

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

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΒΛΑΣΤΟΦΟΡΟΥΣ  
ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ  
(*Olea europaea L. cv 'Kalamon'*) την περίοδο της  
διαφοροποίησης των ανθοφόρων οφθαλμών.**



**ΝΙΚΟΛΑΟΣ Κ. ΤΖΑΝΕΤΑΚΗΣ**

**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 ΒΛΑΣΤΟΦΟΡΟΥΣ  
ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ  
(*Olea europaea L. cv 'Kalamon'*) την περίοδο της  
διαφοροποίησης των ανθοφόρων οφθαλμών.**

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ Κ. ΤΖΑΝΕΤΑΚΗΣ**

**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. Μπουράνης Δημήτριος (Επιβλέπων)

Καθηγητής κ. Καραμπουρνιώτης Γεώργιος

Αν. Καθηγητής κ. Αιβαλάκης Γεώργιος

## Πρόλογος

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την άμεση επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κ. Χ. Κιτσάκη.

Η εργασία αυτή αποτελεί συνέχεια μιας σειράς εργασιών του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Φυτών πάνω στην ελιά, μιας καλλιέργειας με τεράστιο ενδιαφέρον για τη χώρα μας και όχι μόνο. Η παρούσα εργασία εστιάζεται στη μελέτη των πρωτεϊνών των επάκριων οφθαλμών της ελιάς (*Olea europaea L.*).

Το χρονικό διάστημα των δειγματοληψιών καλύφθηκε από την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δ. Μπουράνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου τη συγκεκριμένη μελέτη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης και τα μέλη της επιτροπής, Καθηγητή κ. Γ. Καραμπουρνιώτη και Αν. Καθηγητή κ. Γ. Αιβαλάκη. Ένα θερμό ευχαριστώ σε όλα τα παιδιά του εργαστηρίου Φυσιολογίας Φυτών.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου.

**Νικόλαος Τζανετάκης**  
**Αθήνα 2012**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΠΡΟΛΟΓΟΣ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	3
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	5
1.1.1. Βοτανικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της Ελιάς.....	5
1.1.2. Η σημασία της ελαιοκαλλιέργειας.....	5
1.1.3. Ποικιλία Καλαμών.....	6
<b>1.2. Το φαινόμενο της άνθησης</b> .....	7
1.2.1. Οι βασικές αναπτυξιακές φάσεις ενός φυτού.....	7
1.2.2. Το κορυφαίο μερίστωμα του βλαστού.....	7
1.2.3. Ετήσιος βλαστικός κύκλος της ελιάς.....	9
1.2.4. Η βλάστηση της ελιάς σε σχέση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, το πότισμα και την ανόργανη διατροφή.....	10
1.2.5. Η βλάστηση της ελιάς σε σχέση με την ανθοφορία και την παραγωγή.....	11
<b>1.3. Η πρωτεομική στη μελέτη των φυτών</b> .....	14
1.3.1. Η πρωτεομική σαν εργαλείο μελέτης.....	16
1.3.2. Εφαρμογές πρωτεομικής στα φυτά.....	
1.3.3. Η πρωτεομική στα δενδρώδη-πολυετή είδη.....	17
1.3.4. Η πρωτεομική στην ελιά.....	19
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	19
<b>2.1. Φυτικό υλικό</b> .....	21
<b>2.2. Εκχύλιση ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών</b> .....	22
2.2.1. Διαλύματα για την παραλαβή και τον καθαρισμό των πρωτεϊνών.....	23
<b>2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford</b> .....	26
2.3.1. Διαλύματα για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford.....	26
<b>2.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε κατακόρυφη πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE</b> .....	29
2.4.1. Παρασκευή πηκτής.....	
2.4.2. Διαλύματα για την Παρασκευή πηκτής.....	32

2.4.3. Χειρισμός δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (SDS-PAGE).....	32
2.4.4. Μέθοδοι χρώσης πηκτής.....	35
2.4.4.1. Χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250.....	36
2.4.4.2. Χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο.....	36
2.4.5. Υπολογισμός μοριακού μεγέθους πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	37
<b>2.5. Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE).....</b>	<b>38</b>
2.5.1. Αναλυτική περιγραφή ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων.....	39
2.5.2. Χειρισμός δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων.....	40
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>40</b>
3.1. Μακροσκοπική εικόνα της εξέλιξης των οφθαλμών.....	42
3.2. Η πορεία της στάθμης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών .....	47
3.3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης σε πηκτή SDS.....	48
3.4. Ανάλυση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δυο διαστάσεων 2-DE.....	48
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>49</b>
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>54</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>58</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>62</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 διαίωσιση των ειδών. Η διαφοροποίηση των οφθαλμών γίνεται το χειμώνα, όπου και είναι απαραίτητο το ψύχος για την εαρινοποίηση.

Ο χρόνος της έκπτυξης των ακραίων οφθαλμών επηρεάζεται με την πρωιμότητα της ανάπτυξης του δένδρου της ελιάς αλλά και την αντοχή του στις χαμηλές θερμοκρασίες. Το μήκος της βλάστησης που θα προκύψει, από αυτή την έκπτυξη, καθορίζει την καρποφορία την επόμενη χρονιά και επομένως έχει ιδιαίτερη σημασία. Σημαντική επίσης, είναι και η μεριστωματική δραστηριότητα πριν την έκπτυξη. Η μεριστωματική δραστηριότητα είναι άμεσα συνδεδεμένη με την πρωτεϊνική κατάσταση είτε αυτή είναι δομική είτε σχετίζεται με τις κυτταρικές διαιρέσεις.

Με τα δεδομένα αυτά πραγματοποιήθηκε μελέτη των πρωτεϊνών των επάκριων οφθαλμών της ποικιλίας Καλαμών την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου.

Έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford, με SDS-PAGE ανάλυση και με 2-DE ανάλυση.

Η συγκέντρωση των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στους επάκριους οφθαλμούς παρουσίασε μέγιστα στα μέσα Νοεμβρίου και αρχές Ιανουαρίου και ελάχιστα στις αρχές Δεκεμβρίου, στο τέλος Φεβρουαρίου και μέσα Μαρτίου.

Με την SDS-PAGE ανάλυση, οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες αποκαλύφθηκαν κατά τον μήνα Νοέμβριο και Ιανουάριο. Σε όλες τις ημερομηνίες οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες που εμφανίστηκαν είχαν χαμηλά μοριακά βάρη (10-37 kDa), ενώ εμφανίστηκαν και 4 πρωτεϊνικές ζώνες με μοριακά βάρη από 67-102 kDa.

Από την 2-DE ανάλυση, στις 14 Νοεμβρίου, 31 Ιανουαρίου και στις 28 Φεβρουαρίου προσδιορίστηκαν 42, 39 και 37 πρωτεϊνικές κηλίδες αντίστοιχα. Οι κηλίδες εμφανίστηκαν στην περιοχή pH από 4 έως 7. Στις 28/02 η κατανομή των κηλίδων εντοπίστηκε σε πιο όξινη ζώνη. Από αυτές 8 κηλίδες ήταν ίδιες, ενώ οι υπόλοιπες ήταν διαφορετικές. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι οι κηλίδες με την μεγαλύτερη ένταση εμφανίστηκαν κατά το μήνα Νοέμβριο και Ιανουάριο. Τα

αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν προηγούμενα δεδομένα ότι στα μεριστωματικά κύτταρα υπάρχει μια δυναμική πρωτεϊνική κατάσταση.



## ABSTRACT

The differentiation process of buds consists of a particularly important stage of the biological cycle of the higher plants, as the reproduction and consequently the perpetuation of such species are to a great extent depended upon this procedure. The differentiation of the buds occurs during the winter time as the presence of low temperatures consists of an essential factor in vernalisation.

The time of bolting of apical buds is influenced by the earliness of the olive tree development as well as its resilience to low temperatures.

The consequent length of vegetative growth that is resulted from this bolting determines the following year's fruitbearing and therefore it holds significant importance. Another significant aspect is the meristematic activity prior to bolting. The meristematic activity is directly linked to the protein status whether it refers to structural proteins or is related to cell division.

The above interrelating factors were employed in the investigation of the proteins located in the apical buds of the "kalamon" variety olives during the time period between November and March. The specification of the total accumulation of soluble proteins was realized through the utilization of the Bradford method, as well as the spectroscopy SDS-PAGE and the two-dimensional electrophoresis (2-DE) analysis.

The acquired data demonstrated that the total accumulation of soluble proteins in the apical buds reached maximum values during the mid November and early January, whereas minimum values were identified during early December, late February and mid March.

Moreover, according to the results from SDS-PAGE analysis, the majority of protein zones were revealed during November and January. As measured over the entire experimental period, the majority of protein zones that surfaced showed low molecular weights (10-37 kDa), whereas 4 protein zones exhibit molecular weights from 67-102 kDa.

Furthermore, according to the results from SDS-PAGE analysis, during the 14<sup>th</sup> of November, the 31<sup>th</sup> of January and the 28<sup>th</sup> of February, the protein spots 42, 39 and 37 were specified respectively. The spots were detected in the pH area between 4 and 7. In the 28<sup>th</sup> of February the distribution of the spots was identified in a higher

acidity zone. Among the observed spots, 8 were identical whereas the rest were varying. Additionally, it was noted that the spots exhibiting greater intensity, appeared during November and January.

The results are aligned with preceded empirical evidence suggesting the prevalence of a dynamic protein status in the meristems.

## Σκοπός εργασίας

Η ελιά καρποφορεί στην περιοχή του βλαστού παρελθόντος έτους από πλάγιους ανθοφόρους οφθαλμούς. Με τη δημιουργία της νέας βλάστησης στην ελιά, οι βλαστοί που προκύπτουν έχουν αρκετούς πλάγιους (μασχαλιαίους οφθαλμούς) και έναν επάκριο στη κορυφή τους. Και οι δύο κατηγορίες οφθαλμών όταν δημιουργούνται με τα υπάρχοντα δεδομένα, είναι βλαστοφόροι. Αυτοί που μπορεί να εξελιχθούν σε ανθοφόρους είναι μόνο οι πλάγιοι, ενώ οι επάκριοι στις περισσότερες ποικιλίες παραμένουν βλαστοφόροι.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού προφίλ των επάκριων οφθαλμών της ελιάς από τα μέσα Φθινοπώρου μέχρι την έναρξη της έκπτυξης.

Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν τρεις βασικές μεθοδολογίες 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

Ένα από τα κύρια γνωρίσματα των χωρών που βρίσκονται γύρω από την υδάτινη λεκάνη της Μεσογείου είναι η παρουσία ελαιόδεντρων. Η ελιά είναι σχεδόν βέβαιο ότι αυτοφυόταν στις χώρες της Μεσογείου από την εποχή της εμφάνισης των πρώτων ανθρώπων στην περιοχή. Στην αρχαία Ελλάδα, η ελιά ήταν γνωστή για τα οφέλη της και τις χρησιμότητες της από πολύ παλιά όπως προκύπτει από αγγειογραφίες και τοιχογραφίες τόσο στην Κρήτη όσο και στην Ηπειρωτική Ελλάδα. Σήμερα, η ελιά συνεχίζει να αποτελεί ένα από πιο χρήσιμα δέντρα λόγω των πολλών ωφελειών της (Εικόνα 1.1). Το λάδι της θεωρείται το πιο πλούσιο και υγιεινό φυτικό λάδι και συνιστάται σε όλα σχεδόν τα διαιτολόγια, το ξύλο της χρησιμοποιείται τόσο στην ξυλογλυπτική όσο και ως υλικό καύσης, τα φύλλα της δίνονται στα ζώα για τροφή ενώ από το κουκούτσι της παράγεται λάδι ειδικών χρήσεων.



*Εικόνα 1.1: Δέντρο ελιάς.*

Το καλλιεργούμενο είδος ελιάς είναι το *Olea europaea L.* το οποίο ανήκει στην οικογένεια Oleaceae. Η οικογένεια Oleaceae περιλαμβάνει περισσότερα από 25 γένη. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν τα γένη: *Fraxinus*, *Syringa* (Σύριγγα ή Πασχαλιά), *Ligustrum* (Λιγούστρο), *Forsythia* (Φορσύθια) και *Jasminium* (Γιασεμί). Το είδος *Olea. europaea L* περιλαμβάνει τρία υποείδη, το *Euromediterranea*, το *Laperrini* και το *Guspidata* και κάθε υποείδος διάφορες ποικιλίες (Ποντίκης, 1992).

