716	128,8739	133,7324	6,848147
7/3/2008	97,82192	122,5368	88,94994	103,1029	10,04879
14/3/2008	108,5951	85,14765	72,47338	88,73869	10,58089
20/3/2008	149,7864	126,9728	182,7395	153,1662	16,18693

Πίνακας 3. : Η ανάλυση της παράλλαξης μεταξύ των επαναλήψεων των μετρήσεων των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στους πλάγιους οφθαλμούς της ελιάς με τη μέθοδο Bradford και για το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	B E	Μέσα τετράγωνα	F	Τιμή P	F κρίσιμο
Χρόνος		1		245,6	1,0421E-06	
Επαναλήψεις						
Σφάλμα						
Σύνολο						

Πίνακας 4: Σύγκριση των μέσων όρων της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών των πλάγιων οφθαλμών, των ποικιλιών MANZANILLO και ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ για το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου.

Πηγή παραλλακτικότητας	t	Τιμή P	t κρίσιμο
Χρόνος	<u>-2,4697</u>	<u>0,0242</u>	<u>1,9432</u>
Ποικιλίες	-2,4697	0,0485	2,4469

Πίνακας 5. Πρωτεΐνες δείγματος για SDS

ΜΑΝΖΑΝΙΛΛΟ				
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΕΣ	ΔΕΙΓΜΑ 2	Μ.Ο.ΣΥΓΚ./1000mg	ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΙΓΜ.	SUMPLE BAFER
7/2/2008	0,501	30,95422	15,50806422	7,75403211
15/2/2008	0,51	12,884341	6,57101391	3,285506955
22/2/2008	0,508	44,78729667	22,75194671	11,37597335
29/2/2008	0,501	56,19414667	28,15326748	14,07663374
7/3/2008	0,501	56,19412667	28,15325746	14,07662873
14/3/2008	0,501	31,78714667	15,92536048	7,96268024
20/3/2008	0,508	128,0391	65,0438628	32,5219314

ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ				
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΕΣ	ΔΕΙΓΜΑ2	Μ.Ο.ΣΥΓΚ./1000mg	ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΙΓΜ.	SUMPLE BAFER
7/2/2008	0,505	12,90430667	6,516674867	3,258337433
15/2/2008	0,536	3,3986	1,8216496	0,9108248
22/2/2008	1,043	100,3567767	104,6721181	52,33605903
29/2/2008	0,501	133,73236	66,99991236	33,49995618
7/3/2008	0,503	103,10287	51,86074361	25,93037181
14/3/2008	0,501	88,73869333	44,45808536	22,22904268
20/3/2008	0,503	153,1662267	77,04261201	38,52130601

Πίνακας 6. Πρωτεΐνες δείγματος για 2 D**ΜΑΝΖΑΝΙΛΛΟ**

Date(14-4-10)	ΔΕΙΓΜΑ 3	Μ.Ο.ΣΥΓΚ./1000mg	ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΙΓΜ.	SUMPLE BAFER
7/2/2008	0	30,95422	0	0
15/2/2008	0	12,884341	0	0
22/2/2008	0	44,78729667	0	0
29/2/2008	1,002	56,19414667	56,30653496	28,15326748
7/3/2008	0,887	56,19412667	49,84419035	24,92209518
14/3/2008	0,618	31,78714667	19,64445664	9,82222832
20/3/2008	0,293	128,0391	37,5154563	18,75772815

ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ

Date	ΔΕΙΓΜΑ 3	Μ.Ο.ΣΥΓΚ./1000mg	ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΙΓΜ.	SUMPLE BAFER
7/2/2008	0,5	12,90430667	6,452153333	3,226076667
15/2/2008	0,549	3,3986	1,8658314	0,9329157
22/2/2008	0	100,3567767	0	0
29/2/2008	0,507	133,73236	67,80230652	33,90115326
7/3/2008	0,505	103,10287	52,06694935	26,03347468
14/3/2008	0,5	88,73869333	44,36934667	22,18467333
20/3/2008	0,305	153,1662267	46,71569913	23,35784957

Πίνακας 7.1. Υπολογισμοί Μοριακών Βαρών των πρωτεϊνικών ζωνών που απομονώθηκαν στους πλάγιους οφθαλμούς της MANZANILLO, για το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου.

