

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΟΦΟΡΟΥΣ  
ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ  
(*Olea europaea*, L. cv "Kalamon") την περίοδο της διαφοροποίησης  
τους.**



**ΜΑΡΙΑΝΘΗ Σ. ΣΤΕΦΑΝΟΥ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ  
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ  
ΑΘΗΝΑ 2012**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΟΦΟΡΟΥΣ  
ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ  
(*Olea europaea*, L. cv “*Kalamon*”) την περίοδο της διαφοροποίησης  
τους.**

**ΜΑΡΙΑΝΘΗ Σ. ΣΤΕΦΑΝΟΥ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ  
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ  
ΑΘΗΝΑ 2012**

Το θέμα της παρούσης πτυχιακής μελέτης εγκρίθηκε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 16<sup>η</sup> /2-6-2009).

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή εγκρίθηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ (Συνεδρία 8<sup>η</sup> /14-3-2012).

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Καθηγητής κ. Κίντζιος Σπυρίδων (Επιβλέπων)

Καθηγητής κ. Καραμπουρνιώτης Γεώργιος

Καθηγητής κ. Μπουράνης Δημήτριος

## Πρόλογος

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη της επικ. καθηγήτριας κ. Χ. Κιτσάκη, η βοήθεια της οποίας ήταν απαραίτητη για την ολοκλήρωση του πειράματος.

Η εργασία αυτή αποτελεί μια πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη πάνω στην ελιά, σε μια καλλιέργεια η οποία είναι από τις πιο σημαντικές και με πολύ μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον για όλο το κόσμο. Σε αυτή την εργασία το ενδιαφέρον μας εστιάζεται στην μελέτη των πρωτεϊνών των πλάγιων οφθαλμών της ελιάς (*Olea europaea* L. cv *Kalamon*). Το χρονικό διάστημα των δειγματοληψιών καλύφθηκε από την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου, περίοδος κατά την οποία λαμβάνει χώρα και η διαφοροποίηση των οφθαλμών της ελιάς.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Σ. Κίντζιο και τα μέλη της επιτροπής Καθηγητή κ. Γ. Καραμπουρνιώτη και Καθηγητή κ. Δ. Μπουράνη για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της εργασίας μου. Ένα θερμό ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω και στους συναδέλφους Νικόλαο Μαραγκό και Νικόλαο Τζανετάκη για την βοήθεια και τη συμπαράσταση που απλόχερα μου προσέφεραν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου.

**Μαριάνθη Στεφάνου**  
**Αθήνα 2012**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	5
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	6
1.1.1. Βοτανικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της Ελιάς.....	6
1.1.2. Η σημασία της ελαιοκαλλιέργειας.....	9
1.1.3. Ποικιλία Καλαμών.....	11
<b>1.2. Το φαινόμενο της άνθησης</b> .....	13
1.2.1. Οι βασικές αναπτυξιακές φάσης ενός φυτού.....	13
1.2.2. Μετάβαση από νεανική σε βλαστητική φάση-γονιδιακός έλεγχος.....	14
1.2.3. Γονιδιακός έλεγχος ανθικής επαγωγής.....	15
1.2.4. Μετάβαση από βλαστητική σε ανθική φάση - Γονιδιακός έλεγχος.....	16
1.2.5. Γονιδιακός έλεγχος ανθικής κατασκευής.....	19
1.2.6. Επαγωγή-διαφοροποίηση ανθοφόρων οφθαλμών ελιάς.....	22
1.2.7. Παράγοντες που δύναται να επηρεάσουν την επαγωγή-διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών της ελιάς .....	23
<b>1.3. Η πρωτεομική στη μελέτη των φυτών</b> .....	25
1.3.1. Η πρωτεομική σαν εργαλείο μελέτης.....	25
1.3.2. Εφαρμογές πρωτεομικής στα φυτά.....	26
1.3.3. Η πρωτεομική στα δενδρώδη-πολυετή είδη.....	28
1.3.4. Η πρωτεομική στην ελιά.....	29
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	32
<b>2.1. Φυτικό υλικό</b> .....	32
<b>2.2. Εκχύλιση ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών</b> .....	33
2.2.1. Διαλύματα για την παραλαβή και τον καθαρισμό των πρωτεϊνών.....	34
<b>2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford</b> .....	34
2.3.1. Διαλύματα για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford.....	35
<b>2.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε κατακόρυφη πηκτή πολυακρυλαμίδιου         SDS-PAGE</b> .....	38
2.4.1. Παρασκευή πηκτής.....	38

2.4.2. Διαλύματα για την Παρασκευή πηκτής.....	40
2.4.3. Χειρισμός δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (SDS-PAGE).....	42
2.4.4. Μέθοδοι χρώσης πηκτής.....	42
2.4.4.1. Χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250.....	42
2.4.4.2. Χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο.....	43
2.4.5. Υπολογισμός μοριακού μεγέθους πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	44
<b>2.5. Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE).....</b>	<b>45</b>
2.5.1. Αναλυτική περιγραφή ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων.....	47
2.5.2. Χειρισμός δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων.....	52
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1. Ανάλυση των πρωτεϊνών των οφθαλμών της ελιάς την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου.....</b>	<b>53</b>
3.1.1. Μακροσκοπική εικόνα της εξέλιξης των πλάγιων οφθαλμών (εικόνες και η περιγραφή τους).....	53
3.1.2. Η πορεία της στάθμης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών .....	54
3.1.3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης σε πηκτή SDS-PAGE.....	55
3.1.4. Ανάλυση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δυο διαστάσεων 2-DE.....	59
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>67</b>
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>72</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>73</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>78</b>



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαδικασία της διαφοροποίησης των οφθαλμών αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό στάδιο του βιολογικού κύκλου των ανώτερων φυτών, καθώς από αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η αναπαραγωγή και κατά συνέπεια η διαιώνιση των ειδών.

Η ελιά καρποφορεί στην περιοχή του βλαστού παρελθόντος έτους από πλάγιους εν δυνάμει ανθοφόρους οφθαλμούς.

Τα γεγονότα που συμβαίνουν είναι:

- i. Άνοιξη η δημιουργία της νέας ετήσιας βλάστησης (νέα μεριστώματα).
- ii. Το φθινόπωρο πιθανόν να λαμβάνει χώρα η επαγωγική διεργασία αλλαγής των βλαστητικών μεριστωμάτων σε ανθοφόρα.
- iii. Χειμώνα με αρχές άνοιξης του επόμενου έτους οι διαφοροποιητικές διεργασίες των κυττάρων για το σχηματισμό των ανθικών σπονδυλωμάτων.

Η υπόθεση της εργασίας είναι ότι στο στάδιο (iii) συμβαίνουν στους πλάγιους οφθαλμούς πρωτεομικές μεταβολές που σχετίζονται με τις διαφοροποιητικές διεργασίες.

Η διερεύνηση της υπόθεσης εργασίας που τέθηκε έγινε κατά την περίοδο αυτή με α) προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford β) ανάλυση SDS-PAGE και γ) ανάλυση 2-DE. Χρησιμοποιήθηκαν πλάγιοι οφθαλμοί ελιάς ποικιλίας καλαμών.

Οι απαντήσεις που δόθηκαν στην υπόθεση εργασίας είναι οι ακόλουθες: Την περίοδο Νοεμβρίου- Ιανουαρίου, η συγκέντρωση των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών ήταν υψηλότερη στους πλάγιους οφθαλμούς απ' ότι την περίοδο Ιανουαρίου- Μαρτίου με τη μέγιστη τιμή να σημειώνεται τον μήνα Νοέμβριο. Στους πλάγιους οφθαλμούς οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες (9) αποκαλύφθηκαν κατά τον μήνα Νοέμβριο. Οι πρωτεΐνες με τη μεγαλύτερη ένταση και τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης εντοπίζονταν στα μοριακά μεγέθη από 20 έως 49 kDa περίπου. Τα χαμηλά μοριακά βάρη χαρακτηρίζονταν από ασθενή έκφραση.

Η 2-DE ανάλυση έδειξε 50, 41 και 31 πρωτεϊνικές κηλίδες για τις ημερομηνίες 14/11, 31/01 και 28/02 αντίστοιχα. Διαπιστώθηκαν αρκετές διαφορετικές κηλίδες στις αναλύσεις των πλάγιων οφθαλμών στις τρεις



διαφορετικές ημερομηνίες. Τον Νοέμβριο ο αριθμός των κηλίδων ήταν μεγαλύτερος και πολλές διαφορετικές κηλίδες διαπιστώθηκαν συγκριτικά με τις δύο άλλες ημερομηνίες. Τα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι η περίοδος του Νοεμβρίου είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα και χρήζει διεξοδικότερης διερεύνησης.

## ABSTRACT

The differentiation process of buds consists of a particularly important stage of the biological cycle of higher plants, as the reproduction and consequently the perpetuation of such species are to a great extent depended upon this procedure.

Olive bears fruits in the area of previous year shoot from lateral potentially flower bearing buds.

The events that take place are as follows:

- i. During the spring, new yearly vegetation (new meristems) is created.
- ii. During the fall, the induction process that involves the transition of vegetative meristems to floral meristems, possibly occurs.
- iii. Between winter and early spring of the following year, the differentiating processes of the cells in order to form the floral whorls, are completed.

The hypothesis of the present paper states that in the stage (iii) proteomic transformations in the lateral buds appear, that are associated with the differentiating process.

The exploration of the adopted hypothesis took place during the experimental period (November- March) through: a) the determination of the total water soluble proteins employing the Bradford method, as well as b) SDS-PAGE analysis and c) two-dimensional electrophoresis (2-DE) analysis. The sample was constituted from lateral buds of “ kalamon” variety of olives According to the results deriving from the research hypothesis, during the time period from November to January, the accumulation of the total water extractable proteins, was elevated in the lateral buds comparing to the accumulation noted during the period from January to March, with the maximum value being recorded in November. In the lateral buds, the majority of protein zones (9) were revealed in November. The proteins scoring the highest intensity and maximum frequency were detected in molecular weight between approximately 20 and 49 kDa. The low molecular weight proteins were characterized by low-intensity expression.

The 2-DE analysis demonstrated that the 50, 41 και 31 protein spots correspond to dates 14/11, 31/01 and 28/02. Several different spots were detected in the analysis of the lateral buds in the three different dates. In November, the overall sum of spots was increased and many different spots were identified comparing

to the other two dates. The collected data illustrate that the investigation period of November, was particularly significant and calls for further in-depth examination.

## **Ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού προφίλ των οφθαλμών της ελιάς, καθ' όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης τους (μέσα Φθινοπώρου μέχρι την έναρξη της έκπτυξης).

Για το σκοπό αυτό έγινε: α) προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford β) SDS-PAGE ανάλυση και γ) μια από τις πιο αποτελεσματικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους, αυτής της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων ή 2-DE electrophoresis.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### **1.1.1. Βοτανικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της Ελιάς**

Η καλλιέργεια της ελιάς χάνεται στα βάθη των αιώνων και συμπίπτει με την επέκταση των μεσογειακών πολιτισμών που για αιώνες καθόρισαν το πεπρωμένο της ανθρωπότητας και άφησαν την σφραγίδα τους στο δυτικό πολιτισμό.

Απολιθώματα φύλλων ελιάς έχουν βρεθεί στο Mongardino στην Ιταλία, ενώ στην Κύμη της Ευβοίας έχουν βρεθεί απολιθωμένα φύλλα του είδους *Olea noti* (Εικόνα 1.1) ([http:// www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org)).

Επίσης στη Β. Αφρική έχουν βρεθεί ευρήματα που μαρτυρούν την εξάπλωση του δέντρου (Ποντίκης, 2000).



*Εικόνα 1.1: Απολιθωμένα φύλλα ελιάς.*

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 *Phillyrea*

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 υποτροπικό είδος αιθαλής που αναπτύσσεται σε θάμνο ή δέντρο, φτάνει μέχρι ύψος 5-20 μέτρα και απαιτεί 30-100mm βροχόπτωσης ετησίως. Χαρακτηρίζεται για την μακροζωία του .Ανέχεται αυξημένες θερμοκρασίες (40-42 °C) κατά το καλοκαίρι, όταν υπάρχει διαθέσιμη υγρασία στο έδαφος.

Υποφέρει το χειμώνα αλλά και την άνοιξη αν η θερμοκρασία κατέβει στους -5 έως -6 °C. Πολύ υψηλές θερμοκρασίες και ξηροί άνεμοι όμως είναι επιζήμιοι στην νέα βλάστηση και στην καρπόδεση και προκαλούν συρρίκνωση καρπού. Για την διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών, η ελιά έχει ανάγκη το χειμώνα από μια περίοδο χαμηλών θερμοκρασιών μεταξύ 7°C και 16°C.

Στην περιοχή της Μεσογείου υπάρχουν δέντρα πολλών εκατονταετηρίδων και μερικά που ξεπερνούν και την χιλιετηρίδα (χ Ελιά του Πλάτωνα).

Η ελιά παρενιαυτοφορεί (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.λπ. (Μπαλατσουρας, 1992). Η ελιά καρποφορεί σε ξύλο παρελθόντος έτους από ανθοφόρους οφθαλμούς.

Η ελιά έχει νωρίς την άνοιξη, στους βλαστούς της, οφθαλμούς που θα δώσουν νέους βλαστούς (μαστοφόροι) και βλαστούς που θα δώσουν ταξιανθίες (ανθοφόροι). Αρχικά, στη νέα ετήσια βλάστηση, όλοι οι οφθαλμοί είναι ίδιοι (βλαστοφόροι) και από αυτούς ορισμένοι διαφοροποιούνται αργότερα σε ανθοφόρους. Οι ανθοφόροι ξεχωρίζουν από τους βλαστοφόρους δύσκολα και μόνο σε προχωρημένο στάδιο διαφοροποίησης (στις αρχές της επόμενης άνοιξης, όταν ξεκινάει η νέα βλάστηση). Οι βλαστοφόροι είναι μικρότεροι, στενότεροι και κωνικοί. Οι ανθοφόροι είναι πιο εξογκωμένοι και υποσφαιρικοί.

Ειδικότερα η ελιά φέρει ξυλοφόρους (βλαστοφόρους) και ανθοφόρους οφθαλμούς. Η διάκριση μεταξύ τους είναι παρά πολύ δύσκολη μακροσκοπικά. Οι ξυλοφόροι οφθαλμοί απαντούν έπακρα ή πλάγια των βλαστών και οι μικτοί ανθοφόροι μόνο πλάγια αυτών. Ο ξυλοφορος οφθαλμός εκπτυσσόμενος την άνοιξη, δίνει βλαστό επεκτάσεως ή πλάγια βλάστηση με φύλλα και ξυλοφόρους ή μικτούς ανθοφόρους οφθαλμούς στις μασχάλες αυτών. Ο ανθοφόρος οφθαλμός εκπτύσσεται την άνοιξη και δίνει έπακρια 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 από τους ξυλοφόρους οφθαλμούς παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση (Ποντίκης, 1997).

Τα φύλλα βγαίνουν δυο σε κάθε γόνατο, αντίθετα το ένα από το άλλο. Έχουν βαθύ πράσινο χρώμα στην πάνω επιφάνεια και σταχτί ασημί στην κάτω επιφάνεια. Η πάνω επιφάνεια είναι δερματώδης με παχιά εφυμενίδα ενώ τα

στομάτια στην κάτω επιφάνεια είναι μικρά, βυθισμένα και καλύπτονται με πυκνό χνούδι. Με την κατασκευή αυτή των φύλλων, που περιορίζει την διαπνοή και μειώνει τις απώλειες υγρασίας, η ελιά αποκτά καλή αντοχή στις ξηρικές συνθήκες με υψηλή θερμοκρασία και ανέμους. Για το λόγω αυτό το ελαιόδεντρο κατατάσσεται στα ξηρόφυτα χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν έχει ανάγκη από αρδεύσεις, για μια ορθολογική εκμετάλλευση των φυτειών της. Τα άνθη σχηματίζονται σε ομάδες από 8-25 (ταξιανθία τύπου «βότρυς») συνήθως στις μασχάλες των φύλλων.

Τα άνθη της ελιάς διακρίνονται σε δύο τύπους : α) τα τέλεια, που έχουν ανεπτυγμένους τους στήμονες και τον ύπερο και β) τα ατελή ή στημονοφόρα, που έχουν ανεπτυγμένους μόνο τους στήμονες. Στην περίπτωση αυτή ο ύπερος είναι υποτυπώδης ή ατροφικός. Το ποσοστό των τέλειων και ατελών ανθέων ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία και τις κλιματικές συνθήκες, που επικράτησαν κατά τη διάρκεια του χρόνου. Η ατροφία των στημόνων των ανθέων αποτελεί σπάνιο φαινόμενο. Στα τέλεια άνθη ο ύπερος είναι μεγάλος και γεμίζει σχεδόν ολόκληρο το χώρο του ανθικού σωλήνα. Στα στημονοφόρα άνθη ο ύπερος είναι υπανάπτυκτος και μόλις διακρίνεται στον πυθμένα του ανθικού σωλήνα.

Η άνθηση της ελιάς αρχίζει κατά τον Απρίλιο στις θερμότερες περιοχές και φθάνει μέχρι αρχές Ιουνίου στις ψυχρότερες περιοχές ανάλογα με την ποικιλία.

