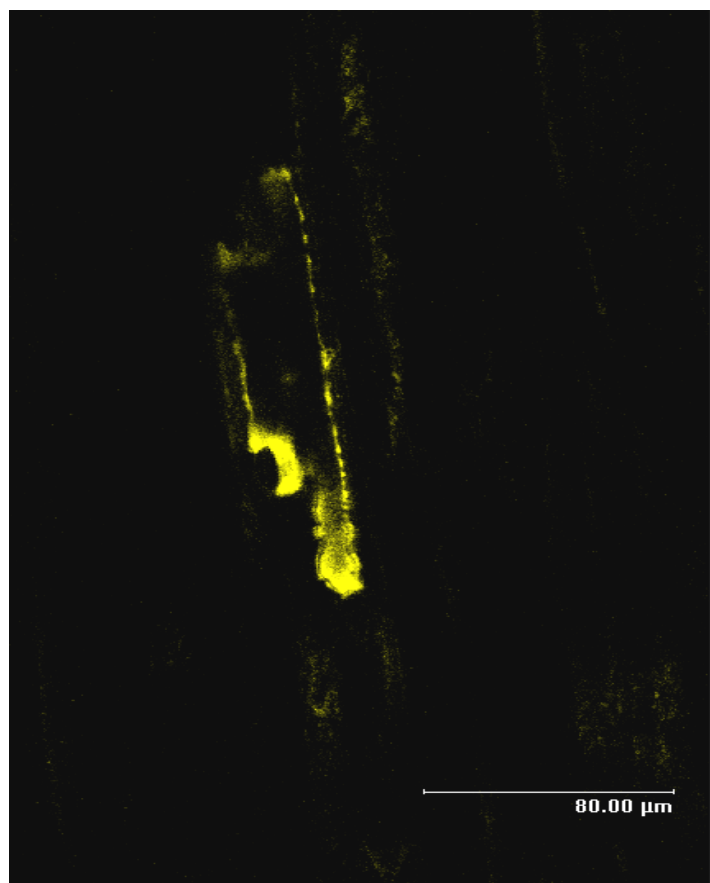


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
«Μικροβιακή Βιοτεχνολογία»



Υποκυτταρικός εντοπισμός μεταφορέων σακχάρων στα κύτταρα σόργου (*Sorghum bicolor*).

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτρης Χατζηνικολάου

ΜΙΧΑΗΛ ΒΑΣΙΛΟΓΛΟΥ

Ιούνιος 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| Πρόλογος-Ευχαριστίες | 1 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 2 |
| 2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΦΛΟΙΩΜΑΤΟΣ | 2 |
| A.2.1 Τα συνοδά κύτταρα | 4 |
| A.2.2 Ανατομική διάπλαση του φύλλου | 7 |
| A.2.2.1 Επιδερμίδα | 7 |
| A.2.2.2 Μεσόφυλλο | 8 |
| A.2.2.3 Φύλλα C ₄ φυτών | 13 |
| A.3 Μεταφορά των προϊόντων της φωτοσύνθεσης | 14 |
| A.3.1 Μηχανισμός μεταφοράς | 15 |
| A.3.2 Ηθμώδης χυμός | 16 |
| A.3.2.1 Μέθοδοι εκχύλισης του ηθμώδους χυμού | 16 |
| A.3.2.2 Χημική σύσταση του ηθμώδους χυμού | 17 |
| A.3.3 Φόρτωση του φλοιώματος | 18 |
| A.3.3.1 Μεταφορά των φωτοσυνθετικών προϊόντων | 18 |
| A.3.3.2 Αποπλασματική οδός | 20 |
| A.3.3.3 Μηχανισμός της αποπλασματικής μεταφοράς της σακχαρόζης | 22 |
| A.3.3.4 Συμπλασματική οδός | 23 |
| A.3.3.5 Μεταφορά μη υδατανθρακικών ενώσεων | 24 |
| A.3.3.6 Μεταφορά μακρομορίων | 27 |
| A.3.4 Εκφόρτωση του φλοιώματος | 29 |
| A.3.4.1 Μηχανισμοί εκφόρτωσης του φλοιώματος | 30 |
| A.3.4.2 Ενεργητική μεταφορά στον αποδέκτη | 31 |
| A.3.5 Ταχύτητα ροής των φωτοσυνθετικών προϊόντων στο φλοιώμα | 32 |
| A.3.5.1 Το πρότυπο πίεσης-ροής | 33 |
| A.3.5.2 Πλευρική μεταφορά | 34 |
| A.3.5.3 Παράγοντες που κατευθύνουν τα φωτοσυνθετικά προϊόντα προς ένα συγκεκριμένο αποδέκτη | 35 |
| A.4 Η Οικογένεια Γονιδίων Φορέων Μονοσακχαριτών στην Αραβίδοψη | 37 |
| A.4.1 Γονίδια Πρωτεϊνών Μεταφορέων Σακχάρων (Sugar Transport Protein, AtSTP) | 38 |

| | |
|---|----|
| A.4.2 Γονίδια Μεταφοράς Γλυκόζης του Χυμοτοπίου (Vacuolar Glucose Transporter-like genes, AtVGT) | 39 |
| A.4.3 Γονίδια Φορέων Μονοσακχαριτών στον Τονοπλάστη, AtTMT (Tonoplast Monosaccharide Transporter genes) | 39 |
| A.4.4 Γονίδια Φορέων Γλυκόζης του Πλαστιδίου, <i>AtpGlcT</i> (Plastidic Glucose Transporter genes) | 40 |
| A.4.5 Γονίδια Φορέων Πολυαλκοολών, <i>AtPLT</i> (Polyol Transporter genes) | 40 |
| A.4.6 Γονίδια Φορέων Ινοσιτόλης, <i>AtINT</i> (inositol transporters genes) | 41 |
| A.4.7 Γονίδια Αρχικής Αντίδρασης στην Αφυδάτωση, <i>AtERD6</i> | 41 |
| A.5 Συμπεράσματα | 43 |
| A.6 Σκοπός της εργασίας | 44 |
| | |
| B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 45 |
| B.1 Μετασηματισμός του <i>E. Coli</i> | 45 |
| B.2 Μετασηματισμός των δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA | 46 |
| B.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA | 46 |
| B.3.1 Miniprep Kit | 46 |
| B.3.2 Μέθοδος Βρασμού | 48 |
| B.4 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων | 49 |
| B.4.1 Πέψη δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού | 49 |
| B.4.2 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA) σε πήκτη αγαρόζης | 50 |
| B.4.3 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης | 51 |
| B.4.4 Λιγοποίηση άκρων DNA | 52 |
| B.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) | 53 |
| B.5.1 Σχεδιασμός των εκκινητών | 54 |
| B.5.1.1 Οι εκκινητές και η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκαν | 54 |
| B.5.1.2 Προετοιμασία των εκκινητών | 55 |

| | |
|---|----|
| B.5.2 Αλυσιδωτή αντίδρασεις πολυμεράσης (PCR) | 56 |
| B.5.3 Καθαρισμός των δειγμάτων μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR) ... | 59 |
| B.6 Βιο-βαλιστική μέθοδος για την μεταφορά γονιδίων σε φυτικούς ιστούς του γλυκού σόργου | 60 |
| B.6.1 Φυτά για βομβαρδισμό | 60 |
| B.6.2 Προετοιμασία των μικρομεταφορέων χρυσού και του διαλύματος DNA | 60 |
| B.6.3 Περιγραφή και λειτουργία της συσκευής βομβαρδισμού μικροσωματιδίων Bio-Rad PDS-1000/He | 62 |
| B.6.4 Έλεγχος των φύλλων που έχουν υποστεί βομβαρδισμό | 63 |
| | |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 65 |
| | |
| Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 67 |
| Γ.1 <i>In silico</i> ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τους μεταφορείς των σακχάρων.. | 67 |
| Γ.1.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) | 71 |
| Γ.1.2 Πέψη των κλώνων cDNA του <i>sb4YFP</i> και <i>sb6YFP</i> | 72 |
| Γ.1.3 Αντίδραση λιγοποίησης | 73 |
| Γ.1.4 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. Coli XLBlue1</i> με τον φορέα έκφρασης <i>pAVA554[<i>sb4YFP/sb6YFP</i>]</i> | 73 |
| Γ.1.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA | 73 |
| Γ.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός των φορέων σακχάρων | 75 |
| | |
| Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 78 |
| | |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 83 |

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η συγκεκριμένη διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού υπό την άμεση επίβλεψη του Καθηγητή Γεωργίου Σκαράκη και του Επίκουρου Καθηγητή Εμμανουήλ Φλεμετάκη στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία» του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα τη Διατριβή μου, από το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, Επίκουρο Καθηγητή Δημήτρη Χατζηνικολάου για την επιλογή του θέματος, καθώς επίσης και τους επιβλέποντες καθηγητές στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Γεώργιο Σκαράκη και Εμμανουήλ Φλεμετάκη για την επιλογή του θέματος, το συνεχές ενδιαφέρον τους για την πορεία του πειραματικού μέρους της εργασίας αλλά και για την κατανόηση του θεωρητικού πλαισίου μέσα στο οποίο εντάσσεται η συγκεκριμένη μελέτη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την υποψήφια Διδάκτορα Βασιλική Λαμπίρη για την πολύτιμη καθοδήγηση, βοήθεια και συνεργασία όσον αφορά την εξοικείωση μου με τον εργαστηριακό χώρο, τις τεχνικές μοριακής βιολογίας αλλά και με το αντικείμενο αυτής της εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα Αναστάσιο Κατσιλέρο και την Διδάκτορα Ουρανία Παυλίδου για την πολύτιμη βοήθειά τους στην εκπόνηση αυτής της εργασίας καθώς επίσης και την υποψήφια Διδάκτορα Ευαγγελία Κουρή για τη σημαντική και πολύτιμη βοήθειά της στη χρήση της συσκευής βομβαρδισμού των φυτικών ιστών με μικροσωματίδια.

A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στ' ανώτερα φυτά, το νερό, τ' ανόργανα στοιχεία και τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης από τις θέσεις πρόσληψης ή παραγωγής τους μεταφέρονται στα διάφορα τμήματα του φυτού, χρησιμοποιώντας δύο συστήματα μεταφοράς: το ξύλωμα και το φλοιώμα. Το νερό και τ' ανόργανα άλατα που προσλαμβάνονται από τις ρίζες, μεταφέρονται στον βλαστό, στα φύλλα, στ' άνθη και στους καρπούς διαμέσου του ξυλώματος, με βάση κυρίως τις διαφορές υδατικού δυναμικού, οι οποίες στις περισσότερες περιπτώσεις δημιουργούνται από την διαπνοή. Τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης τα οποία συντίθενται, κυρίως, στα ώριμα φύλλα, και τα προϊόντα που είναι αποταμιευμένα στ' αποταμιευτικά όργανα (κοτυληδόνες, ενδοσπέρμια, κόνδυλοι και άλλα) μεταφέρονται στ' αναπτυσσόμενα όργανα, συμπεριλαμβανομένων των ριζών, διαμέσου του φλοιώματος. Στ' αποταμιευτικά όργανα μεταφέρονται μόνο τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης από τα φύλλα. Εκτός από τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης, διαμέσου του φλοιώματος ανακατανέμονται επίσης από τα ώριμα φύλλα στο υπόλοιπο φυτικό σώμα συστατικά τα οποία φθάνουν στα φύλλα διαμέσου του ξυλώματος. Παράδειγμα αποτελούν ιόντα όπως του καλίου, του φωσφόρου, καθώς επίσης και αμίδια ή ουρεΐδια, τα οποία είναι προϊόντα της δέσμευσης του αζώτου και μεταφέρονται από τις ρίζες στα φύλλα διαμέσου του ξυλώματος.

Για να κατανοηθεί η κατανομή των φωτοσυνθετικών προϊόντων σ' όλα τα μέρη του φυτού είναι απαραίτητο να περιγραφεί το δίκτυο του φλοιώματος με περισσότερες λεπτομέρειες.

A.2 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΦΛΟΙΩΜΑΤΟΣ

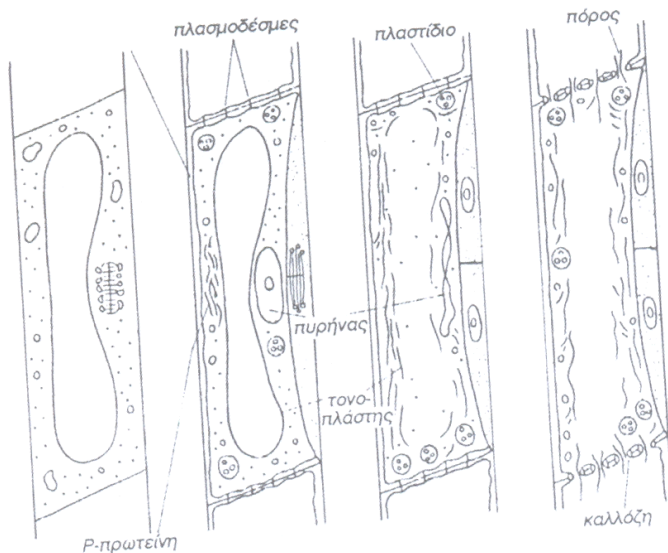
Το αγωγό σύστημα των φυτών αποτελείται από το ξύλωμα και το φλοιώμα, σχηματίζοντας τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Το φλοιώμα, όπως και το ξύλωμα, εκτείνεται σε όλο το φυτικό σώμα. Η μετακίνηση των σακχάρων και των άλλων οργανικών και ανόργανων συστατικών που κινούνται στο φλοιώμα γίνεται διαμέσου των ηθμωδών στοιχείων. Ο όρος ηθμώδη στοιχεία (ΗΣ) περιλαμβάνει τα ηθμώδη κύτταρα, που απαντούν στα κατώτερα τραχεόφυτα και γυμνόσπερμα, και τα ηθμώδη άρθρα, που

απαντούν στα αγγειόσπερμα.

Εκτός από τα ηθμώδη στοιχεία, στο φλοιώμα περιλαμβάνονται και άλλες κατηγορίες κυττάρων: συνοδά κύτταρα, αλβουμινώδη κύτταρα, παρεγχυματικά κύτταρα και, ορισμένες φορές, σκληρεγχυματικές ίνες, σκληρεΐδες και εκκριτικοί σχηματισμοί, π.χ. ρητινοφόροι αγωγοί και γαλακτοφόροι σωλήνες (Γαλάτης και συν., 1995).

Τα ηθμώδη στοιχεία είναι φυτικά κύτταρα άκρως εξειδικευμένα. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό τους είναι ότι πλην ορισμένων εξαιρέσεων, στερούνται πυρήνα, τονοπλάστη, συστήματος Golgi, ριβοσωμάτων, μικροσωληνίσκων και μικρονηματίων ακτίνης (Gamalei, 1989). Τα οργανίδια που παρατηρούνται είναι τροποποιημένα πλαστίδια, μιτοχόνδρια και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο αποτελεί ένα δίκτυο από αναστομωμένους σωληνίσκους (Εικ. Α.1).

Αν και τα κυτταρικά τοιχώματα των ηθμωδών στοιχείων δεν είναι αποξυλωμένα, σε ορισμένες θέσεις έχουν παχύνσεις. Στα εγκάρσια τοιχώματα των ηθμωδών άρθρων, εκεί όπου ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας επιμήκεις σειρές κυττάρων, τους ηθμοσωλήνες, υπάρχουν τροποποιημένες πλασμοδέσμες. Αυτές αποτελούν τους πόρους της ηθμώδους πλάκας σχηματίζοντας ανοιχτά κανάλια που επιτρέπουν την μετακίνηση των συστατικών του ηθμώδους χυμού μεταξύ των ηθμωδών άρθρων (Εικ.Α.1). Η διάμετρος των ηθμωδών πόρων κυμαίνεται μεταξύ 1 και 15 μm .



Εικόνα Α.1: Διαφοροποίηση ενός ηθμοστοιχείου.

Τα ηθμώδη κύτταρα των γυμνοσπέρμων έχουν σχετικά μη εξειδικευμένους ηθμώδεις πόρους, οι οποίοι κατανέμονται σχεδόν ομοιόμορφα σε ολόκληρη την επιφάνεια των κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι ηθμώδεις πόροι είναι γεμάτοι μ' αναρίθμητες μεμβράνες, που συναντώνται στο μέσον του κυτταρικού τοιχώματος και ενώνονται με το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο βρίσκεται απέναντι από τα ηθμώδη πεδία και εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα τους με την μορφή ευδιάκριτων σχηματισμών, των P-πρωτεϊνοσωμάτων. Κατά την ωρίμανση των ηθμωδών άρθρων, η P-πρωτεΐνη, έχοντας σωληνοειδή, κοκκιώδη ή νηματοειδή μορφή, διασκορπίζεται στην περιφέρεια του κυττάρου (Knoblauch και van Bel, 1998).

Τα ηθμώδη άρθρα, τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω των ηθμωδών πόρων, βρίσκονται υπό υψηλή εσωτερική πίεση σπαργής. Όταν ένας ηθμοσωλήνας τραυματιστεί, ο χυμός του διαφεύγει ταχύτατα από το σημείο τραυματισμού με αποτέλεσμα την μείωση της πίεσης και την μεταφορά της P-πρωτεΐνης, αλλά και άλλων κυτταρικών εγκλείστων του ηθμοσωλήνα, στους πόρους της ηθμώδους πλάκας που βρίσκεται προς την πλευρά του τραύματος, προκαλώντας την απόφραξη της. Με τον τρόπο αυτό, ο τραυματισμένος ηθμοσωλήνας απομονώνεται από τους άλλους ηθμοσωλήνες και εμποδίζεται η επιπλέον απώλεια κυτταρικού χυμού.

Εκτός από την P-πρωτεΐνη, οι πόροι των τραυματισμένων ηθμωδών άρθρων φράζονται με την βοήθεια της καλλόζης. Η καλλόζη είναι β-1,3-γλυκάνη. Συντίθεται από ένα ένζυμο του πλασμαλήματος, την συνθάση της καλλόζης, και εναποτίθεται μεταξύ πλασμαλήματος και κυτταρικού τοιχώματος. Η εναπόθεση της καλλόζης στους πόρους της ηθμώδους πλάκας αποφράζει ικανοποιητικά το τραυματισμένο ηθμώδες άρθρο, απομονώνοντας το από τα γύρω κύτταρα. Όταν τα ηθμώδη άρθρα επανακάμψουν, η καλλόζη υδρολύεται και εξαφανίζεται.

Εκτός από τον τραυματισμό, η σύνθεση της καλλόζης προκαλείται και από άλλες καταπονήσεις, όπως μηχανικά ερεθίσματα, υψηλές θερμοκρασίες ή την προετοιμασία φυσιολογικών αναπτυξιακών γεγονότων, όπως είναι ο λήθαργος και η γήρανση.

A.2.1 Τα συνοδά κύτταρα

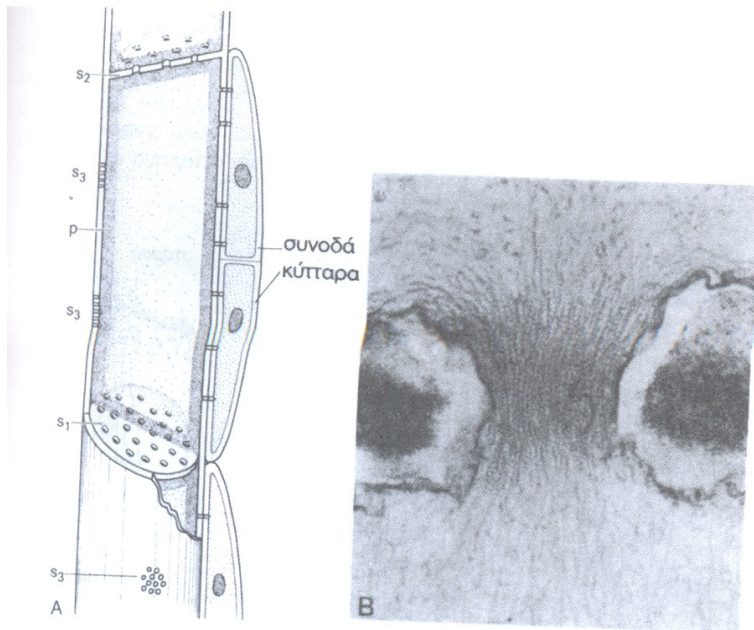
Κάθε ηθμώδες άρθρο, μ' ελάχιστες εξαιρέσεις, συνορεύει μ' ένα τουλάχιστον συνοδό

κύτταρο. Τα συνοδά κύτταρα και τα ηθμώδη άρθρα με τα οποία αυτά συνορεύουν προέρχονται από την ασύμμετρη διαίρεση του ίδιου μητρικού κυττάρου. Στα γυμνόσπερμα, η λειτουργία των συνοδών κυττάρων επιτελείται από τα αλβουμινώδη κύτταρα, τα οποία όμως δεν έχουν κοινή προέλευση με τα ηθμώδη κύτταρα. Τα συνοδά κύτταρα, όπως και τα αλβουμινώδη κύτταρα, επικοινωνούν με τα ηθμώδη στοιχεία με πάρα πολλές πλασμοδέσμες, οι οποίες είναι συχνά διακλαδισμένες προς την πλευρά των συνοδών κυττάρων, υποδηλώνοντας την ύπαρξη στενής λειτουργικής σχέσης μ' αυτά (Εικ. Α.2). Όπως θα αναφερθεί παρακάτω, το σύμπλεγμα συνοδά κύτταρα/ηθμώδη στοιχεία (ΣΚ/ΗΣ) επιτελεί πολλούς ρόλους, που περιλαμβάνουν την φόρτωση και την εκφόρτωση του φλοιώματος, την μεταφορά σε μεγάλη απόσταση, αλλά και τον έλεγχο της φύσης των ουσιών που κινούνται στο φλοιώμα (Orarka και Turgeon, 1999).

Τα συνοδά κύτταρα είναι διαφοροποιημένα παρεγχυματικά κύτταρα με πυρήνα, αναρίθμητα ριβοσώματα, πολλά μιτοχόνδρια, αναπτυγμένο κοκκιώδες ενδοπλασματικό δίκτυο, δικτυοσώματα, πλαστίδια και σε λίγες περιπτώσεις, Ρ-πρωτεΐνη. Τα συνοδά όπως και τ' αλβουμινώδη κύτταρα, συνεργάζονται στενά με τους ηθμοσωλήνες με τους οποίους συνορεύουν. Μια από τις λειτουργίες τους είναι η σύνθεση και παροχή ενέργειας με την μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης, ΑΤΡ. Επιπλέον, τα συνοδά και τ' αλβουμινώδη κύτταρα διαμεσολαβούν για την μεταφορά των προϊόντων της φωτοσύνθεσης από τα κύτταρα του χλωροφυλλούχου παρεγχύματος του φύλλου στα ηθμώδη στοιχεία των δευτερευόντων αγγείων.

Τα συνοδά κύτταρα απαντούν κατά μήκος των ηθμοσωλήνων σε ολόκληρο το φυτικό σώμα, εκτός από τις απολήξεις τους στα φύλλα. Αυτά που βρίσκονται στις απολήξεις των ηθμοσωλήνων των δευτερευόντων αγγείων χαρακτηρίζονται από πυκνό κυτταρόπλασμα και αναρίθμητα μιτοχόνδρια και διακρίνονται σε τρεις τύπους κυττάρων: τα κοινά (ordinary) συνοδά, τα μεταγωγικά (transfer) και τα ενδιάμεσα (intermediate) κύτταρα (Εικ. Α.2).

Στα κοινά συνοδά κύτταρα, οι χλωροπλάστες έχουν καλά αναπτυγμένα θυλακοειδή και η εσωτερική επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος είναι λεία. Επιπλέον, ο αριθμός των πλασμοδεσμών που τα συνδέει με τα γειτονικά κύτταρα, πλην του ηθμώδους άρθρου, είναι μικρός.



Εικόνα Α.2: Σχηματική απεικόνιση ηθμοσωλήνα και συνοδών κυττάρων. S1 και S2= ηθμώδεις πλάκες στα εγκάρσια τοιχώματα, S3= ηθμώδη πεδία στα κατά μήκος τοιχώματα του ηθμοσωλήνα, g= συνοδά κύτταρα, p= επιτόχιο κυττόπλασμα. B. Ηθμώδης πόρος σε κατά μήκος τομή. Ο πόρος περιβάλλεται από καλλόζη (λευκές περιοχές) και ινίδιο Ρ-πρωτεΐνης πυκνά διευθετημένα.

Τα μεταγωγικά κύτταρα μοιάζουν με τα κοινά συνοδά με μία, ωστόσο σημαντική διαφορά: τα κυτταρικά τους έχουν προεκβολές προς το εσωτερικό του κυττάρου (Εικ. Α.2.Α). Αυτές αναπτύσσονται κυρίως στα σημεία που δεν συνορεύουν με το ηθμώδες άρθρο, εξασφαλίζοντας αύξηση της επιφάνειας του πλασμαλήμματος, μ' αποτέλεσμα το αυξημένο δυναμικό πρόσληψης διαλυμένων ενώσεων από τα γειτονικά κύτταρα. Η έλλειψη πλασμοδεσμών μεταξύ κοινών συνοδών κυττάρων και γειτονικών κυττάρων, καθώς και οι προεκβολές του κυτταρικού τοιχώματος των μεταγωγικών κυττάρων, οδηγούν στην υπόθεση ότι αυτές οι δυο κατηγορίες κυττάρων είναι εξειδικευμένες στην πρόσληψη των διαλυμένων ενώσεων από τον αποπλάστη.

Τα ενδιάμεσα κύτταρα χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό πλασμοδεσμών, δια μέσου των οποίων το συνοδό κύτταρο επικοινωνεί με τα γειτονικά, και κυρίως με τα κύτταρα του παρεγχυματικού δεσμικού κολεού, δηλαδή με τα κύτταρα που περιβάλλουν τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες στα φύλλα (Εικ. Α.2.Β). Επίσης, το ενδιάμεσο κύτταρο από τ'

αναρίθμητα μικρά χυμοτόπια , ενώ οι χλωροπλάστες του στερούνται αμύλου και τα θυλακοειδή δεν είναι αναπτυγμένα.

A.2.2 Ανατομική διάπλαση του φύλλου

Το έλασμα του φύλλου των αγγειοσπέρμων συγκροτείται από τρία ιστολογικά συστήματα: του δερμικού ιστού, του θεμελιώδους ιστού και του αγωγού ιστού. Έτσι, οι βασικοί ιστοί του φύλλου είναι: η επιδερμίδα (άνω και κάτω), το μεσόφυλλο και οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες.

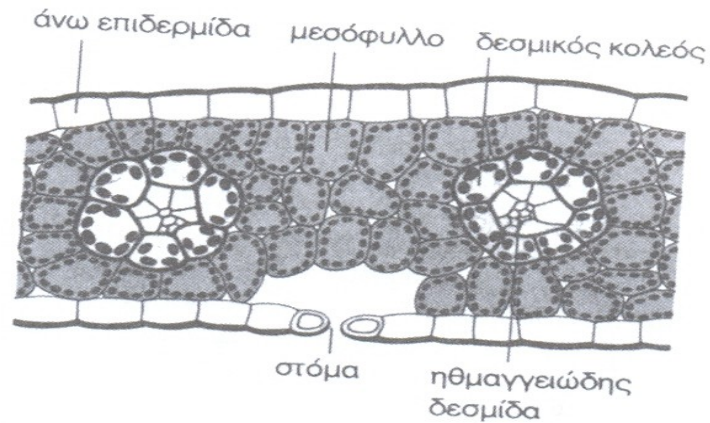
A.2.2.1 Επιδερμίδα

Η επιδερμίδα περιβάλλει το έλασμα του φύλλου ως ο εξωτερικός καλυπτήριος ιστός. Επειδή, το έλασμα έχει πεπλατυσμένη μορφή, η επιδερμίδα διακρίνεται σε άνω (προς τον ήλιο) και κάτω (προς το έδαφος) επιδερμίδα (Εικ. Α.3 και Εικ.Α.4). Η επιδερμίδα αποτελείται συνήθως από μία σειρά κυττάρων, αλλά εκείνη ορισμένων ξηρόφυτων (πικροδάφνη) είναι πολύστρωμη. Τα τυπικά επιδερμικά κύτταρα μοιάζουν με τ' αντίστοιχα του βλαστού. Έχουν, δηλαδή, στενή αμοιβαία διάταξη και συνοχή, στερούνται χλωροπλαστών, και είναι παχύτοιχα προς την εξωτερική επιφάνεια η οποία καλύπτεται από την εφυμενίδα που είναι εμποτισμένη με κηρούς. Στόματα μπορεί να υπάρχουν και στις δύο επιφάνειες του φύλλου, οπότε αυτό είναι αμφιστοματικό. Εκτός από τα φύλλα των ποωδών φυτών και από τα κατακόρυφα φύλλα, συνήθως υπάρχουν αφθονότερα στόματα στην κάτω επιδερμίδα του φύλλου φθάνοντας σ' αριθμό μερικές εκατοντάδες ανά τετραγωνικό χιλιοστό επιφάνειας.

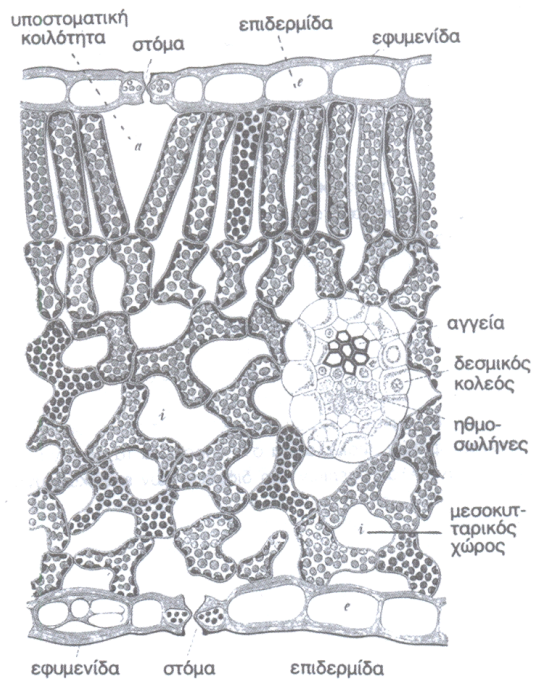
Στα φύλλα των δικότυλων φυτών τα στόματα είναι διάσπαρτα και κατανεμημένα τυχαία, ανεξάρτητα από το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται κάθε στόμα. Στα φύλλα των μονοκότυλων φυτών τα στόματα είναι διατεταγμένα σ' αλληπάλληλες σειρές παράλληλες προς τον κατά μήκος άξονα του φύλλου. Στην αρχή, αναπτύσσονται τα στόματα που βρίσκονται στην κορυφαία περιοχή του φύλλου και ακολούθως διαμορφώνονται τα στόματα που βρίσκονται προς τη βάση του.