Prot. Dist	Rf	LogMW	MW	MW(KDa)	
D=48,37					$\Psi = -1,0036 X + 5,2503$
					20/3/2008
4,45	0,09199917	5,15796963	143869,79	144	
5,45	0,11267314	5,137221232	137158,28	137	
6,45	0,13334712	5,116472834	130759,37	131	
7,45	0,15402109	5,095724437	124659,23	125	
					14/3/2008
24,02	0,49658879	4,751923486	56483,74	56	
27,94	0,57763076	4,670589766	46837,07	47	
					7/3/2008
8,78	0,18151747	5,068129068	116984,7	117	
24,19	0,50010337	4,748396258	56026,85	56	
29,32	0,60616084	4,641956977	43848,72	44	
					29/2/2008
7,83	0,1618772	5,087840045	122416,52	122	
16,3	0,33698573	4,912101116	81677,25	82	
24,13	0,49886293	4,749641162	56187,68	56	
29,63	0,61256977	4,635524974	43204,1	43	
46,14	0,95389704	4,292968927	19632,19	20	
					22/2/2008
7,94	0,16415133	5,085557722	121774,88	122	
16,4	0,33905313	4,910026277	81287,97	81	
24,24	0,50113707	4,747358838	55893,18	56	
29,42	0,60822824	4,639882138	43639,73	44	
42,86	0,88608642	4,361023672	22962,73	23	
					15/2/2008
24,77	0,51209427	4,736362187	54495,69	54	
					7/2/2008
24,55	0,507546	4,740926835	55071,49	55	
37,99	0,78540418	4,462068369	28977,99	29	

Πίνακας 7.2. Υπολογισμοί Μοριακών Βαρών των πρωτεϊνικών ζωνών που απομονώθηκαν στους πλάγιους οφθαλμούς της ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ, για το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Μαρτίου.

D=22,86						
						$\Psi = -1,0036 X + 5,2503$
Prot. Dist	Rf	LogMW	MW	MW(KDa)		
					20/3/2008	
12,7	0,55555556	4,692744444	49288,31	49		
18,63	0,81496063	4,432405512	27064,87	27		
21,8	0,9536308	4,293236133	19644,27	20		
	0				14/3/2008	
12,35	0,54024497	4,708110149	51063,43	51		
18,31	0,80096238	4,446454156	27954,64	28		
21,17	0,92607174	4,320894401	20936,01	21		
	0				7/3/2008	
0,81	0,03543307	5,21473937	163960,41	164		
4,76	0,20822397	5,041326422	109983,11	110		
11,92	0,52143482	4,726988014	53332,01	53		
17,57	0,76859143	4,478941645	30126,03	30		
21,59	0,94444444	4,302455556	20065,77	20		
	0				29/2/2008	
1,23	0,05380577	5,196300525	157145,15	157		
3,53	0,1544182	5,095325897	124544,91	125		
12,14	0,53105862	4,717329571	52159,08	52		
13,97	0,61111111	4,636988889	43349,98	43		
18,17	0,79483815	4,452600437	28353,06	28		
22,01	0,96281715	4,28401671	19231,67	19		
	0				22/2/2008	
1,06	0,0463692	5,203763867	159868,9	160		
12,35	0,54024497	4,708110149	51063,43	51		
15,03	0,65748031	4,590452756	38945,11	39		
17,96	0,78565179	4,46181986	28961,42	29		
21,77	0,95231846	4,294553193	19703,93	20		
	0				15/2/2008	
1,59	0,06955381	5,180495801	151529,08	152		
11,92	0,52143482	4,726988014	53332,01	53		
13,93	0,60936133	4,638744969	43525,62	44		
16,83	0,73622047	4,511429134	32466,01	32		
17,89	0,78258968	4,464893001	29167,08	29		
21,55	0,94269466	4,304211636	20147,07	20		
	0				7/2/2008	
1,91	0,08355206	5,166447157	146705,7	147		
20,43	0,89370079	4,35338189	22562,22	23		