



Γ Ε Ω Π Ο Ν Ι Κ Ο Π Α Ν Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Ι Ο Α Θ Η Ν Ω Ν

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

“Βιοχημική μελέτη της καλλογένεσης στο
φυτό *Arabidopsis thaliana* με σκοπό τη
βελτιστοποίηση του συστήματος
καλλιέργειας ώστε να επάγεται η
σωματική εμβρυογένεση”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ-ΜΑΡΙΑΣ ΧΡΙΣΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2012

Το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής μελέτης «Βιοχημική μελέτη της καλλογένεσης στο φυτό *Arabidopsis thaliana* με σκοπό τη βελτιστοποίηση του συστήματος καλλιέργειας ώστε να επάγεται η σωματική εμβρυογένεση» και η τριμελής εξεταστική επιτροπή εγκρίθηκαν με την απόφαση 4/27-11-2012 της γενικής συνέλευσης ειδικής σύνθεσης του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας .

Την τριμελή εξεταστική επιτροπή απαρτίζουν τα μέλη:

- Κίντζιος Σπυρίδων, Καθηγητής (επιβλέπων)
- Φασσέας Κωνσταντίνος, Καθηγητής
- Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες
Abstract
Περίληψη

A.Εισαγωγή	7-33
A.1 Κυτταροϊστοκαλλιέργεια φυτών	7
A.1.1 Οι παράμετροι στην Κυτταροϊστοκαλλιέργεια φυτών	9
A.1.2 Οι μέθοδοι στην Κυτταροϊστοκαλλιέργεια φυτών	12
A.1.2.1 Καλλιέργεια κάλλων	12
A.1.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων	13
A.1.2.3 Καλλιέργεια εμβρύων	15
A.1.2.4 Καλλιέργεια οργάνων	15
A.1.3 Σωματική εμβρυογένεση	16
A. 1.3.1 Το οξειδωτικό στρες ως παράγοντας που διεγείρει τον σχηματισμό σωματικών εμβρύων	19
A.1.3.2 Το μονοξειδίο του αζώτου ως μόριο μεταγωγής σήματος	20
A.2 Η οξειδωτική καταπόνηση στα κύτταρα	24
A.2.1 Μηχανισμοί δράσης και παρενέργειες των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS)	25
A.2.1.1 Η δράση των ROS σε λιπίδια	26
A.2.1.2 Η δράση των ROS σε πρωτεΐνες	26
A.2.1.3 Η δράση των ROS σε νουκλεϊκά οξέα	26
A.2.2 Αντιοξειδωτικά συστήματα και στρατηγικές αντιμετώπισης της οξειδωτικής καταπόνησης	27
A.2.2.1 Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)	28
A.2.2.2 Γλουταθειόνη	28
A.2.2.3 Ασκορβικό οξύ	28
A.2.2.4 α-Τοκοφερόλη	29
A.2.2.5 Καροτένια	29
A.3 Το φυτικό υλικό	30
A.3.1 Το φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
A.3.2 Το φυτό <i>Lemna minor</i>	32
B. Πειραματική διαδικασία- Υλικά και μέθοδοι	34-42
B.1.1 Σκοπός εργασίας	34
B.1.2 Περιγραφή πειράματος	34
B.2 Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων	35
B.2.1 Παρασκευή θρεπτικού μέσου B5 Gamborg για επαγωγή καλλογένεσης	35
B.2.2 Παρασκευή θρεπτικού μέσου MS για επώαση σπερμάτων <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
B.2.3 Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος Hoagland	38
B.2.4 Παρασκευή υγρού θρεπτικού διαλύματος προμεταχείρισης	38
B.2.5 Απολύμανση εκφύτων	38
B.3 Βιοχημικές μετρήσεις	39
B.3.1 Μέτρηση οξείδωσης λιπιδίων στους ιστούς μέσω μέτρησης της MDA	39

B.3.2 Μέτρησης τις ολικής γλουταθειόνης και προσδιορισμός του λόγου ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης	40
B.3.3 Προσδιορισμός ενεργότητας της SOD	41
B.4 Μετρήσεις pH, αγωγιμότητας και συγκέντρωσης νιτρικών στα θρεπτικά διαλύματα προμεταχείρισης ιστών	42
B.5 Μακροσκοπικές και μικροσκοπικές παρατηρήσεις των ιστών	42
Γ. Αποτελέσματα	43-67
Γ.1 Βιοχημικές αναλύσεις	43
Γ.1.1 Οξείδωση λιπιδίων	43
Γ.1.2 Γλουταθειόνη	46
Γ.1.3 Σχετική ενεργότητα SOD	49
Γ.2 Αναλύσεις των διαλυμάτων προμεταχείρισης	53
Γ.2.1 Μέτρηση pH	53
Γ.2.2 Μέτρηση αγωγιμότητας	55
Γ.2.3 Μέτρηση νιτρικών	60
Γ.3 Μακροσκοπικές και μικροσκοπικές παρατηρήσεις των ιστών	63
Γ.3.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
Γ.3.2 <i>Lemna minor</i>	67
Δ. Συζήτηση	68-80
Δ.1 Αποτελέσματα- Συζήτηση	69
Δ.1.1 Οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών	70
Δ.1.2 Η επίδραση των φυσικοχημικών παραμέτρων των διαλυμάτων προμεταχείρισης.	79
Βιβλιογραφία	81

Ευχαριστίες

«Χαίρε πέτρα ποτίσασα τους διψώντας την ζωή
Χαίρε ελπίς αγαθών αιωνίων»

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών υπό την άμεση επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κίντζιου Σπυρίδωνος στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

Στο σημεία αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Κίντζιο Σπυρίδωνα για την επιλογή του θέματος, το συνεχές ενδιαφέρον του για την εξέλιξη της εργασίας και για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους αλλά και της συγγραφής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Φασσέα Κωνσταντίνο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ.Φλεμετάκη Εμμανουήλ.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη υποψήφια διδάκτορα κα. Ευαγγελία Φλαμπούρη για την πολύτιμη καθοδήγηση καθώς και για το ενδιαφέρον και την καθοριστική συμβολή της στην ολοκλήρωση της μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης θερμά όλα τα μέλη της ομάδας Κυτταροϊστοκαλλιέργειας του Εργαστηρίου και του Εργαστηρίου Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος του τμήματος επιστήμης φυτικής παραγωγής που με τις γνώσεις και τη φιλικότητα τους συνέβαλαν στη δημιουργία ενός ευχάριστου και φιλικού κλίματος εργασίας.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τους φίλους για την αμέριστη συμπαράστασή τους, την αγάπη και την εμπιστοσύνη που δείχνουν στο πρόσωπό μου.

Abstract

In several in vitro cultures it is possible that embryos be developed from somatic cells either directly from organised tissue or indirectly from callus. This procedure is called somatic embryogenesis and requires the induction of proper conditions so that the tissue can reprogram itself and gets somatic embryos developed. Although it's hard to say which conditions are proper but data in literature illustrates that pre-treatment in culture media with stress factors can lead to somatic embryogenesis. The aim of this study is to survey if and how the callus pre-treatment with mannitol, citric acid and spermine leads to somatic embryos or relative structures. The concept is to keep the concentration of chemical compounds standard at 1mM for each while changing the time of exposing. The timeline that was kept in this experiment was 1h, 6h, 12h, and 24h and the tissues that were used was callus from *Arabidopsis thaliana* and plantlets of *Lemna minor*.

To measure the intensity of each stressor three biochemical measurements were run, first lipid oxidation via MDA concentration measurement, second estimation of total glutathione and the ratio of reduced to oxidized glutathione and third the relative activity of SOD via measuring NBT absorbance. Also for the pre-treatment solutions the data about pH and conductivity variance was kept during the time of exposing so that their influence at the tissues can be defined. Finally a differentiated system such as the aquatic plant *Lemna minor* was used to compare their interaction with liquid media according to the callus's interaction with it. In parallel, the concentration of nitrites in the solutions was measured as an indirect determination of nitric oxide in the tissues. After the pre-treatment, *A. thaliana* callus and *Lemna minor* plantlets were put on solid media with 4,5µM 2,4 D. After three weeks of culture on these media, macroscopic and microscopic observations were taking place every 5 days examining the structure relating to somatic embryogenesis.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να μελετηθεί η συσχέτιση της σωματικής εμβρυογένεσης με ορισμένες καταστάσεις καταπόνησης των ιστών. Σε κάλλους του *Arabidopsis thaliana* ύστερα από προμεταχείρισή τους σε υγρό θρεπτικό διάλυμα χωρίς φυτορμόνες αλλά με τις ουσίες κιτρικό οξύ, μαννιτόλη και σπερμίνη ως παράγοντες επαγωγής καταπόνησης έγινε μια σειρά από βιοχημικές αναλύσεις. Κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση των παραπάνω ουσιών αλλά μεταβάλλοντας τη χρονική διάρκεια της έκθεσης στην καταπόνηση μετρήθηκαν η έκταση της οξειδωσης λιπιδίων, ο λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη και η ενεργότητα του ενζύμου της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Επίσης στα προσχεδιασμένα χρονικά διαστήματα τα οποία είναι 1, 6, 12 και 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό, μετρήθηκαν το pH και η αγωγιμότητα των διαλυμάτων προμεταχείρισης καθώς επίσης και η συγκέντρωση των νιτρωδών σε αυτά ώστε να γίνει έμμεση εκτίμηση της παρουσίας του NO στους ιστούς. Παράλληλα και με βάση τον ίδιο σχεδιασμό έγιναν οι αντίστοιχες μετρήσεις χρησιμοποιώντας αντί για κάλλους φυτάρια του υδροχαρούς είδους *Lemna minor* ώστε μέσω της συγκριτικής παρουσίας τους να εκτιμηθεί η αλληλεπίδραση των κάλλων του *Arabidopsis thaliana* με το θρεπτικό μέσο προμεταχείρισης.

Κατά τις μακροσκοπικές και μικροσκοπικές παρατηρήσεις της μετέπειτα καλλιέργειας των ιστών σε στερεό υπόστρωμα τα αποτελέσματα συγκρινόμενα με τον μάρτυρα έδειξαν μια σχετικά μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης εμβρυονικών κάλλων στον χειρισμό με τη μαννιτόλη. Όσο αφορά τις μετρήσεις για τις φυσικοχημικές ιδιότητες των διαλυμάτων προμεταχείρισης είναι δυνατόν να χωριστούν σε δύο μέρη. Από τη μια μεριά αυτό που φαίνεται να ερμηνεύει την ροπή ορισμένων κυττάρων προς την εγκατάσταση του εμβρυακού προτύπου γονιδιακής έκφρασης και από την άλλη τα δεδομένα που περιγράφουν την αλληλεπίδραση των ιστών με το υγρό θρεπτικό μέσο.

A. Εισαγωγή

A.1 Κυτταροϊστοκαλλιέργεια φυτών

Τα σπερματόφυτα, τόσο τα γυμνόσπερα όσο και τα αγγειόσπερμα (*Taiz and Zeiger 2010*), πέρα από την εγγενή αναπαραγωγή, δύνανται να ακολουθήσουν και τον αγενή τρόπο πολλαπλασιασμού. Σε αυτή την πορεία ο οργανισμός αναπαράγεται χωρίς την απαραίτητη σύντηξη των γαμετικών κυττάρων, δηλαδή τη γονιμοποίηση του άνθους την ανάπτυξη του καρπού και ακολούθως την δημιουργία και ωρίμανση των σπερμάτων. Κατά τον εγγενή πολλαπλασιασμό, όχι μόνο στα φυτά αλλά γενικά στη φύση, η ένωση δύο γαμετικών κυττάρων αυξάνει την γενετική ποικιλομορφία και συμβάλει θετικά στη διαδικασία της εξέλιξης των ειδών. Αντιθέτως στον αγενή πολλαπλασιασμό τα άτομα που προκύπτουν είναι γενετικώς πανομοιότυπα με τον αρχικό οργανισμό. Βέβαια η μείωση της γενετικής ποικιλομορφίας είναι ένας λόγος που εξηγεί γιατί στους ανώτερους οργανισμούς έχει επικρατήσει η εγγενής αναπαραγωγή.

Όπως λοιπόν αναφέρθηκε στην αρχή, **ο αγενής πολλαπλασιασμός δίνει άτομα γενετικά πανομοιότυπα με τον αρχικό οργανισμό έτσι λοιπόν σε καλλιεργούμενα φυτά που είναι επιθυμητή αυτή η γενετική ομοιογένεια η αγενής αναπαραγωγή είναι ένας ενδεδειγμένος τρόπος πολλαπλασιασμού**. Γι' αυτό το λόγο πολλές έρευνες έχουν εστιαστεί στην ανάπτυξη μεθόδων για τον αγενή πολλαπλασιασμό των φυτών. Η χρήση μοσχευμάτων, καταβολάδων, παραφυάδων, βολβών ή κονδύλων είναι ορισμένες μέθοδοι που χρησιμοποιούν οι καλλιεργητές για την εφαρμογή της μονογονικής αναπαραγωγής (*Ολυμπίου 2001*). Οι μέθοδοι αυτοί στηρίζονται στην ικανότητα των φυτών για **βλαστητική αναπαραγωγή**, δηλαδή να αναπτυχθεί ένα νέο άτομο από έναν κατάλληλο ιστό λόγω αναγέννησης. Η δυνατότητα για αναγέννηση στα φυτά παρέχεται από ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της φυσιολογίας των φυτικών κυττάρων και ονομάζεται **ολοδυναμία**. Τα ολοδύναμα κύτταρα είναι αυτά που όταν βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν να δώσουν έναν ολόκληρο οργανισμό, μια χαρακτηριστική κατηγορία τέτοιων κυττάρων είναι τα μεριστωματικά τα οποία συγκροτούν τον μεριστωματικό ιστό.

Σε όλα τα ανώτερα φυτά υπάρχει μεριστωματικός ιστός. Αποτελεί τον λιγότερο διαφοροποιημένο φυτικό ιστό και βρίσκεται στα σημεία ανάπτυξη του φυτού καθώς επίσης συγκροτείται από κύτταρα τα οποία διατηρούν την ικανότητά τους να διαιρούνται μιτωτικά (*Αιβαλάκης και συνεργάτες 2005*). Κύτταρα τα οποία χαρακτηρίζονται από μικρό βαθμό διαφοροποίησης και απαρτίζουν τη δομή μόνιμων ιστών, όπως για παράδειγμα τα παρεγχυματικά είναι δυνατόν να εισέρθουν σε διαδικασία

αποδιαφοροποίησης. Το αρχικό κύτταρο υπόκειται σε μιτωτικές διαιρέσεις μέσα στα όρια του κυτταρικού τοιχώματος και τα προκύπτοντα θυγατρικά κύτταρα, που διαθέτουν τη δομή και τις ιδιότητες των μεριστωματικών κυττάρων, στη συνέχεια διαφοροποιούνται παράγοντας νέους ιστούς και όργανα.

Η ολοδυναμία σε συνδυασμό με την ικανότητα για αποδιαφοροποίηση και εκ νέου διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων αποτελούν την βάση στην οποία στηρίζεται η θεωρία της ιστοκαλλιέργειας των φυτών (Davey & Anthony 2009). Αυτός ο όρος καλύπτει όλο το εύρος των τεχνικών που χρησιμοποιούνται στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών όπως είναι, η καλλιέργεια κάλλων, μεριστωμάτων, ανθέρων, πρωτοπλαστών, εμβρύων και οργάνων. Σε επίπεδο εργαστηρίου η ιστοκαλλιέργεια προσφέρει στους επιστήμονες πολύ χρήσιμα εργαλεία για την μελέτη και βελτίωση φυτικών ειδών ενώ χρησιμοποιείται και σε εμπορική κλίμακα καθώς έτσι αυξάνεται η ταχύτητα με την οποία παράγονται νέα φυτά, εξασφαλίζεται η γενετική ομοιογένεια όπου αυτή είναι επιθυμητή επίσης ελαχιστοποιείται η μετάδοση μολυσματικών ασθενειών. Αυτό συμβαίνει γιατί η απολύμανση των ιστών και η διατήρηση ασηπτικών συνθηκών είναι ένα κρίσιμο σημείο για την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας.

Η μεθοδολογία που ακολουθείται στην ιστοκαλλιέργεια ή αλλιώς την *in vitro* καλλιέργεια φυτών, περιλαμβάνει συνοπτικά τα εξής βήματα: πρώτον προετοιμασία, επεξεργασία μητρικού φυτού, δεύτερον την επιλογή του κατάλληλου εκφύτου και την επαγωγή της καλλιέργειας, τρίτον πολλαπλασιασμός κάλλου ή ιστού, τέταρτον αναγέννηση ολόκληρων φυτών (διακρίνονται πιθανά ενδιάμεσα στάδια βλαστογένεσης/ριζογένεσης), πέμπτον εγκλιματισμό των φυτών πριν την υπαίθρια φύτευσή τους (Κίντζιος 1997). Κρίσιμα σημεία σε αυτήν την πορεία είναι η απολύμανσή του εκφύτου και η υπό στείρες συνθήκες τοποθέτησή του σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει την απαραίτητη αναλογία ρυθμιστικών παραγόντων αύξησης, η επαγωγή είτε σωματικής εμβρυογένεσης είτε οργανογένεσης. Σε κάθε ένα από τα παραπάνω βήματα υπάρχουν παράμετροι οι οποίες θα πρέπει να προσεχθούν ώστε να προκύψει το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Ανάλογα με τον τύπο του εκφύτου που χρησιμοποιείται η *in vitro* καλλιέργεια φυτών θα μπορούσε να χωριστεί σε κατηγορίες. Μια πρώτη κατηγορία είναι αυτή της καλλιέργειας ολόκληρων φυτών, όπου σπέρματα των φυτών ή απομονωμένα από τα σπέρματα έμβρυα τοποθετούνται πάνω σε κάποιο θρεπτικό μέσο από όπου και αναπτύσσεται το φυτό (Χατζόπουλος 2001). Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται απομονωμένα όργανα τα οποία αναπτύσσονται *in vitro* η καλλιέργεια χαρακτηρίζεται ως «καλλιέργεια οργάνων» κατά την οποία ακραία μεριστώματα βλαστού ή ρίζας καθώς και ανθήρες αποτελούν την πρώτη ύλη. Μια τρίτη κατηγορία ιστοκαλλιέργειας, είναι η καλλιέργεια κάλλου. Σε αυτή την περίπτωση το έκφυτο που

χρησιμοποιείται τοποθετείται σε θρεπτικό μέσο με διάφορες συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών ώστε να παραχθεί η άμορφη και διαιρούμενη μάζα κυττάρων που ονομάζεται κάλλος. Μια παραλλαγή της καλλιέργειας αυτής μπορεί να θεωρηθεί και η καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο όπου υπάρχουν αιωρούμενα κύτταρα. Κατάλληλες συνθήκες είναι δυνατόν να οδηγήσουν στη δημιουργία καλλιέργειας μεμονωμένων κυττάρων (Χατζόπουλος 2001). Τέλος η απομόνωση πρωτοπλαστών και η καλλιέργειά τους είναι μια ξεχωριστή κατηγορία κυτταροκαλλιέργειας φυτών.

A.1.1 Οι παράμετροι στην κυτταροϊστοκαλλιέργεια φυτών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί κατά τη διαδικασία εγκατάστασης μιας *in vitro* καλλιέργειας φυτών θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε κάθε βήμα. Οι παράμετροι που επηρεάζουν αυτή τη διαδικασία είναι πολλές καθώς επίσης συνδέονται μεταξύ τους, με λίγα λόγια **είναι ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων στο οποίο πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή.**

Το πρώτο κρίσιμο σημείο είναι η **επιλογή του φυτικού είδους και ποιος ιστός θα επιλεγεί** από αυτό ώστε να επαχθεί η καλλιέργεια. Στην ουσία η επιλογή του ιστού απεικονίζει την επιλογή των κατάλληλων φυτικών κυττάρων. Σε γενικές γραμμές τρεις είναι οι παράγοντες που κυβερνούν την ικανότητα των φυτικών κυττάρων για την αναγέννηση ολοκληρωμένων φυτών και αυτοί είναι οι εξής: ο γονότυπος των φυτών, το οντογενετικό και αναπτυξιακό στάδιο του εκφύτου και τέλος οι συνθήκες καλλιέργειας (Χατζόπουλος 2001). Το είδος καθορίζει τον γονότυπο ενώ σε ότι αφορά τον ιστό αυτός καθορίζει τον τύπο του εκφύτου (οντογενετικό στάδιο) και την ηλικία του (αναπτυξιακό στάδιο).

Στον πίνακα 1 παρατίθεται ένα μέρος από τα αποτελέσματα μελέτης των *Miho Ikeda-Iwai et. al.* (2003), όπου φαίνεται η σχέση μεταξύ του τύπου του ιστού, του φυτικού είδους και της ηλικίας των εκφύτων. Πιο αναλυτικά, έκφυτα *Arabidopsis thaliana* από το ακραίο μερίστωμα βλαστού, κοτυληδόνες, υποκοτύλιο και ρίζες που προέρχονται από φυτά 5 ημερών έχουν διαφορετική ανταπόκριση τόσο στην καλλογένεση όσο και στη σωματική εμβρυογένεση. Επιπροσθέτως χρησιμοποιήθηκαν άνθη και μασχαλιαίοι οφθαλμοί, επίσης από το *Arabidopsis thaliana*, από φυτά 8 εβδομάδων και πάλι παρατηρήθηκε διαφορά με τα υπόλοιπα είδη ιστών.

Πίνακας 1: Ακραιο μερίστωμα βλαστού (SA), κοτυληδόνες (C), υποκοτύλιο (H) και ρίζες (R) που προέρχονται από φυτά 5 ημερών. Άνθη (F) και μασχαλιαίοι οφθαλμοί (AB) από φυτά 8 εβδομάδων.

είδος ιστού	SA	C	H	R	F	AB
ολικός αριθμός εκφύτων που εξετάστηκαν	100	100	100	100	42	95
σηματισμός κάλλων (%)	98	12	0	0	97,6	100
σηματισμός σωματικών εμβρύων (%)	29	0	0	0	4,8	4,2
θάνατος φυτών (%)	2	88	100	100	2,4	0

Το δεύτερο κρίσιμο στάδιο για την επιτυχή εγκατάσταση της *in vitro* καλλιέργειας φυτών, είναι η **επιλογή των σωστών συνθηκών καλλιέργειας**. Αυτές αφορούν αρχικά την επιλογή του κατάλληλου θρεπτικού διαλύματος και στη συνέχεια το συνδυασμό και την εύρεση της κατάλληλης συγκέντρωσης των αυξητικών παραγόντων (ορμόνες). Τα απαραίτητα συστατικά ενός θρεπτικού μέσου για την ανάπτυξη φυτών είναι τα ανόργανα άλατα, πηγή άνθρακα και ενέργειας, βιταμίνες και φυτορμόνες (*Thorpe 1981*). Όσο αφορά στις φυτορμόνες οι κυτοκινίνες και οι αυξίνες είναι οι δύο κατηγορίες ορμονών που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια φυτών.

Άλλα συστατικά όπως οργανικό άζωτο, οργανικά οξέα και ορισμένα εκχυλίσματα είναι σημαντικά αλλά όχι απαραίτητα.. Στον πίνακα 2 παρατίθενται αναλυτικά η σύσταση των δύο βασικών θρεπτικών μέσων στην ιστοκαλλιέργεια των *Murashige-Skoog (MS)* και *Gamborg's (B5)*. Βέβαια πέρα από το θρεπτικό μέσο και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την τόσο τις στερεές όσο και τις υγρές καλλιέργειες.

Το pH για παράδειγμα είναι μια σημαντική μεταβλητή στο μέσο καλλιέργειας. Τα φυτικά κύτταρα σε καλλιέργεια απαιτούν ένα όξινο pH όπου αρχικά κυμαίνεται από 5,5-5,8 δεν παραμένει όμως σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Είναι δυνατόν να κυμανθεί από >5 ενώ με την πάροδο του χρόνου μπορεί να πλησιάσει το 6 ή και να το ξεπεράσει (*Davey & Anthony 2009*). Επίσης ο ρυθμός ανάπτυξης είναι στενά συνδεδεμένος με την επικρατούσα θερμοκρασία. **Η κατάλληλη θερμοκρασία** για βέλτιστη ανάπτυξη κινείται στο διάστημα 26-28 βαθμούς κελσίου ενώ έχουν παρατηρηθεί και σειρές κυττάρων οι οποίες αναπτύσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Όλες οι καλλιέργειες φυτικών κυττάρων είναι αερόβιες ενώ όσο αφορά το φωτισμό, αυτός δεν είναι πάντα απαραίτητος στα αρχικά στάδια, ωστόσο είναι προφανές ότι η ανάπτυξη σε συνεχές φως ή η εφαρμογή κάποιας φωτοπεριόδου έχουν θετικό αντίκτυπο στον μεταβολισμό των κυττάρων.

	MS		B5	
Μακροστοιχεία	mg/l	mM	mg/l	mM
NH ₄ NO ₃	1650	20,6	–	–
KNO ₃	1900	18,8	2500	25
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	3	150	1
Mg ₂ PO ₄ .7H ₂ O	370	1,5	250	1
KH ₂ PO ₄	170	1,2	–	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	–	134	1
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	–	–	150	1,1
Μικροστοιχεία	mg/l	μM	mg/l	μM
KI	0,83	5	0,75	4,5
H ₃ BO ₃	6,2	100	3	50
MnSO ₂ .4H ₂ O	22,3	100	–	–
MnSO ₂ .H ₂ O	–	–	10	60
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	30	2	7
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	1	0,25	1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,1	0,025	0,1
CoCl.6H ₂ O	0,025	0,1	0,025	0,1
Fe-EDTA	43	100	43	100
Βιταμίνες και ομόνες	mg/l	mg/l		
Ινοσιτόλη	100	100		
Νικοτινικό οξύ	0,5	1		
Πυριδοξίνη-HCl	0,5	1		
Θειαμίνη	0,1	10		
IAA	1 έως 30	–		
Κινετίνη	0,04 έως 10	0,1		
2,4D	–	0,1 έως 2,0		
Σακχαρόζη	30000	20000		
pH	5.7	5.5		

Πίνακας 2: Σύσταση των Murashige-Skoog και Gamborg για χρήση στην κυτταροϊστοκαλλιέργεια φυτών.

Οι κάλλοι που αναπτύσσονται σε **στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με άγαρ** και φτάνουν σε σχετικά αργούς ρυθμούς ανάπτυξης. Τα νέα κύτταρα σχηματίζονται περιφερικά της μάζα του υπάρχοντος κάλλου με αποτέλεσμα αυτός να αποτελείται από μια μάζα κυττάρων διαφόρων ηλικιών. Αυτό το γεγονός σε συνδυασμό με την αργή ανάπτυξη και την βαθμιαία εξάντληση των θρεπτικών συστατικών, δίνει στο σύστημα καλλιέργειας σε στερεό υπόστρωμα περιορισμένες δυνατότητες, κυρίως εννοείται η παρατήρηση της μορφογένεσης. Αντίθετα στην **καλλιέργεια αιωρούμενων κυττάρων** ή αλλιώς υγρή καλλιέργεια τα κύτταρα υπάρχουν είτε μεμονωμένα είτε ένας αριθμός αυτών σχηματίζει μια μικρή μάζα και έτσι το σύνολό τους έχει σχεδόν την ίδια ηλικία. Τέλος υπάρχει

η δυνατότητα να προστίθενται συνεχώς θρεπτικά συστατικά καθώς και τα κύτταρα περιβάλλονται ολόκληρα από το θρεπτικό διάλυμα (Davey & Anthony 2009). Μια σημαντική εφαρμογή της υγρής καλλιέργειας είναι και οι βιοαντιδραστήρες που βρίσκουν εφαρμογή όχι μόνο στην καλλιέργεια φυτικών κυττάρων αλλά και ζωικών και μικροβιακών.

Οι βιοαντιδραστήρες είναι αυτοματοποιημένα συστήματα τα οποία προσφέρουν ένα ελεγχόμενο περιβάλλον ώστε να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάπτυξη των κυττάρων και/ή το σχηματισμό των επιθυμητών προϊόντων (Kintzios, 2010). Δίνεται η δυνατότητα να παραχθούν σε μεγάλη κλίμακα φυτικά κύτταρα τα οποία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως βιομάζα ή για την απομόνωση χρήσιμων μεταβολικών προϊόντων.

Τέλος μια ακόμα σημαντική παράμετρος που πρέπει να αναφερθεί είναι η **πιθανότητα παρουσίας σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας**. Κύτταρα τα οποία έχουν διέλθει μέσω της αρχικής φάσης του μη οργανωμένου κάλλου ή μετά τη δημιουργία σωματικών εμβρύων δείχνουν συχνά ένα μεγάλο φάσμα φαινοτυπικών αλλαγών και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σωματοκλωνική ποικιλομορφία (Κίντζιος 2005).

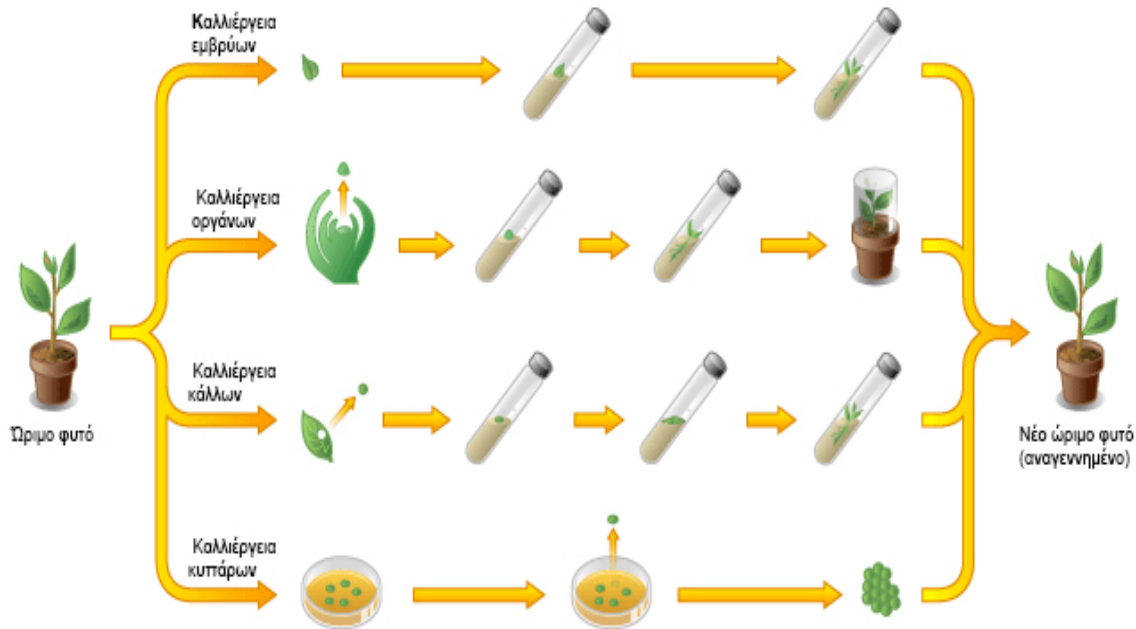
A.1.2 Οι μέθοδοι στην κυτταροϊστοκαλλιέργεια φυτών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η *in vitro* καλλιέργεια φυτών γενικά είναι μια τεχνική που προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα τόσο στην εργαστηριακή έρευνα όσο και σε εμπορική κλίμακα. **Ο όρος λοιπόν κυτταροϊστοκαλλιέργεια περιλαμβάνει όλες αυτές τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για να επιτευχθεί ο στόχος κάθε φορά.** Παρακάτω θα περιγραφούν οι 4 βασικές μέθοδοι της *in vitro* καλλιέργειας (εικόνα 1).

A.1.2.1 Καλλιέργεια κάλλων

Ο κάλλος είναι ένας άμορφος χωρίς συγκεκριμένο πρότυπο ανάπτυξης ιστός. Αναπτύσσεται *in vivo* στα φυτά, σε περιοχές όπου υπάρχει τραυματισμός λόγω προσβολής από έντομο ή κάποιο μικροοργανισμό ή παρουσιάζεται ως αποτέλεσμα κάποιο παράγοντα καταπόνησης (Davey & Anthony 2009). *In vitro*, ο κάλλος αναπτύσσεται όταν ένα έκφυτο τοποθετηθεί υπό ασηπτικές συνθήκες σε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο περιέχει ρυθμιστές αύξησης. Υπό το ερέθισμα αυτών των παραγόντων, οι οποίοι είναι είτε ενδογενείς είτε έχουν προστεθεί στο θρεπτικό μέσο ο μεταβολισμός των κυττάρων μεταβάλλεται, ξεκινούν οι κυτταροδιαίρέσεις και η εξειδίκευση του ιστού χάνεται και αναπτύσσεται ένας νέος ιστός ο οποίος απαρτίζεται από μεριστωματικά και μη εξειδικευμένα

κύτταρα (Edwin et al. 2007). Στην πράξη χρησιμοποιείται συνδυασμός από μια αυξίνη και μια κυτοκινίνη, ορμόνες από τις οποίες η μεν πρώτη επιδρά στην αύξηση του κυττάρου και η δεύτερη ενεργοποιεί τις κυτταροδιαιρέσεις (Taiz & Zeiger 2010). Ο λόγος των συγκεντρώσεων αυξίνη προς κυτοκινίνη εξαρτάται από το είδος του φυτού και το έκφυτο.



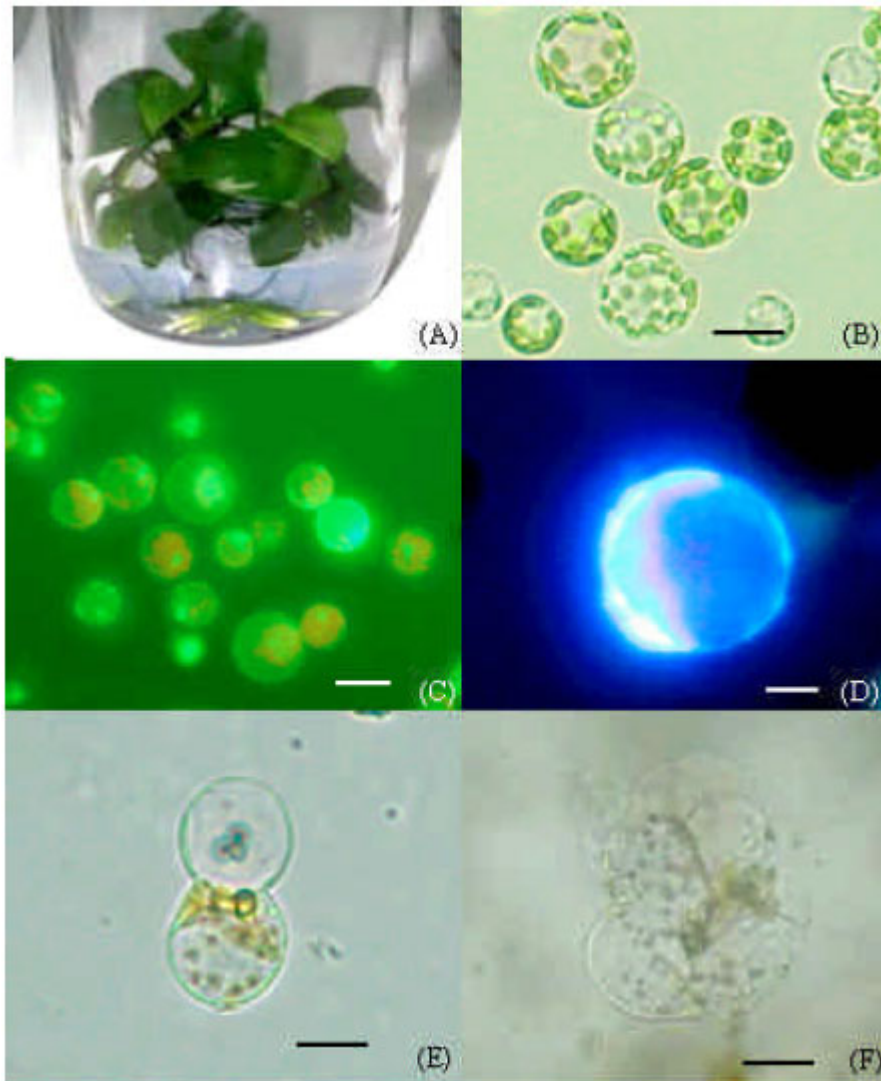
Εικόνα 1: Συνοπτική απεικόνιση των μεθόδων της κυτταροϊστοκαλλιέργειας (S. Felula et al. 2001).

