

**TECHNOLOGICAL EDUCATIONAL INSTITUTE OF
KALAMATA
SCHOOL OF TECHNOLOGICAL AGRICULTURE
DEPARTMENT: GREENHOUSES CULTIVATIONS AND
FLORICULTURE**

TITLE: "Effect of auxin and cytokinin Interaction on adventitious root formation *in vitro* on tobacco."



**Professor: Mr.KANAKIS ANDREAS
Student: SPITHOURAKI VASILIKI**

KALAMATA 2000

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ: ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

**ΘΕΜΑ: “Αλληλεπίδραση της αυξίνης και κυτοκινίνης στο
σχηματισμό επίκτητων ριζών και βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια
εκφύτων καπνού.”**



**Υπεύθυνος Καθηγητής: κος ΚΑΝΑΚΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ
Σπουδάστρια: ΣΠΙΘΟΥΡΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2000

PLANT RESEARCH INTERNATIONAL

TITLE: “Effect of auxin and cytokinin Interaction on adventitious root and shoot formation *in vitro* on tobacco explants.”



**Supervisors: dr. WIM van der KRIEKEN
JAN KODDE**

Student: SPITHOURAKI VASILIK

THE NETHERLANDS 2000

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Dr. Wim van der Krieken που μου έδωσε αυτό το θέμα έρευνας και τον επόπτη μου κ. Jan Kodde που ήταν ένας πολύ καλός δάσκαλος. Κατά την διάρκεια τη εργασίας μου στο ινστιτούτο “Plant research International” έμαθα ότι η έρευνα συνοδεύεται από αυτοσυγκέντρωση, μεθοδολογία και οργάνωση. Η εργασία μου στο εργαστήριο ιστοκαλλιέργειας ήταν μία πολύ καλή ευκαιρία για να αποκτήσω εμπειρία πάνω στον ερευνητικό τομέα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή κ. Κανάκη Ανδρέα, που με τις εξειδικευμένες γνώσεις του πάνω στο αντικείμενο της ιστοκαλλιέργειας με βοήθησε αποτελεσματικά στην οργάνωση της παρούσας εργασίας κατά τρόπο τέτοιο ώστε να την παρουσιάσω και να την στηρίξω ενώπιον της επιτροπής εξέτασης πτυχιακών εργασιών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	vi
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
♦ Αναγέννηση ριζών, βλαστών και εμβρύων : Φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές απόψεις	2
♦ Ο σχηματισμός τυχαίων ριζών, βλαστών και εμβρύων συνοδεύεται από ανάλογα επιτυχή στάδια	4
♦ Επίκτητες ρίζες, τυχαίοι βλαστοί και σωματικά έμβρυα αναπτύσσονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων	5
♦ Αυξίνες	8
♦ Μεταφορά των αυξινών	10
♦ Οι βιολογικοί ρόλοι των αυξινών	10
♦ Κυτοκινίνες	14
♦ Οι κυτοκινίνες μεταφέρονται από τη ρίζα στο βλαστό μέσω των αγγείων του ξύλου	17
♦ Οι βιολογικοί ρόλοι των κυτοκινίνων	18
♦ Το γονίδιο της ισοπεντενυλικής μεταφοράς (ipt gene)	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
ΣΥΖΗΤΗΣΗ / ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε διάφορα βιβλία και άρθρα έχουν καταγραφεί τα αποτελέσματα ενός μεγάλου αριθμού πειραματικών εργασιών που περιγράφουν τον ανταγωνιστικό ρόλο των αυξινών με τις κυτοκίνινες. Σε αυτήν την πτυχιακή, μελετείται η ανταγωνιστική δράση των κυτοκινίνων και των αυξινών στην παραγωγή τυχαίων (επίκτητων) ριζών στον καπνό. Η συγκέντρωση της κυτοκινίνης μεταβλήθηκε προσθέτοντας εξωγενώς κυτοκινίνη ή με την εισαγωγή του γονιδίου IPT κάτω από τον έλεγχο του επαγόμενου με χαλκό διεγέρτη. Για λόγους συντόμευσης ο επαγόμενος με χαλκό διεγέρτης του γονιδίου IPT θα αναφέρεται στο εξής με την έκφραση σύστημα χαλκού- IPT. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα εκφύτων. Ένα σύστημα με έκφυτα δίσκων από το στέλεχος βλαστού (stem disks) και ένα άλλο με έκφυτα μασχαλιαίων βλαστών (axillary shoots). Στο πρώτο πείραμα μετρήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση αυξίνης (IBA και NAA) για διαφορετικούς καλλιεργούμενους γονότυπους. Η προστιθέμενη κυτοκινίνη είχε μια αρνητική επίδραση στην παραγωγή τυχαίων ριζών που οφείλονταν σε οποιαδήποτε χρησιμοποιηθείσα αυξίνη (IBA και NAA) και επιπλέον συνέτεινε στην παραγωγή βλαστών όταν χρησιμοποιούνταν σε υψηλές συγκεντρώσεις σε συνδυασμό με την αυξίνη NAA. Η εισαγωγή του συστήματος της ισοπεντενυλικής-τρανσφεράσης του χαλκού (Cu-IPT) δεν είχε καμία αρνητική επίδραση στο σχηματισμό ριζών από τα έκφυτα των μασχαλιαίων βλαστών ή των δίσκων. Μη αναμενόμενο ήταν ότι, το σύστημα χαλκού-IPT φαίνεται να έχει επιπλέον μια θετική επίδραση στη ριζοβόληση. Αυτό παρουσιάστηκε και στις δύο περιπτώσεις, δηλαδή τόσο του συστήματος των δίσκων όσο και του συστήματος των μασχαλιαίων βλαστών.