Το δέντρο της ελιάς είναι φυτό υποτροπικό, αειθαλές, ανεμόφιλο, το ύψος του μπορεί να φθάσει στα 15-20m και ο χρόνος ζωής του κυμαίνεται από μερικές δεκάδες έως εκατοντάδες έτη. Αυτή η μακροζωία μπορεί να αποδοθεί στην ανθεκτικότητα που εμφανίζει το ξύλο σε προσβολές από εχθρούς και ασθένειες, καθώς και την ικανότητα ανάπτυξης νέας βλάστησης από το ριζικό σύστημα και τον λαιμό. Η ελιά είναι δέντρο που η ανάπτυξη του ευνοείται σε περιοχές με συνθήκες ξηροθερμικές. Οι εδαφικές απαιτήσεις της δεν είναι μεγάλες και γι' αυτό αναπτύσσεται και σε μη γόνιμα εδάφη έως πετρώδη. Βέβαια σε περιοχές με εδάφη γόνιμα και αρδευόμενα η παραγωγή είναι σαφώς μεγαλύτερη.

Ο κορμός της είναι λείος, κυλινδρικός και χρώματος σταχτοπράσινου. Τα φύλλα είναι απλά, λογχοειδή, αντίθετα, με υφή δερματώδη, μικρό μίσχο, χρώμα πράσινο στο επάνω μέρος και σταχτιά στην κάτω επιφάνεια.. Τα άνθη φέρονται σε βοτρυώδεις ταξιανθίες στις μασχάλες αντίθετων φύλλων και σε βλαστούς της προηγούμενης βλαστική περιόδου, αλλά και από λανθάνοντες οφθαλμούς που βρίσκονται σε βλαστού ηλικίας 1-2 ετών. Οι οφθαλμοί είναι μικροί και δύσκολα μπορούν να διακριθούν οι ξυλοφόροι από τους μικτούς.

Ο καρπός είναι δρύπη και σχηματίζεται από τους ιστούς των καρπόφυλλων. Αποτελείται από το εξωκάρπιο, από το σαρκώδες μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο ή πυρήνα. Το ενδοκάρπιο εξωτερικά εμφανίζει χαρακτηριστικές αυλακώσεις που καλούνται γλυφές, ενώ στο εσωτερικό του βρίσκεται το σπέρμα το οποίο συνίσταται από την επιδερμίδα, το ενδοσπέρμιο, τις κοτυληδόνες και το έμβρυο (Εικόνα 1.2).



*Εικόνα 1.2: Καρπός ελιάς*

Η ελιά είναι ένα είδος δέντρου όπου συναντάμε σε αυτό το φαινόμενο της παρενιαυτοφορίας το οποίο οφείλεται σε ένα σύνολο παραγόντων, όπως ποικιλία, κλάδεμα, λίπανση, άρδευση, μέγεθος φορτίου κατά το χρόνο της πλήρους εσοδείας κ.λπ. (Μπαλατσούρας, 1992).

Το ελαιόδεντρο προτιμάει ήπιο καιρό κατά το χειμώνα και θερμό και σχετικά ξηρό κατά το καλοκαίρι. Θωρείται ανθεκτικό στην ξηρασία με μέγιστη θερμοκρασία αντοχής τους 40-42 °C κατά το καλοκαίρι, όταν υπάρχει αρκετή διαθέσιμη υγρασία στο έδαφος. Η ελάχιστη θερμοκρασία δεν πρέπει να πέσει κάτω από τους -7 °C γιατί χαμηλότερες από αυτή μπορεί να προκαλέσουν ζημιές στα δέντρα.

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

Η σημασία της καλλιέργειας της ελιάς είναι πολύ μεγάλη, ειδικά για τα νησιά, γιατί η ελιά μπορεί να φυτευτεί σε εδάφη που δεν είναι κατάλληλα για άλλες καλλιέργειες. Η σημασία ειδικά του λαδιού στην ανάπτυξη του εμπορίου και στον πλούτο των αρχαίων ελληνικών πόλεων είναι τεράστια. Εξίσου σημαντική είναι η χρήση του λαδιού και ο συμβολισμός του στην θρησκεία.

Η καλλιέργεια της ελιάς σε όλη την υφήλιο καλύπτει έκταση 100 εκατομμυρίων στρεμμάτων, ο δε αριθμός των ελαιοδέντρων ανέρχεται σε 800 εκατομμύρια. Από την καλλιεργούμενη αυτή έκταση το 98% περίπου βρίσκεται στην λεκάνη της Μεσογείου.. Η καλλιέργεια της ελιάς έχει σήμερα επεκταθεί και σε άλλες χώρες τις υφής: Αργεντινή, Χιλή, Μεξικό, Περού, Ν. Αφρική, Αυστραλία, ΗΠΑ,

Ιαπωνία κ.α. Στην Ελλάδα το 60% των καλλιεργούμενων εκτάσεων καλύπτεται από την καλλιέργεια της ελιάς. Είναι η κορυφαία χώρα στον κόσμο, παραγωγός της μαύρης ελιάς και έχει περισσότερες ποικιλίες ελιάς από οποιαδήποτε άλλη χώρα. 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. 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.

Εκτός από το ελαιόλαδο και τις επιτραπέζιες ελιές, στα προϊόντα της ελαιοκαλλιέργειας πρέπει να προστεθεί και το πυρηνέλαιο που προορίζεται για βιομηχανική χρήση. Επίσης οικονομική σημασία έχουν και κάποια υποπροϊόντα της ελιάς όπως το ξύλο και ο πυρήνας, που χρησιμοποιούνται ως καύσιμη ύλη (Ποντίκης, 2000).

Με τα προϊόντα της αυτά η ελιά συμμετέχει κάθε χρόνο κατά 2% στα συνολικά εθνικά έσοδα και κατά 15% στο εθνικό αγροτικό εισόδημα. Το ελαιόλαδο, χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα σαν βασικό στοιχείο της μεσογειακής διατροφής αφού αποτελεί μία πλούσια πηγή ενέργειας (αποδίδει 9,3 Kcal/gr), αλλά και σαν φάρμακο αφού είναι γνωστές οι ευεργετικές ιδιότητες του στην υγεία του ανθρώπου. Έτσι συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι έχουμε ιδανική σχέση κορεσμένων και μονοακορέστων λιπαρών οξέων, καλή σχέση μεταξύ βιταμίνης E και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, μεγάλη περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ουσίες, μεγάλη περιεκτικότητα σε υδρογονάνθρακες που βοηθούν τον ανθρώπινο μεταβολισμό και υψηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ (σε ποσοστό 10%) η οποία καλύπτει τις απαιτήσεις του οργανισμού σε λιπαρά οξέα ( <http://www.elais.gr>).

### **1.1.3. Ποικιλία Καλαμών**

Οι ελιές καλαμών είναι μια εξαιρετική ποικιλία επιτραπέζιας ελιάς ονομασίας προέλευσης. Καλλιεργείται κυρίως στους νομούς Μεσσηνίας και Λακωνίας και σε

σημαντική έκταση της ευρύτερης περιοχής του Αγρινίου. Με την κατάλληλη επεξεργασία (χάραγμα, άλμη, ξύδι) έχουμε τις χαρακτηριστικές ελιές καλαμών σε οξάλμη, μια εμπορική ονομασία ιδιαίτερα διαδεδομένη σε Ελλάδα και εξωτερικό.

Οι ελιές Καλαμών είναι ο καρπός του δένδρου *Olea europaea* var. *Ceraticarpa* ή Νυχάτη Καλαμών. Αναπτύσσεται σε δένδρο ύψους 7-10 μέτρων. Οι ελιές Καλαμών συλλέγονται από τον Οκτώβριο μέχρι τον Δεκέμβριο με τα χέρια όταν αποκτήσουν το καφέ-μαύρο βαθυκόκκινο χρώμα τους

Είναι δένδρο που εμφανίζει το φαινόμενο της παρενιαυτοφορίας. 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 περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 17% και το ελαιόλαδο που παράγει είναι εξαιρετικής ποιότητας. Θεωρείται ποικιλία μετρίως ανεκτική στο κρύο, πολύ ευαίσθητη στις υψηλές θερμοκρασίες και ανθεκτική στο βερτισίλλιο (World Catalogue of Olive Varieties 2000).



**Εικόνα 1.3:** Ποικιλία 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 διαίωσιση 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 (Saupe, 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; Saupe, 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 (Saupe, 2001).

### **1.2.2. Το κορυφαίο μερίστωμα του βλαστού (βλαστητικό)**

Η ανάπτυξη των φυτών εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές που καλούνται μεριστώματα. Τα μεριστώματα μπορούν να οριστούν ως ομάδες κυττάρων οι οποίες διατηρούν την ικανότητα να διαιρούνται. Σχεδόν όλες οι κυτταρικές διαιρέσεις συμβαίνουν σε αυτές τις περιοχές. Στα νεαρά φυτά, τα πιο ενεργά μεριστώματα καλούνται ακραία μεριστώματα και είναι τοποθετημένα στην άκρη του βλαστού και στην άκρη της ρίζας.

Η φάση ανάπτυξης των φυτών που δίνει γένεση σε νέα όργανα στη βασική μορφή του φυτού καλείται πρωτογενής ανάπτυξη. Η πρωτογενής ανάπτυξη είναι αποτέλεσμα της δραστηριότητας του ακραίου μεριστώματος, κατά την οποία η διαίρεση των κυττάρων ακολουθείται από σταδιακή μεγέθυνση των κυττάρων. Τα ακραία μερίστωμα, τα οποία είναι τοποθετημένα στο πιο ακραίο σημείο του βλαστού, επιτρέπουν, ουσιαστικά, στο βλαστητικό σύστημα να αναπτυχθεί παρέχοντας μια πηγή μη διαφοροποιημένων κυττάρων τα οποία χρησιμοποιούνται για να σχηματίσουν διάφορους ιστούς και όργανα, όπως τα φύλλα και οι βλαστοί.

Το ακραίο μερίστωμα αποκρύπτεται κανονικά από αποφυλλικές καταβολές και λέπια, τα οποία σχηματίζονται στην βάση του και περιτυλίγουν το μερίστωμα καθώς μεγαλώνουν. Το σχήμα και το μέγεθος του ακραίου μεριστώματος ποικίλει ανάλογα με ένα αριθμό παραμέτρων, συμπεριλαμβανομένου του είδους, του σταδίου ανάπτυξης και των συνθηκών αύξησης (Steeves and Sassux, 1989). Τα μεγαλύτερα ακραία μερίστωμα τα έχουν τα Cycads μεταξύ των Αγγειόσπερμων, τα οποία έχουν διάμετρο 3 mm. Αντίθετα, το ακραίο μερίστωμα του Arabidopsis έχει διάμετρο μικρότερη από 50 μm και περιέχει μόνο μερικές δεκάδες κύτταρα.

Ο σχηματισμός του ακραίου μεριστώματος απαιτεί μια σύνθετη αλληλουχία στο μοτίβο της έκφρασης των γονιδίων. Στο εμβρυικό στάδιο, ο σχηματισμός του ακραίου βλαστητικού μεριστώματος, μπορεί να συσχετιστεί με δραστηριότητες σχετικές με το γονίδιο της αυξίνης. Ένα αρχικό κύμα αυξίνης στην ακραία περιοχή του εμβρύου μπορεί να παρακινήσει την δραστηριότητα κάποιων γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν ένα παράγοντα απόκρισης της αυξίνης, του οποίου η δραστηριότητα σαν μεταγραφικός παράγοντας, βοηθάει στην ανάπτυξη του ακραίου μεριστώματος, ενώ παράλληλα διευκολύνει και την περαιτέρω ροή της αυξίνης προωθώντας την αγγειακή ανάπτυξη (Jenik and Barton, 2005).

Η κυτταρική οργάνωση του ακραίου μεριστώματος παρέχει πολλές πληροφορίες για μια πιο λεπτομερή περιγραφή της ανάπτυξης και της αύξησης και εκτιμάται καλύτερα με μικροσκοπική εξέταση. Διαμήκη τμήματα των βλαστητικών κορυφών αποκαλύπτουν ένα οργανωτικό μοτίβο το οποίο περιέχει ξεχωριστές ζώνες. Το κέντρο ενός ενεργού ακραίου μεριστώματος περιλαμβάνει ένα σύμπλεγμα κυττάρων τα οποία αποτελούν την κεντρική ζώνη. Μια συνοδευτική περιοχή αποτελούμενη από μικρότερα πυκνά κυτοπλασματικά κύτταρα αποτελεί την περιφερειακή ζώνη. Μία άλλη ζώνη, η οποία βρίσκεται κάτω από την κεντρική ζώνη και δίνει γένεση στους εσωτερικούς ιστούς του βλαστού αποτελεί την πλευρική ζώνη.

Αυτές οι ζώνες αντικατοπτρίζουν διαφοροποιήσεις στις μεταβολικές δραστηριότητες. Το πυκνό κυτόπλασμα της περιφερειακής ζώνης είναι συνδεδεμένο με την αυξημένη ανάπτυξη και διαίρεση κυττάρων που παρατηρείται σ' αυτή την περιοχή. Η κεντρικά τοποθετημένη ζώνη δείχνει παρόμοια συμπεριφορά και συνεισφέρει κύτταρα τα οποία γίνονται η εντεριώνη του στελέχους. Η πλευρική ζώνη περιλαμβάνει κύτταρα τα οποία έχουν χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα και διαιρούνται αργά και αναπληρώνουν κύτταρα στους πληθυσμούς της πλευρικής και της περιφερειακής ζώνης (Bowman and Eshed, 2000).