A.1.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων

Η καλλιέργεια φυτικών κυττάρων αφορά στις καλλιέργειες που ξεκινούν από μόνο ένα κύτταρο. Τρεις τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αυτή την περίπτωση, αυτές είναι η καλλιέργεια κλώνων μεμονωμένων κυττάρων, η καλλιέργεια μεμονωμένων κυττάρων τα οποία προέρχονται απευθείας από το φυτό και η καλλιέργεια πρωτοπλαστών (Edwin et al. 2007). Οι κλώνοι μεμονωμένων κυττάρων προκύπτουν ύστερα από φιλτράρισμα της αρχικής καλλιέργειας με σκοπό να απομονωθούν μεμονωμένα μικρά κύτταρα ή συστοιχίες προσκολλημένων κυττάρων με μικρό αριθμό αυτών. Οι πρωτοπλάστες είναι κύτταρα από τα οποία έχει αφαιρεθεί το κυτταρικό τοίχωμα (Εικόνα 2). Η απομάκρυνση του κυτταρικού τοιχώματος γίνεται είτε με μηχανικό τρόπο είτε με ενζυμική υδρόλυση του είτε με συνδυασμό και των δύο τεχνικών (Edwin et al. 2007). Είναι σημαντικό να διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο με κατάλληλο ωσμωτικό δυναμικό για να αποφεύγεται η πλασμόλυση (Χατζόπουλος 2001).

Αφού γίνει η επιτυχημένη απομόνωση τα κύτταρα εμβαπτίζονται σε θρεπτικό μέσο με συγκέντρωση 5×10^2 έως 1×10^6 κύτταρα ανά ml (Davey & Anthony 2009) και τοποθετηθούν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο είναι δυνατόν να ξανασηματίσουν το κυτταρικό τους τοίχωμα και να

αρχίσουν να διαιρούνται αναπτύσσοντας μικροαποικίες (*Edwin et al. 2007*). Αυτές στη συνέχεια μεταφέρονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σχηματίζοντας κάλλους από τους οποίους είναι δυνατόν να αναγεννηθούν νέα φυτά (εικόνα 2). Η χρήση των πρωτοπλαστών στην κυτταροϊστοκαλλιέργεια γίνεται σχεδόν αποκλειστικά για ερευνητικούς σκοπούς ενώ το 1971 ήταν η πρώτη φορά όπου από κάλλο ο οποίος ανατήχθηκε από πρωτοπλάστες αναγεννήθηκε ολόκληρο φυτό (*Tekebe et al. 1971*).



Εικόνα 2: Απομόνωση, καλλιέργεια και κυτταροδιαίρεση πρωτοπλαστών από το είδος *Anybias nana* Engler. Α) 6 εβδομάδων φυτό για απομόνωση, Β) πρωτοπλάστες μετά από καθαρισμό C) Ζωντανά κύτταρα με χρώση FDA, D) αρχίζει να δημιουργείται κυτ. Τοίχωμα, E) διαίρεση πρωτοπλάστη, F) αποικία μετά από καλλιέργεια 30 ημερών. (*Pongchawee et al. 2006.*)

Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής εντοπίζονται στην μελέτη της μοριακής βιολογίας των φυτών. Οι πρωτοπλάστες κυρίως χρησιμοποιούνται σε μελέτες παροδικής έκφρασης γονιδίων διότι έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν μακρομόρια όπως DNA ή ακόμα πιο πολύπλοκες

δομές όπως ιούς, πυρήνες, χλωροπλάστες ακόμη και βακτήρια. Μια άλλη σημαντική εφαρμογή των πρωτοπλαστών είναι ο **σωματικός υβριδισμός**. Μέσω αυτού είναι δυνατόν να αναμειχθούν κύτταρα από διαφορετικά φυτικά είδη ή γένη. Τέλος λόγω της ολοδυναμικότητας των πρωτοπλαστών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μετασηματισμένων και διαγονιδιακών φυτών είτε μέσω του *Agrobacterium* είτε με απευθείας μεταφορά DNA.

A.1.2.3 Καλλιέργεια εμβρύων

Πολύ συχνά στην ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιούνται ανώριμα ή ώριμα έμβρυα, για παράδειγμα για την επαγωγή καλλιέργειας κάλλων. Ωστόσο στη καλλιέργεια εμβρύων αυτό που ως επί το πλείστον γίνεται είναι να απομονώνεται τα έμβρυα από τα σπέρματα και ξεχωριστά κάθε ένα να φυτρώνει *in vitro* ώστε να αναπτυχθεί η δυνατότητα να παράγεται ένα φυτό ανά έκφυτο (*Edwin et al. 2007*). Εκτός από την απομόνωση ολοκληρωμένων εμβρύων από τα σπέρματα είναι δυνατόν να απομονωθούν ανώριμα έμβρυα λίγες μέρες μετά την επικονίαση, μάλιστα φαίνεται σε ορισμένες περιπτώσεις να υπάρχει μεγαλύτερη αποδοτικότητα από τη χρήση ώριμων εμβρύων λόγω του ότι οι μηχανισμοί της ασυμβατότητας έχουν λιγότερο χρόνο για να δράσουν.

Η ασυμβατότητα είναι ένα χαρακτηριστικό το οποίο αναπτύχθηκε κατά τη διάρκεια της εξελικτικής πορείας και υπάρχει ώστε να περιορίζονται ορισμένοι πιθανοί συνδυασμοί γαμετών μέσα στο είδος. Υπάρχουν δύο τέτοιοι μηχανισμοί ο ένας είναι η προ-ζυγωτική ασυμβατότητα όπου δεν προχωράει καθόλου η γονιμοποίηση. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι αυτό της μετά-ζυγωτικής ασυμβατότητα κατά τον οποίο παράγεται το ζυγωτό αλλά δεν γίνεται αποδεκτό από το ενδοσπέρμιο με αποτέλεσμα να αποσυντίθεται ή να αποβάλλεται. Το πλεονέκτημα που προκύπτει από την καλλιέργεια εμβρύων είναι ότι μπορεί να παρακαμφθεί ο μηχανισμός μετα-ζυγωτική ασυμβατότητας η οποία βλάπτει τη δημιουργία υβριδικών σπερμάτων(*Davey & Anthony 2009*).

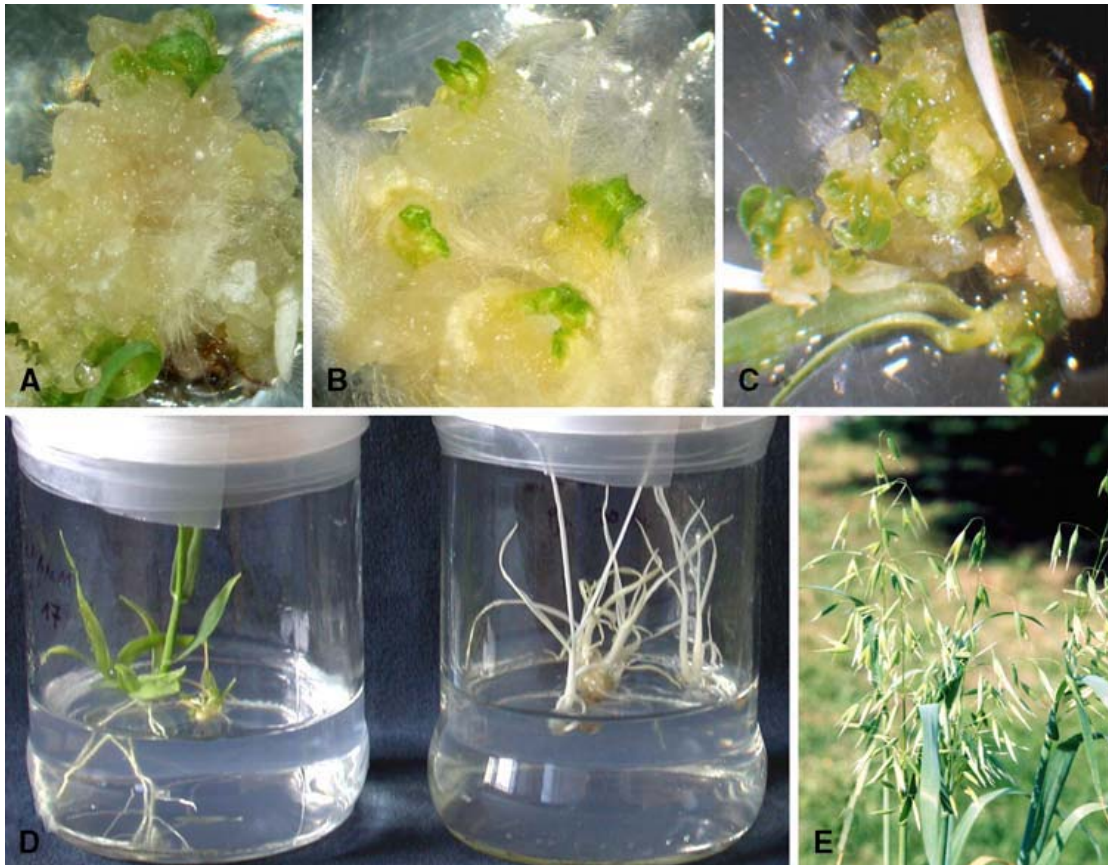
A.1.2.4 Καλλιέργεια οργάνων.

Διαφοροποιημένα φυτικά όργανα συνήθως μπορούν να αναπτυχθούν σε καλλιέργεια χωρίς να χάσουν την ακεραιότητά τους. Οι καλλιέργειες οργάνων χωρίζονται σε δύο τύπους. Πρώτων είναι αυτές στις οποίες καλλιεργούνται καθορισμένα όργανα που πρόκειται να λάβουν συγκεκριμένο μέγεθος και σχήμα όπως είναι τα φύλλα τα άνθη και οι καρποί. Δεύτερον είναι οι καλλιέργειες στις οποίες χρησιμοποιούνται μη καθορισμένα όργανα τα οποία θεωρητικά είναι σε θέση να αναπτύσσονται συνεχώς. Τέτοια όργανα είναι τα ακραία μεριστώματα βλαστού και ρίζας.

A.1.3 Σωματική εμβρυογένεση

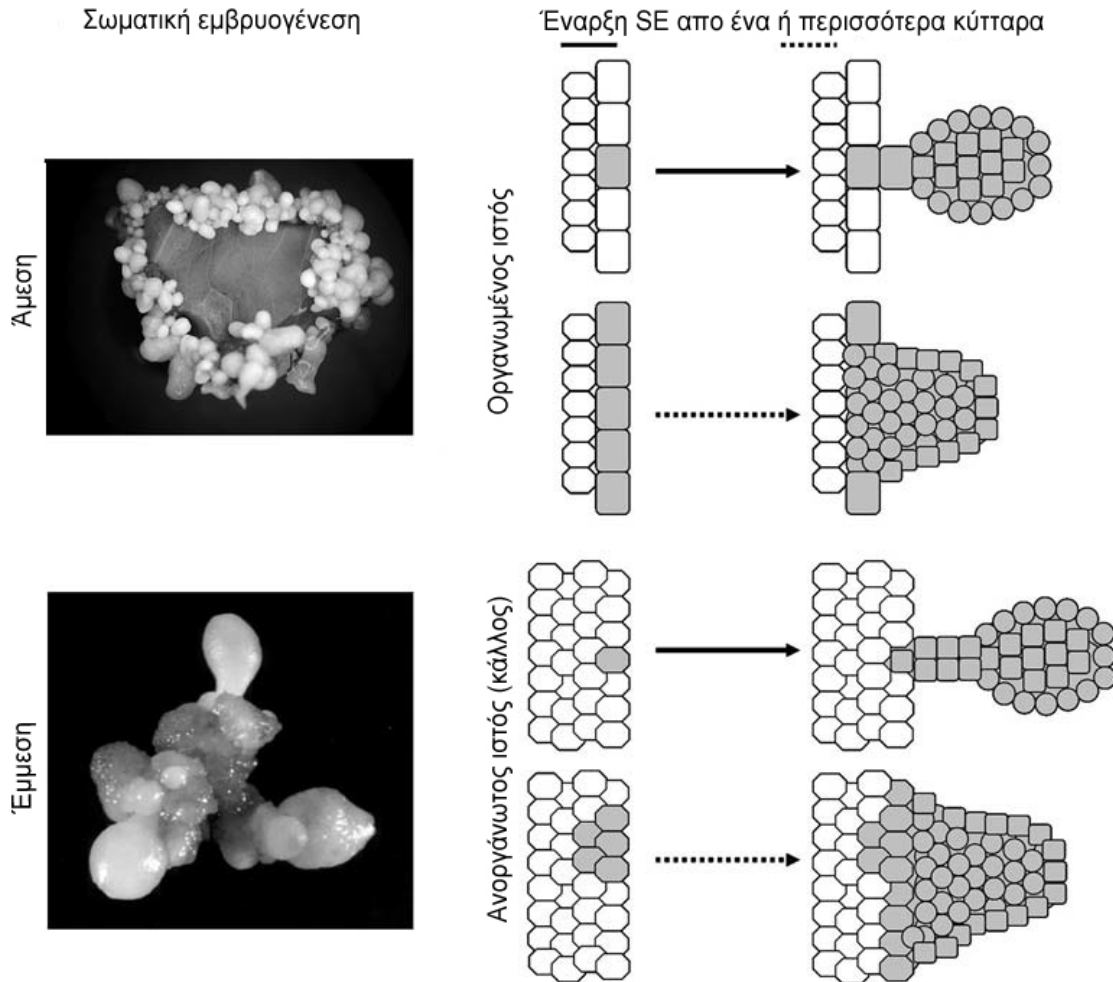
Η εμβρυογένεση στα φυτά, μπορεί να αρχίσει και από άλλα κύτταρα εκτός του γονιμοποιημένου ωαρίου (*Mordohorst et al. 1998*). **Η διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται έμβρυα από σωματικά κύτταρα, δηλαδή χωρίς γονιμοποίηση θηλυκών γαμετών (ωαρίων) από αρσενικούς (μικροσπόρια γύρης) ονομάζεται σωματική εμβρυογένεση** (*Κίντζιος 2005*). Τα σωματικά έμβρυα είναι κλωνικά αντίγραφα του μητρικού φυτού και δεν διαφέρουν μορφολογικά από τα κανονικά ζυγωτικά έμβρυα. Κατά την πορεία της εξέλιξης πολλά φυτά μεταξύ των άλλων μορφών αγενούς πολλαπλασιασμού, ανέπτυξαν την σωματική εμβρυογένεση για να υπερκεράσουν περιβαλλοντολογικούς ή γενετικούς παράγοντες που εμποδίζουν την γονιμοποίηση. **Ωστόσο στη φύση παρουσιάζεται η σωματική εμβρυογένεση** για παράδειγμα μέσα στις σπερματικές βλάστες στο γένος *Paeonia* και πιο σπάνια σε φύλλα των γενών *Asplenium* και *Kalanchoe*.

Σε in vitro καλλιέργεια πρώτη φορά παρατηρήθηκαν σωματικά έμβρυα στο είδος *Dacus carota* από τους Stewart et al. (1958) και τον Reinert (1958) και από τότε υποτέθηκε πως η σωματική εμβρυογένεση φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό σε ένα μεγάλο εύρος συστημάτων ιστοκαλλιέργειας στα φυτά (*G.Edwin et al. 2007*). Η μέθοδος της σωματικής εμβρυογένεσης συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα μεταξύ των οποίων είναι η **εξασφάλιση μη μετάδοσης ιώσεων** από το μητρικό φυτό και η δυνατότητα ανάπτυξης συνθετικών σπόρων (*Κίντζιος 2005*). Αποτελεί ένα πολύ ελκυστικό σύστημα για την μελέτη της εμβρυογένεσης στα φυτά (*G.Edwin et al. 2007*) ενώ είναι και ένα πολύτιμο εργαλείο στη μοριακή βιολογία καθώς μπορεί να γίνει μετασχηματισμός σωματικών εμβρύων με την εισαγωγή ξένου DNA, είτε μέσω *Agrobacterium* είτε μέσω βομβαρδισμού σωματιδίων (*Π. Χατζόπουλος 2001*). Τέλος μεγάλο είναι και το ενδιαφέρον να εφαρμοστεί η σωματική εμβρυογένεση για την μεγάλης κλίμακας παραγωγή φυτών αφού μέσω των βιοαντιδραστήρων θα μπορούσε να υπάρξει παραγωγή ενός εκατομμυρίου φυτών από ένα έκφυτο (*Κίντζιος 2005*). Στην εικόνα 3 φαίνεται ένα παράδειγμα της εφαρμογής των σωματικών εμβρύων στην επιλογή και ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών *Avena sativa* (*S Casparis et al, 2008*).



Εικόνα 3: Διαγονιδιακά φυτά βρώμης από σωματικά έμβρυα και η επιλογή τους. (Α) Επιλογή του εμβρυονικού κάλλου με καναμυκίνη. Πράσινα φυτάρια από ανώριμα έμβρυα (Β) και από έκφυτα από φύλλο (C). (D) Στα αριστερά πράσινο φυτό με ρίζα και στα δεξιά ξερό υπέργειο μέρος χωρίς ρίζα λόγω επιλογής με καναμυκίνη, (E) Διαγονιδιακό φυτό βρώμης.

Η σωματική εμβρυογένεση πιθανά μπορεί να επιτευχθεί σε όλα τα φυτικά είδη υπό τον όρο να επιλεγθεί το κατάλληλο έκφυτο, θρεπτικό μέσο και οι κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας (G.Edwin *et al.* 2007). Χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: την έμμεση σωματική εμβρυογένεση και την άμεση. Όσο αφορά την έμμεση σωματική εμβρυογένεση επάγεται πρώτα η καλλογένεση και στη συνέχεια στους κάλλους (εμβρυονικούς κάλλους) θα αναπτυχθούν τα έμβρυα ενώ στην άμεση τα σωματικά έμβρυα αναπτύσσονται απευθείας πάνω στο έκφυτο χωρίς να μεσολαβήσει η φάση του κάλλου (Williams and Maheswaran 1986). Για να αναπτυχθεί ένα σωματικό έμβρυο θα πρέπει το διαφοροποιημένο φυτικό κύτταρο από το οποίο θα προέλθει το έμβρυο να αποδιαφοροποιηθεί (εκτός εάν είναι μεριστωματικό κύτταρο) και να αποκτήσει τη δομή βλαστοκυττάρου (Davey & Anthony, 2009). Από αυτό στη συνέχεια μέσω των χαρακτηριστικών εμβρυακών σταδίων ανάπτυξης θα σχηματιστεί ένα έμβρυο από το οποίο θα αναγεννηθεί το νέο φυτό. Τα στάδια ανάπτυξης που είναι μορφολογικά ορατά στην σωματική εμβρυογένεση είναι το στάδιο σφαιρικού εμβρύου ή προέμβρυο, το καρδιάσχημο το οποίο στάδιο είναι κρίσιμο για την περαιτέρω ανάπτυξη του εμβρύου, το στάδιο τορπίλης και τέλος το ώριμο έμβρυο (Κίντζιος 2005).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της σωματικής εμβρυογένεσης. Η επάνω φωτογραφία και το σχεδιάγραμμα είναι από τους *F.R. Quiroz-Figueroa et al 2006*. Η κάτω φωτογραφία είναι από τους *Williams et al 1986*.

Για να επιτευχθεί η αναγέννηση φυτών μέσω σωματικών εμβρύων τεχνικά πρέπει να ακολουθηθεί η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά πρέπει να γίνει η καλλιέργεια του εκφύτου σε θρεπτικό μέσο που περιέχει κυρίως αυξίνες και δευτερευόντως κιτοκινίνες και στη συνέχεια ο πολλαπλασιασμός της καλλιέργειας είτε σε στερεό είτε σε υγρό θρεπτικό. Ακολούθως οι εμβρυονικοί κάλλοι που θα έχουν σχηματιστεί τοποθετούνται σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορμόνες ώστε να παρεμποδιστεί η περαιτέρω αύξηση και διεγερθεί ο σχηματισμός των σωματικών εμβρύων και η πρόωρη ανάπτυξη. Τέλος τα σχηματισθέντα σωματικά έμβρυα ωριμάζουν καθώς καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο με αμψισικό οξύ και/ή έχοντας χαμηλό οσμωτικό δυναμικό (*Edwin et al. 2007*) και από αυτά αναγεννάται το φυτό.

Δύο μηχανισμοί φαίνεται ότι είναι σημαντικοί για τον *in vitro* σχηματισμό εμβρυονικών κυττάρων και αυτοί είναι η ενεργοποίηση της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης και ο έλεγχος του μηχανισμού της κυτταρικής επιμήκυνσης (*DeJong et al. 1993; Emons, 1994*). Αυτό σημαίνει ότι τα

εν λόγω κύτταρα θα πρέπει με κάποιο τρόπο να προγραμματίσουν εκ νέου το πρότυπο έκφρασης του DNA ώστε να εκφράσουν αυτά τα χαρακτηριστικά. Η μεθυλίωση του γενετικού υλικού είναι ένας μηχανισμός που μεταβάλλει την έκφραση του DNA και επηρεάζεται από την παρουσία και τη συγκέντρωση της αυξίνης (Schiavo et al. 1989). Επίσης έχει προταθεί ότι και οι παράγοντες ρύθμισης της αύξησης στα φυτά (PGRs) καθώς και η καταπόνηση μπορούν να παίξουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των μηνυμάτων που οδηγούν στην αλλαγή στις έκφρασης των γονιδίων. Η δε πολικότητα του κυττάρου που επηρεάζει το πρότυπο επιμήκυνσής του μπορεί να μεταβληθεί έμμεσα από τους PGRs αφού αυτοί παρεμβαίνουν στην διακύμανση του pH ή/και στο ηλεκτρικό πεδίο γύρω από το κύτταρο.

Στις πιο πρόσφατες μελέτες περί το 1997 οι Yingkun Luo και Hans Ulrich Koop ασχολήθηκαν με την σωματική εμβρυογένεση ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων αλλά και πρωτοπλαστών από φύλλα του *A. thaliana*. Στην περίπτωση των εμβρύων μελετήθηκαν παράμετροι όπως το στάδιο του εκφύτου, οι συγκεντρώσεις και οι συνδυασμοί φυτορμονών που χρησιμοποιήθηκαν. Μελέτη των Mordhorst et al. 1998 έδειξε ότι η σωματική εμβρυογένεση στην *A. thaliana* διευκολύνεται από τις μεταλλαγές σε γονίδια που καταστέλλουν την κυτταρική διαίρεση. Οι Meijer et al. έκαναν συγκαλλιέργεια του *Daucus carota* και *A. thaliana* σε θρεπτικό μέσο χωρίς ρυθμιστές ανάπτυξης με σκοπό να διερευνηθεί αν οι παράγοντες που εκκρίνονται στο θρεπτικό μέσο από την καλλιέργεια σωματικών εμβρύων *D. carota* επηρεάζουν την ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων του *A. thaliana*. Το 2001 αναπτύχθηκε από τον Gaj ένα αποτελεσματικό σύστημα αναγέννησης φυτών *A. thaliana* μέσω της άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης κατά την καλλιέργεια ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

A.1.3.1 Το οξειδωτικό στρες ως παράγοντας που διεγείρει τον σχηματισμό σωματικών εμβρύων.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε μία καλλιέργεια φυτικών κυττάρων για να υπάρξει σωματική εμβρυογένεση θα πρέπει να υπάρχουν κύτταρα τα οποία είναι σε θέση να αντικαταστήσουν το τρέχον πρότυπο γονιδιακής έκφρασης με αυτό που εκφράζεται στα εμβρυϊκά κύτταρα (Chugh and Khurana 2002, Zeng et al. 2007) και παράλληλα να υπάρχει το κατάλληλο επαγωγικό ερέθισμα που θα «οδηγήσει» τα κύτταρα προς την έκφραση των εμβρυϊκών χαρακτηριστικών (Zavatieri et al. 2010). Φαίνεται πως είναι δύο οι κατηγορίες επαγωγικών ερεθισμάτων που επιτρέπουν σε ένα διαφοροποιημένο κύτταρο να μετατραπεί σε αποδιαφοροποιημένο ικανό για εμβρυογένεση και αυτές είναι πρώτον οι φυτορμόνες (παράγοντες ρύθμισης της αύξησης των φυτών) οι οποίες είτε παράγονται ενδογενώς είτε λαμβάνονται από το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου (Yu et al. 2001,

Feher 2005, Patnaik et al. 2005). Η δεύτερη κατηγορία, όπως προκύπτει από ένα μεγάλο εύρος παρατηρήσεων, περιλαμβάνει ερεθίσματα τα οποία προέρχονται από καταστάσεις καταπόνησης των κυττάρων. Ενδεικτικά τέτοιες καταστάσεις μπορεί να είναι η οσμωτική καταπόνηση, οι χειρισμοί που προκαλούν χημική ή μηχανική καταπόνηση, η μεταβολή του pH του θρεπτικού μέσου ή η χορήγηση σε αυτό βαρέων μετάλλων.

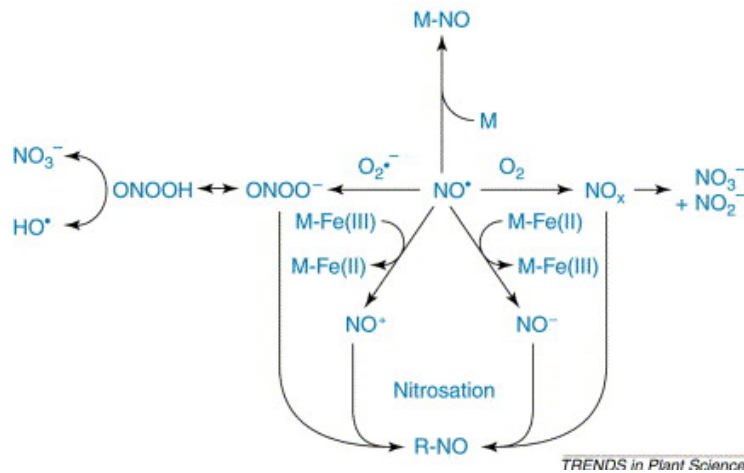
Η συσχέτιση της *in vitro* σωματικής εμβρυογένεσης με την καταπόνηση που υφίσταται το κύτταρο απορρέει από το γεγονός της συνολικής ανταπόκρισης του στην στρεσογόνο κατάσταση που **οδηγεί τελικά στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης** (Zavatieri. et al.2010). Ενώ αρχικά θεωρείτο πως ήταν τυχαία επιλογή κάποιων κυττάρων να αποκτήσουν εμβρυϊκό γονιδιακό πρότυπο έκφρασης εν τούτοις νεότερες μελέτες συνδέουν αυτό το γεγονός με την πολύ καλά οργανωμένη πορεία ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της χρωματίνης κατά τη διάρκεια του φαινομένου **αποδιαφοροποίησης/επαναδιαφοροποίησης** των φυτικών κυττάρων. Παράλληλα κατά τα πρώτα στάδια της σωματικής εμβρυογένεσης είναι χαρακτηριστική η επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με ανταπόκριση σε καταπόνηση (Davletova et al. 2001) δεδομένο που οδηγεί στην υπόθεση που είχε γίνει από τους Dudits et al. το 1995 ότι η σωματική εμβρυογένεση σε μια καλλιέργεια φυτικών κυττάρων είναι μια έσχατη αντίδραση κατά τη διάρκεια της καταπόνησης.

Μελέτη των Ikeda-Iwai et al. (2003) σχετικά με την σωματική εμβρυογένεση ιστών του *A. thaliana* έδειξε ότι είναι εφικτό να προκληθεί αυτή χρησιμοποιώντας τρόπους τεχνητής καταπόνησης. Μάλιστα κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χρονική διάρκεια κάθε χειρισμού παίζει σημαντικό ρόλο για το αποτέλεσμα και ότι ο βέλτιστος χρόνος εξαρτάται από το είδος της κάθε καταπόνησης. Η προμεταχείριση των εκφύτων υπό καταπόνηση είναι ένας παράγοντας που οδηγεί στην επαγωγή της σωματικής εμβρυογένεσης. Ένα ακόμα παράδειγμα είναι πρότερη έκθεση κάλλων από το είδος *Coffea arabica* σε υγρό θρεπτικό διάλυμα που περιέχει 50 μM 6-βενζυλαδενίνη όπου παρατηρήθηκαν σωματικά έμβρυα σε διάρκεια έκθεσης 24 και 48 ώρες (I.Papanastasiou et al.2007). Ανάλογα φαινόμενα έχουν παρατηρηθεί και σε είδη όπως το *Cucumis melo* και *Curcubita pepo* (Kintzios et al. 2002)

A.1.3.2 Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) ως μόριο μεταγωγής σήματος.

Το **μονοξείδιο του αζώτου** είναι μια αέρια **ελεύθερη ρίζα** που έχει μια αρκετά μεγάλη διάρκεια ημιζωής (περίπου 3-4s) αναφορικά με άλλες ελεύθερες ρίζες οι οποίες έχουν διάρκεια ημιζωής ακόμα και της τάξεως των ms ή και μικρότερη (Henry et al.1999, Tuteja et al. 2004). Είναι ένα από τα μικρότερα διατομικά μόρια με υψηλή δυνατότητα διάχυσης και φαίνεται να έχει και κάποιες λυπόφιλες ιδιότητες (Arashimovicz et al. 2007). Έτσι **δεν βρίσκεται μόνο στο υδρόφιλο περιβάλλον**

του κυτταροπλάσματος αλλά μπορεί να διαχυθεί και μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Η χημεία του NO σε βιολογικά συστήματα φαίνεται συνοπτικά στην εικόνα 5 (Wendehenne D et al. 2001).



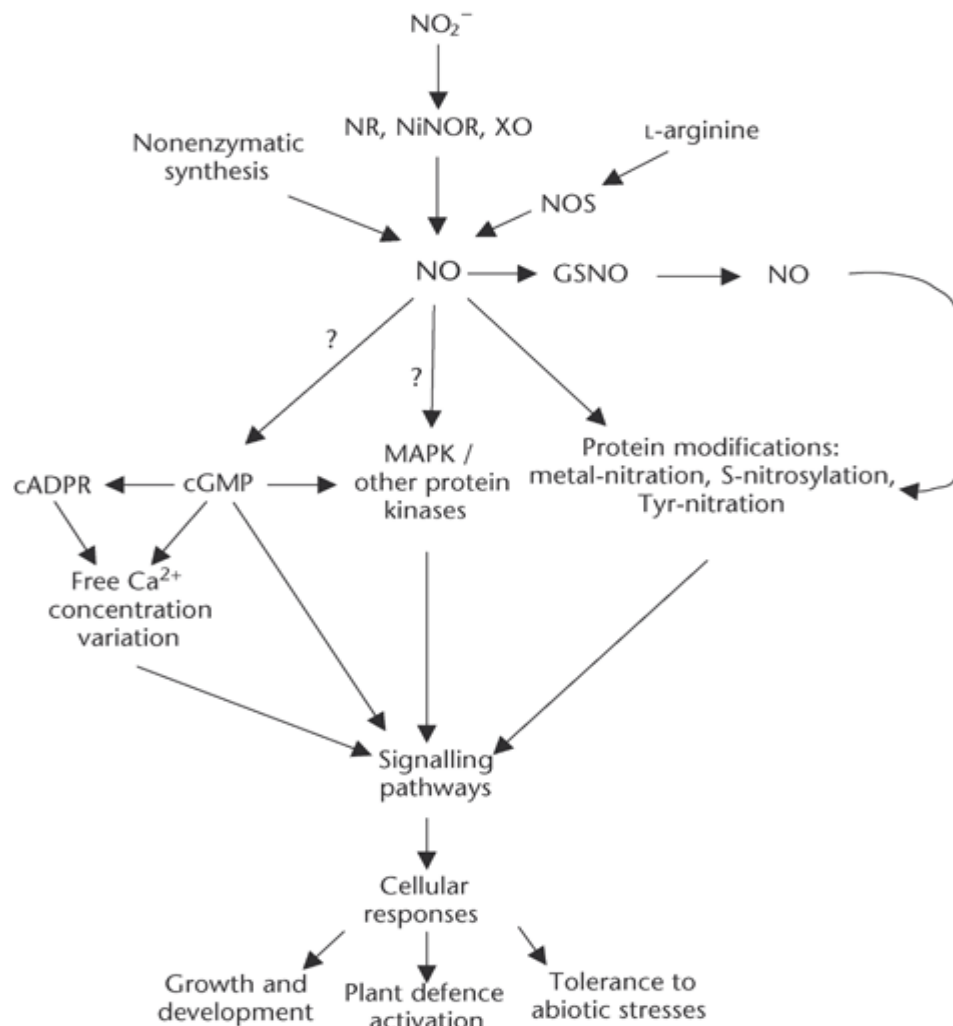
Εικόνα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της χημείας του NO σε βιολογικά συστήματα. Φαίνεται η αλληλεπίδραση με μεταλλοπρωτεΐνες (M-Fe) ή ελεύθερες ρίζες. R-NO είναι συντομογραφία για S-νιτροζυλιωμένες πρωτεΐνες.

Στα φυτά το NO μπορεί να παράγεται ενδογενώς τόσο από μη ενζυμικές όσο και από ενζυμικές αντιδράσεις. Αρχικά φάνηκε πως παράγεται μη ενζυμικά λόγω των αντιδράσεων των οξειδίων του αζώτου με μεταβολίτες του κυττάρου (Cooney et al. 1994) ή λόγω της διάσπασης των νιτρωδών προς NO ή από την αναγωγή νιτρωδών αλάτων όταν αυτά βρεθούν σε όξινο pH (Nishimura et al. 1986, Klepper 1991). Όσον αφορά την ενζυμική αντίδραση παραγωγής NO αυτή καταλύεται από την NAD(P)H εξαρτώμενη αναγωγή των νιτρωδών (NR) ανάγοντας το NO_2^- .

Εκτός από την NR φαίνεται πως στα φυτικά κύτταρα υπάρχει ένα ένζυμο το οποίο προσομοιάζει με την NO-συνθάση (NOS) των ζωικών κυττάρων και μάλιστα μελέτες των τελευταίων ετών στηρίζουν όλο και περισσότερο την υπόθεση αυτή (Wendehenne D et al. 2001, Arashimovicz et al. 2007). Αυτό εκτός των άλλων βασίζεται στο γεγονός πως παρόμοια ένζυμα που έχουν εντοπιστεί σε φυτά εμπλέκονται στον σχηματισμό της L-κιτρουλίνης από την L-αργινίνη ή παρεμποδίζονται από αναστολείς των NOS ζωικών κυττάρων ή είναι εξαρτώμενες από ιόντα ασβεστίου. Τέλος τεχνικές ανοσοαπόκρισης και ανοσοεντοπισμού δηλώνουν την ύπαρξη αυτών των ενζύμων σε φυτικά εκχυλίσματα και στη μήτρα των περοξισωμάτων αντίστοιχα (Barosso et al. 1999, Ribeiro et al. 1998).

Η παρουσία του μονοξειδίου του αζώτου ως κομβικό μόριο για την μεταγωγή σήματος εξαρτάται από τις διάφορες μορφές που μπορεί να πάρει ενεργοποιώντας ανάλογα μια αλληλουχία γεγονότων (Murgia et al. 2002). Από μελέτες φαίνεται πως αυτή η λειτουργία του NO φαίνεται κυρίως σε τρία σημεία μέσα στο δίκτυο βιοχημικών αντιδράσεων του κυττάρου. Αυτά είναι

το εξαρτώμενο από την κυκλική μονοφωσφορική γουανίνη (c-GMP) μονοπάτι μεταβολής της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου, η ενεργοποίηση MAPK ή και άλλων κινασών και η τροποποίηση στη δομή πρωτεϊνών στόχων μέσω S-νιτροζυλίωσης ή νίτρωσης του περιεχόμενου μετάλλου ή καταλοίπων τυροσίνης.



Εικόνα 6: Απαικόνιση της σύνθεσης του NO και πιθανοί στόχοι στη ρύθμιση μεταγωγής σήματος (Wendehenne D et al, 2001)

Στην εικόνα 6 φαίνεται πως το NO είναι δυνατόν να εμπλακεί σε λειτουργίες του κυττάρου όπως η επαγωγή αμυντικών μηχανισμών ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αλλά και σε σημεία διακυτταρικής επικοινωνίας όπως φαίνεται από την ενδεχόμενη συμμετοχή του στο κλείσιμο των στοματίων, την βλάστηση των σπερμάτων και την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος (Wendehenne et al. 2001, Neil et al. 2003, Lamotte et al. 2004). Η επίδραση του NO στην κυτταροϊστοκαλλιέργεια φυτών συνδέεται με την δράση των κυτοκινινών λόγω της επαγωγής της βιοσύνθεσής του από αυτές τις φυτορμόνες (Schere and Holk 2000, Tun et al. 2001, Schere et al. 2004). Νεότερες μελέτες δείχνουν ότι και οι πολυαμίνες όπως η σπερμίνη και η σπερμιδίνη επίσης επάγουν τη βιοσύνθεση του

NO στα κύτταρα (*Tun et al. 2010*) γι' αυτό το λόγο γίνονται προσπάθειες να εκτιμηθεί η δράση τέτοιων πολυαμινών σαν ρυθμιστικοί παράγοντες αύξησης στην κυτταροϊστοκαλλιέργεια φυτών.