Ο καρπός της ελιάς είναι «δρύπη» όπως και των πυρηνοκάρπων. Αποτελείται (από έξω προς τα μέσα) από το φλοιό ή εξωκάρπιο (εφυμενίδα και επιδερμίδα), τη σάρκα ή μεσοκάρπιο όπου γίνεται η ελαιοποίηση και τον πυρήνα ή ενδοκάρπιο μέσα στον οποίο περιέχεται το σπέρμα. Το μεσοκάρπιο αποτελείται από ισοδιαμετρικά ,παρεγγυματικά κύτταρα, μέσα στα οποία σχηματίζονται τα σταγονίδια λαδιού. Ο πυρήνας εξωτερικά φέρει γλύφες (αυλάκια), που μπορεί να διευκολύνουν την διάκριση των διαφόρων ποικιλιών, ενώ εσωτερικά περικλείει το σπέρμα. Οι καρποί αρχικά έχουν πράσινο χρώμα, το οποίο με την πρόοδο της ωρίμανσης των καρπών γίνεται ερυθρωπό και τελικά μαύρο (Εικόνα 2) ( <http://www.greenpage.gr/kaliergeies.htm>) .

Όσον αφορά το έδαφος η ελιά αναπτύσσεται σε όλα τα εδάφη ακόμα και στα άγονα πετρώδη. Αποδίδει όμως πολύ καλύτερα σε σχετικά γόνιμα εδάφη που συγκρατούν αρκετή υγρασία. Υποφέρει σοβαρά σε βαρεία εδάφη που νεροκρατούν. Προτιμά ουδέτερη ή ελαφρά αλκαλική αντίδραση (pH:8) του εδάφους, αντέχει όμως και στα ελαφρά όξινα εδάφη. Έχει σχετικά καλή αντοχή

στην αλατότητα. Η υψηλή σχετικά υγρασία στην ατμόσφαιρα ευνοεί τις ασθένειες από τις οποίες προσβάλλεται η ελιά. Υψηλή σχετικά υγρασία κατά την ανθοφορία μειώνει σημαντικά την καρπόδεση.



*Εικόνα 1.2: Δέντρο ελιάς με τους καρπούς*

### **1.1.2. Η σημασία της ελαιοκαλλιέργειας**

Ελιά, σύμβολο γαλήνης, γονιμότητας, ειρήνης. Τα κλαδιά της έγιναν στεφάνια για να στεφανώνουν τους νικητές των Ολυμπιακών αγώνων και ο πολύτιμος χυμός των καρπών της, το ελαιόλαδο, ήταν το βραβείο για τους νικητές των περιφημων Παναθηναϊκών Αγώνων που γίνονταν προς τιμή της θεάς Αθηνάς. Η ελιά είναι ένα από τα πιο σημαντικά και ανθεκτικά καρποφόρα δέντρα της Μεσογειακής λεκάνης. Στην Ελλάδα η ελιά είχε ξεχωριστή θέση από την αρχαιότητα και είχε συνδεθεί με την διατροφή, τη θρησκεία, την υγεία και την τέχνη. Σήμερα είναι η πρώτη σε σπουδαιότητα δενδρώδης καλλιέργεια στη χώρα μας, αφού καταλαμβάνει σε έκταση το 15% περίπου της καλλιεργούμενης γης και το 75% των εκτάσεων που είναι φυτεμένες με δέντρα.

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. Το γεγονός ότι τα τελευταία 25 χρόνια πραγματοποιούνται νέες φυτεύσεις με συστήματα πυκνής φύτευσης και χαμηλή ανάπτυξη κόμης, οδήγησε στη σταθερή αύξηση των εκτάσεων που καλλιεργούνται με ελιά στη χώρα μας. Επίσης το ίδιο χρονικό διάστημα έχουμε



σημαντική αύξηση της ετήσιας παραγωγής ελαιοκάρπου και παραγωγή λαδιού, καθώς επίσης και αύξηση της παραγωγής βρώσιμης ελιάς. Η κατανομή των ελαιώνων μεταξύ των διαφόρων περιοχών είναι άνιση κυρίως λόγω της προσαρμογής του ελαιόδεντρου σε περιοχές παράκτιες, με ελάχιστη βροχόπτωση κατά την καλοκαιρινή περίοδο. Η ελιά καλλιεργείται στους 50 από τους 54 νομούς της χώρας. Έτσι ενώ στην Κρήτη η ελιά καλλιεργείται στο 61,2 % της συνολικά καλλιεργούμενης έκτασης, στη Μακεδονία μόλις στο 2-3 %. Η Ελλάδα κατέχει την τρίτη θέση στην παγκόσμια παραγωγή ελιών με πάνω από 132 εκατομμύρια δέντρα, τα οποία παράγουν περίπου 350.000 τόνους ελαιολάδου ετησίως, εκ των οποίων 82% είναι έξτρα παρθένο. Επίσης υπάρχουν περίπου 2800 ελαιοτριβεία, 335 συσκευαστήρια-πυρηνελαιουργεία και 80 εργοστάσια επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς. Ετησίως παράγονται περίπου 300.000 τόνοι ελαιολάδου άριστης ποιότητας από το οποίο οι 100.000 τόνοι εξάγονται. Παράγονται επίσης 70.000 τόνοι επιτραπέζιες ελιές από τις οποίες περίπου οι μισές εξάγονται. Παράγονται τέλος γύρω στους 25.000 τόνους 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).

Η ελαιοκαλλιέργεια ασχολείται με ένα «φυσικό δέντρο» με τεράστια ιστορική, οικονομική και περιβαλλοντική σημασία, γι' αυτό και είναι βαθιά ριζωμένο στις παραδοσιακές συνήθειες κάθε παραγωγού. Είναι άριστα δεμένο με την περιβαλλοντική πολιτική για αειφόρο ανάπτυξη της γεωργίας. Επιπλέον ενισχύει τον πολυδιάστατο ρόλο της γεωργίας, προσφέροντας προϊόντα των οποίων η αξία της παραγωγής δεν υπολογίζεται μόνο σε χρήμα. Αντίθετα, το ελαιόδεντρο εκτιμάται όλο και περισσότερο για την ιστορική του σημασία, τη συμβολή του στην ομορφιά του τοπίου, στη βιοποικιλότητα, στην προστασία του περιβάλλοντος και στην υγιεινή διατροφή του σύγχρονου ανθρώπου.

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 στο 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. Ποικιλία Καλαμών

Στις ημέρες μας, η καλύτερη ποικιλία επιτραπέζιας ελιάς θεωρείται η «ελιά Καλαμών». Είναι ποικιλία μεγαλόκαρπη, το σχήμα της είναι κυλινδρικό και είναι κυρτωμένο στην κορυφή. Το χρώμα της ποικιλίας αυτής από πράσινο μεταβάλλεται σε πρασινοκόκκινο, ιώδες μέχρι και βαθύ μελανώδες. Το μέγεθος του καρπού κυμαίνεται από 1,5 έως 2,5 εκατοστά. Είναι συνεκτική στο σάρκωμα και διαθέτει χαρακτηριστική γεύση. Αυτός ο τύπος ελιάς βρίσκεται αποκλειστικά στην Ελλάδα (Εικόνα 1.3).



*Εικόνα 1.3 : Ποικιλία καλαμών*

Η Καλαμών φέρει και τις συνωνυμίες: Αετονύχι, Αετονυχολιά, Καλαματιανή, Κορακολιά, Τσιγκέλι, Τσιγκελολιά και Χονδρολιά. Καλλιεργείται κυρίως στους νομούς Μεσσηνίας, Λακωνίας, Αιτωλοακαρνανίας και Φθιώτιδος. Το δέντρο αναπτύσσει ζωηρή βλάστηση και έχει μέτριο ύψος. Αναπτύσσεται σε δένδρο ύψους 7-10 μέτρων. Τα φύλλα είναι πολύ πλατιά, σκληρά με κυματοειδή και αναδιπλωμένα άκρα, με την πάνω επιφάνεια βαθυπράσινη και την κάτω σταχτοπράσινη. Βρώσιμη μαύρη ελιά, εξαιρετικής ποιότητας, βάρους 5-6 γραμμαρίων. Έχει απαιτήσεις σε νερό και ευδοκίμει σε περιοχές με ήπια καιρικά χαρακτηριστικά. Τα φύλλα είναι μεγαλύτερα από τις άλλες Ελληνικές ποικιλίες ελιάς.

Ο καρπός της ωριμάζει αργά το φθινόπωρο και η συγκομιδή γίνεται όταν αποκτήσει έντονο σκούρο χρώμα. Ο καρπός είναι μέτριος ως μεγάλος, μυτερός,

καμπυλωτός σαν ρώγα σταφυλιού "Αετονύχι", γι' αυτό λέγεται και Αετονυχολιά. Η σάρκα είναι σκληρή, ασπριώδης. Το κουκούτσι είναι μεγάλο, μακρουλό σαν τον καρπό, αποσπάται εύκολα από αυτόν και αυτό είναι ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματά του. Το χρώμα του καρπού από ανοιχτοπράσινο γίνεται κοκκινωπό, και στην ωρίμανση σκούρο μαύρο, χωρίς ν' αλλάζει το χρώμα αυτό στην κονσερβοποίηση. Ωριμάζει το Νοέμβριο – Δεκέμβριο (<http://www.eliamed.gr>).

Χρησιμοποιείται κυρίως για την παρασκευή μαύρων κονσερβών και μάλιστα τύπου «*χαρακτές ξιδάτες*» εκλεκτής ποιότητας (Εικόνα 1.4). Οι καρποί παρουσιάζουν ευκολία στη συλλογή και στη μεταχείριση τους. Διατηρούν το χρώμα τους και έχουν υψηλή αναλογία σάρκας προς καρπό (8,3:1). Η περιεκτικότητά της σε λάδι είναι 17-19% και είναι άριστης ποιότητας. Γενικά, είναι εκλεκτή, ανθεκτική και παραγωγική ποικιλία. Στις χρονιές της μεγάλης παραγωγής χρειάζεται άρδευση μέχρι την έναρξη της ωρίμανσης του καρπού για να μεγαλώσει ικανοποιητικά ο καρπός και να μη ζαρώσει. Για την αποφυγή της υπερπαραγωγής, και του μικρού μεγέθους του καρπού, συστήνεται αυστηρό κλάδεμα τη χρονιά που προβλέπεται μεγάλη παραγωγή.

Καλλιεργείται τόσο στα πεδινά όσο και στα ημιορεινά μέχρι 600 μέτρα, αλλά καλύτερη ποιότητα καρπού εξασφαλίζεται από ελαιόδεντρα των ημιορεινών περιοχών.

Θεωρείται ποικιλία μετρίως ανεκτική στο κρύο, πολύ ευαίσθητη στις υψηλές θερμοκρασίες και ανθεκτική στο βερτισίλλιο και ευαίσθητη στο κυκλοκόνιο. (World Catalogue of Olive Varieties 2000).



*Εικόνα 1.4: Επιτραπέζιες ελιές καλαμών*

## 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 διαίωνιση καθενός φυτικού οργανισμού (δημιουργία ειδικών “αναπαραγωγικών οργάνων”, μειωτική διαίρεση για τη δημιουργία γαμετών κ.λπ.).

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 “δεσμεύουν” ένα κορυφαίο μερίστωμα σε ανθικό καλείται προτροπή άνθησης (floral evocation), μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τέσσερα διακριτά στάδια:

- i. Νεανική βλαστητική φάση
- ii. Ενήλικη βλαστητική φάση
- iii. Ενήλικη αναπαραγωγική φάση και

#### iv. ΑΝΘΗΣΗ

Η μετάβαση από τη μία φάση στην άλλη είναι γνωστή με διάφορους όρους όπως αλλαγή φάσης, οντογενετική ενηλικίωση ή μεριστωματική ενηλικίωση (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, η φυλλοταξία κ.α. (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. Μετάβαση από νεανική σε βλαστητική φάση**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η μετάβαση από την νεανική στην ενήλικη φάση επηρεάζεται τόσο από περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. φωτοπερίοδος, θερμοκρασία) που επιδρούν στο ρυθμό ανάπτυξης, όσο και από ενδογενείς όπως το θρεπτικό και ορμονικό επίπεδο του φυτού. Η μετάβαση αυτή συνήθως ακολουθείται και από μορφολογικές αλλαγές όπως αλλαγές στη μορφολογία των φύλλων και στη διάταξη τους στον κεντρικό βλαστό, μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας και διατήρηση των φύλλων σε φυλλοβόλα δέντρα. Η μετάβαση

αυτή είναι σταδιακή και διαρκεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ότι η μετάβαση από τη βλαστητική στην ανθική φάση (Taiz and Zeiger, 2002).

### 1.2.3. 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

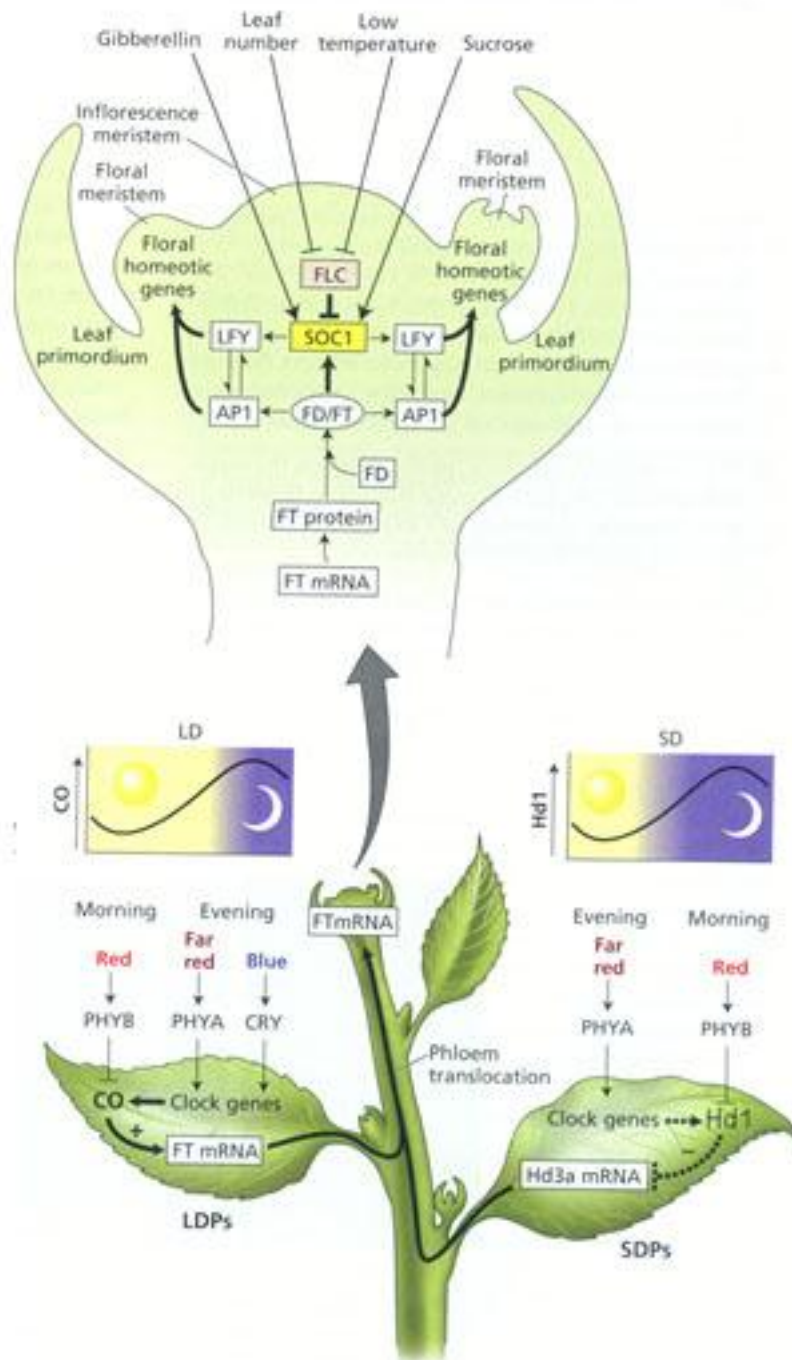
iii. Meristem identity genes: η έκφρασή τους ερμηνεύεται σαν το αποτέλεσμα της αντίδρασης του φυτικού οργανισμού στα διάφορα ενδογενή και περιβαλλοντικά σήματα. Είναι εκείνα τα γονίδια που ενεργοποιούν τα floral organ identity genes (Taiz and Zeiger, 2002).

#### 1.2.4. Μετάβαση από βλαστητική σε ανθική φάση

Είναι πλέον αποδεδειγμένο ερευνητικά ότι η μετάβαση από τη βλαστητική στην ανθική φάση ή η επαγωγή της άνθησης αποτελεί ένα πολυσύνθετο φαινόμενο, που σχετίζεται με ένα περίπλοκο σύστημα αλληλένδετων παραγόντων οι οποίοι περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τη φωτοπερίοδο, τις χαμηλές θερμοκρασίες, τους Υδατάνθρακες και τις γιββερελλίνες (gibberellins). Τα μεταδιδόμενα σήματα που δημιουργούνται στο φύλλο, αποτελούν απαίτηση για τον καθορισμό της κορυφής του βλαστού και στα είδη που ρυθμίζονται αυτόνομα και στα φωτοπεριοδικά. Η διαδικασία καθορισμού του αν αυτά τα μεταδιδόμενα αποτελούνται από ένα ή πολλαπλά μέρη, αποτελεί μια τεράστια πρόκληση για το μέλλον.