A.2.2.2 Μεσόφυλλο

Εκτός από την επιδερμίδα και τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, οι υπόλοιποι ιστοί συγκροτούν το μεσόφυλλο. Αυτό, δηλαδή, αποτελείται ουσιαστικά από το θεμελιώδη (παρεγχυματικό) ιστό του φύλλου, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη λειτουργία της



Εικόνα A.3: Σχηματική απεικόνιση εγκάρσιας τομής ισοπλεύρου φύλλου του *Zea mays*.



Εικόνα A.4: Σχηματική απεικόνιση εγκάρσιας τομής φύλλου του δικότυλου φυτού *Vicia faba*. Διακρίνονται στο μεσόφυλλο, το σπογγώδες και το δρυφακτοειδές παρέγχυμα.

φωτοσύνθεσης. Στα μεσόφυτα, το μεσόφυλλο διακρίνεται σε: δρυφακτοειδές παρέγχυμα και σπογγώδες παρέγχυμα.

Το δρυφακτοειδές (πασσαλοειδές) παρέγχυμα βρίσκεται αμέσως κάτω από την επιδερμίδα και αποτελείται συνήθως από μία σειρά επιμηκών κυλινδρικών κυττάρων, τα οποία είναι τοποθετημένα με τον κατά μήκος άξονα τους κάθετα προσανατολισμένο προς την επιφάνεια του φύλλου. Επειδή, ο ιστός αυτός επιτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό της φωτοσύνθεσης του φυτού, είναι κατάλληλα προσαρμοσμένος σ' αυτή την λειτουργική διαδικασία. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα του δρυφακτοειδούς παρεγχύματος βρίσκονται μεν πολύ κοντά μεταξύ τους αλλά δεν εφάπτονται, έτσι ώστε καθένα να έχει, όσο το δυνατόν, μεγαλύτερη ελεύθερη προσλαμβάνουσα επιφάνεια. Ο μικρός αυτός διάκενος χώρος μεταξύ των δρυφακτοειδών κυττάρων είναι επαρκής για την άνετη κυκλοφορία του διοξειδίου του άνθρακα γύρω απ' αυτά, γεγονός που διευκολύνει την πρόσληψη του. Επιπλέον, οι χλωροπλάστες είναι κατανεμημένοι στην περιφέρεια των κυττάρων του δρυφακτοειδούς παρεγχύματος, δηλαδή βρίσκονται αμέσως κάτω από το κυτταρικό τοίχωμα, πράγμα που επίσης τους διευκολύνει ν' απορροφούν το διοξείδιο του άνθρακα. Τα κύτταρα του δρυφακτοειδούς παρεγχύματος λόγω του επιμήκους των σχήματος λειτουργούν πιθανόν και ως φωταγωγοί διευκολύνοντας την μετάδοση της ηλιακής ακτινοβολίας μέσα στο φύλλο.

Ανάμεσα από το δρυφακτοειδές παρέγχυμα και την κάτω επιδερμίδα βρίσκεται το σπογγώδες παρέγχυμα. Πρόκειται για την υπόλοιπη ιστολογική περιοχή του μεσοφύλλου. Αυτή αποτελείται από ακανόνιστου σχήματος κύτταρα τοποθετημένα σε μεγάλες αποστάσεις μεταξύ τους, έτσι ώστε οι μεσοκυττάριοι χώροι (αποπλάστης) να καταλαμβάνουν μεγαλύτερη έκταση από τα ίδια τα κύτταρα (συμπλάστης) του σπογγώδους παρεγχύματος. Οι υποστομικές κοιλότητες των στομάτων της κάτω επιδερμίδας επικοινωνούν με το σύστημα των μεγάλων μεσοκυττάρων του σπογγώδους παρεγχύματος και του δρυφακτοειδούς παρεγχύματος. Κατά συνέπεια, το διοξείδιο του άνθρακα εισέρχεται από τα στόματα της κάτω επιδερμίδας και παροχετεύεται άνετα στο φωτοσυνθετικό παρέγχυμα. Κάθε κύτταρο του δρυφακτοειδούς παρεγχύματος έχει περίπου τετραπλάσιο αριθμό από ένα αντίστοιχο του σπογγώδους. Επίσης, το δρυφακτοειδές παρέγχυμα έχει πολύ μεγαλύτερη εσωτερική επιφάνεια από το

σπογγώδες, μολονότι το τελευταίο διαθέτει μεγαλύτερους μεσοκυτταρικούς χώρους. Τα στοιχεία αυτά αποδεικνύουν ότι η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται, κατά κύριο λόγο, μέσα στα κύτταρα του δρυφακτοειδούς παρεγγύματος.

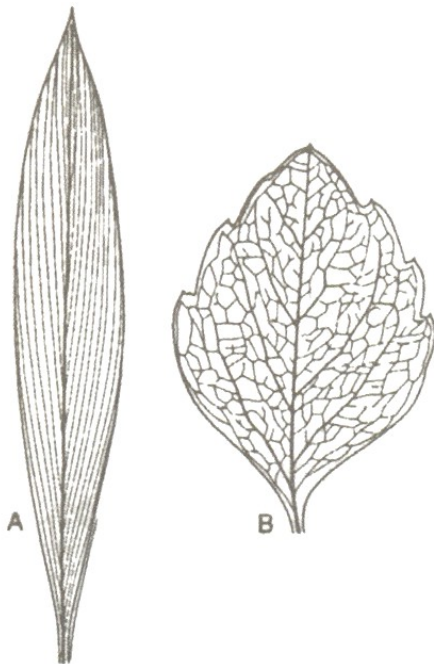
Ένα φύλλο εμφανίζει, συνήθως, δομική πολικότητα. Η άνω και η κάτω πλευρά του, δηλαδή, διαφέρουν, αφού προς τη μία πλευρά βρίσκεται το δρυφακτοειδές παρέγγυμα και προς την άλλη το σπογγώδες. Το φύλλο αυτό ονομάζεται ετερόπλευρο. Τα φύλλα ορισμένων φυτών, ωστόσο, δεν έχουν πολικότητα και ονομάζονται ισόπλευρα, επειδή, οι δύο πλευρές τους είναι όμοιες.

Όλη η επιφάνεια του μεσόφυλλου διατρέχεται από πολυάριθμες ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (νεύρα), οι μεγαλύτερες από τις οποίες περνώντας διά μέσου του μίσχου συνδέονται με το αγωγό σύστημα του βλαστού. Στα φύλλα των περισσότερων δικότυλων φυτών η διάταξη των ηθμαγγειωδών δεσμιδών γίνεται κατά των ακόλουθο τρόπο. Μια μεγάλη ηθμαγγειώδης δεσμίδα μαζί με το συνοδό της παρέγγυμα αποτελεί το μεσαίο νεύρο, το οποίο διασχίζει την κεντρική περιοχή του ελάσματος από τη βάση μέχρι την κορυφή του (Εικ. Α.5). Από το μεσαίο νεύρο ξεκινούν λεπτότερες δευτεροβάθμιες δεσμίδες, από τις οποίες αρχίζουν άλλες ακόμα λεπτότερες τριτοβάθμιες, από τις τελευταίες ξεκινούν ακόμα λεπτοφύστερες τέταρτης τάξης, και ούτω καθεξής.

Έτσι, διαμορφώνεται ένα πολύ εκτεταμένο δίκτυο νεύρων κλιμακούμενου μεγέθους. Αν οι αγωγοί δεσμίδες ενός φύλλου, π.χ. της φτελιάς, τοποθετηθούν στην σειρά ξεπερνούν τα 200 m σε μήκος. Τα μικρά νεύρα σχηματίζουν συνήθως πλέγματα διαφόρων σχημάτων και σχημάτων μεγεθών, τα οποία υποδιαιρούν την επιφάνεια του μεσόφυλλου. Οι μικρότερες περιοχές επιφάνειας ονομάζονται άλω. Στις τελευταίες καταλήγουν τερματικές (ακραίες) ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, που είναι ελεύθερες μέσα στο παρέγγυμα του μεσόφυλλου, αποτελούμενες συνήθως από λίγες τραχεΐδες ή από λίγους ηθμοσωλήνες. Η φόρτωση και η εκφόρτωση του αγωγού ιστού με τα προϊόντα που μεταφέρει γίνεται αρχικά σ' αυτές τις μικρές δεσμίδες. Κάθε κύτταρο του μεσόφυλλου βρίσκεται σ' απόσταση λίγων κυττάρων από κάποια δεσμίδα του φύλλου. Σε φυτά πολλών γενών καθώς το μεσαίο νεύρο εισέρχεται στο φύλλο από τον μίσχο, διακλαδίζεται αμέσως κοντά στην βάση του ελάσματος και δεν το διασχίζει σ' όλο του το μήκος. Σε κάθε περίπτωση σχηματίζεται μια δικτυωτή νεύρωση. Αντίθετα, το φύλλο των μονοκότυλων φυτών διασχίζεται από ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, οι οποίες είναι

παράλληλες μεταξύ τους στο μεγαλύτερο μήκος του ελάσματος, αλλά συγκλίνουν και ενώνονται στην κορυφή ή στην βάση του. Οι δεσμίδες είναι συνήθως παχιές και λεπτότερες, οι οποίες εναλλάσσονται συνεχώς. Οι παράλληλες δεσμίδες δεν είναι ανεξάρτητες, αλλά συνδέονται μεταξύ τους με πολύ λεπτές εγκάρσιες δεσμίδες διάσπαρτες σ' όλη την έκταση του ελάσματος. Η διάταξη αυτή ονομάζεται παράλληλη νεύρωση.

Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες του φύλλου, γενικά, συγκροτούνται από πρωτογενές ξύλωμα και πρωτογενές φλοιώμα. Στα φύλλα ορισμένων δικότυλων φυτών, ωστόσο, η κεντρική δεσμίδα και ορισμένες άλλες παχιές δεσμίδες υφίστανται δευτερογενή αύξηση. Το ξύλωμα βρίσκεται συνήθως προς την πάνω πλευρά του φύλλου και το φλοιώμα προς την κάτω, σ' αντιστοιχία με την θέση του ξυλώματος προς το κέντρο του βλαστού και του φλοιώματος προς την περιφέρεια αυτού και σε συνέχεια της



Εικόνα A.5: Σχηματική απεικόνιση φύλλων από (A) μονοκότυλο φυτό (με παράλληλες νερώσεις) και από (B) δικότυλο φυτό (με δικτυωτές νευρώσεις).

διαδρομής της ηθμαγγειώδους δεσμίδας από τον βλαστό στο φύλλο διαμέσου του μίσχου.

Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες διατρέχουν το έλασμα του φύλλου στον χώρο μεταξύ του δρυφακτοειδούς και του σπογγώδους παρεγχύματος και σχεδόν ουδέποτε βρίσκονται μέσα στους μεγάλους μεσοκυτταρικούς χώρους του μεσόφυλλου. Οι μεγάλες δεσμίδες περιβάλλονται και συγκρατούνται από παρεγχυματικά κύτταρα που έχουν λίγους χλωροπλάστες. Οι μικρές δεσμίδες περικλείονται από τον δεσμικό κολεό, ο οποίος είναι ένας μονόστρωμος δακτύλιος λεπτότοιχων παρεγχυματικών κυττάρων στενά συνδεδεμένων μεταξύ τους, τα οποία είναι παρόμοια μ' εκείνα του μεσόφυλλου. Ο δεσμικός κολεός περιβάλλει την δεσμίδα σ' όλο το μήκος, εμποδίζοντας την να έρχεται σ' άμεση επαφή με τον μεσοκυτταρικό χώρο. Κατά συνέπεια, ο δεσμικός κολεός ελέγχει όλες τις εισερχόμενες και εξερχόμενες ουσίες της δεσμίδας, οι οποίες πρέπει να περάσουν πρώτα μέσα απ' αυτόν. Οι δεσμικοί κολεοί σε πολλές περιπτώσεις φύλλων δημιουργούν προεκτάσεις από παρόμοια κύτταρα, με τις οποίες συνδέονται είτε με την άνω είτε με την κάτω επιδερμίδα ή και με τις δύο. Οι προεκτάσεις του δεσμικού κολεού παρέχουν, γενικά, μηχανική υποστήριξη στο φύλλο. Ειδικά, στα δικότυλα φυτά, με τις προεκτάσεις του δεσμικού κολεού μεταφέρεται νερό στην επιδερμίδα του φύλλου.

Δεσμικός κολεός περιβάλλει, επίσης, τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των φύλλων των μονοκότυλων φυτών. Στα ποώδη, ειδικά, αυτός είναι ή μονόστρωμος ή δίστρωμος. Ο μονόστρωμος δεσμικός κολεός αποτελείται από λεπτότοιχα παρεγχυματικά κύτταρα, που έχουν πολυάριθμους μικρούς χλωροπλάστες ή είναι ημιδιαφανή. Στον δίστρωμο δεσμικό κολεό, ο εξωτερικός δακτύλιος κυττάρων έχει την δομή ενός κανονικού μονόστρωμου κολεού. Ο εσωτερικός δακτύλιος σ' εγκάρσια τομή φαίνεται ότι συνίσταται από μικρότερα, πιο παχύτοιχα κύτταρα από εκείνα του εξωτερικού δακτυλίου και ονομάζεται κολεός μεστώματος. Στα κύτταρα του κολεού μεστώματος έχει παρατηρηθεί ταινία Caspary και έχουν βρεθεί αποθέσεις σουβερίνης, γεγονός που υποδηλώνει έναν αντίστοιχο ρόλο του κολεού μεστώματος στο φύλλο μ' εκείνον της ενδοδερμίδας στη ρίζα.

Εξαιτίας της εκτεταμένης επιφάνειας του και επειδή είναι λεπτό το έλασμα του φύλλου έχει ανάγκη στήριξης, η οποία του παρέχεται από τα κολλεγχυματικά κύτταρα. Αυτά περιβάλλουν, βασικά, το μεσαίο νεύρο αλλά και τις μεγάλες δεσμίδες των φύλλων των δικότυλων φυτών. Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες του φύλλου των μονοκότυλων περιβάλλονται, αντίθετα, από σκληρογυματικά κύτταρα. Επίσης, κολλεγχυματικά

κύτταρα και σκληρογυματικές ίνες υπάρχουν, αντίστοιχα, στα περιθώρια των φύλλων των δικότυλων και των μονοκότυλων φυτών. Επιπλέον, οι προεκτάσεις του δεσμικού κολεού μπορεί να μην είναι κολλεγυματικές και να παρέχουν στήριξη. Η συμπαγής επιδερμίδα περιβάλλοντας το έλασμα μαζί με την εφυμενίδα προσφέρει στο φύλλο και αξιόλογη μηχανική υποστήριξη.

A.2.2.3 Φύλλα C₄ φυτών

Στις τυπικές περιπτώσεις C₄ φυτών δεν υπάρχει τυπικό δρυφακτοειδές ή σπογγώδες παρέγχυμα και τα κύτταρα του χλωροεγγύματος του φύλλου διατάσσονται ακτινωτά γύρω από τον δεσμικό κολεό. Σ' άλλα φυτά, π.χ. στο καλαμπόκι αυτό δεν συμβαίνει (Εικ. Α.3). Ο δεσμικός κολεός των αγροστωδών μπορεί ν' αποτελείται από μία ή δύο κυτταρικές στιβάδες. Τ' αγροστώδη με δίστιβο κολεό μπορεί να είναι C₃ φυτά ή C₄, ενώ εκείνα που έχουν μονόστιβο κολεό στις μεγαλύτερες δεσμίδες είναι C₄ φυτά.

Ο δεσμικός κολεός των C₄ φυτών αποτελείται από ευμεγέθη κύτταρα, που περιέχουν μεγάλο αριθμό χλωροπλαστών, οι οποίοι πολλές φορές στερούνται grana και φέρουν μόνο θυλακοειδή στρώματος. Τα υπόλοιπα κύτταρα του μεσοφύλλου έχουν χλωροπλάστες τυπικής οργάνωσης. Η ύπαρξη ή η απουσία των grana στους χλωροπλάστες του δεσμικού κολεού διαφόρων C₄ φυτών συνδέεται με συγκεκριμένες μεταβολές στον κύκλο της C₄ φωτοσύνθεσης. Αξίζει να σημειωθεί η απουσία του ενζύμου καρβοξυλάση της διφωσφορικής ριβουλόζης (RuBP), που δεσμεύει το CO₂, από τα πλαστίδια του μεσοφύλλου (των C₄ φυτών) και η παρουσία του στους χλωροπλάστες του δεσμικού κολεού. Στα κύτταρα του μεσοφύλλου η δέσμευση του CO₂ πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου καρβοξυλάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού (PEP) οξέος, (το οποίο όμως εντοπίζεται στο κυτόπλασμα των κυττάρων και όχι στους χλωροπλάστες), για να σχηματιστεί αρχικά οξαλοξικό οξύ το οποίο, ανάλογα με το φυτό, μετατρέπεται στα C₄ καρβοξυλικά οξέα μηλικό και ασπαρτικό. Αυτά μεταφέρονται στα κύτταρα του δεσμικού κολεού, όπου λειτουργεί ο κύκλος του Calvin. Στα κύτταρα αυτά, οι παραπάνω ενώσεις αποκαρβοξυλιώνονται και παράγεται CO₂, το οποίο δεσμεύεται από την καρβοξυλάση της διφωσφορικής ριβουλόζης, που υπάρχει στους χλωροπλάστες. Στο μεσόφυλλο επιστρέφει συμπλαστικά

πυροσταφυλικό οξύ ή αλανίνη.

Τα C₄ φυτά χρησιμοποιούν ως εναλλακτική λύση την παραπάνω φωτοσυνθετική οδό για ν' αντιμετωπίσουν το πρόβλημα της απώλειας ενέργειας των C₃ φυτών, τα οποία δεσμεύουν το διοξείδιο του άνθρακα CO₂ μέσω της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης και σχηματίζονται δύο μόρια 3-φωσφορογλυκερικού οξέος. Το ένζυμο που καταλύει αυτή την αντίδραση είναι η καρβοξυλάση της διφωσφορικής ριβουλόζης και έχει χαμηλή συγγένεια με το CO₂, και σε ορισμένες συνθήκες δρα ως οξυγονάση, προσθέτοντας στην διφωσφορική ριβουλόζη οξυγόνο και όχι CO₂. Οι ενώσεις που παράγονται συμμετέχουν στον κύκλο του γλυκολικού οξέος-φωτοαναπνοής, με αποτέλεσμα το φυτό να χάνει σημαντικά ποσά ενέργειας.

Επιπλέον, τα κύτταρα του δεσμικού κολεού περιέχουν πολλά μιτοχόνδρια, υπεροξεισωμάτια περισσότερα από τα κύτταρα του μεσοφύλλου, ενώ στο τοίχωμα τους, σε μερικά τουλάχιστον C₄ φυτά, εναποτίθεται σουβερίνη, που τα καθιστά αδιαπέραστα από το νερό. Αυτό συνεπάγεται την υποχρεωτική συμπλαστική επικοινωνία τους με τα υπόλοιπα κύτταρα του μεσοφύλλου, μέσω τροποποιημένων πλασμοδεσμών.

A.3 Μεταφορά των προϊόντων της φωτοσύνθεσης

Τα πρώτα πειράματα για τη μελέτη της διαδρομής που ακολουθούν τα φωτοσυνθετικά προϊόντα έγιναν το 1675 από τον Ιταλό ανατόμο Marcello Malpighi. Ο Malpighi παρατήρησε ότι η αφαίρεση ενός κυλινδρικού τμήματος του δευτερογενούς φλοιού ενός δένδρου δεν επηρέασε, όπως είναι φυσικό, την διαπνοή, αφού η μεταφορά του νερού γίνεται δια μέσου ξυλώματος, που βρίσκεται εσωτερικά του φλοιού (Taiz και Zeiger, 1998). Όμως, το τμήμα του φλοιού πάνω από την τομή διογκώθηκε, και γι' αρκετό διάστημα παρέμεινε υγιές, ενώ το τμήμα κάτω από την τομή μετά από κάποιο χρονικό διάστημα νεκρώθηκε. Αργότερα, βρέθηκε πως στο τμήμα του φλοιού πάνω από την τομή συσσωρεύονταν σάκχαρα, ενώ σ' εκείνο κάτω από την τομή, τα σάκχαρα ήταν μειωμένα. Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε το 1727 από τον Stephen Hales και το 1928 από τους Mason και Maskell, οι οποίοι συμπέραναν ότι τα σάκχαρα μεταφέρονται δια μέσου του φλοιού των δένδρων. Επιπλέον, η μεγάλη συγκέντρωση της σακχαρόζης στα ηθμώδη στοιχεία και η εξίσου μεγάλη συγκέντρωση στον δευτερογενή φλοιό και στα φύλλα

οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα σάκχαρα μεταφέρονται δια μέσου των ηθμωδών στοιχείων.

Η χρήση ραδιενεργών ισοτόπων επέτρεψε την εκτέλεση πειραμάτων που έδωσαν ασφαλή συμπεράσματα όσον αφορά την κίνηση των προϊόντων της φωτοσύνθεσης. Η μελέτη της κίνησης των προϊόντων της φωτοσύνθεσης μπορεί να μην γίνει με την χορήγηση είτε ραδιενεργού διοξειδίου του άνθρακα στα φύλλα, τα οποία φωτίζονται και είναι κλεισμένα σε θαλάμους, είτε ραδιενεργά σημασμένων σακχάρων, π.χ. σακχαρόζης. Στην περίπτωση αυτή, τα φύλλα τοποθετούνται σε διάλυμα σακχαρόζης, αφού πρώτα αφαιρεθεί η επιδερμίδα τους ή τμήμα της εφυμενίδας, ώστε το υδατικό διάλυμα της ραδιενεργού σακχαρόζης να περάσει στα παρεγχυματικά κύτταρα του φύλλου και τον αγωγό ιστό. Μετά την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος επώασης του ιστού, η θέση της ραδιενεργού σακχαρόζης σ' αυτόν μπορεί να εντοπιστεί με την μέθοδο της αυτοραδιογραφίας. Ύστερα, από ορισμένο χρονικό διάστημα έκθεσης του ιστού στο ραδιενεργό υπόστρωμα, ο ιστός μονιμοποιείται και, αφού εγκλεισθεί σε παραφίνη ή ρητίνη, τέμνεται σε λεπτές τομές, οι οποίες καλύπτονται με ειδικό φωτογραφικό φιλμ, σε σκοτεινό θάλαμο. Κατά την διάρκεια της έκθεσης, η ακτινοβολία από το ραδιενεργό υλικό προσβάλλει το φιλμ και, μετά την εμφάνιση του, η θέση των ραδιενεργά σημασμένων ουσιών εμφανίζεται σ' αυτό με τη μορφή σκοτεινών κουκκίδων. Τα πειράματα αυτά επιβεβαίωσαν ότι τα σάκχαρα μεταφέρονται δια μέσου των ηθμωδών στοιχείων του φλοιώματος.

A.3.1 Μηχανισμός μεταφοράς

Η κατεύθυνση μεταφοράς των συστατικών του φλοιώματος δεν καθορίζεται από τη βαρύτητα. Η μεταφορά των προϊόντων της φωτοσύνθεσης, αλλά και η ανακατανομή των ιόντων από τα φύλλα, καθορίζεται με βάση τις θέσεις ζήτησης και κατανάλωσης των συστατικών αυτών. Τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης, συμπεριλαμβανομένων αυτών που είναι αποταμιευμένα σ' αποταμιευτικούς ιστούς, μεταφέρονται από τις θέσεις παροχής, που ονομάζονται πηγές (sources: ώριμα φύλλα, κοτυληδόνες, ενδοσπέρμια, ρίζες και άλλα) στις θέσεις αποταμίευσης ή κατανάλωσης (ρίζες και αναπτυσσόμενα όργανα, π.χ. άνθη, καρποί, φύλλα, σπέρματα και άλλα), που ονομάζονται αποδέκτες (sinks). Σύμφωνα

με τον ορισμό αυτό, ένα όργανο μπορεί να είναι είτε πηγή είτε αποδέκτης, αναλόγως του αναπτυξιακού σταδίου του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ρίζα του παντζαριού, το οποίο είναι διετεές. Τον πρώτο χρόνο, η ρίζα αποτελεί τον αποδέκτη των προϊόντων της φωτοσύνθεσης των ώριμων φύλλων τα οποία αποταμιεύει. Τον δεύτερο χρόνο, η ίδια ρίζα παρέχει στ' αναπτυσσόμενα φύλλα και στον βλαστό τα υλικά αποδόμησης των προϊόντων που αποταμίευσε κατά την διάρκεια του πρώτου έτους.

Ωστόσο, ποιοι παράγοντες καθορίζουν την πηγή για έναν συγκεκριμένο αποδέκτη; Ένας από τους παράγοντες αυτούς είναι η απόσταση του αποδέκτη από την πηγή. Ωριμα φύλλα που γειτονεύουν με το αρχέφυτρο του βλαστού αποτελούν την κύρια πηγή των προϊόντων της φωτοσύνθεσης για το συγκεκριμένο όργανο, ενώ πηγή για τη ρίζα είναι τα ώριμα φύλλα που βρίσκονται κοντά στη βάση του βλαστού. Εν τούτοις, παρεμβολές στην οδό που οδηγεί τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης προς ένα συγκεκριμένο αποδέκτη μπορεί να μεταβάλλουν την πηγή τους. Η αφαίρεση των φύλλων που βρίσκονται κοντά στην βάση του βλαστού αναγκάζει τα ώριμα φύλλα που βρίσκονται ψηλότερα στον βλαστό να τροφοδοτήσουν τη ρίζα. Η μεταβολή της πορείας των φωτοσυνθετικών προϊόντων, όμως, προϋποθέτει την ύπαρξη αλληλοσυνδέσεων των ηθμαγγειωδών δεσμίδων μεταξύ πηγής και αποδέκτη.

A.3.2 Ηθμώδης χυμός

A.3.2.1 Μέθοδοι εκχύλισης του ηθμώδους χυμού

Το φλοιώμα είναι ένας σύνθετος ιστός, ο οποίος αποτελείται από πολλές κατηγορίες κυττάρων, π.χ. από παρεγχυματικά κύτταρα, σκληροεγχυματικά κύτταρα, συνοδά κύτταρα και ηθμώδη στοιχεία. Ωστόσο, ο κυτταρικός χυμός μεταφέρεται μόνο δια μέσου των ηθμωδών στοιχείων. Γι' αυτό τον λόγο, η επιλογή της μεθόδου μελέτης της σύστασης του ηθμώδους χυμού απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή.

Ο χυμός του φλοιώματος βρίσκεται υπό πίεση. Μια απλή μέθοδος μελέτης της σύστασης του θα ήταν η συλλογή και μελέτη της σύστασης του χυμού που εκρέει από μια τομή στο φλοιώμα. Όμως η μέθοδος αυτή έχει μειονεκτήματα. Το σημαντικότερο μειονέκτημα είναι ότι στον χυμό αυτό περιέχονται και συστατικά άλλων τραυματισμένων

κυττάρων του φλοιώματος. Επιπλέον, ο χυμός που παραλαμβάνεται από την τομή του φλοιώματος αραιώνεται με την είσοδο νερού από τα κύτταρα που γειτονεύουν με τα ηθμώδη στοιχεία, εξαιτίας της ελάττωσης του υδατικού δυναμικού, την οποία προκαλεί η μείωση της σπαργής των ηθμωδών στοιχείων, λόγω της τομής των κυττάρων. Τέλος, ο τραυματισμός των ηθμοσωλήνων προκαλεί φράξιμο της ηθμώδους πλάκας, με την εναπόθεση της Ρ-πρωτεΐνης, οπότε η εκροή του χυμού αναστέλλεται.

Δύο εντομολόγοι, ο Kennedy και ο Mittler, πρότειναν για την απομόνωση του ηθμώδους χυμού των ηθμοσωλήνων την χρήση της αφίδας, ενός εντόμου που τρέφεται με τον χυμό. Οι αφίδες με τα εξειδικευμένα στοματικά τους εξαρτήματα, δηλαδή τους τέσσερις κυλινδρικούς στυλίσκους, έναν μόνο ηθμοσωλήνα φύλλου ή βλαστού από τον οποίο απομυζούν τον ηθμώδη χυμό. Μόλις τρυπηθεί ο ηθμοσωλήνας, η αφίδα μπορεί να ναρκωθεί με CO₂ και οι στυλίσκοι ν' αφαιρεθούν και ν' αναλυθούν. Με την μέθοδο αυτή, ο χυμός προέρχεται αποκλειστικά από τους ηθμοσωλήνες. Επιπλέον, η είσοδος του στυλίσκου δεν προκαλεί πτώση της πίεσης στον ηθμοσωλήνα και έτσι δεν γίνεται πιο αραιός ο ηθμώδης χυμός. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή έχει και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως είναι η δυσκολία τοποθέτησης του εντόμου σε μια συγκεκριμένη θέση του οργάνου, καθώς και η ενδεχόμενη πρόκληση αντιδράσεων του φυτού-ξενιστή από την προσβολή της αφίδας, τα οποία όμως δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο για το χρονικό διάστημα που είναι απαραίτητο για τη συλλογή του χυμού.

A.3.2.2 Χημική σύσταση του ηθμώδους χυμού

Ο ηθμώδης χυμός, παρ' ότι διαφέρει από είδος σε είδος, αποτελείται από μη αναγωγικά σάκχαρα, κυρίως σακχαρόζη, ή μείγμα ολιγοσακχαριτών της σειράς της ραφφινόζης (ολιγοσακχαρίτες που περιέχουν σακχαρόζη ενωμένη μ' ένα δύο ή τρία μόρια γαλακτόζης, δηλαδή, ραφφινόζη, σταχυόζη, και βερμπασκοζη, αντιστοίχως), και από αλκοόλες σακχάρων (μαννιτόλη, σορβιτόλη).

Στον ηθμώδη χυμό, εκτός από τα σάκχαρα, υπάρχουν και αζωτούχες οργανικές ενώσεις, φυτοορμόνες και διάφορα ανόργανα και οργανικά ιόντα. Το ποσοστό των αζωτούχων οργανικών ενώσεων είναι συνήθως σχετικά μικρό. Ωστόσο, στα φύλλα που γερνούν το ποσοστό τους είναι υψηλό. Οι πρωτεΐνες των φύλλων υδρολύονται πριν την

φυλλόπτωση και τα προϊόντα της υδρόλυσης τους στα μεν πολυετή φυτά μεταφέρονται διά μέσου του φλοιώματος στον βλαστό, όπου αποταμιεύονται για να χρησιμοποιηθούν κατά την επόμενη αυξητική περίοδο, ενώ στα ετήσια φυτά μεταφέρονται στ' αναπτυσσόμενα σπέρματα.

Οι αζωτούχες οργανικές ενώσεις παράγονται από την αμμωνία, η οποία κατά το μεγαλύτερο ποσοστό είναι προϊόν της αναγωγής των νιτρικών ιόντων που προσλαμβάνονται από το περιβάλλον ή του αζώτου που δεσμεύεται από τα συμβιωτικά βακτήρια στα φυμάτια των ριζών.