A.2 Η οξειδωτική καταπόνηση στα κύτταρα

Τα κύτταρα είτε στο φυσικό τους περιβάλλον είτε μέσα σε μία καλλιέργεια είναι δυνατόν να αντιμετωπίσουν διάφορους παράγοντες καταπόνησης, αναπόφευκτα αφού βρίσκονται σε διαρκή επικοινωνία με το περιβάλλον τους και εξαρτώνται από αυτό. Για να διατηρήσουν την ομοιοστασία τους έχουν αναπτύξει μηχανισμούς με τους οποίους ανταπεξέρχονται στις στρεσογόνες καταστάσεις καθώς επίσης αποτοξινώνουν τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού. Η κυριότερη μορφή καταπόνησης είναι το **οξειδωτικό στρες** καθώς εμφανίζεται ως δευτερεύουσα καταπόνηση ύστερα από παρουσία καταστάσεων όπως ξηρασία, αλατότητα, ακραίες θερμοκρασίες, παρουσία περιβαλλοντικής ρύπανσης ή βιοτικών παραγόντων καταπόνησης και άλλων καταστάσεων (Sunkar 2010) για παράδειγμα λειτουργίες του κυττάρου όπως η αναπνοή ή η φωτοσύνθεση. Ένας λόγος που παρουσιάζεται το οξειδωτικό στρες στο κυτταρόπλασμα ή και σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα είναι η δημιουργία ελευθέρων ριζών.

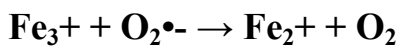
Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια εξαιρετικά ασταθή και έχουν την τάση να αντιδρούν ταχύτατα με γειτονικά μόρια για να σταθεροποιούνται ενεργοποιώντας όμως με τον τρόπο αυτό μια αλυσίδα αντιδράσεων που ως τελικό αποτέλεσμα έχει τη διάσπαση την απενεργοποίηση ή την τροποποίηση ενός σημαντικού μορίου, όπως για παράδειγμα ενός ενζύμου, ή την παραγωγή ενός νέου μορίου. **Με την εμφάνισή τους στο κύτταρο ενεργοποιείται ένας καταρράκτης μεταγωγής σήματος (J.Berg et al.2010)** ώστε να ενεργοποιηθούν εκείνοι οι μηχανισμοί που θα αποτοξινώσουν ή θα απενεργοποιήσουν ή θα εγκλωβίσουν σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα όποια βλαπτικά μόρια εμφανιστούν. Αυτή η μεταγωγή σήματος που **ξεκινάει ως αντίδραση σε έναν παράγοντα καταπόνησης** μπορεί να **μεταβάλει από την ενζυμική δραστηριότητα σε ένα κύτταρο μέχρι και το πρότυπο έκφρασης** ορισμένων γονιδίων ή ακόμα να επάγει την διαδικασία της απόπτωσης, όπως συμβαίνει στην αντίδραση υπερευαισθησίας.

Ως ελεύθερες ρίζες στη χημεία, μπορούν να δράσουν μόρια ή θραύσματα μορίων αν αποκτήσουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο μόριό τους. Συνηθέστερα το άτομο που συμμετέχει στη δημιουργία των ελευθέρων ριζών είναι το οξυγόνο έτσι οι ρίζες αυτές ονομάζονται ενεργές μορφές οξυγόνου (**reactive oxygen species ROS**). Οι κυριότερες από αυτές είναι το όζον, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), Η ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot), υπεροξειδία οργανικών οξέων (RCOOH^\cdot), άλκοξυ και υπεροξειδικές ρίζες (RO^\cdot και ROO^\cdot), υποχλωριώδες οξύ και τα **υπεροξειδία του αζώτου**. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου παρουσιάζονται συνεχώς στο κύτταρο και είναι ως επί το πλείστον βλαβερές όμως στην πορεία της εξέλιξης έχουν παίξει ένα σημαντικό μεταλλαξιογόνο ρόλο

προωθώντας την επιλογή των ειδών. Σύμφωνα με την άποψη αυτή αυξάνονται οι πιθανότητες μεταλλάξεων σε γονιδίων τα οποία εμπλέκονται σε αυτούς τους μηχανισμούς αντιμετώπισης, αυτό συμβαίνει γιατί τα εν λόγω γονίδια αφού είναι μεταγραφικά ενεργά δεν προστατεύονται από τις ιστόνες και είναι επιρρεπή σε οξειδωτικές αλλοιώσεις ή καταστροφές (Καραμπουρνιώτης 2002)

A.2.1 Μηχανισμοί δράσης και παρενέργειες των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS)

Οι ελεύθερες ρίζες ενοχοποιούνται για μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων στο κύτταρο χωρίς όμως να είναι εύκολο να διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους λόγω ότι είναι ασταθή μόρια με βραχεία διάρκεια ζωής. Σε πολλές περιπτώσεις δεν μπορεί να διασαφηνιστεί αν η παρουσία των ελευθέρων ριζών είναι η γενεσιουργός αιτία της διαταραχής ή το αποτέλεσμα της (Beausejour et al. 2003). Από τις αντιδράσεις παραγωγής ενέργειας στον οργανισμό παράγεται το ανιόν του υπεροξειδίου του οξυγόνου όταν ένα μόριο οξυγόνου λάβει ένα ηλεκτρόνιο. Ο ρυθμός παραγωγής του στο κύτταρο εξαρτάται κυρίως από το ρυθμό λειτουργίας των μιτοχονδρίων ή των χλωροπλαστών αλλά και από τη συγκέντρωση οξυγόνου στο κύτταρο. Αυτό το ανιόν στη συνέχεια μπορεί να δημιουργήσει άλλες ελεύθερες ρίζες μέσω της αντίδρασης Harber-Weiss. Η τελευταία αποτελείται από δύο επιμέρους αντιδράσεις. Πρώτον αυτή κατά την οποία το ανιόν του υπεροξειδίου του οξυγόνου ανάγει τον τρισθενή σίδηρο :



ενώ η δεύτερη είναι η γνωστή αντίδραση Fenton κατά την οποία ο δισθενής σίδηρος αντιδρά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου προς ρίζα υδροξυλίου και ανιόν υδροξυλίου :



Συνολικά από αυτές τις δύο αντιδράσεις παράγονται τα εξής :



Ο σίδηρος δρα καταλυτικά σε αυτές τις αντιδράσεις και φαίνεται πως το υπεροξείδιο του οξυγόνου έχει τη δυνατότητα να αποσπά σίδηρο από τις πρωτεΐνες και μέσω τη αντίδρασης Fenton να οδηγή στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου.

Το μοριακό οξυγόνο λοιπόν αν και δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα εν τούτοις είναι το εναρκτήριο μόριο για την παραγωγή τους. Σίγουρα σε ένα κύτταρο που διατηρεί την ομοιόσταση του οι ενεργές μορφές οξυγόνου διατηρούνται σε μια ελάχιστη συγκέντρωση και δεν προκαλούν εκτεταμένες βλάβες και δυνητικά λειτουργούν και σαν μόρια μεταγωγής σήματος ενδοκυτταρικά και διακυτταρικά.

Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα παραδείγματα πως οι ενεργές μορφές οξυγόνου δρουν σε ορισμένα μόρια ή λειτουργίες του κυττάρου,

A.2.1.1 Η δράση των ROS σε λιπίδια

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν **οξειδωση των λιπαρών οξέων** και παραγωγή ουσιών όπως μηλονική διαλδεΰδη, 4 ύδροξυονονενόλη και F2 ισοπροστανοειδή, ουσίες οι οποίες εάν συγκεντρωθούν στο κυτταρόπλασμα έχουν τοξική δράση και επηρεάζουν τα γειτονικά συστήματα. Επιπροσθέτως **η δράση των ROS στα λιπίδια των μεμβρανών αλλοιώνει την διαπερατότητα και τη λειτουργία τους** με αποτέλεσμα να υπάρχει άκριτη μεταφορά ουσιών τόσο μεταξύ κυττάρου και περιβάλλοντος όσο και μεταξύ κυτταρικών διαμερισμάτων (*Schafer and Buettner 2000*). Αυτή η δυσμενής κατάσταση για τις κυτταρικές μεμβράνες είναι δυνατόν να οδηγήσει και σε λύση του κυττάρου.

A.2.1.2 Η δράση των ROS σε πρωτεΐνες

Όλα τα αμινοξέα μπορούν να δεχθούν τη δράση των ελευθέρων ριζών και να υποστούν οξειδωση. Μεταξύ των οξειδωμένων αμινοξέων συμβαίνει η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και έχει ως συνέπεια την **αλλαγή της δομής της πρωτεΐνης** με αποτέλεσμα αυτή να χάνει την λειτουργικότητά της. Είτε αφορά δομική πρωτεΐνη είναι αφορά κάποιο ένζυμο οι επιπτώσεις είναι συνήθως αρνητικές για το κύτταρο. Παραδείγματος χάριν αν οι ενεργές μορφές οξυγόνου μεταβάλουν με αυτόν τον τρόπο τη δομή του ενζύμου ακονιτάση είναι πιθανόν αφενός να παρεμποδιστεί η κύκλος του Krebs και η συνέχεια της κυτταρικής αναπνοής, αφετέρου να γίνει συσσώρευση του κιτρικού οξέως στα μιτοχόνδρια (*J.Berg et al. 2010*).

A.2.1.3 Η δράση των ROS στα νουκλεϊκά οξέα.

Οι βάσεις του DNA είναι και αυτές ιδιαίτερα ευαίσθητες στη δράση των ελευθέρων ριζών. Ένα από τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης είναι η 8-ύδροξυ-2-δεοξυγουανোসύδη (*Kevin et al. 2007*). Η οξειδωση του DNA μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις οι οποίες αφορούν τόσο το πυρηνικό όσο και το μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό γενετικό υλικό. Μάλιστα στα πλαστίδια λόγω της θέσης του DNA κοντά στους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας και κατά συνέπεια και παραγωγής ROS είναι περισσότερο εκτεθειμένο σε αυτές. Αυτή την κατάσταση την ενισχύει και το γεγονός ότι το γενετικό υλικό σε μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες έχει μικρότερη αναγεννητική και επιδιορθωτική δυνατότητα σε σχέση το πυρηνικό.

A.2.2 Αντιοξειδωτικά συστήματα και στρατηγικές αντιμετώπισης της οξειδωτικής καταπόνησης.

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των κυττάρων ενεργοποιούνται ακόμα και από χαμηλές συγκεντρώσει ελευθέρων ριζών και περιλαμβάνουν μια σειρά από ενζυμικές και μη ενζυμικές αντιδράσεις. Ως αντιοξειδωτικές ενώσεις δρουν όποιες από αυτές έχουν την ικανότητα να αναστείλουν την δημιουργία ελευθέρων ριζών ή να τις εξουδετερώσουν. Αν και δεν υπάρχει ένας ενιαίος τρόπος κατάταξης των αντιοξειδωτικών ουσιών αυτές θα μπορούσαν να καταταχθούν σε ένζυμα, μη ενζυμικές πρωτεΐνες και σε υδρόφιλες ή λιπόφιλες ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (Keaney and Vita1995).

Η ενεργοποίηση αυτών των μηχανισμών είναι δυνατόν να διακριθεί σε 3 στάδια ξεκινώντας από την **αποφυγή της παραγωγής των ROS** κρατώντας σε επάρκεια την οξειδωτική διαδικασία στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Το ένζυμο AOX, η εναλλακτική οξειδάση (alternative oxidase) όταν ενεργοποιείται στα μιτοχόνδρια συνεισφέρει στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ του διαθέσιμου υποστρώματος και τις απαιτήσεις σε ATP. Επιπλέον συστήματα που λειτουργούν προς αυτή την κατεύθυνση είναι η ενεργοποίηση της αποσυζευκτικής πρωτεΐνης (Vercesi et al. 1995 and Laloi et al. 1997) και η ενεργοποίηση των NAD(P)H αφυδρογονασών.

Στη συνέχεια ο στόχος είναι να γίνει **εξουδετέρωση των ROS** κυρίως με τη δράση του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (superoxide dismutase SOD). Τέλος γίνεται η **επιδιόρθωση των ζημιών που έχουν προκληθεί από τις ROS**, μέσω μηχανισμών διόρθωσης όπως είναι η υπεροξειδάση του γλουταθείου ή η αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών για επισκευή των πρωτεϊνών και η επιδιόρθωση του DNA.

Οι πιο σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες οι οποίες παίρνουν μέρος στην εξουδετέρωση των ROS είναι το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η ανηγμένη γλουταθειόνη, η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και τα καροτενοειδή. Ανάλογο ρόλο παίζουν σε ορισμένες περιπτώσεις οι πολυαμίνες, τα φλαβονοειδή και ορισμένοι συμβατοί οσμολύτες. Οι συγκεντρώσει των αντιοξειδωτικών ουσιών εμφανίζονται υψηλότερες σε φωτοσυνθετικά κύτταρα και μεριστωματικούς ιστούς. Στα φωτοσυνθετικά κύτταρα οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών ουσιών παρατηρούνται στους χλωροπλάστες. Στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες ο κύκλος ασκορβικού-γλουταθειόνης αποτελεί τη σημαντικότερη βιοχημική οδό εξουδετέρωσης των ROS. Ο κύκλος αυτός λειτουργεί σε συνεργασία με τον κύκλο των ξανθοφυλλών με στόχο την προστασία των φωτοσυστημάτων από την υπερβολική παροχή ενέργειας.

A.2.2.1 Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

Το ένζυμο SOD εξουδετερώνει τις ενεργές μορφές οξυγόνου μετατρέποντας το ανιόν $O_2 \cdot$ σε O_2 και H_2O_2 το οποίο H_2O_2 εξουδετερώνεται μέσω της δράσης της καταλάσης κύκλου ασκορβικού-γλουταθειόνης, του συστήματος της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και του συστήματος της θειορεδοξίνης (θειορεδοξίνη και ρεδοουκτάση της θειορεδοξίνης). Στα φωτοσυνθετικά κύτταρα η δισμουτάση του υπεροξειδίου απαντάται σε τρεις διαφορετικές μορφές ανάλογα με το μεταλλικό ιόν που περιέχει. Είναι η ομάδα των Cu/Zn-SOD (εντοπίζεται κυρίως στο στρώμα των χλωροπλαστών και στο κυτταρόπλασμα), η ομάδα Mn-SOD που εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και η ομάδα Fe-SOD η οποία σε ορισμένα είδη εντοπίζεται στο στρώμα των χλωροπλαστών.

A.2.2.2 Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα είναι ένα τριπεπίδιο που αποτελείται από L-κυστεΐνη L- γλουταμινικό και γλυκίνη (GSH) (Sunkar 2010) και αποτελεί ένα σουφριδρικό αντιοξειδωτικό το οποίο είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά συστήματα και βρίσκεται στο πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια (Masella et al.2005). Είναι ευρέως διαδεδομένη σε ζώα, μικροοργανισμούς και στα φυτά στα οποία βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και τους χλωροπλάστες.

Η γλουταθειόνη αντιδρά με οργανικά υπεροξειδία και μετατρέπεται στην οξειδωμένη διμερή μορφή της (GSSH) μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η συσσώρευση της GSSG μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε άλλα ενζυμικά συστήματα και για αυτόν τον λόγο μετατρέπεται εκ νέου σε GSH μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο αναγωγή της γλουταθειόνης. Επίσης η γλουταθειόνη συμμετέχει στη μεταφορά αμινοξέων δια μέσου μεμβρανών και επαναφέρει άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως είναι το ασκορβικό οξύ και η α-τοκοφερόλη, στην ανηγμένη μορφή τους (Masella et al.2005). **Ο λόγος της ανηγμένης γλουταθειόνης (GHS) προς την οξειδωμένη (GSSG) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της οξειδωτικής κατάστασης του ιστού που εξετάζεται, (Nogueira et al. 2004).**

A.2.2.3 Ασκορβικό οξύ

Το L-ασκορβικό οξύ ή αλλιώς η βιταμίνη C είναι μια υδρόφιλη αντιοξειδωτική ένωση που αποτελείται από έξι άτομα άνθρακα και είναι η ενολική μορφή της λακτόνης του 2-κετογουλονικού οξέος με μια ομάδα ενεδιόλης στους άνθρακες 2 και 3. Η σημασία του ασκορβικού οξέος έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να **αλληλεπιδράσει με μια πληθώρα ελευθέρων ριζών** όπως η ρίζα υδροξυλίου ή

οι υπεροξειδικές ρίζες (Duthie, 1999). Επιπλέον θεωρείται ότι ανάγει την οξειδωμένη α-τοκοφερόλη σχηματίζοντας ρίζα ασκορβικού οξέος (Buettner, 1993). Τέλος δημιουργεί χηλικές ενώσεις με ιόντα χαλκού και σιδήρου εμποδίζοντας τη δράση τους (Sies et al., 1995).

Το ασκορβικό επιδρά σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες, εμπλέκεται στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης, στη φωτοσύνθεση, στη φωτο-οξειδωτική καταπόνηση και γενικότερα στο μεταβολισμό του φυτού. Επίσης παίζει ρόλο ενζυμικού συμπαραγόντα σε έναν μεγάλο αριθμό ενζυμικών αντιδράσεων του μεταβολισμού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα ένζυμα μόνο- ή διοξυγενάσες οι οποίες περιέχουν σίδηρο ή χαλκό στο ενεργό κέντρο και απαιτούν το L-ασκορβικό οξύ για μέγιστη δραστηριότητα. Στα ανώτερα φυτά οι ποσότητες του ασκορβικού οξέος ποικίλουν από ιστό σε ιστό. Όργανα και ιστοί υπό ανάπτυξη περιέχουν από 0,1 έως 2mg ασκορβικού ανά γραμμάριο νωπού βάρους ενώ δεν εντοπίζεται σε ξηρούς σπόρους και σε ορισμένα φρούτα υπολογίζεται ότι είναι το 0,1 % του νωπού βάρους.

A.2.2.4 α-Τοκοφερόλη

Παράγεται από το ομογεντυσικό οξύ και λόγω της λιπόφιλης ιδιότητά της μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες και εκεί να προστατεύει τα λιπίδια από την δράση των ελευθέρων ριζών. Η αντιοξειδωτική της δράση ασκείται μέσω προσφοράς του υδρογόνου του αρωματικού υδροξυλίου και η οξειδωμένη μορφή της σταθεροποιείται μέσω διασποράς του ασύζευκτου ηλεκτρονίου εντός του αρωματικού δακτυλίου.

A.2.2.5 Καροτένια

Τα καροτένια είναι τετρατερπένια που αποτελούνται από 8 μονάδες ισοπερνίου και μπορούν να είναι άκυλα ή να εμπεριέχουν δακτυλίους ατόμων άνθρακα. Τροφές πλούσιες σε καροτένια είναι φρούτα με κίτρινο πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα καθώς και φυλλώδη λαχανικά με σκούρο πράσινο χρώμα. Η κυριότερη αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην ικανότητά τους να σαρώνουν τις ελεύθερες ρίζες ατομικού οξυγόνου (Paiva and Russell, 1999).

A.3 Φυτικό υλικό

A.3.1 Το φυτό Arabidopsis thaliana.

Το *Arabidopsis thaliana* (εικόνα 5) είναι ένα δικότυλο φυτικό είδος που ανήκει στην οικογένεια *Brassicaceae* (οικογένεια των σταυρανθών) και ανακαλύφθηκε από τον Johannes Thal. Το φυτό αυτό και δεν έχει ιδιαίτερη οικονομική αξία σε αντίθεση με άλλα είδη της οικογένειας *Brassicaceae* όπως η κράμβη, το λάχανο, το μπρόκολο κ.α. καλλιεργούμενα φυτά.. **Παρόλο που δεν έχει καμία οικονομική σημασία, έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων χάριν ορισμένων ιδιοτήτων του που το αναδεικνύουν ως το καταλληλότερο φυτικό μοντέλο για μελέτες βιοχημείας και φυσιολογίας φυτών. Το *Arabidopsis thaliana* έχει χαρακτηριστεί ως φυτό μοντέλο για μελέτες γενετικής των φυτών (Sommerville and Koornneef, 2002). Τα χαρακτηριστικά του που επιβεβαιώνουν αυτό είναι :**

- Το μικρό μέγεθος του γενετικού υλικού του *A.thaliana* (100-120X10 που το καθιστά εύκολο τον χειρισμό και οφείλεται στο σχετικά μικρό ποσοστό επαναληπτικού DNA που περιέχει.
- Ο μικρός βιολογικός κύκλος (διάρκειας περίπου 8-10 εβδομάδων), το γεγονός ότι η ανάπτυξη των φυτών δεν επηρεάζεται από την εποχή και μπορεί να γίνει εύκολα τόσο σε θάλαμο ανάπτυξης όσο και σε θερμοκήπιο καθώς και η παραγωγή μεγάλου αριθμού σπόρων ανά γενιά.
- Η πολλή καλή προσαρμοστικότητά του.
- Ο εύκολος μετασχηματισμός του με το *Agrobacterium tumefaciens*
- Η αυτογονιμοποίηση των ανθέων του καθώς και η δυνατότητα αποθήκευσης των αφυδατωμένων σπόρων για μεγάλο χρονικό διάστημα, είναι ένα χαρακτηριστικό που εξυπηρετεί στην διατήρηση καθαρών σειρών.

Το γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* έχει μέγεθος περί τις 125 Mb και περιέχει περίπου 25 χιλιάδες γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για σχεδόν 11 χιλιάδες οικογένειες πρωτεϊνών. Ο απλοειδής αριθμός χρωμοσωμάτων του φυτού είναι $n=5$. Αυτά τα χρωμοσώματα χαρακτηρίζονται από μεγάλα τμήματα που προέκυψα από τον διπλασιασμό του γονιδιώματος κατά την εξελικτική πορεία.



Εικόνα 7: Άνθη, καρποί και σπέρματα του φυτού *Arabidopsis thaliana* καθώς και τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά.

Το κορυφαίο μερίστωμα του βλαστού στα πρώτα στάδια έχει τη μορφή ροζέτας. Κατά την μετάβαση στην αναπαραγωγική φάση μεταπίπτει σε πρωτογενές μερίστωμα ταξιανθίας το οποίο απευθείας δημιουργεί ανθοφόρους οφθαλμούς. Οι καταβολές των τελευταίων φύλλων δίνουν μικρότερα φύλλα τα οποία αναπτύσσονται στο ανθοφόρο στέλεχος. Οι πλάγιοι οφθαλμοί στις μασχάλες των φύλων αυτών δημιουργούν δευτερογενείς άξονες της ταξιανθίας στους οποίους δημιουργούνται επίσης ανθοφόροι οφθαλμοί.

Υπάρχουν αναφορές ότι το *Arabidopsis thaliana* είναι κατάλληλο φυτό για την γενετική σωματικών κυττάρων από τους Gresshoff (1973); Corcos et al. (1973). Η πρόοδος σε αυτόν τον τομέα εξαρτάται από την επιτυχή in vitro μορφογένεση. Σχετικά με την μορφογένεση, οργανογένεση και σωματική εμβρυογένεση δεν υπάρχουν πολλές αναφορές γιατί έχει δοθεί μεγαλύτερο βάρος σε μελέτες γενετικής και μοριακής βιολογίας (Papanastasiou 2005). Οι Corcos et al. (1973) αναφέρουν προκαταρκτικές σχετικά με τον σχηματισμό κάλλου και την ανάπτυξή του σε White υγρό υπόστρωμα (White 1963). Η οργανογένεση από ιστοκαλλιέργεια *Arabidopsis thaliana* αναφέρεται περί το 1973 από τους Gresshoff και Doy (1972); Corcos et al. (1973) χωρίς όμως να έχει γίνει κατανοητός ο έλεγχος του φαινομένου αυτού.

A.3.2 Το φυτό Lemna minor.

Το φυτό *Lemna minor* (εικόνα 8) ανήκει στην οικογένεια *Lemnaceae*. Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται υδροχαρή φυτικοί οργανισμοί γνωστοί και ως duckweeds (φακές του νερού). Το γένος *Lemna* περιλαμβάνει 13 διαφορετικά είδη και συναντιέται κυρίως στην Βόρεια Αμερική, Ευρώπη, Ασία, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία. Μορφολογικά αποτελείται από φυλλίδια επίπεδα, ωοειδή, σπάνια κυρτά, γενικά συμμετρικά με λεία την άνω επιφάνεια. Είναι μόνα τους ή σε αποικίες των 2-5 φυλλιδίων (εικόνα8). Κάθε φυλλίδιο φέρει μια ρίζα. Οι ρίζες έχουν μήκος έως και 15 cm ενώ η κορυφή τους είναι κυρίως στρογγυλή. Οι μίσχοι είναι λευκοί, μικροί και συχνά αποσυντίθενται. Τα φυλλίδια έχουν μήκος 1-8 mm Το μήκος του φυλλιδίου είναι 1.3-2 φορές μεγαλύτερο από το πλάτος. Φέρουν 3 έως 5 νεύρα, ενώ αν είναι παραπάνω από 3 τότε τα εξωτερικά διακλαδίζονται από τα εσωτερικά.

Στο υδροχαρές αυτό φυτό ο ιστός περιλαμβάνει πρωτεΐνες, λιπίδια, άζωτο και φώσφορο δύο φορές περισσότερο από άλλα φυτά με αγγειακό σύστημα. Επίσης με ολόκληρο το σώμα του φυτού να αποτελείται από ένα μη δομημένο, μεταβολικά ενεργό ιστό, το μεγαλύτερο ποσοστό της φωτοσύνθεσης αφιερώνεται στο σχηματισμό πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων με αποτέλεσμα το φυτό να έχει υψηλά επίπεδα θρεπτικών συστατικών. Αναπτύσσεται γρήγορα σε νερό με υψηλά επίπεδα αζώτου και φωσφόρου. Επιβιώνει καλύτερα σε pH 4,5-7,5. Σε θερμοκρασίες παγετού παραμένει στον πυθμένα της λίμνης με τη μορφή τυγίου ή σπόρων μέχρι οι θερμοκρασίες να ανέλθουν στα φυσιολογικά επίπεδα ανάπτυξης. Αναπαράγεται κυρίως με αγενή πολλαπλασιασμό και πιο σπάνια εγγενώς. Ο ρυθμός αναπαραγωγής είναι διπλάσιος σε σχέση με άλλα φυτά με αγγειακό σύστημα.

Η *L. minor* είναι πολύ σημαντικός οργανισμός αφού αποτελεί βασικό κρίκο της τροφικής αλυσίδας. Επίσης είναι χρήσιμη ως υγρή καλλιέργεια αφού μπορεί να προσαρμοστεί σχεδόν σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης, με καλύτερη ευδοκίμηση σε νερό πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Η υψηλή περιεκτικότητα των φυτών σε λιπίδια και πρωτεΐνες, τα καθιστά μια σημαντική πηγή τροφής για τα ζώα. Επίσης έχουν τη δυνατότητα απομάκρυνσης διαφόρων ουσιών από το νερό. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα απορρόφησης σε μεγάλο βαθμό θρεπτικών ουσιών από την επιφάνεια του νερού (<http://www.mobot.org>).



Εικόνα 8: Το υδρόβιο φυτό *Lemna minor*.

B. Πειραματική διαδικασία-Υλικά και Μέθοδοι

B.1.1 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η συμπεριφορά κάλλων από σπέρματα του φυτού *Arabidopsis thaliana* και φυταρίων του φυτού *Lemna minor* μετά από προσχεδιασμένους χειρισμούς. Ακολούθως να μελετηθεί η πιθανότητα ανάπτυξης σωματικών εμβρύων και να εξεταστεί αν παίζει ρόλο η καταπόνηση την οποία έχουν υποστεί οι ιστοί στην επαγωγή της σωματικής εμβρυογένεσης. Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για να επαχθεί η καταπόνηση ήταν η σπερμίνη, το κιτρικό οξύ και η μανιτόλη.

Όσο αφορά τη μανιτόλη υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία ότι επάγει την σωματική εμβρυογένεση σε μεριστωματικούς ιστούς από φυτά *Arabidopsis thaliana* 5 ημερών (Ikeda-Iwai et al. 2003), ενώ το κιτρικό οξύ το κιτρικό οξύ αναφέρεται ως παράγοντας που διεγείρει την σωματική εμβρυογένεση στο *Pinus taeda* (Da Silva et al. 2008). Για την σπερμίνη υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές ότι επάγει τη βιοσύνθεση του NO στο *Arabidopsis thaliana* (Tun et al. 2006). Σε αυτή την περίπτωση θα γίνει προσπάθεια εκτίμησης του NO ως μόριο μεταγωγής σήματος. Η εν λόγω εκτίμηση θα γίνει μέσω της μέτρησης των νιτρωδών στο θρεπτικό διάλυμα.

B.1.2 Περιγραφή πειράματος

Το σκεπτικό ήταν να γίνει έκθεση διαφορετικής χρονικής διάρκειας των ιστών σε υγρά θρεπτικά διαλύματα με βάση την εργασία των Papanastasiou et al. 2007 που έγινε προγενέστερα στο εργαστήριο. Τα διαλύματα προμεταχείρισης περιείχαν τις εξής ουσίες, σπερμίνη 1mM, κιτρικό οξύ 1mM και μανιτόλη 1mM καθώς και θρεπτικό διάλυμα χωρίς προσθήκη κάποιας ουσίας που χρησίμευσε ως μάρτυρας. Όσο αφορά τη χρονική διάρκεια της έκθεσης των ιστών αυτή ήταν 1 ώρα, 6 ώρες 12 ώρες και 24 ώρες έκθεσης στις παραπάνω ουσίες. Δηλαδή για τα 4 διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα (σπερμίνη, κιτρικό οξύ, μανιτόλη και μάρτυρας) πάρθηκαν δείγματα για εγκατάσταση ιστοκαλλιέργειας με σκοπό την ανάπτυξη σωματικών εμβρύων καθώς και για μετρήσεις ώστε να γίνει εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών σε διαφορετικές χρονικές στιγμές οι οποίες αναφέρονται πιο πάνω (1h, 6h, 12h και 24h).

Στη συνέχεια ένα μέρος των κάλλων μεταφέρθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με συγκέντρωση 4,5μM της αυξίνης 2,4 D και έγιναν μικροσκοπικές και μακροσκοπικές παρατηρήσεις. Οι υπόλοιποι κάλλοι χρησιμοποιήθηκαν ώστε να γίνει εκτίμηση της οξείδωσης λιπιδίων, του λόγου

ανηγμένης γλουταθειόνης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης και της δραστηριότητας του ενζύμου SOD. Πέρα από αυτές τις μετρήσεις κρατήθηκαν τα δεδομένα της διακύμανσης του pH και την αγωγιμότητας των θρεπτικών διαλυμάτων καθώς επίσης μετρήθηκε η συγκέντρωση νιτρικών σε αυτά.

Παράλληλα με τη χρήση φυταρίων του υδρόβιου είδους *Lemna minor* επαναλήφθηκε η παραπάνω διαδικασία για να διευκρινιστεί η συμπεριφορά του ιστού στο θρεπτικό μέσο όταν είναι διαφοροποιημένος ή όχι.

Για τον σχηματισμό κάλλων από σπέρματα του φυτού *Arabidopsis thaliana* τα έκφυτα αφού απολυμάνθηκαν τοποθετήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με συγκέντρωση 2,25 μM της αυξίνης 2,4 D και 0,25 μM της κυτοκίνης κινετίνης. Τα έκφυτα ύστερα από 4 εβδομάδες καλλιέργειας είχαν σχηματίσει κάλους ικανοποιητικού μεγέθους για χρήση.

B.2 Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων

B.2.1. Παρασκευή θρεπτικού μέσου B5 Gamborg για καλλογένεση.

Για την προετοιμασία του θρεπτικού διαλύματος καλλογένεσης είναι χρήσιμο να παρασκευαστούν πρώτα συμπυκνωμένα διαλύματα των συστατικών. Τα διαλύματα χωρίζονται σε 4 ομάδες και ονομάζονται διάλυμα Α, Β, Γ και Δ και κάθε ένα από αυτά έχει την παρακάτω σύσταση:

Διάλυμα Α:

- KNO₃ 25mM
- (NH₄)₂SO₄ 1mM
- CaCl₂ 2H₂O 1mM
- MgSO₄ 7 H₂O 1mM
- NaH₂PO₄ H₂O 1mM

Διάλυμα Β:

- H₃BO₃ 50 μM
- MnSO₄ H₂O 60 μM

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 μM
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM

Διάλυμα Γ:

- KI 4,5 μM
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 μM
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1 μM
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 μM

Διάλυμα Δ:

- Πυριδοξίνη HCl 5 μM
- Θειαμίνη HCl 30 μM
- Νικοταμινικό οξύ 8 μM

Τα εν λόγω διαλύματα συμπυκνώνονται ώστε να είναι εφικτό να μετρηθούν όσο συστατικά βρίσκονται σε μικροποσότητες και η συμπύκνωση εξαρτάται από τον παρασκευαστή. Πέρα από τα παραπάνω συστατικά στο θρεπτικό μέσο B5 Gamborg πρέπει να χρησιμοποιηθούν επιπλέον και τα εξής:

- MES 2,5 mM
- Σουκρόζη 10%
- Άγαρ 8%
- myo-ινοσιτόλη 0,1 mM
- Απιονισμένο νερό μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου του διαλύματος.

Οι παράγοντες ρύθμισης της αύξησης για καλλογένεση ήταν οι εξής

- 2,4 D 2,25 μM διαλυμένο σε 20% αιθανόλη
- Κινετίνη 0,25 μM διαλυμένη σε 20% NaOH ή KOH 1N

Για την παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου B5 δεν χρησιμοποιείται άγαρ και όλα τα συστατικά είναι δυνατόν να αποστειρωθούν σε αυτόκαυστο. Τα συμπυκνωμένα διαλύματα φυλάσσονται στους 4°C εκτός από το διάλυμα Δ και τις ορμόνες που φυλάσσονται στους

-20°C. Τέλος το διάλυμα Β τοποθετείται σε σκουρόχρωμο δοχείο λόγω του σιδήρου που περιέχεται σε αυτό.

B.2.2 Παρασκευή θρεπτικού μέσου MS για επώαση σπερμάτων *Arabidopsis thaliana*.

Για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος MS πρέπει να φτιαχτούν τα εξής συμπυκνωμένα διαλύματα Α, Β, Γ και Δ. :

Διάλυμα Α:

- KNO_3 18,8 mM
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1mM
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 mM
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM

Διάλυμα Β:

- H_3BO_3 100 μM
- $\text{MnSO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 μM
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 μM
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM

Διάλυμα Γ:

- KI 5 μM
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 μM
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1 μM
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 μM

Διάλυμα Δ:

- Πυριδοξίνη HCl 0,5 mg/l
- Θειαμίνη HCl 0,1 mg/l
- Νικοταμινικό οξύ 0,5 mg/l

Τα εν λόγω διαλύματα συμπυκνώνονται ώστε να είναι εφικτό να μετρηθούν όσο συστατικά βρίσκονται σε μικροποσότητες και η συμπύκνωση εξαρτάται από τον παρασκευαστή. Πέρα από τα παραπάνω συστατικά στο θρεπτικό μέσο MS πρέπει να χρησιμοποιηθούν επιπλέον και τα εξής:

- MES 2,5 mM
- Σουκρόζη 8%
- Άγαρ 8%
- myo-ινοσιτόλη 0,1 mM
- Απιονισμένο νερό μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου του διαλύματος.

Για την παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου MS δεν χρησιμοποιείται άγαρ και όλα τα συστατικά είναι δυνατόν να αποστειρωθούν σε αυτόκαυστο

B.2.3 Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος Hoagland

Η ανάπτυξη των φυτών *Lemna minor* έγινε στο θρεπτικό διάλυμα Hoagland. Για την παρασκευή αυτού του θρεπτικού διαλύματος χρησιμοποιούνται τα εξής συστατικά:

Μακροστοιχεία:

- KNO_3 350 mg/l
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 295 mg/l
- KH_2PO_4 90 mg/l
- K_2HPO_4 12.6 mg/l
- MgSO_4 100 mg/l

Ιχνοστοιχεία:

- H_3BO_3 120 $\mu\text{g/l}$
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 180 $\mu\text{g/l}$
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 44 $\mu\text{g/l}$
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 180 $\mu\text{g/l}$
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 760 $\mu\text{g/l}$
- EDTA 1500 $\mu\text{g/l}$

B.2.4 Παρασκευή υγρού θρεπτικού διαλύματος προμεταχείρισης

Για τα θρεπτικά διαλύματα προμεταχείρισης φτιάχνεται το θρεπτικό μέσο B5 Gamborg χωρίς στερεοποιητικό παράγοντα. Κάθε διάλυμα προμεταχείρισης που χρησιμοποιήθηκε εδώ αποτελείται από 25ml B5 Gamborg και τελική συγκέντρωση από τις ουσίες επαγωγής της καταπόνησης 1mM. Για

το λόγο αυτό φτιάχτηκαν μητρικά διαλύματα για κάθε μια ουσία σύμφωνα με τις παρακάτω αναλογίες :

- 0,4 g μανιτόλη σε 50 ml απιονισμένο νερό
- 0,7 g κιτρικό οξύ σε 50 ml απιονισμένο νερό
- 0,5 g σπερμίνη σε 50 ml απιονισμένο νερό

Από αυτά τα διαλύματα χρησιμοποιείται 1 ml στα 25ml θρεπτικού μέσου.

B.2.5 Απολύμανση εκφύτων.

Η απολύμανση των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν έγινε με χρήση διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου και η όλη διαδικασία έλαβε χώρα μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής. Η διαδικασία για την απολύμανση σπερμάτων *Arabidopsis thaliana* ήταν η εξής :

- Με αποστειρωμένο dH₂O παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 30% υποχλωριώδους νατρίου.
- Εμβάπτιση των ιστών σε αυτό για 1 λεπτό
- Απομάκρυνση του διαλύματος απολύμανσης και ξέπλυμα των ιστών διάρκειας 1 λεπτού σε αποστειρωμένο dH₂O επαναλαμβάνοντας τουλάχιστον 6 φορές.