Όσο αφορά την δομή του ακραίου μεριστώματος μπορεί να υπάρχουν διαφοροποιήσεις στο σχήμα και στο μέγεθος του σε ένα ίδιο είδος φυτού. Οι δομές κυμαίνονται από επίπεδες έως κυκλικές. Τέτοιες περιοδικές αλλαγές στο μέγεθος και στο σχήμα του ακραίου μεριστώματος συσχετίζονται με διαδοχικούς κύκλους του σχηματισμού των φύλλων. Περαιτέρω, ανατομικές διαφοροποιήσεις μπορούν να συμβούν σε σχέση με αλλαγές στο ρυθμό σχηματισμού των φύλλων και στη συνολική ανάπτυξη συσχετιζόμενη με εποχικές αλλαγές και το ξεκίνημα του ληθάργου. (Taiz and Zeiger, 2006).

Ένα πλήθος δραστηριοτήτων γονιδίων απαιτείται για την δημιουργία και δραστηριότητα του κορυφαίου μεριστώματος. Για παράδειγμα, τα μεταλλάγματα του γονιδίου WUSCHEL (WUS), το οποίο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα, αποτυγχάνει να παράγει ένα λειτουργικό κορυφαίο μερίστωμα (Mayer et al. 1998). Ακόμα το γονίδιο SHOOT MERISTEMLESS (STM) παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ακραίου μεριστώματος κατά την εμβρυακή φάση. Παράλληλα, για να διατηρηθεί η μεριστωματική δραστηριότητα των ακραίων μεριστωμάτων, οι γιββερελλίνες πρέπει να εξαχθούν από το εσωτερικό των κυττάρων καθώς δρουν εναντίον της σωστής δομής του ακραίου μεριστώματος (Taiz and Zeiger, 2006).

Στα περισσότερα είδη βλαστός προκύπτει και από τη δραστηριότητα των μασχαλιαίων οφθαλμών. Αυτά είναι τα μεριστώματα τα οποία αναπτύσσονται στις μασχάλες των πρωτογενών φύλλων και έτσι ο σχηματισμός των βλαστών σχετίζεται με τις δραστηριότητες των ακραίων κορυφαίων και των πλάγιων κορυφαίων μεριστωμάτων οι οποίοι ελέγχουν την φυλλοταξία αλλά και τη συνολική μορφή του υπέργειου μέρους του φυτού. Η ανάπτυξη των ακραίων μεριστωμάτων μπορεί να επηρεαστεί από εσωτερικούς παράγοντες όπως οι ορμόνες και από περιβαλλοντικούς, όπως το φώς.

Στο φαινόμενο της κυρίαρχης κορυφής, η ανάπτυξη του ακραίου οφθαλμού επηρεάζει δυσμενώς την ανάπτυξη των πλευρικών οφθαλμών και αυτό ρυθμίζεται από την καθοδική κίνηση της αυξίνης του ακραίου κορυφαίου μεριστώματος, από τη θρεπτική κατάσταση, καθώς και από καλλιεργητικές παρεμβάσεις (π.χ. το κλάδεμα κ.ά.).

### **1.2.3. Ετήσιος βλαστικός κύκλος της ελιάς**

Η αύξηση των βλαστών της ελιάς διακρίνεται σε επάκρια και πλάγια. Η επάκρια προέρχεται από την έκπτυξη του επάκριου ξυλοφόρου οφθαλμού και συνιστάται σε επιμήκυνση του βλαστικού άξονα, ενώ η πλάγια προέρχεται από την έκπτυξη των ξυλοφόρων οφθαλμών, που απαντούν ανά δύο στη μασχάλη των φύλλων. Η βλάστηση της ελιάς εξαρτάται από :

- Τις περιβαλλοντικές συνθήκες
- Το πότισμα
- Την ανόργανη διατροφή
- Την ανθοφορία και την παραγωγή (Ποντίκης, 2000)

Κατά τους Schroeder και Rizi (1967) η βλάστηση της ελιάς επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, αλλά οι πιο σημαντικοί είναι η θερμοκρασία, η διαθέσιμη εδαφική υγρασία και η ανόργανη θρέψη.

### **1.2.4. Η βλάστηση της ελιάς σε σχέση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, το πότισμα και την ανόργανη διατροφή**

Υπό ομαλές φυσικές συνθήκες ο ετήσιος βλαστικός κύκλος της ελιάς διαιρείται στις ακόλουθες φράσεις : τη φθινοπωρινή βλάστηση διαδέχεται ο χειμερινός λήθαργος (αναστολή της αύξησης της βλάστησης), που ακολουθείται από τη φάση της εαρινοποίησης (επίδραση χειμερινού ψύχους), τη διαφοροποίηση των οφθαλμών από τα μέσα του χειμώνα, την ανθοφορία και την νέα ανοιξιάτικη βλάστηση, την αρχική ανάπτυξη των καρπών, τη σκλήρυνση του πυρήνα και την καλοκαιρινή διάπαυση (αναστολή της αύξησης της βλαστήσεως) (Jimenez, 1969). Ο

Ziganevic (1959) αναφέρει ότι στο Αζερμπαϊτζάν τα υγιή καρποφόρα ελαιόδεντρα χαρακτηρίζονται από δύο φάσεις βλαστήσεως μια έντονη κατά την άνοιξη με αρχές καλοκαιριού και μια λιγότερο έντονη το φθινόπωρο. Οι Carrante και Laviola (1960) παρατήρησαν ότι στην νότια Ιταλία η καμβιακή δραστηριότητα αναστελλόταν από το Δεκέμβριο έως τα μέσα Απριλίου και από τον Ιούλιο έως τα τέλη Σεπτεμβρίου. Στην Ελλάδα, η βλαστική αύξηση της ελιάς αρχίζει στις αρχές Απριλίου και συνεχίζεται μέχρι τα μέσα Οκτωβρίου (Ποντίκης, 2000).

Συμπερασματικά, ο βλαστικός τύπος της ελιάς επηρεάζεται από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η καλοκαιρινή αναστολή της αύξησης οφείλεται σε έλλειψη νερού και η χειμερινή στις χαμηλές θερμοκρασίες (Ποντίκης, 2000).

Η ελιά θεωρείται πολύ ανθεκτική στην ξηρασία (Leon και Bukovac, 1978), όμως ανταποκρίνεται θετικά στην παροχή νερού με οποιαδήποτε μέθοδο (Spiegel, 1958; Aggabio, 1974; Mirella and Deidda, 1977).

Η ελιά δεν εμφανίζει εύκολα συμπτώματα τροφοπενιών ανόργανων στοιχείων. Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί τροφοπενίες, όπως ο Demetriadis et al, 1962 παρατήρησε συμπτώματα τροφοπενιών καλίου ή ο Cifferi et al, 1956 παρατήρησε συμπτώματα τροφοπενιών βορίου.

Πάντως οι τροφοπενίες είναι ιδιαίτερες σπάνιες. Στην Ελλάδα, έχει παρατηρηθεί, όμως, σε ελαιώνες έλλειψη Ca και Mg.

### **1.2.5. Η βλάστηση της ελιάς σε σχέση με την ανθοφορία και την παραγωγή**

Στα φυτά παρατηρείται ενδογενής ανταγωνισμός για τα θρεπτικά στοιχεία μεταξύ των ταχέως αυξανόμενων φυτικών οργάνων (Bollard, 1970). Στην ελιά συμπίπτει η βιολογική δραστηριότητα της βλαστητικής και της αναπαραγωγικής ανάπτυξης. Επομένως, έντονος ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία υπάρχει μεταξύ των δύο αυτών τύπων οργάνων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον εκφυλισμό της ωοθήκης (Almeida, 1940). Σύμφωνα με τον Villemur et al (1978) η βλαστική αύξηση αρχίζει να σταματά μετά την άνθηση και αυτό οφείλεται στο ότι μετά την καρπόδεση η ανάπτυξη των καρπών καθίσταται το κύριο κέντρο συσσώρευσης των μεταβολιτών. Έτσι η βλαστική αύξηση, η οποία λαμβάνει χώρα από την άνοιξη μέχρι το

φθινόπωρο, με κάποια αναστολή το καλοκαίρι, πρέπει να προηγείται ή να έπεται της ανθήσεως. Παράλληλα ο Almeida (1940) παρατήρησε ζωηρότεροι βλαστοί παρατηρήθηκαν σε καρποφόρους βλαστούς με μικρή ανθοφορία.

### **1.3. Η πρωτεομική στη μελέτη των φυτών**

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

Τα τελευταία χρόνια έχει καθοριστεί πλήρως η αλληλουχία περισσότερων των 40 γονιδιωμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ο γρήγορος ρυθμός των προσπαθειών για τον καθορισμό της αλληλουχίας των γονιδιωμάτων οδήγησε στην ανακάλυψη πολλών νέων γονιδίων στα οποία δεν είχε αποδοθεί κάποια λειτουργία. Για την κατανόηση της λειτουργίας αυτών των γονιδίων οι επιστήμονες στρέφονται στη συστηματική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των στοιχείων που αποτελούν ένα βιολογικό σύστημα, κυρίως mRNA, πρωτεΐνες και μεταβολίτες. Λόγω του γεγονότος ότι οι πρωτεΐνες έχουν βασική βιολογική λειτουργία, η πρωτεομική εξελίσσεται ταχύτατα.

Η πρωτεομική είναι ένας κλάδος της επιστήμης που επικεντρώνεται στις πρωτεΐνες. 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) στον 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 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.

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

Για παράδειγμα οι Koller et al. (2002) συνδυάζοντας 2-DE και υγρή χρωματογραφία (LC) ανέλυσαν το πρωτεόμα 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. Στη διεθνή βιβλιογραφία συμπεριλαμβάνεται πληθώρα αξιολογών μελετών για διάφορα φυτικά είδη. 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, φαινολών, 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 λιγνινοποιημένους ιστούς. Παρόλο αυτά έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες πρωτεομικής μελέτης των φυτών αυτών που απέβλεπαν κυρίως στη καταγραφή του γενικότερου πρωτεϊνικού χάρτη στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια και την αντίδραση τους σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης.

Τα τελευταία χρόνια η μοριακή έρευνα των πολυετών φυτών έχει αποκτήσει κατ'αντιστοιχία με τα ετήσια δύο φυτά μοντέλα, τη λεύκα (*Populus*) για τα αγγειόσπερμα και το πεύκο (*Pinus*) για τα γυμνόσπερμα, με επικρατέστερο όμως για ευκολία έρευνας το πρώτο εξαιτίας του σχετικά μικρού γονιδιώματος (~450-550 Mbp, *Arabidopsis*~100-150 Mbp) και της σχετικής ευκολίας μετασχηματισμού του με *Agrobacterium*. Στα παραπάνω φυτά μοντέλα οι όποιες λειτουργικές γενοματικές προσεγγίσεις έχουν γίνει (όπως αρκετά

μεγάλης κλίμακας ESTs, έκφραση γονιδίων και πρωτεομικές προσεγγίσεις) θεωρείται ότι θα επιτρέψουν μελλοντικά την εξειδικευμένη αναγνώριση γονιδίων/πρωτεϊνών που συγκεκριμένα εμπλέκονται σε σημαντικά βιολογικά φαινόμενα των πολυετών φυτών (Canovas et al. 2004).

Παρά τις δυσκολίες που παρουσιάζουν τα πολυετή φυτά ως προς τη μοριακή τους μελέτη (γονιδιακό/πρωτεϊνικό επίπεδο), ορισμένα φαινόμενα που καταλήγουν 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 J.V.Jorjín-Novo et al. (2008) ερεύνησαν σε πρωτεϊνικό επίπεδο το σχηματισμό του ξύλου στο γένος *Populus*, τόσο για τη καταγραφή και τη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων πρωτεϊνών όσο και για τη μελέτη της λειτουργίας και των αλληλεπιδράσεων των διαφόρων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη συγκεκριμένη διαδικασία. Κάνοντας χρήση της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων προσδιόρισαν αρκετά πρωτεϊνικά μόρια, είτε με μικροαλληλούχιση είτε με σύγκριση ESTs (Poplar EST database). Πρωτεΐνες που εξειδικευμένα εκφράζονται στο ξύλο αναγνωρίστηκαν με σύγκριση των 2-DE προφίλ μεταξύ φλοιού, νεαρού και ώριμου ξύλου.