Η αναγωγή των νιτρικών ιόντων, αναλόγως του φυτικού είδους και των περιβαλλοντικών παραγόντων, γίνεται είτε στην ρίζα είτε στα φύλλα. Όταν η αναγωγή των νιτρικών στ' αμμωνία γίνεται στην ρίζα, η αμμωνία ενσωματώνεται, αναλόγως του φυτικού είδους, στ' αμίδια γλουταμίνη και ασπαραγίνη, στα ουρεΐδια κιτρουλλίνη και αλλαντοΐνη ή σε αμινοξέα τα οποία μεταφέρονται διά μέσου του ξυλώματος στον βλαστό και στα φύλλα. Οι απαιτούμενες οργανικές ενώσεις, που αποτελούν τις ανθρακικές αλυσίδες από τις οποίες δεσμεύεται το άζωτο, αλλά και αυτές που χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας για την ενσωμάτωση του αζώτου, είναι φωτοσυνθετικά προϊόντα, τα οποία μεταφέρονται από τα φύλλα στη ρίζα διά μέσου του φλοιώματος. Οι αζωτούχες οργανικές ενώσεις που μεταφέρονται από τις ρίζες στα φύλλα, όπως και αυτές που παράγονται στα φύλλα, μεταφέρονται στ' άλλα φυτικά όργανα διά μέσου του φλοιώματος. Στα φυτά που έχουν αζωτοδεσμευτικά φυμάτια, όπως είναι τα ψυχανθή, ένα μέρος των αζωτούχων ενώσεων των σπερμάτων προέρχεται από τις ρίζες και ένα μέρος από ενώσεις που συντίθενται στα φύλλα.

A.3.3 Φόρτωση του φλοιώματος

A.3.3.1 Μεταφορά των φωτοσυνθετικών προϊόντων

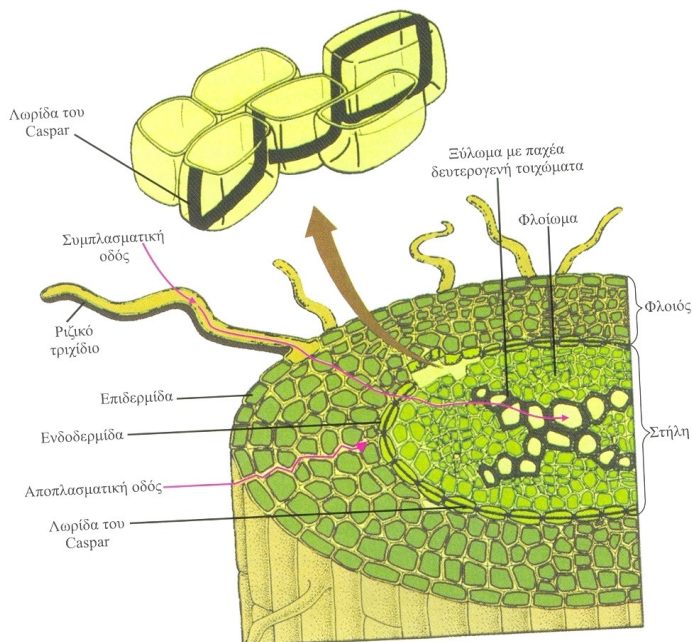
Το ωσμωτικό δυναμικό του φλοιώματος είναι πολύ χαμηλότερο απ' αυτό των κυττάρων του μεσοφύλλου και οφείλεται συχνά στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των σακχάρων, και κυρίως της σακχαρόζης, αφού η σακχαρόζη είναι η κύρια μορφή μεταφοράς των σακχάρων στο φλοιόμα. Η διαδικασία που προκαλεί την συσσώρευση σακχάρων στα

σύμπλεγμα συνοδά κύτταρα/ηθμώδη στοιχεία (ΣΚ/ΗΣ) από τον συμπλάστη ή τον αποπλάστη (Εικ. Α.6) του μεσοφύλλου αποκαλείται φόρτωση του φλοιώματος (phloem loading).

Η φόρτωση του φλοιώματος αποτελεί έναν από τους καθοριστικούς παράγοντες της αύξησης και της ανάπτυξης των φυτών και επομένως της φυτικής παραγωγής.

Το πρώτο προϊόν της φωτοσύνθεσης, η φωσφορική τριόζη, μεταφέρεται από τον χλωροπλάστη στο θεμελιώδες κυτταρόπλασμα, όπου μετατρέπεται σε σακχαρόζη (suc)· κατά τη διάρκεια της νύχτας, η σακχαρόζη συντίθεται επίσης από την γλυκόζη, προϊόν της υδρόλυσης του αμύλου των χλωροπλαστών. Η σακχαρόζη μεταφέρεται κατόπιν από τα κύτταρα του μεσοφύλλου στα ηθμώδη στοιχεία των δευτερευόντων αγγείων (Εικ. Α.7), που απέχουν 2-3 κύτταρα το πολύ. Πως όμως μεταφέρεται η σακχαρόζη; Ακολουθεί την αποπλασματική ή τη συμπλασματική οδό;

Ύστερα από μελέτες και διαφωνίες, οι επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η φόρτωση του φλοιώματος διαφέρει αναλόγως του φυτικού είδους. Ο σημαντικότερος ίσως παράγοντας είναι ο αριθμός των πλασμοδεσμών μεταξύ των συνοδών κυττάρων των δευτερευόντων αγγείων και των γειτονικών κυττάρων του μεσοφύλλου, ο οποίος διαφέρει μεταξύ των φυτικών ειδών.



Εικόνα Α.6: Ανατομία της ρίζας σε σχέση με τις πιθανές οδούς μετακίνησης του νερού και των

προϊόντων φωτοσύνθεσης, τη συμπλασματική και αποπλασματική οδό.

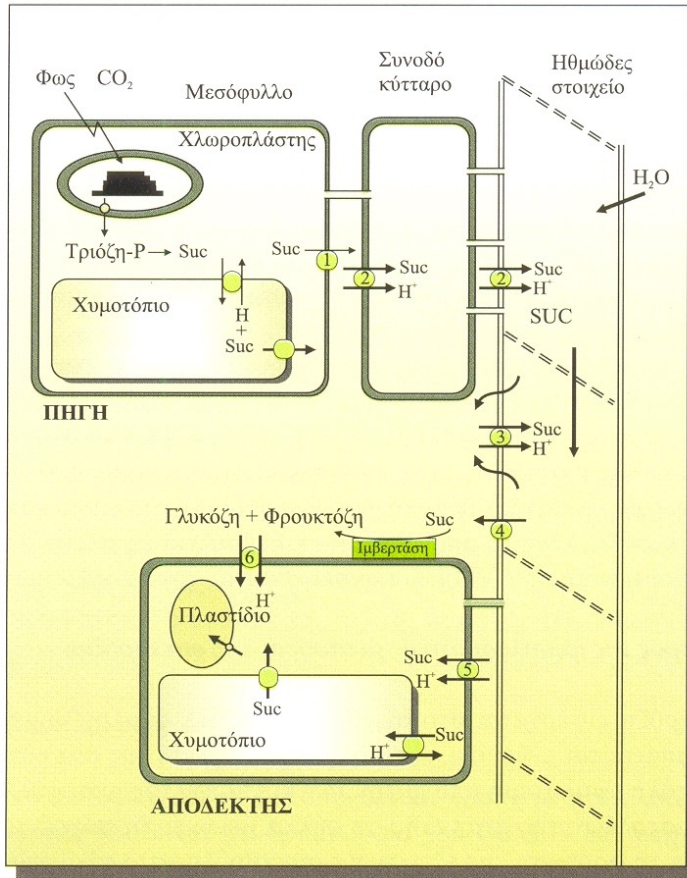
Στα φυτικά είδη που έχουν κοινά συνοδά ή μεταγωγικά κύτταρα, τα φωτοσυνθετικά προϊόντα εισέρχονται στο φλοίομα (στο σύμπλοκο ΣΚ/ΗΣ) αποκλειστικά υπό τη μορφή σακχαρόζης, ακολουθώντας την αποπλασματική οδό (Εικ. Α.7). Στα περισσότερα ποώδη φυτά που προέρχονται από εύκρατα κλίματα, τα φωτοσυνθετικά προϊόντα εισέρχονται στο φλοίομα από τον αποπλάστη. Αντιθέτως, στα φυτά στα οποία τα δευτερεύοντα αγγεία έχουν ενδιάμεσα συνοδά κύτταρα, τα φωτοσυνθετικά προϊόντα με τη μορφή ραφφινόζης, σταχυόζης ή σακχαρόζης ακολουθούν την συμπλασματική οδό. Ωστόσο, στις περιπτώσεις που τα συνοδά κύτταρα των δευτερευόντων αγγείων έχουν μικρό αριθμό πλασμοδεσμών, ένα μέρος των προϊόντων της φωτοσύνθεσης μπορεί ν' ακολουθεί την αποπλασματική οδό και ένα άλλο μέρος την συμπλασματική.

A.3.3.2 Αποπλασματική οδός

Η τεκμηρίωση ότι η φόρτωση του φλοιώματος ακολουθεί την αποπλασματική οδό μεταφοράς ενισχύεται αν:

- Τα μεταφερόμενα σάκχαρα εντοπίζονται στον αποπλάστη.
- Η σακχαρόζη, που παρέχεται εξωγενώς, συσσωρεύεται στα ηθμώδη στοιχεία, όπως ακριβώς όταν προέρχεται από τη φωτοσυνθετική δέσμευση του CO₂.
- Η παρουσία του αναστολέα PCMBs (το μετά υδραργύρου άλας του p-χλωροβενζολοσουλφονικού οξέος ή p-χλωροϋδραργυροβενζολο-σουλφονικό οξύ) αναστέλλει την πρόσληψη της σακχαρόζης (το PCMBs αναστέλλει τη διέλευση της σακχαρόζης διά μέσου του πλασμαλήμματος και, κατά συνέπεια, την πρόσληψη της από τον αποπλάστη). Σημειώνεται ότι ο αναστολέας PCMBs δεν εισέρχεται στα κύτταρα.

Πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ραδιενεργή σακχαρόζη έδειξαν ότι σε φυτικά είδη, όπως το μπιζέλι, το παντζάρι, το κουκί και άλλα, τουλάχιστον μία από τις προϋποθέσεις αυτές ισχύει, υποδηλώνοντας ότι στα συγκεκριμένα φυτά η είσοδος της σακχαρόζης στα σύμπλεγμα ΣΚ/ΗΣ ακολουθεί την αποπλασματική οδό.



Εικόνα Α.7: Μεταφορά της σακχαρόζης (Suc) στο φλοιώμα σε μεγάλη απόσταση. Από τη θέση παραγωγής της, η σακχαρόζη μπορεί να φορτωθεί στο σύμπλεγμα ΣΚ/ΗΣ είτε δια μέσου των πλασμοδεσμών (συμπλασματικά) είτε διαμέσου του αποπλάστη. Στην περίπτωση της αποπλασματικής μεταφοράς απαιτείται η δράση ενός μεταφορέα της σακχαρόζης (1) με τη βοήθεια του οποίου αυτή θα διασχίσει το πλασμαλήμμα του κυττάρου του μεσοφύλλου ή του δεσμικού παρεγχύματος, ενώ για την είσοδο της στο σύμπλεγμα ΣΚ/ΗΣ πρέπει να δράσει ένας δεύτερος μεταφορέας (2). Η σακχαρόζη στον ηθμοσωλήνα παρασύρεται από το ρεύμα μετακίνησης του ηθμώδους χυμού, που δημιουργείται εξαιτίας της διαφοράς της υδροστατικής πίεσης στα δύο άκρα του ηθμοσωλήνα. Κατά τη διάρκεια της ροής είναι δυνατόν να λάβει χώρα παθητική διαρροή της σακχαρόζης (υποδεικνύεται με κυματιστά τόξα), η οποία μπορεί να επαναπροσληφθεί με την δράση ενός μεταφορέα (3). Για την αποπλασματική εκφόρτωση του φλοιώματος απαιτείται η δράση ενός μεταφορέα (4), ενώ η είσοδος της σακχαρόζης στα κύτταρα του αποδέκτη μπορεί να γίνει είτε διαμέσου των πλασμοδεσμών είτε διαμέσου της δράσης ενός μεταφορέα (5). Συνχά, στον αποπλάστη του αποδέκτη υπάρχει η ιμβερτάση, οπότε η σακχαρόζη εισέρχεται στα κύτταρα του αποπλάστη με την μορφή της εξόζης (6). Η είσοδος της σακχαρόζης στα χυμοτόπια γίνεται με αντιμεταφορέα, ενώ η έξοδος της με συμμεταφορέα.

Η σακχαρόζη εισέρχεται αυτούσια στο σύμπλεγμα ΣΚ/ΗΣ. Αυτό αποδείχθηκε με τη χρήση διαγονιδιακών τομάτας, τα οποία είχαν στον αποπλάστη τους ιμβερτάση, το ένζυμο που διαλύει τη σακχαρόζη. Αυτά τα φυτά παρουσίασαν μικρή ταχύτητα αύξησης, καθώς και αδυναμία να κινητοποιήσουν το αποταμιευτικό άμυλο των ώριμων φύλλων (φύλλα-πηγές), όταν τα φυτά αναπτύσσονταν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο σκοτάδι. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει επιπλέον ότι στην τομάτα η σακχαρόζη φορτώνεται στο φλοίωμα ακολουθώντας την αποπλασματική οδό.

A.3.3.3 Μηχανισμός της αποπλασματικής μεταφοράς της σακχαρόζης

Όταν η σακχαρόζη εισέρχεται στο σύμπλεγμα ΣΚ/ΗΣ ακολουθώντας την αποπλασματική οδό, απαιτείται ενέργεια, επειδή η συγκέντρωση της στα φύλλα του φλοιώματος είναι πολύ υψηλότερη απ' αυτήν των κυττάρων του μεσοφύλλου. Πράγματι, χορήγηση των αναστολέων της αναπνοής σε φύλλα μειώνει τη συγκέντρωση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και αναστέλλει τη φόρτωση της εξωγενούς σακχαρόζης στο φλοίωμα.

Όπως είναι γνωστό, στις περισσότερες περιπτώσεις ενεργής μεταφοράς, η ενέργεια παρέχεται από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Στην περίπτωση της αποπλασματικής μεταφοράς της σακχαρόζης, η ενέργεια που εκλύεται από την υδρόλυση του ATP χρησιμοποιείται για την έξοδο πρωτονίων αντίθετα από τη διαβάθμιση της συγκέντρωσής τους. Τα πρωτόνια εισέρχονται αυτόματα στο κύτταρο, εξαιτίας του χαμηλού pH του αποπλάστη σε σχέση με το pH του κυτταροπλάσματος. Η μετακίνηση αυτή των πρωτονίων συνδέεται μ' εξειδικευμένους μεταφορείς, όπως αυτόν της σακχαρόζης, η οποία διαπερνά το πλασμαλήμμα μαζί με τα πρωτόνια. Η πρόσληψη της σακχαρόζης μειώνεται όταν το pH του αποπλάστη είναι υψηλό, διότι μειώνεται η ηλεκτρεγερτική δύναμη των πρωτονίων.

Η υπόθεση της συνεργασίας μιας αντλίας H^+ -ATP (αντλίας πρωτονίων) με τον μεταφορέα της σακχαρόζης ενισχύεται από τ' αποτελέσματα πειραμάτων, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές:

- Με την χρήση αντισωμάτων εντοπίστηκαν αντλίες πρωτονίων στο πλασμαλήμμα των συνοδών κυττάρων του φυτού της αραβιδόψης και των

μεταγωγικών κυττάρων στα φυτά του κουκιού, και μάλιστα στις θέσεις των τοιχωματικών προεκβολών των κυττάρων που βρίσκονται προς το μέρος των κυττάρων του παρεγχυματικού κολεού, εκεί δηλαδή όπου η μεταφορά των φωτοσυνθετικών προϊόντων είναι πιο έντονη.

- Στα συνοδά κύτταρα της αραβιδόψης, η αντλία πρωτονίων που παράγει τη διαβάθμιση των πρωτονίων και η πρωτεΐνη-συμμεταφορέας της σακχαρόζης- H^+ που χρησιμοποιεί την διαβάθμιση αυτή, εντοπίζονται στην ίδια περιοχή.

Στα διάφορα φυτικά είδη υπάρχουν ποικίλοι πρωτεϊνικοί συμμεταφορείς της σακχαρόζης- H^+ . Ο ποικίλος χαρακτήρας των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι γνωστό αν έχει σχέση με τη λειτουργία τους ή με το φυτικό είδος. Σε ποώδη φυτά, όπως στο καλαμπόκι, ο μεταφορέας SUT1 απαντά στο πλασμαλήμμα των ηθμωδών στοιχείων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σακχαρόζη μπαίνει κατευθείαν στο ηθμώδες στοιχείο, χωρίς την παρεμβολή συνοδών κυττάρων. Αντιθέτως, στο φυτό χωνάκι (*Ipomoea nil*), ο μεταφορέας της σακχαρόζης SUC2 μαζί με την αντλία πρωτονίων (H^+ -ATPάση) εντοπίστηκε μόνο στο πλασμαλήμμα των συνοδών κυττάρων, ενώ απουσίαζε από τα ηθμώδη στοιχεία (Εικ. Α.8).

Πως όμως ρυθμίζεται η ταχύτητα της αποπλάσματικής μεταφοράς της σακχαρόζης; Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η σακχαρόζη εισέρχεται στο φλοίωμα με τη διαμεσολάβηση εξειδικευμένου μεταφορέα, και επομένως η κινητική της πρόσληψης της από φλοίωμα εξαρτάται από την συγκέντρωση της: όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της σακχαρόζης στον αποπλάστη τόσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα της πρόσληψης της. Επίσης, η μείωση της πίεσης σπαργής των ηθμωδών στοιχείων αυξάνει την ταχύτητα της αποπλάσματικής εισόδου της σακχαρόζης στο φλοίωμα.

A.3.3.4 Συμπλασματική οδός

Η πιο πειστική απόδειξη ότι τα φωτοσυνθετικά προϊόντα στο φλοίωμα ακολουθούν τη συμπλασματική οδό είναι ότι η παρουσία του PCMBBS δεν επηρεάζει την πρόσληψη της σακχαρόζης. Αυτοραδιογραφήματα φύλλων από φυτά, στα οποία ο αριθμός των πλασμοδεσμών μεταξύ του συμπλέγματος ΣΚ/ΗΣ και των γειτονικών κυττάρων είναι μεγάλος (π.χ. φυτά των οικογενειών Onagraceae, Lamiaceae και Hydrangeaceae), μετά

τη χορήγηση $^{14}\text{CO}_2$, έδειξαν ότι το PCMBS δεν είχε ανασταλτική δράση στην φόρτωση του φλοιώματος.

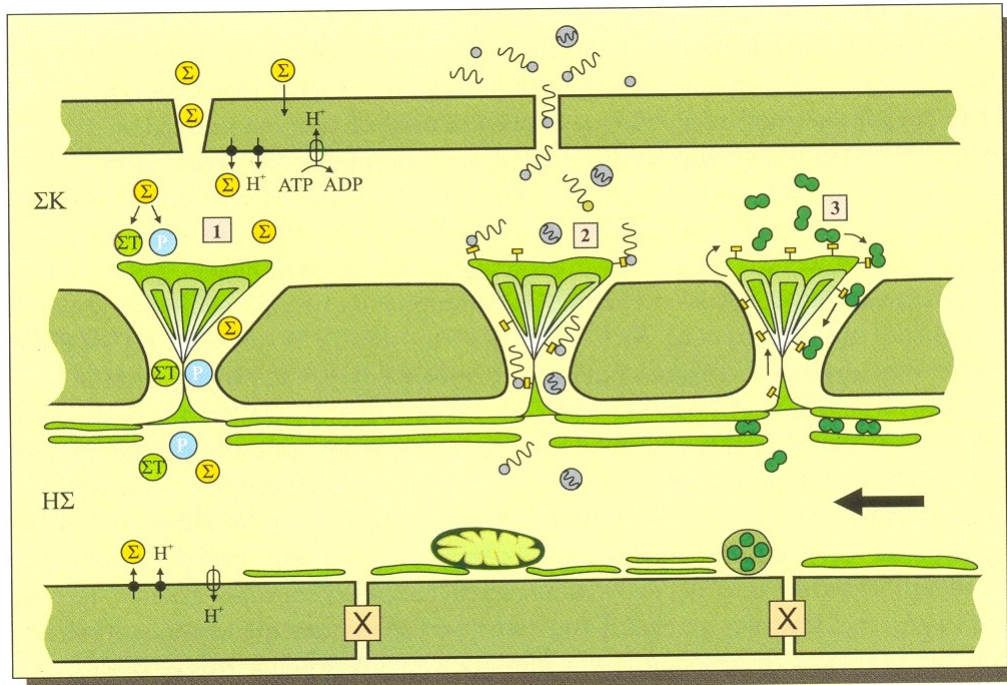
Όμως υπάρχουν δύο ερωτήματα που ανακύπτουν: πρώτον γιατί η σύσταση του ηθμώδους χυμού είναι διαφορετική απ' αυτήν των γειτονικών κυττάρων, και δεύτερον πως εξηγείται το γεγονός ότι η συγκέντρωση των σακχάρων στον ηθμώδη χυμό είναι μεγαλύτερη από εκείνη στα γειτονικά κύτταρα.

Απάντηση στα παραπάνω ερωτήματα μπορεί να δώσει το μοντέλο του «μηχανισμού παγίδευσης με πολυμερισμό» του Turgeon. Σύμφωνα μ' αυτό, η σακχαρόζη των κυττάρων του μεσοφύλλου, έχοντας συγκέντρωση μεγαλύτερη απ' αυτήν του ενδιάμεσου κυττάρου, διαχέεται στο ενδιάμεσο κύτταρο σύμφωνα με τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης της. Εκεί ενώνεται με τη γαλακτινόλη σχηματίζοντας τη ραφφινόζη, τη σταχυόζη και τη βερμπασκόζη (Εικ. Α.8). Η μεγάλη διάμετρος των μορίων αυτών δεν επιτρέπει την επιστροφή τους στα κύτταρα του μεσοφύλλου, διότι δεν χωρούν να περάσουν από τις πλασμοδέσμες που τα συνδέουν με το ενδιάμεσο κύτταρο. Η ισχύς του μοντέλου του Turgeon ενισχύεται από το γεγονός ότι όλα τα ένζυμα, που εμπλέκονται στη μετατροπή της σακχαρόζης σε ραφφινόζη ή σταχυόζη, υπάρχουν στα ενδιάμεσα κύτταρα.

Η παρουσία στο φλοιώμα φυτών μεγάλης συγκέντρωσης σακχαρόζης, που θεωρητικά η φόρτωση της ακολουθεί τη συμπλασματική οδό, έρχεται σ' αντίθεση με το μοντέλο αυτό. Παρ' όλα αυτά, η υψηλή συγκέντρωση είναι δυνατόν να ερμηνευτεί αν στο φλοιώμα οι ολιγοσακχαρίτες αυτοί μεταβολίζονται σε σακχαρόζη και αν στο μέρος της σακχαρόζης, που εισέρχεται στο ενδιάμεσο κύτταρο, δεν μεταβολίζεται σε ολιγοσακχαρίτες, αλλά μεταφέρεται στο φλοιώμα όπως είναι.

A.3.3.5 Μεταφορά μη υδατανθρακικών ενώσεων

Στον ηθμώδη χυμό, εκτός από τα σάκχαρα υπάρχουν και άλλα συστατικά, όπως αμινοξέα, οργανικά οξέα, φυτοορμόνες, ανόργανα ιόντα και άλλα. Τ' αμινοξέα και τ' ανόργανα ιόντα συχνά εισέρχονται στο σύμπλοκο ΣΚ/ΗΣ με μηχανισμούς ενεργής



Εικόνα Α.8: Σχηματική αναπαράσταση της κυκλοφορίας διαλυμένων και μεγαλομοριακών ενώσεων μεταξύ συνοδών κυττάρων και ηθμωδών στοιχείων. (1) Φόρτωση διαλυμένων ενώσεων. Όταν η σακχαρόζη (Σ) φορτώνεται συμπλασματικά, εισέρχεται στο συνοδό κύτταρο από τον παρεγχυματικό κολεό και μετατρέπεται σε ραφφινόζη (Ρ) ή σταχυόζη (ΣΤ). Οι ολιγοσακχαρίτες αυτοί είναι αρκετά ογκώδεις, οπότε δεν μπορούν να διαχυθούν πίσω στον παρεγχυματικό κολεό, αλλά μπορούν να διαχυθούν μέσω των ηθμωδών πεδίων στα ηθμώδη στοιχεία. Όταν η μεταφορά της σακχαρόζης είναι αποπλασματική, η είσοδος της στο συνοδό κύτταρο γίνεται με την δράση μιας πρωτεΐνης-μεταφορέα, η οποία εντοπίζεται είτε στο πλασμαλήμμα του συνοδού κυττάρου (όπως φαίνεται στην εικόνα) είτε στο πλασμαλήμμα του ηθμώδους στοιχείου. (2) Κυκλοφορία του mRNA. Τα ενδογενή μόρια RNA που προέρχονται από το μεσόφυλλο εισέρχονται στο συνοδό κύτταρο πάνω σε εξειδικευμένες πρωτεΐνες-συνοδούς (γκρίζοι κύκλοι). Όταν φθάσουν στα ηθμώδη πεδία, πιθανολογείται ότι οι πρωτεΐνες-συνοδοί αντιδρούν με μία πρωτεΐνη υποδοχέα (τετράγωνο), η οποία εντοπίζεται στον δεσμοσωληνίσκο που διέρχεται από τον πόρο της πλασμοδέσμης. Τα ικά RNA στο συνοδό κύτταρο κυκλοφορούν με την βοήθεια μιας μεταφορικής πρωτεΐνης (κύκλοι). Όπως και στην περίπτωση των ενδογενών μορίων RNA, οι μεταφορικές πρωτεΐνες αντιδρούν με μία πρωτεΐνη-υποδοχέα και έτσι διευκολύνεται η μετακίνηση τους στα ηθμώδη στοιχεία. Συστημικοί ιοί κυκλοφορούν διαμέσου των ηθμωδών πεδίων και ως ακέραιοι ιοί (γκρίζοι κύκλοι με ελατήριο). (3) Μετακίνηση

πρωτεϊνών μεταξύ ΣΚ και ΗΣ. Οι πρωτεΐνες που συντίθενται στα συνοδά κύτταρα (ΣΚ) και προορίζονται για το περιφερειακό κυτταρόπλασμα των ηθμοδών στοιχείων (ΗΣ) μετακινούνται διαμέσου των ηθμοδών πεδίων μετά από αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες-υποδοχείς που βρίσκονται στους δεσμοσωληνίσκους. Με τον τρόπο αυτό μετακινούνται κατά μήκος του λείου ενδοπλασματικού δικτύου των ΗΣ, εξασφαλίζοντας την παράδοση τους στον στόχο τους, χωρίς να παρασυρθούν από το ρεύμα μετακίνησης στους ηθμοσωλήνες. Μετά την παράδοση των πρωτεϊνών στον προορισμό τους, οι πρωτεϊνικοί υποδοχείς μπορεί ν' ανακυκλωθούν πίσω στα ΣΚ, ώστε να συλλέξουν άλλο «φορτίο» (τόξα). Άλλες μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες μπορεί να εισέλθουν με διάχυση από τα ΣΚ στα ΗΣ και να μετακινηθούν μέσω των ηθμοσωλήνων, καταλήγοντας σε κάποιο αποδέκτη.

μεταφοράς. Γ' άλλα συστατικά, όπως τα οργανικά οξέα και οι φυτοορμόνες, απαντούν στο φλοιώμα σε μικρότερες συγκεντρώσεις απ' ότι στα γειτονικά κύτταρα. Αυτό υποδηλώνει ότι η είσοδος τους στο φλοιώμα δεν γίνεται με δαπάνη μεταβολικής ενέργειας. Τα οργανικά οξέα μπορούν εξαιτίας του όξινου χαρακτήρα τους να διαπεράσουν τη λιπιδική διπλοστοιβάδα του πλασμαλήμματος μ' απλή διάχυση.

Αλλά, και γενικά ενώσεις με όξινο χαρακτήρα, όταν μπουν στο κύτταρο παγιδεύονται σ' αυτό ή και σε οργανίδια που έχουν αλκαλικό pH, εξαιτίας του αλκαλικού pH του κυτταροπλάσματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το αμπισισικό οξύ (ABA), το μεγαλύτερο ποσοστό του οποίου βρίσκεται κατά τη διάρκεια της ημέρας στους χλωροπλάστες.

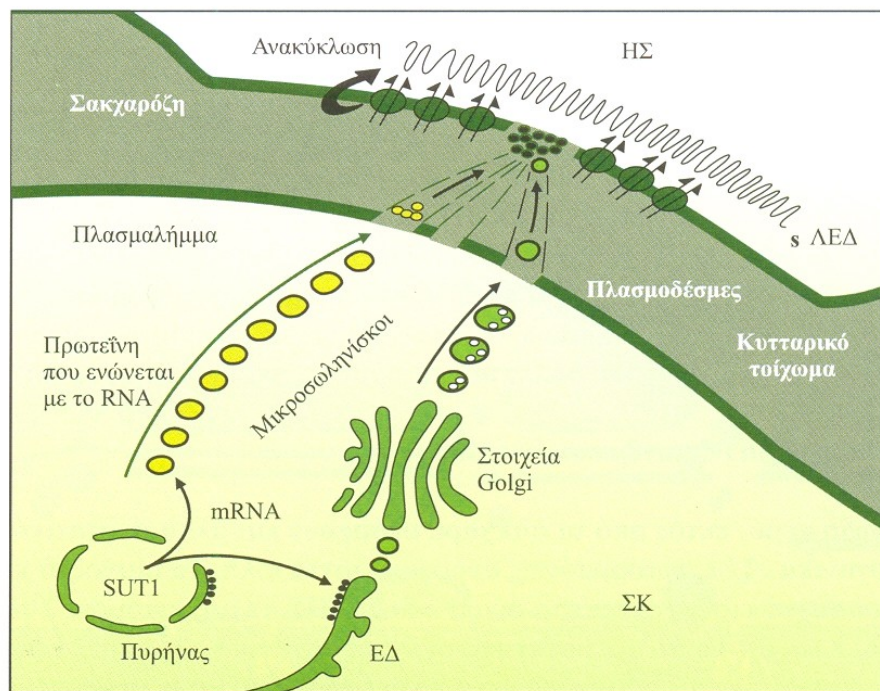
Άλλες ενώσεις διαπερνούν το πλασμαλήμμα του συμπλέγματος ΣΚ/ΗΣ με τη βοήθεια του μεταφορέα ή διά μέσου του συμπλάστη. Ενώσεις που δεν αποτελούν φυτικό συστατικό όπως π.χ. ζιζανιοκτόνα ή μυκητοκτόνα, εισέρχονται στους ηθμοσωλήνες, με απλή διάχυση μέσω του πλασμαλήμματος του συμπλέγματος ΣΚ/ΗΣ. Οι ενώσεις αυτές παραμένουν στους ηθμοσωλήνες, διότι η ταχύτητα με την οποία εισέρχονται είναι αρκετά μεγάλη, ώστε να τους επιτρέπει να συσσωρεύονται, ενώ η ταχύτητα εξόδου απ' αυτούς είναι μικρή, έτσι ώστε μέρος μόνο από τις ενώσεις αυτές να καταλήγει στον αποδέκτη.