Η διαδικασία για την απολύμανση των ριζιδίων του φυτού *Lemna minor* είναι η ίδια με την παραπάνω με τη διαφορά ότι το διάλυμα απολύμανσης είναι 5% περιεκτικότητας υποχλωριώδους νατρίου.

B.3 Βιοχημικές μετρήσεις

B.3.1 Μέτρηση οξειδωσης λιπιδίων στους ιστούς μέσω της μέτρησης MDA

Κατά την οξειδωση των λιπιδίων παράγονται προϊόντα που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) και σχηματίζουν χρωμογόνα σύμπλοκα που ανιχνεύονται με φασματοσκοπικές μεθόδους.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής :

- Ομογενοποίηση του ιστού με υγρό άζωτο.
- Ανάμειξη 50 mg ιστού με 1ml 0,1% TCA.
- Φυγοκέντρηση του μείγματος στις 10.000 στροφές για 15 λεπτά.
- Αναμειγνύονται, 500 μl από το υπερκείμενο 1 ml 20% TCA και 1 ml 0,5% TBA.
- Θέρμανση του μείγματος για 30 λεπτά στους 95 °C και στη συνέχεια κατευθείαν στον πάγο.

- Φωτομέτρηση του δείγματος στα 532 nm και στα 600 nm. Η απορρόφηση στα 600 nm αφαιρείται από την απορρόφηση στα 532 nm και το αποτέλεσμα είναι η ζητούμενη απορρόφηση.
- Η συγκέντρωση της MDA προκύπτει από το νόμο των Beer-Lambert's με συντελεστεί απόσβεσης για την MDA $\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Επεξηγήσεις : Το διάλυμα 0,5 % TBA φτιάχνεται σε διάλυμα 20 % οξικού οξέος. Οι εργασίες πριν τη φυγοκέντρηση γίνονται στον πάγο. Το TBA είναι το θείοβαρβουτουρικό οξύ, το TCA είναι το τριχλωροξεϊκό οξύ.

B.3.2 Μέτρηση ολικής γλουταθειόνης και προσδιορισμός του λόγου ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης.

Για αυτές τις μετρήσεις έγινε δοκιμασία των εκχυλισμάτων με χρήση του αντιδραστηρίου Ellman ή αλλιώς DTNB. Αυτό αντιδρά με θειολικές ομάδες R-SH παράγοντας το μόριο NTB το οποίο προσδιορίζεται με φωτομέτρηση στα 412 nm. Παρατίθεται αναλυτικά η διαδικασία μέτρησης της ολικής γλουταθειόνης με αυτό το αντιδραστήριο :

- Ομογενοποίηση του ιστού με υγρό άζωτο.
- 50 mg ιστού εκχυλίστηκαν σε 1 ml με διαλύματος 0.1 M φωσφορικού καλίου με EDTA (KPE) pH 7 στο οποίο προστέθηκε triton X και σουλφοσαλκυλικό οξύ (SSA).
- Για την αντίδραση μέτρησης της ολικής GSH χρειάστηκαν : 140 μl NADPH 0,3 mM, 20 μl DTNB 6 mM, 10 μl δείγματος και 20 μl ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης 50 units/ml.
- Η φωτομέτρηση έγινε στα 412 nm μετρώντας την απορρόφηση κάθε 1 λεπτό για 6 λεπτά.
- Για τη μέτρησης της GSSG 100 ml από το αρχικό εκχύλισμα μεταφέρθηκαν σε καθαρά eppendorf και προστέθηκε σε αυτά 2 μl καθαρής 2-βυνίλ-πυριδίνης δημιουργώντας δυσδιάλυτο σύμπλοκο με την GSH . Μετά από 30 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου όλα τα μόρια GSH έχουν αδρανοποιηθεί και η μέτρηση δίνει τη συγκέντρωση των GSSG που μετατράπηκαν σε GSH.
- Για την αντίδραση μέτρησης της GSSG κρατούνται οι παραπάνω αναλογίες ενώ ως δείγμα χρησιμοποιούνται 10 μl από το εκχύλισμα με την 2-βυνίλ-πυριδίνης.
- Η φωτομέτρηση έγινε στα 412 nm μετρώντας την απορρόφηση κάθε 1 λεπτό για 6 λεπτά.

Επεξηγήσεις : Οι διαδικασίες της εκχύλισης γίνεται στον πάγο. Στο διάλυμα εκχύλισης προστίθενται 3 ml triton X και 120 mg SSA στα 20 ml. Η 2-βυνίλ-πυριδίνη χρησιμοποιείται αυστηρά στην απαγωγό εστία.

B.3.3 Προσδιορισμός ενεργότητας της SOD.

Ο υπολογισμός της σχετικής ενεργότητας της SOD δείγματα, έγινε με τη μέτρηση της απορρόφησης της φορμαζάνης, καθώς αυτή σχηματίζεται από την αναγωγή του nitro blue tetrazolium (NBT) από το O_2^- . Η παραγωγή του O_2^- γίνεται με τη διάσπαση της ριβοφλαβίνης, όταν βρεθεί κάτω από έντονο φωτισμό (Yu and Rengel 1999). Η παρουσία της SOD παρεμποδίζει την αναγωγή του NBT από το παραγόμενο από τη ριβοφλαβίνη O_2^- καθώς το μετατρέπει σε H_2O_2 , οπότε παρατηρείται μείωση της απορρόφησης έναντι του τυφλού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής :

- Ομογενοποίηση του ιστού με υγρός άζωτο.
- Εκχύλιση του δείγματος σε 1,5 ml Hepes.
- Διήθηση στον πάγο και παραλαβή 0,75 ml του εκχυλίσματος.
- Προσθήκη 25 μl NBT
- Τοποθέτηση του δείγματος για 5 λεπτά στο φως (4000 Lux).
- Για το τυφλό δείγμα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι δεν χρησιμοποιήθηκαν 0,75 ml Hepes .
- Η φωτομέτρηση έγινε στα 560 nm.

Διάλυμα Hepes pH 7,6 :

- 50 mM Hepes
- 50 mM $NaCO_3$
- 13 mM μεθειονίνη
- 0,025 % triton-X 100
- 20 μM ριβοφλαβίνη

Επεξηγήσεις : Το NBT διαλύθηκε σε διάλυμα 0,05 M PBS και διατηρείται στο σκοτάδι. Το διάλυμα PBS pH 7.4 είχε την εξής σύσταση 0,14 NaCl , 0,05 M $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ και 0,05 M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$. Για κάθε δείγμα η πραγματική απορρόφηση είναι η διαφορά :
Απορ. τυφλού –Απορ. δείγματος= Πραγματική απορρόφηση δείγματος. mM.

B.4 Μετρήσεις pH, αγωγιμότητας και συγκέντρωσης νιτρωδών στα θρεπτικά διαλύματα προμεταχείρισης των ιστών.

Τόσο η μέτρηση του pH και της αγωγιμότητας όσο και αυτή των νιτρωδών στα θρεπτικά διαλύματα προμεταχείρισης των ιστών έγιναν ακριβώς τη στιγμή μετά τη δειγματοληψία των ιστών. Οι δειγματοληψίες έγιναν μέσα σε ένα 24ωρο στις : 1h 6h 12h και 24h.

Οι εκτιμήσεις του pH και της αγωγιμότητας έγιναν απευθείας με μηχανήματα του εργαστηρίου, το pHμετρο CONSORT C830 και το αγωγιμόμετρο Delta OHM, HD 2106.1 αντίστοιχα, ενώ για τα νιτρικά έγινε φωτομετρική εκτίμηση με χρήση πρότυπης καμπύλης η οποία φτιάχτηκε με βάση το θρεπτικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε.

Τα νιτρώδη στο θρεπτικό μέσο μετρήθηκαν με χρήση του αντιδραστηρίου Griess με βάση την ακόλουθη διαδικασία :

- Ανάμειξη σε ίσους όγκους των N-1-(naphthyl)-EDTA 1mg/ml και σουλφονικό οξύ ώστε να σχηματιστεί 10mg/ml διαλυμένο σε 5% φωσφορικό οξύ το αντιδραστήριο Griess.
- Διάλυμα για πρότυπη καμπύλη NaNO_2 1mM
- 20 μl Griess και 150 μl δείγματος επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
- Φωτομέτρηση στα 260 nm.

B.5 Μακροσκοπικές και μικροσκοπικές παρατηρήσεις των ιστών.

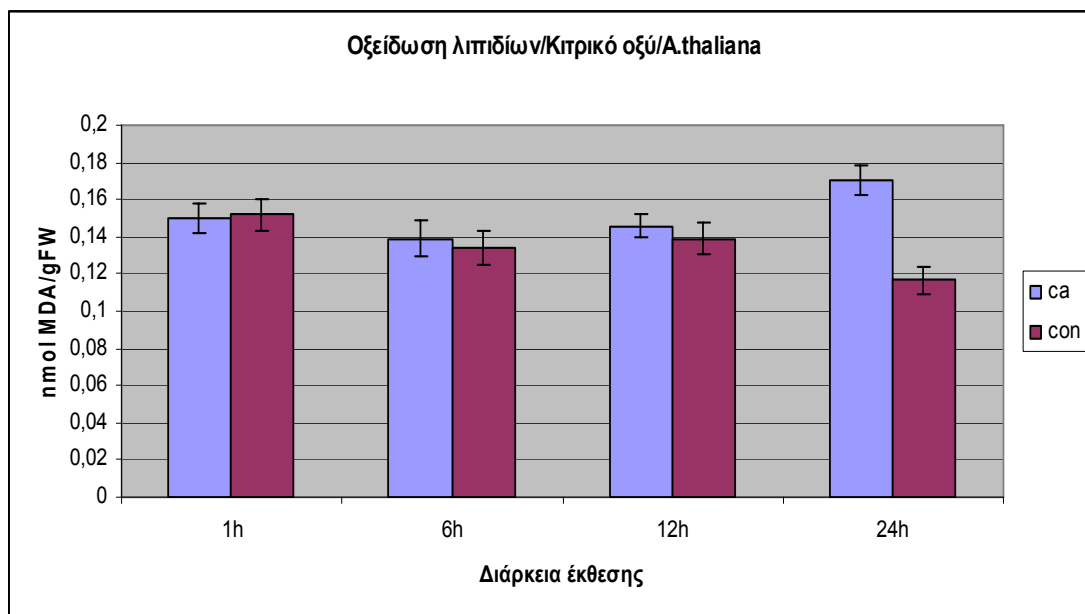
Κατά τη διάρκεια της προμεταχείρισης των ιστών έγιναν μακροσκοπικές παρατηρήσεις τόσο για τους κάλλους όσο του *Arabidopsis thaliana* και για τα φυτάρια του *Lemna minor*. Αυτές αφορούσαν στην παρατήρηση του χρώματος και της συνεκτικότητας των κάλλων ενώ για τα φυτάρια της λέμνας παρατηρήθηκε η ευρωστία των φύλλων και το μήκος της ρίζας. Στη συνέχεια μετά την προμεταχείριση και την εγκατάσταση των καλλιεργειών σε στερεό υπόστρωμα οι παρατηρήσεις που έγιναν στους κάλλους μακροσκοπικά ήταν η εξακρίβωση της εγκατάστασης της καλλιέργειας και μικροσκοπικά έγιναν εκτενής έλεγχος σε στερεοσκόπιο για την ανάπτυξη προεμβρυακών μαζών ή η ανάπτυξη σωματικών εμβρύων. Για τα φυτάρια της λέμνας έγινε μακροσκοπική παρατήρηση για την εγκατάσταση της καλλιέργειας και η παρατήρηση στο στερεοσκόπιο αφορούσε τον έλεγχο για απευθείας ανάπτυξη δομών ή ολοκληρωμένων σωματικών εμβρύων.

Γ. Αποτελέσματα

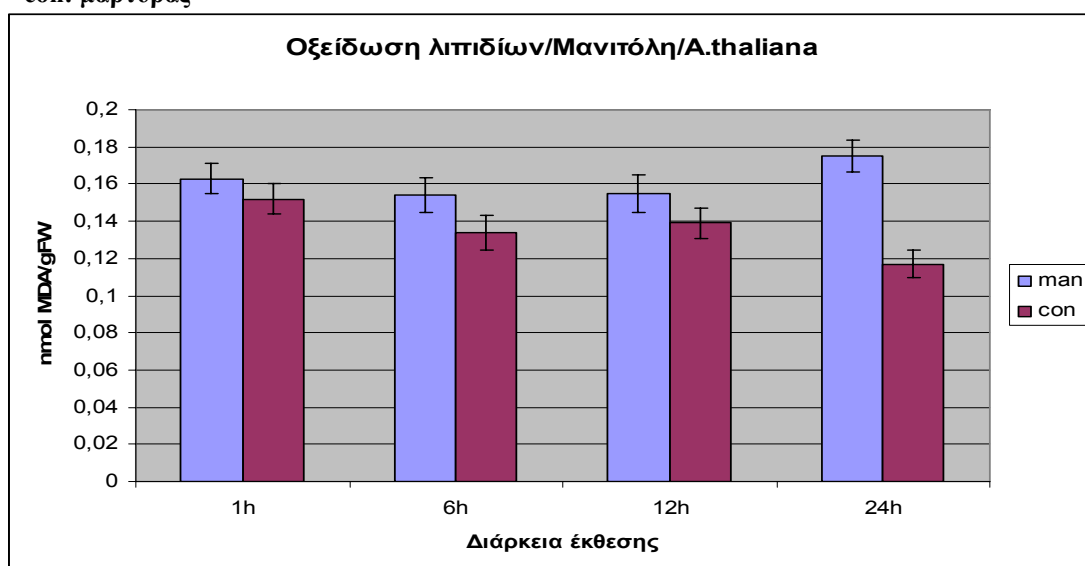
Γ.1 Βιοχημικές αναλύσεις

Γ1.1 Οξείδωση λιπιδίων

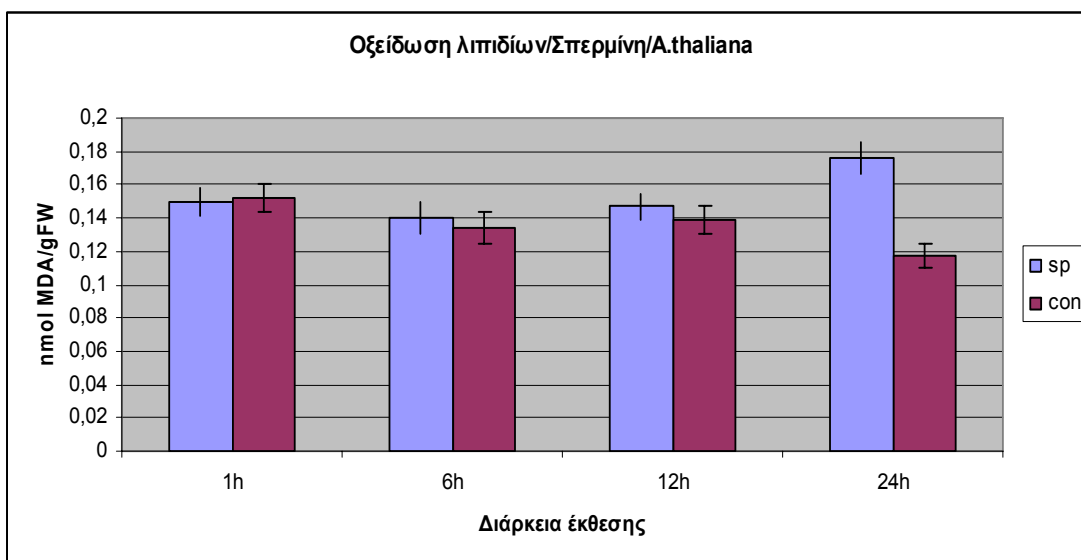
Για την εκτίμηση της έκτασης της οξείδωσης των μεμβρανικών λιπιδίων έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης της μηλονικής διαλδεύδης (MDA), ένα από τα προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων, στα δείγματα. Τα επόμενα διαγράμματα (διάγραμμα 1,2,3) δείχνουν τα αποτελέσματα για τους κάλλους του *A. thaliana*.



Διάγραμμα 1: Η οξείδωση λιπιδίων κατά τον χειρισμό με κιτρικό οξύ για το *A. thaliana*. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας



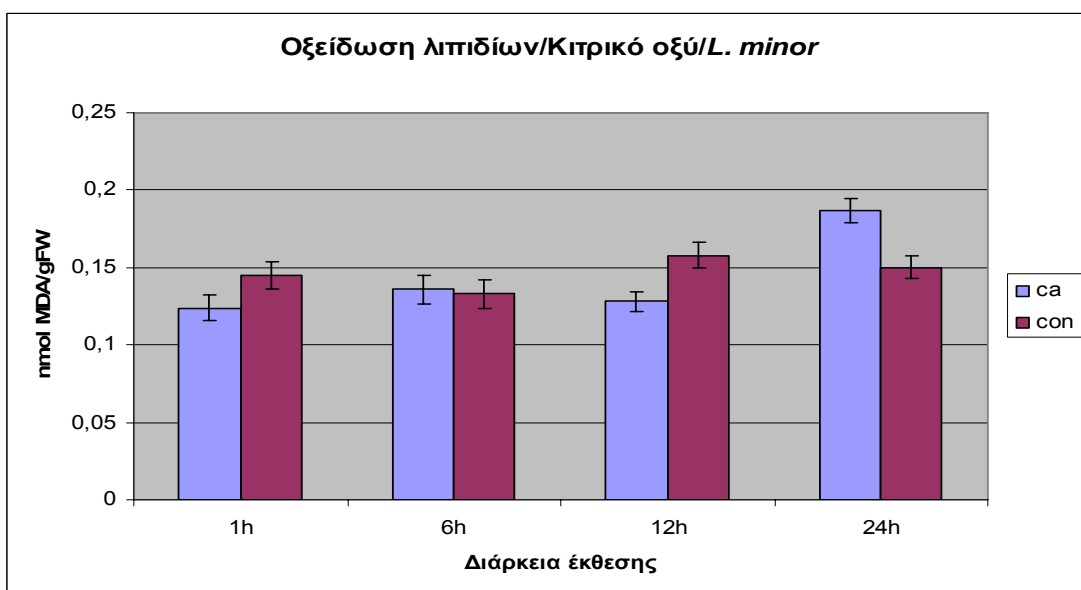
Διάγραμμα 2: Η οξείδωση λιπιδίων κατά τον χειρισμό με μανιτόλη για το *A. thaliana*. man: μανιτόλη, con: μάρτυρας.



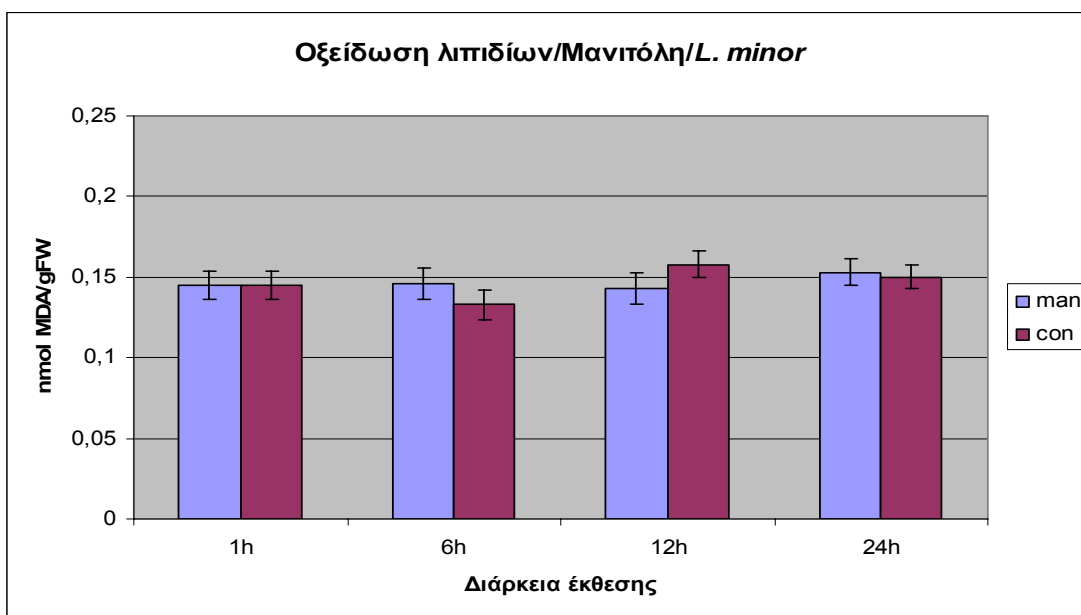
Διάγραμμα 3: Η οξειδωση λιπιδίων κατά τον χειρισμό με σπερμίνη για το *A. thaliana*. sp: σπερμίνη, con: μάρτυρας.

Όπως φαίνεται στα διαγράμματα κατά την πρώτη έκτη και δωδέκατη ώρα της προμεταχείρισης η οξειδωση των λιπιδίων για τον χειρισμό με την σπερμίνη και το κιτρικό οξύ κυμαίνεται κοντά στα επίπεδα του μάρτυρα ενώ κατάτι αυξημένη από τον μάρτυρα ήταν η συγκέντρωση της MDA στη μανιτόλη. Στη συνέχεια όμως η μέτρηση στις 24 ώρες έδειξε αρκετά μεγαλύτερη διαφορά από τον μάρτυρα και για τις τρεις ουσίες κιτρικό οξύ, μανιτόλη και σπερμίνη. Αντίθετα στον μάρτυρα παρατηρήθηκε σταδιακή πτώση με τον χρόνο.

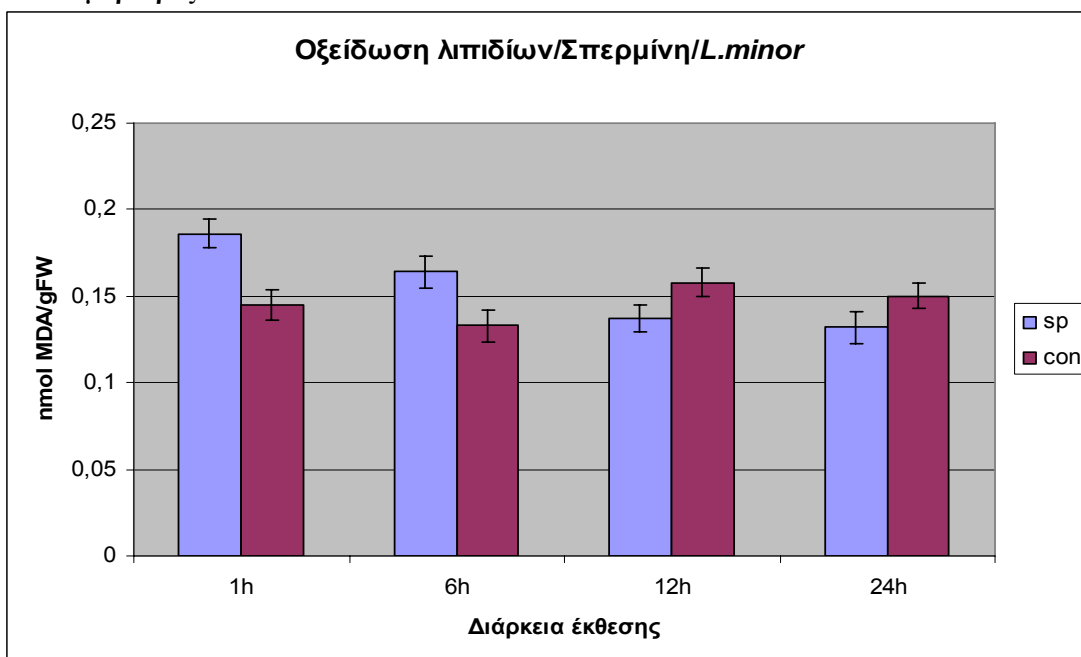
Στα παρακάτω διαγράμματα (διάγραμμα 4,5,6) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα φυτάρια *L. minor*.



Διάγραμμα 4: Η οξειδωση λιπιδίων κατά τον χειρισμό με κιτρικό οξύ για την *L. minor*. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας.



Διάγραμμα 5: Η οξείδωση λιπιδίων κατά τον χειρισμό με μανιτόλη για την *L. minor*. man: μανιτόλη, con: μάρτυρας.



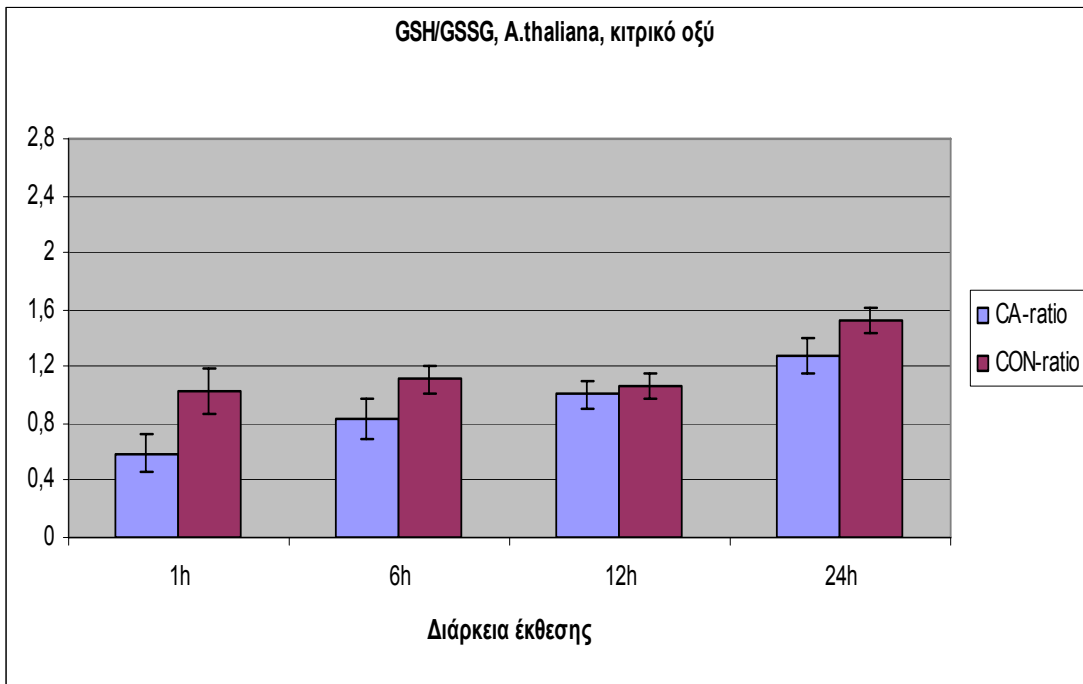
Διάγραμμα 6: Η οξείδωση των λιπιδίων κατά τον χειρισμό με σπερμίνη για την *L. minor*. sp: σπερμίνη, con: μάρτυρας.

Για τα φυτά της *L. minor* και στους 3 χειρισμούς και στους τρεις χειρισμούς φαίνεται διαφορετική αντίδραση όσο αφορά στην οξείδωση λιπιδίων. Όταν χρησιμοποιείται κιτρικό οξύ φαίνεται πως η συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεύδης αρχικά να κυμαίνεται στα επίπεδα του μάρτυρα και λίγο χαμηλότερα ενώ στις 24 ώρες υπάρχει μια σαφής διαφορά στη συγκέντρωση της MDA με τον μάρτυρα. Στο χειρισμό με μανιτόλη δεν υπάρχουν διαφοροποιήσεις με τον μάρτυρα ενώ

στη σπερμίνη η συγκέντρωση της MDA φαίνεται να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου και να φτάνει και σε επίπεδα μικρότερα από αυτά του μάρτυρα.

Γ.1.2 Γλουταθειόνη

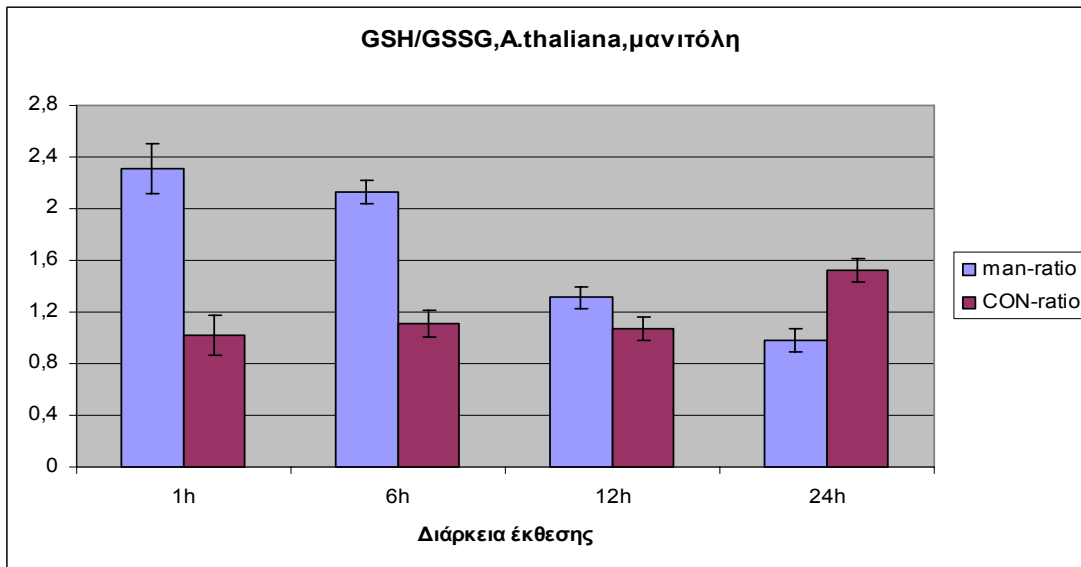
Για την εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών που μελετήθηκαν εκτός από την έκταση της οξείδωσης των μεμβρανικών λιπιδίων μετρήθηκε και ο λόγος ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) προς οξειδωμένη (GSSG). Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε ο τύπος (ολικήGSH-GSSG)/GSSG για τη μέτρηση της αναλογίας. Όσο ο λόγος ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης αυξάνεται σημαίνει πως για δεδομένη συγκέντρωση ολικής GHS τα μόρια της οξειδωμένης γλουταθειόνης μειώνονται επομένως υψηλή τιμή του λόγου παραπέμπει σε μικρό εύρος ενεργοποίησης του αντιοξειδωτικού συστήματος της γλουταθειόνης. Οι μονάδες μέτρησης της γλουταθειόνης είναι nmolGSH ήGSSG/gFW. Τα διαγράμματα 7 , 8 και 9 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα για τους κάλλους του *A.thaliana*.



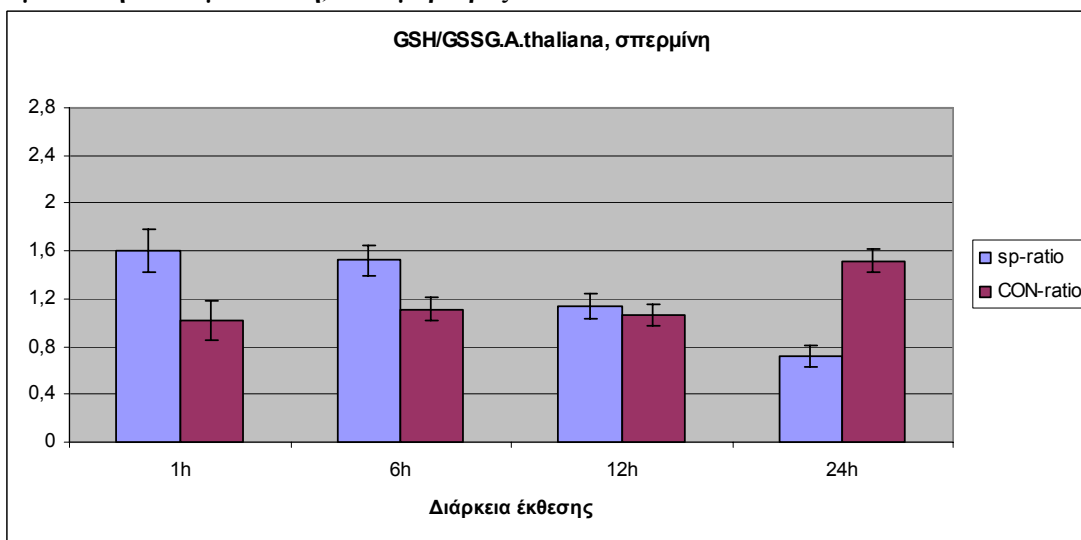
Διάγραμμα 7: Λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης για το *A. thaliana* κατά τον χειρισμό με κιτρικό οξύ. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας

Σε αυτή τη μέτρηση για το χειρισμό με το κιτρικό οξύ για τους κάλλους του *A.thaliana* τα αποτελέσματα δείχνουν πως τιμές των λόγων ξεκινούν από χαμηλά και καθόλη τη διάρκεια των μετρήσεων δεν ξεπερνάνε την τιμή του μάρτυρα. Αντίθετα στη σπερμίνη όπως φαίνεται στο διάγραμμα 9 η τιμή του λόγου ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης ξεκινά από τιμή σχεδόν

διπλάσια από αυτή του μάρτυρα αλλά καταλήγει στο 24ωρο να είναι αισθητά κάτω από τον μάρτυρα. Μεγάλη διαφοροποίηση παρουσιάζεται στις δύο πρώτες μετρήσεις στη μανιτόλη όπου η τιμή του λόγου είναι πάνω από το διπλάσιο αυτής του μάρτυρα ενώ τελικά καταλήγει και στην περίπτωση της μανιτόλης ο λόγος ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης να έχει μικρότερη τιμή από αυτή του μάρτυρα.



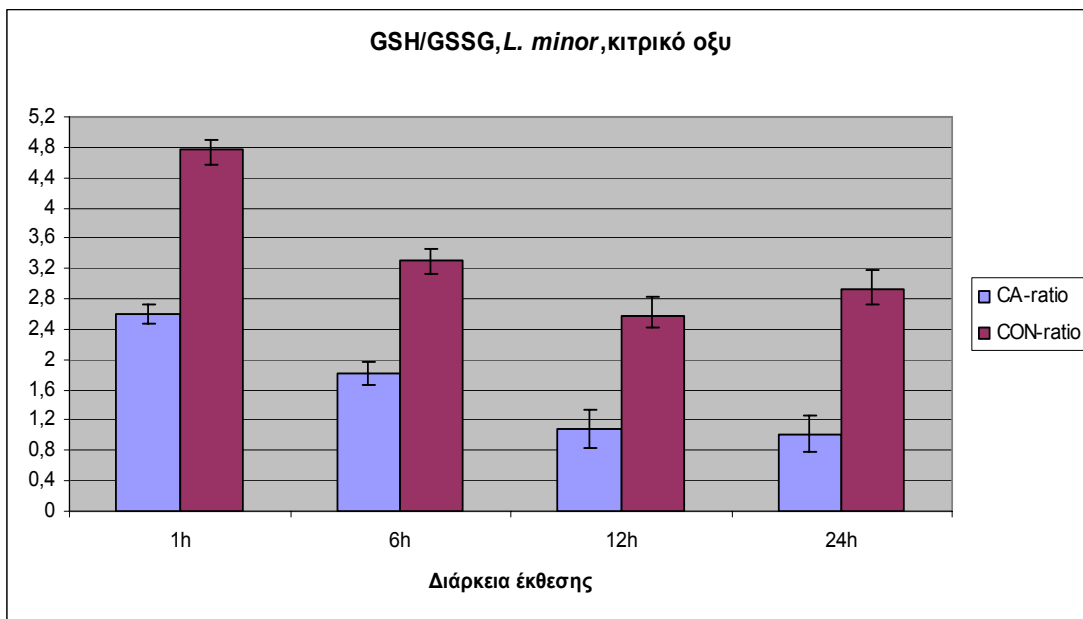
Διάγραμμα 8: Λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης για το *A. thaliana* κατά τον χειρισμό με μανιτόλη. man: μανιτόλη, con: μάρτυρας.