Οι γενετικές μελέτες έχουν καθορίσει (βεβαιώσει εμπειρικά) ότι υπάρχουν τέσσερις διακριτές εξελικτικοί οδοί οι οποίοι ελέγχουν την ανθογένεση στα μακροήμερα *Arabidopsis* (Εικόνα 1.5).

Η φωτοπεριοδική οδός ξεκινά στο φύλλο και εμπλέκει φυτοχρώματα και κρυπτοχρώματα. Οι PHYA και PHYB έχουν αντικρουόμενες επιδράσεις στην ανθογένεση. Στα μακροήμερα φυτά *Arabidopsis* υπό συνθήκες μακράς διάρκειας ημέρας, η αλληλεπίδραση των φωτουποδοχέων εισάγει μια οδό η οποία έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση μονοξειδίου (CO) στα συνοδά κύτταρα του ηθμού.



**Εικόνα 1.5:** Συνοπτική απεικόνιση των τεσσάρων μονοπατιών ελέγχου της ανθικής επαγωγής στο γένος *Arabidopsis* (Taiz and Zeiger 4<sup>η</sup> έκδοση 2006).



Παραπάνω παρατηρούμε τους πολλαπλούς εξελικτικούς οδούς στην ανθογέννεση των φυτών Arabidopsis:

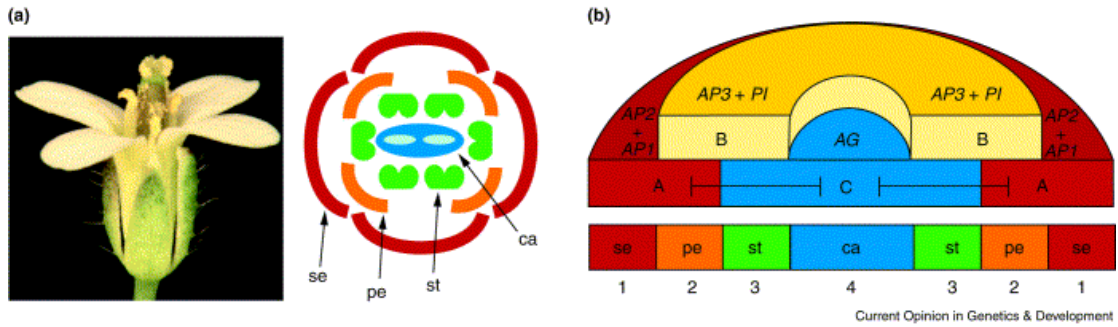
1. Φωτοπερίοδος 2. Αυτόνομη οδός (αριθμός φύλλων) και εαρινοποίηση (χαμηλή θερμοκρασία), 3. ενεργειακή οδός και 4. Γιβερρελινική οδός. Η φωτοπερίοδος εντοπίζεται στα φύλλα και ενέχει την παραγωγή ενός μεταδιδόμενου ανθικού ερεθίσματος, το οποίο θεωρείται ότι είναι FT mRNA. Στα μακροήμερα όπως το Arabidopsis το FT mRNA παράγεται στο φλοίωμα ως απάντηση στην συγκέντρωση της πρωτεΐνης του μονοξειδίου υπό συνθήκες μακρο-ημερίας. Έπειτα μεταφέρεται μέσω των ηθμοσωλήνων στο κορυφαίο μερίστωμα. Στα βραχυήμερα, το μεταφερόμενο ανθικό ερέθισμα Hd3a mRNA εκφράζεται όταν η ανασταλτική πρωτεΐνη Hd1 δεν καταφέρνει να συγκεντρωθεί υπό συνθήκες βραχυ-ημερίας. Στο μερίστωμα το FT ή Hde3 mRNA μεταφράζεται σε πρωτεΐνες. Στα Arabidopsis το FT αλληλεπιδρά με μια άλλη πρωτεΐνη το FD. Ο συνδυασμός FT/FD στην συνέχεια, ενεργοποιεί τα γονίδια AP1 και SOC1, τα όποια πυροδοτούν την έκφραση του γονιδίου LFY. Τα LFY και AP1 με την σειρά τους, πυροδοτούν την έκφραση των ανθικών ομοιωτικών γονιδίων. Η αυτόνομη οδός (αριθμός φύλλων) και η οδός με εαρινοποίηση (χαμηλή θερμοκρασία) δρουν στο κορυφαίο μερίστωμα ώστε να ρυθμίσουν αρνητικά την FLC, έναν αρνητικό ρυθμιστή της SOC1. Η ενεργειακή και η γιβερρελινική οδός, οι οποίες επίσης τοποθετούνται στο μερίστωμα, προωθούν την έκφραση του SOC1.

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. Φυσικά το παραγόμενο σήμα είναι πιο ισχυρό όταν συμμετέχουν και τα τέσσερα μονοπάτια.

### 1.2.5. 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 δακτυλίου. Ο 1<sup>ος</sup> εξωτερικός δακτύλιος αποτελείται από τα σέπαλα, ο 2<sup>ος</sup> περιλαμβάνει τα πέταλα, ο 3<sup>ος</sup> τους στήμονες και ο 4<sup>ος</sup> 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<sup>ο</sup> δακτύλιο η μεμονωμένη έκφραση γονιδίων τύπου A(AP1) έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό των σέπαλων. Στο 2<sup>ο</sup> δακτύλιο η συνδυασμένη έκφραση τύπου A(AP2) και B(AP3/PI) προδιαγράφει το σχηματισμό των πετάλων. Ο σχηματισμός των στήμονων στον 3<sup>ο</sup> δακτύλιο αποδίδεται στην ταυτόχρονη έκφραση γονιδίων τύπου B(AP3/PI) και C(AG), ενώ εκείνος του υπέρου στον 4<sup>ο</sup> δακτύλιο στη δράση μόνο γονιδίων τύπου C(AG) (Goto et al, 2001, Εικόνα 1.6).

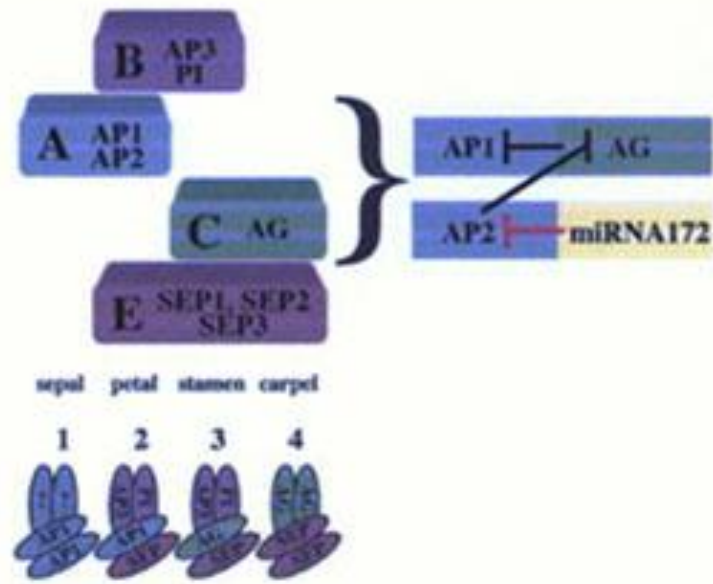


**Εικόνα 1.6 :** (α) άνθος *Arabidopsis*, (β) διαγραμματική απεικόνιση μοντέλου ABC (Taiz and Zeiger, 2002).

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<sup>ο</sup> δακτύλιο να σχηματίζονται στίγματα αντί για σέπαλα και στον 2<sup>ο</sup> δακτύλιο στήμονες αντί για πέταλα. Η μετάλλαξη γονιδίων τύπου B οδηγούσε στο σχηματισμό σέπαλων αντί για πέταλα στον 2<sup>ο</sup> δακτύλιο και στιγμάτων στη θέση των στημόνων στον 3<sup>ο</sup> δακτύλιο, ενώ φυτά με ag μετάλλαξη σχημάτιζαν πέταλα αντί για στήμονες στον 3<sup>ο</sup> δακτύλιο και σέπαλα στη θέση των στιγμάτων στον 4<sup>ο</sup> 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 1.7:** Διαγραμματική απεικόνιση μοντέλου ABCE. A, B, C και E είναι οι τέσσερις δραστηριότητες που βρίσκονται παρακείμενα του άνθους. Οι τέσσερις αυτές δραστηριότητες απαιτείται να λειτουργήσουν συνδυαστικά για να διευκρινιστεί η ταυτότητα των τεσσάρων σπονδυλωμάτων στο λουλούδι, σέπαλα, πέταλα, στήμονες και ύπερος. Μια δεύτερη σημαντική πτυχή του μοντέλου ABC είναι ότι η A και η 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 γονιδίων κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες πρωτεϊνών MADS. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες MADS λειτουργούν μαζί σε σύμπλοκα μεγαλύτερα από 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 1.7 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 τα εξής: 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 το *Arabidopsis* ισχύει πλέον το αναθεωρημένο μοντέλο ABCE, το οποίο επιβεβαιώνεται με ομόλογα γονίδια στην τομάτα και στην πετούνια (Jack, 2004).

### 1.2.6. Επαγωγή-διαφοροποίηση ανθοφόρων οφθαλμών ελιάς

Η ελιά φέρει ξυλοφόρους και ανθοφόρους οφθαλμούς. Οι πρώτοι είναι μικρότεροι και πιο κωνικοί, ενώ οι δεύτεροι περισσότερο εξογκωμένοι στο μέσο και υποσφαιρικοί. 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 επίσης ξυλοφόρους ή ανθοφόρους οφθαλμούς στις μασχάλες αυτών. Οι ανθοφόροι εκπτυσσόμενοι την άνοιξη δίνουν βλάστηση, η οποία φέρει επάκρια βοτρυώδη ταξιανθία με άνθη, τα οποία αν γονιμοποιηθούν εξελίσσονται σε καρπούς.

Η ανθική επαγωγή στην ελιά θεωρείται μια μακράς διάρκειας διαδικασία που επηρεάζεται από πληθώρα περιβαλλοντικών και ενδογενών του δένδρου παραγόντων. Η όλη διαδικασία της ανθικής επαγωγής χωρίζεται σε δύο στάδια :

**Επαγωγική φάση :** είναι εκείνο το στάδιο κατά το οποίο μέρος των οφθαλμών που μέχρι εκείνη τη στιγμή βρίσκονταν σε βλαστητική κατάσταση επάγονται σε ανθοφόρους. Η μετατροπή αυτή συνοδεύεται από βιοχημικές κατά βάση αλλαγές στα μεριστώματα, συνεπεία διαφόρων εξωγενών και ενδογενών επιδράσεων. Η επαγωγή των οφθαλμών σε ανθοφόρους θεωρείται “μη αντιστρεπτή φάση”, υποδηλώνοντας την ύπαρξη μιας και μόνο πλέον οντογενετικής κατάστασης, δηλαδή να εξελιχθεί σε άνθος ή να μην υποστεί περαιτέρω εξέλιξη παραμένοντας σε βλαστητική μορφή.

**Φάση διαφοροποίησης :** αποτελεί επακόλουθο της προηγούμενης φάσης και πρόκειται για μια κατεξοχήν ανατομική εξέλιξη των ανθοφόρων (αλλά και βλαστοφόρων) οφθαλμών, κατά την οποία σχηματίζονται οι τυπικοί ιστοί (σπονδυλώματα) των ανθέων. Κατά βάση λαμβάνει χώρα λίγο καιρό πριν από την άνθηση.

### 1.2.7. Παράγοντες που δύναται να επηρεάσουν την επαγωγή διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών της ελιάς

Το σχηματισμό των ανθοφόρων οφθαλμών στην ελιά επηρεάζουν πολλοί παράγοντες από τους οποίους οι σπουδαιότεροι είναι το κλίμα και κυρίως η θερμοκρασία και το φως, η ποικιλία και η κατάσταση θρέψης του δέντρου. Ορισμένοι από τους παράγοντες αυτούς που είναι κρίσιμοι στο σχηματισμό ανθοφόρων οφθαλμών επηρεάζουν και την παραγωγικότητα του δέντρου.

Ένας μεγάλος αριθμός ερευνητών έχει ασχοληθεί γενικότερα με το φαινόμενο της άνθησης στην ελιά, εστιάζοντας κυρίως στους παράγοντες εκείνους που επιδρούν τόσο επί της φάσης διαφοροποίησης των ανθοφόρων οφθαλμών όσο και στο χρόνο εκδήλωσης της άνθησης. Η φάση της διαφοροποίησης στην ελιά εντοπίζεται στο χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Απριλίου, ενώ αποτελούν κανόνα μέχρι και σήμερα τα δεδομένα του Hartman (1951) ότι ξεκινά περίπου 8 εβδομάδες πριν από τη πλήρη άνθηση και ολοκληρώνεται με την πλήρη ανάδυση του άνθους.

Καμία ανατομική αλλαγή δεν είναι ορατή μακροσκοπικά στους οφθαλμούς από τη στιγμή που σχηματίζονται (Ιούνιος) μέχρι και την εμφάνιση των πρώτων ανθικών καταβολών. Σύμφωνα με τους Hartman (1953) και Hackett and Hartman (1963) το ελαιόδεντρο δύναται να διαφοροποιήσει άνθη, μόνο όταν προηγουμένως έχει δεχθεί την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Συγκεκριμένα παρατήρησαν από πολύ νωρίς (αρχές Φεβρουαρίου) να λαμβάνουν χώρα σημαντικές ανατομικές μεταβολές όπως επιμήκυνση και διαπλάτυνση του κορυφαίου μεριστώματος και αύξηση του νωπού βάρους μόνο σε οφθαλμούς που προέρχονταν από δένδρα που είχαν εκτεθεί σε επαγωγίμες συνθήκες ψύχους. Αντίθετα στα μη εαρινοποιημένα δένδρα τέτοιες μεταβολές δεν ανιχνεύθηκαν ακόμη και λίγο καιρό πριν από την άνθηση. Οι ίδιοι ερευνητές (1967) θεωρούν ως ιδανική θερμοκρασία εαρινοποίησης για τη ελιά τους 10-13 °C, επισημαίνοντας ότι η παρατεταμένη έκθεση σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (3-4 °C) επιδρά αρνητικά. Ανάλογα ο Porlingis (1972) αναφέρει ότι θερμοκρασίες πάνω από 16 °C μειώνουν το ποσοστό άνθησης ενώ την επάγουν θερμοκρασίες μεταξύ 12 και 13 °C. Συμπληρώνει επίσης ότι η ημερήσια διακύμανση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του χειμώνα (7 °C για 20 h, 26 °C για 4 h) είναι ακόμη πιο ευεργετική

για την άνθηση καθώς και ότι μεταξύ των διαφόρων ποικιλιών υπάρχουν αξιολογικές διαφορές σε ανάγκες ψύχους για το μέγιστο της άνθησης.

Όπως συμβαίνει και σε άλλα φυτά, έτσι και στην ελιά το ερέθισμα του ψύχους γίνεται αντιληπτό μόνο στο τμήμα του φυτού που εκτίθεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Σύμφωνα με τους Hacket and Hartman (1964) η ελιά θεωρείται ως φωτοπεριοδικά ουδέτερο φυτό, με υψηλές ανάγκες εαρινοποίησης. Η φυλλική επιφάνεια είναι μεν απαραίτητη για το σχηματισμό των ανθέων αλλά αρκεί και ένα ποσοστό 10% αυτής για το σχηματισμό ικανοποιητικού αριθμού. Φαίνεται επίσης ότι το οποιοδήποτε ερέθισμα δίνεται από τα φύλλα, αυτό δεν μεταναστεύει σε μεγάλες αποστάσεις όπως μεταξύ βραχιόνων παρά μόνο σε μικρούς γειτονικούς βλαστούς. Ωστόσο, αν και τα φύλλα φαίνεται να μην λειτουργούν ως αισθητήριο ψύχους, θα πρέπει τα δύο ερεθίσματα χαμηλών θερμοκρασιών και φύλλων να δρουν ταυτόχρονα προκειμένου να προαχθεί η άνθηση (Hacket and Hartman, 1964).

Η ελιά χαρακτηρίζεται από το φαινόμενο της παρενιαυτοφορίας. 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 έχει ήδη αναφερθεί, σαφής ενδείξεις για τον χρόνο που λαμβάνει χώρα η επαγωγή κάποιων οφθαλμών σε ανθοφόρους δεν υπάρχουν. Κατά τους Pinney και Polito (1990) η επαγωγή των οφθαλμών της ελιάς σε ανθοφόρους

πραγματοποιείται πριν την επικράτηση χαμηλών θερμοκρασιών το χειμώνα (Νοέμβριο). Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξαν λίγο αργότερα και οι Rallo και Martin (1991). Κατά άλλους ερευνητές Fernandez-Escobar και Benlloch (1992), ο χρόνος επαγωγής τοποθετείται ακόμα 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. Η πρωτεομική στη μελέτη των φυτών**

#### **1.3.1. Η πρωτεομική σαν εργαλείο μελέτης**

Με διάφορες τεχνικές που έχουν αναπτυχτεί 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 την 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). Λόγω του γεγονότος ότι οι πρωτεΐνες έχουν βασική βιολογική λειτουργία, η πρωτεομική εξελίσσεται ταχύτατα.