#### **1.3.4. Η πρωτεομική στην ελιά**

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 μg/g NB ιστού) είτε από ενήλικους μορφολογικά βλαστούς (750 και 950 μg/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 επεξεργασίας 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 της δυσκολίας 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 et al. (2009) 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**

Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήσαμε επάκριους οφθαλμούς της ελιάς και συγκεκριμένα της ποικιλίας Καλαμών. Τα δένδρα από τα οποία συλλέξαμε το υλικό βρίσκονται στον Ελαιώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και είναι ηλικίας 25-30 ετών.

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 9 δειγματοληψίες από τις 14 Νοεμβρίου έως τις 14 Μαρτίου, σε 15μερα χρονικά διαστήματα.

Οι οφθαλμοί συλλέγονταν από ετήσια βλάστηση και από ολόκληρη την κόμη του δένδρου έτσι ώστε το δείγμα μας να είναι όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικό. Οι οφθαλμοί αφού κοβόταν από τους βλαστούς τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο για την αρχική συντήρηση και εν συνεχεία στην κατάψυξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$  έως την χρήση τους. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν πρωινές ώρες, από τις 8:00 έως 10:00 π.μ.

## 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:

Η εκχύλιση των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών έγινε ως εξής:

Αρχικά, γινόταν λειοτριβήση του ιστού που συντηρείτο στους  $-80^{\circ}\text{C}$  με την βοήθεια υγρού αζώτου. Οι συνθήκες λειοτριβήσης ήταν ασηπτικές. Τοποθετούσαμε τον λειοτριβημένο ιστό σε falcon. Προσθέταμε δεκαπλάσιο όγκο, σε σχέση με το βάρος του ιστού, διαλύματος εκχύλισης και κάναμε ανάδευση με vortex για 90 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

Ακολούθως, κάναμε φυγοκέντρηση σε 19000 g για 30 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια, παραλαμβάνουμε την υπερκείμενη φάση και την τοποθετούσαμε σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 ml. Σε κάθε σωλήνα βάζαμε για x ml εκχυλίσματος x ml χλωροφόρμιο/μεθανόλη (2:1) και αναμιγνύαμε με vortexing για 30 sec. Τέλος, προσθέταμε x ml 10% TCA-0.07% β-μερκαπτοαιθανόλη σε ακετόνη και επωάζαμε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για overnight. Έτσι πραγματοποιείται η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών.

Κατά την διαδικασία κατακρήμνισης δημιουργούνται τρεις φάσεις : I ) η υπερκείμενη υδατινή φάση (προέρχεται από το extraction buffer) , II ) η ενδιάμεση γαλακτωματώδης πρωτεϊνική φάση και III ) η υποκείμενη οργανική φάση (ακετόνη).

Την επόμενη μέρα, απομακρύνουμε την υπερκείμενη υδατινή φάση ενώ οι δύο άλλες φάσεις αναμιγνύονται με vortexing για 30 sec. Ακολούθως, τοποθετούσαμε τα διαλύματα σε όσο το δυνατόν λιγότερα eppendorfs των 1,5 ή 2 ml για να είναι πιο εύκολα στον χειρισμό. Σε κάθε eppendorf βάζαμε από 0,5 ml διαλύματος. Στη συνέχεια, ξεπλέναμε τρεις συνεχόμενες 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 και μετά αναμιγνύονταν οι άλλες δύο με vortexing για 30 sec και φυγοκεντρούνταν σε 10000 g για 6 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

Μετά τα παραπάνω ξεπλύματα η πρωτεϊνική φάση ήταν ενιαία ενώ η πρωτεϊνική ήταν με τη μορφή ιζήματος. Παρακάτω, απομακρύνουμε την υπερκείμενη φάση, ενώνουμε όλα τα eppendorfs σε ένα και προσθέταμε 1 ml διαλύματος ακετόνης-0.07% β-μερκαπτοαιθανόλη και κάναμε φυγοκέντρηση σε 10000 g για 6 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Παίρναμε το δείγμα και αφού του αφαιρούσαμε την υπερκείμενη

φάση, το τοποθετούσαμε για επώαση στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 15 min. Εν συνεχεία, ξαναπροσθέταμε 1 ml διαλύματος ακετόνης-0.07%  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη και κάναμε φυγοκέντρηση σε 10000 g για 6 min στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Τέλος, απομακρύναμε την υπερκείμενη φάση ενώ, παράλληλα, απομακρύναμε την περίσσεια ακετόνης με εφαρμογή ήπιου αέρα. Το ίζημα πρωτεϊνών που παραλαμβάναμε το τοποθετούσαμε για διατήρηση στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι και τη χρήση του.

Αξίζει να σημειωθεί πως τα δείγματα και τα διαλύματα κατά την χρήση τους βρισκόντουσαν εντός πάγου.

### **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%  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη, 1% PVP διαλυτή, 1% PVP αδιάλυτη, 10mM PMSF).

Ζυγίζαμε 1 g PVP διαλυτή και τη διαλύαμε σε 70 ml ddH<sub>2</sub>O. Προσθέταμε 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. Προσθέταμε 1 ml  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη και συμπληρώναμε με ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 100 ml. Το διάλυμα συντηρούταν στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Πριν τη χρήση του προσθέταμε 1 g PVP αδιάλυτη και 10 mM PMSF.

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

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

3) Διάλυμα 10% TCA-0,07%  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη σε ακετόνη.

Ζυγίζαμε 10 gr TCA και τα διαλύαμε σε 100 ml ακετόνη. Στη συνέχεια προσθέταμε 70  $\mu$ l  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη.

4) Υδατικό διάλυμα 10 % TCA.

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

5) Διάλυμα ακετόνης-0,07%  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη.

Σε 100 ml ακετόνης προσθέταμε 70  $\mu$ l  $\beta$ -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 απεσταγμένο 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  $K_2HPO_4$  1M και 38,8 ml  $KH_2PO_4$  1M. Γινόταν ρύθμιση του pH στο 7,0 .

Για την παρασκευή 50 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος διαλύσαμε 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 διαλύσαμε 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.

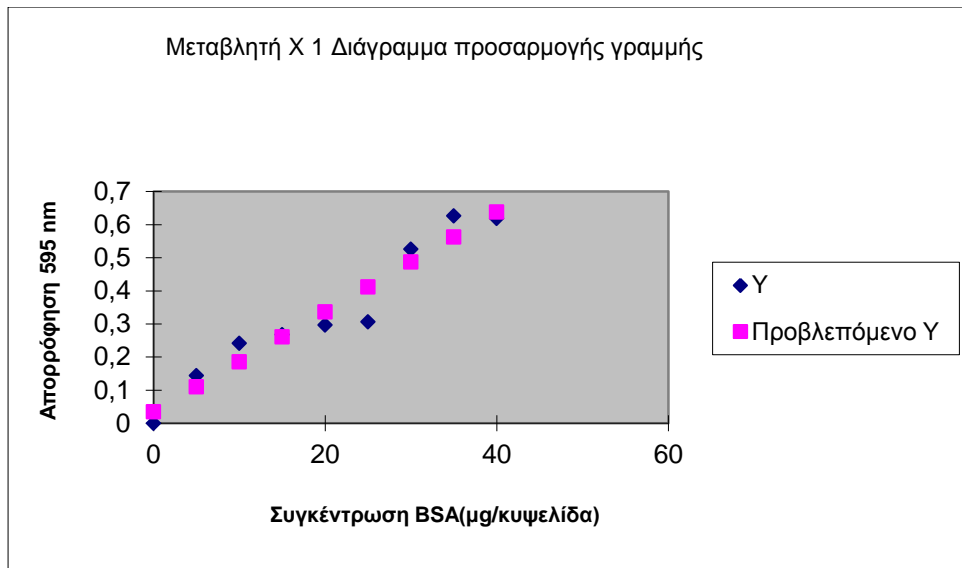
**Πίνακας 2.1:** Σειρά std διαλυμάτων (BSA) για την καμπύλη αναφοράς στη φωτομέτρηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

tube	Διάλυμα A (μl)	Συγκ/ση BSA στην κυψελίδα	Διάλυμα B (μl)	Όγκος A+B (μl)	Αντιδραστήριο Bradford (μl)	Τελικός όγκος κυψελίδα (ml)	στην
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 αντιδραστηρίου 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	0,128	0,127	0,177	0,144
10	0,254	0,233	0,236	0,241
15	0,270	0,252	0,281	0,268
20	0,309	0,289	0,291	0,29633333
25	0,319	0,296	0,304	0,30633333
30	0,554	0,508	0,514	0,52533333
35	0,556	0,630	0,693	0,62633333
40	0,618	0,618	0,619	0,61833333



$$\Psi=0,015092X+0,034304$$

*Διάγραμμα 2.1* : Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών.

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

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

Η SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) είναι μια ηλεκτροφορητική μέθοδος με την οποία πολυπεπτίδια 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)

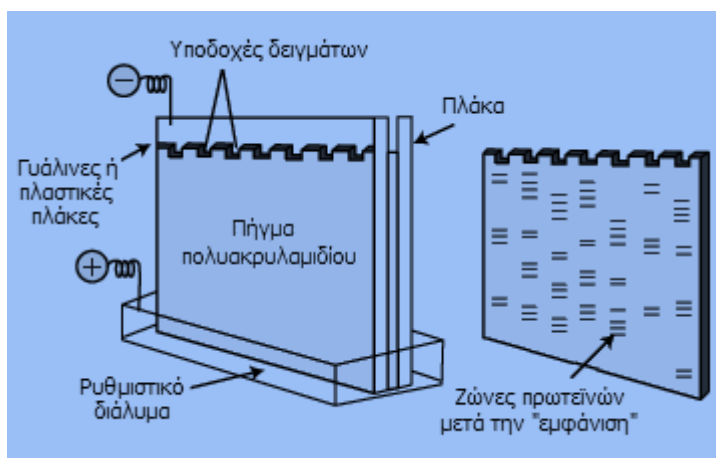
1. Σε κωνική φιάλη απαέρωσης θέταμε 25 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου.
2. Προσθέταμε 15 ml ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής διαχωρισμού και 600 μl διαλύματος 10% SDS.
3. Το μίγμα στη συνέχεια αραιώνονταν με 24 ml ddH<sub>2</sub>O και υποβάλλονταν σε απαέρωση με τη βοήθεια αντλίας νερού για 5 min περίπου.
4. Προσθέταμε 300 μl διαλύματος υπερθειϊκού 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 προετοιμάσαμε 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 υπερθειϊκού 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.

- Διαλύματα για την παρασκευή της πηκτής
- i. Διάλυμα ακρυλαμιδίου/N',N-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο (30,8 % T-2,7 % C<sub>Bis</sub> )  
Ζυγίζαμε 60 g ακρυλαμιδίου και τα διαλύαμε σε 150 ml ddH<sub>2</sub>O. Κατόπιν προσθέταμε 1,6 g N',N-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο και συμπληρώναμε 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 )  
Ζυγίζαμε 100 mg υπερθειϊκού αμμωνίου και τα διαλύαμε 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  
Ζυγίζαμε 10 g SDS και τα διαλύαμε 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 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.
- v. Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοιβαξης (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)  
Ζυγίζαμε 12 g Tris και τα διαλύαμε 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 διαλύαμε 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. Ακολουθώντας 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. Ακολουθώντας, 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.

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 διηθούνταν και προσθέταμε 35 ml οξικό οξύ. Συμπληρώναμε σε τελικό όγκο 1 L με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα συντηρούνταν 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.

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

Η χρώση με νιτρικό άργυρο ( $\text{AgNO}_3$ ) βασίζεται στην εξειδικευμένη δέσμευση των ιόντων σιδήρου στις σουλφιδρηνικές 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 πηκτική 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 πηκτική 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 πηκτική 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.

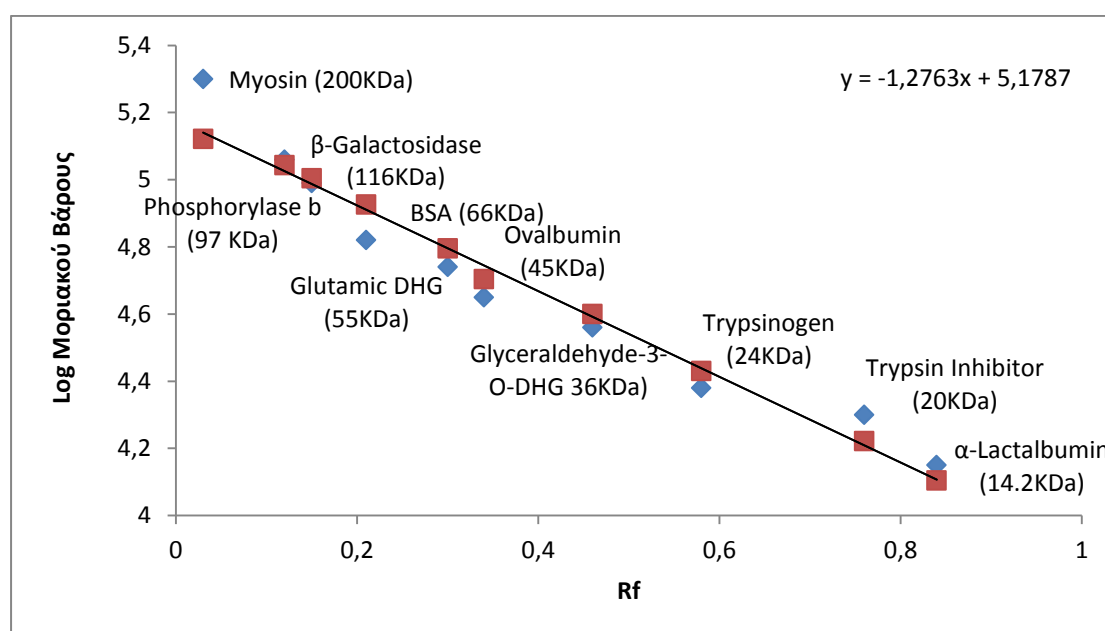
#### **2.4.5. Υπολογισμός μοριακού μεγέθους πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου**

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 πηκτική 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 πηκτώμα, 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 επιστοιβαξης, 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 αλφάδι 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.