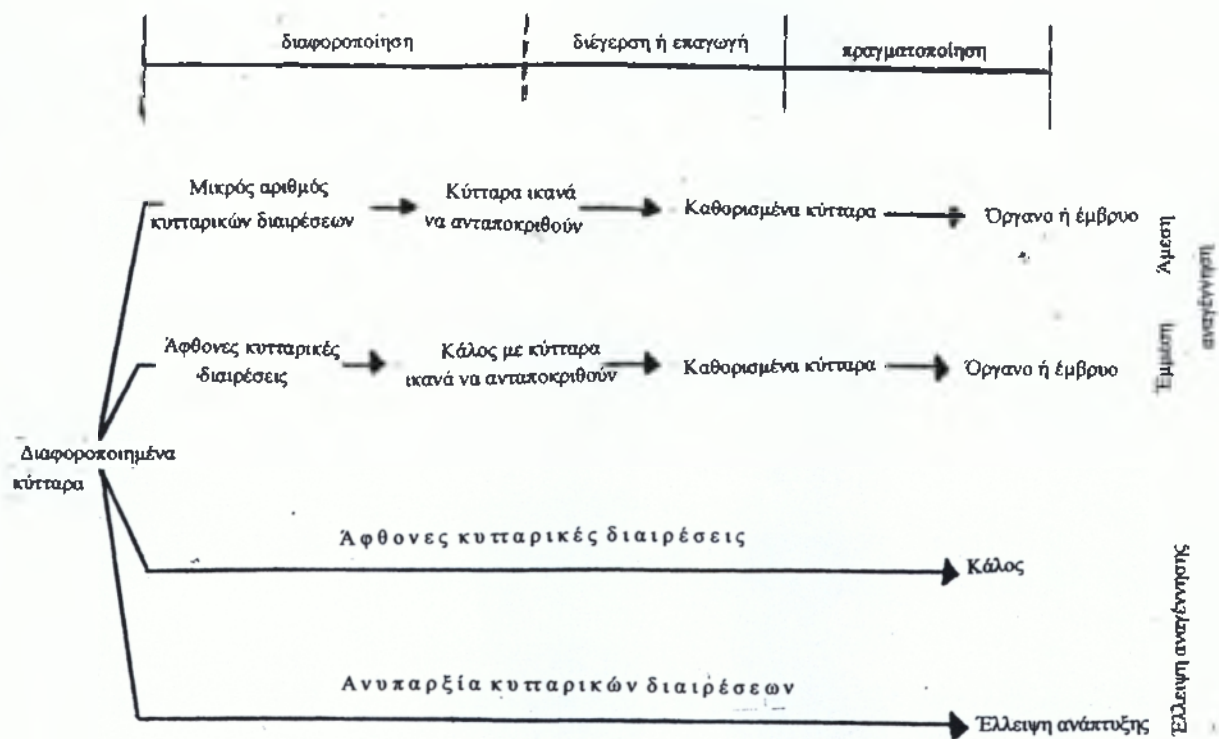
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- ♦ Αναγέννηση ριζών, βλαστών και εμβρύων : Φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές απόψεις