A.3.3.6 Μεταφορά μακρομορίων

Εκτός από τις μικρομοριακές ενώσεις (σάκχαρα, αμινοξέα και άλλα) και ιόντα, στον χυμό του φλοιώματος έχουν εντοπιστεί μακρομοριακές ενώσεις, όπως πρωτεΐνες και RNA. Το RNA που έχει εντοπιστεί στο φλοιώμα είναι ενδογενές ή ιικό RNA. Στα ηθμώδη στοιχεία έχει εντοπιστεί mRNA του SUT1 (Εικ. A.9). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το *sut1* mRNA συντίθεται στα συνοδά κύτταρα και, εφόσον δεν μεταφραστεί εκεί, μεταφέρεται με τη μορφή νουκλεοπρωτεΐνης διά μέσου των πλασμοδεσμών στα ηθμώδη στοιχεία, όπου συνδέεται με το ενδοπλασματικό δίκτυο του ηθμώδους στοιχείου [Εικ. A.8(2)]. Η απουσία ριβοσωμάτων στα ηθμώδη στοιχεία αποκλείει τη μετάφραση του στα ηθμώδη στοιχεία. Το πιο πιθανό είναι ότι αυτό το mRNA, όπως και άλλα mRNA που έχουν εντοπιστεί στο φλοιώμα, προορίζεται να διανύσει μεγάλες αποστάσεις στο

ρεύμα μετακίνησης του φλοιώματος, με τελική κατάληξη τα κύτταρα που το περιβάλλουν.

Για την εισαγωγή του ιικού RNA στο φλοιώμα ακολουθούνται διάφορες στρατηγικές. Το ιικό RNA στο μεσόφυλλο μετακινείται διά μέσου των πλασμοδεσμών ως ευθύγραμμο σύμπλεγμα ενωμένο με μια εξειδικευμένη ιική μεταφορική πρωτεΐνη. Κατά τη διάρκεια της μετακίνησης του στο φλοιώμα, και προκειμένου να προστατευτεί από τις ριβονουκλεάσες του φλοιώματος, το ιικό RNA φαίνεται πως συνδέεται προσωρινά με μια δεύτερη ιική πρωτεΐνη. Ο ιός *Cauliflower mosaic* (CMV) μετακινείται δια μέσου των ηθμωδών πεδίων ως ριβονουκλεοπρωτεΐνη, ενώ ακολουθεί η συγκρότηση του ιού μέσα σε συμπλέγματα προσδεμένα σε μεμβράνες που συνδέονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο του ηθμώδους στοιχείου. Αντίθετα, ο ιός του καρότου κυκλοφορεί ακέραιος στο φλοιώμα των δευτερευόντων αγγείων και στα ηθμώδη πεδία των ηθμωδών στοιχείων.



Εικόνα Α.9: Στα είδη Solanaceae, η πρωτεΐνη SUT1 εντοπίζεται στο πλασμαλήμμα του ΗΣ, ενώ η μεταγραφή της γίνεται στα ΣΚ. Υπάρχουν δυο πιθανά μονοπάτια, τα οποία είναι δυνατόν να λειτουργούν συγχρόνως: το mRNA του *Sut1* είναι δυνατόν να περάσει μέσα από τις πλασμοδέσμες με κάποιο μηχανισμό μεταφοράς του RNA. Αλλιώς, η μετάφραση του μπορεί να γίνει στα ΣΚ και να παραδοθεί στο ΗΣ διαμέσου του πλασμαλήμματος ή των πλασμοδεσμών. ΕΔ: ενδοπλασματικό δίκτυο, ΛΕΔ: λείο ενδοπλασματικό δίκτυο του ΗΣ.

Στον ηθμώδη χυμό έχουν αναγνωριστεί διάφορες πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, μεταξύ 20 και 60 kDa. Ορισμένες απ' αυτές απαντούν σχεδόν αποκλειστικά στα ηθμώδη στοιχεία, όπως η β-αμυλάση, η γλουταρεδοξίνη, η θειορεδοξίνη, η Ρ-πρωτεΐνη, η ουβικιτίνη, η κυκλοφιλίνη, καθώς και διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες. Ο ρόλος των περισσότερων από τις πρωτεΐνες αυτές δεν είναι γνωστός, το ίδιο και η σταθερότητα τους.

Οι περισσότερες από τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες που συντίθενται στα συνοδά κύτταρα και από εκεί μεταφέρονται στα ηθμώδη στοιχεία συμπλασματικά, διά μέσου των πλασμοδεσμών. Κατόπιν, ορισμένες πρωτεΐνες «αγκυροβολούν» στα ηθμώδη στοιχεία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι πολλές Ρ-πρωτεΐνες, οι οποίες «αγκυροβολούν» στα ηθμώδη στοιχεία συνδεόμενες πιθανώς με τη λεκτίνη PP2. Ωστόσο, τουλάχιστον ορισμένες Ρ-πρωτεΐνες, όπως του γένους *Cucurbita*, μετακινούνται διά μέσου του φλοιώματος μαζί με τα φωτοσυνθετικά προϊόντα.

Επίσης, είναι πιθανό πρωτεΐνες που συντίθενται στα συνοδά κύτταρα (ΣΚ) να μεταφέρονται στα ηθμώδη στοιχεία (ΗΣ), μετακινούμενες διά μέσου των διακλαδισμένων πλασμοδεσμών πάνω σε πρωτεϊνικούς υποδοχείς των δεσμοσωληνίσκων [Εικ. Α.8(3)]. Οι υποδοχείς αυτοί τις παραδίδουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο του ΗΣ (το οποίο είναι συνεχές μεταξύ γειτονικών ΗΣ), όπου καταλήγουν «έρποντας» στις συγκεκριμένες θέσεις-στόχους, χωρίς να παρασυρθούν από το ρεύμα μετακίνησης του φλοιώματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο μεταφορέας της σακχαρόζης SUT1, ο οποίος συντίθεται στα ΣΚ και μεταφέρεται διά μέσου των πλασμοδεσμών στο γειτονικό ΗΣ. Η μεταφορά της πρωτεΐνης αυτής γίνεται με μηχανισμό στόχευσης, ώστε να μην παρασυρθεί από το ρεύμα μετακίνησης του φλοιώματος, αλλά να ενσωματωθεί στο πλασμαλήμμα του ΗΣ.

Α.3.4 ΕΚΦΟΡΤΩΣΗ ΤΟΥ ΦΛΟΙΩΜΑΤΟΣ

Τα φωτοσυνθετικά προϊόντα και τ' άλλα συστατικά του ηθμώδους χυμού, αφού εισέλθουν στους ηθμοσωλήνες, εκφορτώνονται απ' αυτούς σε όλο το μήκος τους. Το μονοπάτι που ακολουθεί η εκφόρτωση του φλοιώματος καθορίζει τα γεγονότα-κλειδιά της μεταφοράς, τα οποία είναι υπεύθυνα για την μετακίνηση των διαλυμένων ουσιών από

τα ηθμώδη στοιχεία στα κύτταρα του αποδέκτη.

A.3.4.1 Μηχανισμοί εκφόρτωσης του φλοιώματος

Η εκφόρτωση του φλοιώματος είναι η μετακίνηση των φωτοσυνθετικών προϊόντων από τα ηθμώδη στοιχεία στα κύτταρα του αποδέκτη, και περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Έξοδο των φωτοσυνθετικών προϊόντων από το σύμπλεγμα ΣΚ/ΗΣ του αποδέκτη.
- Μεταφορά τους σε κύτταρα του αποδέκτη.
- Μεταβολισμό ή/και αποταμίευση τους στα κύτταρα του αποδέκτη.

Όπως κατά τη φόρτωση του φλοιώματος, έτσι και κατά την εκφόρτωση του, η οδός που ακολουθούν τα φωτοσυνθετικά προϊόντα από τα ηθμώδη στοιχεία στα κύτταρα του αποδέκτη μπορεί να είναι συμπλασματική ή αποπλασματική, τουλάχιστον σε κάποιο σημείο της διαδρομής τους. Επειδή οι αποδέκτες είναι ιστοί με πολύ διαφορετική ανατομία (φύλλα, ρίζες, σπέρματα και άλλα), ο μηχανισμός εκφόρτωσης (συμπλασματική ή αποπλασματική οδός, ενεργητική ή παθητική μεταφορά) δεν ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο. Ύπαρξη πλασμοδεσμών μεταξύ ηθμωδών στοιχείων και κυττάρων του αποδέκτη και συνθήκες ανοξίας ή έλλειψη δράσης του PCMBBS υποδηλώνουν ότι ακολουθείται η συμπλασματική οδός. Η εκφόρτωση των φωτοσυνθετικών προϊόντων στ' αναπτυσσόμενα φύλλα πολλών δικοτυλήδων, όπως του καπνού, ακολουθεί τη συμπλασματική οδό, ενώ στ' αναπτυσσόμενα φύλλα του αραβοσίτου ακολουθεί την αποπλασματική οδό. Στους κονδύλους της πατάτας, τα φωτοσυνθετικά προϊόντα εκφορτώνονται από τα ηθμώδη στοιχεία στα παρεγχυματικά αποταμιευτικά κύτταρα, ακολουθώντας κυρίως τη συμπλασματική οδό (η πλασμόλυση των παρεγχυματικών κυττάρων αναστέλλει την εκφόρτωση τους), αλλά ένα μικρό μέρος των φωτοσυνθετικών προϊόντων εκφορτώνεται ακολουθώντας, σε κάποιο σημείο της διαδρομής τους, την αποπλασματική οδό (η παρουσία PCMBBS μειώνει την ποσότητα που εισέρχεται στα παρεγχυματικά κύτταρα).

A.3.4.2 Ενεργητική μεταφορά στον αποδέκτη

Η είσοδος των φωτοσυνθετικών προϊόντων στους αποδέκτες, όπως είναι τα νεαρά φύλλα, η ρίζα, οι αναπτυσσόμενοι αποταμιευτικοί ιστοί (π.χ. σπέρματα, κόνδυλοι) γίνεται με την δαπάνη μεταβολικής ενέργειας. Όταν η εκφόρτωση του φλοιώματος είναι συμπλασματική, τα φωτοσυνθετικά προϊόντα διαχέονται διά μέσου των πλασμοδεσμών σύμφωνα με την διαβάθμιση της συγκέντρωσης τους, η οποία διατηρείται διότι μόλις αυτά εισέλθουν στα κύτταρα του αποδέκτη μεταβολίζονται:

- Στους αυξανόμενους ιστούς (φύλλα, ρίζα, άνθη), ένα μικρό ποσοστό χρησιμοποιείται ως αναπνευστικό υπόστρωμα, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό μετατρέπεται σ' ενώσεις που απαιτούνται για την αύξηση τους.
- Στους αποταμιευτικούς ιστούς μετατρέπονται τελικώς σ' αποταμιευτικά προϊόντα (πολυμερή, άμυλο, πρωτεΐνες και άλλα). Με τον τρόπο αυτό, η συγκέντρωση των φωτοσυνθετικών προϊόντων στα κύτταρα του αποδέκτη διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες διαδικασίες απαιτούν ενέργεια.

Όταν η εκφόρτωση του φλοιώματος είναι αποπλασματική, για να φθάσουν τα φωτοσυνθετικά προϊόντα στα κύτταρα του αποδέκτη πρέπει να διασχίσουν τουλάχιστον δύο κυτταρικές μεμβράνες: αυτήν του κυττάρου από το οποίο εξέρχονται και αυτήν του κυττάρου στο οποίο θα εισέλθουν. Τόσο η έξοδος των σακχάρων από τα ηθμώδη στοιχεία όσο και η είσοδος τους στα κύτταρα του αποδέκτη γίνεται με την βοήθεια εξειδικευμένου μεταφορέα.

Στα αναπτυσσόμενα σπέρματα δεν υπάρχουν συμπλασματικές συνδέσεις μεταξύ των μητρικών ιστών και των ιστών του εμβρύου. Έτσι, τα φωτοσυνθετικά προϊόντα εξέρχονται από τα ηθμώδη στοιχεία στον αποπλάστη του αποδέκτη, απ' όπου προσλαμβάνονται από τα κύτταρα του. Στα σπέρματα των ψυχανθών, όπως της σόγιας, η είσοδος της σακχαρόζης στον αποπλάστη, αλλά και στα κύτταρα του εμβρύου, γίνεται με την διαμεσολάβηση μεταφορέα και απαιτεί μεταβολική ενέργεια. Αντιθέτως, στ' αναπτυσσόμενα σπέρματα των δημητριακών, όπως του σιταριού, η έξοδος της σακχαρόζης από το ηθμώδες στοιχείο στον αποπλάστη γίνεται παθητικά. Στον αποπλάστη υπάρχει η ιμπερτάση, η οποία υδρολύει την σακχαρόζη σε γλυκόζη και

φρουκτόζη. Έτσι, η συγκέντρωση της σακχαρόζης στον αποπλάστη παραμένει χαμηλή, εξασφαλίζοντας μια διαβάθμιση της συγκέντρωσης της μεταξύ του ηθμόδους στοιχείου του μητρικού φυτού και του αποπλάστη του αποδέκτη. Η πρόσληψη της σακχαρόζης και της γλυκόζης ή της φρουκτόζης από τα κύτταρα του αναπτυσσομένου σπέρματος γίνεται με την βοήθεια μεταφορέα.

Συχνά, τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης αποταμιεύονται στα χυμοτόπια των κυττάρων του αποδέκτη. Η είσοδος της σακχαρόζης στα χυμοτόπια γίνεται μ' αντιμεταφορά H^+ και με δαπάνη μεταβολικής ενέργειας, η οποία παρέχεται από το ATP. Στην διαδικασία συμμετέχει μια αντλία πρωτονίων, η H^+ -ATPάση, η οποία προκαλεί την είσοδο πρωτονίων στα χυμοτόπια αντίθετα από την διαβάθμιση της συγκέντρωσης τους (το pH του χυμοτοπίου είναι όξινο). Τα πρωτόνια εξέρχονται από το χυμοτόπιο σύμφωνα με την διαβάθμιση της συγκέντρωσης τους (το pH του κυτταροπλάσματος είναι περίπου 7) και η ενέργεια που εκλύεται χρησιμοποιείται για την είσοδο της σακχαρόζης με την βοήθεια του αντιμεταφορέα, αντίθετα από την διαβάθμιση της συγκέντρωσης της.

A.3.5 ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΡΟΗΣ ΤΩΝ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΦΛΟΙΩΜΑ

Η μέτρηση της ταχύτητας ροής των φωτοσυνθετικών προϊόντων στους ηθμοσωλήνες έγινε χρησιμοποιώντας ραδιενεργά σημασμένες ενώσεις, συνήθως ^{11}C - ή ^{14}C -σακχαρόζη, οι οποίες τοποθετούνται σε μια θέση του ηθμοσωλήνα και, μετά την πάροδο ορισμένου χρονικού διαστήματος, εντοπίζεται με κατάλληλα όργανα η θέση όπου έχουν μεταφερθεί.

Γενικά, η ταχύτητα μετακίνησης των φωτοσυνθετικών προϊόντων στο φλοιώμα ποικίλλει από 0,3-1,5 m·h⁻¹. Οι διαφορές αυτές οφείλονται πιθανώς στις διαφορετικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά και στις ιδιαιτερότητες των φυτικών ειδών. Πάντως πρόκειται για πολύ μεγάλες ταχύτητες, που αποκλείουν το γεγονός ότι η μετακίνηση στο φλοιώμα γίνεται με διάχυση (η ταχύτητα μετακίνησης με διάχυση είναι 1 m ανά 32 χρόνια).

A.3.5.1 Το πρότυπο πίεσης-ροής

Απ' όλα τα πρότυπα μετακίνησης ουσιών στο φλοιώμα, το επικρατέστερο είναι αυτό που διατυπώθηκε πρώτα από τον Ernst Münch, στην δεκαετία του 1930. Σύμφωνα μ' αυτό, η ροή των φωτοσυνθετικών προϊόντων στο φλοιώμα οφείλεται σε μια διαβάθμιση της υδροστατικής πίεσης, η οποία αναπτύσσεται μεταξύ πηγής και αποδέκτη ως συνέπεια της φόρτωσης του φλοιώματος στην πηγή και της εκφόρτωσης του στον αποδέκτη. Όταν τα φωτοσυνθετικά προϊόντα φορτώνονται σ' ένα ηθμώδες στοιχείο της πηγής μειώνεται το ωσμωτικό δυναμικό, συνεπώς και το υδατικό δυναμικό του. Αυτή η μείωση προκαλεί την είσοδο του νερού από τα γειτονικά κύτταρα στο ηθμώδες στοιχείο της πηγής, δημιουργώντας αύξηση στην πίεση σπαργής του.

Όταν τα φωτοσυνθετικά προϊόντα εξέρχονται από το ηθμώδες στοιχείο του αποδέκτη, αυξάνεται το ωσμωτικό δυναμικό, επομένως και το υδατικό δυναμικό του, σε σχέση μ' αυτό των γειτονικών κυττάρων, μ' αποτέλεσμα την έξοδο του νερού και τη μείωση της πίεσης σπαργής του. Έτσι, δημιουργείται μια διαφορά πίεσης μεταξύ της μίας άκρης του ηθμοσωλήνα στην πηγή (ηθμώδες στοιχείο στην πηγή) και της άλλης στον αποδέκτη (ηθμώδες στοιχείο στον αποδέκτη), προκαλώντας την ροή των φωτοσυνθετικών προϊόντων κατά μήκος του ηθμοσωλήνα, όπως ακριβώς η πίεση ωθεί το νερό σ' ένα σωλήνα.

Αυτή η διαφορά πίεσης μεταξύ ηθμωδών στοιχείων πηγής και αποδέκτη (στις δύο άκρες του ηθμοσωλήνα) διατηρείται εξαιτίας της ύπαρξης των εγκάρσιων τοιχωμάτων των ηθμοσωλήνων, τα οποία – παρ' ότι είναι διατηρητά (ηθμώδεις πόροι)- δημιουργούν μια αντίσταση στην ροή μέσα στο φλοιώμα. Πως όμως εξηγείται το γεγονός ότι το νερό μετακινείται στον ηθμοσωλήνα από μια περιοχή χαμηλού δυναμικού Ψ (στην πηγή) προς μια περιοχή υψηλού δυναμικού Ψ ; Αυτή η φορά μετακίνησης του νερού δεν αντιβαίνει τις αρχές της θερμοδυναμικής, διότι η μετακίνηση του νερού στους ηθμοσωλήνες είναι μαζική και όχι ωσμωτική, εφόσον κατά την διαδρομή του το νερό δεν διαπερνά κυτταρικές μεμβράνες. Σύμφωνα μ' αυτό το μοντέλο μετακίνησης στο φλοιώμα, η ροή του ηθμώδους χυμού είναι παθητική και οφείλεται στην διαφορά πίεσης. Ωστόσο, για ν' αναπτυχθεί αυτή η διαφορά πίεσης απαιτείται ενέργεια, αφού τόσο για την φόρτωση των φωτοσυνθετικών προϊόντων στο φλοιώμα όσο και για την εκφόρτωση τους δαπανάται

ενέργεια.

Για ν' αποδειχθεί αυτό το μοντέλο, εμπειρισταωμένες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί, σε πολλές από τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν σύγχρονες βιοχημικές και μοριακές τεχνικές, καθώς και σύγχρονες τεχνικές μικροσκοπίας, έδειξαν ότι η μετακίνηση στο φλοίωμα μπορεί να ερμηνευτεί με το μοντέλο ροής - πίεσης. Οι Knoblauch και Aart van Bel, χρησιμοποιώντας συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης ακτίνων laser, εντόπισαν ζωντανό φλοίωμα σε φυτά *Vicia faba*. Με τη μέθοδο αυτή αποφεύγονται τα προβλήματα που δημιουργούνται, όταν χρησιμοποιούνται άλλες τεχνικές μικροσκοπίας στις οποίες απαιτείται νέκρωση του ιστού. Χρησιμοποιώντας φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες χρωματίζουν τις μεμβράνες και τις πρωτεΐνες που μετακινούνται στο φλοίωμα, οι επιστήμονες αυτοί επιβεβαίωσαν ότι οι ηθμώδεις πόροι είναι ανοικτοί, δεδομένου ότι σ' αυτούς δεν εντοπίστηκε ούτε μεμβράνη ούτε Ρ-πρωτεΐνη. Σε κάθε ηθμοσωλήνα, ο ηθμώδης χυμός ρέει μόνο προς μία κατεύθυνση. Παρόλ' αυτά, είναι δυνατόν η ροή σε ηθμοσωλήνες διαφορετικών ηθμαγγειωδών δεσμίδων να είναι αντίθετη. Επίσης, στην περίπτωση που ένα φύλλο μετατρέπεται από αποδέκτης σε πηγή, είναι δυνατόν σε γειτονικούς ηθμοσωλήνες (της ίδιας ηθμαγγειώδους δεσμίδας) η ροή να είναι αντίθετη. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, σύμφωνα με το πρότυπο του Münch, για τη ροή του ηθμώδους χυμού στο φλοίωμα δεν απαιτείται δαπάνη ενέργειας. Πράγματι, πειράματα που έγιναν με διαφορετικά φυτικά υλικά έδειξαν ότι σε συνθήκες ψύχους, στις οποίες η παραγωγή ATP είναι πολύ χαμηλή, η ταχύτητα ροής στο φλοίωμα αρχικά μειώνεται, αλλά μετά από κάποιο χρονικό διάστημα αποκαθίσταται.

A.3.5.2 Πλευρική μεταφορά

Σύμφωνα με το πρότυπο του Münch, τα ηθμώδη άρθρα θεωρήθηκαν ως αγωγοί, με συστατικά που ρέουν προς μία κατεύθυνση, χωρίς να υπάρχει πλευρική διαφυγή. Σήμερα, όμως, είναι γνωστό ότι η τροφοδοσία των αποδεκτών που βρίσκονται γύρω από τα ηθμώδη άρθρα γίνεται με πλευρική μεταφορά, η οποία προϋποθέτει απελευθέρωση των συστατικών του χυμού από τα ηθμώδη άρθρα και απορρόφηση τους από τα γειτονικά προς το σύμπλεγμα κύτταρα ΗΣ/ΣΚ. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των αποδεκτών που βρίσκονται γύρω από τα ηθμώδη άρθρα και

αυτών που βρίσκονται στην απόληξη του ηθμοσωλήνα. Η πλευρική διοχέτευση συστατικών του ηθμώδους χυμού καθορίζεται πιθανώς από την ύπαρξη κατάλληλων μεταφορέων και πλασμοδεσμών στα γειτονικά προς το σύμπλεγμα ΣΚ/ΗΣ. Υπερμικροσκοπικές μελέτες της ρίζας της *Arabidopsis thaliana* έδειξαν ότι υπάρχει επικοινωνία, μέσω πλασμοδεσμών μεταξύ του συμπλέγματος ΣΚ/ΗΣ και των κυττάρων του φλοιού. Επίσης, μεταβολικοί αναστολείς σε ρίζες του ίδιου φυτού οι οποίες είχαν τροφοδοτηθεί με την χρωστική καρβοξυφλουορεσίνη (carboxyfluorescein, χρωστική που είναι ευκίνητη στο φλοιώμα) προκάλεσαν τη διαρροή της χρωστικής εκτός του συμπλέγματος ΣΚ/ΗΣ προς τα γειτονικά κύτταρα του φλοιού, υποδηλώνοντας ότι σε φυσιολογικές συνθήκες οι πλασμοδέσμες διατηρούνται κλειστές με μια ενεργειακά εξαρτώμενη διαδικασία.

A.3.5.3 Παράγοντες που κατευθύνουν τα φωτοσυνθετικά προϊόντα προς ένα συγκεκριμένο αποδέκτη

Η κατανομή των φωτοσυνθετικών προϊόντων μεταξύ των διαφόρων αποδεκτών παίζει σημαντικό ρόλο στην ομαλή αύξηση και ανάπτυξη των φυτών και καθορίζεται, εκτός από την απόσταση και τον βαθμό επικοινωνίας πηγής και αποδέκτη μέσω του αγωγού συστήματος, και από άλλους παράγοντες.

Πολλά πειράματα έχουν δείξει ότι υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των αποδεκτών για τα φωτοσυνθετικά προϊόντα που παράγονται από μια πηγή. Ο ανταγωνισμός μπορεί να εκδηλώνεται μεταξύ βλαστού και ρίζας ή αναπαραγωγικών και αυξανόμενων νεαρών βλαστητικών οργάνων. Στα φασόλια και στα παντζάρια, σε συνθήκες μειωμένης παροχής φωτοσυνθετικών προϊόντων, το μεγαλύτερο ποσοστό των προϊόντων αυτών κατανέμεται στ' αυξανόμενα φύλλα και το μικρότερο ποσοστό τους στη ρίζα. Αντιθέτως, σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης, το μεγαλύτερο ποσοστό των φωτοσυνθετικών προϊόντων κατανέμεται στη ρίζα.

Ένας από τους παράγοντες που καθορίζουν την κατανομή των φωτοσυνθετικών προϊόντων στους διάφορους αποδέκτες είναι η ισχύς του αποδέκτη. Η ισχύς ενός αποδέκτη εξαρτάται από το βάρος του και από την μεταβολική δραστηριότητα του. Μεταβολισμός των φωτοσυνθετικών προϊόντων στον αποδέκτη οδηγεί σε μεγάλη

διαφορά της συγκέντρωσης τους μέσα και έξω απ' αυτόν, προκαλώντας έντονη διαφορά στην πίεση σπαργής στα δύο άκρα του ηθμοσωλήνα.

Η μεταβολική δραστηριότητα σ' ένα αποδέκτη προσδιορίζεται από τα ένζυμα που υδρολύουν την σακχαρόζη. Η παρουσία της ιμπερτάσης ή της συνθάσης της σακχαρόζης (το ένζυμο αυτό, παρουσία UDP (διφωσφορική ουριδίνη), υδρολύει τη σακχαρόζη σε UDP (ουριδινό διφωσφορική)-γλυκόζη και UDP-φρουκτόζη στα κύτταρα του αποδέκτη αυξάνει τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης μεταξύ του κυττάρου του αποδέκτη και του αποπλάστη ή του ηθμοσωλήνα του αποδέκτη (εφόσον η εκφόρτωση του φλοιώματος είναι αποπλαστική ή συμπλασματική αντίστοιχα). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τα υδρολυτικά ένζυμα της σακχαρόζης ρυθμίζονται από την παρουσία σακχάρων. Έλλειψη σακχάρων αυξάνει την έκφραση των γονιδίων της φωτοσύνθεσης, της κινητοποίησης των αποταμιευτικών προϊόντων και των διαδικασιών εκφόρτωσης, ενώ περίσσεια σακχάρων ευνοεί την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετικές με την αποταμίευση και την χρήση τους.

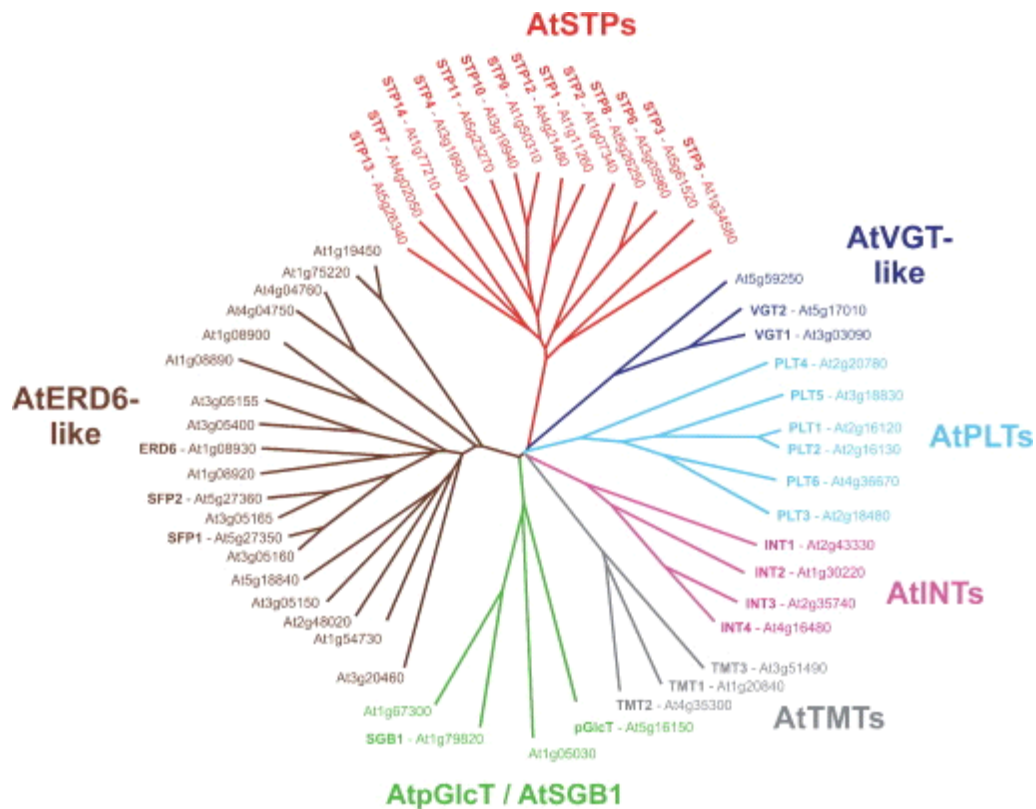
Σ' αυτό το σημείο θα πρέπει ν' αναφερθεί πως η πηγή πληροφορείται ποια είναι η ισχύς ενός αποδέκτη. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, η αύξηση και η ανάπτυξη των διαφόρων οργάνων συντονίζεται με την βοήθεια μηνυμάτων, όπως οι ορμόνες, η πίεση σπαργής, το pH και άλλα. Η μείωση της πίεσης σπαργής αυξάνει την ενεργότητα της αντλίας H⁺-ATPάσης, μ' αποτέλεσμα την αύξηση της πρόσληψης της σακχαρόζης. Αυτό δείχνει ότι η πίεση σπαργής αποτελεί ένα απομακρυσμένο μήνυμα, που προκαλεί την μεταφορά των φωτοσυνθετικών προϊόντων σ' ένα συγκεκριμένο αποδέκτη. Επίσης, οι ορμόνες επηρεάζουν έμμεσα την κατανομή των φωτοσυνθετικών προϊόντων, ρυθμίζοντας αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως την αύξηση ή την γήρανση ενός αποδέκτη ή την δραστηριότητα των μεμβρανικών μεταφορέων. Τέλος, και η σακχαρόζη παίζει τον ρόλο του μηνύματος, η επάρκεια ή η ανεπάρκεια της οποίας μπορεί να προκαλέσει την έκφραση γονιδίων των οποίων τα προϊόντα είναι δυνατόν να μεταβάλλουν την δραστηριότητα μιας πηγής ή ενός αποδέκτη.

A.4 Η Οικογένεια Γονιδίων Φορέων Μονοσακχαριτών στην Αραβίδουξη.