#### *Διαδικασία παρασκευής πηκτής.*

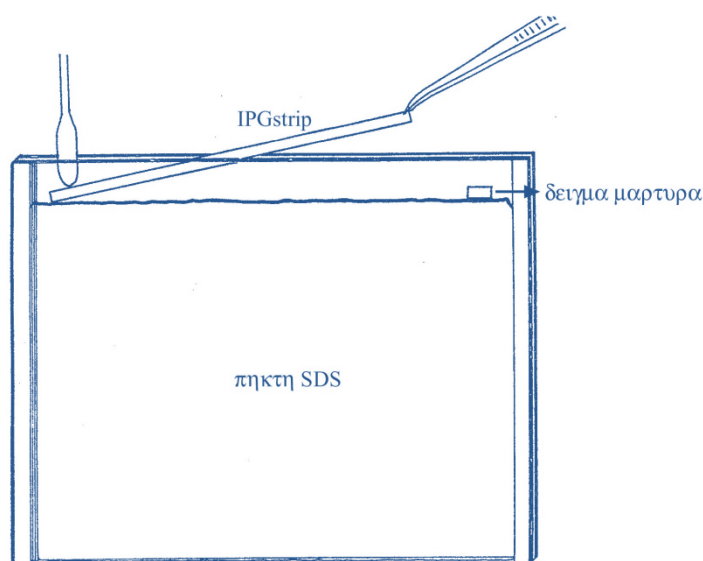
Στο στάδιο αυτό η πηκτική SDS που χρησιμοποιήθηκε για τη 2<sup>η</sup> διάσταση ήταν παρόμοια με αυτή που περιγράψαμε στην προηγούμενη παράγραφο. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι σ' αυτή την περίπτωση η πηκτική δεν διαθέτει περιοχή επιστοίβαξης. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μεγαλύτερη περιοχή διαχωρισμού των πρωτεϊνών καθώς και ευκολία στην τοποθέτηση του IPGstrip μεταξύ των γυάλινων πλακιδίων. Το πάχος της πηκτής ήταν 0,8 mm.

Η τοποθέτηση των IPGstrip γινόταν ως εξής :

Με τη βοήθεια μιας τσιμπίδας τοποθετήσαμε την μία άκρη του IPGstrip μεταξύ των γυάλινων πλακών και στη συνέχεια με μια σπάτουλα πιέσαμε το strip προς τα κάτω ώστε να έρθει σε πλήρη επαφή με τη πηκτική διαχωρισμού. Προσπαθήσαμε να αποφύγουμε τον εγκλωβισμό φυσαλίδων αέρα μεταξύ strip και πηκτής γιατί έτσι δεν θα υπάρξει μεταφορά πρωτεϊνών από τη μία διάσταση στην άλλη στα συγκεκριμένα σημεία.



Παράλληλα τοποθετήσαμε και δείγμα μαρτύρων 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.

Τέλος, ακινητοποιήσαμε το IPGstrip με διάλυμα 0.5 % αγαρόζης μέχρι ενός ύψους 2 mm πάνω από το strip. Η ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιήθηκε είχε ένταση 50 mA και 300V για 2-3 h περίπου.

Ακολούθησε χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο όπως περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο.

### **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. Μακροσκοπική εικόνα της εξέλιξης των οφθαλμών

Αναφέρθηκε ήδη στο φυτικό υλικό ότι χρησιμοποιήθηκαν τρία δέντρα. Αναλυτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από το δέντρο Α. Στις φωτογραφίες που ακολουθούν καταγράφεται η πορεία της ανάπτυξης των επάκριων οφθαλμών.



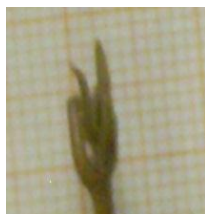
14/11 :Δεν παρατηρήθηκε  
καμία έκπτυξη



1/12: Δεν παρατηρήθηκε  
καμία έκπτυξη



15/12: Έναρξη της  
έκπτυξης



3/01: Συνέχιση της  
ανάπτυξης



17/01: Συνέχιση της  
ανάπτυξης



31/01: Συνέχιση της  
ανάπτυξης



14/02: Παρόμοια με την  
προηγούμενη εικόνα



28/02: Παρόμοια με την  
προηγούμενη εικόνα



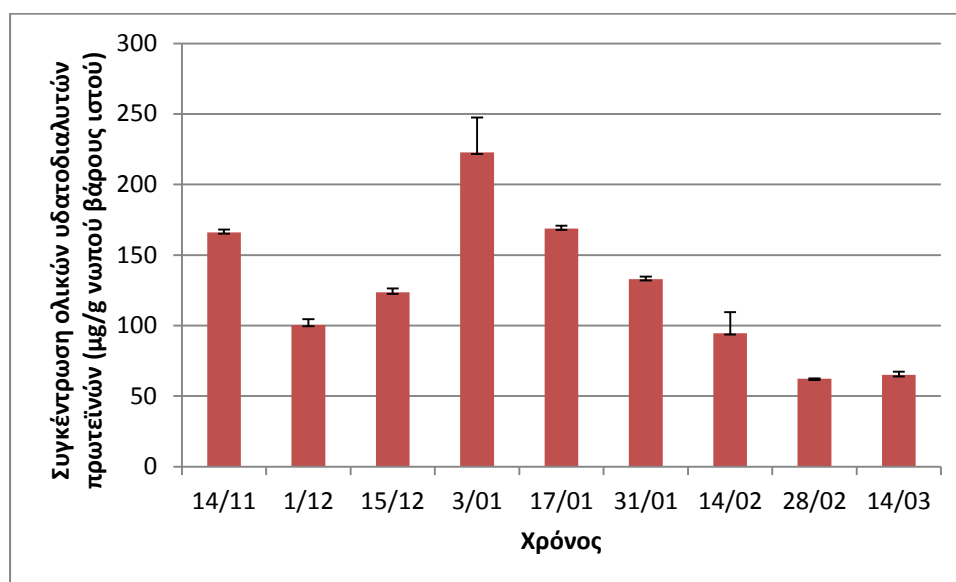
14/03: Έντονη αύξηση  
της έκπτυξης

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

Παρατηρήσαμε έναρξη της έκπτυξης των ακραίων οφθαλμών στις 15/12. Σταδιακά είχαμε βραδεία συνεχή ανάπτυξη. Στις 14/3 είχαμε εμφανή αύξηση της έκπτυξης συγκριτικά με το προηγούμενο διάστημα.

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

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



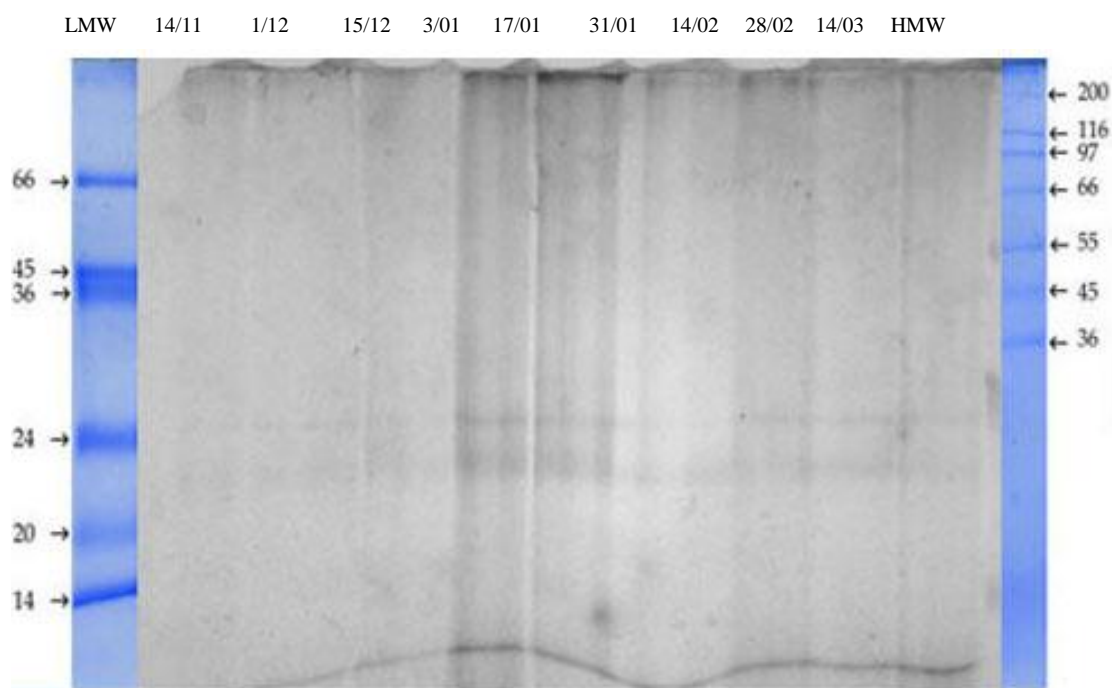
Διάγραμμα 3.1 : Η πορεία της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών την περίοδο από μέσα Νοεμβρίου έως μέσα Μαρτίου.

Η στάθμη των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών για το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου-Μαρτίου κυμάνθηκε μεταξύ 62,30 μg/g νωπού βάρους (στις 28/2) και 222,65 μg/g νωπού βάρους (στις 03/1). Η ανάλυση της παράλλαξης έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφόρων ημερομηνιών δειγματοληψιών. Η γενική εικόνα της καμπύλης παρουσιάζει τρία ελάχιστα στις 1/12, 28/2 και 14/3. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών διατηρήθηκε σε σταθερά σχετικά επίπεδα από 28/2 έως

14/3 ( $\approx 62,3$   $\mu\text{g/g}$  νωπού βάρους ιστού) και η μέγιστη παρατηρήθηκε στις 3/1 με 222,65  $\mu\text{g/g}$  νωπού βάρους ιστού).

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

Στις εικόνες 3.2 και 3.3 παρουσιάζεται η πηκτή SDS-PAGE των επάκριων οφθαλμών της ελιάς στο δέντρο A, 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 επάκριους οφθαλμούς της ποικιλίας Καλαμών την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου. Χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250 (LMW: χαμηλού MB μάρτυρας, HMW: υψηλού MB μάρτυρας).

LMW 14/11 1/12 15/12 3/01 17/01 31/01 14/02 28/02 14/03 HMW



**Εικόνα 3.3:** SDS-PAGE στους επάκριους οφθαλμούς της ποικιλίας Καλαμών 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 3 έως 7 για το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου-Μαρτίου (**Πίνακας 3. 1**).

Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν κυμάνθηκε από 10 έως 100 KDa περίπου. Οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες (7) αποκαλύφθηκαν στα μέσα Νοεμβρίου έως αρχές Ιανουαρίου. Σε όλες τις ημερομηνίες οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες έχουν χαμηλά Μοριακά Βάρη από 37 έως 10 kDa περίπου. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες ζώνες ήταν αυτές των 31 kDa, 28 kDa και 24 kDa (9 φορές, 7 φορές και 5 φορές αντίστοιχα). Στα μεγάλα μοριακά βάρη αποκαλύφθηκαν δυο πρωτεϊνικές ζώνες με μεγέθη από 90 kDa (στις 3/01) έως 102 kDa(στις 1/12) περίπου. Στα χαμηλά μοριακά βάρη, δυο πρωτεϊνικές ζώνες 11 kDa και 10 kDa περίπου εντοπίστηκαν σε όλες σχεδόν τις ημερομηνίες. Οι πιο ισχυρά εμφανιζόμενες πρωτεΐνες εμφανίστηκαν γύρω στα 36, 32, 27 και 24 kDa περίπου.