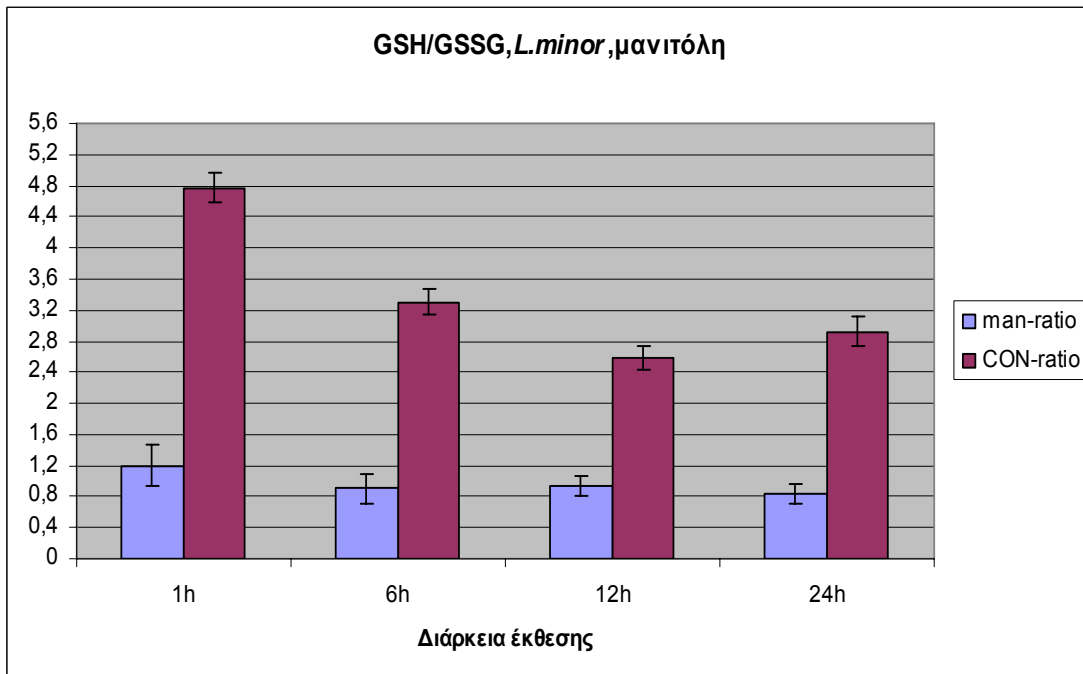
Διάγραμμα 9: Λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης για το *A. thaliana* κατά τον χειρισμό με σπερμίνη. sp: σπερμίνη, con: μάρτυρας.

Τα αποτελέσματα για τα φυτά *L. minor* φαίνονται στα διαγράμματα 10, 11 και 12. Με την πρώτη ματιά σε όλους τους χειρισμούς τιμή του λόγου GSHαν/GSSG είναι μικρότερη από αυτές του

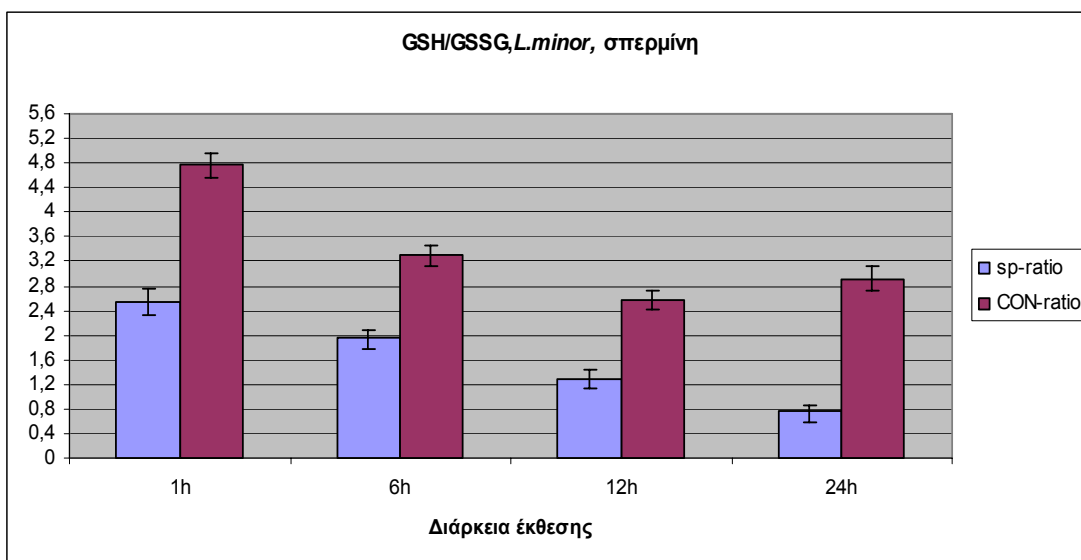
μάρτυρα μάλιστα στο χειρισμό με τη μανιτόλη παρατηρούνται σταθερά χαμηλές τιμές χαμηλότερες και από αυτές των άλλων χειρισμών.



Διάγραμμα 10: Λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης για την *L. minor* κατά τον χειρισμό με κιτρικό οξύ. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας



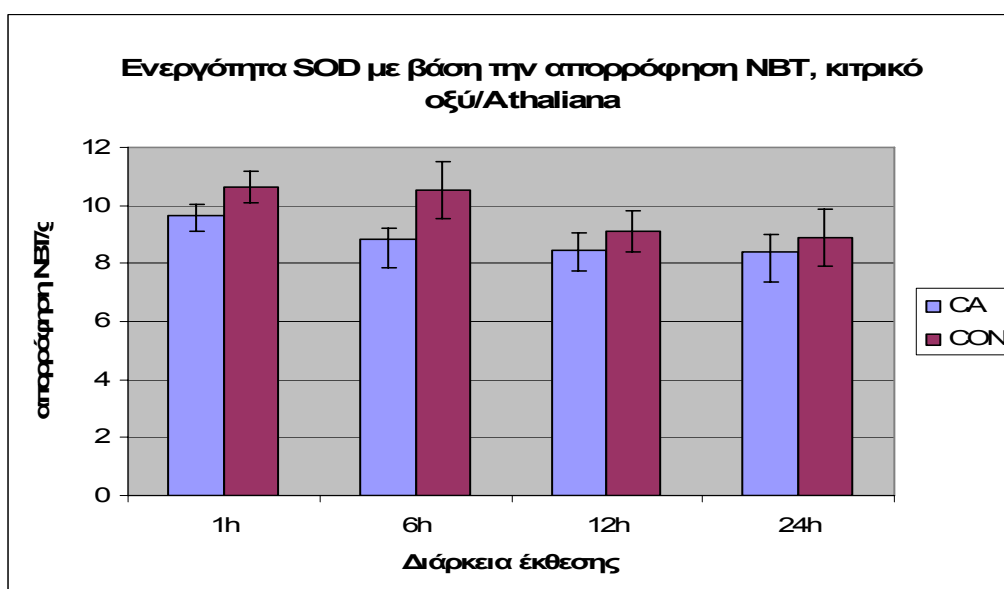
Διάγραμμα 11: Λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης για την *L. minor* κατά τον χειρισμό με μανιτόλη. man: μανιτόλη, con: μάρτυρας.



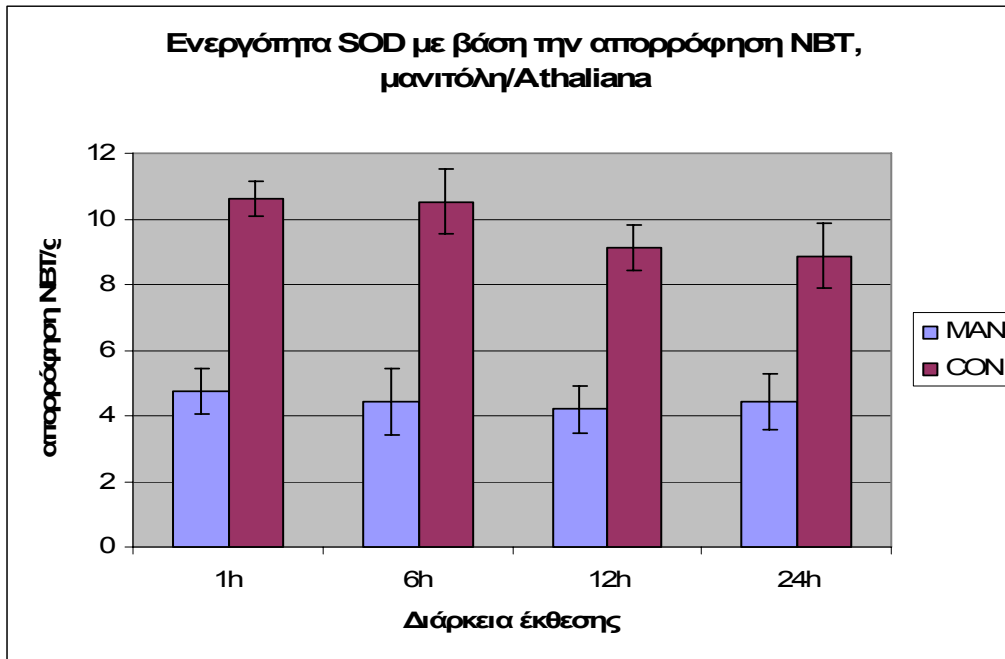
Διάγραμμα 12: Λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης για την *L.minor* κατά τον χειρισμό με σπερμίνη. sp: σπερμίνη, con:μάρτυρας.

Γ.1.3 Σχετική ενεργότητα SOD

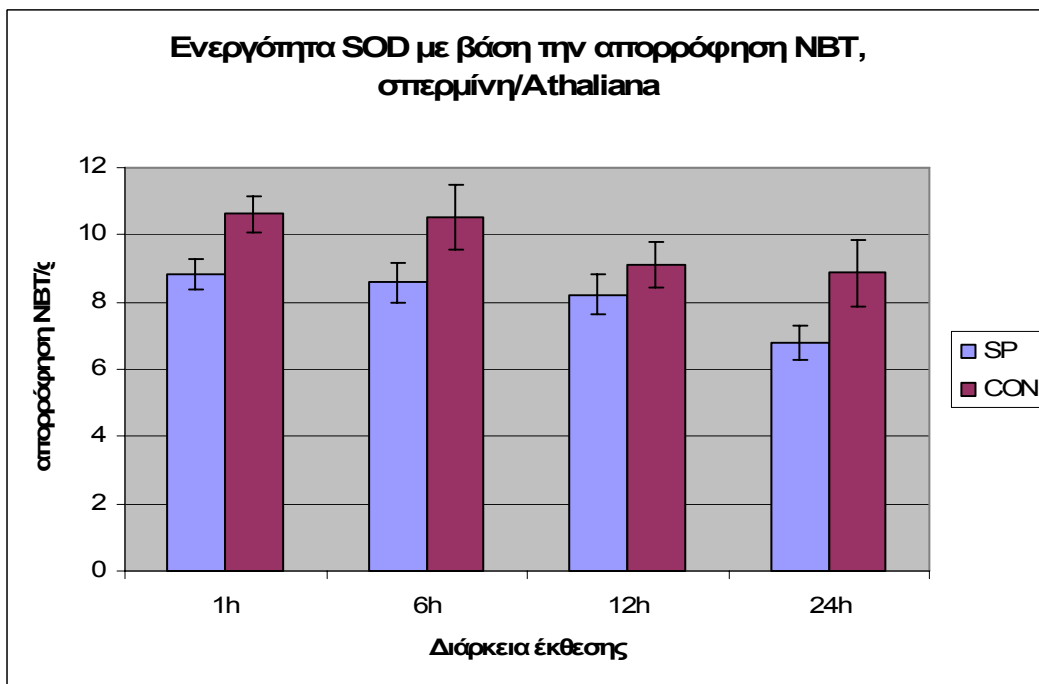
Τα αποτελέσματα για την ενεργότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης παρουσιάζονται εκφρασμένα σε απορρόφηση του NBT ανά γραμμάριο νεπού βάρους. Στα διαγράμματα 13, 14 και 15 παρατίθενται τα αποτελέσματα για τους κάλλους του *A. thaliana*. Φαίνεται πως η ενεργότητα του ενζύμου τόσο στο κιτρικό οξύ όσο και στη σπερμίνη κυμαίνεται στα επίπεδα του μάρτυρα αλλά σχετικά χαμηλότερη από αυτή του μάρτυρα. Αντίθετα είναι σαφής η διαφορά της ενεργότητας της SOD στο χειρισμό με τη μανιτόλη.



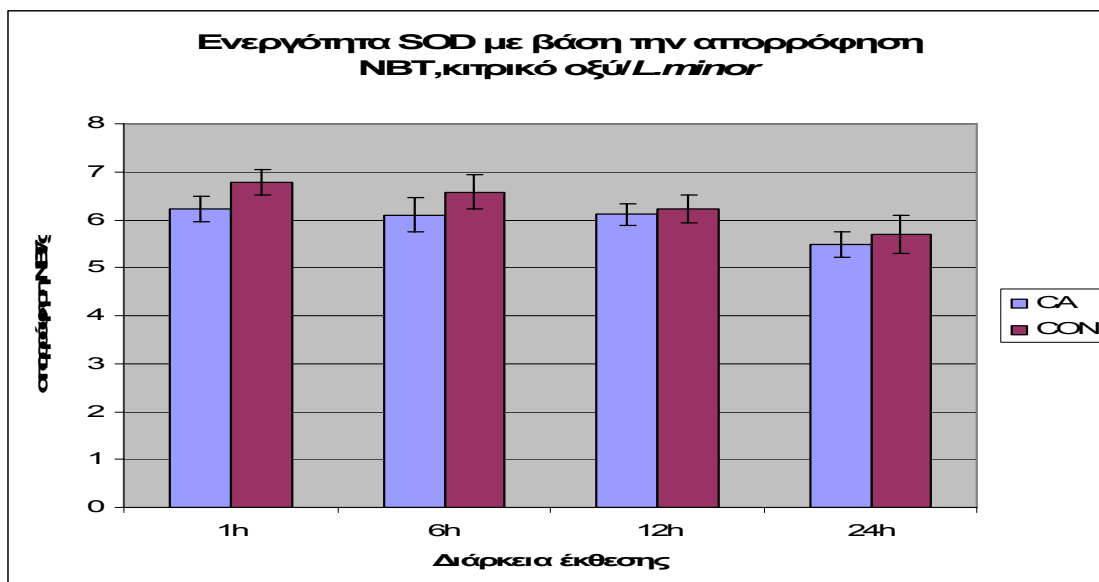
Διάγραμμα 13: Ενεργότητα SOD κατά τον χειρισμό με κιτρικό οξύ για το *A. thaliana* ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας



Διάγραμμα 14: Ενεργότητα SOD κατά τον χειρισμό με μανιτόλη για το *A. thaliana*. man: μαννιτόλη, con: μάρτυρας.

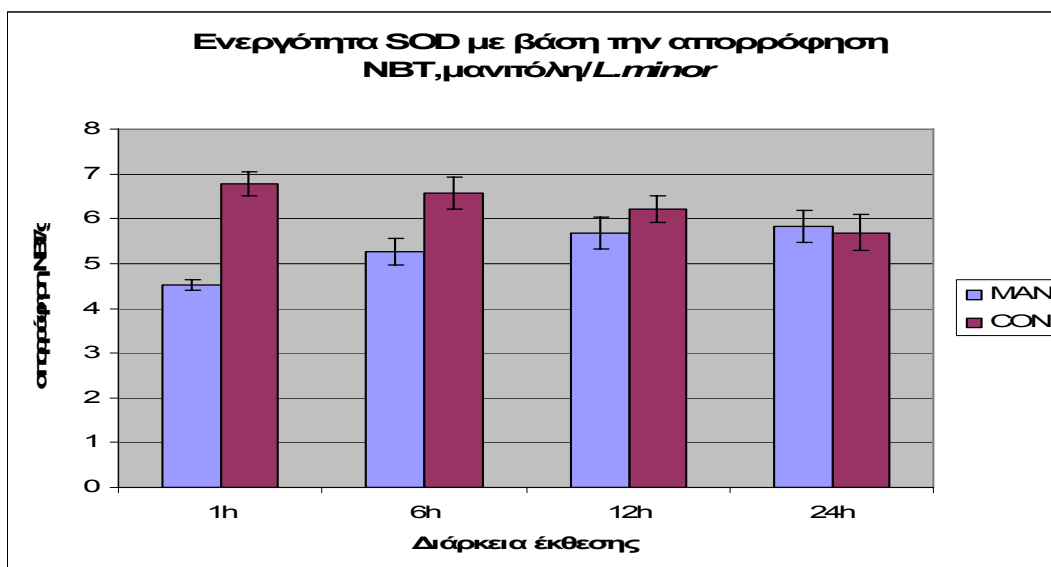


Διάγραμμα 15: Ενεργότητα SOD κατά τον χειρισμό με σπερμίνη για το *A. thaliana*. sp: σπερμίνη, con: μάρτυρας.

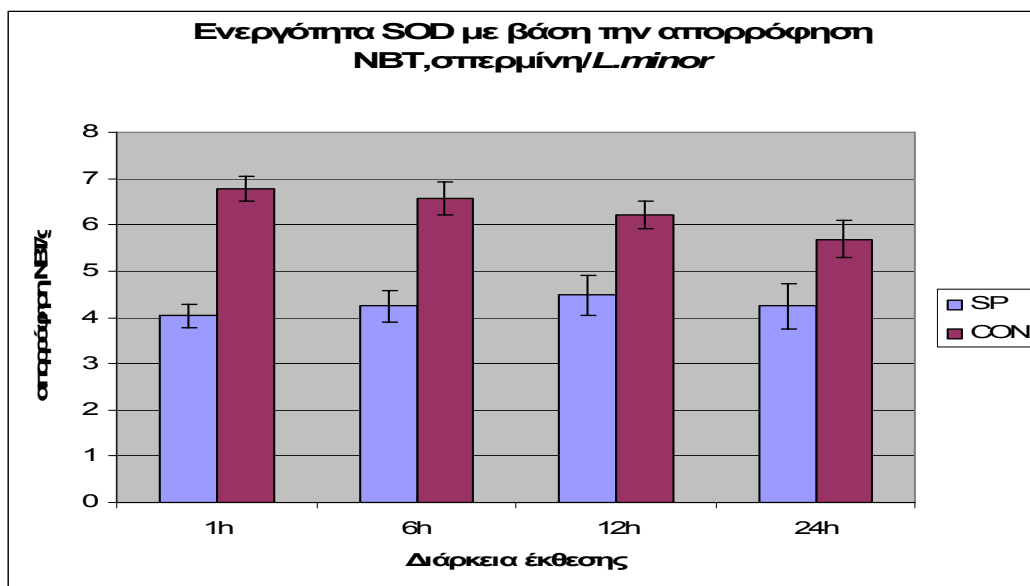


Διάγραμμα 16: Ενεργότητα SOD κατά τον χειρισμό με κιτρικό οξύ για την *L. minor*. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας

Στη συνέχεια τα αποτελέσματα της ενεργότητας της SOD για τα φυτάρια *L.minor* παρουσιάζονται στα διαγράμματα 16, 17 και 18. Σε όλους τους χειρισμούς οι τιμές της απορρόφησης του NBT είναι μικρότερες από αυτές του μάρτυρα. Στο κιτρικό οξύ η ενεργότητα της SOD είναι κοντά σε αυτή του μάρτυρα ενώ στη μανιτόλη η απορρόφηση ξεκινά από χαμηλά επίπεδα και αυξάνεται σε σχέση με το χρόνο. Στη σπερμίνη παρατηρείται η μεγαλύτερη διαφορά από το μάρτυρα και επιπλέον δεν σημειώνεται σημαντική αυξομείωση στην απορρόφηση με την πάροδο του χρόνου.



Διάγραμμα 17: Ενεργότητα SOD κατά τον χειρισμό με μανιτόλη για την *L. minor*. man: μανιτόλη, con: μάρτυρας.



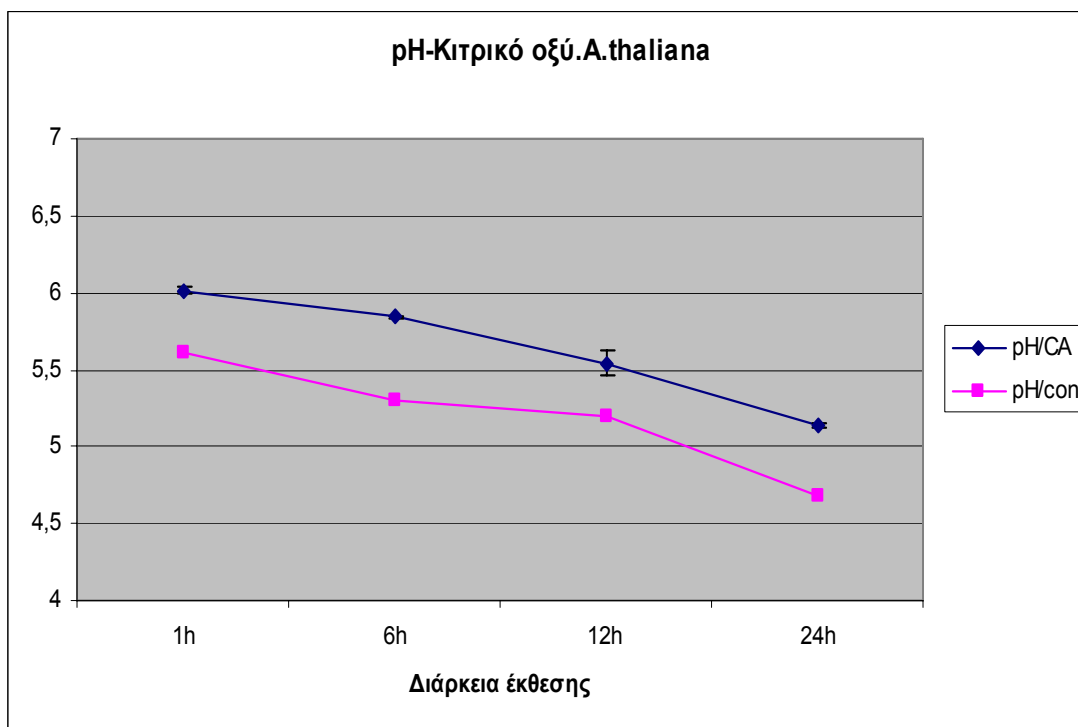
Διάγραμμα 18: Ενεργότητα SOD κατά τον χειρισμό με σπερμίνη για την *L. minor*. sp: σπερμίνη, con:μάρτυρας.

Γ.2 Αναλύσεις των διαλυμάτων προμεταχείρισης

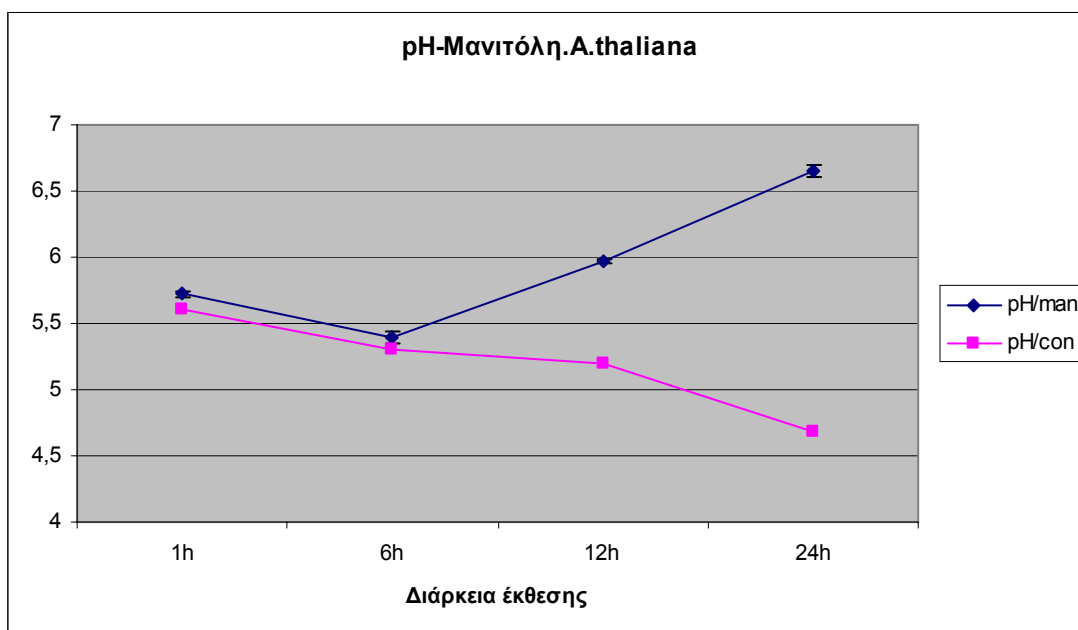
Γ.2.1 Μέτρηση pH

Οι μετρήσεις στο pH των διαλυμάτων προμεταχείρισης έγιναν τη στιγμή που γινόταν η δειγματοληψία των ιστών. Στα παρακάτω διαγράμματα 19, 20 και 21 φαίνεται η διακύμανση του pH στο υγρό θρεπτικό μέσο κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε κάθε χειρισμό για τους κάλλους του *Arabidopsis thaliana*.

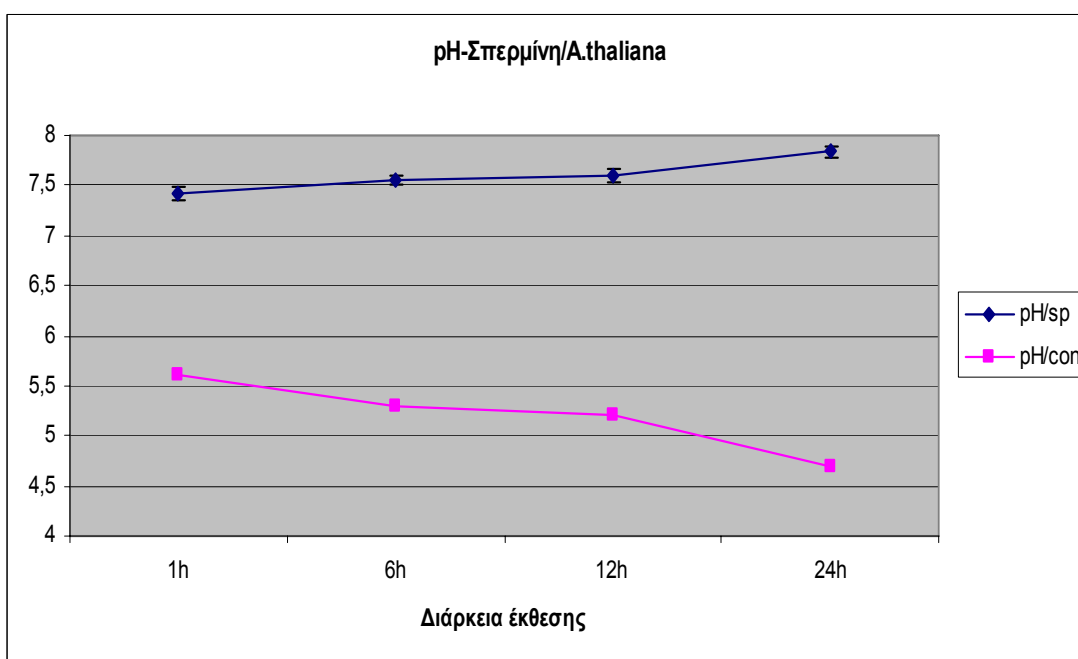
Στο διάγραμμα 19 που φαίνεται η διακύμανση του pH κατά τον χειρισμό με το κιτρικό οξύ παρατηρείται πως το pH είναι ελαφρώς υψηλότερο από αυτό του μάρτυρα ενώ μειώνεται σταθερά η τιμή του καθ' όλη τη διάρκεια του 24ώρου. Στο διάλυμα με την μανιτόλη (διάγραμμα 20) ενώ αρχικά το pH κυμαίνεται στα επίπεδα του μάρτυρα από τις 6 έως τις 24 ώρες επώασης αυξάνεται ξεπερνώντας στην τελευταία μέτρηση και το 6,5. Τέλος το θρεπτικό διάλυμα με τη σπερμίνη (διάγραμμα 21) καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης έχει μια τιμή στο pH πολύ υψηλότερη από αυτή του μάρτυρα, κοντά στο 7,5 η οποία με το πέρασμα του χρόνου τείνει στην τιμή 8.



Διάγραμμα 19: Διακύμανση του pH στο θρεπτικό μέσο προμεταχείρισης κατά τον χειρισμό με κιτρικό οξύ για το *A.thaliana*. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας.



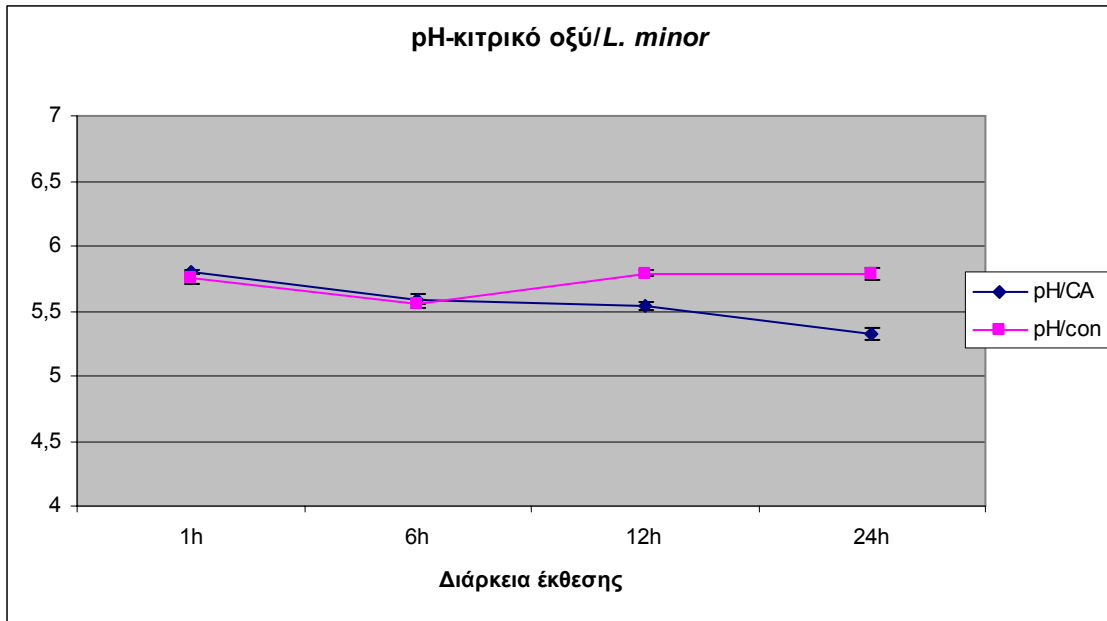
Διάγραμμα 20: Διακύμανση του pH στο θρεπτικό μέσο προμεταχείρισης κατά τον χειρισμό με μανιτόλη για το *A.thaliana*. man: μαννιτόλη, con: μάρτυρας.



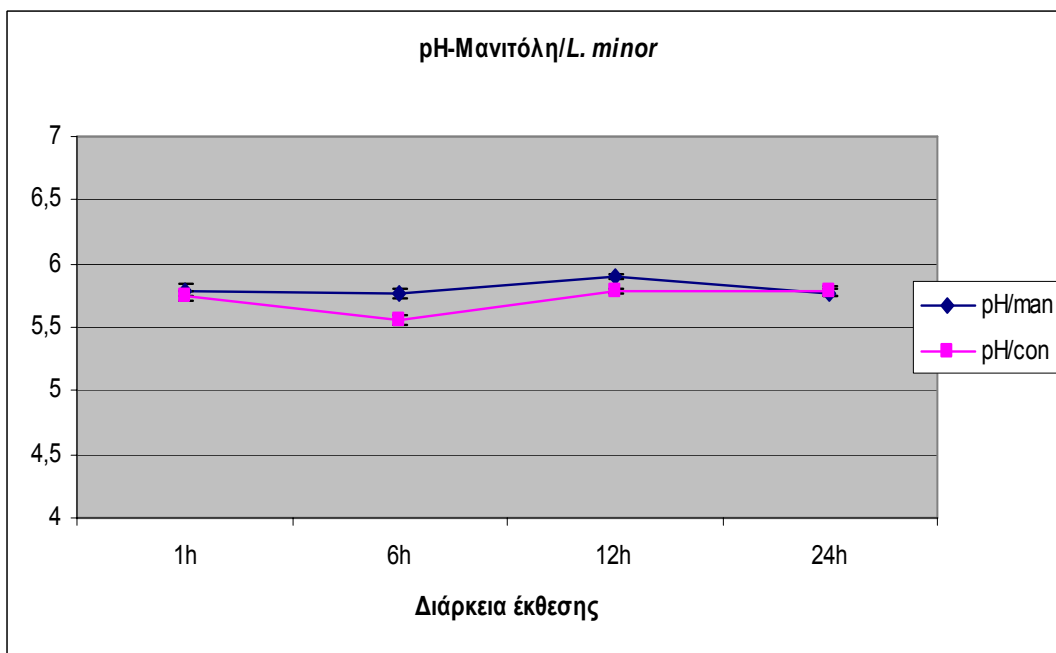
Διάγραμμα 21: Διακύμανση του pH στο θρεπτικό μέσο προμεταχείρισης κατά τον χειρισμό με σπερμίνη για το *A.thaliana*. sp: σπερμίνη, con:μάρτυρας.

Στα διαγράμματα 22, 23 και 24 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων του pH για τα φυτά του *Lemna minor*. Κατά τον χειρισμό με το κιτρικό οξύ το pH έχει σταθερά πτωτική πορεία ενώ αυτό του μάρτυρα κυμαίνεται στο διάστημα 5,5-6,0 το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τον μάρτυρα για τους κάλλους του *A. thaliana* όπου και εκεί φαίνεται μια σταθερά πτωτική πορεία. Στον χειρισμό με την μανιτόλη η διακύμανση του pH γίνεται πάλι στο διάστημα 5,5-6,0 όπως στο μάρτυρα ενώ στο

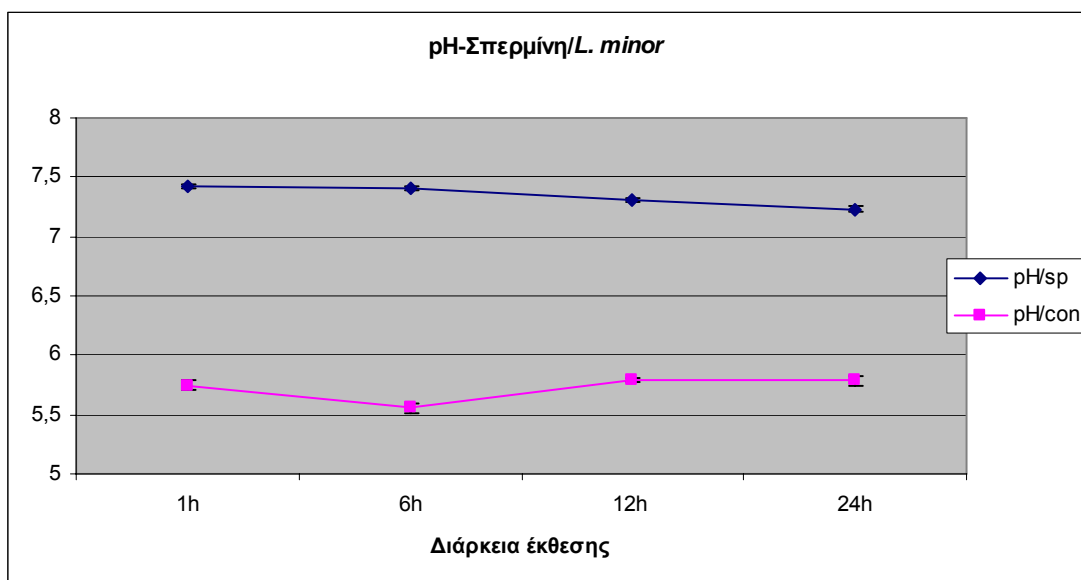
διάλυμα με τη σπερμίνη υπάρχει μια απότομη αύξηση κοντά στο 7,5 και κατά τη διάρκεια των μετρήσεων η τιμή του pH κινείται στο διάστημα 7,5-7,0.



Διάγραμμα 22: Διακύμανση του pH στο θρεπτικό μέσο προμεταχείρισης κατά τον χειρισμό με κιτρικό οξύ για τη *L. minor*. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας.



Διάγραμμα 23: Διακύμανση του pH στο θρεπτικό μέσο προμεταχείρισης κατά τον χειρισμό με μανιτόλη για τη *L. minor*. man: μαννιτόλη, con: μάρτυρας.

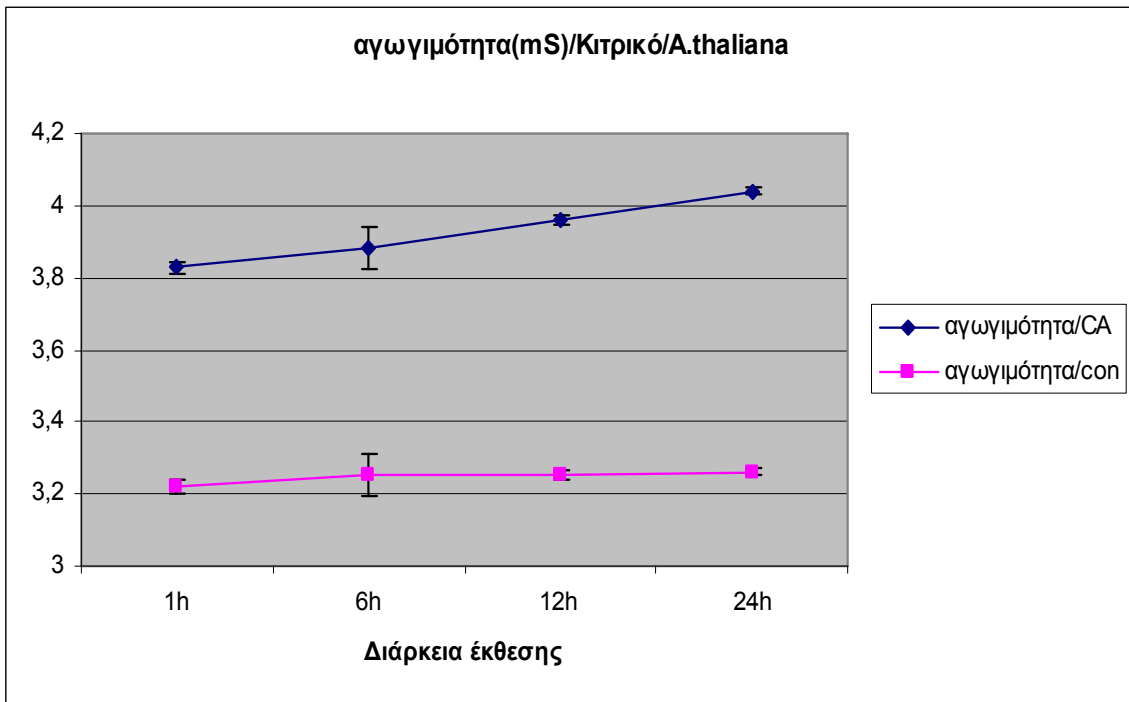


Διάγραμμα 24: Διακύμανση του pH στο θρεπτικό μέσο προμεταχείρισης κατά τον χειρισμό με σπερμίνη για τη *L. minor*. sp: σπερμίνη, con:μάρτυρας.