Η μεταφορά σακχάρων διαμέσου των ορίων μεμβράνης διευκολύνεται με πρωτεΐνες μεταφορείς, οι οποίες καταλύουν είτε την παθητική (αλλά όχι την επιλεκτική) διάχυση είτε την ενεργό-εξαρτημένη μεταφορά επιτρέποντας έτσι την συσσώρευση υποστρωμάτων σακχάρων. Παρά τη μακροχρόνια γνώση της κατανομής σακχάρων και της υποκυτταρικής διαμερισματοποίησης σακχάρων, η μοριακή κλωνοποίηση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των αντιστοιχών πρωτεϊνών μεταφορέων από τα ανώτερα φυτά δεν επιτεύχθηκε για δεκαετίες. Γι' αρκετό χρονικό διάστημα, θεωρείτο ότι κάθε φυτό έχει ένα μόνο φορέα για μονοσακχαρίτες και ένα φορέα για τη σακχαρόζη.

Μόνο μετά την ολοκλήρωση της φυλλογενετικής ανάλυσης του γονιδιώματος της αραβίδουξης αποκαλύφθηκε η ύπαρξη μιας οικογένειας γονιδίων φορέων μονοσακχαριτών με 53 μέλη, τα οποία περιλαμβάνουν καλούς υποψήφιους για ενδοκυτταρικούς φορείς των αλκοολών σακχάρων. Αυτά τα γονίδια έχουν σημαντική ομολογία με γνωστούς φορείς μονοσακχαριτών. Όπως απεικονίζεται στο φυλλογενετικό δέντρο της Εικόνας (A.10) αυτά τα γονίδια μπορούν να ομαδοποιηθούν σ' επτά υποοικογένειες, οι οποίες σαφώς έχουν μία κοινή καταγωγή. Όλοι αυτοί οι φορείς μοιράζονται μεγάλες ομοιότητες στην τοπολογία τους στην μεμβράνη με δώδεκα προβλεπόμενα διαμεμβρανικά τμήματα. Μέσα στις υποοικογένειες, οι ομολογίες είναι υψηλές που κυμαίνονται από το 42 % μέχρι το 96 % ομοιότητας.

Όταν οι υποοικογένειες συγκρίνονται η μία με την άλλη ο βαθμός της ομολογίας μειώνεται σημαντικά στηρίζοντας την ομαδοποίηση αυτών των γονιδίων σ' επτά διακριτές οικογένειες. Αν και σε κάποιες περιπτώσεις η γενική ομολογία στους ήδη χαρακτηριζόμενους φορείς σακχάρων είναι σχετικά χαμηλή, όλες αυτές οι πρωτεΐνες δείχνουν διατηρημένες μικρές αλληλουχίες αμινοξέων, οι οποίες υποστηρίζουν ισχυρά μια λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών ως φορείς σακχάρων.



Εικόνα A.10: Φυλλογενετικό δέντρο της οικογένειας γονιδίων των μεταφορέων μονοσακχαριτών στην Αραβίδοψη. Οι αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών των μεταφορέων μονοσακχαριτών αναλύθηκαν με την χρήση του προγράμματος Clustal X algorithm και το φυλλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα TreeView 1.6 software. Ονόματα υπο-οικογενειών, κωδικοί πρωτεϊνών από το Κέντρο Πληροφορίας του Μονάχου για αλληλουχίες πρωτεϊνών (Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS)) και ονόματα γονιδίων (όπου υπάρχουν) αναγράφονται.

A.4.1 Γονίδια Πρωτεϊνών Μεταφορέων Σακχάρων (Sugar Transport Protein, AtSTP)

Μέχρι σήμερα, τα γονίδια αντιπροσωπεύουν την καλύτερα χαρακτηρισμένη οικογένεια των φορέων εξόζης στην αραβίδοψη. Όλα τα γνωστά γονίδια της υποοικογένειας είναι πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης και καταλύουν την πρόσληψη των εξοζών του γονιδίου *AtSTP1* ήταν ο πρώτος που προσδιορίστηκε σ' ένα ανώτερο φυτό (Sauer et al., 1990). Έκφραση στον μύκητα *Schizosaccharomyces pombe* και στον *Xenopus oocytes* αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη *AtSTP1* είναι ένας συμμεταφορέας

μονοσακχαρίτη/πρωτονίου μεγάλου βαθμού έλξης, ικανός να μεταφέρει ένα αριθμό εξοζών εκτός από φρουκτόζη (Boorer et al., 1994). Ο φορέας πρωτεΐνης AtSTP1 εντοπίζεται περισσότερο σε βλαστώντα σπέρματα και σε ρίζες σποροφύτων (Sherson et al., 2000) όπου υπολογίζεται ως το 60% της ποσότητας μεταφοράς μονοσακχαριτών όπως με μελέτες πρόσληψης με μια μεταλλαγμένη σειρά του γονιδίου *Atstp1*.

A.4.2 Γονίδια Μεταφοράς Γλυκόζης του Χυμοτοπίου (Vacuolar Glucose Transporter-like genes, AtVGT)

Όπως φαίνεται στην εικόνα (A.10), η υποοικογένεια η οποία είναι κοντά στα γονίδια, τα οποία σε πολλές βάσεις δεδομένων ως υποθετικοί φορείς σακχάρων. Πρόσφατα, δύο γονίδια απ' αυτή την οικογένεια το γονίδιο πρωτεΐνης AtVGT1 και το γονίδιο *AtVGT2* έχουν εντοπιστεί στην μεμβράνη χυμοτοπίου (Aluri και Büttner, 2007). Για το γονίδιο *AtVGT1*, η ενεργή μεταφορά της γλυκόζης, αλλά όχι της ξυλόζης, επιδείχθηκε με λειτουργική έκφραση στις ζύμες και με μελέτες πρόσληψης σ' απομονωμένα χυμοτόπια από τις ζύμες. Το γονίδιο πρωτεΐνης AtVGT1 εκφράζεται αρκετά στην γύρη, στα φύλλα και στα στελέχη και δεν είναι ανιχνεύσιμο στις ρίζες. Η ανάλυση των μεταλλαγμένων σειρών υποδεικνύει μία σημαντική λειτουργία αυτού του φορέα (του χυμοτοπίου) γλυκόζης κατά τις διαδικασίες ανάπτυξης όπως βλάστηση σπόρου και άνθιση (Aluri και Büttner, 2007).

A.4.3 Γονίδια Φορέων Μονοσακχαριτών στον Τονοπλάστη, AtTMT (Tonoplast Monosaccharide Transporter genes)

Η υποοικογένεια AtTMT αποτελείται από τρία ομόλογα γονίδια φορέων του τονοπλάστη μ' εκτεταμένο ενδιάμεσο τμήμα πολυπεπτιδικής αλυσίδας μεταξύ των υποθετικών διαμεμβρανικών ελικών έξι και επτά. Μία τέτοια εκτεταμένη δομική μονάδα είναι επίσης παρούσα στον φορέα σακχαρόζης AtSUT2/AtSUC3, η οποία επομένως θεωρήθηκε ως πιθανός αισθητήρας σακχάρων (Barker και συν., 2000) εξαιτίας της κατασκευαστικής ομοιότητας με του αισθητήρες γλυκόζης (στους ζυμομύκητες) SNF3 και RGT2. Μελέτες του πρωτεόματος στους τονοπλάστες κριθαριού και αραβίδουνης

έδειξαν την παρουσία των φορέων υποοικογένειας *ATTMT1* στην μεμβράνη χυμοτοπίου (Carter και συν. 2004, Endler και συν. 2006). Η έκφραση των γονιδίων *AtTMT1* και *AtTMT2* προκαλείται από συνθήκες στρες όπως ξηρασίας, αλατότητας και ψύχους και από σάκχαρα υποδεικνύοντας ότι τα γονίδια *AtTMT1* και *AtTMT2* παίζουν ένα ρόλο στην μεταφορά εξοζών στα χυμοτόπια, κυρίως υπό συνθήκες στρες.

A.4.4 Γονίδια Φορέων Γλυκόζης του Πλαστιδίου, *AtpGlcT* (Plastidic Glucose Transporter genes)

Σ' αυτή την υποοικογένεια υπάρχουν τρία ομόλογα γονίδια από την αραβίδοψη (με ποσοστό ομοιότητας αμινοξέων 43-71%), τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες/φορείς γλυκόζης στα πλαστίδια. Ο πρώτος υποθετικός φορέας γλυκόζης pGlcT της εσωτερικής μεμβράνης του φακέλου του χλωροπλάστη προσδιορίστηκε στο σπανάκι (Weber και συν., 2000), και απ' αυτόν τον φορέα, η υποοικογένεια πήρε την ονομασία της.

Μια λειτουργία του φορέα pGlcT στην εξαγωγή της γλυκόζης η οποία προέρχεται από την αμυλολυτική διάσπαση του μεταβατικού αμύλου προτάθηκε. Παρόλ' αυτά, μια άμεση απόδειξη της λειτουργίας, μεταφοράς καθώς επίσης και μια ανάλυση μετάλλαξης για να υποστηρίξει αυτή τη λειτουργία δεν υπάρχει μέχρι σήμερα.

A.4.5 Γονίδια φορέων πολυαλκοολών, *AtPLT* (Polyol Transporter genes)

Οι αλκοόλες σακχάρων είναι ωσμωτικά ενεργά διαλύματα οι οποίες συσσωρεύονται σ' ένα αριθμό φυτών σ' αντίδραση στο στρες του κρύου του νερού ή της αλατότητας (Noiraud και συν., 2001). Ο πρώτος φορέας μανιτόλης στα φυτά *AgMaT1* απομονώθηκε από το σέλινο με συμπλήρωση μιας μετάλλαξης της ζύμης (Noiraud και συν., 2001). Επίσης, στην αραβίδοψη, οι πολυαλκοόλες φαίνεται ότι παίζουν ένα ρόλο και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες μεταφοράς έχουν προσδιοριστεί και έχουν χαρακτηριστεί μερικώς (Reinders και συν., 2005) αλλά μέχρι τώρα οι φυσιολογικές λειτουργίες αυτών των φορέων δεν είναι σαφείς.

Μέσα στην οικογένεια των μονοσακχαριτών, έξι γονίδια έχουν σημαντική ομολογία με προηγουμένως προσδιορισμένους φορείς πολυολών. Η ανάλυση του *AtPLT5*, το πρώτο

μέλος αυτής της υποομάδας, απεκάλυψε ότι αυτός ο φορέας εναπόκειται στην πλασματική μεμβράνη και είναι ένας H^+ -συμμεταφορέας για γραμμικές πολυόλες, όπως σορβιτόλη, ξυλιτόλη, ερυθριτόλη ή γλυκερόλη καθώς επίσης η κυκλική πολυολ μυο-ινοσιτόλη και διαφορετικές εξόζες και πεντόζες συμπεριλαμβάνοντας την ριβόζη, τετρόζες και ένα οξύ μονοσακχαρίτη (Klepek και συν., 2005).

Το γονίδιο *AtPLT5* εκφράζεται κυρίως στη ζώνη επιμήκυνσης της ρίζας, στον αγγειακό ιστό των φύλλων και σε κάποια ανθικά όργανα. Οι πολυαλκοόλες βρίσκονται επίσης στα χυμοτόπια.

A.4.6 Γονίδια φορέων ινοσιτόλης, *AtINT* (inositol transporters genes)

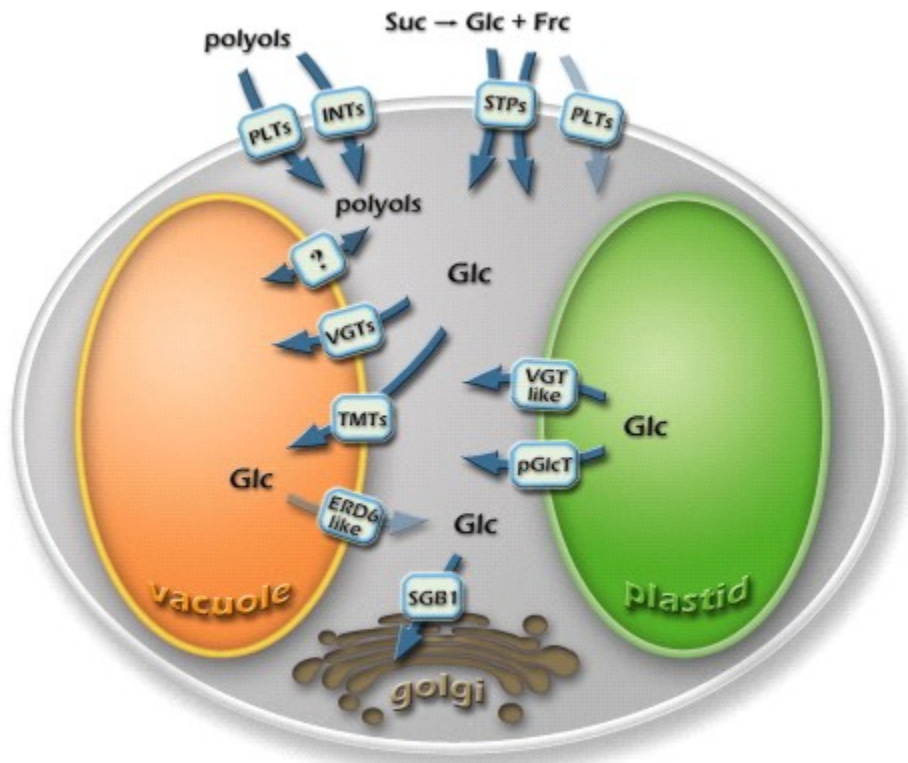
Η ινοσιτόλη είναι ένα κυτταρικό συστατικό που εντοπίζεται σε μια ποικιλία οργανισμών συμπεριλαμβανομένου και των φυτών. Κυρίως φωσφορυλιώνεται και λειτουργεί και λειτουργεί ως δομικό συστατικό μεμβρανών και ως μορφή αποθήκευσης του φωσφόρου στους σπόρους. Τα τέσσερα μέλη της οικογένειας μονοσακχαριτών της αραβίδωσης δείχνουν δυνατή ομολογία, με τους φορείς μυο-ινοσιτόλης από τις ζύμες και τους ανθρώπους και τους φορείς μυο-ινοσιτόλης MITR1 και MITR2 από το κοινό παγόφυτο *Messembryanthemum crystallinum* (Chauhan και συν., 2000). Σ' αντίθεση με τους MITR1 και τους MITR2, οι οποίοι θεωρούνται ότι καταλύουν τη συμμεταφορά Na^+ /μυο-ινοσιτόλης και εντοπίστηκαν στον τονοπλάστη, ο φορέας του γονιδίου *AtINT4* είναι ένας αρκετά ειδικευμένος συμμεταφορέας πρωτονίων/μυο-ινοσιτόλης και εντοπίστηκε στην πλασματική μεμβράνη (Schneider και συν., 2006). Το γονίδιο *AtINT4* εκφράζεται αρκετά στη γύρη και στα συνοδά κύτταρα του φλοιώματος, όπου θα μπορούσε να λειτουργήσει στη φόρτιση του φλοιώματος με μυο-ινοσιτόλη, πιθανόν να επιτρέψει τη σύνθεση ραφφινόζης.

A.4.7 Γονίδια Αρχικής Αντίδρασης στην Αφυδάτωση, *AtERD6*

Τα 19 γονίδια της υποομάδας *AtERD6* αντιπροσωπεύουν την λιγότερο ερευνηθείσα υποομάδα στην οικογένεια των φορέων μονοσακχαριτών, τα οποία μοιράζονται ομοιότητα σε ποσοστό 48-95% το ένα με το άλλο. Τα ομόλογα γονίδια *ERD6*

ονομάστηκαν μετά από το γονίδιο *ERD6* (early-responsive to dehydration, δηλαδή, αρχική αντίδραση στην αφύγρανση), το οποίο κωδικοποιεί για ένα υποθετικό φορέα σακχάρων (Kiyosue και συν., 1998). Το γονίδιο *ERD* εκφράζεται σε συνθήκες αφύγρανσης και κρύου, αλλά οι μελέτες στις ζύμες δεν ήταν επιτυχείς στην απόδειξη της δραστηριότητας μεταφοράς σακχάρων. Επιπλέον, αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει δυο ομόλογα γονίδια, πολύ σχετιζόμενα, φορέων μονοσακχαριτών τα *SFP1* και *SFP2* (sugar-porter family protein, δηλαδή, οικογένεια μεταφορέων πρωτεϊνών σακχάρων), τα οποία βρίσκονται ως διαδοχικά γονίδια στο χρωμόσωμα 5 (Quiirino και συν., 2001). Και τα δυο γονίδια ρυθμίζονται διαφορετικά και το *SFP1* δείχθηκε ότι εκφράζεται κατά την γήρανση του φυτικού ιστού η οποία παράλληλα συνοδεύεται από μία συσσώρευση των μονοσακχαριτών σε τέτοιους ιστούς. Παρόλ' αυτά, και για τα δυο γονίδια, ο λειτουργικός χαρακτηρισμός δεν είναι γνωστός μέχρι τώρα.

Κάποια γονίδια *AtERD6* δείχνουν υψηλή ομολογία μ' ένα υποθετικό φορέα σακχάρων από τα ζαχαρότευτλα *Beta vulgaris*, το οποίο δείχθηκε να εντοπίζεται στην μεμβράνη χυμοτοπίου, αλλά επίσης γι' αυτό το ομόλογο του τεύτλου η λειτουργία της μεταφοράς δεν μπορούσε να επιδειχθεί (Chiou και Bush, 1996).



Εικόνα A.11: Σχηματική απεικόνιση της υποκυτταρικής κατανομής των μονοσακχαριτών και ο εντοπισμός καθορισμένος για μεταφορείς μονοσακχαριτών. Η κατεύθυνση μεταφοράς για γλυκόζη, φρουκτόζη και πολυόλες προς το κύτταρο και μέσα στο κύτταρο ενδείκνυται με βέλη και τ' αντίστοιχα ονόματα μεταφορέων δίνονται σε κουτιά [STP: Sugar Transport Protein (Πρωτεΐνη Μεταφορέα Σακχάρων), VGT: Vacuolar Glucose Transporter (Μεταφορέας Γλυκόζης του Χυμοτοπίου), TMT: Tonoplast Monosaccharide Transporter (Μεταφορέας Μονοσακχαριτών του Τονοπλάστη), pGlcT: Plastidic Glucose Transporter (Μεταφορέας Γλυκόζης του Πλαστιδίου), SGB1: Suppressor of G protein Beta1 (Παρεμποδιστής της Πρωτεΐνης G Beta1), PLT: Polyol Transporter (Μεταφορέας Πολυολών), INT: Inositol Transporter (Μεταφορέας Ινοσιτόλης), ERD6-like: Early-Responsive to Dehydration (Πρωτεΐνη παρόμοια μ' αυτήν της Αρχικής-Αντίδρασης στην Αφυδάτωση)].

A.5 Συμπεράσματα

Η διαθεσιμότητα ολοκλήρων των γονιδιωμάτων των φυτών έχει επηρεάσει σημαντικά τον προσδιορισμό και την ανάλυση των φυλογενετικά σχετιζόμενων ομάδων των γονιδίων. Στην αραβίδοψη, αυτό έχει οδηγήσει σε μια μεγάλη πρόοδο στην κατανόηση των κοινών λειτουργικών χαρακτηριστικών αλλά επίσης και σε διαφωνία μέσα σε οικογένειες γονιδίων, όπως η οικογένεια γονιδίων των φορέων μονοσακχαριτών.

Όντως, τα γονίδια φορέων των μονοσακχαριτών σχηματίζουν ξεχωριστές υποοικογένειες μοιράζονται κάποια χαρακτηριστικά, παρόλ' αυτά, τα διαθέσιμα, προς

τον παρόν, δεδομένα δείχνουν ότι ο βαθμός ομολογίας δεν αντικατοπτρίζει, απαραίτητα, υποκυτταρικό εντοπισμό ή ειδίκευση υποστρώματος. Μέχρι τώρα, υποστρώματα σακχάρων γνωστά ότι μεταφέρονται από φορείς μονοσακχαριτών περιλαμβάνουν κυρίως εξόζες, αλλά επίσης, πολυαλκοόλες και σε μία περίπτωση (*AtPLT5*), επίσης, πεντόζες και τετρόζες.

A.6 Σκοπός της εργασίας

Η κατανόηση της γενετικής ρύθμισης στην κατανομή του δεσμευμένου άνθρακα μόλις έχει ξεκινήσει. Εκτός από τα γονίδια, τα οποία έχουν περιγραφεί παραπάνω, πολλοί άλλοι γενετικοί τόποι στο καλαμπόκι έχουν εντοπιστεί που ρυθμίζουν τη συσσώρευση υδρογονανθράκων. Ο χαρακτηρισμός του βιοχημικού και φυσιολογικού ρόλου αυτών των γονιδίων και όλων των μελών της οικογένειας γονιδίων μεταφορέων σακχάρων θ' ανοίξει νέους ορίζοντες έρευνας στον έλεγχο της κατανομής δεσμευμένου άνθρακα στα φυτά. Επιπλέον, θα διαθέσει εκπληκτικές δυνατότητες για βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις με σκοπό την αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών και την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Ο σκοπός αυτής της Διπλωματικής Εργασίας ήταν ο υποκυτταρικός εντοπισμός μελών της οικογένειας των μεταφορέων σακχάρων (είτε στην μεμβράνη του κυττάρου, είτε στα διάφορα οργανίδια του κυττάρου) με τη χρήση φθορίζουσών πρωτεϊνών (Yellow Fluorescent Protein, YFP) υβριδίων με την YFP.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 Μετασχηματισμός του *E. coli*

Με παραλλαγή της μεθόδου, (που περιγράφεται από τους Cohen και συν., 1972), δημιουργήθηκαν κύτταρα ικανά γι' ανασχηματισμό. Η προετοιμασία δεκτικών κυττάρων έγινε σε στελέχη *XL Blue1* των βακτηριακών κυττάρων *E. coli*. Για τα κύτταρα *XL Blue1* παράγοντας πίεσης επιλογής είναι τα αντιβιοτικά τετρακυκλίνη και καναμυκίνη.

Σε 10 ml θρεπτικού διαλύματος LB, προστίθεται το κατάλληλο αντιβιοτικό και εμβολιάζεται μ' αποικία *E. coli*. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 18 ώρες, με συνεχή ανακίνηση.

Από την παραπάνω καλλιέργεια, χρησιμοποιούνται 2 ml για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση έως ότου η Οπτική Πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι $O.D._{600}=0,2-0,3$.

- Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε με 50 ml παγωμένου διαλύματος 0,1M $MgCl_2$.
- Η επαναδιάλυση έγινε με ανακίνηση μέσα σε πάγο ώστε να διατηρούνται τα κύτταρα σε χαμηλές θερμοκρασίες.
- Το διάλυμα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 25 ml παγωμένου διαλύματος 0,1M $CaCl_2$ και αφέθηκε στον πάγο για 20 λεπτά.
- Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4 °C και επαναδιαλύθηκαν σε 10 ml παγωμένου διαλύματος 0,1M $CaCl_2$.

- Προστέθηκε γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v).
- Τέλος, ακολούθησε κλασματοποίηση των 100 ml σε σωλήνες erpendorf και διατηρούνται στους -80 °C.

B.2 Μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμιδιακό DNA

Για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων ακολουθείται η εξής διαδικασία: Σε σωλήνα erpendorf μεταφέρονται 100 ml δεκτικών κυττάρων *E. coli* και προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακό DNA. Ο όγκος μεταφοράς πλασμιδιακού DNA δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των δεκτικών κυττάρων.

Τα δεκτικά κύτταρα με το πλασμιδιακό DNA αναμιγνύονται με ήπιο τρόπο και το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42 °C για 1-2 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθενται 200 μl θρεπτικού διαλύματος LB και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για μία ώρα.

Στην συνέχεια, τα κύτταρα απλώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

B.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

B.3.1 Miniprep Kit

Οι απομονώσεις πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκαν με το εγχειρίδιο QIAprep Spin Miniprep της εταιρίας QIAGEN.

Μονή αποικία του βακτηριακού στελέχους του *E. coli* αναπτύσσεται, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού, σε 5 ml θρεπτικού υποστρώματος LB στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση για 14-16 ώρες.

- Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 1,5 ml σε σωλήνα erpendorf και

φυγοκεντρούνται στις 6.000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Το υπερκείμενο απορρίπτεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Buffer) P1 που περιέχει RNase A.
- Με την προσθήκη 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος P2, το δείγμα αναδεύεται απαλά και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα μέχρι 5 λεπτά. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται λύση των κυττάρων.
- Προστίθενται 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος N3, ακολουθεί ανάμιξη και φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Επαναλαμβάνουμε την φυγοκέντρηση αν το υπερκείμενο διάλυμα δεν είναι καθαρό, δηλαδή, διαυγές.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται στην στήλη QIAprep.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ο όγκος που διαπέρασε την στήλη απομακρύνεται ενώ το πλασμιδιακό DNA έχει προσδεθεί στην στήλη.
- Προστίθενται 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος PE και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διήθημα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για την βέλτιστη απομάκρυνση του διαλύματος PE, καθώς στο διάλυμα περιέχεται αιθανόλη και μπορεί να επηρεάσει (παρεμποδίσει) περαιτέρω τις ενζυμικές αντιδράσεις.
- Ο σωλήνας της στήλης QIAprep αποτελείται από δυο τμήματα. Το πάνω μέρος του σωλήνα, στο οποίο βρίσκεται η στήλη στην οποία έχει προσδεθεί το DNA, τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf όγκου 1,5 ml.
- Για την έκλυση του DNA από την στήλη στον σωλήνα erpendorf προστίθεται διπλό αποσταγμένο νερό (ddH₂O) ή διάλυμα ρυθμιστικό EB (30 μl).
- Μετά από 1 λεπτό επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου.

- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C.

B.3.2 Μέθοδος Βρασμού

Σύμφωνα με τους Holmes και Quingley (1981), η μέθοδος αποτελείται από τα παρακάτω βήματα:

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό, εμβολιάζονται με μια μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E. coli*, τα οποία έχουν μετασχηματιστεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση για περίπου 16 ώρες.
- 1,5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 6.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 µl STET, προσθέτοντας 1 µl λυσοζύμη (50mg*ml⁻¹).
- Γίνεται επώαση του δείγματος στους 100 °C για 45 δευτερόλεπτα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το ίζημα απομακρύνεται με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 180 µl ισοπροπανόλης.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για την συλλογή του πλασμιδιακού DNA.
- Ακολουθεί ξέπλυμα με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση σε 20 µl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

B.4 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων

B.4.1 Πέψη δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

Οι πέψεις των δειγμάτων DNA μ' ενδονουκλεάσες περιορισμού γίνονται σε τελικό όγκο που κυμαίνεται από 20 μl μέχρι και 100 μl, ανάλογα με την ποσότητα και καθαρότητα του DNA που υποβάλλεται σε πέψη, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η πραγματοποίηση των αντιδράσεων.

- Σε σωλήνα erpendorf τοποθετείται το δείγμα DNA, η ενδονουκλεάση περιορισμού, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για την δράση του ενζύμου, ddH₂O μέχρι τον επιθυμητό τελικό όγκο. Συνήθως, χρησιμοποιείται μια μονάδα ενζύμου (1 unit) για κάθε μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Για παράδειγμα, μια τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 30 μl περιλαμβάνει:

| | |
|---|-----------|
| Διάλυμα DNA 1μg σε νερό ή TE | Έως 10 μl |
| 10 x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου | 3 μl |
| Ένζυμο περιορισμού (1 unit*μl ⁻¹) | 1 μl |
| RNAse (1μg*ml ⁻¹) | 0,5 μl |
| ddH ₂ O ως τελικό όγκο | 30 μl |

- Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 3-4 ώρες σε κατάλληλη θερμοκρασία. Εμείς «κόψαμε» τον πλασμιδιακό φορέα pAVA 554 με το ένζυμο NcoI και τα ένθετα τμήματα του DNA (insert) με το ένζυμο PscI (με συμβατά άκρα, compatible ends).
- Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

B.4.2 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA) σε πήκτη αγαρόζης.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται προκειμένου να διαχωριστούν και ν' αναλυθούν νουκλεϊκά οξέα διαφορετικού μεγέθους και διαμόρφωσης. Ο διαχωρισμός των γραμμικών μορίων DNA σε πηκτή αγαρόζης είναι ανάλογος με τον λογάριθμο του μεγέθους των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων ανιχνεύονται με την βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπερϊώδους ακτινοβολίας. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από την συγκέντρωση της πηκτής σ' αγαρόζη και κυμαίνεται από 0,1 έως 100 Kb. Στον Πίνακα (B.1) αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης, ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία για την προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων:

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε διάλυμα 1xTAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου διαλυθεί πλήρως και το μίγμα γίνει διαυγές.
- Στο παραπάνω διάλυμα αφού μειωθεί η θερμοκρασία στους 50 °C-60 °C, προστίθεται κατάλληλος όγκος βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 0,001% (v/v), ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.
- Στην συνέχεια, το διάλυμα τοποθετείται στην συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, με προσοχή διαλύονται οι φυσαλίδες που υπάρχουν μέσα σ' αυτό και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ εφαρμόζεται η κατάλληλη “χτένα” (πριν στερεοποιηθεί η πηκτή), ώστε να σχηματιστούν στην πηκτή τα βοηθία φόρτωσης, όπου θα τοποθετηθούν σ' επόμενο βήμα τα δείγματα.
- Στα δείγματα του DNA που πρόκειται ν' αναλυθούν, προστίθεται διάλυμα φόρτωσης όγκου ίσο με το 1/10 του όγκου του διαλύματος.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνεται η χτένα και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα

ηλεκτροφόρησης 1x TAE.

- Τα δείγματα τοποθετούνται στα βαθρία φόρτωσης και ηλεκτροφορούνται υπό συνεχή τάση μεταξύ 75 και 180 V (ή αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο έντασης 5 Vcm⁻¹), ανάλογα με το μέγεθος της πηκτής και την περιεκτικότητας της σ' αγαρόζη.

Πίνακας Β.1: Συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

| Αγαρόζη % | Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (Kb) |
|-----------|---|
| 0,3 | 1,0-70 |
| 0,5 | 0,7-45 |
| 0,8 | 0,4-20 |
| 1 | 0,3-10 |
| 1,2 | 0,2-8 |
| 1,5 | 0,2-6 |
| 2 | 0,1-5 |

B.4.3 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης

Η απομόνωση των τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης έγινε σύμφωνα με το εγχειρίδιο QIAquick® Gel Extraction της QIAGEN. Από την πηκτή αγαρόζης όπου έχει γίνει ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA, αφαιρείται εκείνο το τμήμα της πηκτής που φέρει το DNA του μεγέθους που μας ενδιαφέρει. Το αποκομμένο τμήμα τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf και ζυγίζεται.

- Για κάθε mg πηκτής προστέθηκε 3 μl διαλύματος ρυθμιστικού διαλύματος QG.
- Ακολούθησε επώαση του δείγματος στους 50 °C για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο. Εφαρμόστηκε ισχυρή ανακίνηση κάθε 2-3 λεπτά. Προτάθηκε ο χρόνος επώασης να παραταθεί έως ότου η πηκτή να διαλυθεί πλήρως.