Καθ' όλες τις ημερομηνίες παρουσιάστηκαν επίσης, όπως φαίνεται από τον **Πίνακα 3.1**, ευδιάκριτες πρωτεϊνικές ζώνες από 31 kDa έως 24 kDa. Ακόμη μια ζώνη των 80 kDa περίπου εμφανίστηκε μόνο στις 14/11. Μια αρκετά ευδιάκριτη ζώνη με μοριακό βάρος 37 kDa περίπου εμφανίστηκε την ημερομηνία 14 Νοεμβρίου. Τέλος

εμφανίστηκε μια ομάδα πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους 16, 15, 14,13,11 και 10 kDa. Η ζώνη των 16 kDa εμφανίζεται στις 15 Δεκεμβρίου και μετά στις 28/2 . Η ζώνη των 15 kDa εμφανίζεται μόνο στις 14 Νοεμβρίου, η ζώνη των 11 KDa από 1/12 έως 3/1 και η ζώνη των 10 KDa από 17/1 έως 14/3.

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		102408								100
2	99879		97412	90370	90370					90
3	82795									80
4				67781						67
5	37189									37
6	30067	<b>30067</b>	32007	31609	31216	31851	31851	31609	30828	31
7				<b>27204</b>	27547	<b>27424</b>	28244	<b>27204</b>	28244	28
8	<b>24308</b>	<b>24308</b>	<b>23112</b>	24308		24308				24
9							19167			19
10			17127					16704		16
11	15304									15
12	12686	13847	12686	12686	11623	12686				13
13		11336	11336	11336						11
14						10386	<b>10386</b>	10649	<b>10649</b>	10

*Πίνακας 3.1:* Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών ζωνών που απομονώθηκαν στους επάκτριους οφθαλμούς της ελιάς για το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου-Μαρτίου. Με έντονη γραμματοσειρά σημειώνονται οι πιο έντονες πρωτεϊνικές ζώνες.

### **3.4. Ανάλυση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2-DE)**

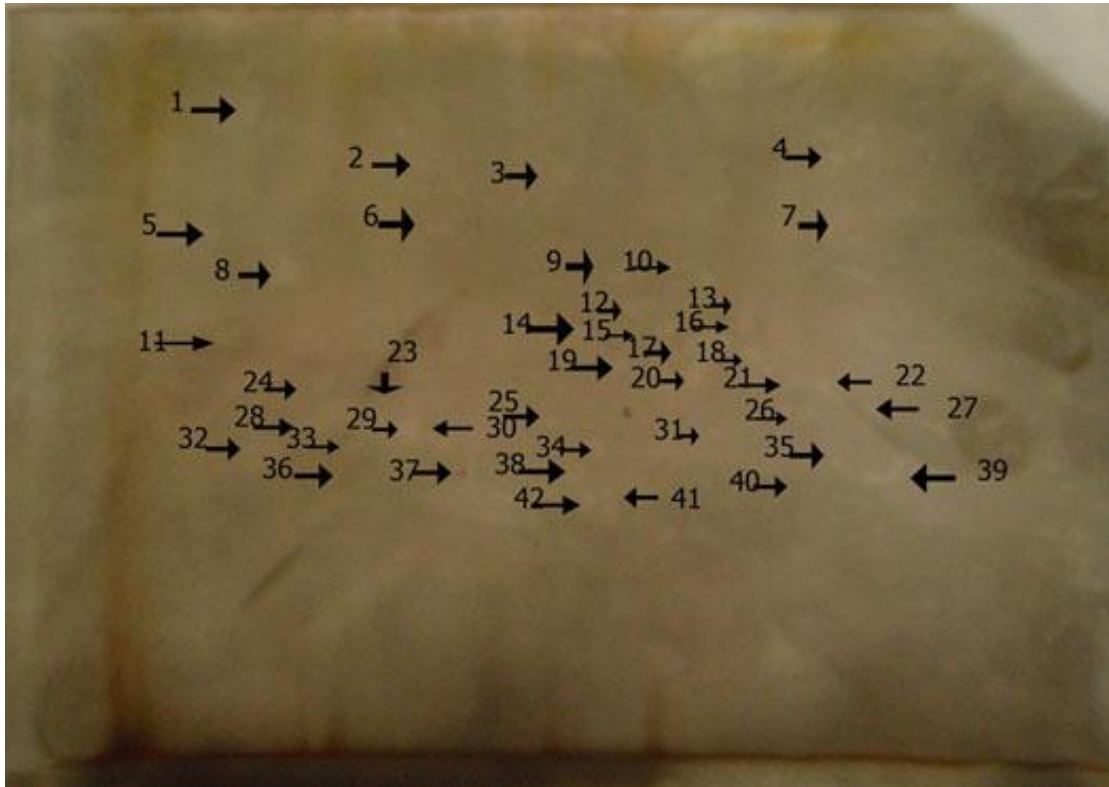
Η τελική μελέτη των οφθαλμών της ελιάς περιελάμβανε όπως προείπαμε ανάλυση με ηλεκτροφόρηση δύο-διαστάσεων. Η 2-DE πραγματοποιήθηκε σε IPGstrip pH 4-7, μήκους 13 cm όσον αφορά τη 1<sup>η</sup> διάσταση ενώ η 2<sup>η</sup> σε 12.5% πηκτή κατακόρυφης συσκευής.

Τα τελικά ηλεκτροφορήματα χρωματίστηκαν με νιτρικό άργυρο. Για τη 2-DE επιλέξαμε τρεις διαφορετικές ημερομηνίες για να καλύψουμε όλο το εύρος της δειγματοληψίας. Στις εικόνες 3.5, και 3.6 και 3.7 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 κατανομή των κηλίδων εντοπίστηκε σε πιο όξινη ζώνη στις 28/02. Η 2-DE ανάλυση με το Photoshop αποκάλυψε τις περισσότερες πρωτεϊνικές κηλίδες τον μήνα Νοέμβριο (42 κηλίδες). Ως προς την δεύτερη διάσταση για τις 14/11 το σύνολο των πρωτεϊνών συγκεντρώνεται στην περιοχή 24 έως 100 kDa περίπου, για τις 31/1 από 17 έως 85 kDa και για τις 28/2 από 12 έως 97 kDa. Το σύνολο των πρωτεϊνικών κηλίδων που εντοπίσαμε ήταν 42 κηλίδες στις 14/11, 39 κηλίδες στις 31/1 και 37 επίσης κηλίδες στις 28/2 (*Πίνακες 3.2, 3.3 και 3.4*).

pH: 4.0

pH: 7.0

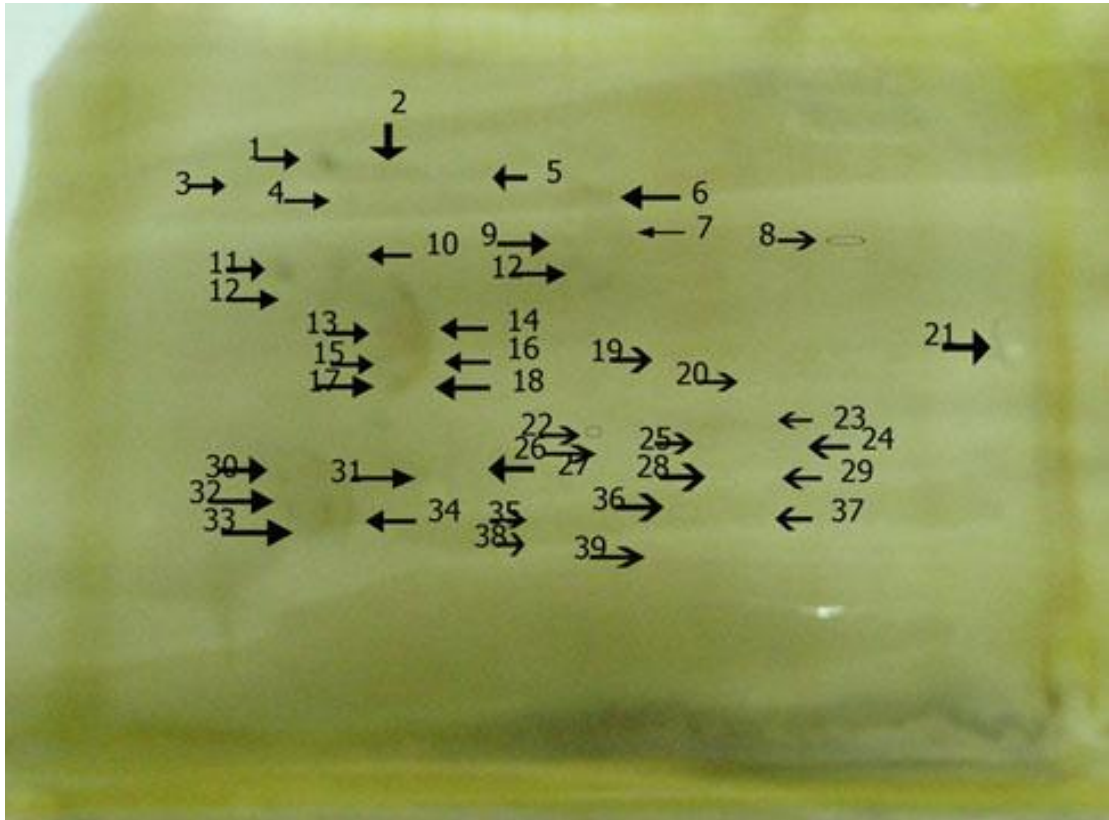


**Εικόνα 3.4:** 2-DE στους επάκριους οφθαλμούς ελιάς ημερομηνίας 14 Νοεμβρίου. Στην 1<sup>η</sup> διάσταση χρησιμοποιήθηκε I-PGstrip pH 4-7, 13cm. Η 2<sup>η</sup> διάσταση έγινε σε κατακόρυφο σύστημα. Η χρώση της πηκτής έγινε με Νιτρικό Άργυρο.



pH: 4.0

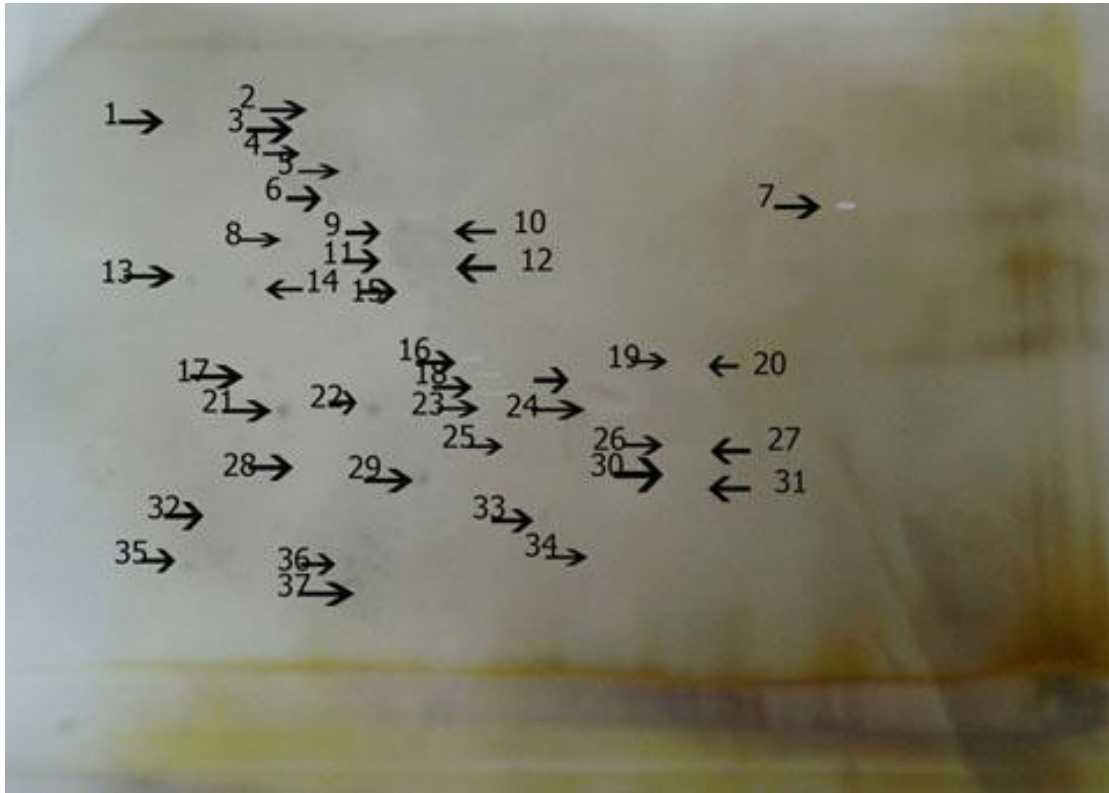
pH: 7.0



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

pH: 4.0

pH: 7.0



Εικόνα 3.6: 2-DE στους επάκριους οφθαλμούς της ελιάς στις 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 (Με έντονη γραμματοσειρά σημειώνονται οι πιο έντονες πρωτεϊνικές κηλίδες).