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 διάφορων γονιδίων γνωστής ή ακόμη και άγνωστης αλληλούχισης που εκφράζονται σένα οργανισμό.

Αρχικά ο όρος χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τη μελέτη των πρωτεϊνών ενός οργανισμού που εκφράζονται χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (Two-Dimensional gel electrophoresis) και φασματογραφία μάζας (Mass Spectrometry) με σκοπό το διαχωρισμό και την αναγνώριση των πρωτεϊνών υπό καθορισμένες πειραματικές συνθήκες. Ο σκοπός της



πρωτεομικής πλέον έχει διευρυνθεί στη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών ( Simson, 2003).

Στην πρωτεομική ανάλυση χρησιμοποιούνται πολλές διαφορετικές μεθοδολογίες. Μια από τις πιο αποτελεσματικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους είναι ο συνδυασμός της χρήσης πηκτώματος δύο διαστάσεων (2-DE) για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών και της φασματομετρίας μάζας, για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό τους. Η φασματομετρία μάζας μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αυτόνομα στην πρωτεομική, ενώ μια πιο σύγχρονη μεθοδολογία είναι αυτή της χρήσης μικροσυστοιχιών αντισωμάτων (antibody microarrays) για την ανάλυση συγκεκριμένου πρωτεϊνικού προτύπου. Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE) αποτελεί ίσως την καλύτερη τεχνική για τη λύση των πρωτεϊνών ενός σύνθετου δείγματος. Ωστόσο, άλλες τεχνικές διαχωρισμού συμπεριλαμβανομένων των SDS-PAGE, HPLC, ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) είναι χρήσιμα εργαλεία στην αναλυτική πρωτεομική (Τσάγκαρης, 2008; Liebler, 2002).

### 1.3.2. 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. Ακόμη λοιπόν 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*) στον τρόπο έκφρασης κάποιων μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (HSPs), που πιθανά να αποτελούν μάρτυρες θερμικής καταπόνησης και κατά συνέπεια ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο είδος.

Η ανάλυση ενός ιστού ή οργανισμού σε επίπεδο πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση δύο-διαστάσεων για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων, αποτελεί πλέον μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και αποτελεσματική μέθοδο προς τη κατεύθυνση αυτή. Για την εφαρμογή της μεθόδου επίσης υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με τις “ιδιαιτερότητες” της και ιδιαίτερα με τον τρόπο παρασκευής των δειγμάτων, που είναι ίσως το πιο κρίσιμο σημείο για την επιτυχή εφαρμογή της. 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, φαινόλων, λιπών, χρωστικών κ.α.) που αλληλεπιδρούν με τα πρωτεϊνικά μόρια, επηρεάζοντας εν τέλει την 2-DE.

### 1.3.3. 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 λγνινοποιημένους 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) ερευνήσαν 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.

#### 1.3.4. Η πρωτεομική στην ελιά

Κατά την πορεία ανάπτυξης των φυτών, τα κύτταρα υφίστανται μεταβολές στο σχήμα, στη χημική σύνθεση και στην πρωτεϊνική σύσταση 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 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 με SDS-PAGE ανάλυση διαφορετικής ηλικίας ιστών (φύλλα, φλοιό και οφθαλμούς) διαφόρων ποικιλιών-κλώνων ελιάς προσπάθησαν να προσεγγίσουν το φαινόμενο της

“αλλαγής φάσης” από νεανική σε ενήλικη 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. Φυσικά, 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. Γενικότερα, τα μοριακά μεγέθη των πρωτεϊνών που εκφράστηκαν στους υπό εξέταση ιστούς ελιάς κυμάνθηκαν μεταξύ 14 και 66 kDa, συμπεριλαμβανομένων και των δύο υπομονάδων της Rubisco (14 και 55 kDa) και μόνο σε δείγματα φύλλων (νεαρά/ώριμα).

Οι Wang et al. (2003), ανέπτυξαν ένα πρωτόκολλο παρασκευής 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 όπως και εμείς διαπιστώσαμε από τη βιβλιογραφία. 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*.

Ο Ανδρεάδης (2005), έχοντας ήδη πραγματοποιήσει δοκιμές με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας του εκχυλίσματος πρωτεϊνών κατέληξε σε ένα συνδυασμό πρωτοκόλλων με βασικά χαρακτηριστικά την εκχύλιση κατά Garcia και κατακρήμνιση πρωτεϊνών με TCA/ακετόνη. Το πρωτόκολλο αυτό εφαρμόστηκε σε πλάγιους και επάκριους οφθαλμούς ελιάς καθώς και σε όργανα των βλαστών ήτοι: ώριμα φύλλα, νεαρά φύλλα και ξύλο ως βάση αναφοράς.

Τέλος, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι, οι τρεις προαναφερθείσες εργασίες συνέβαλαν στη βελτίωση πρωτοκόλλων και αποτέλεσαν τον “κορμό” κατά κάποιο τρόπο, για το στήσιμο τόσο των τεχνικών στο δικό μας πειραματικό υλικό όσο και για τη γενικότερη προσέγγιση του θέματος της παρούσας εργασίας.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. Φυτικό Υλικό**

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

Το Πείραμα πραγματοποιήθηκε στον Ελαιώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στο Βοτανικό. Για την συλλογή οφθαλμών χρησιμοποιήθηκαν τρία δέντρα (Α, Β και Γ). Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν σε 15ήμερη βάση τις πρωινές ώρες (08.00 έως 10:00 π.μ. περίπου) από τις αρχές Νοεμβρίου μέχρι την έκπτυξη των οφθαλμών, τέλος Μάρτη.

Στα αποτελέσματα μας παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το δέντρο Α.

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 λειοτριβήση των δειγμάτων γίνονταν με τη βοήθεια υγρού αζώτου σε προψυγμένα γουδί και γουδοχέρι. Οι λειοτριβημένοι ιστοί διατηρούταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι και τη χρήση τους.

## 2.2. Εκχύλιση ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών

Η εκχύλιση των πρωτεϊνών από τους οφθαλμούς της ελιάς πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των Garcia et al. (2000), 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-μερκαπτοαιθανόλη σε ακετόνη και επώαση στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 60 min ή overnight.
5. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνταν 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 ddH<sub>2</sub>O (σε κάθε ξέπλυμα απορρίπτονταν η ανώτερη φάση, αναμιγνύονταν οι άλλες δύο και φυγοκεντρούνταν 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)



### **2.2.1. 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-μερκαπτοαιθανόλη, 1% PVP διαλυτή, 1% PVP αδιάλυτη, 10 mM PMSF).

Ζυγίζουμε 1 g PVP διαλυτή και τη διαλύουμε σε 70 ml ddH<sub>2</sub>O. Προσθέτουμε 1,0064 g βορικό νάτριο, 0,8806 g ασκορβικό οξύ και γινόταν ρύθμιση του pH στο 9 με 5,8 % NH<sub>4</sub>OH. Προσθέτουμε 1 ml β-μερκαπτοαιθανόλη και συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 100 ml. Το διάλυμα συντηρούταν στους 4 °C. Πριν τη χρήση του προσθέτουμε 1 g PVP αδιάλυτη και 10 mM PMSF.

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

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

3) Διάλυμα 10% TCA-0,07% β-μερκαπτοαιθανόλη σε ακετόνη.

Ζυγίζουμε 10 gr TCA και τα διαλύουμε σε 100 ml ακετόνη. Στη συνέχεια προσθέτουμε 70 μl β-μερκαπτοαιθανόλη.

4) Υδατικό διάλυμα 10 % TCA.

Ζυγίζουμε 10 gr TCA και τα διαλύουμε σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O.

5) Διάλυμα ακετόνης-0,07% β-μερκαπτοαιθανόλη.

Σε 100 ml ακετόνης προσθέτουμε 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, 1977).

### 2.3.1. Διαλύματα για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

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.

#### i. Μητρικό διάλυμα BSA

Ζυγίζαμε x ποσότητα (μεταξύ 10 και 20 mg) BSA και τη διαλύαμε σε x ml διπλά αποσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O). Το διάλυμα αυτό διατηρούνταν στους -20 °C.

#### ii. Διάλυμα A

Διαλύαμε 600 μl μητρικού διαλύματος BSA με ddH<sub>2</sub>O σε ένα τελικό όγκο 6000 μl, οπότε και προέκυπτε μία αραιώση 1/10. Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι 10 μg BSA/100 μl ddH<sub>2</sub>O.

#### iii. Διάλυμα B (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM, pH 7,0)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 M : Ζυγίζαμε 17,418 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και τα διαλύαμε σε τελικό όγκο 100 ml με ddH<sub>2</sub>O

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M : Ζυγίζαμε 13,609 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και τα διαλύαμε σε τελικό όγκο 100 ml με ddH<sub>2</sub>O

Το πυκνό φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (1 M) προέκυπτε με ανάμιξη 61,2 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M και 38,8 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M. Γινόταν ρύθμιση του pH στο 7,0 .

Για την παρασκευή 50 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος διαλύαμε 50 ml πυκνού φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (1 M) σε τελικό όγκο 1000 ml με ddH<sub>2</sub>O.

#### iv. 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 ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 1 L και διηθούσαμε. Φτιάχναμε την παρακάτω σειρά διαλυμάτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml. Πραγματοποιούνταν τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση.

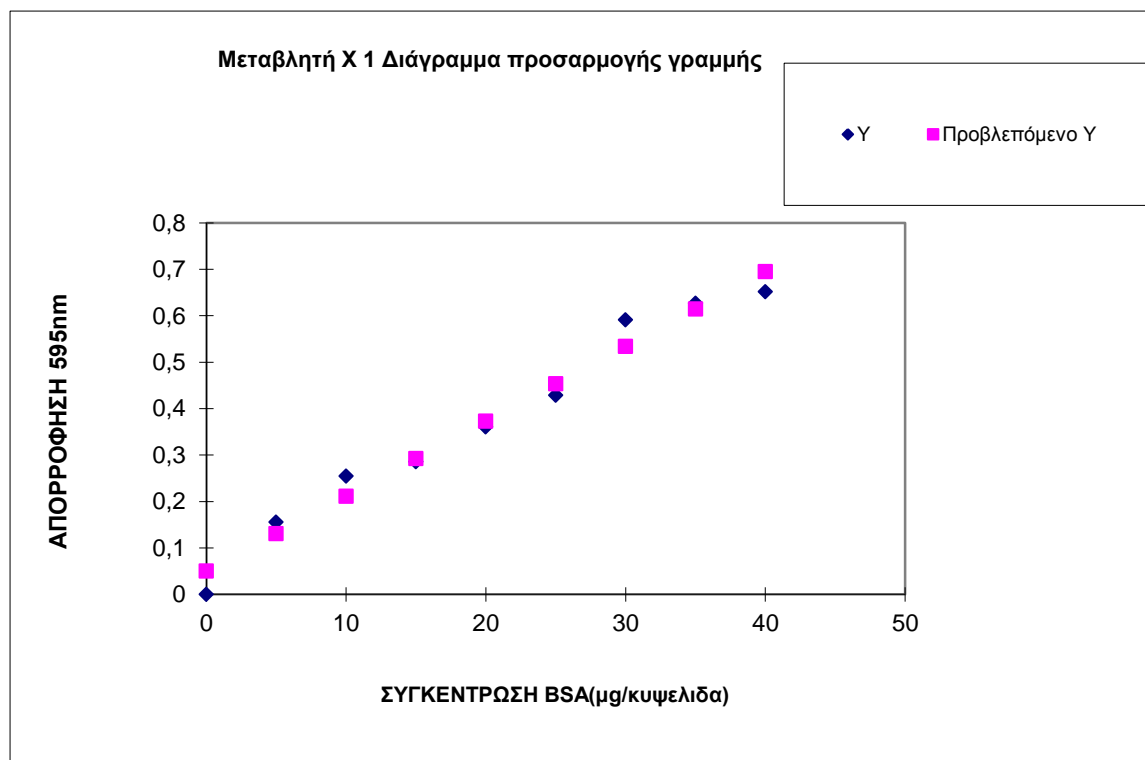
**Πίνακας 2.1:** Σειρά std διαλυμάτων (BSA) για την καμπύλη αναφοράς στη φωτομέτρηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

tube	Διάλυμα A (μl)	Συγκ/ση BSA στην κυψελίδα	Διάλυμα B (μl)	Όγκος A+B (μl)	Αντιδραστήριο Bradford (μl)	Τελικός όγκος στην 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	»	»	»

Γινόταν μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm μετά την πάροδο 5 min από την προσθήκη του αντιδραστήριου Bradford και κατασκευάζονταν η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Με ανάλογο τρόπο γινόταν και η μέτρηση των δειγμάτων, η απορρόφηση των οποίων ανάγονταν τελικά σε συγκέντρωση με τη βοήθεια της καμπύλης.

**Πίνακας 2.2:** Μετρήσεις των απορροφήσεων στα 595 nm.

Συγκ/ση BSA στην κυψελίδα	Επανάληψη I	Επανάληψη II	Επανάληψη III	Μέσος όρος Απορροφήσεων
0	0	0	0	0
5	0,135	0,177	0,155	0,15566667
10	0,324	0,248	0,192	0,255
15	0,337	0,246	0,273	0,285
20	0,349	0,365	0,367	0,36033333
25	0,432	0,433	0,421	0,42866667
30	0,606	0,588	0,579	0,591
35	0,556	0,631	0,693	0,62666667
40	0,668	0,668	0,619	0,65166667



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

Διάγραμμα 2.1. : Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών.

Η καμπύλη αναφοράς επαναλαμβάνονταν για κάθε καινούρια παρτίδα μετρήσεων που γινόταν σε διαφορετική χρονική στιγμή.

Η συγκέντρωση ανάγονταν σε  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης /  $\text{g}$  NB ιστού.

## **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 πήγμα το οποίο 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 ήταν η αποδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων, προσδίδοντας σε αυτά την ίδια πυκνότητα φορτίου, έτσι ώστε η κινητικότητα τους στα πήγματα, 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**

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στη παρούσα εργασία, στηρίχτηκε στο προτεινόμενο από τη Hoefler (1994). Η διαστάσεις της πηκτής ήταν 1,5 x 140 x 160 mm.

Η πορεία για την παρασκευή της πηκτής έχει ως εξής:

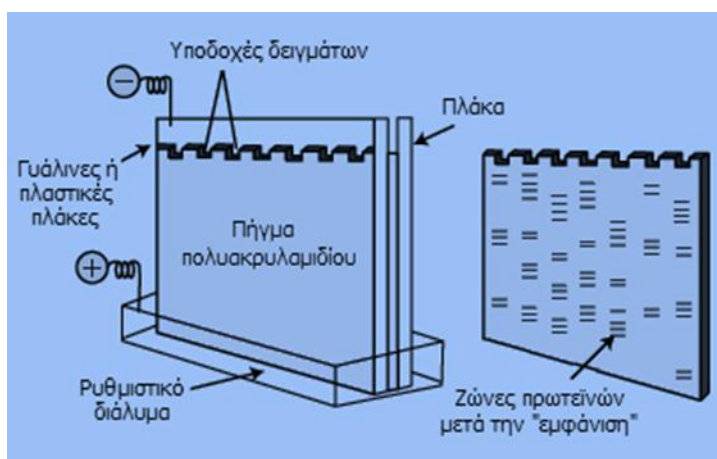
#### Πηκτή διαχωρισμού (12,5 % T)

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 ddH<sub>2</sub>O 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 1½ 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 ddH<sub>2</sub>O 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 ddH<sub>2</sub>O και μία φορά με διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης.
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).

#### 2.4.2. Διαλύματα για την παρασκευή πηκτής.

Τα διαλύματα για την παρασκευή της πηκτής είναι τα εξής:

- i. Διάλυμα ακρυλαμιδίου/N',N-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο (30,8 % T-2,7 % C<sub>Bis</sub> )  
Ζυγίζουμε 60 g ακρυλαμιδίου και τα διαλύουμε σε 150 ml ddH<sub>2</sub>O. Κατόπιν προσθέτουμε 1,6 g N',N-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο και συμπληρώνουμε σε τελικό όγκο 200 ml με ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διηθούνταν και συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο στους 4°C.
- ii. Διάλυμα 10 % w/v υπερθειϊκού αμμωνίου (APS )  
Ζυγίζουμε 100 mg υπερθειϊκού αμμωνίου και τα διαλύουμε σε τελικό όγκο 1 ml με ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα παρασκευαζόταν κάθε φορά πριν από τη χρήση του.
- iii. Διάλυμα 10 % w/v SDS  
Ζυγίζουμε 10 g SDS και τα διαλύουμε σε τελικό όγκο 100 ml με ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διηθούνταν και συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου.