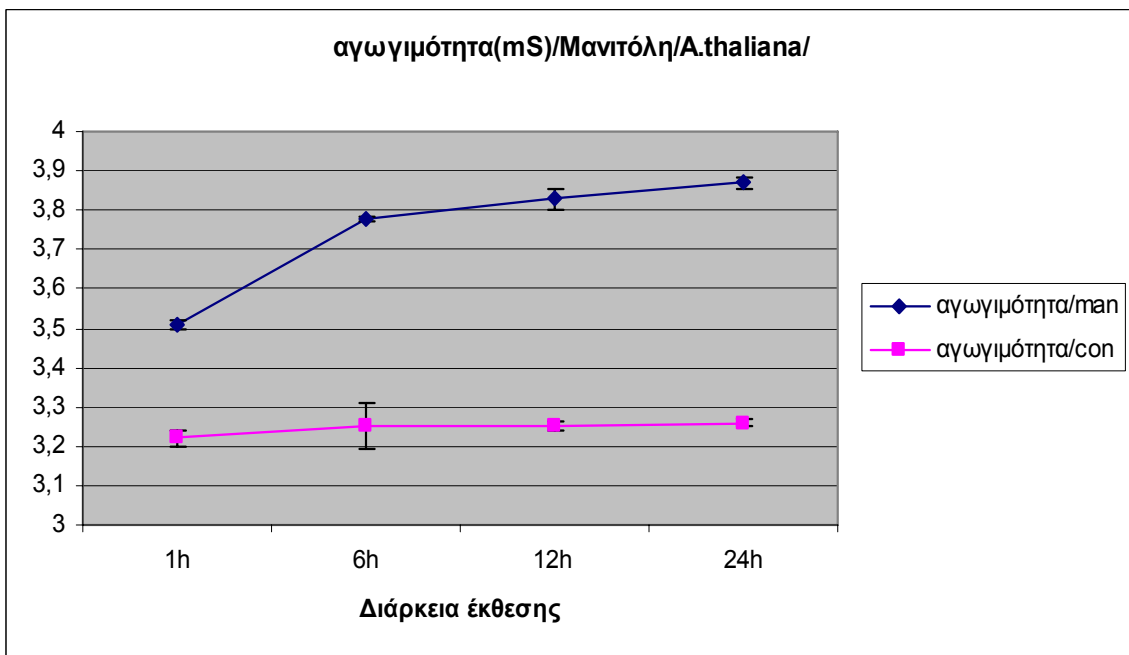
Γ.2.2 Μέτρηση αγωγιμότητας

Εδώ παρουσιάζεται η διακύμανση της αγωγιμότητας στα διαλύματα προμεταχείρισης για τους κάλλους του *A.thaliana* και τα φυτάρια της *Lemna minor*, όλες οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία 27 °C και η μονάδα μέτρησης είναι τα milliSiemens (mS). Χαρακτηριστικό των αποτελεσμάτων για τους κάλλου του *A.thaliana* που φαίνονται στα διαγράμματα 25, 26 και 27 είναι ότι ο μάρτυρας έχει αρκετά χαμηλότερη τιμή και από τους τρεις χειρισμούς. Όσο αφορά το διάλυμα με το κιτρικό οξύ η αγωγιμότητα ξεκινά από την υψηλότερη τιμή σε σχέση με του άλλους χειρισμούς και φτάνει και πάνω από τα 4 mS. Για τη μανιτόλη παρατηρείται μια σχετικά απότομη άνοδος και από τις 6 ώρες και μετά η αγωγιμότητα αυξάνει με μικρότερο ρυθμό. Στη σπερμίνη φαίνεται πως η αγωγιμότητα αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου πλησιάζει την τιμή αυτής του κιτρικού οξέως.

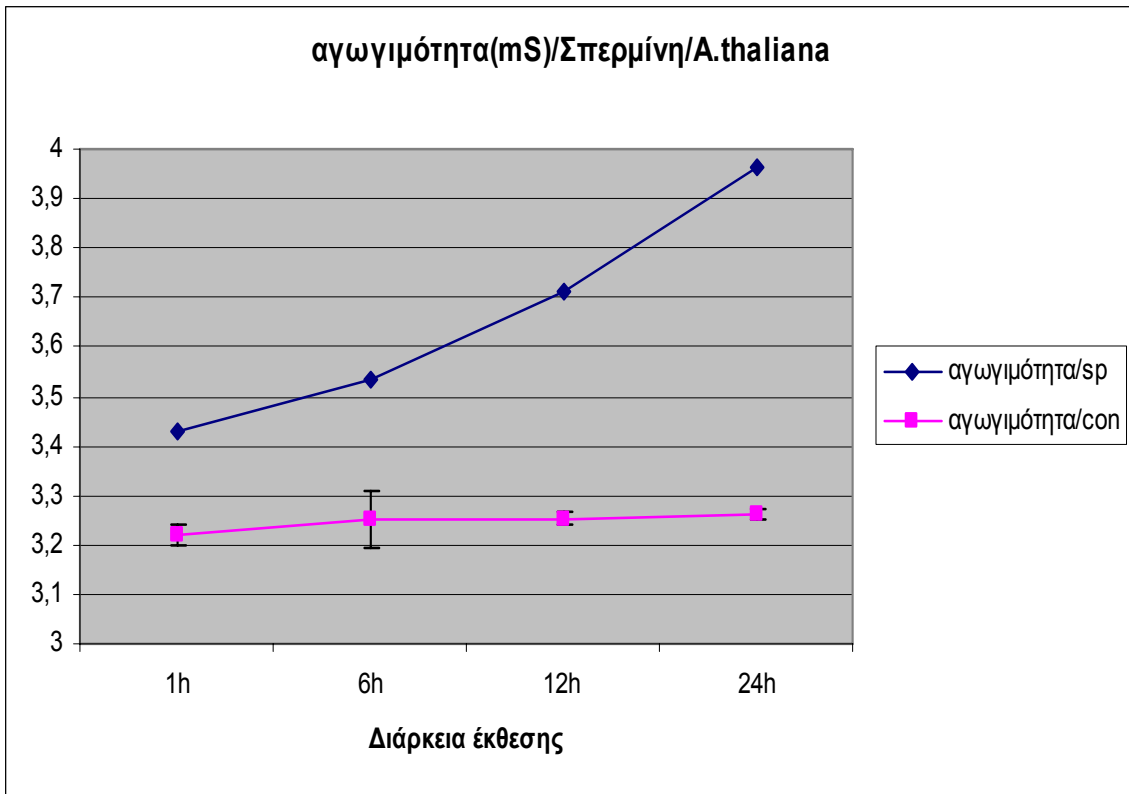
Για τα φυτάρια *Lemna minor* τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα 28, 29 και 30. Και για τους τρεις χειρισμούς, κιτρικό οξύ, μανιτόλη και σπερμίνη, οι τιμές της αγωγιμότητας είναι χαμηλότερες από αυτές των κάλλων του *A.thaliana* αλλά σταθερά υψηλότερες από αυτές του μάρτυρα. Βέβαια με εξαίρεση την περίπτωση του κιτρικού οξέως όπου φαίνονται αρκετά υψηλές τιμές στους άλλους δύο χειρισμούς η αγωγιμότητα αρχικά κυμαίνεται στα επίπεδα του μάρτυρα. Τέλος άλλο ένα χαρακτηριστικό των αποτελεσμάτων είναι ότι οι μάρτυρες μεταξύ των κάλλων του *A.thaliana* και των φυταρίων της *Lemna minor* παρουσιάζουν διαφορές τόσο στο ρυθμό μεταβολής όσο και στο γεγονός ότι στο μάρτυρα για τη *Lemna minor* υπάρχει ένα μεγαλύτερο εύρος στο οποίο κυμαίνονται οι τιμές της αγωγιμότητας.



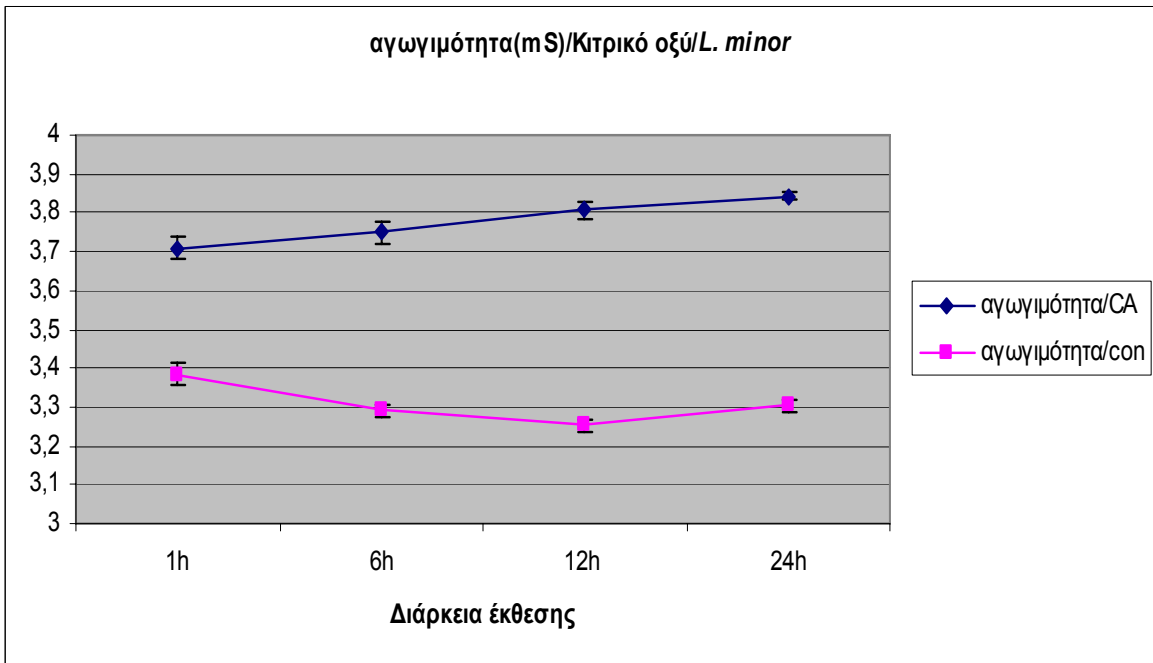
Διάγραμμα 25: Διακύμανση της αγωγιμότητας κατά τον χειρισμό με κιτρικό οξύ για το *A. thaliana*. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας.



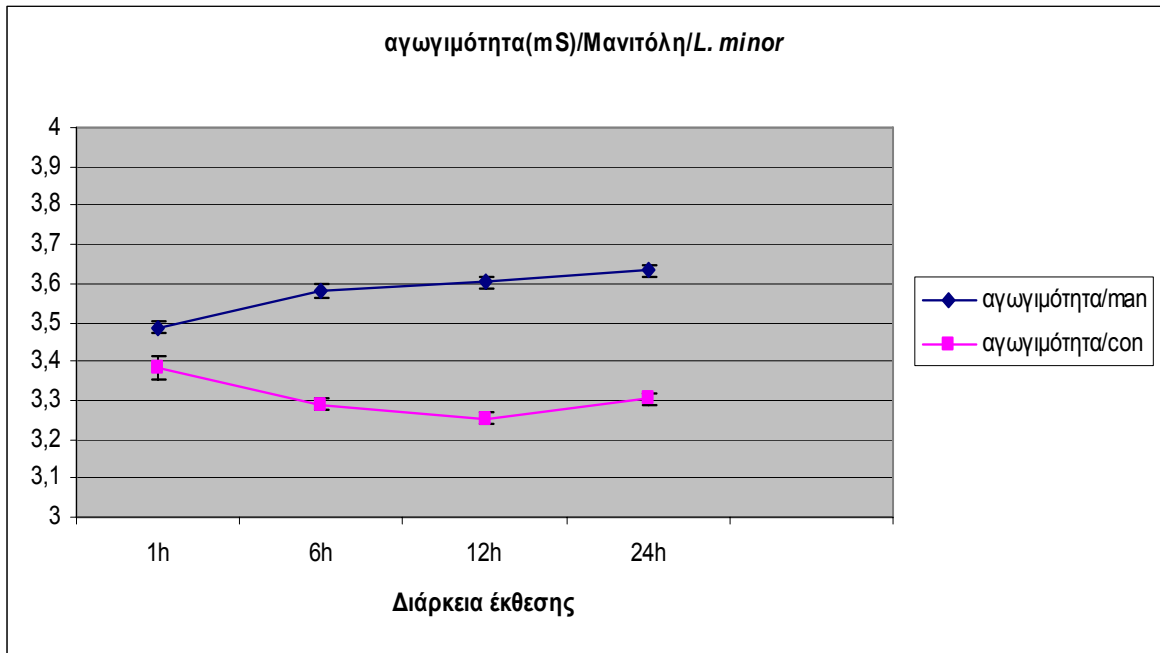
Διάγραμμα 26: Διακύμανση της αγωγιμότητας κατά τον χειρισμό με μανιτόλη για το *A. thaliana*. man: μανιτόλη, con: μάρτυρας.



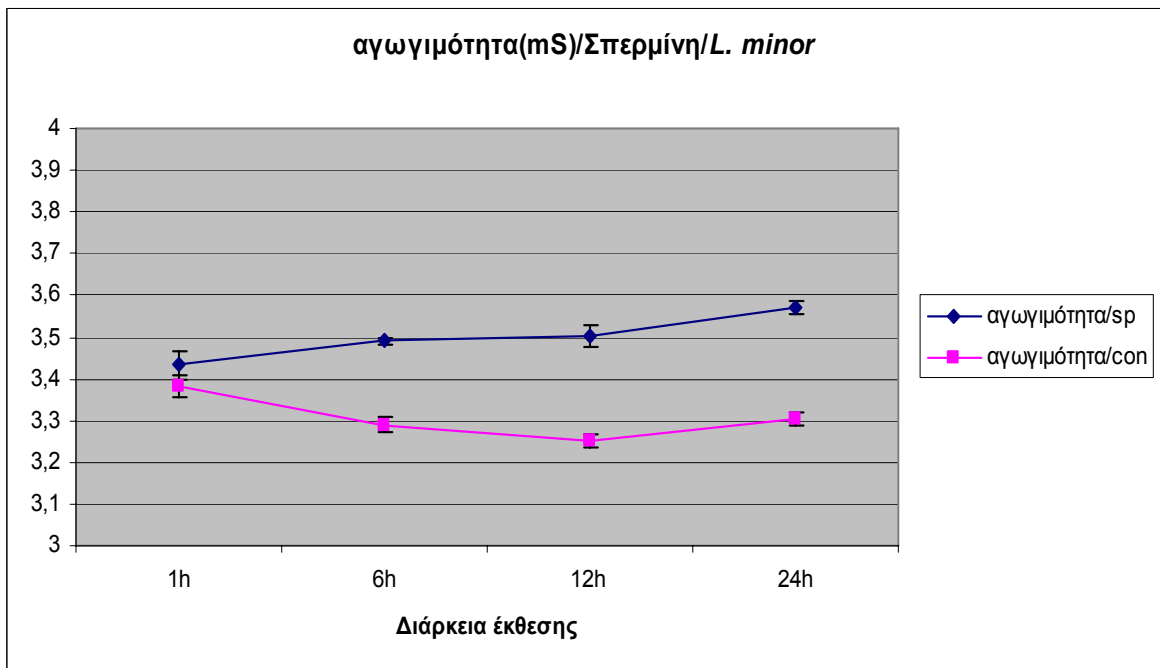
Διάγραμμα 27: Διακύμανση της αγωγιμότητας κατά τον χειρισμό με σπερμίνη για το *A. thaliana*. sp: σπερμίνη, con:μάρτυρας.



Διάγραμμα 28: Διακύμανση της αγωγιμότητας κατά τον χειρισμό με κιτρικό οξύ για τη *L. minor*. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας.



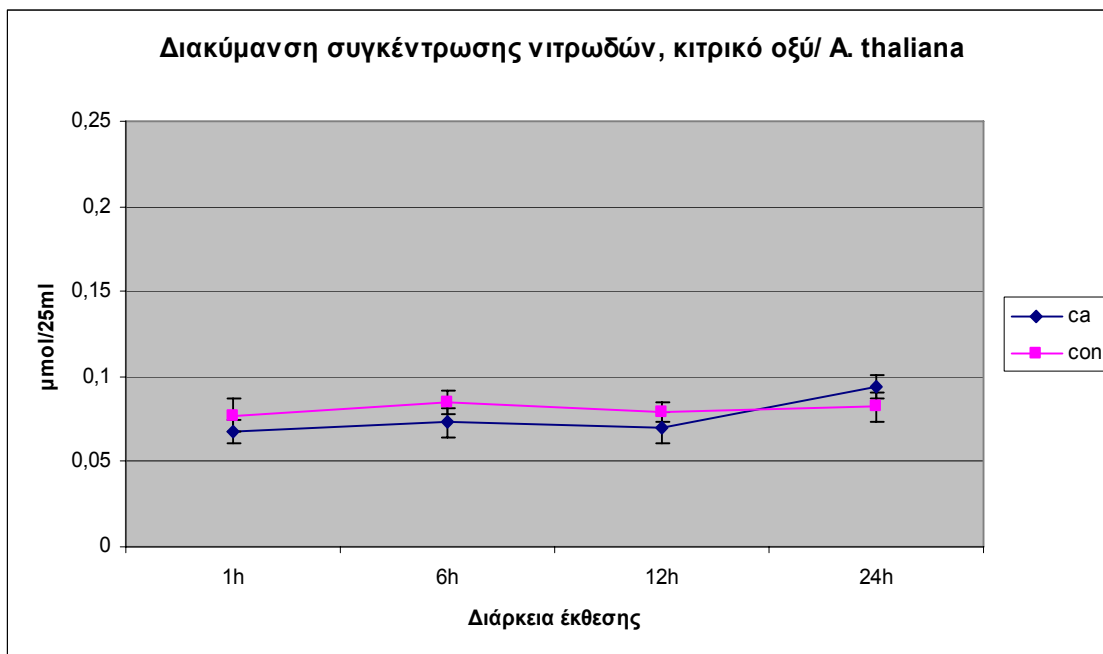
Διάγραμμα 29: Διακύμανση της αγωγιμότητας κατά τον χειρισμό με μανιτόλη για τη *L. minor*. man: μανιτόλη, con: μάρτυρας.



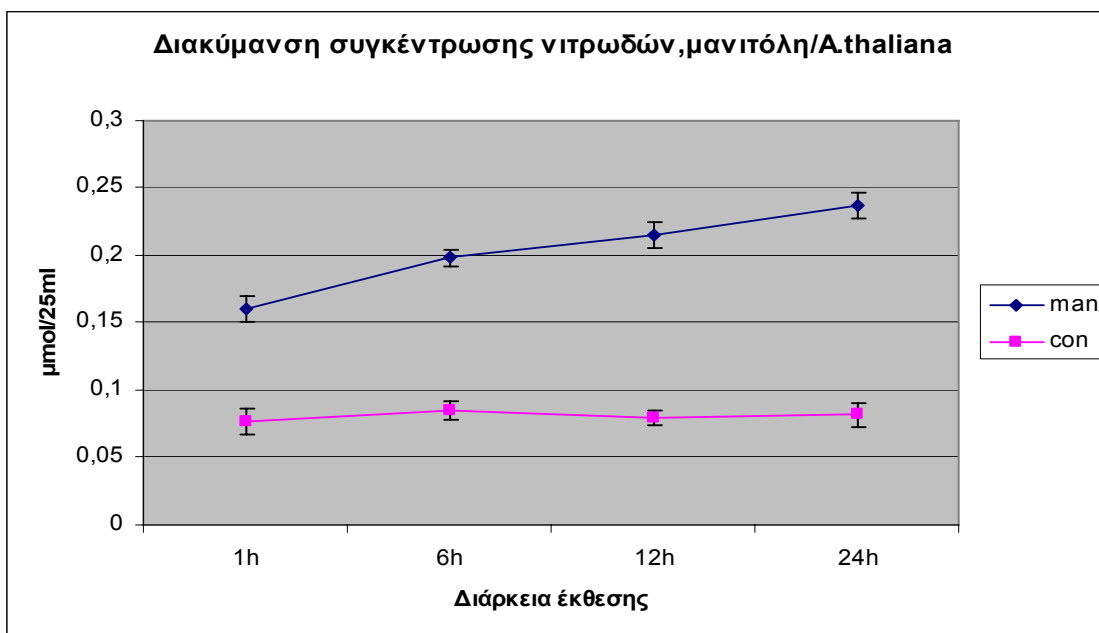
Διάγραμμα 30: Διακύμανση της αγωγιμότητας κατά τον χειρισμό με σπερμίνη για τη *L. minor*. sp: σπερμίνη, con: μάρτυρας.

Γ.2.3 Μέτρηση νιτρωδών

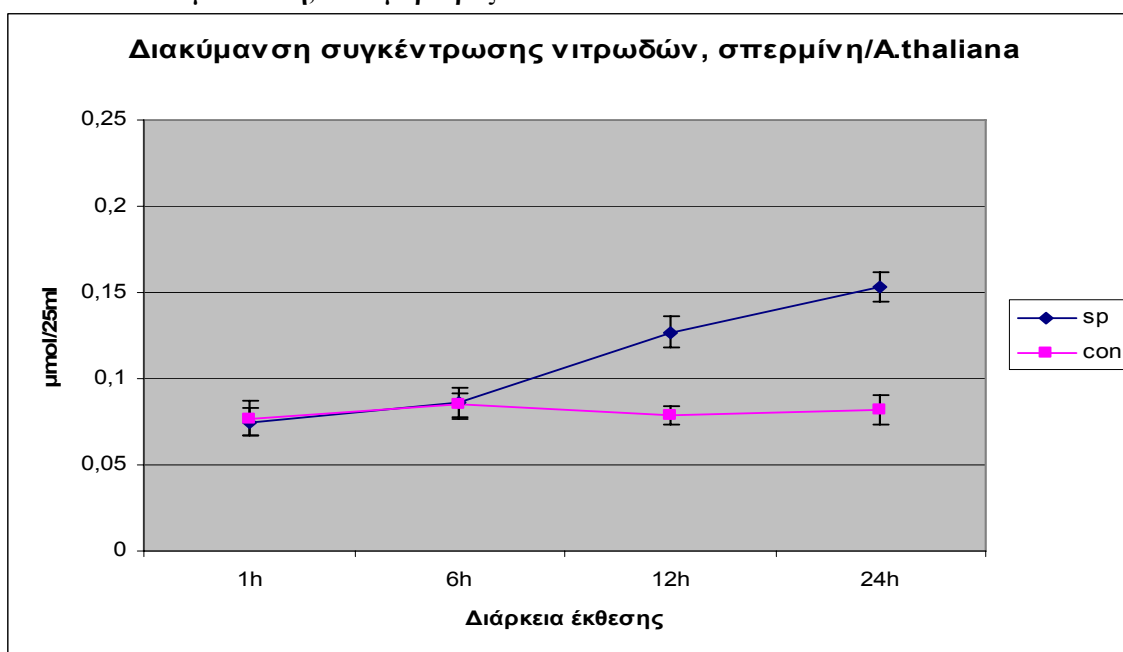
Η μέτρηση των νιτρωδών στα διαλύματα προμεταχείρισης έγινε με βάση το αντιδραστήριο Griess και φωτομέτρηση στα 260nm και έγινε με σκοπό να εκτιμηθεί η παραγωγή του NO στους ιστούς. Στα παρακάτω διαγράμματα (διάγραμμα 31, 32 και 33) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των νιτρωδών στα θρεπτικά διαλύματα προμεταχείρισης για το *A.thaliana*. Στο χειρισμό για το κιτρικό οξύ δεν φαίνεται κάποια διαφοροποίηση στη συγκέντρωση των νιτρωδών από τις τιμές του μάρτυρα. Η μεγαλύτερη διαφορά παρουσιάζεται στο θρεπτικό διάλυμα με τη μαννιτόλη (διάγραμμα 32) στο οποίο η συγκέντρωση των νιτρωδών ξεκινάει πολύ υψηλότερα από τον μάρτυρα και συνεχίζει να αυξάνεται καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων. Αντιθέτως για το διάλυμα με τη σπερμίνη αρχικά η τιμή της συγκέντρωσης συμβαδίζει με αυτή του μάρτυρα αλλά από την επώαση 6 ωρών έως το 24ωρο αυξάνεται συνεχώς.



Διάγραμμα 31: Διακύμανση της συγκέντρωσης των νιτρωδών κατά τον χειρισμό με το κιτρικό οξύ για το *A. thaliana*. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας.



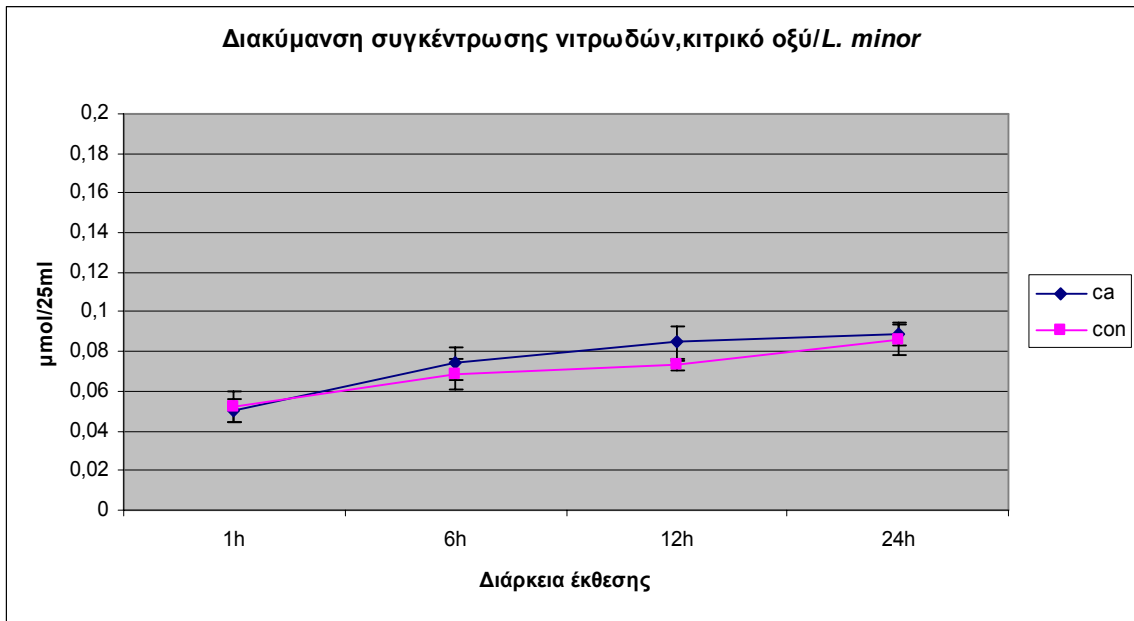
Διάγραμμα 32: Διακύμανση της συγκέντρωσης των νιτρωδών κατά τον χειρισμό με μανιτόλη για το *A. thaliana*. man: μανιτόλη, con: μάρτυρας.



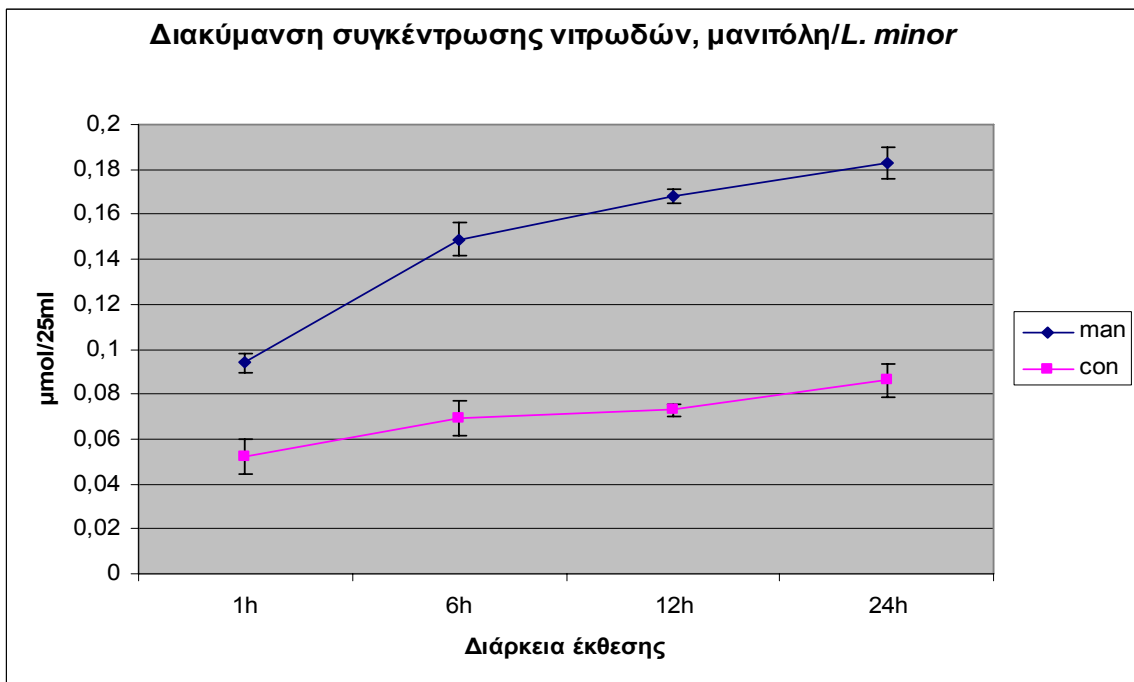
Διάγραμμα 33: Διακύμανση της συγκέντρωσης των νιτρωδών κατά τον χειρισμό με σπερμίνη για το *A. thaliana*. sp: σπερμίνη, con: μάρτυρας.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τη συγκέντρωση νιτρωδών στα διαλύματα προμεταχείρισης για τα φυτά *Lemna minor*. Στο διάγραμμα 34 που παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τον χειρισμό με το κιτρικό οξύ φαίνεται πως δεν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση από τον μάρτυρα. Στο χειρισμό με την μανιτόλη (διάγραμμα 35) είναι μεγάλη η διαφορά με το μάρτυρα και μάλιστα το πρότυπο αύξησης της συγκέντρωσης των νιτρωδών προσομοιάζει με αυτό στον αντίστοιχο χειρισμό για το *A.thaliana*. Τέλος στο διάγραμμα 36 που παρουσιάζονται τα

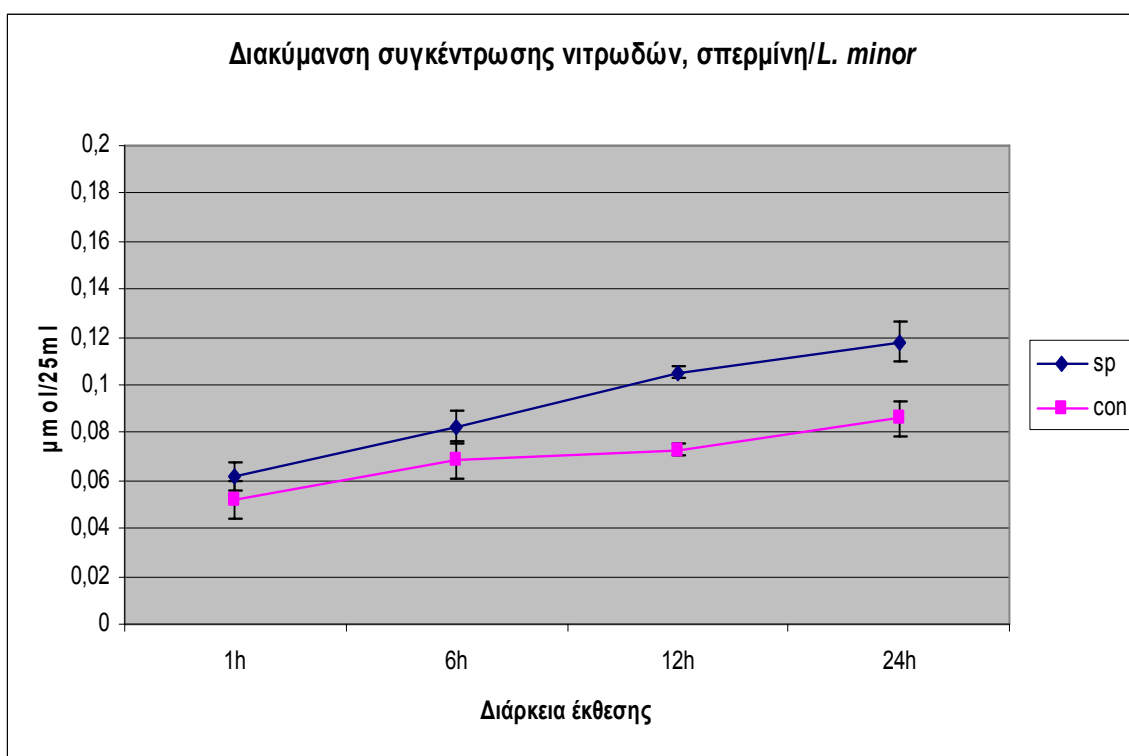
αποτελέσματα για το χειρισμό με την σπερμίνη φαίνεται μια συνεχής αύξηση της συγκέντρωσης σε σχετικά υψηλότερες τιμές από το μάρτυρα.



Διάγραμμα 34: Διακύμανση της συγκέντρωσης των νιτρωδών κατά τον χειρισμό με κιτρικό οξύ για τη *L. minor*. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας.



Διάγραμμα 35: Διακύμανση της συγκέντρωσης των νιτρωδών κατά τον χειρισμό με μανιτόλη για τη *L. minor*. man: μαννιτόλη, con: μάρτυρας.



Διάγραμμα 36: Διακύμανση της συγκέντρωσης των νιτρωδών κατά τον χειρισμό με σπερμίνη για τη *L. minor*. sp: σπερμίνη, con: μάρτυρας.

Γ.3 Μακροσκοπικές και μικροσκοπικές παρατηρήσεις των ιστών.

Γ.3.1 Arabidopsis thaliana

Μακροσκοπικές παρατηρήσεις για τους κάλλους.

Για το **μάρτυρα** τα αποτελέσματα ήταν τα εξής :

Προμεταχείριση 1h: Συμπαγείς κάλλοι, χωρίς να έχουν αποκολληθεί μάζες κυττάρων, χρώμα αμετάβλητο με το αρχικό δηλαδή πολύ ανοιχτό πράσινο. Στη συνέχεια η καλλιέργεια στο στερεό υπόστρωμα εγκαταστάθηκε με επιτυχία.

Προμεταχείριση 6h: Η συνεκτικότητα των κάλλων παραμένει σταθερή και το χρώμα επίσης αμετάβλητο. Η καλλιέργεια στο στερεό υπόστρωμα εγκαταστάθηκε με επιτυχία.

Προμεταχείριση 12h: Η συνεκτικότητα των κάλλων παραμένει σταθερή όπως και το χρώμα, φαίνεται πως ελάχιστες μάζες κυττάρων έχουν αποκολληθεί από τους αρχικούς κάλλους. Έγινε με επιτυχία η εγκατάσταση στο στερεό υπόστρωμα.

Προμεταχείριση 24h: Ομοίως δεν υπήρξε κάποια μεταβολή ενώ εγκαταστάθηκε επιτυχώς η καλλιέργεια στο στερεό υπόστρωμα.

Για τον χειρισμό με το **κιτρικό οξύ** τα αποτελέσματα ήταν τα εξής :

Προμεταχείριση 1h: Συμπαγείς κάλλοι, χωρίς να έχουν αποκολληθεί μάζες κυττάρων, χρώμα αμετάβλητο με το αρχικό δηλαδή πολύ ανοιχτό πράσινο. Στη συνέχεια η καλλιέργεια στο στερεό υπόστρωμα εγκαταστάθηκε με επιτυχία.

Προμεταχείριση 6h: Η συνεκτικότητα των κάλλων παραμένει σταθερή και το χρώμα επίσης αμετάβλητο. Η καλλιέργεια στο στερεό υπόστρωμα εγκαταστάθηκε με επιτυχία.