14/11			
α/κ	MW(kDa)/PI	α/κ	MW(kDa)/PI
1	99/5,11	22	36/6,90
2	<b>80/5,41</b>	23	<b>35/5,65</b>
3	<b>79/6,10</b>	24	<b>35/5,12</b>
4	<b>83/6,99</b>	25	<b>30/4,84</b>
5	<b>61/4,96</b>	26	<b>30/6,96</b>
6	64/5,51	27	<b>32/6,90</b>
7	64/6,11	28	29/5,49
8	53/5,12	29	28/5,65
9	52/6,5	30	28/6,12
10	54/6,84	31	27/6,95
11	40/4,96	32	27/5,08
12	46/6,80	33	<b>27/5,12</b>
13	47/6,85	34	<b>27/6,13</b>
14	42/6,11	35	27/6,90
15	41/4,99	36	<b>26/4,99</b>
16	42/5,12	37	26/5,99
17	40/5,98	38	26/5,84
18	39/4,92	39	<b>26/6,99</b>
19	38/6,51	40	25/6,98
20	35/5,91	41	<b>24/6,14</b>
21	<b>35/6,37</b>	42	<b>24/5,91</b>
Σύνολο κηλίδων			
42			

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

31/1			
α/κ	MW(KDa)/PI	α/κ	MW(KDa)/PI
1	82/4,99	21	41/6,12
2	85/5,99	22	31/6,81
3	76/4,36	23	32/6,91
4	71/4,98	24	30/6,97
5	76/5,91	25	30/6,98
6	71/6,45	26	30/6,11
7	64/6,45	27	27/6,72
8	63/6,89	28	26/6,93
9	62/6,12	29	<b>26/6,99</b>
10	59/5,33	30	28/5,11
11	56/5,11	31	28/5,32
12	54/5,12	32	<b>24/5,12</b>
13	<b>45/5,36</b>	33	<b>18/5,29</b>
14	47/5,41	34	23/5,32
15	40/5,36	35	23/5,72
16	40/5,41	36	24/6,99
17	36/5,36	37	23/6,99
18	36/5,41	38	17/5,72
19	39/6,81	39	17/6,58
20	38/6,12		
Σύνολο κηλίδων 39			

**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 (Με έντονη γραμματοσειρά σημειώνονται οι πιο έντονες πρωτεϊνικές κηλίδες).

28/2			
α/κ	MW(KDa)/PI	α/κ	MW(KDa)/PI
1	92/4,59	21	<b>31/5,09</b>
2	97/4,99	22	<b>33/5,92</b>
3	90/4,99	23	<b>33/5,98</b>
4	<b>84/5,19</b>	24	<b>32/6,51</b>
5	<b>78/5,23</b>	25	28/6,09
6	70/5,21	26	<b>28/6,37</b>
7	<b>64/6,99</b>	27	<b>27/6,89</b>
8	59/5,11	28	25/5,11
9	60/5,61	29	<b>24/5,54</b>
10	60/5,88	30	24/6,97
11	54/5,61	31	23/6,99
12	53/5,78	32	21/5,03
13	<b>53/4,99</b>	33	21/6,11
14	<b>51/5,52</b>	34	<b>17/6,51</b>
15	<b>47/5,61</b>	35	<b>17/4,99</b>
16	<b>38/5,88</b>	36	<b>15/5,92</b>
17	<b>36/4,99</b>	37	12/5,92
18	<b>35/4,98</b>		
19	<b>36/6,47</b>		
20	<b>36/5,87</b>		
Σύνολο κηλίδων			
37			

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 και οι λιγότερες στην πηκτή ημερομηνίας 14 Μαρτίου, δηλαδή όταν είχε γίνει πια η διαφοροποίηση και το δέντρο θα έμπαινε στην φάση της άνθησης. Οι πηκτές των ημερομηνιών αυτών είχαν κοινές πρωτεϊνικές κηλίδες οι οποίες παρουσιάζονται έντονες (64, 47, 38, 36, 32, 28, 27 και 24 kDa ). Υπάρχουν βέβαια και πρωτεΐνες οι οποίες κινήθηκαν σε κοντινά επίπεδα (Πίνακας 3.5). Επίσης υπάρχουν πολλές κοινές πρωτεΐνες στην πηκτή των ημερομηνιών μεταξύ 14/11 και από 31/01.

Τέλος συγκρίνοντας τις ημερομηνίες αυτές παρατηρήσαμε ότι στην δεύτερη και τρίτη δεν είχαμε πλήθος πρωτεϊνικών κηλίδων μεγάλου μοριακού βάρους σε αντίθεση με την πρώτη ημερομηνία στις 14/11 όπου υπάρχουν κηλίδες με μεγαλύτερο Μοριακό Βάρος φαινόμενο που παρατηρήσαμε και στις αντίστοιχες πηκτές της SDS-PAGE.

**Πίνακας 3.5:** Οι συντεταγμένες (MW/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
99/5,11	85/5,41	97/4,99
83/6,99	82/4,99	92/4,59
80/5,41	76/4,99-6,11	90/4,99
79/6,10	71/5,34-6,45	84/5,19
64/5,51-6,99	64/6,45	78/5,23
61/4,96	63/6,89	70/5,21
54/6,84	62/6,12	64/6,99
53/5,12	59/5,33	61/5,61-5,98
52/6,5	56/5,11	59/5,11
47/6,95	54/5,12	54/5,61
46/6,90	47/5,41	53/4,99-5,98
42/6,11-6,12	45/5,36	51/5,52
41/5,99	41/6,12	47/5,71
40/5,96-5,98	40/5,36-5,41	38/5,98
39/4,92	39/6,58	36/4,99-6,47
38/6,51	38/6,88	35/5,98
36/6,90	36/5,36-5,41	33/5,92-5,98
35/5,12-6,97	32/6,91	32/6,51
32/7,20	31/6,81	31/5,09
30/6,96-4,84	30/6,11-6,97	28/6,09-6,37
29/5,49	28/5,11-5,32	27/7,10
28/5,65	27/6,72	25/5,11
27/5,08-6,99	26/6,23-6,99	24/5,54-6,97
26/4,99-7,3	24/5,12-6,99	23/6,99
25/6,98	23/5,32-6,99	21/5,03-6,11
24/6,11-6,94	18/5,29	17/6,51
	17/5,72-6,58	15/5,92
		12/5,92

#### **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Αναφέρθηκε ήδη ότι η ελιά καρποφορεί σε βλαστούς του προηγούμενου έτους οι οποίοι έχουν μέτρια ζωηρότητα.. Η ελιά φέρει ξυλοφόρους και μικτούς ανθοφόρους οφθαλμούς. Οι ξυλοφόροι φέρονται επάκρια και πλάγια στις μασχάλες των φύλλων, ενώ οι μικτοί ανθοφόροι φέρονται πλάγια στις μασχάλες των φύλλων και πάρα πολύ σπάνια επάκρια. Οι ξυλοφόροι όταν εκπτυχθούν την άνοιξη, δίνουν βλάστηση, ενώ οι μικτοί ανθοφόροι δίνουν μικρή βλάστηση και άνθη σε βοτρυώδη ταξιανθία. Η διαφοροποίηση των ξυλοφόρων οφθαλμών της ελιάς κατά τη διάρκεια του χειμώνα είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ανάπτυξη της βλάστησης που θα πραγματοποιηθεί κατά τη διάρκεια της άνοιξης (Μπαλατσούρας, 1992).

Ο χρόνος της έκπτυξης συνδέεται με την πρωιμότητα της ανάπτυξης αλλά και την αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες. Το μήκος της βλάστησης που θα προκύψει καθορίζει την καρποφορία την επόμενη χρονιά και επομένως έχει ιδιαίτερη σημασία. Σημαντική, επίσης, είναι και η μεριστωματική δραστηριότητα πριν και κατά την έκπτυξη των ακραίων οφθαλμών. 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).

Από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στους επάκριους οφθαλμούς της ελιάς για την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου, διαπιστώθηκε αρκετά υψηλή στάθμη στα δείγματα Νοεμβρίου και Ιανουαρίου. Επίσης αρκετές πρωτεΐνες εντοπίστηκαν την περίοδο του χειμώνα. Από την μέθοδο Bradford που χρησιμοποιήσαμε για τον προσδιορισμό των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στους επάκριους οφθαλμούς διαπιστώσαμε ότι η πορεία της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών φαίνεται να έχει κυματοειδή μορφή με τα μέγιστα να παρουσιάζονται στα μέσα Νοεμβρίου και αρχές Ιανουαρίου, ενώ τα ελάχιστα στις αρχές Δεκεμβρίου, στα τέλη Φεβρουαρίου και αρχές Μαρτίου. Η κατάσταση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στο ρυθμό της μεριστωματικής δραστηριότητας είτε στις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούσαν κατά την διάρκεια των δειγματοληψιών που ενδεχομένως επηρέαζαν την μεριστωματική δραστηριότητα. Είναι γνωστή η καθοριστική επίδραση της θερμοκρασίας στην μεριστωματική δραστηριότητα (Gimenez-Martins et al. 1977). Οι θερμοκρασίες που



επικρατούσαν κατά την διάρκεια των δειγματοληψιών δεν ήταν ακραίες και κυμαίνονταν μέσα στα όρια των θερμοκρασιακών αντοχών της ελιάς. Επομένως, οι μεταβολές που πραγματοποιούνται στις συγκεντρώσεις των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών πρέπει να οφείλονται σε ενδογενής παράγοντες.

Σε σύγκριση των αποτελεσμάτων μας, με τα αποτελέσματα της Στεφάνου (2012), παρατηρήσαμε ότι η στάθμη των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στους πλάγιους οφθαλμούς έχει και αυτή κυματοειδή μορφή αλλά είναι υψηλότερη συγκριτικά με τους επάκριους. 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) και Γιαννόπουλος 2011 . Ότι δηλαδή τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών κυμαίνονται σε περιοχές με χαμηλά μοριακά βάρη. Υπήρχαν τέσσερις πρωτεϊνικές ζώνες οι οποίες εμφανίζονταν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (32, 28, 27, και 24 kDa). Αυτές οι πρωτεΐνες πρέπει να σχετίζονται με μεταβολικές διεργασίες που συμβαίνουν στα μεριστώματα αυτά την περίοδο που μελετήσαμε.

Η Στεφάνου (2012) παρατήρησε επίσης πρωτεϊνικές ζώνες και στους πλάγιους οφθαλμούς της ελιάς καλαμών. Τέτοιες πρωτεΐνες θα μπορούσαν να είναι δομικές ή να σχετίζονται με τον βασικό μεταβολισμό των μεριστωματικών κυττάρων.

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 επάκριους οφθαλμούς την περίοδο Νοεμβρίου-Μαρτίου.

Παρατηρήθηκε πάντως και η περιοδική εμφάνιση κάποιων πρωτεϊνών (102, 90, 15 kDa). Τέτοιες πρωτεΐνες οι οποίες συσσωρεύονται και εξαφανίζονται στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες (Chen et al., 2009). Οι Smalle και Vierstra (2004) αναφέρουν συσσώρευση πρωτεϊνικής κινάσης και άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών στο *Dimocarpus longan* σε ανθοφόρους οφθαλμούς.

Μεγαλύτερο, ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι την περίοδο που εμφανίζονται οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες (αποτελέσματα SDS-PAGE

ανάλυση) παρουσιάζονται και οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών (αποτελέσματα από την Bearden) καθώς και το αντίστροφο.

Παρατηρήσαμε τον μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνικών ζωνών την περίοδο μέσα Νοεμβρίου και αρχές Ιανουαρίου γεγονός που υποδηλώνει ότι την περίοδο αυτή πραγματοποιούνται ιδιαίτερα σημαντικές διεργασίες στους επάκριους οφθαλμούς. Επίσης η μακροσκοπική εικόνα των επάκριων οφθαλμών αποκάλυψε έναρξη της έκπτυξης μέσα Δεκεμβρίου με αρχές Ιανουαρίου. Άρα οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες που εμφανίζονται την περίοδο αυτή θα πρέπει να σχετίζονται με τις κυτταρικές διαιρέσεις και αύξηση κυττάρων που είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την έκπτυξη οφθαλμών.

Ο αριθμός των πρωτεϊνικών κηλίδων που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο 2-DE είναι 42, 39 και 37 για τις ημερομηνίες 14/11, 31/01 και 28/02 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματά μας είναι παραπλήσια με αυτά που αναφέρει ο Ανδρεάδης (2006) επίσης για τους οφθαλμούς της ελιάς, (περίπου 50 κηλίδες) ενώ οι Wang et al. (2003) αναφέρουν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό κηλίδων (περίπου 150) σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς.