- iv. Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)  
Ζυγίζαμε 36,3 g Tris και τα διαλύσαμε σε 150 ml ddH<sub>2</sub>O. Ρυθμίζαμε το pH στο 8,8 με πυκνό HCl και συμπληρώναμε σε τελικό όγκο 200 ml με ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διηθούνταν και συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο στους 4°C.
- v. Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοιβαξής (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)  
Ζυγίζαμε 12 g Tris και τα διαλύσαμε σε 150 ml ddH<sub>2</sub>O. Ρυθμίζαμε το pH στο 6,8 με πυκνό HCl και συμπληρώναμε σε τελικό όγκο 200 ml με ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διηθούνταν και συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο στους 4°C.
- vi. 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 διαλύσαμε σε 0,5 L ddH<sub>2</sub>O. 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.
- vii. Διάλυμα βουτανόλης κορεσμένη με νερό  
Αναμιγνύαμε 50 ml βουτανόλης με 5 ml ddH<sub>2</sub>O. Χρησιμοποιούταν η ανώτερη φάση για την οριζοντίωση της πηκτής διαχωρισμού.
- viii. 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 ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο στους 4°C.



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

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (8M ουρία, 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 10% γλυκερόλη).

Ζυγίζαμε 48 g ουρία και τα διαλύαμε σε 40 ml ddH<sub>2</sub>O. Προσθέταμε 6,25 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8, 2 g SDS, 5 ml β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 ml γλυκερόλη και συμπληρώναμε με ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 100 ml. Το διάλυμα συντηρούταν στους -20 °C σε ποσότητες των 2 ml.

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 δύο ηλεκτροφορήσεις για κάθε δείγμα.

### 2.4.4. Μέθοδοι χρώσης πηκτής

#### 2.4.4.1. 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 χρώσης της πηκτής
  - i. Με τη λήξη του προγράμματος ηλεκτροφόρησης μεταφέραμε άμεσα την πηκτή σε επαρκή ποσότητα διαλύματος προσήλωσης όπου και επωάζονταν για 20 min.
  - ii. Ακολούθως, ξεπλέναμε με απιονισμένο νερό και την μεταφέραμε στο διάλυμα της χρωστικής για μία περίπου ώρα.

- iii. Ο αποχρωματισμός της πηκτής γινόταν με τακτή ανανέωση του διαλύματος αποχρωματισμού, μέχρις του επιθυμητού οπτικού αποτελέσματος.

#### Διαλύματα χρώσης της πηκτής

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

- i. 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.

- ii. 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).

- iii. 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.

#### 2.4.4.2. Χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο

Η χρώση με νιτρικό άργυρο ( $\text{AgNO}_3$ ) 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
  - i. Με τη λήξη του προγράμματος ηλεκτροφόρησης μεταφέραμε τη πηκτή σε επαρκή ποσότητα διαλύματος προσήλωσης για 20 min.
  - ii. Ξεπλέναμε με το διάλυμα πλύσης για 10 min και ακολουθούσε επώαση σε απιονισμένο νερό overnight.
  - iii. Στη συνέχεια τοποθετούσαμε την πηκτή στο διάλυμα εξισορρόπησης για 1 min (ακριβώς) και αφού ξεπλέναμε δύο φορές για 1 min (ακριβώς) με απιονισμένο νερό γινόταν επώαση στο διάλυμα χρώσης για 20 min.
  - iv. Ακολουθούσε δύο φορές ξέπλυμα για 1 min (ακριβώς) με απιονισμένο νερό και επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης μέχρις ότου εμφανίζονταν οι πρωτεϊνικές ζώνες.
  - v. Η διακοπή της αντίδρασης γινόταν με το διάλυμα οξικού οξέος, για 10 min.
  - vi. Τέλος, η πηκτή τοποθετούνταν στο διάλυμα αποθήκευσης.

- Διαλύματα χρώσης της πηκτής με νιτρικό άργυρο
  - i. Διάλυμα προσήλωσης : 50% v/v μεθανόλη, 5% v/v οξικό οξύ σε απιονισμένο νερό.
  - ii. Διάλυμα πλύσης : 50% v/v μεθανόλη σε απιονισμένο νερό.
  - iii. Διάλυμα εξισορρόπησης : Διαλύαμε 0,2 gr  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2$  σε 1 l απιονισμένο νερό.
  - iv. Διάλυμα χρωστικής : Διαλύαμε 1g  $\text{AgNO}_3$  σε 1 l απιονισμένο νερό.
  - v. Διάλυμα ανάπτυξης : Σε τελικό όγκο 1 l απιονισμένο νερό διαλύαμε 20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και προσθέταμε 400 ml φορμαλδεύδη (0,04% v/v).
  - vi. Διάλυμα διακοπής αντίδρασης : 5% v/v οξικό οξύ.
  - vii. Διάλυμα αποθήκευσης : 1% v/v οξικό οξύ.

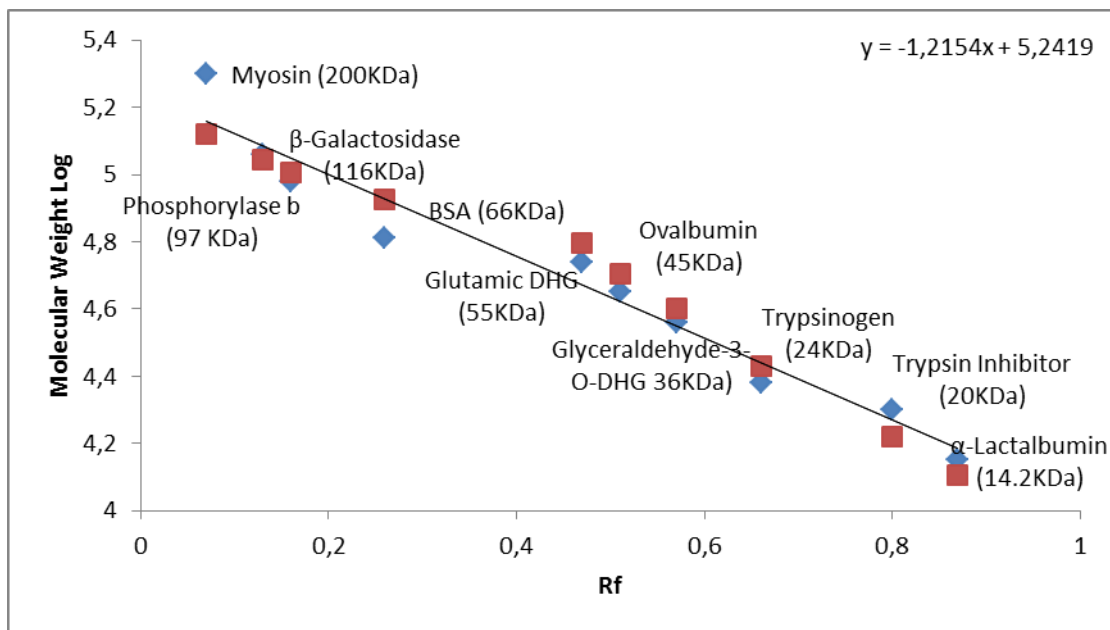
#### **2.4.5. Υπολογισμός μοριακού μεγέθους πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου**

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.

## 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<sup>η</sup> διάσταση (IEF) πραγματοποιείται σε ειδική πηκτή σε μορφή αφυδατωμένης λωρίδας (IPGstrip, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) ενώ η 2<sup>η</sup> 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).

- i. Διάλυμα ενυδάτωσης των IPGstrip (9,5 M ουρία, 2% CHAPS, 2% IPG buffer, 20 mM διθειοθρεϊτόλη)

Ζυγίζαμε 14,25 g ουρίας και τα διαλύαμε σε 15 ml ddH<sub>2</sub>O. 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 ddH<sub>2</sub>O 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.

- ii. Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (0,5 M Tris-HCl, pH 8,8)

Ζυγίζαμε 12 g Tris και τα διαλύαμε σε 150 ml ddH<sub>2</sub>O. Ρυθμίζαμε το pH στο 8,8 με πυκνό HCl και συμπληρώναμε σε τελικό όγκο 200 ml με ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διηθούνταν και συντηρούταν σε αδιαφανές δοχείο στους 4°C.

iii. Μητρικό διάλυμα εξισορρόπησης των IPGstrip (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 ddH<sub>2</sub>O 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.

iv. Διάλυμα ακινητοποίησης των IPGstrip στη 2η 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 ddH<sub>2</sub>O. Προσθέταμε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής επιστοιβάξης, 400 μl 10 % SDS και συμπληρώναμε με ddH<sub>2</sub>O 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<sup>η</sup> ημέρα : Ενυδάτωση των Immobiline DryStrip

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

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

- 2) Αφαιρούσαμε με προσοχή από τα IPGstrips 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 IPGstrip και διαλύματος ενυδάτωσης.
- 3) Καλύπταμε κάθε IPGstrip με 2-3 ml DryStrip 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<sup>η</sup> ημέρα : 1<sup>η</sup> διάσταση – Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)

Η ισοηλεκτρική εστίαση πραγματοποιούνταν σε οριζόντια ψυχόμενη συσκευή ηλεκτροφόρησης τύπου Multiphor II (Amersham Biosciences, 2004).

##### 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 DryStrip Cover Fluid και τοποθετούσαμε με προσοχή τον ειδικό δίσκο (Immobiline

DryStrip 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 IPGstrip.
- 5) Κόβαμε δύο IEF Electrode Strips μήκους 13 cm το καθένα, ανεξάρτητα από τον αριθμό των IPGstrip που θα χρησιμοποιούσαμε. Τα τοποθετούσαμε σε επίπεδη, καθαρή επιφάνεια και τα διαβρέχαμε με 0,5 ml ddH<sub>2</sub>O. 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 ddH<sub>2</sub>O.

#### Τοποθέτηση των Immobiline DryStrip

- 1) Αφού απομακρύναμε από τα ενυδατωμένα πλέον strip την οποιαδήποτε περίσσεια διαλύματος ενυδάτωσης με διηθητικό χαρτί βρεγμένο με ddH<sub>2</sub>O 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 DryStrip Cover Fluid μέσα στο δίσκο ώστε να καλυφθούν πλήρως τα IPGstrip.
- 4) Θέταμε τις κατάλληλες παραμέτρους ρεύματος για την έναρξη της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης. Για IPGstrip μήκους 13 cm και εύρους pH 4-7 η συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν:



	V	mA	W	h	Vh
Φάση 1	300	1	5	0.1	1
Φάση 2	300	1	5	6	1800
Φάση 3	3500	1	5	5	17500
Φάση 4	3500	1	5	5.5	19200

### 3<sup>η</sup> ημέρα : 2<sup>η</sup> διάσταση – SDS PAGE

#### Εξισορρόπηση των IPGstrip

- 1) Αφού ολοκληρωνόταν το πρόγραμμα της ισοηλεκτρικής εστίασης παραλαμβάναμε τα IPGstrip για τη διαδικασία εξισορρόπησης η οποία πραγματοποιούταν 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 IPGstrip δεν επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν αμέσως για τη 2<sup>η</sup> διάσταση συντηρούνταν στους -80 °C, πριν την διαδικασία εξισορρόπησης.**

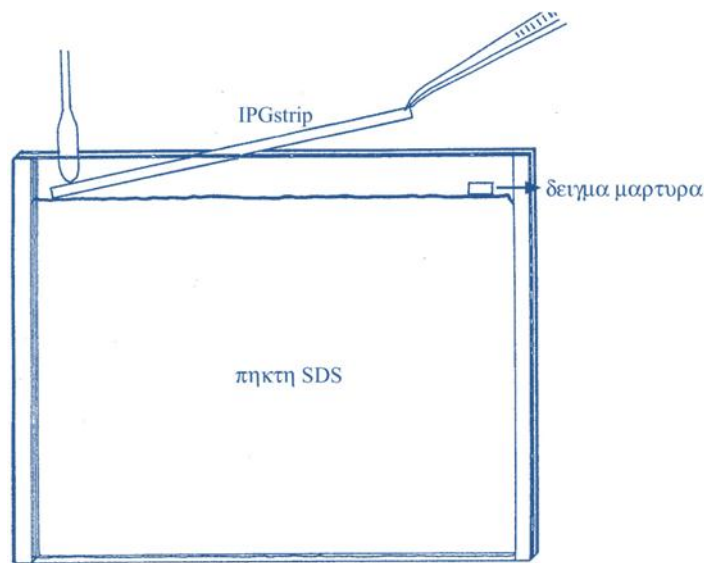
- 2) Μετά και την δεύτερη εξισορρόπηση μεταφέραμε τα strips πάνω σε βρεγμένο με ddH<sub>2</sub>O διηθητικό χαρτί για 10 min για την απομάκρυνση περίσσειας διαλυμάτων εξισορρόπησης.

#### *Κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης*

Η πηκτή SDS που χρησιμοποιήθηκε για τη 2<sup>η</sup> 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, η περιοχή διαχωρισμού έφθανε μέχρι ενός επιπέδου 0,5 cm περίπου κάτω από την κορυφή των γυάλινων πλακιδίων και το πάχος των gel ήταν 0,8 mm και όχι 1,5 mm.

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

- 1) Με τη βοήθεια μιας τσιμπίδας τοποθετούσαμε την μία άκρη του IPGstrip 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.
- 2) Το δείγμα μαρτύρων τοποθετούνταν με sample piece στο περιθώριο μεταξύ IPGstrip και spacer.



**Εικόνα 2.2 :** Τοποθέτηση του IPGstrip στη πηκτή 2<sup>ης</sup> διάστασης σε κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

- 3) Ακινητοποιούσαμε-ασφαλίσαμε το IPGstrip με διάλυμα 0,5 % αγαρόζης μέχρι ενός ύψους 2 mm πάνω από το strip.
- 4) Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν σε σταθερή ένταση 20 mA, για 1½-2 h περίπου.

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 IPGstrip.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Ανάλυση των πρωτεϊνών των πλάγιων οφθαλμών της ποικιλίας

Καλαμών την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου.

##### 3.1.1. Μακροσκοπική εικόνα της εξέλιξης των πλάγιων οφθαλμών

(εικόνες και περιγραφή τους).

Αναφέρθηκε ήδη στο φυτικό υλικό ότι χρησιμοποιήθηκαν τρία δέντρα.

Αναλυτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από το δέντρο Α.

Στις φωτογραφίες που παρατίθενται περιγράφεται αντίστοιχα η πορεία της ανάπτυξης των πλάγιων οφθαλμών.



14-11



1-12



15-12



3-01



17-01



31-01



14-02



28-02



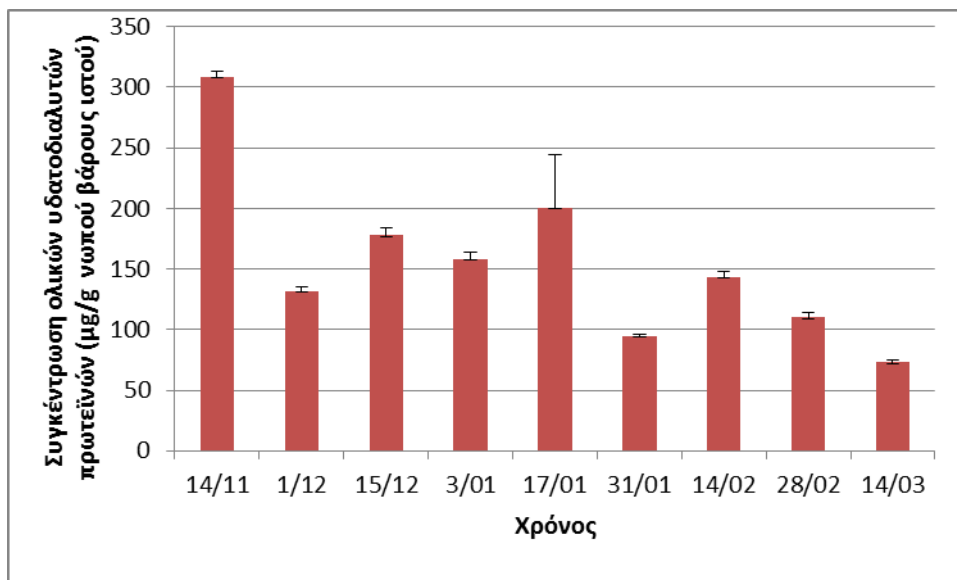
14-03

*Εικόνα 3.1:* Η εικόνα της μορφολογικής εξέλιξης των πλάγιων οφθαλμών της ελιάς από τα μέσα Νοεμβρίου έως και μέσα Μαρτίου.

Στην (Εικόνα 3.1) παρατηρούμε τις διαφορές στη μορφολογική εικόνα της εξέλιξης των πλάγιων οφθαλμών του δέντρου που μελετήσαμε. Ειδικότερα, από τα μέσα Νοεμβρίου έως και αρχές Δεκεμβρίου, η μακροσκοπική εικόνα των οφθαλμών παρέμεινε η ίδια αναφορικά με το μέγεθος αυτών. Οι πρώτες ενδείξεις έκπτυξης άρχισαν να διαφαίνονται στο μεσοδιάστημα των δειγματοληψιών της 15<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου και 14<sup>ης</sup> Φεβρουαρίου. Στις 14 Φεβρουαρίου η έκπτυξη των οφθαλμών ήταν σαφής και μακροσκοπικά. Ο μίσχος είχε επιμηκυνθεί. Στις 14 Μαρτίου ο μίσχος των οφθαλμών είχε διπλάσιο σχεδόν μήκος ενώ ήταν διακριτά πολλά μεριστώματα (καταβολές) σε συμπαγή μορφή.

### 3.1.2. Η πορεία της στάθμης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών

Η πορεία της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στους πλάγιους οφθαλμούς της ελιάς στο δέντρο Α για την περίοδο Νοεμβρίου – Μαρτίου (όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford) παρουσιάζεται στο διάγραμμα 3.1.