Προμεταχείριση 12h: Η συνεκτικότητα παρέμεινε σταθερή, παρατηρήθηκε ένας αποχρωματισμός των ιστών καθώς. Εγκαταστάθηκε με επιτυχία η καλλιέργεια στο στερεό υπόστρωμα

Προμεταχείριση 24h: Η συνεκτικότητα των ιστών φαίνεται να έχει μειωθεί καθώς είναι πιο μαλακοί, το χρώμα δεν έχει μεταβληθεί από την προηγούμενη παρατήρηση. Στο στερεό υπόστρωμα η καλλιέργεια εγκαταστάθηκε επιτυχώς.

Για το χειρισμό με την **μανιτόλη** τα αποτελέσματα ήταν τα εξής :

Προμεταχείριση 1h: Συμπαγείς κάλλοι με ελάχιστες μάζες κυττάρων να έχουν αποκολληθεί. Το χρώμα αμετάβλητο (πολύ ανοιχτό πράσινο). Η καλλιέργεια στο στερεό υπόστρωμα εγκαταστάθηκε επιτυχώς.

Προμεταχείριση 6h: Μειώνεται σχετικά η συνεκτικότητα των κάλλων, φαίνεται να είναι πιο μαλακοί. Εμφανίζονται αρκετές μάζες κυττάρων που έχουν αποκολληθεί από τους αρχικούς κάλλους ενώ δεν παρατηρείται μεταβολή του χρώματος. Στο στερεό υπόστρωμα η καλλιέργεια εγκαταστάθηκε με επιτυχία.

Προμεταχείριση 12h: Έχει μειωθεί αρκετά η συνεκτικότητα και έχουν αποκολληθεί πολλές μάζες κυττάρων έτσι ώστε να μην ξεχωρίζουν οι αρχικοί κάλλοι. Στο χρώμα παρατηρήθηκε ελαφρύς αποχρωματισμός ενώ οι καλλιέργειες στο στερεό υπόστρωμα εγκαταστάθηκαν σε ένα μεγάλο ποσοστό.

Προμεταχείριση 24h: Έχει μειωθεί πολύ η συνεκτικότητα των κάλλων. Οι ίδιες αποκολλημένες μάζες κυττάρων φαίνεται να έχουν παραμείνει μόνο που είναι πιο μαλακές. Έχει προχωρήσει ο αποχρωματισμός ενώ στο στερεό υπόστρωμα δεν εγκαταστάθηκαν οι καλλιέργειες καθώς με την πάροδο του χρόνου παρατηρήθηκε νέκρωση των κάλλων, μεταβολή του χρώματος προς το καφέ ανοιχτό και δεν υπήρχε η υποτυπώδης προσκόλληση στο θρεπτικό μέσο.

Για τον χειρισμό με την **σπερμίνη** τα αποτελέσματα ήταν τα εξής :

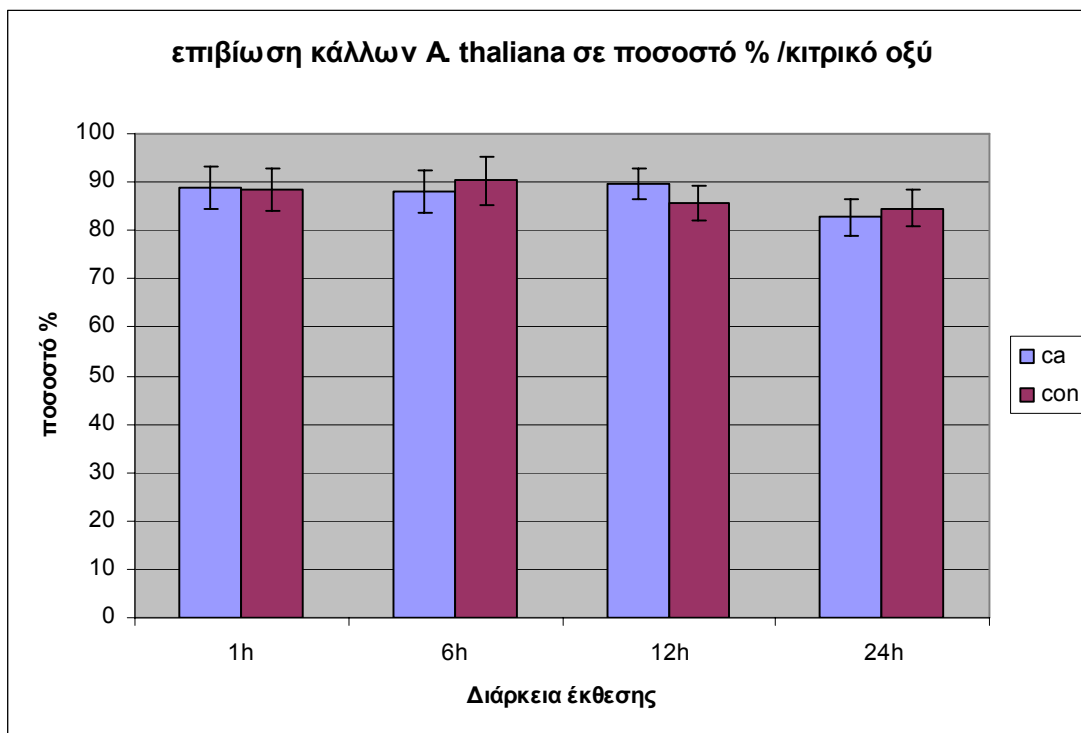
Προμεταχείριση 1h: Συμπαγείς κάλλοι, χωρίς να έχουν αποκολληθεί μάζες κυττάρων, χρώμα αμετάβλητο με το αρχικό δηλαδή πολύ ανοιχτό πράσινο. Στη συνέχεια η καλλιέργεια στο στερεό υπόστρωμα εγκαταστάθηκε κατά ένα μεγάλο ποσοστό.

Προμεταχείριση 6h: Μειώνεται λίγο η συνεκτικότητα των κάλλων και έχουν αποκολληθεί ελάχιστες μάζες κυττάρων από τους αρχικούς κάλλους ενώ το χρώμα δεν φαίνεται να μεταβάλλεται. Στο στερεό υπόστρωμα επίσης δεν φάνηκε να μεταβάλλεται το ποσοστό εγκατάστασης των καλλιιεργειών.

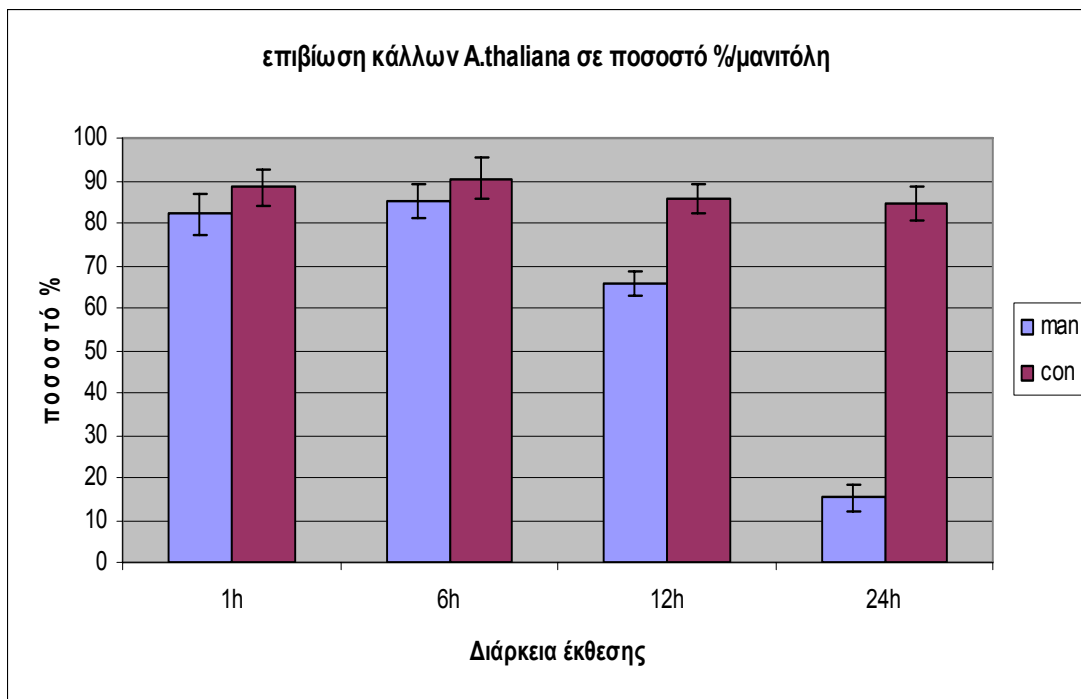
Προμεταχείριση 12h: Δεν μεταβλήθηκε η συνεκτικότητα των κάλλων ούτε φάνηκε να αποκολλούνται περισσότερες μάζες κυττάρων από τους αρχικούς κάλλους. Ο αποχρωματισμός από την προηγούμενη παρατήρηση είχε προχωρήσει. Το ποσοστό εγκατάστασης της καλλιιεργειας στο στερεό υπόστρωμα μειώθηκε.

Προμεταχείριση 24h: Ομοίως η συνεκτικότητα των κάλλων δεν μεταβάλλεται το ίδιο και το χρώμα ενώ μειώθηκε δραστικά το ποσοστό εγκατάστασης των καλλιιεργειών στο στερεό υπόστρωμα. Με την πάροδο του χρόνου παρατηρήθηκε νέκρωση των κάλλων.

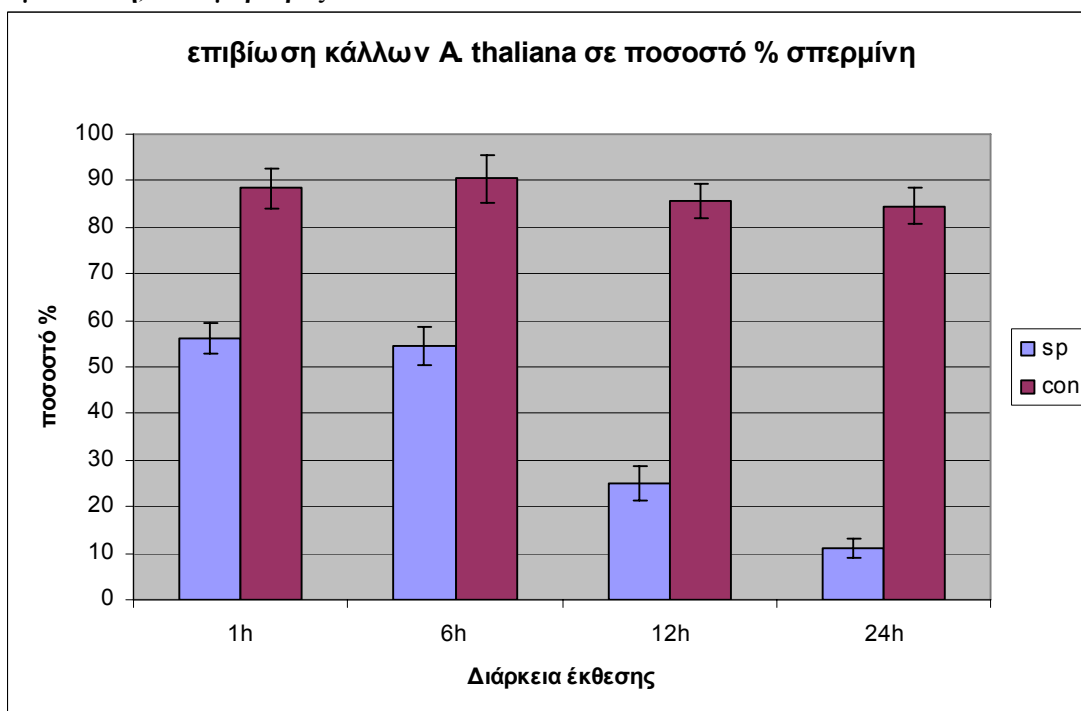
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται συνολικά το ποσοστό επιβίωσης των κάλλων στο στερεό υπόστρωμα ως μέτρο της επιτυχούς εγκατάστασης των καλλιιεργειών σε αυτό. Τα αποτελέσματα προέκυψαν μετά από παρατηρήσεις ανά εβδομάδα.



Διάγραμμα 37: Ποσοστά επιβίωσης κάλλων κατά το χειρισμό με κιτρικό οξύ για το *A.thaliana*. ca: κιτρικό οξύ, con: μάρτυρας.



Διάγραμμα 38: Ποσοστά επιβίωσης κάλλων κατά το χειρισμό με μανιτόλη για το *A.thaliana*. man: μανιτόλη, con: μάρτυρας.



Διάγραμμα 39: Ποσοστά επιβίωσης κάλλων κατά το χειρισμό με σπερμίνη για το *A.thaliana*. sp: σπερμίνη, con:μάρτυρας.

Παράλληλα με τις μακροσκοπικές έγιναν και μικροσκοπικές παρατηρήσεις στο στερεοσκόπιο για την εκτίμηση της απόδοσης της σωματικής εμβρυογένεσης στους κάλλους ανάλογα με κάθε

χειρισμό. Οι παρατηρήσεις ξεκίνησαν μετά την τρίτη εβδομάδα καλλιέργειας των κάλλων στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με 4,5 μM 2,4 D και γινόντουσαν σταθερά κάθε 5 ημέρες. Οι παρατηρήσεις έδειξαν τα εξής:

- Στο **μάρτυρα** η παρουσία εμβρυονικών κάλλων ήταν περιορισμένη ενώ δεν παρατηρήθηκαν σε κανένα τέτοιο κάλλο δομές από προέμβρυα ή σφαιρικά έμβρυα. Το ποσοστό εμβρυονικών κάλλων ήταν κοντά στο 7% του συνόλου των κάλλων που επιβίωσαν από αυτόν τον χειρισμό (δηλαδή 6,16/88).
- Στο **κιτρικό οξύ** η παρουσία εμβρυονικών κάλλων ήταν παρόμοια με αυτή του μάρτυρα χωρίς να αναπτυχθούν δομές από προέμβρυα ή σφαιρικά έμβρυα. Το ποσοστό των εμβρυονικών κάλλων κυμάνθηκε στο 7,39-8,09 % του συνόλου των κάλλων που επιβίωσαν από αυτό την χειρισμό (δηλαδή 7,68/96).
- Στη **μανιτόλη** το ποσοστό παρουσίας εμβρυονικών κάλλων ήταν εμφανώς μεγαλύτερο από αυτό των παραπάνω χειρισμών ενώ σε κάποια σημεία παρατηρήθηκε η ανάπτυξη δομών σφαιρικών εμβρύων. Το ποσοστό εμβρυονικών κάλλων κυμάνθηκε 17,62-18,98 % (δηλαδή 12.96/72).
- Στο χειρισμό με τη **σπερμίνη** η παρουσία εμβρυονικών κάλλων ήταν σχεδόν μηδενική ενώ το σύνολο των κάλλων που επιβίωσαν παρουσίασαν και καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους κατά την καλλιέργεια στο στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με 4,5 μM 2,4 D

Lemna minor

Όσο αφορά τα φυτάρια του είδους *Lemna minor* μετά τους χειρισμούς με κιτρικό οξύ, μανιτόλη και σπερμίνη υπήρξε μηδενικό ποσοστό επιτυχίας στην εγκατάσταση καλλιέργειας στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με 4,5 μM 2,4D. Οπότε δεν έγιναν παρατηρήσεις για την άμεση εμβρυογένεση σε ιστούς, οι λόγοι θα συζητηθούν στο επόμενο κεφάλαιο.

4. Συζήτηση

4.1 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία ο σκοπός ήταν να γίνει βιοχημική μελέτη της ιστοκαλλιέργειας του φυτού *A. thaliana* αλλά και μελέτη των παραμέτρων του θρεπτικού μέσου ώστε να σχεδιαστεί ένα σύστημα καλλιέργειας το οποίο θα ευνοεί την επαγωγή της σωματικής εμβρυογένεσης. Το πείραμα σχεδιάστηκε με βάση τόσο τα δεδομένα της βιβλιογραφίας τα οποία συνδέουν διάφορους παράγοντες καταπόνησης με την ανάπτυξη σωματικών εμβρύων στην ιστοκαλλιέργεια αλλά και με διεθνείς εργασίες όπως αυτή των Ikeda-Iwai M. et al. (2003) και Papanastasiou et al. (2007) στις οποίες μελετάτε η ένταση της καταπόνησης και πώς αυτή επηρεάζει την όλη διαδικασία, καθώς και οι επιδράσεις αυτής σε βιοχημικά μονοπάτια *in vitro*, ιδιαίτερα αυτά που εμπλέκονται στο οξειδωτικό-αντιοξειδωτικό ισοζύγιο.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί αρχικά προκλήθηκε καλλογένεση χρησιμοποιώντας ως έκφυτα σπέρματα του φυτού *A. thaliana* και στη συνέχεια αυτοί οι κάλοι εμβολιάστηκαν σε υγρά θρεπτικά διαλύματα τα οποία περιείχαν τις ουσίες κιτρικό οξύ, μανιτόλη και σπερμίνη ως μέσα καταπόνησης. Η μελέτη έγινε διαφοροποιώντας τη χρονική διάρκεια της έκθεσης κρατώντας σταθερή την συγκέντρωση αυτών των ουσιών στο 1mM έκαστη. Παράλληλα με την οργάνωση αυτού του πειράματος χρησιμοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες ως έκφυτο και το υδρόβιο φυτό *L. minor* πρώτον για να καταφανεί εάν υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην ποιότητα του θρεπτικού μέσου όταν χρησιμοποιείται ένα διαφοροποιημένο σύστημα μέσα στα υπό εξέταση θρεπτικά διαλύματα και δεύτερον για την επαγωγή της άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης μέσα από τη διαδικασία της επώασης σε συνθήκες καταπόνησης.

Οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις για τους κάλλους του *A.thaliana* έδειξαν πως η βιωσιμότητά τους εξαρτάται από την ένταση της καταπόνησης που έχουν υποστεί. Απόδειξη είναι τα αποτελέσματα στα διαγράμματα 38 και 39 όπου φαίνεται πως με την πάροδο του χρόνου κατά τους χειρισμούς με τη μανιτόλη και τη σπερμίνη μειώνεται αισθητά το ποσοστό επιβίωσης των κάλλων. Ενώ συγκρίνοντας τους δύο χειρισμούς μεταξύ τους φαίνεται η μανιτόλη να είναι λιγότερο επιβαρυντική απ' ότι η σπερμίνη. Όσο αφορά το κιτρικό οξύ δεν παρουσιάζεται κάποια αξιοσημείωτη διαφορά από το μάρτυρα γεγονός που αποδεικνύεται και από το διάγραμμα 37. Όσο αφορά τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις δείξαν ότι στο χειρισμό με τη μανιτόλη υπάρχει μια μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης δομών που σχετίζονται με τη σωματική εμβρυογένεση σε σχέση με το μάρτυρα και το κιτρικό οξύ ενώ για τη σπερμίνη δεν υπάρχουν τέτοια δεδομένα.

Τέλος όσο αφορά στις βιοχημικές μελέτες στη *Lemna minor* αυτές δείχνουν πως με την πάροδο του χρόνου τα φυτάρια τείνουν να προσαρμοστούν στις διαφορετικές συνθήκες που υφίστανται σε κάθε χειρισμό. Στην παρούσα εργασία η αποτυχία στην εγκατάσταση ιστοκαλλιέργειας της λέμνας σε στερεό υπόστρωμα έγκειται στο γεγονός ότι δεν βρέθηκε αποτελεσματικό πρωτόκολλο απολύμανσης των ιστών με αποτέλεσμα την συνεχή ανάπτυξη μολύνσεων τόσο από μύκητες όσο και από βακτήρια. Έτσι δεν κατέστη δυνατή η παρατήρηση της απευθείας σωματικής εμβρυογένεσης ύστερα από επώαση σε καταστάσεις καταπόνησης

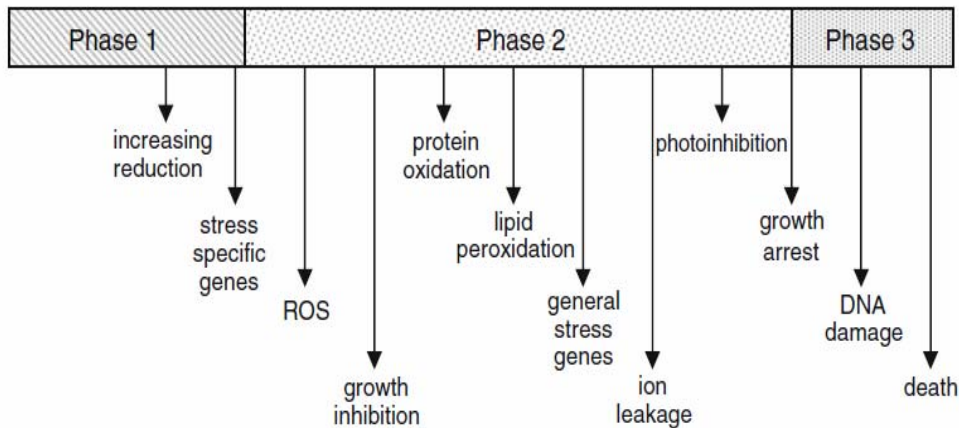
4.1.1 Η οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών.

Οι μετρήσεις της έκτασης της οξείδωσης των μεμβρανικών λιπιδίων, της αναλογίας ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης και της ενεργότητας του ενζύμου σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) δείχνουν κατά προσέγγιση την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών τη χρονική στιγμή που έγιναν αυτές ενώ η σύνθεσή τους κατά τις 1, 6, 12 και 24 ώρες μετά την έκθεση είναι δυνατόν να παρουσιάσει την μεταβολή της στη διάρκεια του 24ώρου. Βέβαια η οξειδοαναγωγική κατάσταση ενός κυττάρου και στη συνέχεια ενός ιστού είναι ένα μέτρο το οποίο δίνει πολλές πληροφορίες για τη φυσιολογική κατάσταση του ιστού. Στην εικόνα 9 φαίνεται μια σχηματική παρουσίαση των τριών φάσεων της οξειδωτικής καταπόνησης σε ένα κύτταρο (*Sunkar 2010*) και παρατηρείται πως εκτεταμένη οξείδωση λιπιδίων υπάρχει κατά το μέσο της δεύτερης φάσης.

Με βάση λοιπόν τα αποτελέσματα για τη διακύμανση της οξείδωσης των λιπιδίων για τους κάλλους του *A. thaliana* (διαγράμματα 1, 2 και 3) βγαίνει το συμπέρασμα ότι η καταπόνηση στους ιστούς αυτούς για τα χρονικά διαστήματα μίας, έξη και δώδεκα ωρών δεν φαίνεται να έχει ξεπεράσει ένα κρίσιμο όριο εκτεταμένης ζημιάς στα μεμβρανικά λιπίδια. Αυτό το συμπέρασμα προκύπτει από το γεγονός ότι δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα. Κατά τις μετρήσεις στο εικοσιτετράωρο παρατηρείται μια αύξηση στη συγκέντρωση της MDA σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά για να ειπωθεί ασφαλώς ότι το κύτταρο έχει περάσει σε προχωρημένη φάση της οξειδωτικής καταπόνησης θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλοι παράγοντες.

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου στην εικόνα 9 δεν παράγονται μόνο κατά τη διάρκεια ενός εξωτερικού παράγοντα καταπόνησης αλλά συνεχώς λόγω των φυσιολογικών λειτουργιών του κυττάρου, για αυτό το λόγο οι περισσότερες γραμμές άμυνας έναντι των ROS προϋπάρχουν σε ετοιμότητα για να προλαμβάνουν την απορρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας που είναι και η αρχική φάση της οξειδωτικής καταπόνησης (*Sunkar 2010*). Η γλουταθειόνη, που αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης σε αυτή την εργασία, είναι μια σημαντική γραμμή άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ιδιαίτερη σημασία έχει η μέτρηση της αναλογίας της

ανηγμένης (GSH) προς την οξειδωμένη μορφή (GSSG) αφού μικρές τιμές του λόγου δίνουν την πληροφορία ότι περισσότερα μόρια της ολικής γλουταθειόνης βρίσκονται στη μορφή GSSG. Αυτό σημαίνει πως τη στιγμή που γίνεται η μέτρηση το δείγμα που έχει την μικρότερη τιμή στην αναλογία αυτή φαίνεται πως το αντιοξειδωτικό σύστημα της γλουταθειόνης λειτουργεί σε μεγαλύτερη έκταση.



Εικόνα 9: Ενδεικτικό σχήμα των τριών φάσεων της οξειδοαναγωγικής απορρόθμισης (Sunkar 2010)

Στα διαγράμματα 7, 8 και 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για την γλουταθειόνη για τους κάλλους του *A. thaliana*. Στα δείγματα του μάρτυρα κατά την πρώτη, έκτη και δωδέκατη ώρα της επώασης η αναλογία έχει μια σχετικά σταθερή τιμή μικρότερη από αυτή που μετρήθηκε στο εικοσιτετράωρο έτσι θα μπορούσε να βγει το συμπέρασμα ότι με το πέρασμα του χρόνου οι ιστοί τείνουν να προσαρμόζονται στις διαφορετικές συνθήκες της υγρής καλλιέργειας. Για τα δείγματα από τους χειρισμούς με το κιτρικό οξύ φαίνεται πως οι τιμές της αναλογίας ξεκινούν χαμηλότερα από αυτές του μάρτυρα όμως με την πάροδο του χρόνου πλησιάζουν σε αυτές δίνοντας ένα παρόμοιο πρότυπο μεταβολής. Από αυτά και λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα της οξείδωσης λιπιδίων αλλά και του ποσοστού βιωσιμότητας είναι δυνατόν να ειπωθεί πως οι κάλλοι στον χειρισμό με το κιτρικό οξύ μοιάζει να έχουν παρόμοια συμπεριφορά με τον μάρτυρα κυρίως μέχρι τις πρώτες 12 ώρες.

Για τους χειρισμούς με μαννιτόλη και σπερμίνη παρατηρούνται αρκετά μεγάλες τιμές στο λόγο ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης κατά τις πρώτες ώρες της επώασης οι οποίες με την πάροδο του χρόνου μειώνονται ενώ παρατηρείται και αρκετά μεγάλη διαφορά από τον μάρτυρα. Βέβαια σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται και μεταξύ των δύο αυτών χειρισμών αφού στη σπερμίνη μετρήθηκαν σταθερά μικρότερες τιμές απ' ότι στην προμεταχείριση με τη μαννιτόλη.

Το χαρακτηριστικό στα αποτελέσματα των βιοχημικών μετρήσεων της γλουταθειόνης είναι ότι στο μάρτυρα και στην επώαση με το κιτρικό οξύ οι τιμές στο λόγο ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης ξεκινούν από χαμηλές τιμές και αυξάνονται ενώ στη σπερμίνη και στη μαννιτόλη η αναλογία ξεκινά από υψηλές τιμές και με την πάροδο του χρόνου μειώνονται. Αυτό φαίνεται να είναι παράδοξο καθώς η μεγάλη τιμή του λόγου ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης δίνει την πληροφορία ότι δεν υπάρχει σε μεγάλο βαθμό ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού της γλουταθειόνης παρόλο που αυτοί οι δύο χειρισμοί προκαλούν μεγαλύτερης έντασης καταπόνηση.

Η μαννιτόλη είναι μια πολυαλκοόλη που προκαλεί αύξηση του οσμωτικού δυναμικού του διαλύματος με αποτέλεσμα να ευνοείται η κίνηση του διαλύτη μέσω ημιπερατής μεμβράνης προς το διάλυμα με χαμηλότερη συγκέντρωση. Η επιλογή της μαννιτόλης ως παράγοντα καταπόνησης έγινε προκειμένου οι ιστοί που θα επωαστούν σε θρεπτικό διάλυμα με συγκέντρωση 1mM μαννιτόλη να υποστούν οσμωτική καταπόνηση. Η πρώτη γραμμή άμυνας των κυττάρων τα οποία υφίστανται οσμωτική καταπόνηση είναι να συνθέσουν οσμωτικά ενεργές ενώσεις ώστε να ισοσκελιστεί η πίεση του κυτοσολίου με αυτή του εξωτερικού διαλύματος. Έτσι με βάση το γεγονός ότι η οξειδωτική καταπόνηση εμφανίζεται δευτερευόντως σε τέτοιες καταστάσεις δίνεται μια εξήγηση γιατί αρχικά η αναλογία ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης έχει υψηλή τιμή η οποία στην πορεία μειώνεται.

Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στην προμεταχείριση με τη σπερμίνη. Η σπερμίνη είναι μια πολυαμίνη η οποία όταν προτίθεται το θρεπτικό διάλυμα αυξάνει το pH. Με βάση τα δεδομένα αυτού του πειράματος η αύξηση του pH φτάνει από 5,6 στα 7,5 και κατά τη διάρκεια του εικοσιτετραώρου που γίνονται οι μετρήσεις δεν παρατηρείται μείωση του - μάλιστα υπάρχει και μια μικρή αύξηση. Ένα από τα συμπεράσματα είναι ότι από μια παρατεταμένη επώαση σε υψηλό pH είναι δυνατόν να προκληθεί αθροιστική βλάβη στις μεμβράνες ώστε προοδευτικά να επαχθεί η οξειδωτική καταπόνηση. Αυτή η θέση μπορεί να υποστηριχθεί τόσο από την έντονη πτώση της βιωσιμότητας των κάλλων όσο και με την αύξηση της οξείδωσης λιπιδίων με την αύξηση της έκθεσης.

Άλλη μια μέτρηση που έγινε για να προσδιοριστεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών ήταν η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD) που καταλύει τη μετατροπή $O_2 \cdot$ σε O_2 και H_2O_2 . Στα διαγράμματα 13, 14 και 15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ενεργότητας της SOD στα δείγματα και η πιο σημαντική παρατήρηση γίνεται στο χειρισμό με τη μαννιτόλη αφού η απορρόφηση που του NBT είναι πολύ μικρότερη τόσο από το μάρτυρα όσο και από τις άλλες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό δείχνει ότι στα εκχυλίσματα των

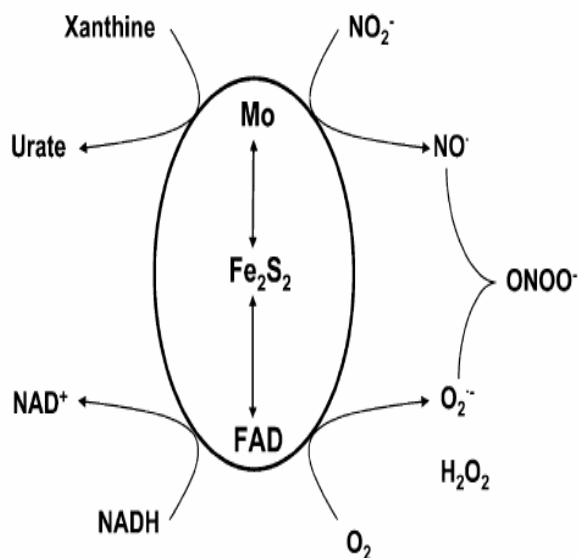
κάλλων που επώαστηκαν στη μαννιτόλη το ένζυμο SOD είναι περισσότερο ενεργό απ' ότι στο μάρτυρα και στους χειρισμούς με κιτρικό οξύ και σπερμίνη.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως υπάρχουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων και έτσι αποδεικνύεται κάθε ουσία έχει διαφορετική επίδραση στους ιστούς. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από τα ποσοστά βιωσιμότητας των κάλλων του *A. thaliana*. Όσο αφορά όμως στις μικροσκοπικές παρατηρήσεις για την αναζήτηση δομών που εμφανίζονται στη σωματική εμβρυογένεση τα αποτελέσματα δεν ήταν απόλυτα σαφή. Κατά πρώτον στους ιστούς που επώαστηκαν στο θρεπτικό διάλυμα με τη σπερμίνη πέρα από τα μειωμένα ποσοστά επιβίωσης δεν παρατηρήθηκαν εμβρυονικοί κάλλοι. Στο μάρτυρα και στην προμεταχείριση με το κιτρικό οξύ στο σύνολο των κάλλων που εγκαταστάθηκαν στο στερεό θρεπτικό μέσο παρατηρήθηκαν εμβρυονικοί κάλλοι και δομές σωματικών εμβρύων σε ένα ποσοστό 7 με 8 %. Τέλος όταν οι ιστοί επώαστηκαν στο διάλυμα προμεταχείρισης με μαννιτόλη το παραπάνω ποσοστό ήταν πιο υψηλό (17-19%).

Η διαφορά, της τάξεως του 10%, που παρατηρείται στο χειρισμό με την μαννιτόλη θα μπορούσε να ειπωθεί ότι προέκυψε λόγω της οσμωτικής καταπόνησης που προκλήθηκε. Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που επαληθεύουν αυτή τη θέση και αναφέρονται και σε άλλα είδη εκτός από το *A. thaliana* όπως είναι το *Vitis vinifera* (Jiangwei et al. 2009) το *Dacus carota* (Kamada 1989) και *Medicago truncatula* (Rose et al. 2006). Τα αποτελέσματα των βιοχημικών αναλύσεων της ενεργότητας της SOD για τους κάλλους που επώαστηκαν σε θρεπτικό διάλυμα με μαννιτόλη δείχνουν σαφώς μεγαλύτερη ενεργότητα του ενζύμου απ' ότι στο μάρτυρα γεγονός που θα μπορούσε να συνδεθεί με την αυξημένη συχνότητα εμβρυονικών κάλων και δομών σωματικών εμβρύων.

Σε εργασία των Kairong et al. (2002) στο είδος *Lysium barbatum* βρέθηκε ότι ύστερα από προμεταχείριση με H_2O_2 επάχθηκε η σωματική εμβρυογένεση παράλληλα η ενεργότητα του ενζύμου SOD βρέθηκε αυξημένη κατά τις πρώτες μέρες της καλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης ενώ μειώθηκε η ενεργότητά του με την πάροδο των ημερών. Μελέτες δείχνουν επίσης τη συμμετοχή του H_2O_2 , προϊόν της δράσης της SOD, ως μόριο μεταγωγής σήματος σε λειτουργίες όπως η ανάπτυξη, η προσαρμογή σε καταπόνηση ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Apel and Hert, 2004). Όσο αφορά στην παρούσα εργασία από τη μία μεριά δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα ώστε να συνδεθεί η ενεργότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης με την παρατηρηθείσα διαφοροποίηση στους κάλλους όμως είναι γεγονός η αυξημένη ενεργότητά της και θα ήταν δυνατόν σε επόμενες μελέτες να μετρηθεί παράλληλα με την ενεργότητα του ενζύμου καταλάση που ανάγει το H_2O_2 , ώστε να εκτιμηθεί η παρουσία αυτής της ρίζας στον ιστό κατά τα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης.

Εκτός από το H_2O_2 , όπως έχει ήδη αναφερθεί, και το NO είναι μια ελεύθερη ρίζα η οποία φαίνεται να παίζει ρόλο στη μεταγωγή σήματος στα φυτά. Υπάρχουν μάλιστα δεδομένα τα οποία τοποθετούν την παραγωγή του NO κατά την ανταπόκριση σε καταπόνηση στο ίδιο χρονικό σημείο με αυτή του H_2O_2 (Neil et al. 2002). Επειδή ο χρόνος ημιζωής του NO στα βιολογικά συστήματα περιορίζεται σε μερικά δευτερόλεπτα, στην παρούσα εργασία η εκτίμηση της συγκέντρωσής του στους ιστούς έγινε έμμεσα μέσω της μέτρησης της συγκέντρωσης των νιτρικών στα διαλύματα προμεταχείρισης. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα διαγράμματα 31, 32 και 33 δείχνουν μια μεγάλη διαφορά στο χειρισμό με τη μαννιτόλη σε σχέση και με τον μάρτυρα αλλά και με τις άλλες δύο ουσίες, κιτρικό οξύ και σπερμίνη, σε όλη τη διάρκεια της επώασης. Λαμβάνοντας υπόψη και τα προηγούμενα αποτελέσματα για την προμεταχείριση με τη μαννιτόλη και εστιάζοντας στη χρονική διάρκεια της επώασης στις 6 και 12 ώρες όπου παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό των εμβρυονικών κάλλων, φαίνεται πως οι ιστοί που επωάζονται σε αυτές τις συνθήκες υφίστανται μια ένταση καταπόνησης ικανής να κινητοποιήσει τους αμυντικούς μηχανισμούς του κυττάρου αλλά χωρίς να ωθήσει το σύστημα πέρα από τα όρια αντοχής του.