Ο πολύ μικρός αριθμός κηλίδων που ως τώρα έχουν αναφερθεί για ανάλυση ιστών ελιάς (Ανδρεάδης 2006, Wang et al., 2003, Κατσίβα 2010, δικά μας αποτελέσματα) συγκριτικά με άλλης προέλευσης φυτικών ιστών (οι Ahsan και Komatsu, 2009 σε φύλλα σόγιας ανίχνευσαν 500 πρωτεϊνικές κηλίδες με 2-DE ανάλυση) είναι βεβαίως απόρροια και του πρωτόκολλου καθαρισμού που πρέπει να ακολουθηθεί ώστε να καταλήξουμε σε αξιολογήσιμα αποτελέσματα. Είναι χαρακτηριστικό ότι ο Ανδρεάδης χρησιμοποιώντας παρόμοιο πρωτόκολλο σε ρίζες καλαμποκιού προσδιόρισε περί τις 350 κηλίδες με την 2-DE ανάλυση.

Αναφέρθηκε ήδη στα αποτελέσματα ότι η 2-DE στους ιστούς επάκριων οφθαλμών της ελιάς έγινε σε τρεις περιόδους ( μέσα Νοεμβρίου, τέλος Ιανουαρίου και τέλος Φεβρουαρίου). Υπάρχει βεβαίως κάποια επιφύλαξη για το ποσοστό των απωλειών των πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία καθαρισμού των δειγμάτων και αν αυτή είναι παρόμοια και στις τρεις περιόδους, λόγω των δυσχερειών στις τεχνικές που αναφέρθηκαν παραπάνω. Με την παραδοχή ότι αυτές ήταν παρόμοιες θα πρέπει να σημειώσουμε ότι και εδώ (όπως και από την SDS ανάλυση) προκύπτει το συμπέρασμα ότι συμβαίνουν διαφορετικές διεργασίες στους μήνες Νοέμβριο-Ιανουάριο και Φεβρουάριο στους επάκριους οφθαλμούς της ελιάς (πέρα από τις βασικές μεταβολικές διεργασίες). Σ' αυτό το συμπέρασμα μας οδηγεί και η

διαπίστωση ότι υπήρχαν αρκετές διαφορετικές κηλίδες στις αναλύσεις των επάκριων οφθαλμών στις τρεις ημερομηνίες.

Σε σύγκριση των αποτελεσμάτων μας, με τα αποτελέσματα της Στεφάνου (2012) για τους πλάγιους οφθαλμούς, παρατηρήσαμε ότι οι επάκριοι οφθαλμοί παρουσίασαν ένα αριθμό κηλίδων μικρότερο από τους πλάγιους οφθαλμούς. Η κατάσταση υποδηλώνει ότι στους πλάγιους συμβαίνουν πιο πολύπλοκα γεγονότα απ' ότι στους επάκριους.

Ακόμα, οι κηλίδες διαπιστώθηκαν σε όλο το εύρος του pH (4-7). Η μεγαλύτερη κατανομή των κηλίδων εντοπίστηκε σε πιο όξινη ζώνη στις 28/02. Ανάλογη εικόνα παρουσιάζεται και από 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 pI. (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).

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

## **5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

1. Η μακροσκοπική εικόνα των επάκριων οφθαλμών αποκάλυψε έναρξη της έκπτυξης των επάκριων οφθαλμών μέσα Δεκεμβρίου με αρχές Ιανουαρίου. Έντονη αύξηση της έκπτυξης παρατηρήθηκε στα μέσα Μαρτίου.
2. Η όλη πορεία της στάθμης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στους επάκριους οφθαλμούς παρουσιάζει μέγιστα στα μέσα, περίπου, του Νοεμβρίου και προς τις αρχές Ιανουαρίου και ελάχιστα στις αρχές Δεκεμβρίου, στο τέλος Φεβρουαρίου και μέσα Μαρτίου.
3. Παρατηρήθηκαν πρωτεΐνες με μεγάλα και μικρότερα μοριακά βάρη. Το μεγαλύτερο μοριακό βάρος ήταν περίπου 102 kDa και το μικρότερο 10 kDa.
4. Η πλειονότητα των πρωτεϊνών είχε χαμηλά μοριακά βάρη.
5. Οι πιο ισχυρά εκφραζόμενες πρωτεΐνες είναι εκείνες που εμφανίζονται με τη μεγαλύτερη συχνότητα (36, 32, 27 και 24 kDa).
6. Με την 2-DE ανάλυση προσδιορίστηκαν 42, 39 και 37 πρωτεϊνικές κηλίδες, στις 14 Νοεμβρίου, 31 Ιανουαρίου και 28 Φεβρουαρίου αντίστοιχα.
7. Ως προς τα μοριακά βάρη, το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών συγκεντρώθηκε στις τιμές από 12 έως 99 kDa.
8. Σε όλες τις περιπτώσεις το σύνολο σχεδόν των πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται από χαμηλές τιμές pIs, που κυμαίνονται από 4 έως 7. Η κατανομή των κηλίδων εντοπίστηκε σε πιο όξινη ζώνη στις 28/02.
9. Διαπιστώθηκαν οκτώ (8) κοινές πρωτεϊνικές κηλίδες στις αναλύσεις των επάκριων 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. **Κατσίβα, 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. **Στεφάνου, Μ. 2012.** Μελέτη των πρωτεϊνών στους ανθοφόρους οφθαλμούς της ελιάς ποικιλίας καλαμών (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. Biocchimica et Biiophysica 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. **Chand, B. G. and Cain, J. C. 1967.** The effect of seed formation on subsequent flowering in apple. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 91: 63-68.
23. **Chen, S., Liu, H., Chen, W., Xie, D. and Zheng, S. 2009.** Proteomic analysis of differentially expressed proteins in longan flowering reversion buds. *Sci. Hortic.* 122: 275–280
24. **Crawford, K. and Zambryski, P. 1999.** Phylem transport: Are you chaperoned? *Curr. Biol.* 9: R281-R285
25. **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.
26. **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.

27. **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.
28. **Fabbri, A. and Benelli C. 2000.** Flower bud induction and differentiation in olive. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 75 (2): 131-141.
29. **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.
30. **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.
31. **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.
32. **Hacket, W. P. and Hartman, H. T. 1967.** The influence of temperature on floral initiation in the olive. *Plant Physiology.* 20: 430-436.
33. **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.
34. **Hartman, H. T. 1953.** Effect of winter chilling on fruitfulness and vegetative growth in the olive. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 62: 184-190.
35. **Hartman, H. T., 1951.** Time of floral differentiation of the olive in California. *Botanica Gazette.* 112: 323-327.
36. **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.
37. **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
38. **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.

- 39. Pinney, K. And V. S. Polito. 1990.** Flower initiation in “Manzanillo” olive. *Acta Horticulture*.
- 40. 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.
- 41. Saupe, D. S. 2001.** Flowering.<http://employees.csbsju.edu/ssaupe/biol327/flowering.ht>
- 42. Shaw, M. M and Riederer, B. M. 2003.** Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 3: 1408-1417.
- 43. Sheila McCormick, 2004.** Control of Male Gametophyte Development. *The Plant Cell*, Vol. 16, S142-S153.
- 44. Simson, R. J. 2003.** Proteins and proteomics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, ISBN: 0-87969-553-6.
- 45. Taiz, L. and E. Zeiger. 1998.** *Plant Physiology*. 2<sup>nd</sup> edition.
- 46. Taiz, L. and E. Zeiger. 2002.** *Plant Physiology*. 3<sup>rd</sup> edition
- 47. Taiz, L., Zeiger, E., 2006.** *Plant Physiology*. 3<sup>rd</sup> edn, Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland.
- 48. 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.
- 49. 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.
- 50. 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.
- 51. 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.
- 52. World Catalogue of Olive Varieties. 2000.**
- 53. Yadegari Ramin and Drews N. Fary, 2004.** Female Gametophyte Development. *The Plant Cell*, Vol. 16, S133-141.



54. **Amersham Biosciences, 2004.** 2-D Electrophoresis, Principles and methods.
55. **Hofer, 1994.** Protein electrophoresis application guide.
56. **Sigma, 2003.** Biochemicals and reagents.
57. **Sigma, 1994.** Electrophoresis.

Πηγές από το διαδίκτυο:

58. <http://www.internationaloliveoil.org>
59. <http://www.iama.gr/ethno/mytilini/taxtalidou.html>
60. <http://www.aua.gr/roussos/Roussos>
61. <http://www.elais.gr>
62. <http://www.iama.gr/ethno/mytilini/moulas.html>

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

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

Sampling Date	Sample Fresh Weight (mg)	Sample Buffer Volume (μl)	Volume used in cuvette (μl)	Phosphate solution (μl)	Absorbance Replicate I	Absorbance Replicate II	Absorbance Replicate III
14/11	0,300	300	100	1400	0,280	0,285	0,290
01/12	0,300	300	100	1400	0,174	0,194	0,190
15/12	0,300	300	100	1400	0,212	0,224	0,226
3/01	0,300	300	100	1400	0,306	0,436	0,369
17/01	0,300	300	100	1400	0,284	0,289	0,294
31/01	0,300	300	100	1400	0,238	0,230	0,237
14/02	0,300	300	100	1400	0,137	0,179	0,215
28/02	0,300	300	100	1400	0,129	0,128	0,128
14/03	0,300	300	100	1400	0,127	0,139	0,131

*Πίνακας 2 :* Τα Rf των μαρτύρων υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκαν στην SDS-PAGE ανάλυση.

Πρωτεΐνη	MW(KDa)	logMW	Απόσταση πρωτεΐνης	Συνολική απόσταση	Rf
Myosin	200	5,3	0,8	23,8	0,033
β-Galactisidase	116	5,06	3	23,8	0,126
Phosphorylase B	97	4,99	3,6	23,8	0,151
BSA	66	4,81	4,9	23,8	0,205
Glutamic DHG	55	4,74	6,9	23,8	0,289
Ovalbumin	45	4,65	8,2	23,8	0,344
Glyceraldeyde	36	4,55	11	23,8	0,462
Trypsinogen	24	4,38	13,1	23,8	0,550
Trypsin Inhibitor	20	4,3	18,2	23,8	0,764
α-Lactalbumin	14	4,15	21,6	23,8	0,907

**Πίνακας 3 :** Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών ζωνών που προέκυψαν από την SDS-PAGE ανάλυση.

<b>Απόσταση πρωτεΐνης</b>	<b>Συνολική απόσταση</b>	<b>Rf</b>	<b>LogMW</b>	<b>MW</b>
3,1	23,5	0,13	5,01	102408
3,3	23,5	0,14	4,99	99879
3,5	23,5	0,14	4,98	97412
4,1	23,5	0,17	4,95	90370
4,8	23,5	0,20	4,9	82795
6,4	23,5	0,27	4,83	67781
11,2	23,5	0,47	4,57	37189
12,5	23,5	0,53	4,49	31609
12,7	23,5	0,54	4,48	30828
13,4	23,5	0,57	4,45	28244
13,7	23,5	0,58	4,43	27204
13,9	23,5	0,59	4,42	26532
14,6	23,5	0,62	4,38	24308
15	23,5	0,63	4,36	23122
16,5	23,5	0,70	4,28	19167
16,7	23,5	0,71	4,27	18694
17,4	23,5	0,74	4,23	17127
17,6	23,5	0,74	4,22	16704
18,3	23,5	0,77	4,18	15304
19,1	23,5	0,81	4,14	13847
19,8	23,5	0,84	4,10	12686
20,5	23,5	0,87	4,06	11623
20,7	23,5	0,88	4,05	11336
21,2	23,5	0,90	4,02	10649
21,4	23,5	0,91	4,01	10386

**Πίνακας 4:** Η συγκέντρωση των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών (μg/g NB ιστού) στους επάκριους 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	162,79	166,11	169,42	166,11	1,91
1/12	92,56	105,81	103,16	100,51	4,04
15/12	117,74	125,69	127,01	123,48	2,89
3/01	180,02	266,16	221,77	222,65	24,86
17/01	165,44	168,76	172,07	168,76	1,91
31/01	134,96	129,66	134,30	132,98	1,66
14/02	68,04	95,87	119,72	94,55	14,93
28/02	62,74	62,08	62,08	62,30	0,22
14/03	61,42	69,37	64,07	64,95	2,33

**Πίνακας 5:** Στατιστικά παλινδρόμησης

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

**Πίνακας 6:** Ανάλυση Διακύμανσης

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ					
	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα α F
Παλινδρόμηση			0,3416627	99,24756	
η	1	0,341662757	6	9	2,19334E-05
Υπόλοιπο	7	0,024097712	0,0034425		
Σύνολο	8	0,365760469	3		

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P
<b>Τεταγμένη επί την αρχή</b>	<b>0,034303704</b>	0,036062604	0,95122647	0,3731694
<b>Μεταβλητή X 1</b>	<b>0,015092222</b>	0,001514932	9,9623074	2,193E-05