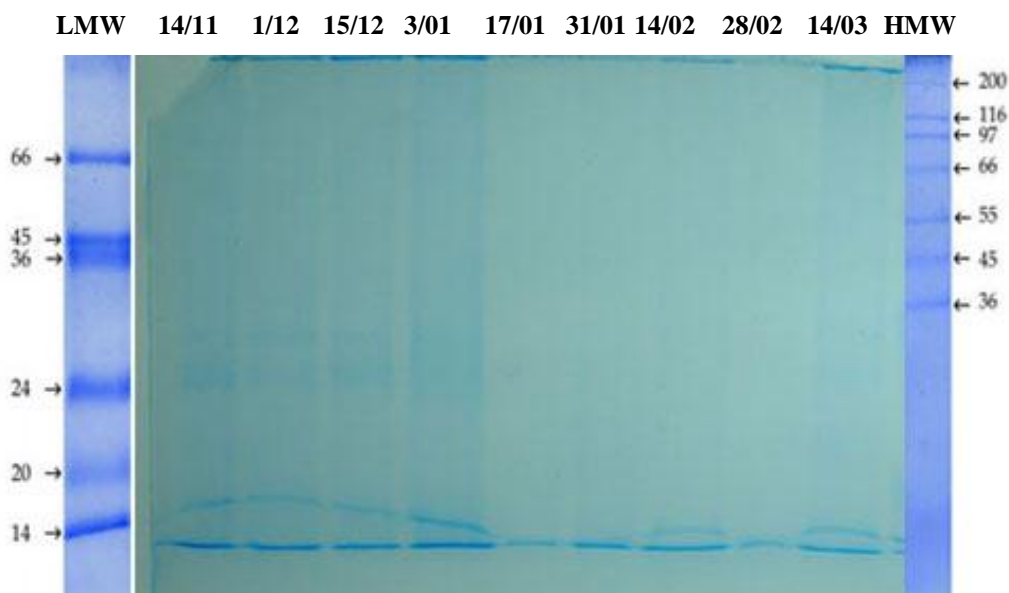


Διάγραμμα 3.1 : Η πορεία της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών την περίοδο από μέσα Νοεμβρίου έως μέσα Μαρτίου.

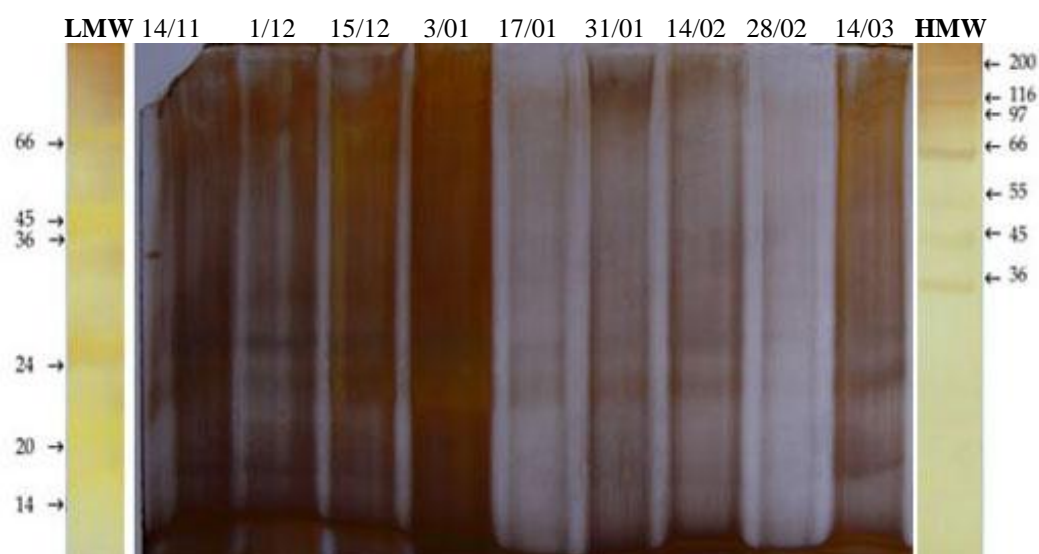
Η στάθμη των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών για το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου-Μαρτίου κυμάνθηκε μεταξύ 72,90  $\mu\text{g/g}$  νωπού βάρους (στις 14/3) και 308,57  $\mu\text{g/g}$  νωπού βάρους (στις 14/11). Η γενική εικόνα της καμπύλης παρουσιάζει τρεις περιοχές με ελάχιστα μεταξύ των 1/12, 31/01 και 14/03. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών διατηρείται σε σταθερά σχετικά επίπεδα από 1/12 έως 3/1 ( $\approx 150 \mu\text{g/g}$  νωπού βάρους ιστού). Η ανάλυση της παράλλαξης έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφόρων ημερομηνιών δειγματοληψιών.

### 3.1.3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης σε πηκτή SDS-PAGE

Στην εικόνα 3.2 και 3.3 παρουσιάζεται η πηκτή SDS-PAGE των πλάγιων οφθαλμών της ελιάς στο δέντρο Α, με τα αντίστοιχα μοριακά βάρη των μαρτύρων δεξιά και αριστερά της εικόνας 3.2 και 3.3. Πραγματοποιήθηκε χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250 καθώς και χρώση με νιτρικό άργυρο.



**Εικόνα 3.2:** SDS-PAGE στους πλάγιους οφθαλμούς της ποικιλίας Καλαμών (Δέντρο Α) την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου. Χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250 (LMW: χαμηλού MB μάρτυρας, HMW: υψηλού MB μάρτυρας).



**Εικόνα 3.3:** SDS-PAGE στους πλάγιους οφθαλμούς της ποικιλίας Καλαμών (Δέντρο Α) την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου. Χρώση της πηκτής με Νιτρικό Άργυρο. (LMW: χαμηλού MB μάρτυρας, HMW: υψηλού MB μάρτυρας).

Ο αριθμός των εμφανών πρωτεϊνικών ζωνών που αποκαλύφθηκε με τη μέθοδο SDS-PAGE κυμάνθηκε από 5 έως 9 για το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου-Μαρτίου (**Πίνακας 3. 1**).

Το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν κυμάνθηκε από 12 έως 120 KDa περίπου. Οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες (9) αποκαλύφθηκαν από αρχές Νοεμβρίου. Σε όλες τις ημερομηνίες οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες είχαν χαμηλά μοριακά βάρη από 50 έως 12 kDa περίπου. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες ζώνες ήταν αυτές των 35 kDa και 24 kDa (9 και 8 φορές αντίστοιχα για το καθένα). Στα μεγάλα μοριακά βάρη αποκαλύφθηκαν δυο πρωτεϊνικές ζώνες με μεγέθη από 100 kDa έως 120 kDa περίπου. Στα χαμηλά μοριακά βάρη, εντοπίστηκαν τρεις πρωτεϊνικές ζώνες των 35, 24 και 17 kDa εντοπίστηκαν σε όλες σχεδόν τις ημερομηνίες.

Μια σημαντική διαφορά στην διάταξη των πρωτεϊνικών ζωνών, παρατηρήθηκε την 1<sup>η</sup> Δεκεμβρίου και την 31<sup>η</sup> Ιανουαρίου. Οπότε και διακρίναμε πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους 120 kDa περίπου, που δεν απαντώνται στις υπόλοιπες ημερομηνίες.

Καθ' όλες τις ημερομηνίες παρουσιάστηκαν επίσης, όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.1, ευδιάκριτες πρωτεϊνικές ζώνες από 66 kDa έως 12 kDa. Ακόμη μια ζώνη των 80 kDa περίπου εμφανίστηκε μόνο στις 1/12 και 14/3. Μια αρκετά ευδιάκριτη ζώνη με μοριακό βάρος 64 kDa περίπου εμφανίστηκε τις ημερομηνίες 14/11, 31/1, και 14/02. Μια πρωτεϊνική ζώνη 58 kDa εμφανίστηκε μόνο κατά το μήνα Νοέμβριο και μια πρωτεϊνική ζώνη των 40 kDa εμφανίζεται μόνο στις 28/02. Τέλος εμφανίστηκε μια ομάδα 3 πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους 17, 16, και 12 kDa. Η πρωτεϊνική ζώνη των 17 kDa εμφανίζεται σε όλες τις ημερομηνίες εκτός από 17/01 έως 14/02. Η ζώνη των 16 kDa εμφανίζεται από 17 Ιανουαρίου έως και 28 Φεβρουαρίου. Η ζώνη των 12 kDa εμφανίζεται στις 14/11 και 15/12 και επανεμφανίζεται πάλι από 17/01 έως και 31/01.



Πίνακας 3.1: Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών ζωνών που απομονώθηκαν στους πλάγιους οφθαλμούς της ελιάς για το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου-Μαρτίου στο δέντρο Α. Με έντονη γραμματοσειρά σημειώνονται οι πιο έντονες πρωτεϊνικές ζώνες και με πράσινη σκίαση οι κοινές πρωτεϊνικές ζώνες

α/α	14/11	1/12	15/12	3/1	17/1	31/1	14/2	28/2	14/3	M.O. MW(KDa)
1		123408				120542				120
2	107429			100469						100
3		81794							<b>79426</b>	80
4	65427							66982		66
5	62790					64662	64662			64
6	58860									58
7	50225			49059	50225	54532	50225	50225	52953	50
8		<b>46259</b>	<b>46259</b>					<b>47082</b>		46
9								<b>40412</b>		40
10	35303	<b>35303</b>	35936	33881	33094	33094	34081	34081	36570	35
11	<b>29081</b>	<b>28405</b>		<b>29081</b>	<b>27746</b>	<b>28239</b>	<b>28239</b>	<b>27746</b>	<b>29252</b>	24
			23303	24381	24669	24669			20927	
12	17648	17314	17314	17648				18938	17648	17
13					16838	16838	16838	16838		16
14	13708		13708		13708	<b>12926</b>				12

### 3.1.4. Ανάλυση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δυο διαστάσεων (2-DE)

Η τελική μελέτη των οφθαλμών της ελιάς περιελάμβανε όπως προείπαμε ανάλυση με ηλεκτροφόρηση δύο-διαστάσεων. Η 2-DE πραγματοποιήθηκε σε IPGstrip pH 4-7, μήκους 13 cm όσον αφορά τη 1<sup>η</sup> διάσταση ενώ η 2<sup>η</sup> σε 12.5% πηκτή κατακόρυφης συσκευής.

Τα τελικά ηλεκτροφορήματα χρωματίστηκαν με νιτρικό άργυρο. Για τη 2-DE επιλέξαμε τρεις δειγματοληψίες για να καλύψουμε όλο το εύρος της δειγματοληψίας. Στις εικόνες 3.4, 3.5 και 3.6 παρουσιάζονται οι πηκτές ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων 2-DE στις οποίες σημειώνονται οι κηλίδες που διαπιστώθηκαν κατά την επεξεργασία με το Photoshop.

Διαπιστώθηκαν κηλίδες σε όλο το εύρος του pH (4-7). Η μεγαλύτερη κατανομή των κηλίδων για τις δυο ημερομηνίες των 14/11 και 31/01 εντοπίστηκαν προς την πιο όξινη περιοχή απ' ότι της ημερομηνίας 28/02. Η 2-DE ανάλυση με το Photoshop αποκάλυψε τις περισσότερες πρωτεϊνικές κηλίδες τον μήνα Νοέμβριο. Ως προς την δεύτερη διάσταση για τις 14/11 το σύνολο των πρωτεϊνών συγκεντρώνεται στην περιοχή 15 έως 128 kDa περίπου, για τις 31/1-14/2 από 12 έως 90 kDa και για τις 28/2-14/3 από 18 έως 93 kDa. Το εύρος των μοριακών βαρών, και στις δυο περιπτώσεις, μπορούμε να πούμε ότι ακολουθεί το αντίστοιχο της SDS-PAGE ανάλυσης.

Το σύνολο των πρωτεϊνικών κηλίδων που καταφέραμε να μετρήσουμε ήταν 50 κηλίδες στις 14/11, 41 κηλίδες για το διάστημα από 31/01-14/02 και 31 κηλίδες στις 28/2-14/3. (*Πίνακες 3.2, 3.3 και 3.4*).

**pH: 4**

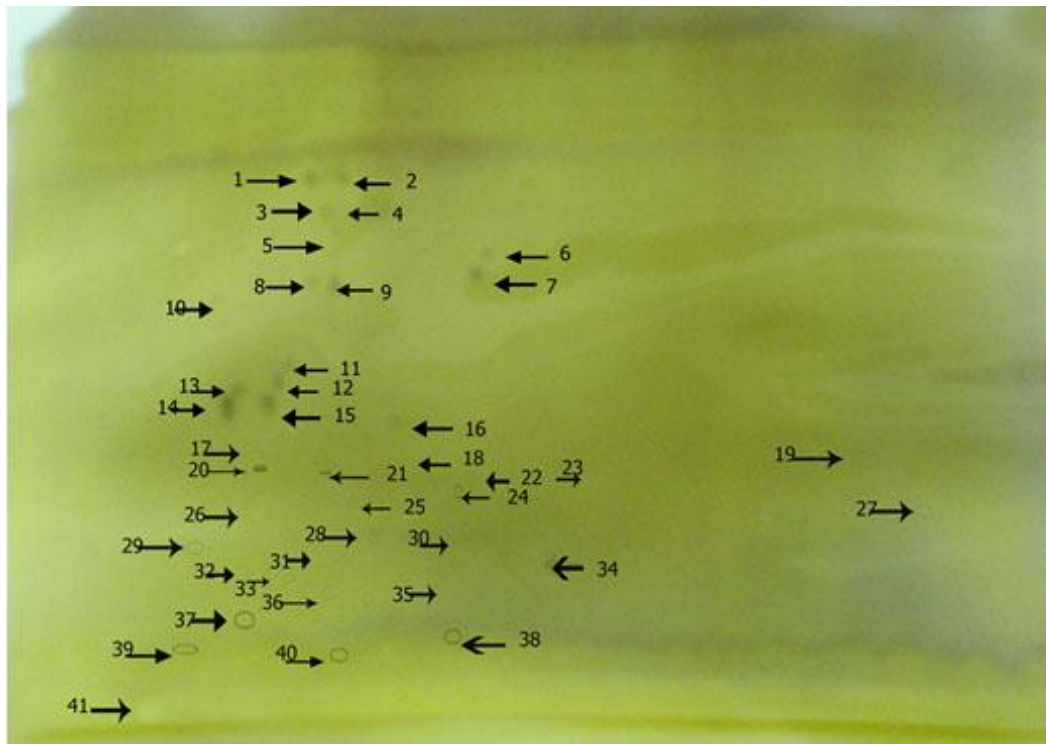
**pH: 7**



**Εικόνα 3.4:** 2-DE στους πλάγιους οφθαλμούς ελιάς ημερομηνίας 14 Νοεμβρίου. Στην 1<sup>η</sup> διάσταση χρησιμοποιήθηκε IPGstrip pH 4-7, 13cm. Η 2<sup>η</sup> διάσταση έγινε σε κατακόρυφο σύστημα. Η χρώση της πηκτής έγινε με Νιτρικό Άργυρο.

pH: 4

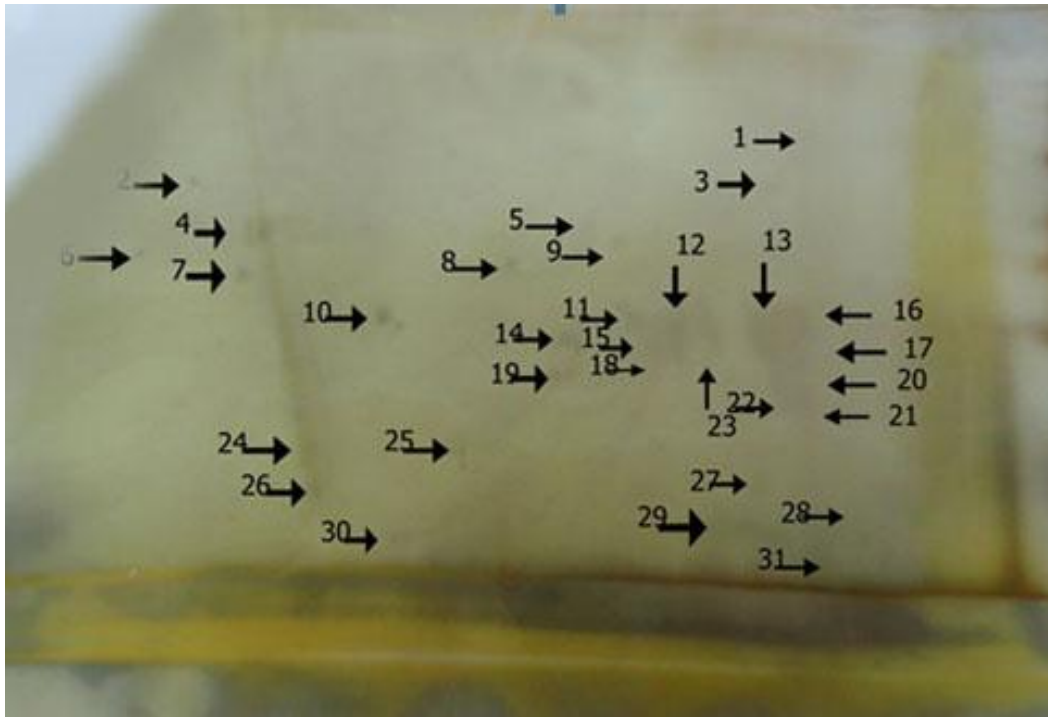
pH: 7



Εικόνα 3.5: 2-DE στους οφθαλμούς της ελιάς ημερομηνίας 31/1. Στην 1<sup>η</sup> διάσταση χρησιμοποιήθηκε IPGstrip pH 4-7, 13cm. Η 2<sup>η</sup> διάσταση έγινε σε κατακόρυφο σύστημα. Η χρώση της πηκτής έγινε με Νιτρικό Άργυρο

pH: 4

pH: 7



Εικόνα 3.6: 2-DE στους οφθαλμούς της ελιάς ημερομηνίας 28/2. Στην 1<sup>η</sup> διάσταση χρησιμοποιήθηκε IPGstrip pH 4-7, 13cm. Η 2<sup>η</sup> διάσταση έγινε σε κατακόρυφο σύστημα. Η χρώση της πηκτής έγινε με Νιτρικό Άργυρο

**Πίνακας 3.2:** Οι συντεταγμένες (MW/PI) των πρωτεϊνικών κηλίδων που παρατηρήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE) για την ημερομηνία 14 Νοεμβρίου στους πλάγιους οφθαλμούς. (Με έντονη γραμματοσειρά σημειώνονται οι πιο έντονες πρωτεϊνικές κηλίδες).