- Προστέθηκε ποσότητα ισοπροπανόλης 1 μl για κάθε mg πηκτής.
- Το διάλυμα τοποθετήθηκε στην στήλη QIAquick Spin και η στήλη αυτή τοποθετήθηκε σε σωλήνα συλλογής erpendorf. Ακολούθησε φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου. Στην φάση αυτή, το DNA προσδέθηκε στην στήλη. Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη απορρίφθηκε από τον erpendorf και η στήλη τοποθετήθηκε πάλι πίσω στον σωλήνα erpendorf.
- Προστέθηκαν 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος QG. Έγινε φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη απορρίφθηκε από τον erpendorf και η στήλη τοποθετήθηκε πάλι πίσω στον σωλήνα erpendorf.
- Προστέθηκαν 750 μl διαλύματος PE. Έγινε φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη απορρίφθηκε και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση.
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετήθηκε σε σωλήνα erpendorf. Για την έκλουση του DNA προστέθηκε ddH₂O ή διάλυμα EB (30 μl).
- Μετά από 1 λεπτό ακολούθησε φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα διατηρήθηκε στους -20 °C.

B.4.4 Λιγοποίηση άκρων DNA

Η αντίδραση της DNA λιγάσης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl. Για την μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδιασμένων πλασμιδίων, η αναλογία μορίων (με άκρα) πλασμιδίου φορέα και ένθετου DNA ρυθμίζεται στο 1:3 αντίστοιχα. Σε σωλήνα erpendorf αναμιγνύονται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

| | |
|---|------|
| DNA πλασμιδιακός φορέας | 1 μl |
| Ένθετο DNA(ή DNAένθεσης) | 1 μl |
| 10 χρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης | 1 μl |
| Ένζυμο Λιγάση T4 (1 unit*μl ⁻¹) | 1 μl |
| ddH ₂ O | 6 μl |

Το δείγμα επώαστηκε στους 4 °C για 14-16 ώρες ή εναλλακτικά στους 25 °C για 3 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολούθησε θέρμανση του δείγματος στους 60 °C για 10 λεπτά με σκοπό την απενεργοποίηση της λιγάσης.

Το δείγμα επώαστηκε στους 4 °C για 24-25 ώρες ή εναλλακτικά στους 25 °C για 3 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολούθησε θέρμανση του δείγματος στους 65 °C για 10 λεπτά με σκοπό την απενεργοποίηση της λιγάσης.

B.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Γενικά, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR) αποτελεί μια μέθοδο ενίσχυσης εξειδικευμένων αλληλουχιών DNA, με την χρήση ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για την αντιγραφή της μήτρας του DNA με τη δράση κάποιας πολυμεράσης. Εκτός από την τυπική αντίδραση ενίσχυσης δίκλωνων τμημάτων DNA τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μια σειρά από παραλλαγές της βασικής διαδικασίας που περιγράφηκε παραπάνω. Η μέθοδος της PCR έχει βρει ευρεία εφαρμογή στην βιοτεχνολογία, στην πρωτεϊνική μηχανική και πιο συγκεκριμένα στην *in vitro* κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση.

B.5.1 Σχεδιασμός των εκκινητών

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών οι εξής παράμετροι λήφθηκαν υπόψη: Οι εκκινητές πρέπει να είναι συμπληρωματικοί στην κατάλληλη αλυσίδα του γονιδίου στόχου. Το μέγεθος τους πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο, στο συγκεκριμένο πείραμα 22-23 νουκλεοτίδια, για να υβριδίζουν εξειδικευμένα στις αλληλουχίες στόχους.

Για την κλωνοποίηση των δύο γονιδίων απαιτείται ο σχεδιασμός 4 εκκινητών, δηλαδή, ο sb4YFP-F, ο sb4YFP-R, ο sb6YFP-F και ο sb6YFP-R. Οι παραπάνω εκκινητές sb4YFP-F και sb6YFP-F σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε, να δημιουργείται θέση πέψης από την ενδονουκλεάση περιορισμού, που έχουμε επιλέξει, PscI. Χρησιμοποιήσαμε το ένζυμο PscI, για να κόψουμε τα ένθετα τμήματα DNA (των κλώνων *sb4YFP* και *sb6YFP*) με συμβατά άκρα. Κατόπιν αυτού του βήματος, χρησιμοποιήσαμε το ένζυμο NcoI για την πέψη του φορέα pAVA 554 και να εισάγουμε τα ένθετα τμήματα DNA. Το συγκεκριμένο ένζυμο κόβει την αλληλουχία των βάσεων στο σημείο της αλληλουχίας A CA TGT του γονιδίου προς κλωνοποίηση, και τόσο η αλληλουχία της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης όσο και η αλληλουχία του φορέα pAVA 554 είναι μέσα στο πλαίσιο ανάγνωσης (in frame) που γίνεται από τους εκκινητές. Επίσης, οι συγκεκριμένοι εκκινητές υβριδίζουν με την μήτρα DNA αλλά και μεταξύ τους.

B.5.1.1 Οι εκκινητές και η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκαν

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

sb4YFP-F: 5'-AAA AC ATG TCA GCG CAC GGG CCG-3',

sb4YFP-R: 5'-TTT A CAT GTA GAA GTG GGT CTT-3',

sb6YFP-F: 5'-AAA AC ATG TCA GCT TCC GCC GAC-3' και

sb6YFP-R: 5'-TTT A CAT GTA CAT GGC GGG CAT-3'.

Επιλέχθηκε η DyNAnzyme™ EXT DNA πολυμεράση (από την Finnzymes OY), ένα εξαιρετικά θερμοανθεκτικό ένζυμο, με κριτήριο κυρίως την εξαιρετικά χαμηλή συχνότητα σημειακών μεταλλαγών που φτάνει το 2×10^{-6} ανά νουκλεοτίδιο ανά κύκλο. Είναι ειδικά κατάλληλη για δύσκολα πλαίσια (templates) ανάγνωσης, για μεγάλες αντιδράσεις PCR και για κλωνοποίηση γονιδίων. Η υψηλή ακρίβεια οφείλεται στην ύπαρξη της 3' προς 5' εξωνουκλεοτιδικής δράσης. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της DyNAnzyme™ EXT DNA πολυμεράσης είναι πως αφήνει τυφλά άκρα στα προϊόντα της αντίδρασης.

Οι εκκινητές αγοράστηκαν από την εταιρία 'INVITROGEN' σε ποσότητες και κατά συνέπεια σε θερμοκρασίες στις οποίες υβριδίζουν, όπως αυτές αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας Β.2: Οι ποσότητες των εκκινητών και οι θερμοκρασίες υβριδισμού.

| εκκινητής | ποσότητα (nmol) | ποσοστό (%GC) | θερμοκρασία υβριδισμού |
|-----------|-----------------|---------------|------------------------|
| sb4YFP-F | 32,8 | 59 | 61,38 °C |
| sb4YFP-R | 40,7 | 39 | 54,15 °C |
| sb6YFP-F | 37,5 | 52 | 59,50 °C |
| sb6YFP-R | 31,3 | 45 | 55,64 °C |

B.5.1.2 Προετοιμασία των εκκινητών

Οι εκκινητές παραλήφθησαν σε μορφή σκόνης διαλύθηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 100% μέσα σ' ένα eppendorf.

Η τιμή της θερμοκρασίας (T_m) στην οποία υβριδίζουν οι εκκινητές προκύπτει από τον μαθηματικό τύπο: $T_m = 81,5 + 16,6 \times \log M + 0,41(\%GC) - 500/M$, όπου:

$M = 0,05 \times [Na^+]$ η συγκέντρωση των αλάτων,

$\log M$, ο λογάριθμος της συγκέντρωσης, και

%GC το επί τοις εκατό ποσοστό των ζευγών γουανίνης (G) κυτοσίνης (C) στον εκκινητή.

Η συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση είναι 0,6 μM . Γι' αυτό θα πρέπει να φτιάξουμε ένα τέτοιο αρχικό διάλυμα ώστε παίρνοντας 1 μlt να έχουμε 0,6 μM τελική συγκέντρωση. Σύμφωνα με την εξίσωση για την αρχή διατήρησης της μάζας μιας διαλυμένης ουσίας, και με δεδομένο ότι η αντίδραση του PCR θα έχει όγκο 50 μlt τότε θα έχουμε: $x \cdot 1 \mu\text{lt} = 0,6 \mu\text{M} \cdot 50 \mu\text{lt} \Rightarrow x = 30 \mu\text{M}$ θα είναι η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος (stock).

Διαλύουμε την αρχική ποσότητα των εκκινητών σε συγκέντρωση 100 μM τότε ο όγκος του διαλύματος θα είναι: $c = n/v$ όπου n ο αριθμός των moles, v ο όγκος του διαλύματος που θέλουμε να υπολογίσουμε και c η συγκέντρωση του εκκινητή που είναι 100 μM . Άρα ο όγκος του διαλύματος για τον εκκινητή sb4YFP-F θα είναι $v = n/c = 32,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol} / 100 \mu\text{M} = 32,8 \cdot 10^{-5} \text{lt}$ ή $v = 328 \mu\text{lt}$. Αντίστοιχα, ο όγκος του διαλύματος για τον εκκινητή sb4YFP-R θα είναι $v = 40,7 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol} / 100 \mu\text{M}$ ή 407 μlt . Τέλος, ο όγκος του εκκινητή sb6YFP-F θα είναι 375 μlt και ο όγκος του εκκινητή sb6YFP-R θα είναι 313 μlt .

Για την αραίωση των εκκινητών, οι οποίοι έχουν παραλειφθεί σε σωλήνες eppendorf σε μορφή σκόνης, τοποθετούμε τους σωλήνες eppendorf σ' ένα δοχείο με πάγο, κατόπιν, φυγοκεντρούμε τους σωλήνες eppendorf, που φέρουν τους εκκινητές, και προσθέτουμε διπλά αποσταγμένο νερό (ddH_2O) σε κάθε eppendorf, ανάλογα με την ποσότητα του ώστε να έχουμε ένα διάλυμα του εκκινητή συγκέντρωσης 100 μM . Αναμιγνύουμε πολύ καλά το διάλυμα των εκκινητών στο βόρτεξ και παίρνουμε 30 μl από το κάθε διάλυμα των 4 εκκινητών συγκέντρωσης 100 μM , και τοποθετούμε το κάθε διάλυμα των 30 μl σε 4 διαφορετικούς eppendorf, ενώ στην συνέχεια προσθέτουμε 70 μl ddH_2O . Κατόπιν, αναμιγνύουμε πολύ καλά τον κάθε eppendorf στο βόρτεξ και έτσι έχουμε έτοιμα διαλύματα για τις PCR αντιδράσεις.

B.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Θα κάνουμε τέσσερις αντιδράσεις PCR, και πιο συγκεκριμένα, μία αντίδραση για τους εκκινητές του κλώνου sb4YFP (τον sb4YFP-F και τον sb4YFP-R), μία αντίδραση

για τον μάρτυρα του κλώνου sb4YFP (όπου αντί για την συγκέντρωση του διαλύματος μήτρας DNA, προσθέτω 1 μl ddH₂O), μία αντίδραση για τους εκκινητές του κλώνου sb6YFP (τον sb6YFP-F και τον sb6YFP-R) και μία αντίδραση για τον μάρτυρα του κλώνου sb6YFP, όπου αντί για την συγκέντρωση του διαλύματος μήτρας DNA, προσθέτω 1 μl ddH₂O.

Για την παρασκευή του διαλύματος μήτρας DNA, έχουμε πολλαπλασιάσει τα πλασμίδια που φέρουν τα γονίδια προς μελέτη (miniprep) ώστε να έχουμε μία συγκέντρωση μήτρας DNA 800 ng*1 μl⁻¹. Κατόπιν, αραιώνουμε το διάλυμα DNA, ώστε να πάρουμε μία συγκέντρωση 50-80 ng*μl⁻¹. Σύμφωνα με τις οδηγίες από την εταιρία παρασκευής του ενζύμου πολυμεράσης, η ελάχιστη συγκέντρωση του DNA (για την αντίδραση PCR) είναι 1 pg-10 ng*50 μl⁻¹ αντίδρασης, αλλά εμείς βάζουμε, συνήθως, 20 ng DNA αντίδρασης PCR. Συνεπώς, θα πάρουμε 1 μl από το διάλυμα DNA συγκέντρωσης 800 ng*μl⁻¹ και θα προσθέσουμε ρυθμιστικό διάλυμα (illusion buffer) γι' αραιώση.

Παρακάτω, παρατίθενται αναλυτικότερα τα αντιδραστήρια και οι συνθήκες πραγματοποίησης των αντιδράσεων PCR. Οι συνθήκες πραγματοποίησης μιας αντίδρασης PCR προσαρμόζονται στις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος.

Για τις δύο πρώτες αντιδράσεις πολυμερισμού, προστίθενται σε ειδικό σωλήνα eppendorf τα εξής:

Πίνακας Β.3.α) Σύνθεση αντιδραστηρίων για την αντίδραση PCR.

| | | | |
|--------------------------------------|---------|--------------------------------------|---------|
| Μήτρα DNA | 1 μl | ddH ₂ O | 1 μl |
| Εκκινητής sb4YFP-F | 1 μl | Εκκινητής sb4YFP-F | 1 μl |
| Εκκινητής sb4YFP-R | 1 μl | Εκκινητής sb4YFP-R | 1 μl |
| Μίγμα dNTPs | 1 μl | Μίγμα dNTPs | 1 μl |
| Ρυθμιστικό διάλυμα MgCl ₂ | 5 μl | Ρυθμιστικό διάλυμα MgCl ₂ | 5 μl |
| EXTDNA πολυμεράση | 1 μl | EXTDNA πολυμεράση | 1 μl |
| DMSO | 2,5 μl | DMSO | 2,5 μl |
| ddH ₂ O | 37,5 μl | ddH ₂ O | 37,5 μl |
| Τελικός όγκος | 50 μl | Τελικός όγκος | 50 μl |

Πίνακας Β.3.β) Σύνθεση αντιδραστηρίων για την αντίδραση PCR.

| | | | |
|--------------------------------------|---------|--------------------------------------|---------|
| Μήτρα DNA | 1 μl | ddH ₂ O | 1 μl |
| Εκκινητής sb6YFP-F | 1 μl | Εκκινητής sb6YFP-F | 1 μl |
| Εκκινητής sb6YFP-R | 1 μl | Εκκινητής sb6YFP-R | 1 μl |
| Μίγμα dNTPs | 1 μl | Μίγμα dNTPs | 1 μl |
| Ρυθμιστικό διάλυμα MgCl ₂ | 5 μl | Ρυθμιστικό διάλυμα MgCl ₂ | 5 μl |
| EXTDNA πολυμεράση | 1 μl | EXTDNA πολυμεράση | 1 μl |
| DMSO | 2,5 μl | DMSO | 2,5 μl |
| ddH ₂ O | 37,5 μl | ddH ₂ O | 37,5 μl |
| Τελικός όγκος | 50 μl | Τελικός όγκος | 50 μl |

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι:

| | | | |
|----------------------|------------------|---|-----------|
| Αρχική αποδιάταξη | 94 °Cγια 3 λεπτά | } | 29 κύκλοι |
| Αποδιάταξη | 94 °Cγια 1 λεπτό | | |
| Υβριδισμός εκκινητών | 56 °Cγια 1 λεπτό | | |
| Επιμήκυνση | 72 °Cγια 1 λεπτό | | |
| Τελική επιμήκυνση | 72 °Cγια 1 λεπτό | | |

| | | | |
|-------------------|-------------------|---|-----------|
| Αρχική αποδιάταξη | 94 °Cγια 3 λεπτά | } | 5 κύκλοι |
| Αρχική αποδιάταξη | 94 °Cγια 1 λεπτό | | |
| Annealing | 54 °Cγια 1 λεπτό | } | 25 κύκλοι |
| Επιμήκυνση | 72 °Cγια 1 λεπτό | | |
| Αποδιάταξη | 94 °Cγια 1 λεπτό | } | |
| Annealing | 60 °Cγια 1 λεπτό | | |
| Επιμήκυνση | 72 °Cγια 1 λεπτό | | |
| Τελική επιμήκυνση | 72 °Cγια 10 λεπτά | | |
| hold | 4 °Cγια 20 ώρες | | |

Στην τρίτη αντίδραση PCR, τα προϊόντα των δύο παραπάνω αντιδράσεων συνδιάζονται και ενισχύονται με την βοήθεια των εξωτερικών εκκινήτων. Στην τελευταία αντίδραση οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων είναι οι εξής:

| | |
|-----------------------|------------|
| Μήτρα DNA | 10 μ l |
| Εκκιν Φ (30 μ M) | 1 μ l |
| Εκκιν P (30 μ M) | 1 μ l |
| Μίγμα dNTPs | 1 μ l |
| 10xρυθμιστικό διάλυμα | 5 μ l |
| Πφυ DNAπολυμεράση | 1 μ l |
| ddH ₂ O | 31 μ l |
| Τελικός όγκος | 50 μ l |

Η τελευταία εξίσωση πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες με τις προηγούμενες αντιδράσεις.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 1,5 %.

B.5.3 Καθαρισμός των δειγμάτων μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR)

Μετά από κάθε αντίδραση PCR ακολούθησε καθαρισμός των δειγμάτων σύμφωνα με το εγχειρίδιο QIAquick PCR Purification της QIAGEN.

Ο καθαρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε για την απαλλαγή από τους εκκινήτες και από μη ειδικά προϊόντα ενίσχυσης. Μετά την έκλουση από την στήλη το επιθυμητό προϊόν της αντίδρασης ήταν ελεύθερο από άλατα και μακρομοριακές ουσίες.

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε διάλυμα PB, πενταπλασίου όγκου από αυτόν της αντίδρασης PCR.
- Το διάλυμα μεταφέρθηκε προσεκτικά στην στήλη 'QIAquick spin column', ακολούθησε φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου.

- Το διάλυμα που συλλέχθηκε στο κάτω μέρος της στήλης απορρίφθηκε.
- Στην στήλη προστέθηκαν 750 μl διαλύματος PE.
- Έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που συλλέχθηκε στο κάτω μέρος της στήλης απορρίφθηκε.
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετήθηκε σε σωλήνα eppendorf. Για την έκλυση του DNA προστέθηκε ddH₂O ή διάλυμα EB (30 μl).
- Μετά από 1 λεπτό ακολούθησε φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα διατηρήθηκε στους -20°C.

B.6 Βιο-βαλιστική μέθοδος για την μεταφορά γονιδίων σε φυτικούς ιστούς του γλυκού σόργου.

B.6.1 Φυτά για βομβαρδισμό

Για τον βομβαρδισμό, χρησιμοποιήθηκαν νεαρά φυτά γλυκού σόργου ηλικίας 15 ημερών, και συγκεκριμένα τα φύλλα τους τα οποία εκπλύθηκαν αρχικά με διπλό αποσταγμένο νερό και στην συνέχεια τα στεγνώσαν με χαρτί στον θάλαμο νηματικής ροής. Ακολούθως, τοποθετήθηκαν τα νεαρά φύλλα του γλυκού σόργου σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Murashige και Skoog (MS) με την κάτω φυλλική επιφάνεια προς τα πάνω. Τα φύλλα του σόργου πιέστηκαν λίγο στην αгарόζη για να μην μετακινηθούν μέσα στο τρυβλίο.

B.6.2 Προετοιμασία των μικρομεταφορέων χρυσού και του διαλύματος DNA

Για την αποσυγκόλληση των μικρομεταφορέων χρυσού, αρχικά τοποθετήθηκαν 60mg στεγνών μικρομεταφορέων σε 1 ml 100 % EtOH, και ανακινήθηκαν στο βόρτεξ (vortex)

σε υψηλή ταχύτητα για δύο λεπτά, και αυτή η ανακίνηση επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Για το πλύσιμο των μικρομεταφορέων χρυσού, έγινε φυγοκέντρωση στις 10.000 σ.α.λ. για ένα λεπτό. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 ml αποστειρωμένο dH₂O. Ανακινήθηκαν οι μικρομεταφορείς στο βόρτεξ, φυγοκεντρήθηκαν, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και η διαδικασία επαναλήφθηκε. Οι μικρομεταφορείς επαναδιαλύθηκαν σε 1 ml dH₂O, και 50 μl ελήφθησαν από το διάλυμα και τοποθετήθηκαν σε επιστήλες (epi-tubes) και το αποθηκεύτηκαν στους 4 °C. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι οι μικρομεταφορείς βολφραμίου (tungsten) πρέπει ν' αποθηκευτούν στους -20 °C για να εμποδιστεί η οξειδωση τους. Επίσης θα πρέπει να δίνεται προσοχή κατά την λήψη των μικρομεταφορέων από το αιώρημα, με πιπέτα, καθώς το αιώρημα αυτό πρέπει να είναι σε συνεχή ανακίνηση, διότι οι μικρομεταφορείς καθιζάνουν πολύ γρήγορα.

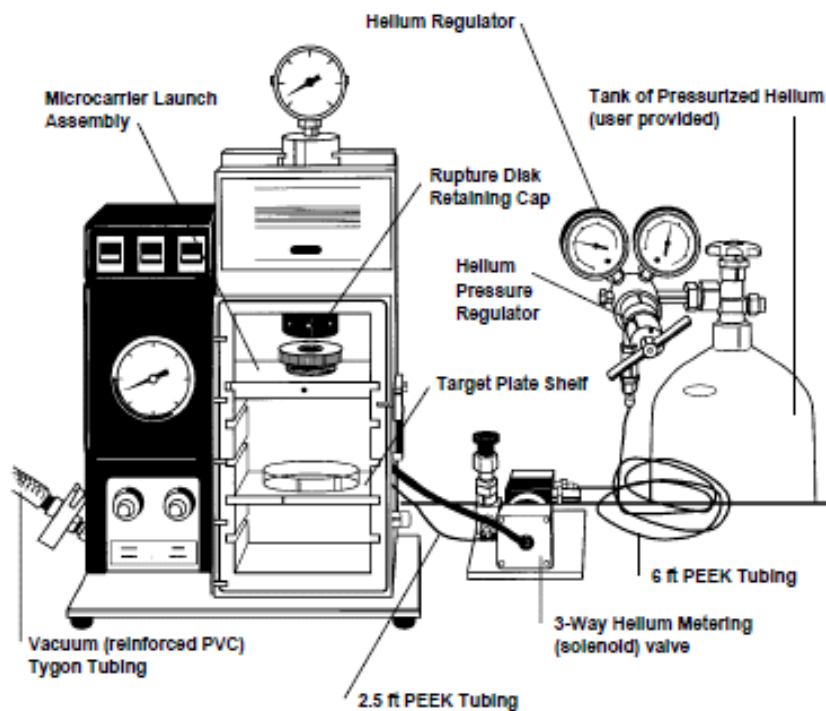
Σε σωλήνα erpendorf, που περιέχει 50 μl αντιπροσωπευτικού δείγματος του μικρομεταφορέα (χρυσός), προστέθηκαν με την σειρά που αναφέρονται:

- 5 μl πλασμιδιακό DNA (1 μg*μl⁻¹), αφού ανακινήθηκε με βόρτεξ ελάχιστα.
- 50 μl 0,1 M CaCl₂ και ανακινήθηκε στο βόρτεξ ελάχιστα.
- 20 μl 0,1 M σπερμιδίνη, και ανακινήθηκε στο βόρτεξ για 3 λεπτά
- Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 σ.α.λ. για 30 δευτερόλεπτα. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο διάλυμα.
- Οι μικρομεταφορείς πλύθηκαν με 500 μl 100 % αιθυλική αλκοόλη (EtOH), ανακινήθηκαν στο βόρτεξ για 10 δευτερόλεπτα, φυγοκεντρήθηκαν και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο διάλυμα.
- Οι μικρομεταφορείς εμβαπτίστηκαν πάλι σε 50 μl 100 %(EtOH), οι οποίοι (μικρομεταφορείς) έπρεπε να χρησιμοποιηθούν μέσα σε 1 με 2 ώρες.
- Η συσκευή βομβαρδισμού σωματιδίων καθαρίστηκε με διάλυμα 70 % EtOH.

B.6.3 Περιγραφή και λειτουργία της συσκευής βομβαρδισμού μικροσωματιδίων Bio-Rad PDS-1000/He

Η συσκευή βομβαρδισμού μικροσωματιδίων λειτουργεί μ' αέριο ήλιο (He), για να επιταχύνει μικροσωματίδια υποκυτταρικού μεγέθους, καλυμμένα με DNA (ή άλλο βιολογικό υλικό) σ' ένα εύρος ταχυτήτων οι οποίες είναι απαραίτητες για να μετασχηματίσουν διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Αυτό το βαλλιστικό σύστημα αποτελείται από τον θάλαμο βομβαρδισμού (η κύρια μονάδα), τον σωλήνα σύνδεσης με την αντλία κενού και όλα τ' απαραίτητα στοιχεία για την σύνδεση και την διοχέτευση του ηλίου υψηλής πίεσης στην κύρια μονάδα (ρυθμιστής πίεσης ηλίου, ηλεκτρομαγνητική βαλβίδα και σωλήνας σύνδεσης).

Το βαλλιστικό σύστημα Bio-Rad PDS-1000/He χρησιμοποιεί ήλιο υψηλής πίεσης, το οποίο απελευθερώνεται από ένα δίσκο εκτόξευσης, και μερική πίεση κενού για να ωθήσει ένα φύλλο μακρομεταφορέα το οποίο είναι γεμάτο μ' εκατομμύρια μικροσκοπικών μικρομεταφορέων χρυσού ή βολφραμίου προς τα κύτταρα 'στόχους' με υψηλή ταχύτητα. Οι μικρομεταφορείς είναι καλυμμένοι με DNA ή άλλο βιολογικό υλικό. Ο μακρομεταφορέας σταματάει την πορεία του μετά από μία μικρή απόσταση σ' ένα προπέτασμα πρόσκρουσης. Οι μικρομεταφορείς, οι οποίοι φέρουν το DNA συνεχίζουν την πορεία τους προς τον στόχο ώστε να διαπεράσουν και να μετασχηματίσουν τα κύτταρα.



Εικόνα Β.1: Τα μέρη της συσκευής του βαλλιστικού συστήματος Bio-Rad PDS 1000/He.

Vacuum (reinforced PVC): Αντλία με ενισχυμένο πολυ-βινυλοχλωρίδιο,

Microcarrier launch assembly: Συνδεσμολογία εκτόξευσης μικρομεταφορέων,

Helium regulator: Ρυθμιστής/Δείκτης πίεσης ηλίου,

Rupture disk retaining cap: Πώμα στερέωσης δίσκου εκτόξευσης,

Helium pressure regulator: Ρυθμιστής πίεσης ηλίου,

Target plate shelf: Ράφι τρυβλίου «στόχου»,

PEEK tubing: Σύνδεση PEEK,

3-Way helium metering: Μετρητής ηλίου,

Tank of pressurized helium: Δοχείο συμπυκνωμένου ηλίου.

B.6.4 Έλεγχος των φύλλων που έχουν υποστεί βομβαρδισμό

Ο έλεγχος των βομβαρδισμένων φύλλων, 2-4 ώρες μετά τον βομβαρδισμό, του σόργου έγινε σ' ένα κανονικό μικροσκόπιο με λάμπα UV υπεριώδους (ultraviolet) ακτινοβολίας.

Αρχικά, η διαδικασία ξεκίνησε με το άνοιγμα του διακόπτη και χρειάστηκαν περίπου 10 λεπτά για την λάμπα UV να ζεσταθεί και ν' ανάψει. Στο μικροσκόπιο υπάρχουν κάποια φίλτρα τα οποία κόβουν το κόκκινο φως και επιτρέπουν στο πράσινο και στο κίτρινο φως, ελάχιστα, να περάσουν.

Τα τρυβλία ανοίχτηκαν και τα “βομβαρδισμένα” φύλλα του σόργου ελήφθησαν και προετοιμάστηκαν έτσι ώστε τα κύτταρα να παρατηρηθούν σ' αυτά τα φύλλα τα οποία έχουν μετασχηματιστεί επιτυχώς και φέρουν το πλασμιδιακό DNA στο οποίο υπάρχει και η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη η οποία φθορίζει διότι απορροφά τα υπόλοιπα μήκη κυμάτων εκτός απ' αυτό του πράσινου χρώματος. Με μια λαβίδα, τοποθετήθηκε το κομμάτι αυτού του φύλλου σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα με την κάτω επιφάνεια τους προς τα πάνω. Στην συνέχεια, προστέθηκαν δύο σταγόνες νερού πάνω στο φύλλο και στην συνέχεια την καλυπτρίδα, ώστε η καλυπτρίδα να τοποθετηθεί καλύτερα με το νερό. Έτσι παρατηρήθηκε το φύλλο στο φακό του μικροσκοπίου στη μεγέθυνση Νο 40, και η παρατήρηση έγινε καλύτερη μ' εστίαση σε κύτταρα με το φως (του μικροσκοπίου) αναμμένο στην αρχή, ενώ στη συνέχεια σβήνοντας το φως για να εντοπίστηκαν τα κύτταρα που φθόριζαν πράσινα κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Σύνθεση ρυθμιστικών διαλυμάτων

Αντιδραστήριο Bradford: 100 mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 διαλύεται σε 100 ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v). Στο διάλυμα προστίθενται 100 ml πυκνού φωσφορικού οξέος (85 % w/v). Όλα τα υλικά προστίθενται εντός σκοτεινού δοχείου και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε θερμοκρασία 25 °C.

APS (10%): 1 gr APS (Amonium Persulfate) διαλύεται σε 10 ml dH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Βρωμιούχο αιθίδιο: Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg*ml⁻¹ σε αποσταγμένο νερό (dH₂O) και φυλάσσεται στους 4 °C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5 μg*ml⁻¹.

BIS (1%): 0,5 gr BIS-ακρυλαμίδης διαλύονται σε 50 ml dH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

IPTG (100 mM): 238 mg IPTG (Ισοπροπυλ-βητα-ϋ-θειογαλακτοπυρανοσίδης) διαλύονται (σίγμα I-6758) σε 10 ml αποσταγμένο νερό (DW) για ένα διάλυμα συγκέντρωσης (100mM). Το διάλυμα φυλάσσεται σε φιαλίδια του 1ml στους -20 °C.

Λυσοζύμη: 50 mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1 ml dH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Sample Buffer: 4% SDS, 10% 2-μερκαπταιθανόλη, 0,1M Tris-HCl pH=6,8 και γλυκερόλη 20 %.

STET: Σακχαρόζη 8%, Triton x100: 5%, 50 mM Tris-HCl pH=8,0 και 50 mM EDTA.

TE: 10 mM Tris-HCl pH=8,1 και 50 mM EDTA.

1xTAE: Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50xTAE το οποίο αραιώνεται 50 φορές. Το αρχικό διάλυμα 50xTAE αποτελείται από: 242 gr Tris base, 57,1 ml κρυσταλλικού (glacial) οξικού οξέος και 100 ml EDTA 0,5 M με pH=8,0 μέχρι τελικού όγκου 1lt και pH=8,5.