Εικόνα 10: Σχηματική παρουσίαση ενός προτεινόμενου μεταβολικού μονοπατιού στο οποίο παράγεται NO από τη δράση του ενζύμου οξειδάσης-αναγωγάσης της χανθίνης ενώ φαίνεται και μια χρονική σύνδεση της παραγωγής του NO με το H_2O_2 (Del Rio et al., 2004)

Ένα γενικό συμπέρασμα που αφορά την οξειδοαναγωγική κατάσταση του ιστού σε σχέση με την ενεργοποίηση της διαδικασίας της διαφοροποίησης είναι ότι ο παράγοντας που θα προκαλέσει διαταραχή στον ιστό θα πρέπει να είναι σε τέτοια ένταση ώστε να μην προκληθεί οξειδοαναγωγική ανισοροπία σε αυτόν τον ιστό. Να σημειωθεί ότι όταν γίνεται αναφορά στην ένταση της

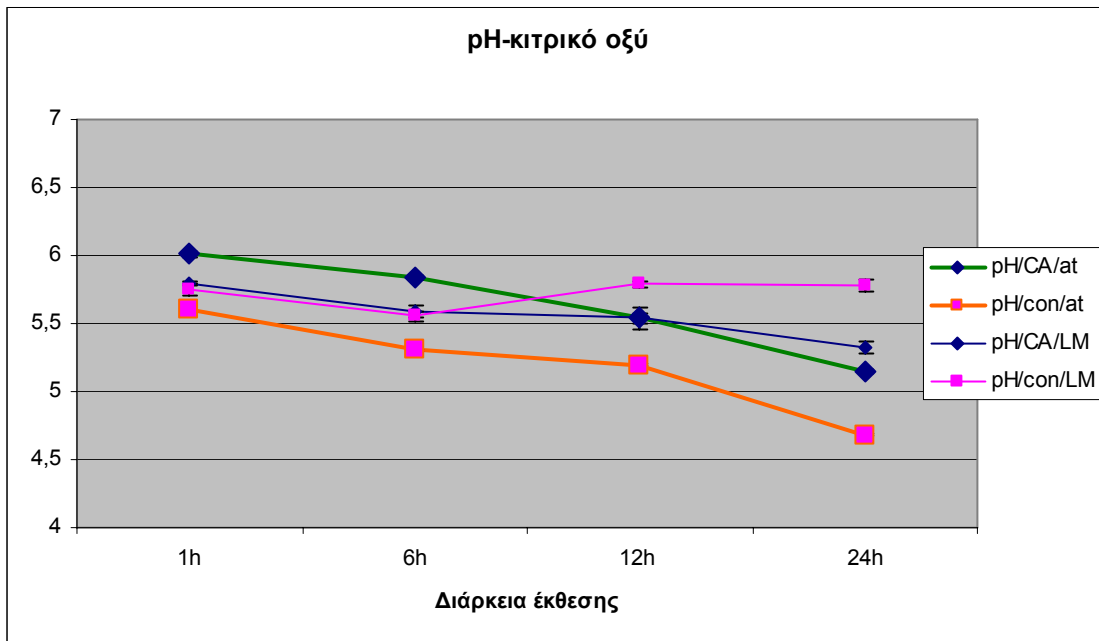
καταπόνησης λαμβάνονται υπόψη τόσο ο παράγοντας του χρόνου όσο και ο παράγοντας της συγκέντρωσης για κάθε ουσία. Σε αυτή την εργασία φάνηκε πως ο χειρισμός με το κιτρικό οξύ δεν ήταν τέτοιας έντασης ώστε να δώσει διαφορετικά αποτελέσματα από τον μάρτυρα ενώ η προμεταχείριση με τη σπερμίνη είναι πιθανόν, αν για την ίδια χρονική διάρκεια της επώασης είχε χρησιμοποιηθεί μικρότερη συγκέντρωση, να ήταν διαφορετικά τα αποτελέσματα. Βέβαια και το είδος της καταπόνησης ενδέχεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο καθώς σε βιβλιογραφικές αναφορές η επαγωγή του οσμωτικού στρες δίνει τα περισσότερα αποτελέσματα, αντίστοιχα και στην παρούσα μελέτη η προμεταχείριση με τη μαννιτόλη δείχνει να είναι πιο αποδοτική.

4.1.2 Η επίδραση των φυσικοχημικών παραμέτρων των διαλυμάτων προμεταχείρισης.

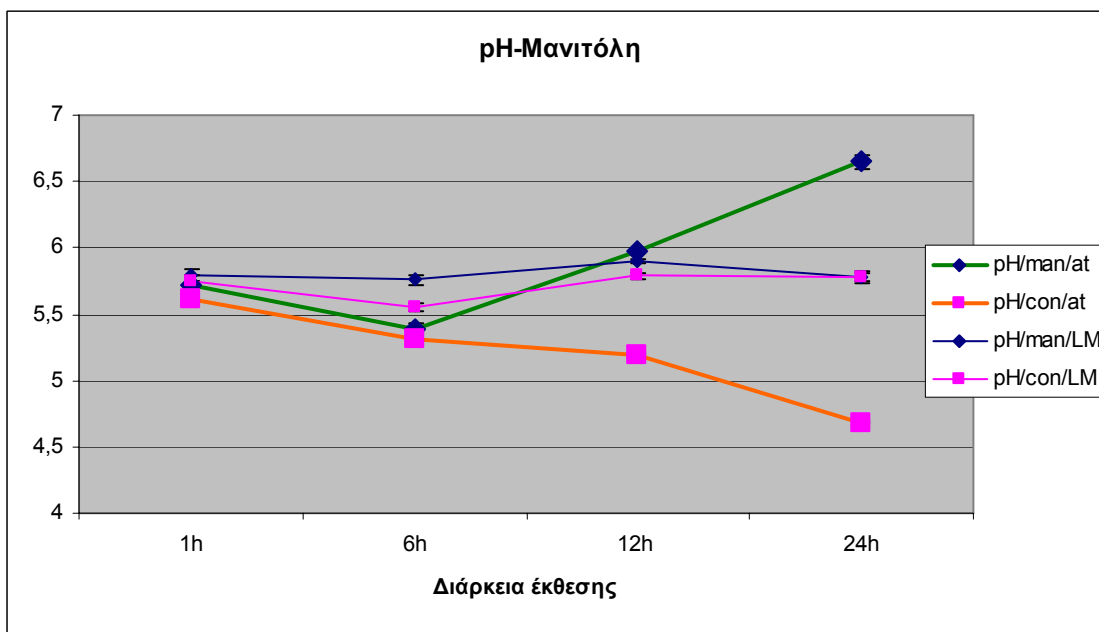
Παράλληλα με τις βιοχημικές μετρήσεις στους ιστούς, έγινε και μετρήσεις του pH και της αγωγιμότητας των διαλυμάτων προμεταχείρισης οι οποίες εδώ παρουσιάζονται συγκριτικά με αντίστοιχες για τα διαλύματα προμεταχείρισης των φυταρίων της *Lemna minor* με σκοπό να εκτιμηθεί η αλληλεπίδραση των κάλλων με το θρεπτικό διάλυμα.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 40 το pH για τον χειρισμό με το κιτρικό οξύ όσο αφορά στους κάλλους μειώνεται με την πάροδο του χρόνου με παρόμοιο τρόπο με τον μάρτυρα ενώ για τα φυτάρια *L. minor* στον μάρτυρα φαίνεται μια σχετική σταθεροποίηση αντίθετα με το χειρισμό που παρουσιάζεται μια σταδιακή μείωση. Η μείωση του pH κατά τις πρώτες ώρες μιας υγρής καλλιέργειας στην κυτταροϊστοκαλλιέργεια είναι κάτι φυσιολογικό (Edwin et al. 2007).

Στο χειρισμό με την μαννιτόλη το pH για τους κάλλους παρουσιάζει μια πτώση κατά τις πρώτες ώρες της καλλιέργειας όμως μετά τις 6 ώρες συμβαίνει μια αύξηση της τάξεως μιας μονάδας σε αντίθεση με τον μάρτυρα αλλά και με τα φυτάρια *L. minor* όπου παρατηρείται σταθεροποίηση ανάμεσα στις τιμές 5,5 με 5,7 (διάγραμμα 41). Έτσι φαίνεται πως η απότομη αύξηση που παρατηρείται από τις 6 ώρες και μετά στην καλλιέργεια των κάλλων δεν οφείλεται στην προσθήκη της μαννιτόλης αλλά σε πιθανή αλληλεπίδραση των ιστών με τις συνθήκες καλλιέργειας.



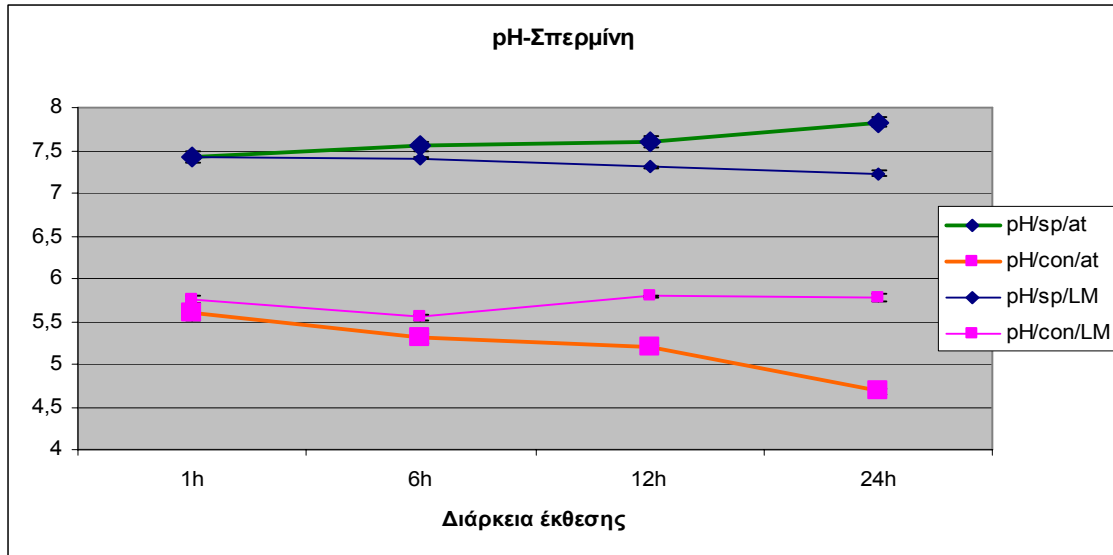
Διάγραμμα 40: Συγκριτική παρουσίαση της διακύμανσης του pH για το χειρισμό με το κιτρικό οξύ CA/at: θρεπτικό διάλυμα με κιτρικό οξύ για τους κάλλους του at, con/at: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τους κάλλους at, CA/LM: θρεπτικό διάλυμα με κιτρικό οξύ για τα φυτά LM con/LM: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τα φυτά LM.



Διάγραμμα 41: Συγκριτική παρουσίαση της διακύμανσης του pH για το χειρισμό με τη μανιτόλη. man/at: θρεπτικό διάλυμα με μανιτόλη για τους κάλλους του at, con/at: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τους κάλλους at, man/LM: θρεπτικό διάλυμα με μανιτόλη για τα φυτά LM con/LM: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τα φυτά LM.

Αντίθετα με τα παραπάνω, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 42, στην προμεταχείριση με τη σπερμίνη τόσο στην καλλιέργεια των κάλλων όσο και σε αυτή των φυτάρων *L. minor* παρατηρείται

σχετικά μεγάλη αύξηση του pH από την αρχή μέχρι το τέλος της επώασης (στις 24 ώρες) παρουσιάζοντας μια σταθεροποίηση σε σχέση με τον μάρτυρα. Σε αυτή την περίπτωση είναι δυνατόν να ειπωθεί πως η προθήκη της σπερμίνης είναι ο λόγος της αύξησης του pH και πως δεν είναι οι ιστοί αυτοί που επηρεάζουν την τιμή του.

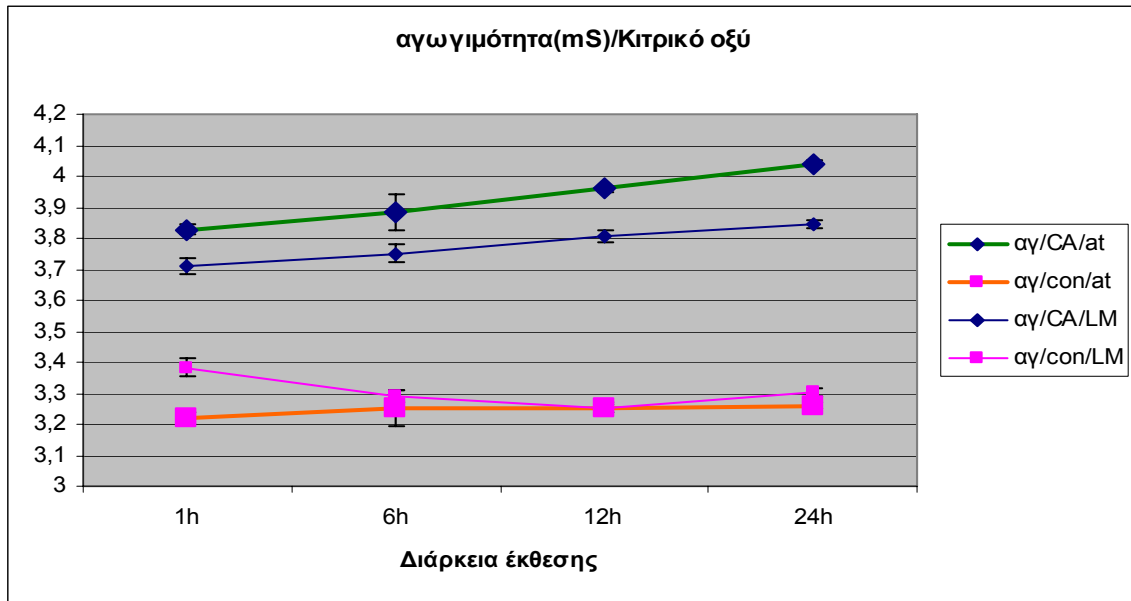


Διάγραμμα 42: Συγκριτική παρουσίαση της διακύμανσης του pH για το χειρισμό με τη σπερμίνη. sp/at: θρεπτικό διάλυμα με σπερμίνη για τους κάλλους του at, con/at: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τους κάλλους at, sp/LM: θρεπτικό διάλυμα με σπερμίνη για τα φυτά LM con/LM: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τα φυτά LM.

Η αγωγιμότητα των διαλυμάτων μετρήθηκε λαμβάνοντας υπόψη δύο δεδομένα πρώτον ότι η διακύμανσή της φαίνεται πως είναι μια ένδειξη για την ένταση της διαρροής ιόντων στους ιστούς (Sunkar 2010) και ότι αφού το ηλεκτρικό δυναμικό γύρω από το κύτταρο είναι δυνατόν να επηρεάσει την πολικότητά τους (Edwin et al, 2007) ενδέχεται και η αγωγιμότητα του διαλύματος να μπορεί να δώσει μια ένδειξη για το αν η αυξημένη συγκέντρωση ιόντων στο διάλυμα προμεταχείρισης θα μπορούσε να επηρεάσει την πολικότητα ορισμένων κυττάρων ώστε να τα ωθήσει προς την πραγματοποίηση ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης και ενδεχόμενη επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης.

Στο διάγραμμα 43 που παρουσιάζεται η διακύμανση της αγωγιμότητας για τα διαλύματα προμεταχείρισης με το κιτρικό οξύ και για τους κάλλους και για το φυτό *L. minor* φαίνεται ότι και στις δύο περιπτώσεις τα διαλύματα με το κιτρικό οξύ εξ αρχής έχουν μεγαλύτερη αγωγιμότητα από τους μάρτυρες. Ο κύριος λόγος που συμβαίνει αυτό είναι ότι το κιτρικό οξύ που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε μορφή άλατος με νάτριο, απλώς για το διάλυμα των κάλλων του *A. thaliana* η αγωγιμότητα στις 24 ώρες έχει υψηλότερη τιμή ενδεχομένως γιατί συμβαίνει μια μικρής έκτασης διαρροής ιόντων

από τους κάλλους καθώς και γιατί επιφάνειά τους είναι μεγαλύτερη από την επιφάνεια του ριζικού συστήματος των φυταρίων *L. minor*.

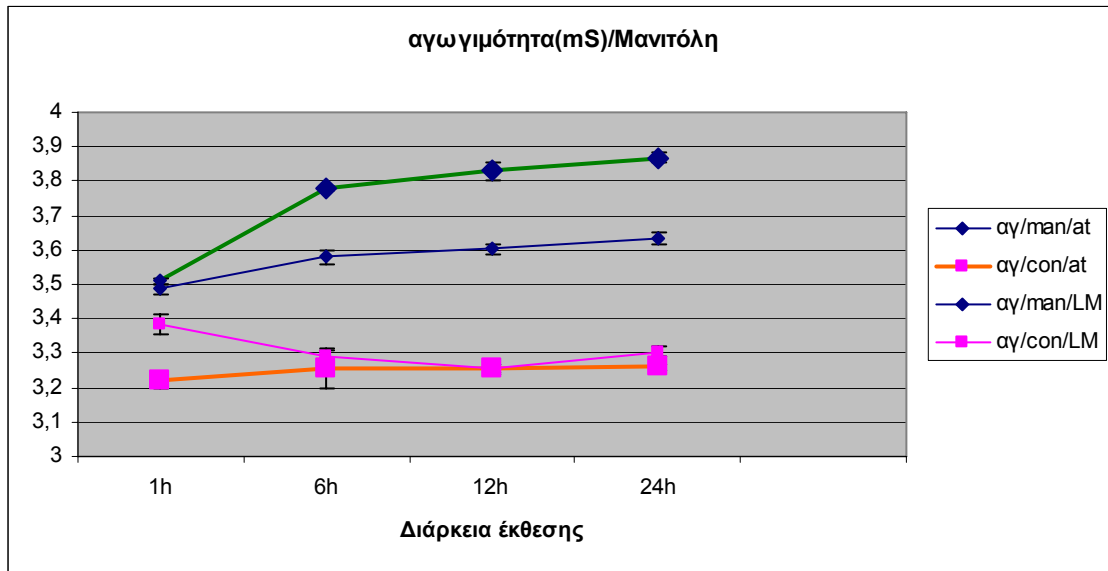


Διάγραμμα 43: Συγκριτική παρουσίαση της αγωγιμότητας των διαλυμάτων προμεταχείρισης με το κιτρικό οξύ. CA/at: θρεπτικό διάλυμα με κιτρικό οξύ για τους κάλλους του at, con/at: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τους κάλλους at, CA/LM: θρεπτικό διάλυμα με κιτρικό οξύ για τα φυτάρια LM con/LM: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τα φυτάρια LM.

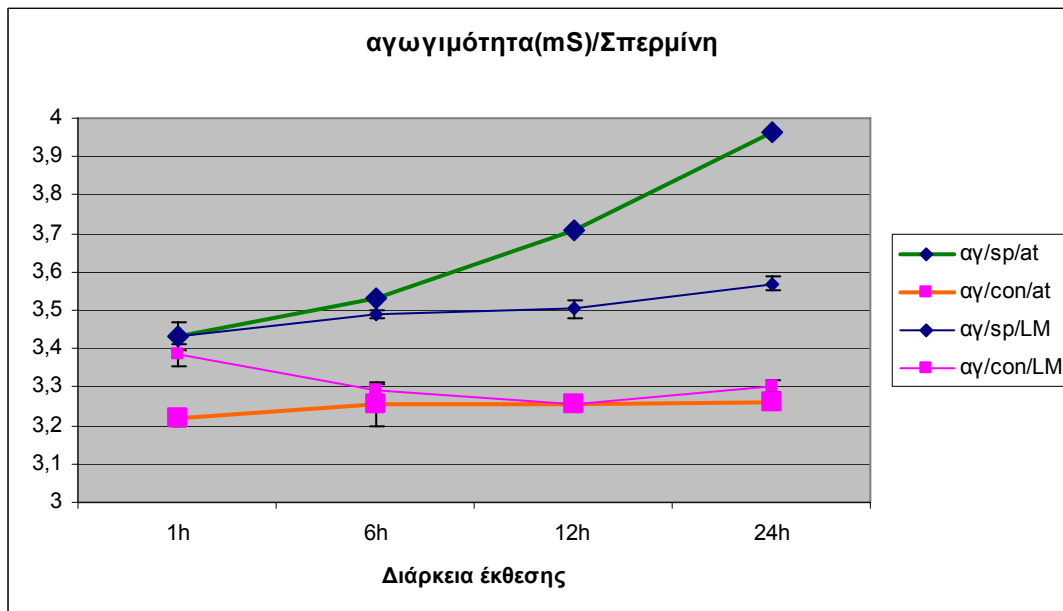
Κατά τον χειρισμό με την μαννιτόλη (διάγραμμα 44) η αγωγιμότητα στα διαλύματα των κάλλων αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου αρχικά γρήγορα (από 1 έως 6 ώρες επώασης) και στη συνέχεια με μικρότερο ρυθμό (6 έως 24 ώρες επώασης) και η αύξηση είναι της τάξεως του 0,5 mS σε αντίθεση με τα διαλύματα που επώασθηκαν τα φυτάρια *L. minor* όπου παρατηρείται μια αύξηση αλλά πολύ μικρότερη. Και σε αυτή την περίπτωση η πιθανότερη εξήγηση είναι η διαρροή ιόντων από την επιφάνεια των κάλλων ενώ όσο αφορά στα φυτάρια της λέμνας η αύξηση είναι της τάξεως του 0,1 mS όπως έγινε και στο χειρισμό με το κιτρικό οξύ γεγονός που αποδεικνύει ότι ταφυτά της λέμνας αντιδρούν με παρόμοιο τρόπο στα διαλύματα προμεταχείρισης με κιτρικό οξύ και μαννιτόλη. Αντίθετα η διακύμανση της αγωγιμότητας των διαλυμάτων που επώασθηκαν οι κάλλοι είναι διαφορετική ανάμεσα στους δύο χειρισμούς αφού κατά την επώαση στη μαννιτόλη η αγωγιμότητα μετριέται σε χαμηλότερα επίπεδα (3,5 mS) από το κιτρικό οξύ αλλά τελικά καταλήγει στο 24ωρο να έχει σχεδόν την ίδια τιμή (3,9 mS).

Στο διάγραμμα 45 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την αγωγιμότητα στα διαλύματα προμεταχείρισης με σπερμίνη. Είναι χαρακτηριστική η μεγάλη αύξηση της αγωγιμότητας στα διαλύματα που επώασθηκαν οι κάλλοι και σε συνδυασμό και με τα παραπάνω αποτελέσματα αλλά και με το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί μικρή βιωσιμότητα στο χειρισμό με τη σπερμίνη είναι πιθανόν να

ειπωθεί ότι αυτή η αύξηση στην αγωγιμότητα οφείλεται σε αυξημένη διαρροή ιόντων από τους κάλλους. Αυτή η άποψη ενισχύεται και από την παρατήρηση ότι για τα διαλύματα στα οποία επώασθησαν τα φυτά της λέμνας η διακύμανση της αγωγιμότητας περιορίζεται στο διάστημα 3,45 με 3,55 mS.



Διάγραμμα 44: Συγκριτική παρουσίαση της αγωγιμότητας των διαλυμάτων προμεταχείρισης με τη μανιτόλη. man/at: θρεπτικό διάλυμα με μανιτόλη για τους κάλλους του at, con/at: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τους κάλλους at, man/LM: θρεπτικό διάλυμα με μανιτόλη για τα φυτά LM con/LM: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τα φυτά LM.



Διάγραμμα 45: Συγκριτική παρουσίαση της αγωγιμότητας των διαλυμάτων προμεταχείρισης με τη μανιτόλη. sp/at: θρεπτικό διάλυμα με σπερμίνη για τους κάλλους του at, con/at: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τους κάλλους at, sp/LM: θρεπτικό διάλυμα με σπερμίνη για τα φυτά LM con/LM: θρεπτικό διάλυμα μάρτυρας για τα φυτά LM.

4.2 Συμπεράσματα και Προοπτικές

Συνοπτικά, σε αυτή την εργασία φαίνεται πως η οσμωτική καταπόνηση που προκλήθηκε από τη μανιτόλη αύξησε τη συχνότητα εμφάνισης δομών που σχετίζονται με την σωματική εμβρυογένεση. Σε αρκετά μικρότερο ποσοστό εμφανίστηκαν αυτές οι δομές και στο μάρτυρα και στην προμεταχείριση με το κιτρικό οξύ. Μια εξήγηση γι' αυτό το φαινόμενο είναι μια ενδεχόμενη υποξία που μπορεί να υπέστησαν οι ιστοί κατά την προσαρμογή τους από το στερεό στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα αλλά και ότι οι συνθήκες που δημιουργήθηκαν από τη χρήση του κιτρικού οξέος δεν ήταν τόσο συνθήκες καταπόνησης αλλά όπως καταδεικνύεται και στη βιβλιογραφία πολλές φορές η προσθήκη ορισμένων οργανικών οξέων στο υπόστρωμα βελτιώνει την αποδοτικότητα του υποστρώματος (Sunkar 2010, Edwin et al. 2007, Douglas et al. 1979). Έτσι αν και στα γυμνόσπερμα έχει φανεί πως το κιτρικό οξύ είναι μια ουσία που επάγει τη σωματική εμβρυογένεση (De Silva et al. 2007) η χρήση του στα αγγειόσπερμα πρέπει να μελετηθεί περισσότερο.

Η τρίτη ουσία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η σπερμίνη. Τα δεδομένα γι' αυτή την πολυαμίνη εκτός των άλλων, δείχνουν πως είναι μια ένωση η οποία αυξάνει κατά πολύ το pH του διαλύματος προμεταχείρισης αλλά και επάγει την βιοσύνθεση του NO σε ιστούς του *Arabidopsis thaliana* (Tun et al. 2006). Εδώ τα αποτελέσματα έδειξαν κάτι που μοιάζει παράδοξο και αυτό είναι ότι η συγκέντρωση των νιτροδών στα διαλύματα της σπερμίνης ήταν κατά πολύ μικρότερη από αυτή στα διαλύματα της μανιτόλης. Βέβαια υπάρχει πάντα η προοπτική ενός ιστοειδικού εντοπισμού του NO για παράδειγμα με την χρώση DAF 2 DA (4,5-diaminofluorescein diacetate), ή να ανιχνευθεί η παρουσία του NO με αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας (Neill et al. 2003, del Rio et al., 2004) καθώς επίσης και με φασματοφωτομετρία της αντίδρασης μετατροπή της οξυαιμογλοβίνης σε μεθαιμογλοβίνη (Orozco-Cardenas and Ryan, 2002). Οι μέθοδοι εντοπισμού του NO δεν περιορίζονται στις παραπάνω απλώς αναφέρονται ενδεικτικά ορισμένες. Τέλος η εκτίμηση για τη λειτουργία του μονοξειδίου του αζώτου εκτός από τον εντοπισμό του πρέπει να γίνει και συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την υπόλοιπη βιοχημική κατάσταση του ιστού και βέβαια αυτό σε συνδυασμό με μελέτη έκφρασης γονιδίων που έμμεσα ή άμεσα θα μπορούσαν να ρυθμιστούν μέσω του NO.

Το πεδίο έρευνας για την σωματική εμβρυογένεση σίγουρα δεν περιορίζεται στα όρια και τις ιδέες που προτείνονται στην παρούσα μελέτη. Η ανάπτυξη συστημάτων καλλιέργειας που ευνοούν την ανάπτυξη σωματικών εμβρύων στα φυτά είναι μια συνεχής πρόκληση καθώς η συγκεκριμένη διαδικασία συγκεντρώνει πλεονεκτήματα τα οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί αφορούν τόσο την εργαστηριακή έρευνα όσο και την προοπτική ανάπτυξης καινοτόμων προϊόντων σε επίπεδο εμπορικής εκμετάλλευσης.

Βιβλιογραφία

- Arasimowicz M., J. Floryszak-Wieczorek. 2007.** Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science* 172 876–887
- Apel and Hirt, 2004.** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, , vol. 55, p. 373-399.
- Barroso JB, Corpas FJ, carreras A., Sandalio LM., Lupianez JA, del Rio LA., 1999.** Location og nitric oxide synthase in plants peroxisomes. *Journal of biological chemistry*, 274, 36729-36733
- Beausejour C, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe S, Yaswen P and Campisi J 2003.** Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22: 4212–4222.
- Berg J., Tymoczko J.L and Stryer 2010.** Biochemistry, Fifth edition. International Edition.
- Buettner G. 1993.** The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, - Tocopherol, and Ascorbate *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300: 535-543.
- Chung, A and Khurana P., 2002** Gene expression during somatic embryogenesis – recent advances. *Current Science*, vol. 83, no. 6,p. 715-739.
- Cooney, R.V., Harwood, P.J., Custer, L.J., Franke, A.A., 1994.** Lightmediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ. Health Persp.* 102, 460–462.
- Davey M. R. and Antony P., 2009.** Plant cell culture. Essential methods. School of bioscience university of Nottingham Loughborough, UK
- Davletova, S. Meszaros T., Miskolczi, P., Oberchall, A., Torok, K., Magyar, Z., Dutis, D. and Deak M. 2001,** Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *Journal of Experimental Botany*, vol. 52, no. 355, p. 215-221.
- De Jong A.J., Schmidt E.D.L. and de Vries S.C. 1993.** Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 22: 367–377.
- De Silva Z V. , D. Bostwick, Z Kristi L. Burns Z Charlie D. Oldham Z Anna Skryabina Z M. Cameron Sullards Z Di Wu Z Yalin Zhang Z Sheldon W. May Z Gerald S. Pullman, 2008.** Isolation and characterization of a molecule stimulatory to growth of somatic embryos from early stage female gametophyte tissue of loblolly pine. *Plant cell reports*, 27: 633-647
- del Rio A L., Corpasa F. J., Barroso J.B. 2004.** Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65. 783–792.
- Dutis D., Gyorgyey, J., Borge, L. and Bako, L. 1995.** Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, Trevor A. ed. *In vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 267-308.

- Duthie G. 1999** Determination of activity of antioxidants in humansubjects. Proceedings of the Nutrition Society, 58: 1015-1024.
- Emons A.M.C. 1994.** Somatic embryogenesis: cell biological aspects. Acta Bot. Neerl. 43: 1–14.
- Edwin G, Hall M. and De Kler G.J 2007.** Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Springer
- FEHÉR, Attila. 2005** Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujid, Abdul and Samaj, Josef. eds. *Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs*, Springer; Berlin/Heidelberg, , vol. 2, p. 85-101.
- Gaj M. D. 2001.** Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **64**: 39–46.
- Gaj M. D. 2001.** Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43: 27–47.
- Gasparis Z Sebastian Cezary Bregier Z Waclaw Orczyk Z Anna Nadolska-Orczyk 2008.** Agrobacterium-mediated transformation of oat (*Avena sativa* L.) cultivars via immature embryo and leaf explants. *Plant cell reports*
- Ikedai-Iwai Miho Mikihisa Umehara, Shinobu Satoh and Hiroshi Kamada, 2003.** Stress induce somatic embryogenesis in vegetive tissue of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 34, 107-114.
- Jiangwei Z., H. Mab, S.Chen, M. Ji, A. Perl, L. Kovacs , S. Chen 2009.** Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon—A proteomic approach. *Plant science* 177: 103-113.
- Kairong, C, JI L., Gengmel X; Jialong, L.,Lihong, W. and Yafu, W. 2002** Effect of hydrogen peroxide on synthesis of proteins during somaticembryogenesis in *Lycium barbarum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, vol. 68, no. 2, p. 187-193.
- Keaney J and Vita J. 1995** Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog-Cardiovasc-Dis.* 38: 129-54.
- Klepper, L.A., 1979.** Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmos. Environ.*13, 537–542.
- Kintzios S., Seretti E., Blouhos P., Drossopoulos JB., Kitsaki C.K., Lippa-Tsakalidis A., 2002.** Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash and melon. *Plant cell reports* 21.1-8
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-LeGrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A. and Wendehenne, D. 2004** Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* 135: 516–529.

- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C and Giovannini C. 2005.** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *J. Nutr.Biochem.* 16: 577-586.
- Mordhost A. P., K. J. Voerman, M, V. Hartog, E. A. Meijer,J. van Went, M. Koornneef and S. C. de Vries 1998.** Somatic Embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* Is Facilitated by Mutations in Genes Repressing Meristematic Cell Divisions. Genetics Society of America
- Murgia I., Delledone M., Soare C. 2002.** Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant journal* 30, 521-528.
- Neil, S. J.; Desikan, R., Clarke A., Hurst, R. D. and Hancock, J. T. 2002.** Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, , vol. 53, no. 372, p. 1237-1247.
- Neil I., Desihan R., Clark A., Hancock JT., 2002.** Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant physiology* 128, 13-16.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T., 2002a.** Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 388–395.
- Neill, S.J., Desikan, R. and Hancock, J. 2003** Nitric oxide signalling in plants. *New Physiol.* 159: 11–35.
- Nishimura, H. (1986)** Reduction of NO₂ to NO by rush and other plants. *Environ. Sci.Technol.* 20, 413–416
- Nogueira C, Zeni G and Rocha J. 2004.** Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104: 6255–6285.
- Orozco-Cardenas M.L. and Ryan C.A. 2002. Nitric oxide negatively modulates wound signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology* 130, 487-493.
- Paiva S and Russell R. 1999.** β-Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition* 18:426-433.
- Papanastasiou I., Soukouli K., Mosxopoulou G., Kahia J. and Kintzios S. 2007.** Effect of liquid pulse with 6-benzyladenine on the induction of somatic embryogenesis from coffee (*Coffea Arabica L.*) callus culture. *Plant cell tissue culture* 92:215-225
- Patnaik, D.; Mahalakshmi, A. and Khurana, P. 2005.**Effect of water stress and heavy metals on induction of somatic embryogenesis in wheat leaf base cultures. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 43, no.8, p. 740-745.
- Quiroz-Figueroa F. R., Z R. Rojas-Herrera, Rosa M. Galaz-Avalos Z, V. M. Loyola-Vargas, 2006.** Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Organ Culture* . 86:285–301

- Ribeiro E.A. Jr., F.Q. Cunha, W.M. Tamashiro, I.S. Martins, 1999** Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells, *FEBS Lett.* 445 283–286.
- Rose R. J. and K. E. Nolan 2006.** Genetic Regulation of Somatic Embryogenesis With Particular Reference To *Arabidopsis thaliana* And *Medicago truncatula*.
- Schafer F and Buettner G. 2000.** Acidic pH amplifies iron-mediated lipid peroxidation in cells. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1175–1181.
- Scherer, G.F.E. 2004** NO as a potential second messenger in cytokinin signaling. In Nitric Oxide Signaling in Plants. Edited by Magalhaes, J.R., Singh, R.P. and Passos, L.P. pp. 149–166. Studium Press, LCC, Houston, TX, USA.
- Scherer, G.F.E. and Holk, A. 2000.** NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaine accumulation in *Amaranthus caudatus* L. *Plant Growth Regul.* 32: 345–350.
- Sies H, Stahl W and Sundquist A, 1995.** Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669, 7-20
- Sunkar R. 2010.** Plant stress tolerance, methods and protocols. *Oklahoma State University, Stillwater, OK, USA.* Human Press.
- Taiz L and Zeiger 2010.** Plant physiology. Fifth edition.
- Thorpe T. 1981.** Plant cell tissue culture. Methods and applications in agriculture. Department of Biology University of Calgary, Calgary Alberta ,Canada.
- Tun, N.N., Holk, A., Scherer, G.F.E., 2001.** Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Lett.* 509,174–176.
- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V.,Handro W., Iochevet E.,Floh S.and Günther F. E. Scherer.2006** Polyamines Induce Rapid Biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant Cell Physiol.* 47(3): 346–354.
- Tuteja N. , M. Chandra, R. Tuteja, M.K. Misra, (2004)** Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology, *J. Biomed. Biotech.* 4 227–237.
- Wendehenne D. , A. Pugin, D. Klessig, J. Durner. (2001)** Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells, *Trends Plant Sci.* 6 177–183.
- YU, Tsong-Ann; YEH, Shyi-Dong and YANG, Jiu-Sherng. 2001** Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, , vol. 42, no. 4, p. 281-286.
- Zavattieri M. A., A. M. Frederico, M. Lima, R. Sabino, B. Arnholdt-Schmitt 2010.** Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458

Zeng F., Zhang X., Cheng L., Hu,L., Zhu, L., Cao, J. and Guo, X. 2007. A draft gene regulatory network for cellular totipotencyreprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics*,, vol. 90, no. 5, p. 620-628.

Αϊβαλάκης Γ., Καραμπουρνιώτης Γ και Φασσέας Κ. (Συλλογικό έργο) 2005. Γενική βοτανική. Η μορφολογία , η ανατομία και η φυσιολογία των ανώτερων φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Καραμπουρνιώτης Γ., 2002. Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών. Οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Κίντζιος Σ., 2005 Συνοδευτικές σημειώσει παραδόσεων κύτταρο/ιστοκαλλιέργειας φυτών. Εδόσεις ΓΠΑ , Αθήνα.

Κίντσιος Σ., 1997. Επιχειρηματική ιστοκαλλιέργεια. Κατασκευή και διαχείριση επιχειρηματικών μονάδων παραγωγής ανθοκομικού πολλαπλασιαστικού υλικού με ιστοκαλλιέργεια. Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα.

Μοσχοπούλου Γ., 2006. Ανάπτυξη βιοαισθητήρα βιοηλεκτρικής αναγνώρισης πέμπτης και έκτης γενιάς για την ανίχνευση ελευθέρων ριζών και συγκριτική μελέτη απόδοσης αυτού

Παπαναστασίου Ι., 2005. Μελέτη της σχέσης της οξειδωτική ισορροπίας των φυτικών κυττάρων και ιστών με διεργασίες in vitro διαφοροποίησης αυτών. Μεταπτυχιακή μελέτη ΓΠΑ.

Ολυμπίου Χ., 2001. Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια. Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα.

Χατζόπουλος Π., 2001. Βιοτεχνολογία φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.