14/11			
α/κ	MW(kDa)/PI	α/κ	MW(kDa)/PI
1	128/4,85	26	<b>39/5,25</b>
2	<b>129/4,85</b>	27	<b>37/4,82</b>
3	<b>107/5,12</b>	28	32/4,82
4	<b>99/5,12</b>	29	32/6,45
5	<b>96/6,97</b>	30	15/6,88
6	87/6,97	31	26/5,55
7	78/4,99	32	25/5,55
8	78/5,51	33	<b>25/6,12</b>
9	68/4,51	34	<b>24/5,45</b>
10	68/5,45	35	23/6,12
11	<b>63/5,45</b>	36	<b>23/4,85</b>
12	<b>66/5,11</b>	37	24/4,99
13	63/4,85	38	24/4,85
14	57/4,85	39	<b>21/6,55</b>
15	<b>57/5,45</b>	40	21/6,95
16	<b>57/6,45</b>	41	<b>21/6,91</b>
17	<b>54/6,45</b>	42	21/6,99
18	51/4,98	43	<b>20/6,87</b>
19	47/4,3	44	20/6,93
20	46/4,85	45	<b>20/6,97</b>
21	<b>46/5,45</b>	46	<b>20/6,93</b>
22	<b>43/5,11</b>	47	<b>18/6,91</b>
23	<b>46/6,12</b>	48	<b>18/6,90</b>
24	<b>41/5,48</b>	49	<b>18/6,89</b>
25	<b>39/4,52</b>	50	<b>16/6,93</b>
Σύνολο κηλίδων			
50			

**Πίνακας 3.3:** Οι συντεταγμένες (MW/PI) των πρωτεϊνικών κηλίδων που παρατηρήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE) για την ημερομηνία 31/1 στους πλάγιους οφθαλμούς. (Με έντονη γραμματοσειρά σημειώνονται οι πιο έντονες πρωτεϊνικές κηλίδες).

31/1			
α/κ	MW(KDa)/PI	α/κ	MW(KDa)/PI
1	90/4,99	21	31/5,12
2	88/5,11	22	31/6,25
3	79/5,11	23	30/5,99
4	78/5,11	24	28/6,45
5	69/5,11	25	26/5,11
6	68/6,52	26	26/4,85
7	60/6,55	27	26/6,99
8	60/5,11	28	24/5,11
9	60/5,11	29	<b>23/4,65</b>
10	57/4,66	30	23/6,45
11	43/5,11	31	22/4,85
12	42/5,11	32	<b>20/4,85</b>
13	<b>42/4,66</b>	33	<b>20/5,11</b>
14	37/4,71	34	20/6,67
15	37/5,11	35	19/5,99
16	36/5,99	36	18/5,11
17	32/4,85	37	17/4,85
18	32/5,99	38	16/6,15
19	32/6,99	39	15/4,55
20	31/4,85	40	15/5,11
		41	12/4,45
Σύνολο κηλίδων 41			

**Πίνακας 3.4:** Οι συντεταγμένες (MW/PI) των πρωτεϊνικών κηλίδων που παρατηρήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE) για την ημερομηνία από 28/2 στους πλάγιους οφθαλμούς (Με έντονη γραμματοσειρά σημειώνονται οι πιο έντονες πρωτεϊνικές κηλίδες).

28/2			
α/κ	MW(KDa)/PI	α/κ	MW(KDa)/PI
1	94/5,45	17	<b>55/6,99</b>
2	91/4,11	18	51/5,45
3	92/5,35	19	49/5,09
4	<b>83/4,22</b>	20	<b>49/6,17</b>
5	83/5,22	21	<b>43/6,17</b>
6	78/4,03	22	<b>45/5,99</b>
7	<b>72/4,22</b>	23	<b>51/5,99</b>
8	72/4,71	24	39/4,55
9	78/5,25	25	39/4,66
10	<b>61/4,61</b>	26	34/4,57
11	61/5,33	27	34/5,98
12	<b>64/5,99</b>	28	32/6,18
13	<b>64/5,98</b>	29	29/5,99
14	57/5,11	30	22/4,61
15	56/5,45	31	18/6,36
16	<b>61/5,87</b>		
Σύνολο κηλίδων			
31			

Στην πηκτή ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων παρατηρήθηκαν κάποιες πρωτεϊνικές κηλίδες πιο έντονες από τις υπόλοιπες. Οι περισσότερες σε ένταση πρωτεϊνικές κηλίδες παρατηρήθηκαν στην πηκτή ημερομηνίας 14 Νοεμβρίου, δηλαδή κατά την διαφοροποίηση οφθαλμών. Οι πηκτές των ημερομηνιών αυτών είχαν πέντε (5) κοινές πρωτεϊνικές κηλίδες οι οποίες παρουσιάζονται έντονες κυρίως περίπου στα 78 , 57, 43, 32 και 18 kDa. Υπάρχουν βέβαια και πρωτεΐνες οι οποίες κινήθηκαν σε κοντινά επίπεδα (Πίνακας 3.5).

Επίσης συγκρίνοντας τις ημερομηνίες 31<sup>η</sup> Ιανουαρίου και 28<sup>η</sup> Φεβρουαρίου με την 14<sup>η</sup> Νοεμβρίου παρατηρήσαμε ότι στην τρίτη είχαμε ένα πλήθος πρωτεϊνικών κηλίδων μεγάλου μοριακού βάρους και με ευρύ ισοηλεκτρικό σημείο σε αντίθεση με την πρώτη και δεύτερη ημερομηνία όπου οι κηλίδες αυτές απουσίαζαν, φαινόμενο που παρατηρήσαμε και στις αντίστοιχες πηκτές της SDS-PAGE.



**Πίνακας 3.5:** Οι συντεταγμένες (MB/PI) των διαφορετικών πρωτεϊνικών κηλίδων που παρατηρήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE) στις τρεις ημερομηνίες: 14/11, 31/01 και 28/2 (με κόκκινο χρωματίζονται οι κοινές πρωτεϊνικές κηλίδες).

14/11 MW(kDa)/PI	31/01 MW(kDa)/PI	28/02 MW(kDa)/PI
129/4,85	90/4,99	94/5,45
128/4,85	88/5,11	92/5,35
107/5,12	79/5,11	91/4,11
99/5,12	78/5,11	83/4,22-5,22
96/6,97	69/5,11	78/5,25
87/6,99	68/6,52	72/4,22-4,71
78/4,99-5,51	60/5,11-6,55	64/5,98
68/4,61-5,45	57/4,66	61/4,61-5,33
66/5,11	43/5,11	57/5,11
63/4,85	42/4,66-5,11	56/5,45
57/4,85-6,45	37/4,71-5,11	55/6,99
54/6,45	36/5,99	51/5,45-6,11
51/4,98	32/4,85-6,99	49/5,09-6,17
47/4,3	31/4,85-6,25	45/5,99
46/4,85-6,99	30/5,99	43/6,87
43/5,11	28/6,45	39/4,55-4,66
41/6,45	26/5,11-6,99	34/4,57-6,23
39/4,45-5,25	24/5,11	32/6,17
37/4,82	23/4,65-6,45	29/5,99
32/4,82-6,45	22/4,85	22/4,61
26/5,55	20/4,85-6,99	18/6,36
25/5,55-6,12	19/5,99	
24/4,85-5,45	18/5,11	
23/4,85-6,12	17/4,85	
21/6,55-6,99	16/6,45	
20/6,87-6,97	15/4,55-5,11	
18/6,89-6,91	12/4,45	
16/6,15		

#### **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η ελιά είναι ένα από τα πιο σημαντικά αειθαλή δέντρα εξαιτίας της υψηλής αξίας του λαδιού και των επιτραπέζιων ελιών στη διατροφή του ανθρώπου. 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. Στα μεριστώματα της ελιάς που είναι ικανά να μετατραπούν σε αναπαραγωγικά βρίσκονται οι οφθαλμοί των μασχαλών των φύλλων της νέας βλάστησης. 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 γόννοι αυτοί προφανώς εκφράζονται σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

Στα πολυετή ενήλικα φυτά η αλλαγή φάσης εντοπίζεται στην περιοχή των ετήσιων βλαστών. 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 μάλιστα γνωστό και για την ελιά, ότι οι οφθαλμοί της όταν καθοριστούν σε ανθοφόρους (determined) δεν μπορεί να αλλάξουν φάση (Fabbri and Benelli., 2000).

Αν και αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει στη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων, ωστόσο λιγοστές είναι οι γνώσεις μας για το πρωτεϊνικό προφίλ κατά

την διάρκεια της διαφοροποίησης. Η συγκέντρωση των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών αναμενόμενο είναι να σχετίζεται με τις διαφοροποιητικές διαδικασίες (μίτωσης), αφού είναι γνωστό ότι ειδικές πρωτεΐνες, δομικές και ένζυμα, έχουν εξειδικευμένο ρόλο στον κυτταρικό κύκλο (Taiz and Zeiger, 2006).

Γενικά κατά το βλαστικό στάδιο είναι δυνατόν να εκφράζονται κάποιες πρωτεΐνες οι οποίες δεν εκφράζονται κατά την άνθηση.

Η ερμηνεία των δεδομένων μας θα στηριχθεί στην υπόθεση ότι την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου οι πλάγιοι οφθαλμοί είναι διαφοροποιημένοι σε ανθοφόρους.

Διαπιστώσαμε τρεις περιοχές συγκεντρώσεων των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών (μέσα Νοεμβρίου –αρχές Δεκεμβρίου, μέσα Δεκεμβρίου-τέλη Ιανουαρίου και αρχές Φεβρουαρίου-μέσα Μαρτίου). Η περιοχή μέσα Νοεμβρίου-αρχές Δεκεμβρίου παρουσιάζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών. Η κατάσταση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί σε μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα των πλάγιων οφθαλμών την περίοδο αυτή παρότι είναι περίοδος χαμηλών θερμοκρασιών. Θα περίμενε κανείς οι χαμηλές θερμοκρασίες να μην επιτρέπουν μεταβολική δραστηριότητα στους πλάγιους οφθαλμούς. Κατά τους Pinney και Polito (1990), Rallo και Martin (1991) ο χρόνος επαγωγής των πλάγιων οφθαλμών της ελιάς σε ανθοφόρους τοποθετείται περίπου πριν την επικράτηση των χαμηλών θερμοκρασιών του χειμώνα (Νοέμβριο).

Υπάρχουν πάρα πολλές αναφορές σχετικές με την καθοριστική σημασία των χαμηλών θερμοκρασιών στην προώθηση και ολοκλήρωση της διαφοροποίησης των οφθαλμών της ελιάς (Hackett και Hartmann 1963 1964;, Hackett και Hartmann 1967; , Porlingis 1972; , Minella και Deidda, 1968; και Porlingis και Therios 1979.). Οι θερμοκρασίες που επικρατούσαν κατά την διάρκεια των δειγματοληψιών, ήταν μέσα στα όρια που απαιτούνται για την διαφοροποίηση των οφθαλμών και πάντως όχι ακραίες. Επομένως, οι μεταβολές που πραγματοποιούνται στις συγκεντρώσεις των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών μάλλον οφείλονται σε ενδογενής παράγοντες.

Οι Kitsaki et al. (2010) που μελέτησαν σχολαστικά την ανατομία των υπό διαφοροποίηση οφθαλμών στην Κονσερβολιά κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μεριστωματική δραστηριότητα στους πλάγιους οφθαλμούς η οποία μάλιστα είναι κυματοειδούς μορφής. Η διαπίστωση αυτή είναι σύμφωνη με την

εικόνα που παρατηρήσαμε στις διακυμάνσεις των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών που προσδιορίσαμε με την Bearden στους πλάγιους οφθαλμούς.

Ωστόσο αυτό που είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ιδιαίτερα την περίοδο μέσα Νοεμβρίου-τέλη Φεβρουαρίου 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 Φεβρουαρίου σε σχέση με τα τέλη Νοεμβρίου υποδηλώνει ότι την περίοδο αυτή πραγματοποιούνται ιδιαίτερα σημαντικές διεργασίες στους πλάγιους οφθαλμούς.

Σε σύγκριση των αποτελεσμάτων μας, με τα αποτελέσματα του Τζανετάκη (2012), παρατηρήσαμε ότι η στάθμη των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στους πλάγιους οφθαλμούς είναι υψηλότερη συγκριτικά με τους επάκριους εκτός από αρχές Ιανουαρίου, όπου οι επάκριοι εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών. Οι πλάγιοι οφθαλμοί είναι τα πλέον συμπαγή όργανα και η εκατοστιαία αναλογία ξηράς μάζας είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τους επάκριους 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 πρωτεϊνικές ζώνες οι οποίες εμφανίζονται σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Αυτές οι πρωτεΐνες θα έπρεπε να σχετίζονται με τον βασικό μεταβολισμό των μεριστωματικών κυττάρων σε όλη τη διάρκεια της μελέτης μας. Παρόμοια εικόνα παρουσίασε και ο Τζανετάκης στους επάκριους οφθαλμούς.

Σύμφωνα με των Garcia et al. (2000) στα φύλλα της ελιάς παρουσιάζονται έντονα οι δυο υπομονάδες της rubisco στα 55 και στα 14 KDa αντίστοιχα. Στους επάκριους οφθαλμούς της ποικιλίας καλαμών δεν διαπιστώθηκαν αυτές οι δυο υπομονάδες. Αυτό υποδηλώνει ότι είναι μηδαμινή έως ανύπαρκτη η φωτοσυνθετική δραστηριότητα στους πλάγιους οφθαλμούς την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου.

Επιπλέον στην SDS-PAGE ανάλυση και για την περίοδο Νοεμβρίου παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός πρωτεϊνικών ζωνών συγκριτικά με το υπόλοιπο χρονικό διάστημα του πειράματος. Το τελευταίο αυτό στοιχείο ίσως

υποδηλώνει ότι την περίοδο αυτή στους πλάγιους κατ' αρχήν οφθαλμούς να συμβαίνουν γεγονότα τα οποία δεν συνέβαιναν προγενέστερα, η πραγματοποίηση των οποίων προϋποθέτει την παρουσία κάποιων ειδικών πρωτεϊνών.

Είναι γνωστό άλλωστε ότι οι διαφοροποιητικές διεργασίες και οι κυτταροδιαιρέσεις στα μεριστωματικά κύτταρα των ανθοφόρων οφθαλμών της ελιάς αρχίζουν αρκετά νωρίς το χειμώνα, πολύ πριν την έναρξη έκπτυξης των οφθαλμών (τέλη Μαρτίου) ( Ανδρεάδης, 2001, Kitsaki et al. 2010). Είναι πολύ πιθανόν λοιπόν οι νέες πρωτεΐνες που εμφανίζονται την περίοδο αυτή να σχετίζονται με ακόμη πιο πρόωρη μεριστωματική δραστηριότητα των κυττάρων των πλάγιων οφθαλμών. Τέτοιες πρωτεΐνες οι οποίες περιοδικά συσσωρεύονται και εξαφανίζονται σε διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου είναι οι κυκλίνες (Buchanan et al., 2000). Κατά τους Ekramoddoullah et al. (1996) επίσης παρατηρείται αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση και μεταβολική ένταση μετά από ανάλυση με SDS-PAGE και 2-DE στα φύλλα του γένους *Pinus*, ιδιαίτερα κατά τους χειμερινούς μήνες (Δεκέμβριο, Ιανουάριο και Φεβρουάριο) καθώς το δένδρο εισέρχεται στη ληθαργική περίοδο. Παρ' ότι η λειτουργία των περισσότερων από αυτών των πρωτεϊνών είναι άγνωστη, θεωρείται ότι πρόκειται για αποθησαυριστικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνες ) οι οποίες έχουν λειτουργίες παγοπροστασίας των ιστών κατά τη διάρκεια των χειμερινών χαμηλών θερμοκρασιών και αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες.