Σύνθεση θρεπτικών μέσων

LB: θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηριακών κυττάρων *E. coli*.

Για την παρασκευή 1 lt θρεπτικού διαλύματος LB: σε 1 lt απιονισμένο νερό προστίθενται 10 gr NaCl, 10 gr Bacto-Trypton (casein) και 5 gr Yeast extract. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5 % αγαρόζη (agar). Ακολουθεί αποστείρωση. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ τα τρυβλία με το στερεό θρεπτικό μέσο φυλάσσονται στους 4 °C.

Παρασκευή και συγκεντρώσεις αντιβιοτικών

Αμπικιλίνη:

Μητρικό διάλυμα: 100 mg*ml⁻¹ σ' αποστειρωμένο dH₂O

Τελική συγκέντρωση: 100 μg*ml⁻¹ θρεπτικού διαλύματος

Καναμυκίνη

Μητρικό διάλυμα: 25 mg*ml⁻¹ σ' αποστειρωμένο dH₂O

Τελική συγκέντρωση: 25 μg*ml⁻¹ θρεπτικού διαλύματος

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 *In silico* ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τους μεταφορείς των σακχάρων

Για την ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από τα δύο (υπό μελέτη) γονίδια *sb4YFP* και *sb6YFP*, μαζί με αμινοξικές αλληλουχίες χαρακτηρισμένων και δημοσιευμένων ακολουθιών μεταφορέων σακχάρων οι οποίες βρέθηκαν με την διαδικασία του Blast, πραγματοποιήθηκε ανάλυση στοίχισης με το πρόγραμμα ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) και τ' αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα Γ.1.

Σύμφωνα με τ' αποτελέσματα που προέκυψαν, παρουσιάζεται σημαντική ομολογία μεταξύ αυτών και υπάρχουν αρκετές συντηρημένες περιοχές. Βέβαια, υπάρχουν και περιοχές που εμφανίζουν ελάχιστη ή και καθόλου ομολογία (Εικ. Γ.1). Πιο συγκεκριμένα, σύγκριση προς τις αλληλουχίες των λειτουργικά γνωστών μεταφορέων σακχάρων δείχνει ότι οι αντίστοιχες προβλεπόμενες πρωτεΐνες Sb4YFP και Sb6YFP (από τα γονίδια *sb4YFP* και *sb6YFP*) διατηρούν μία από τις χαρακτηριστικές αλληλουχίες του μοτίβου (RXGRR) η οποία υπάρχει είτε στον δεύτερο (Henderson, 1990) ή στον έκτο βρόγχο (στο R94 και στο R338 στην Sb4YFP) των μεταφορέων σακχάρων, οι οποίοι ανήκουν στην Υπεροικογένεια των MFS μεταφορέων (Major Facilitator Superfamily, MFS, Marger και Saier, 1993).

Ακόμη παρατηρούμε ότι το κατάλοιπο της ιστοδίνης (His-186) στην πρωτεΐνη Sb4YFP είναι συντηρημένο και στις δύο αλληλουχίες καθώς επίσης και στις αλληλουχίες των γνωστών λειτουργικά πρωτεϊνών. Αυτό το κατάλοιπο της ιστοδίνης, στον εξωκυτταρικό βρόγχο, είναι υπεύθυνο για την δέσμευση της σακχαρόζης στην διαδικασία της μεταφοράς (Lu και Bush, 1998).

```

gi|108706669|gb|ABF94464.1|
gi|195641268|gb|ACG40102.1|
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|
gi|195611454|gb|ACG27557.1|
tr|C5XCG3|C5XCG3_SORBI
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI
gi|77556319|gb|ABA99115.1|
gi|77552122|gb|ABA94919.1|
gi|77552119|gb|ABA94916.1|

```

```

MTTSRRLADRKTKAKFQKNITKRGSVPETT VKKNDY PVGELVLGFFIFVR 50

```

```

gi|108706669|gb|ABF94464.1|
gi|195641268|gb|ACG40102.1|
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|
gi|195611454|gb|ACG27557.1|
tr|C5XCG3|C5XCG3_SORBI
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI
gi|77556319|gb|ABA99115.1|
gi|77552122|gb|ABA94919.1|
gi|77552119|gb|ABA94916.1|

```

```

-----MTKDDAVPVAVAPAKRPPIN-----K 21
-----MSTGTDVAVPVAVAPAKRPPIN-----K 22
-----MS---KDVAAD--IPAAEAPAKRPPIN---K 23
-----MS---KDVAAD--IPAAEAPAKRPPIN---K 23
-----MSNSKQHDAAADDGGIPEAPEAKRPPIN---K 29
-----MADAD--LAEAIETPKKSNV-----K 19
-----MAHRFDAAAPELLAKFDADATPPPP---PKR NK 29
-----MAPDVEARLLAASSKPAFAAAAALPRNK 29
ISYDRDRSVLIGGGRRAMASGGDDAAAPLLAS--KHGGERR---NT 93
-----MASDGD-AAAPLLTPSGDNDDEPRRR---RNM 28

```

```

gi|108706669|gb|ABF94464.1|
gi|195641268|gb|ACG40102.1|
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|
gi|195611454|gb|ACG27557.1|
tr|C5XCG3|C5XCG3_SORBI
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI
gi|77556319|gb|ABA99115.1|
gi|77552122|gb|ABA94919.1|
gi|77552119|gb|ABA94916.1|

```

```

YAFGCALLASMSVLLGYDISVMSGAQIFMKEDLKITDQIEILAGVINI 71
YAFACALLASMSVLLGYDISVMSGAQLFMKEDLKITDQIEILAGVINI 72
YALACAILASMSILLGYDVSVMGAQIFMKRDINITDQIEILAGIINI 73
YALACAILASMSILLGYDVSVMGAQIFMKRDINITDQIEILAGIINI 73
YALACAVLASMSILLGYDVSVMGAQLFMKQDLKITDQIEILAGIINI 79
YASICAILASMASVILGYDIGVMGAAMYIKKDLKITDQIEILAGIINI 69
YPPFCAVLASMTSVLMGYNVAVTSGAQIFMAEDLGVSDAQIEVLGIVINI 79
YPPFCAVLASMTSVLMGYNVAVTSGAQIFMAEDLGVSDAQIEVLGIVINI 79
FAFACATLASMTTILMGYNLALMSGAELFIREDLGLADEQEVLSGSMNV 143
FAFGCATLASMTTILMGYNLALMSGAQLFVREDMGLSDAEIEVLGSMNV 78

```

```

gi|108706669|gb|ABF94464.1|
gi|195641268|gb|ACG40102.1|
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|
gi|195611454|gb|ACG27557.1|
tr|C5XCG3|C5XCG3_SORBI
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI
gi|77556319|gb|ABA99115.1|
gi|77552122|gb|ABA94919.1|
gi|77552119|gb|ABA94916.1|

```

```

YSLFGSLAAGMTSDWLGRRYTMVLAIAIFFTGALLMGLAENYAF LMAGR F 121
YSLFGSLAAGLTSIDLGRRYTMVLAIAIFFTGALLMGLAPDYGF LMAGR F 122
FSLVGS LAAGR TSDWIGRRYTMVLAIVIFFAGALIMGLAPSYAVVLMGR F 123
FSLVGS LAAGR TSDWIGRRYTMVLAIVIFFAGALIMGLAPSYAVVLMGR F 123
YSLVGS LAAGR TSDWLGRRYTMVLAIAIFFAGALIMGLAPSYTILMGR F 129
YSLDGSFAGARTSDRIGRRLTVVFAVIFVFGALLMGLFVAVNYGMLMGR F 119
YSLVGALLAGWTSDDLGRRLTIVLANAFPLVGLAMALARGYALLMGR F 129
YSLVGALLAGWTSDDLGRRLTIVLTNGFFLAGPLVMSLAGGYAALMAGR F 129
FMLASILAAGTVADAAAGRRGTLVLANALLMAGALAMS LGGSYAALMAAR F 193
FMLASILAAGWAADTLGRRGTLVLANAF LMAGALAMS LGATYAALMAAR F 128

```

```

gi|108706669|gb|ABF94464.1|
gi|195641268|gb|ACG40102.1|
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|
gi|195611454|gb|ACG27557.1|
tr|C5XCG3|C5XCG3_SORBI
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI
gi|77556319|gb|ABA99115.1|
gi|77552122|gb|ABA94919.1|
gi|77552119|gb|ABA94916.1|

```

```

VAGIGVGYALMIAFVYTAEVAPT SARGFLTSFPEVFNNSGILLGYVS NFA 171
VAGIGVGFALMIAFVYTAEVAPT SARGFLTSFPEVFNNEGILLGYVS NFA 172
VAGVGVGYALMIAFVYTAEVAPT SARGLLTSFPEVFNINFGVLLGYIS NFA 173
VAGVGVGYALMIAFVYTAEVAPT SARGLLTSFPEVFNINFGVLLGYIS NFA 173
VAGVGVGYALMIAFVYTAEVAPT SARGLLTSFPEVFNINFGVLLGYIS NFA 179
VAGVGVGFGGMIAFVYTAEISPASSRGLTSFPEVFNINFGILLGYLS NFA 169
VAGVGVGYALVIAFVYTAEISPASSRGLLSLPEIFINFGVMLSYSV NFA 179
VAGIGVGYALVIAFVYTAEISPASSRGLLSLPEIFINFGVMLSYSV NFA 179
VTSVGVGFVAVVAFVYAVEISPASSRGLLSLPEIFINAGILLGYVS NFA 243
VTSVGVGFARVAVVYNAEISPASTRGVLTSLDDMFINVGILLGYVS NFA 178

```

```

gi|108706669|gb|ABF94464.1|
gi|195641268|gb|ACG40102.1|
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|
gi|195611454|gb|ACG27557.1|
tr|C5XCG3|C5XCG3_SORBI
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI
gi|77556319|gb|ABA99115.1|
gi|77552122|gb|ABA94919.1|
gi|77552119|gb|ABA94916.1|

```

```

FARLPVHLSWRAMFLVAVPPVIFLGI AVLAMPESPRWLVMGRGRIEDARRV 221
FARLPVHLSWRAMFLVAVPPVIFLGI AVLAMPESPRWLVMGRGRIEDARRV 222
FHGLPVLHLSWRAMFLVAVPPVIFLGI AVLAMPESPRWLVMQGRIGDARRV 223
FHGLPVLHLSWRAMFLVAVPPVIFLGI AVLAMPESPRWLVMQGRIGDARRV 223
FHGLPVLHLSWRAMFLVAVPPVIFLGI AVLAMPESPRWLVMQGRIGDARRV 229
FARLPVHLSWRAMFLVAVPPVIFLGI AVLAMPESPRWLVMQGRIGDARRV 219
FSGLPVHLSWRAMFLVAVPPVIFLGI AVLAMPESPRWLVMQGRIGDARRV 229
FSGLPVHLSWRAMFLVAVPPVIFLGI AVLAMPESPRWLVMQGRIGDARRV 229
LAGLPLRLGWRVMPFAAGVPPVIFLGI AVLAMPESPRWLVMQGRIGDARRV 293
FAGLPVHLSWRAMFLVAVPPVIFLGI AVLAMPESPRWLVMQGRIGDARRV 228

```



```

gi|108706669|gb|ABF94464.1|      LLKTSDSDEAEDRLLDIKKAVGIPEDASD--GEDVVAIVRAN-KASQG- 267
gi|195641268|gb|ACG40102.1|      LQKTSDSPAEAEERLLDIKKVVGIPGVTD--ADDVAIVRASSKASSSS 270
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|      LQKTSDSPAEAEERLLDIKSAVGIPEGIADDMNDELVAIVRKN-KGTHG- 271
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|      LQKTSDSPKAEVRLADIKSAVGIPEGIADDMNDELVAIVRKN-KGTHG- 271
gi|195611454|gb|ACG27557.1|      LAKTSNSPAEAEERLLADIKNAIGIPDGVGD-NDDDVVVAVRN-KGSHG- 276
tr|C5XC63|C5XC63_SORBI          LEKTSASPEAEERLLADIKVAAGIPKDLDG----DVVTVPKERNGGEMQ- 264
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI          LDRTSDTPAEAEQRLLIQDQVVTNS----S-----SGVGGGG- 262
gi|77556319|gb|ABA99115.1|      LDRTSDTPAEAEQRLLQEIQDQVVAAGSVAG-----NGNGGGG- 266
gi|77552122|gb|ABA94919.1|      LARTSDTPAEADLRLEEITRAVAAQ-----AGVAGG- 324
gi|77552119|gb|ABA94916.1|      LARTSDSAREADLRLEEIKHAAVAP-----HDAGGG- 259
* : ** : . ** * : * .

gi|108706669|gb|ABF94464.1|      -----EGVWKELELLNPTREVRRLVAVLGLMFIQQATGVDCVVMYSPRVF 312
gi|195641268|gb|ACG40102.1|      SSSRHGEGVWKELELLNPTREVRRLVAVLGLMFIQQATGVDCVVMYSPRVF 320
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|      -----EGVLRDLLLLHPTPFVRRILLIACLGQFFQQASGIDSVVLYSPRVF 316
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|      -----EGVLRDLLLLHPTPFVRRILLIACLGQFFQQASGIDSVVLYSPRVF 316
gi|195611454|gb|ACG27557.1|      -----EGVWRDLLLLRPTPFVRRILLIACLGQFFQQASGIDSVVLYSPRVF 321
tr|C5XC63|C5XC63_SORBI          -----VVKALIFSPIPALRRILLSGVGLHFFQQASGSDSVVLYSPRVF 307
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI          -----AWKEVATKAG--VRRVLLMVLTLQFFQQASGIDSVVLYGPRVL 303
gi|77556319|gb|ABA99115.1|      -----AWKEVATKPG--VRRVLAIVLTLQFFQQASGIDSVVLYGPRVL 307
gi|77552122|gb|ABA94919.1|      -----VWRQLLVRPTPTVRRIMTNVLSLHFFQQASGIDVIVLYSPRVF 367
gi|77552119|gb|ABA94916.1|      -----VWRELLFRPSAMVRRILATVIGLQFFQQASGIDVIVLYSPRVF 302
. : : . : ** : : * * : ** : * * : * : * : * : * :

gi|108706669|gb|ABF94464.1|      ERAGIKSKTNSLGASMAVGVCCKTFPIPIATLLLLDRVGRRLPILLSGGGMA 362
gi|195641268|gb|ACG40102.1|      ERAGIKSKTNSLGASMAVGACKTFEPIPISTLLLLDRIGRRPILLSGGGMT 370
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|      QQAGIKKTANTLGATISVGATKTLFELVATFLLDRVGRRLPILLSAGGMV 366
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|      QQAGIKKTANTLGATISVGATKTLFELVATFLLDRVGRRLPILLSAGGMV 366
gi|195611454|gb|ACG27557.1|      EKAGLRSNNSLGATMAVGATKTLFELVATFLLDRVGRRLPILLSAGGMV 371
tr|C5XC63|C5XC63_SORBI          KSAGITDDNKLHGVTCVAVGSKTLFELVATFLLDRVGRRLPILLSAGGMV 357
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI          AMAGVTSNTLLSLNVLFQVAVAGSILVAMALADRVGRRLPILLSSTGGMT 353
gi|77556319|gb|ABA99115.1|      AAAGVASNTLLGLNVVFGVAKASSILVAMALDRVGRRLPILLSSTGGMT 357
gi|77552122|gb|ABA94919.1|      KQAGMASNTSVAATVAVGVVKTCSELVATLSDRVGRRLPILLSAAGMA 417
gi|77552119|gb|ABA94916.1|      KKAGMASNTSILGATIAIGVVKTCFELVATLSDRLGRRLPILLSSTGGMA 352
* * : . * . . * : * : : * : * : * : * : * : * :

gi|108706669|gb|ABF94464.1|      IFLPTLATSLMMDR--RPEGEAKALGAIISIAAMLSFVASFASGLGPVAV 410
gi|195641268|gb|ACG40102.1|      IFLPTLATSLMMDR--RPEGEAAALGAVSIAAMLSFVASFASGLGPVAV 418
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|      VSLVTLASTLHVIAQRTSADGATALSGVSIASVLTFFVASFSIGMGPIAW 416
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|      VSLVTLASTLHVIAQRTSADGATALSGVSIASVLTFFVASFSIGMGPIAW 416
gi|195611454|gb|ACG27557.1|      VSLVTLASLALRAIDR--LPEGQATSLAGVSIASVLTFFVASFSIGMGPIAW 419
tr|C5XC63|C5XC63_SORBI          VALIGLGTGLTVVGH--HEDAKIPSAVALCIASLAVYAFVFSIGLGPITG 405
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI          AALLVLGSLFAAFAG---AKDDAAVAA--VSVAAVVAVVAVSVGLGPLAW 399
gi|77556319|gb|ABA99115.1|      ASLLALGSLVFAAFAG---AKDDAAVAAVAAVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAV 404
gi|77552122|gb|ABA94919.1|      VALASLALTLCVAG---APSPARAAA--GVASAAAVVAVVAVSVGLGPLAW 462
gi|77552119|gb|ABA94916.1|      VTLTSLALTLRVAS---PESTASSAA--CVASVAVVAVVAVSVGLGPTTA 396
* * . : . * : * : * : * : * : * : * : * :

gi|108706669|gb|ABF94464.1|      VYTSSEIYVRLRAQAAAIGTGLNRLMSGATTMSFLSLSNAITIAGSFYLY 460
gi|195641268|gb|ACG40102.1|      VYCSSEIYPLRLRAQAAAIGTGLNRLMSGATTMSFLSLSNAITIAGSFYLY 468
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|      VYSSSEIFPLRLRAQGCALGTAMNRLMSGATTMSFYSLSNKITLAGSLYLY 466
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|      VYSSSEIFPLRLRAQGCALGTAMNRLMSGATTMSFYSLSNKITLAGSFYLY 466
gi|195611454|gb|ACG27557.1|      VYSSSEIFPLRLRAQGCALGTAMNRLMSGATTMSFISLYKAITFAGSFYLY 469
tr|C5XC63|C5XC63_SORBI          VYNSSEIFPLQVRLAGFVAVMACNRVTSVAVISMTFLSLSKGITIGGSFFLY 465
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI          VYSSSEILPLRLRGGAGLGTAMNRLMSGVVTMTFISLYQGITMAGAFYLY 449
gi|77556319|gb|ABA99115.1|      VYSSSEILPLRLRGGAGVGTAMNRLMSGVVTMTFISLYGAITMAGAFYLY 454
gi|77552122|gb|ABA94919.1|      SYGSEIMPLMLRAQAGVAVNRVTCVLSMTFISVAGGITMAGCFEYV 512
gi|77552119|gb|ABA94916.1|      TYTAEVMPRLRLRAQGTGLGVAVNRLACGAVTMTFISLADGITMAGCFEYV 446
* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

gi|108706669|gb|ABF94464.1|      ASIAAAGVVFMYFFLPETRGKSLDTEKLFPGK-DTDDDDVDTSRHE--R 507
gi|195641268|gb|ACG40102.1|      ACIAAAGVVFMYFFLPETRGKSLDTEKLFPGK-DADDEDVGDSTRHAPSK 517
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|      ASIAAAGVVFMECFLETRGEGLEDTEKLFPGG-TGDAVEKEDEHGHAKST 515
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|      ASIAAAGVVFMECFLETRGEGLEDTEKLFPGG-TGDAVEKEDEHGHAKST 515
gi|195611454|gb|ACG27557.1|      AGIAAAGVLFMEFFLPETRGNSLEDTEKLFPGG-GDHDEDKEDGHDAQKST 518
tr|C5XC63|C5XC63_SORBI          SGIAAVGVVFFFVCLPETRGRTLEEMKLFMGPDIDMAQDDTAAKERVV 505
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI          AAIAAAASFVVFYACLPETRGRSLEDMEELFHTK----- 482
gi|77556319|gb|ABA99115.1|      AAIAAAASFVVFYACLPETRGRSLEDMEELFHTK----- 487
gi|77552122|gb|ABA94919.1|      AGAAVAAVVVFVYVRLPETRGRSLEDMDVLFK----- 544
gi|77552119|gb|ABA94916.1|      AGVAAAACVVFVYVWLPETRGRSLENMDVVFSK----- 478
: * . . : * : * : * : * : * : * : * : * :

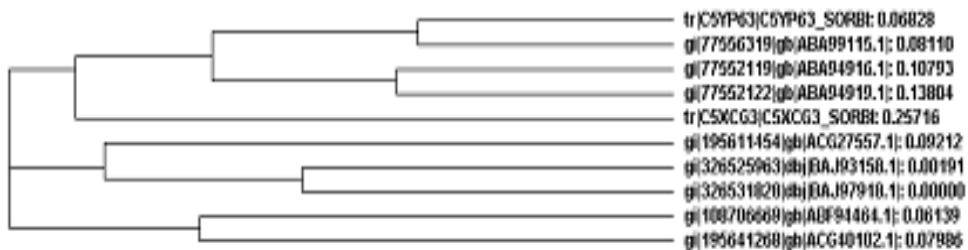
```

```

gi|108706669|gb|ABF94464.1|      KRST---ELSAQH 517
gi|195641268|gb|ACG40102.1|     KPSTSTLELSAQH 531
gi|326525963|dbj|BAJ93158.1|    QLTPR----- 520
gi|326531828|dbj|BAJ97918.1|    QLTPR----- 520
gi|195611454|gb|ACG27557.1|    ELSSSQ----- 525
tr|C5XCG3|C5XCG3_SORBI         EMPTM----- 510
tr|C5YP63|C5YP63_SORBI         -----
gi|77556319|gb|ABA99115.1|     -----
gi|77552122|gb|ABA94919.1|     -----
gi|77552119|gb|ABA94916.1|     -----

```

Εικόνα Γ.1: Ευθυγράμμιση αμινοξικών αλληλουχιών των δύο πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *sb4YFP* και *sb6YFP* (υπό μελέτη) σε σύγκριση με άλλες αλληλουχίες πρωτεϊνών γνωστών και χαρακτηρισμένων λειτουργικά ως μεταφορείς σακχάρων. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε μέσω του προγράμματος ClustalW. Παρακάτω αναφέρεται ο οργανισμός προέλευσης και ο αριθμός καταχώρησης των στοιχημένων αλληλουχιών: *OsMaT* (Mannitol transporter - *Oryza sativa Japonica Group*, ABF94464), *ZmPlt4* (Polyol transporter 4 - *Zea mays*, ACG40102), *HvSUT* (Sugar transporter - *Hordeum vulgare subsp. vulgare*, BAJ93158), *HvSUT* (Sugar transporter - *Hordeum vulgare subsp. vulgare*, BAJ97918), *ZmSOT* (Sorbitol transporter - *Zea mays*, ACG27557), *Sb02g037580* (Υποθετική μη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη *Sb02g037580* του γονιδίου *Sb6YFP* - *Sorghum bicolor*, C5XCG3/EER97445), *Sb08g016530* (Υποθετική μη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη *Sb08g016530* του γονιδίου *Sb4YFP* - *Sorghum bicolor*, C5YP63/EES17097), *OsSUT* (Sugar transporter - *Oryza sativa Japonica Group*, ABA99115), *OsSUT* (Sugar transporter - *Oryza sativa Japonica Group*, ABA94919), *OsSUT* (Sugar transporter - *Oryza sativa Japonica Group*, ABA94916).



Εικόνα Γ.2: Φυλλογενετικό δέντρο των μεταφορέων σακχάρων βασισμένο στις αμινοξικές τους αλληλουχίες οι οποίες αναλύθηκαν αρχικά μέσω του προγράμματος ClustalW.

Από την παρατήρηση του παραπάνω φυλλογενετικού δέντρου προκύπτει ότι ο, υπό

μελέτη, μεταφορέας *sb4YFP* βρίσκεται στον ίδιο κλάδο και στην ίδια διακλάδωση με τον χαρακτηρισμένο μεταφορέα σακχάρων *OsSUT* στο ρύζι (*oryza sativa*). Επίσης, στον ίδιο κλάδο, αλλά σε διαφορετική διακλάδωση, ανήκουν και άλλοι δυο χαρακτηρισμένοι μεταφορείς σακχάρων *OsSUT*.

Τέλος στον ίδιο κλάδο, όπως φαίνεται στο φυλλογενετικό δέντρο, ανήκει και ο δεύτερος υπό μελέτη μεταφορέας *sb6YFP* αλλά σε διαφορετική διακλάδωση, ωστόσο, παρουσιάζει ομολογία με τους τρεις παραπάνω μεταφορείς σακχάρων *OsSUT* στο ρύζι.

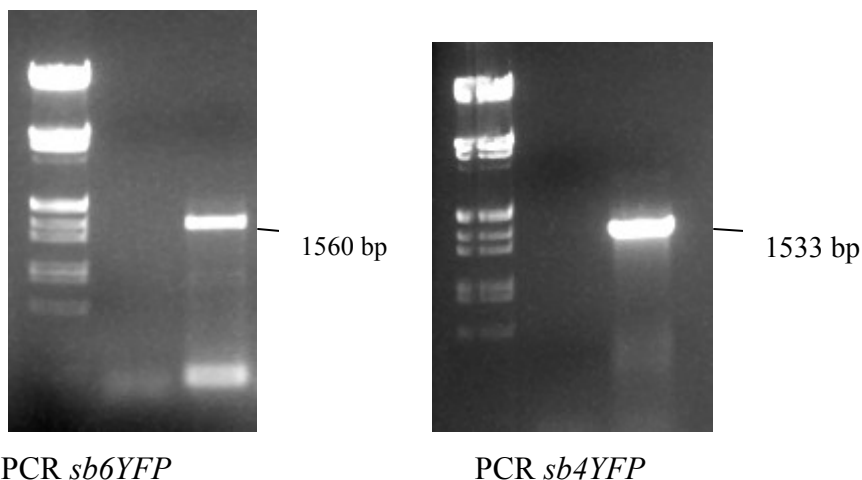
Όσον αφορά τους υπόλοιπους μεταφορείς σακχάρων του φυλλογενετικού δέντρου έχουν ταξινομηθεί σε δυο διαφορετικούς κλάδους, στο φυλλογενετικό δέντρο.

Γ.1.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Τα γονίδια *sb4YFP* και *sb6YFP* απομονώθηκαν/κλωνοποιήθηκαν από τα πλασμίδια/φορείς έκφρασης *XLBluescript1* και οι αλληλουχίες τους ενισχύθηκαν με την PCR και την χρήση των εκκινητών οι οποίοι φέρουν αλληλουχίες αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση *PciI*.

Έτσι, σύμφωνα με τα προϊόντα της αντίδρασης του PCR, το γονίδιο *sb4YFP* έχει μέγεθος 1353 bp και σχηματίζει 511 κωδικόνια (Εικ. Γ.2), ενώ το γονίδιο *sb6YFP* έχει μέγεθος 1560 bp και σχηματίζει 520 κωδικόνια (Εικ. Γ.2).

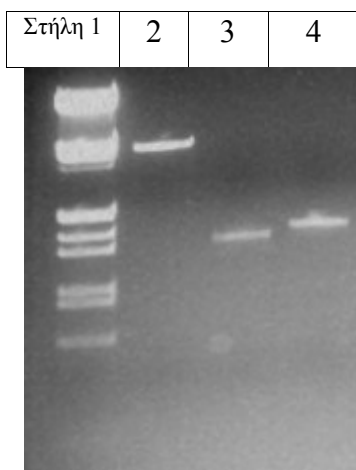
Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε παραλαβή των προϊόντων της PCR από την πηκτή όπως περιγράφεται στην παράγραφο Β.4.2 για να ενισχυθεί η κωδική περιοχή των γονιδίων, τα οποία θα υποβληθούν σε πέψη αργότερα, και τέλος ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR έλαβε χώρα, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Β.5.



Εικόνα Γ.3: Ανάλυση της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης 1%. Στην αριστερή στήλη, της κάθε εικόνας, ο δείκτης των μοριακών βαρών (λDNA/HindIII). Στην δεξιά στήλη το προϊόν της αντίδρασης PCR για τα γονίδια *sb6YFP* και *sb4YFP* αντίστοιχα.

Γ.1.2 Πέψη των κλώνων cDNA του *sb4YFP* και *sb6YFP*

Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων αντίδρασης PCR, τα γονίδια υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης pAVA554. Για να επιτευχθεί η κλωνοποίηση τα προϊόντα της τελευταίας αντίδρασης και ο φορέας έκφρασης υποβλήθηκαν σε διπλή πέψη από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού PciI και NcoI (παράγραφος Β.4.3).



Εικόνα Γ.4: Οι πέψεις έχουν αναλυθεί σε πηκτή αγαρόζης. Παρουσιάζονται τέσσερα δείγματα. Στην πρώτη στήλη, ο δείκτης των μοριακών βαρών (λDNA/HindIII). Στην στήλη 2 η πέψη του φορέα έκφρασης pAVA 554, στην στήλη 3 η πέψη του γονιδίου *sb4YFP* και στην στήλη 4 η πέψη του γονιδίου *sb6YFP*.

Γ.1.3 Αντίδραση λιγοποίησης

Μετά την ολοκλήρωση των πέψεων τα προϊόντα της αντίδρασης και ο φορέας pAVA554 φέρουν κολλώδη άκρα και υποβλήθηκαν σε αντίδραση λιγοποίησης (παράγραφος Β.4.4)

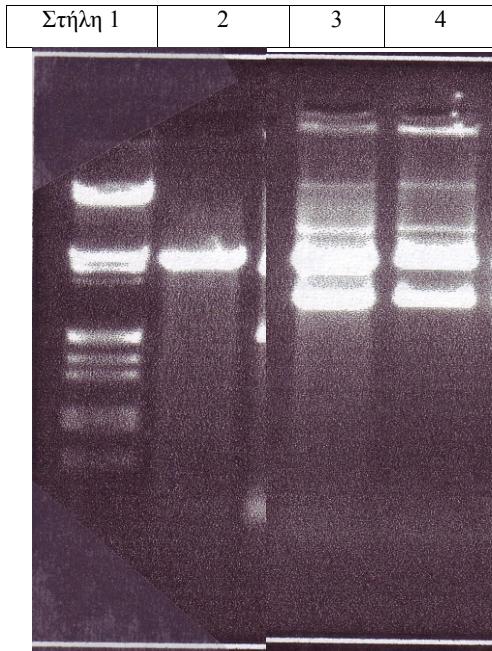
Γ.1.4 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli XlBlue1* με τον φορέα έκφρασης pAVA554[*sb4YFP/sb6YFP*].

Ο φορέας έκφρασης pAVA554, στον οποίο έχουν υποκλωνοποιηθεί τα γονίδια (υπό μελέτη), χρησιμοποιήθηκε για τον μετασηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. Coli Xlblue1* (παράγραφος Β.1). Εν συνεχεία, τα κύτταρα *E. coli* απλώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα LB με καναμυσίνη (100 µg/ml). Η επιλογή των κλώνων που φέρουν το πλασμίδιο έγινε με χρήση του αντιβιοτικού καναμυσίνη, στο οποίο έχει αντίσταση ο προεπιλεγμένος φορέας. Οι κλώνοι αυτοί παρέμειναν στους 37°C κατά την διάρκεια της νύχτας.