Υπάρχουν τρεις πρωτεϊνικές ζώνες οι οποίες εμφανίζονται σχεδόν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (50, 40, 20 kDa). Αυτές οι πρωτεΐνες θα πρέπει να σχετίζονται με τον βασικό μεταβολισμό στα κύτταρα των υπό διαφοροποίηση οφθαλμών. Οι λοιπές πρωτεϊνικές ζώνες, οι οποίες δεν εμφάνιζαν σταθερή παρουσία σε όλη τη διάρκεια του πειράματος πιθανά να είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με φάση του κυτταρικού κύκλου.

Ο αριθμός των πρωτεϊνικών κηλίδων που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο 2-DE είναι 50, 41 και 31 για τις ημερομηνίες 14/11, 31/01 και 28/02 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της 2-DE είναι παραπλήσια με εκείνα που αναφέρει ο Ανδρεάδης (2006), η Κατσίβα (2010) και ο Τζανετάκης (2012) για τους οφθαλμούς της ελιάς.

Σε σύγκριση των αποτελεσμάτων μας, με τα αποτελέσματα του Τζανετάκη (2012) για τους επάκριους οφθαλμούς, παρατηρήσαμε ότι οι πλάγιοι

οφθαλμοί παρουσίασαν ένα αριθμό κηλίδων μεγαλύτερο από τους επάκριους οφθαλμούς. Η κατάσταση υποδηλώνει ότι στους πλάγιους συμβαίνουν πιο πολύπλοκα γεγονότα απ' ότι στους επάκριους.

Διαπιστώθηκαν κηλίδες σε όλο το εύρος του PH (4-7). Η μεγαλύτερη κατανομή κηλίδων όμως για τις ημερομηνίες 14/11 και 31/01 εντοπίστηκε προς την πιο όξινη περιοχή από ότι της 28/02. Ανάλογη εικόνα παρουσιάζεται και από τους Wang et al. (2003) στην 2-DE ανάλυση στα φύλλα της ελιάς. Ωστόσο, και σε άλλα φυτικά είδη η πλειονότητα των πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται από όξινες σχετικά τιμές pIs (Carter et al.2004; Mechin et al. 2004).

Η διαφορετικότητα της έντασης των κηλίδων το πιθανότερο είναι απόρροια της αφθονίας 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).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πηκτή του Νοεμβρίου. Παρατηρήθηκε ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνικών κηλίδων που δεν εμφανίστηκε στις άλλες δύο ημερομηνίες. Η διαφορετική αυτή εικόνα αφορούσε κηλίδες με πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, δηλαδή 96 kDa/6,97 pI έως 128 kDa/4,85 pI. Το φαινόμενο αυτό είχε παρατηρηθεί και στη SDS-PAGE ανάλυση όπου έχει ήδη σχολιαστεί η παρουσία των διακριτών αυτών πρωτεϊνών.

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

## **5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

1. Η μακροσκοπική εικόνα των πλάγιων οφθαλμών αποκάλυψε έναρξη έκπτυξης των πλάγιων οφθαλμών μέσα Δεκεμβρίου με μέσα Φεβρουαρίου. Έντονη αύξηση της έκπτυξης παρατηρήθηκε στα μέσα Μαρτίου.
2. Διαπιστώθηκαν τρεις περιοχές συγκεντρώσεων των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών (μέσα Νοεμβρίου-αρχές Δεκεμβρίου, μέσα Δεκεμβρίου-τέλη Ιανουαρίου και αρχές Φεβρουαρίου-μέσα Μαρτίου). Η περίοδος μέσα Νοεμβρίου-μέσα Δεκεμβρίου παρουσιάζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών.
3. Η μέγιστη συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών σημειώθηκε τον μήνα Νοέμβριο.
4. Παρατηρήθηκαν πρωτεΐνες με μεγάλα και μικρότερα μοριακά βάρη. Το μεγαλύτερο μοριακό βάρος ήταν περίπου 128 kDa και το μικρότερο 12 kDa.
5. Η πλειονότητα των πρωτεϊνών είχε χαμηλά μοριακά βάρη .
6. Οι πιο ισχυρά εκφραζόμενες πρωτεΐνες είναι εκείνες που εμφανίζονταν με τη μεγαλύτερη συχνότητα (50, 40, 30 και 20 kDa).
7. Με την 2-DE ανάλυση προσδιορίστηκαν 50, 41 και 31 πρωτεϊνικές κηλίδες, στις 14 /11, 31/01 και 28/02.
8. Ως προς τα μοριακά βάρη, το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών συγκεντρώθηκε στις τιμές από 12 έως 129 kDa.
9. Σε όλες τις περιπτώσεις το σύνολο σχεδόν των πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται από τιμές pIs, που κυμαίνονται από 4 έως 7. Η κατανομή των κηλίδων εντοπίστηκε σε πιο όξινη ζώνη στις 28/02.
10. Διαπιστώθηκαν πέντε (5) κοινές πρωτεϊνικές κηλίδες στις αναλύσεις των πλάγιων οφθαλμών μεταξύ των τριών ημερομηνιών.

## 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. **Γιαννόπουλος, Η. 2011.** Πρωτεομική μελέτη των επάκριων οφθαλμών της Κονσερβολιάς την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου. (Πτυχιακή εργασία)
4. **Δελής, Κ. 2000.** Μελέτη των μεταβολών των πρωτεϊνών στις ταξιανθίες της ελιάς (*Olea europaea L.* Cv. ‘‘Konservolia’’’) κατά τη διάρκεια της άνθησης (Πτυχιακή εργασία).
5. **Δροσόπουλος, Β. Ι. 1994.** Μετασυλλεκτική φυσιολογία των καρπών. Μέρος ΙΙ. Εκδόσεις Γ.Π.Α.
6. **Κατσιβα, Ε. 2010.** Πρωτεομική μελέτη των πλαγίων οφθαλμών της Κονσερβολιάς την περίοδο Οκτωβρίου-Μαρτίου. (Πτυχιακή εργασία)
7. **Μπαλατσούρας, Γ.Δ. 1992.** Η ελιά - καλλιέργεια με σύγχρονες μεθόδους, Εκδόσεις Πελεκάνος, Αθήνα, ISBN: 960-400-034-9.
8. **Μαραγκός Νίκος, 2011.** Μελέτη των πρωτεϊνών στις ταξιανθίες της ελιάς ποικιλίας Καλαμών.
9. **Ποντίκης, Κ. 2000.** Ειδική Δενδροκομία Ελαιοκομία, Εκδόσεις Α. Σταμούλη, Αθήνα, ISBN: 960-351-311-3.
10. **Ποντίκης, Κ. 1992.** Ελαιοκομία, Εκδόσεις Α. Σταμούλη, Πειραιάς.
11. **Τζανετάκης, Ν. 2012.** Μελέτη των πρωτεϊνών στους βλαστοφόρους οφθαλμούς της ελιάς καλαμών, την περίοδο διαφοροποίησης των ανθοφόρων οφθαλμών (μεταπτυχιακή εργασία).
12. **Τσάγκαρης, Γ.Θ. 2008.** Πρωτεομική: Νέες τεχνολογικές τάσεις, Bioresearch 50-55.
13. **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.
14. **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.



15. **Bearden, J. C. 1977.** Quantitation of submicrogram quantities of protein by improved protein-dye binding assay. *Biochimica et Biophysica Acta*. 533: 525-529.
16. **Bernier, G. 1988.** The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 39: 175-219.
17. **Bouranis, D. L., Kitsaki, C. K., and Tzakosta, A. 2004.** Differences in nitrate and ammonium homeostasis of reproductive and vegetative shoots of olive tree cv Kalamon during inflorescence development. *Journal of plant nutrition*. 27: 797-813.
18. **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.
19. **Buchanan, B. B., Gruissem, W. and R. L. Jones. 2000.** *Biochemistry and molecular biology of plants*.
20. **Canovas, F., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H. and Rissignol, M. 2004.** Plant proteome analysis. *Proteomics*. 4: 285-298.
21. **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.
22. **Dafny-Yelin, M., Guterman, I., Menda, N., Ovadis, M., Shalit, M., Pichersky, E., Zamir, D., Lewinsohn, E., Adam, Z., Weiss, D., Vainstein, A., 2005** Flower proteome: changes in protein spectrum during the advanced stages of rose petal development. *Planta* 2005, 222, 37–46.
23. **Ekramoddoullah, M. K. and D. W. Taylor. 1996.** Seasonal variation of western white pine (*Pinus monticola* D. Don) foliage proteins. *Plant Cell Physiology*. 37 (2): 189-199.
24. **Echalier, A., Endicott, J.A., Nobl, M.E.M., 2010.** Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 511-519.
25. **Fabbri, A. and Benelli C. 2000.** Flower bud induction and differentiation in olive. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 75 (2): 131-141.

26. **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.
27. **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.
28. **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.
29. **Hacket, W. P. and Hartman, H. T. 1967.** The influence of temperature on floral initiation in the olive. *Plant Physiology*. 20: 430-436.
30. **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.
31. **Hartman, H. T. 1953.** Effect of winter chilling on fruitfulness and vegetative growth in the olive. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 62: 184-190.
32. **Hartman, H. T., 1951.** Time of floral differentiation of the olive in California. *Botanica Gazette*. 112: 323-327.
33. **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.
34. **Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J.M., Manning, G., Morgan, D.O., Tsai, L.H., Wolgemuth, D.J., 2009.** Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat. Cell Biol.* (11):1275-1276
35. **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.
36. **Pinney, K. And V. S. Polito. 1990.** Flower initiation in “Manzanillo” olive. *Acta Horticulture*.
37. **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.
- 38. Saupe, D. S. 2001.** Flowering.<http://employees.csbsju.edu/ssaupe/biol327/flowering.ht>
  - 39. Shaw, M. M and Riederer, B. M. 2003.** Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 3: 1408-1417.
  - 40. Sheila McCormick, 2004.** Control of Male Gametophyte Development. *The Plant Cell*, Vol. 16, S142-S153.
  - 41. Simson, R. J. 2003.** Proteins and proteomics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, ISBN: 0-87969-553-6.
  - 42. Taiz, L. and E. Zeiger. 1998.** *Plant Physiology*. 2<sup>nd</sup> edition.
  - 43. Taiz, L. and E. Zeiger. 2002.** *Plant Physiology*. 3<sup>rd</sup> edition
  - 44. Thiellement, H., Bahrman, N., Damerval, C., Plomion, C., Rossignol, M., Santoni, V., Vienne, D. and M. Zivy. 1999.** Proteomics for genetic and physiological studies in plants. *Electrophoresis*. 20: 2013-2026.
  - 45. Verkest, A., Weinl, C., Inze, D., De Veylder, L., Schnittger, A., 2005.** Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cel cycle control. *Plant Physiol*. 139, 1099-1106.
  - 46. 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.
  - 47. 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.
  - 48. World Catalogue of Olive Varieties. 2000.**
  - 49. Yadegari Ramin and Drews N. Fary, 2004.** Female Gametophyte Development. *The Plant Cell*, Vol. 16, S133-141.
  - 50. Amersham Biosciences, 2004.** 2-D Electrophoresis, Principles and methods.
  - 51. Hoefler, 1994.** Protein electrophoresis application guide.
  - 52. Sigma, 2003.** Biochemicals and reagents.
  - 53. Sigma, 1994.** Electrophoresis.

Πηγές από το διαδίκτυο:

54. <http://www.greenpage.gr/kaliergeies.htm>
55. <http://www.internationaloliveoil.org>
56. <http://www.moa.gov.cy/>
57. <http://www.clab.edc.uoc.gr>
58. <http://www.eliamed.gr>
59. [http://www.onlineexpo.gr/articlesDetails\\_gr](http://www.onlineexpo.gr/articlesDetails_gr)
60. <http://www.iama.gr/ethno/mytilini/taxtalidou.html>
61. <http://www.aua.gr/roussos/Roussos>
62. <http://www.iama.gr/ethno/mytilini/moulas.html>

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακας 1:** Μετρήσεις των απορροφήσεων των δειγμάτων στα 595 nm.

Sampling Date	Sample Fresh Weight (mg)	Sample Buffer Volume (μl)	Volume used in cuvette (μl)	Phosph Buffer solution (μl)	Absorbance I Replicate I	Absorbance II Replicate II	Absorbance III Replicate III
14/11	300	300	100	1400	0,486	0,506	0,508
1/12	300	300	100	1400	0,242	0,227	0,231
15/12	300	300	100	1400	0,319	0,299	0,291
3/01	300	300	100	1400	0,29	0,258	0,271
17/01	250	250	50	1450	0,252	0,28	0,261
31/01	300	300	100	1400	0,178	0,175	0,18
14/02	300	300	100	1400	0,264	0,243	0,246
28/02	300	300	100	1400	0,209	0,19	0,203
14/03	300	300	100	1400	0,148	0,139	0,146

**Πίνακας 2:** Η συγκέντρωση των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών (μg/g NB ιστού) στους πλάγιους οφθαλμούς της ελιάς για το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου-Μαρτίου. Σε κάθε ημερομηνία πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

Ημερομηνία	Επαναλήψεις				
	1 <sup>η</sup>	2 <sup>η</sup>	3 <sup>η</sup>	ΜΟ	ΤΣ
14/11	299,29	312,54	313,87	308,57	4,65
1/12	137,61	127,68	130,33	131,87	2,97
15/12	188,64	175,38	170,08	178,03	5,51
3/01	169,42	148,22	156,83	158,16	6,15
17/01	288,49	162,79	150,20	200,50	44,14
31/01	95,21	93,22	96,53	94,99	0,96
14/02	152,197	138,28	140,27	143,58	4,34
28/02	115,75	103,16	111,77	110,23	3,71
14/03	73,33	69,37	74,01	72,90	1,80

**Πίνακας 3:** Η ανάλυση της παράλλαξης των επαναλήψεων των μετρήσεων των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στις ταξιανθίες της ελιάς με τη μέθοδο Bradford για το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου-Μαρτίου .

<i>Στατιστικά παλινδρόμησης</i>	
Πολλαπλό R	0,966496839
R Τετράγωνο	0,934116139
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,924704159
Τυπικό σφάλμα	0,058673079
Μέγεθος δείγματος	9

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ					
	<i>βαθμοί ελευθερίας</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Σημαντικότητα F</i>
Παλινδρόμηση	1	0,341662757	0,341662757	99,24756877	2,19334E-05
Υπόλοιπο	7	0,024097712	0,00344253		
Σύνολο	8	0,365760469			

	<i>Συντελεστές</i>	<i>Τυπικό σφάλμα</i>	<i>t</i>	<i>τιμή-P</i>
<b>Τεταγμένη επί την αρχή</b>	<b>0,034303704</b>	0,036062604	0,951226469	0,373169415
<b>Μεταβλητή X 1</b>	<b>0,015092222</b>	0,001514932	9,962307402	2,19334E-05

Έλεγχος F των διακυμάνσεων δύο δειγμάτων

	<i>Μεταβλητή 1</i>	<i>Μεταβλητή 2</i>
Μέσος	39828	155,4291212
Διακύμανση	1679,25	4900,382372
Μέγεθος δείγματος	9	9
βαθμοί ελευθερίας	8	8
F	0,342677341	
P(F<=f)	0,075474181	
F κρίσιμο	0,290858219	

**Πίνακας 4:** Τα Rf των μαρτύρων υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκαν στην SDS-PAGE ανάλυση.

Protein	MW (KDa)	LogMW	Prot. Dist	Total Dist.	Rf
<b>Myosin</b>	200	5,30	3,49	46,78	0,07
<b>β-Galactosidase</b>	116	5,06	6,31	46,78	0,13
<b>Phosphorylase b</b>	97	4,98	7,58	46,78	0,16
<b>BSA</b>	66	4,81	12,59	46,78	0,26
<b>Glutamic DHG</b>	55	4,74	22,44	46,78	0,47
<b>Ovalbumin</b>	45	4,65	24,24	46,78	0,51
<b>Glyceraldehyde-3-O-DHG</b>	36	4,55	27,09	46,78	0,57
<b>Trypsinogen</b>	24	4,38	30,09	46,78	0,66
<b>Trypsin Inhibitor</b>	20	4,30	37,89	46,78	0,80
<b>α-Lactalbumin</b>	14,2	4,15	41,11	46,78	0,87

**Πίνακας 5:** Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών ζωνών που προέκυψαν από την SDS-PAGE ανάλυση.

Prot Dist.	Total Dist.	Rf	LogMW	MW	MW(KDa)
6,3	47,63	0,1322	5,08114	120542,3	120
9,4	47,63	0,1973	5,00203	100469,7	100
12,9	47,63	0,2708	4,91272	81794,45	81
16,3	47,63	0,3422	4,82596	66982,95	66
16,9	47,63	0,3548	4,81065	64662,68	64
18,5	47,63	0,3884	4,76982	58860,73	58
21,2	47,63	0,4450	4,70092	50225,97	50
22,6	47,63	0,4744	4,66520	46259,81	46
24,9	47,63	0,5227	4,60651	40412,29	40
27,2	47,63	0,5710	4,54782	35303,94	35
33,5	47,63	0,7033	4,38706	24381,63	24
36,1	47,63	0,7579	4,32071	20927,49	20
39	47,63	0,8188	4,24671	17648,85	17
39,8	47,63	0,8356	4,22630	16838,46	16
44,3	47,63	0,9300	4,11147	12926,27	12