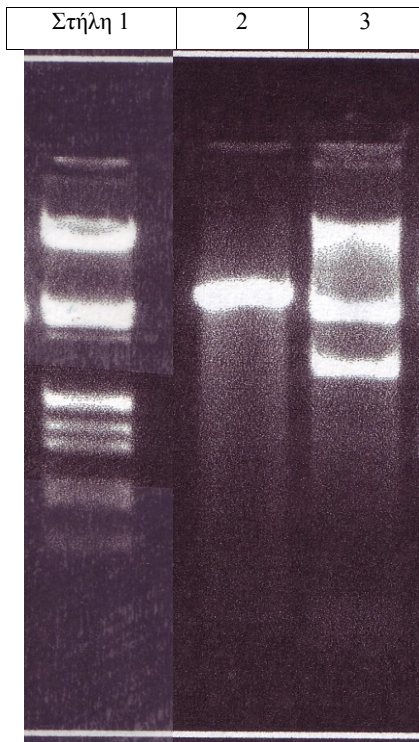
Γ.1.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Από τις αποικίες που αναπτύσσονται, ελήφθησαν δείγματα και αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας των 5ml LB επιλογής ως προς την καναμυσίνη. Μετά πραγματοποιήθηκε πλασμιδιακή απομόνωση με την μέθοδο του βρασμού (παράγραφος Β.3.2) και πέψεις ελέγχου με τα ένζυμα περιορισμού SacI για το πλασμιδιακό DNA που φέρει το γονίδιο *sb4YFP* και BamHI για το πλασμιδιακό DNA που φέρει το γονίδιο *sb6YFP*.

Κάποιες από τις καλλιέργειες που έφεραν την ένθεση, επιλέχθηκαν και η πλασμιδιακή απομόνωση πραγματοποιήθηκε με την βάση το πρωτόκολλο QIAprep Spin Miniprep Kit της QIAGEN.



Εικόνα Γ.5: Οι πέψεις έχουν αναλυθεί σε πηκτή αγαρόζης 1%. Παρουσιάζονται τέσσερα δείγματα. Στην πρώτη στήλη, ο δείκτης των μοριακών βαρών (λ DNA/HindIII), στην στήλη 2 η πέψη του φορέα έκφρασης pAVA 554, και στις στήλες 3 και 4 οι πέψεις του φορέα έκφρασης pAVA 554 που φέρει το γονίδιο *sb4YFP*.



Εικόνα Γ.6: Οι πέψεις έχουν αναλυθεί σε πηκτή αγαρόζης 1%. Στην πρώτη στήλη, ο δείκτης των μοριακών βαρών (λ DNA/HindIII), στην στήλη 2 η πέψη του φορέα έκφρασης pAVA 554, και στην στήλη 3 η πέψη του φορέα έκφρασης pAVA 554 που φέρει το γονίδιο *sb6YFP*.

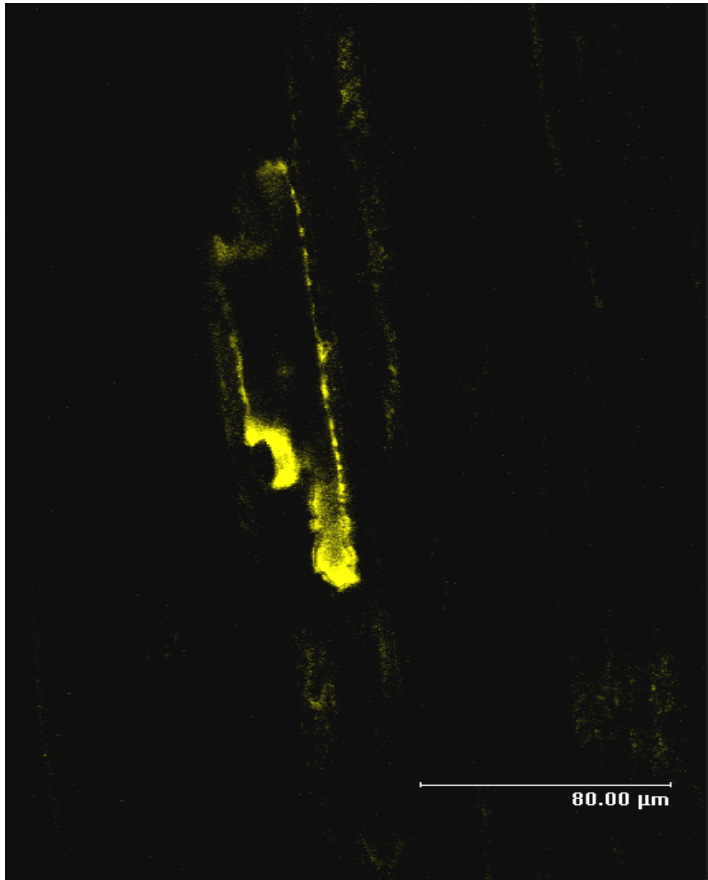
Γ.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός των φορέων σακχάρων

Ο έλεγχος των βομβαρδισμένων φύλλων, 2-4 ώρες μετά τον βομβαρδισμό, του σόργου γίνεται σ' ένα κανονικό μικροσκόπιο με λάμπα UV υπεριώδους (ultraviolet) ακτινοβολίας.

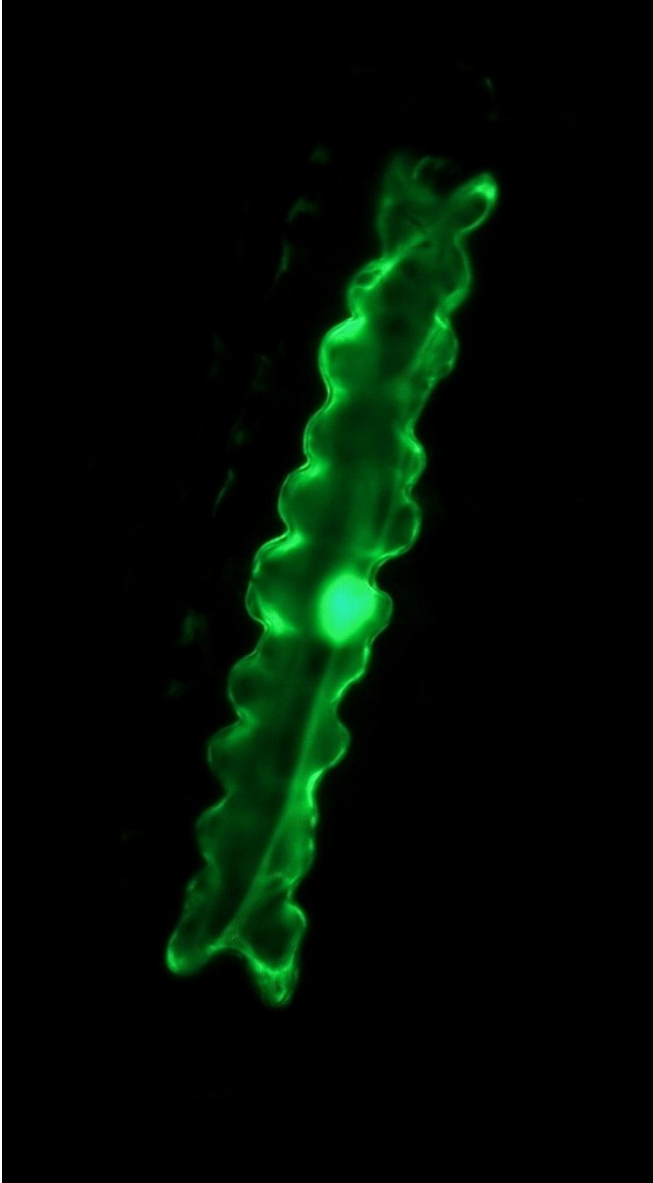
Οι φορείς των σακχάρων εντοπίστηκαν στα “βομβαρδισμένα” φύλλα του σόργου στο συνεστιακό μικροσκόπιο με την παρουσία της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (Εικ. Γ.7), η οποία εκφράζεται από το αντίστοιχο γονίδιο που έχει συντηχθεί με τα γονίδια *sb4YFP* και *sb6YFP* που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες-φορείς.

Πιο συγκεκριμένα, στη εικόνα φαίνεται να υπάρχει κίτρινος φθορισμός περιμετρικά του κυττάρου και είναι πολύ πιο έντονος στην κάτω πλευρά του κυττάρου. Αυτό σημαίνει ότι η πρωτεΐνη-φορέας σακχάρων είναι εντοπισμένη περιμετρικά του κυττάρου στην

πλασματική μεμβράνη και έχει συσσωρευτεί περισσότερο στην κάτω πλευρά του κυττάρου, το οποίο έχει μετασχηματιστεί, όπως φαίνεται στην εικόνα Γ.7. Αντίθετα, στην περίπτωση, στην οποία η YFP πρωτεΐνη εκφράστηκε χωρίς τον μεταφορέα, εντοπίζεται σ' όλο το κύτταρο.



Εικόνα Γ.7: Ανάλυση έκφρασης των ένθετων τμημάτων DNA με σύντηξη της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης και του φορέα sb4YFP (YFP fusion constructs) σε κύτταρα του σόργου. Τα κύτταρα σόργου μετασχηματίστηκαν με τα γονίδια *sb4YFP* και *sb6YFP*.

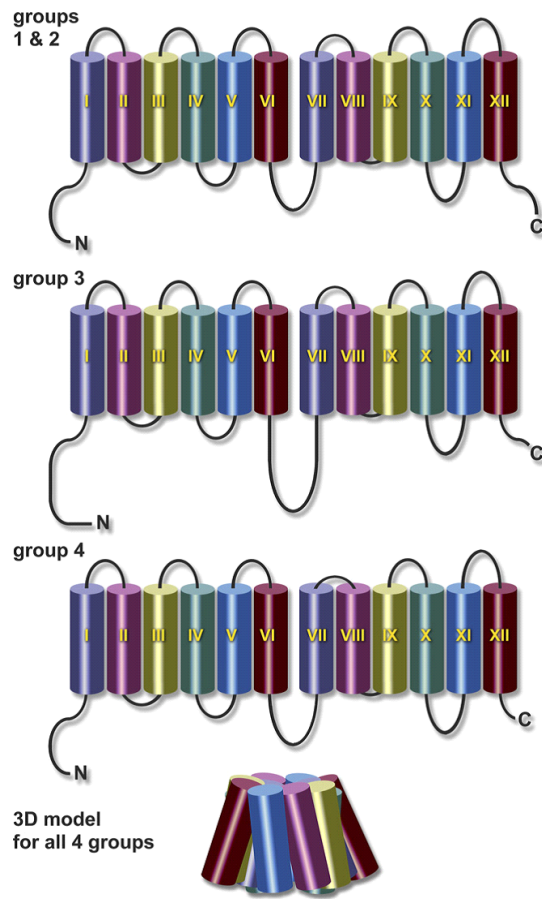


Εικόνα Γ.8: Σχηματική απεικόνιση κυττάρου από φύλλο σόργου το οποίο έχει μετασηματιστεί και εκφράζεται η YFP χωρίς τον μεταφορέα (και είναι ο «μάρτυρας») στην πειραματική διαδικασία.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σ' αυτή την πειραματική εργασία έγινε ο χαρακτηρισμός δύο γονιδίων *sb4YFP* και *sb6YFP* που κωδικοποιούν για δύο αντίστοιχες πρωτεΐνες-μεταφορείς σακχάρων στο σόργο. Ο χαρακτηρισμός τους ως μεταφορείς σακχάρων βασίστηκε στην ομολογία των αλληλουχιών τους με γνωστούς μεταφορείς σακχάρων κατόπιν σύγκρισης των αμινοξικών αλληλουχιών τους.

Όσον αφορά τη δομή των μεταφορέων σακχάρων, αναλύσεις διαφορετικών φυτικών μεταφορέων σακχάρων έδειξαν ότι υπάρχουν δώδεκα διαμεμβρανικές έλικες για όλες τις πρωτεΐνες (Sauer και Stolz, 1994). Μελέτες ανοσοεντοπισμού με ειδικά αντισώματα επιβεβαίωσαν ακόμη και τον προβλεπόμενο αριθμό των διαμεμβρανικών ελικών και απέδειξαν ότι τα τελικά άκρα N- και C- της πρωτεΐνης μεταφορέα στην πλασματική μεμβράνη είναι στην κυτοπλασματική πλευρά της μεμβράνης (Stolz και συν., 1999). Ευθυγραμμίσεις των διαθέσιμων μεταφορέων σακχάρων των φυτών με αλληλουχίες άλλων συμμεταφορέων H⁺-σακχάρων και ευθυγραμμίσεις των πρώτων και δεύτερων μισών αυτών των πρωτεϊνών μεταφορέων σακχάρων υποστήριξαν (i) την συμμετοχή των μεταφορέων σακχάρων των φυτών στην κύρια υπεροικογένεια διευκολυντών και (ii) η υπόθεση ότι τα μέλη αυτής της υπεροικογένειας εξελίχθηκαν από ένα ή περισσότερους προγονικούς μεταφορείς με μόνο έξι διαμεμβρανικές έλικες (Εικ. Δ.1) με διπλασιασμό (DUPLICATION) γονιδίου και σύντηξη (Marger και Saier, 1993).



Εικόνα Δ.1: Δυσδιάστατα μοντέλα για μεταφορείς σακχαρόζης τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές υποομάδες οι οποίες απεικονίζονται στην παραπάνω εικόνα. Το επάνω μοντέλο δίνει την δομή για τον τύπο ομάδας 1 (δικοτυλήδονα) και για τον τύπο ομάδας 2 (μονοκοτυλήδονα) μεταφορέων σακχάρων των πλασματικών μεμβρανών. Το δεύτερο μοντέλο δείχνει την προβλεπόμενη δυσδιάστατη δομή μεταφορέων σακχάρων των πλασματικών μεμβρανών ομάδας τύπου 3, και το τελευταίο μοντέλο δίνει την δομή για την ομάδα (τύπου 4) μεταφορέων σακχάρων του τονοπλάστη. Οι διαμεμβρανικές έλικες απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα. Όμοια χρώματα χρησιμοποιήθηκαν για τις αντίστοιχες διαμεμβρανικές έλικες των πρώτων και δεύτερων μισών για να επισημανθούν οι ενδομοριακές συντηρήσεις αλληλουχίας. Οι κύριες διαφορές μεταξύ μεταφορέων σακχάρων των διαφορετικών ομάδων είναι εκτός των περιοχών των αλληλουχιών τους που διαπερνούν την μεμβράνη.

Αυτή η πληροφορία χρησιμοποιήθηκε για να σχεδιάσουμε και να συγκρίνουμε δυσδιάστατα μοντέλα μεταφορέων σακχάρων των τεσσάρων διαφορετικών ομάδων. Οι πιο προφανείς διαφορές εντοπίστηκαν στις κατασκευές (domains) του τελικού άνθρακα (-C) και της τελικής αμινομάδας (-N) των μεταφορέων και στους βρόγχους οι οποίοι

συνδέουν τις διαμεμβρανικές έλικες VI και VII (κεντρικός κυττοπλασματικός βρόγχος) ή τις έλικες VII VIII (οι οποίες προβλέπονται να βρίσκονται στον εξωκυτταρικό χώρο στους εντοπισμένους φορείς στην πλασματική μεμβράνη και μέσα στο χυμοτόπιο στους μεταφορείς των τονοπλαστών). Το 15-20 % του ήδη αναφερομένου υψηλότερου αριθμού αμινοξέων στην ομάδα μεταφορέων τύπου-3 μπορεί ν' αποδοθεί, σχεδόν εξολοκλήρου, σ' ένα επιμηκυμένο τελικό άκρο -N (περίπου 20 αμινοξέα) και σ' ένα μεγεθυμένο κυττοπλασματικό βρόγχο (περίπου 60 αμινοξέα). Επιπλέον τα τελικά άκρα άνθρακα (-C) αυτών των μεταφορέων της ομάδας τύπου-3 είναι ελάχιστα πιο μικρά από αυτά των μεταφορέων της ομάδας τύπου-1 και ομάδας τύπου-2. Οι προβλεπόμενοι μεταφορείς χυμοτοπίων της ομάδας 4 έχουν τα μικρότερα τελικά άκρα άνθρακα και μια πολύ μικρή αλληλουχία σύνδεσης μεταξύ των διαμεμβρανικών ελικών VII και VIII. Επομένως, η ομάδα μεταφορέων τύπου-4 συνήθως έχει την μικρότερη αλληλουχία πεπτιδίων απ' όλα τα μέλη οικογένειας των μεταφορέων σακχαρόζης ενός φυτικού είδους.

Η ομοιότητα των διαθέσιμων κρυσταλλικών κατασκευών από άλλα μέλη της κύριας υπεροικογένειας διευκολυντών (LacY [Abramson και συν., 2003] και GlpT [Huang και συν., 2003]) μας επιτρέπει να προτείνουμε ένα μοντέλο των διαμεμβρανικών ελικών των φυτικών μεταφορέων σακχαρόζης για τον τρόπο με τον οποίο είναι διευθετημένες στην πλασματική μεμβράνη ή στον τονοπλάστη. Από τις δημοσιευμένες κατασκευές των LacY και GlpT μπορεί να συναχθεί ότι οι διαμεμβρανικές έλικες I, IV, VII και X σχηματίζουν μία κατασκευή τύπου κλεψύδρας η οποία σχηματίζει ένα υποστρώματος ο οποίος περιβάλλεται από άλλες οκτώ έλικες. Υποθέτοντας ότι οι φυτικοί μεταφορείς σακχαρόζης μπορεί να έχουν μία παρόμοια δομή, ειδικά, ότι οι ίδιες διαμεμβρανικές έλικες εμπλέκονται στον σχηματισμό πόρου, ένα άτεχνο “μοντέλο εργασίας” για περαιτέρω δομικές αναλύσεις μπορεί να εξαχθεί (Εικ. Δ.1, βάση).

Σύμφωνα με μελέτες (Kühn και συν., 1997), οι φορείς σακχάρων εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων των ηθμοδών στοιχείων, τα οποία έχουν προκύψει από ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των γειτονικών συνοδών κυττάρων. Επιπλέον, ένα μέρος των εκφραζόμενων πρωτεϊνών φτάνει στον προορισμό του στην πλασματική μεμβράνη, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό των μορίων της πρωτεΐνης-φορέα παραμένει μέσα στο κύτταρο (Kühn και συν., 1999) και είναι εντοπισμένο περιμετρικά της πυρηνικής μεμβράνης, εξωτερικά σχηματίζοντας ένα δακτύλιο. Τέλος, η πρωτεΐνη-φορέας δεν έχει

βρεθεί μόνο σε δευτερογενείς νευρώσεις των φύλλων (φυτικοί ιστοί-πηγές), αλλά και σε στελέχη των φυτών και σε ρίζες.

Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν μέσω της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έδειξαν στις πέψεις ότι τα πλασμίδια φέρουν τα γονίδια που πιθανά κωδικοποιούν για μεταφορείς σακχάρων. Στην συνέχεια, με την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA παρατηρούμε ότι ο μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli*, με τον φορέα pAVA554 (που φέρει τις ενθέσεις), ήταν επιτυχής.

Κατά τη διαδικασία της βαλλιστικής μεθόδου, η οποία έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι τα νεαρά φυτά σόργου ηλικίας 15 ημερών αποτελούν κατάλληλο φυτικό υλικό για το πείραμα και αυτό μας δίνει την δυνατότητα να πραγματοποιήσουμε τέτοιες ερευνητικές μελέτες σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ακόμη, οι μικρομεταφορείς του χρυσού που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν θετικά αποτελέσματα στον μετασχηματισμό των φύλλων σόργου και συνεπώς μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό των φύλλων σόργου με την βαλλιστική μέθοδο.

Τέλος, ο έλεγχος των “βομβαρδισμένων” φύλλων, 2-4 ώρες μετά τον “βομβαρδισμό”, γίνεται σ' ένα κανονικό μικροσκόπιο με λάμπα UV υπεριώδους ακτινοβολίας, και απ' αυτό συμπεραίνουμε όπτι είναι μια γρήγορη διαδικασία και μπορούμε να δούμε τ' αποτελέσματα μέσα στην ίδια την ημέρα, οπότε μπορούμε να επαναλάβουμε το πείραμα για να εξετάσουμε (ή να μελετήσουμε) και άλλους πιθανούς μεταφορείς σακχάρων.

Επιπλέον, με το συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) μπορούμε να εντοπίσουμε σε ποιο σημείο στο κύτταρο βρίσκονται οι μεταφορείς σακχάρων π.χ. στην πλασματική μεμβράνη ή σε κάποιο οργανίδιο.

Στα περισσότερα φυτικά είδη, η σακχαρόζη είναι το κύριο προϊόν της αφομοίωσης του άνθρακα και η κύρια ένωση του άνθρακα που μεταφέρεται. Η κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της μεταφοράς των σακχάρων και κυρίως της σακχαρόζης πρόοδευσε με την απομόνωση του πρώτου φυτικού μεταφορέα σακχαρόζης από το σπανάκι (Riesmeier και συν. 1992). Από τότε μεταφορείς σακχάρων έχουν χαρακτηριστεί σε πολλά φυτικά είδη, συμπεριλαμβανομένου μονοκοτυλήδων και δικοτυλήδων φυτών. Οι αλληλουχίες αυτών των μεταφορέων είναι υψηλά συντηρημένες και ομαδοποιούνται με βάση την κοινή δομή (και διαμορφώνονται με την

συντηρημένη δομή) για μέλη της Κύριας Οικογένειας Διευκολυντών (Major Facilitator Superfamily, MFS, Marger και Saier 1993).

Σ' αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί, όπως πρόσφατα αποδείχθηκε, ότι η περιεκτικότητα σακχάρων σε στελέχη ζαχαροκάλαμου θα μπορούσε να διπλασιαστεί χωρίς καμία επίπτωση στην ανάπτυξη του φυτού, απεικονίζοντας το δυναμικό της μεγάλης τροποποίησης των διαδρομών κατανομής του άνθρακα (Wu και Birch, 2007). Πρόσθετα, η υπερσυσσώρευση των υδρογονανθράκων στα φύλλα καλαμποκιού επανακατηύθηνε σημαντικές ποσότητες άνθρακα στην κελουλόζη, στο κυτταρικό τοίχωμα (Baker και Braun, 2008). Αυτά τα παραδείγματα υποδεικνύουν ότι υπάρχουν μεγάλες ευκαιρίες στην διαχείριση των πορειών κατανομής του δεσμευμένου άνθρακα στα αγρωστώδη. Τέλος, θα πρέπει να μελετηθούν οι γενετικοί μηχανισμοί και τα σημεία ελέγχου, τα οποία ρυθμίζουν την κατανομή υδρογονανθράκων στα φυτά.

Η βιολογία της συσσώρευσης σακχάρων δεν είναι σημαντική μόνο αγρονομικά, αλλά, επίσης εξασφαλίζει ένα ενδιαφέρον φυσιολογικό σύστημα για την μελέτη της κατανομής των υδρογονανθράκων. Για να σχεδιάσουμε στρατηγικές για την διαχείριση της συσσώρευσης των σακχάρων, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που περιορίζουν την διαδικασία (Grof και Campbell, 2001). Οι μεταφορείς που ρυθμίζουν την κίνηση των σακχάρων δια μέσου των μεμβρανών είναι πιθανόν σημεία ελέγχου στο μονοπάτι και αυτός αποτελεί έναν από τους μελλοντικούς στόχους στην έρευνα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R. and Iwata, S.** Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*? *Science* (2003), 610–615.
- S. Aluri and M. Büttner**, Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (2007), pp. 2537–2542
- Baker RF, Braun DM** *tie-dyed2* functions with *tie-dyed1* to promote carbohydrate export from maize leaves. *Plant Physiol* **146** (2008): 1085–1097
- L. Barker, C. Kuhn, A. Weise, A. Schulz, C. Gebhardt, B. Hirner, H. Hellmann, W. Schulze, J.M. Ward and W.B. Frommer**, SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements, *Plant Cell* **12** (2000), pp. 1153–1164.
- K.J. Boorer, D.D. Loo and E.M. Wright**, Steady-state and presteady-state kinetics of the H⁺/hexose cotransporter (STP1) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Xenopus* oocytes, *J. Biol. Chem.* **269** (1994), pp. 20417–20424.
- Braun DM, Slewinski TL**. Genetic control of carbon partitioning in grasses: Roles of *Sucrose Transporters* and *Tie-dyed* loci in phloem loading. *Plant Physiol.*, 2009, **149**: 71–81.
- M. Büttner**, The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*, *FEBS Lett.* **581** (2007), pp. 2318-2324.
- Γαλάτης, Β., Π. Αποστολάκος, και Χ. Κατσαρός**. 1995. Εισαγωγή στην Βοτανική. Σταμούλης, Αθήνα-Πειραιάς. ISBN 9060-351-049-1.
- Γαλάτης, Β., Δ. Γανωτάκης, Κ. Γκανή-Σπυροπούλου, Γ. Καραμπουρνιώτης, Κ. Κοτζαμπάσης, Ελ.-Ι. Κωσταντινίδου, Ι. Μανέτας, Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη:** ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ Από το μόριο στο περιβάλλον. 2003. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Carter, S. Pan, J. Zouhar, E.L. Avila, T. Girke and N.V. Raikhel**, The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins, *Plant Cell* **16** (2004), pp. 3285–3303.

- S. Chauhan, N. Forsthoefel, Y. Ran, F. Quigley, D.E. Nelson and H.J. Bohnert**, Na⁺/myo-inositol symporters and Na⁺/H⁺-antiport in *Mesembryanthemum crystallinum*, *Plant J.* **24** (2000), pp. 511–522.
- T.J. Chiou and D.R. Bush**, Molecular cloning, immunochemical localization to the vacuole, and expression in transgenic yeast and tobacco of a putative sugar transporter from sugar beet, *Plant Physiol.* **110** (1996), pp. 511–520.
- Cohen S.N., Chang A.C.Y. and Hsu L.**, (1972), “Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor DNA”, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **69**, pp. 2110-2114.
- Cronshaw, J.** 1981. Phloem structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**: 465-484.
- Δεληβόπουλος, Σ.** 1994. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΦΥΤΩΝ. Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη. ISBN 960-317-015-1.
- A. Endler, S. Meyer, S. Schelbert, T. Schneider, W. Weschke, S.W. Peters, F. Keller, S. Baginsky, E. Martinoia and U.G. Schmidt**, Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach, *Plant Physiol.* **141** (2006), pp. 196–207.
- Gamalei, Y.** (1989). Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. *Trees* **3**, 96 – 110.
- Grof CPL, Campbell JA**, Sugarcane sucrose metabolism: scope for molecular manipulation. *Aust J Plant Physiology.* **28** (2001): 1-12.
- Hall, J. and D.A. Baker.** 1996. Transport of photoassimilates. *J. Exp. Bot.* **47**: 1119-1333.
- Henderson, P.J.F.** (1990). Proton linked sugar transport systems in bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* **22**, 525-569.
- Holmes D.S. and Quingley M.**, (1981), “A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids”, *Anal. Biochem.*, **114**, pp. 193-197.
- Huang, Y., Lemieux, M.J., Song, J., Auer, M. and Wang, D.N.** (2003) Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* **301**,

616–620.

- T. Kiyosue, H. Abe, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki**, ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of Arabidopsis, encodes a putative sugar transporter, *Biochim. Biophys. Acta* **1370** (1998), pp. 187–191.
- Y.S. Klepek, D. Geiger, R. Stadler, F. Klebl, L. Landouar-Arsivaud, R. Lemoine, R. Hedrich and N. Sauer**, Arabidopsis polyol transporter5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose, *Plant Cell* **17** (2005), pp. 204–218.
- Knoblauch, M. and A.J.E. van Bel.** (1998). Sieve tubes in action. *Plant Cell* **10**: 35-50.
- Kühn, C., Franceschi, V.R., Schulz, A., Lemoine, R., and Frommer, W.B.** (1997). Localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements indicate macromolecular trafficking. *Science* **275**, 1298–1300.
- Kühn, C., Barker, L., Bürkle, L., and Frommer, W.B.** (1999). Update on sucrose transport in higher plants. *J. Exp. Bot.* **50**: 935-953.
- Lalonde, S., E. Boles, H. Hellman, L. Barker, J.W. Patrick, W.B. Frommer, and J.M. Ward.** (1999). The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell* **11**: 707-726.
- Lu, J.M.Y., and Bush, D.R.** (1998). His-65 in the proton-sucrose symporter is an essential amino acid whose modification with site-directed mutagenesis increases transport activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 9025–9030.
- Marger M., and Saier, Jr.M.** (1993). A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in Biochemical Science.* **18**, 13-20.
- N. Noiraud, L. Maurousset and R. Lemoine**, Transport of polyols in higher plants, *Plant Physiol. Biochem.* **39** (2001), pp. 717–728.
- N. Noiraud, L. Maurousset and R. Lemoine**, Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem, *Plant Cell* **13** (2001), pp. 695–705.
- B.F. Quirino, W.D. Reiter and R.D. Amasino**, One of two tandem Arabidopsis genes

homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated, *Plant Mol. Biol.* **46** (2001), pp. 447–457.

Oparka, K.J. and R. Turgeon. 1999. Sieve elements and companion cells-Traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* **11**: 739-750.

Patrick, J.W. 1997. Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 191-222.

Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* **11** (1992): 4705-13.

A. Reinders, J.A. Panshyshyn and J.M. Ward, Analysis of transport activity of Arabidopsis sugar alcohol permease homolog AtPLT5, *J. Biol. Chem.* **280** (2005), pp. 1594–1602.

N. Sauer, K. Friedlander and U. Graml-Wicke, Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*, *EMBO J.* **9** (1990), pp. 3045–3050.

Sauer, N. and Stolz, J. (1994) SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine tagged protein. *Plant J.* **6**, 67–77.

S. Schneider, A. Schneidereit, K.R. Konrad, M.R. Hajirezaei, M. Gramann, R. Hedrich and N. Sauer, Arabidopsis inositol transporter4 mediates high-affinity H⁺ symport of myoinositol across the plasma membrane, *Plant Physiol.* **141** (2006), pp. 565–577.

S.M. Sherson, G. Hemmann, G. Wallace, S. Forbes, V. Germain, R. Stadler, N. Bechtold, N. Sauer and S.M. Smith, Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 plays a major role in uptake and response of Arabidopsis seeds and seedlings to sugars, *Plant J.* **24** (2000), pp. 849–857.

Taiz, L. and E. Zeiger. 1998. *Plant Physiology*. Second Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. ISBN 0-87893-831-1.

Van Bel, A.J.E.. Strategies of phloem loading. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.*

Biol. **44** (1993): 253-281.

A. Weber, J.C. Servaites, D.R. Geiger, H. Kofler, D. Hille, F. Groner, U. Hebbeker and U.I. Flugge, Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator, *Plant Cell* **12** (2000), pp. 787–802.

Wu L, Birch RG Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. *Plant Biotechnol J* **5** (2007): 109–117