Στα φυτά, ειδικότερα κατά τη διάρκεια *in vitro* καλλιέργειας, τα σωματικά κύτταρα όταν υποστούν την επίδραση του κατάλληλου διεγέρτη μπορούν να σχηματίσουν τυχαίες ρίζες, τυχαίους βλαστούς ή σωματικά έμβρυα. Αναγέννηση καλείται μια διαδικασία ανάπτυξης αποτελούμενη από διακριτικές φάσεις και η υπόθεση αυτή εδραιώθηκε από τους Christianson και Warnick (1983). Υπάρχουν 3 διακριτές φάσεις :

- 1). Αποδιαφοροποίηση (κατά τη διάρκεια της οποίας ο φυτικός ιστός γίνεται ικανός ή κατάλληλος να ανταποκριθεί στην οργανογενετική/εμβρυογενετική διέγερση),
- 2). Διέγερση ή επαγωγή (όπου τα κύτταρα προορίζονται να σχηματίσουν ρίζα, βλαστό ή έμβρυο),
- 3). Πραγματοποίηση (προβολή ενός οργάνου ή ενός εμβρύου)

Η πρώτη φάση μπορεί να περιλαμβάνει μια περίοδο ανάπτυξης κάλου (*έμμεση αναγέννηση*), αλλά συχνά τα κύτταρα που υπάρχουν στο έκφυτο γίνονται ικανά για αναπαραγωγή χωρίς κυτταρική διαίρεση (*άμεση αναγέννηση*). Σε ένα έκφυτο μόνο μερικά κύτταρα εκδηλώνουν την οργανογενετική/εμβρυογενετική αντίδραση. Στην *άμεση αναγέννηση*, οι τρεις αναπαραγωγικοί δρόμοι αρχίζουν από κύτταρα σε διαφορετικούς ιστούς. Αυτό είναι περισσότερο φανερό όταν οι διαφορετικοί τύποι της αναγέννησης συμβαίνουν στο ίδιο έκφυτο. Το ορμονικό έναυσμα για την φάση της αποδιαφοροποίησης μπορεί να είναι ένα γενικό ερέθισμα, πιθανόν η αυξίνη. Κατά τη διάρκεια της φάσης της διέγερσης, κάθε πορεία απαιτεί συγκεκριμένα ορμονικά εναύσματα. Κατά τη διάρκεια της φάσης της πραγματοποίησης, οι ορμόνες μπορούν να απουσιάζουν ή να βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση. Τα επιτυχή βήματα στη διαδικασία της αναγέννησης συμπίπτουν με γεγονότα που συμβαίνουν σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο, αλλά μέχρι τώρα δεν έχει προβληθεί καμιά κατανοητή εικόνα.



Εικόνα 1: Γενική αλληλουχία των φάσεων ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της αναγέννησης.

- ♦ **Ο σχηματισμός τυχαίων ριζών, βλαστών και εμβρύων συνοδεύεται από ανάλογα επιτυχή στάδια**

Η εμφάνιση των φάσεων για την αναγέννηση βλαστών, μελετήθηκε από τους Christianson και Warnick (1983), σε έκφυτα φύλλων του είδους *Convolvulus*. Αυτοί μετέφεραν πολλές φορές μετά από την αρχή της ιστοκαλλιέργειας έκφυτα από ένα θρεπτικό μέσο σε άλλο, χρησιμοποιώντας 3 τύπους θρεπτικών μέσων, δηλαδή θρεπτικό μέσο που προκαλούσε την αναγέννηση: βλαστών (SIM) ή ριζών (RIM) ή κάλου (CIM). Αυτά τα θρεπτικά μέσα είχαν πολλές διαφορετικές αναλογίες αυξίνης-κυτοκινίνης. Κατά τη διάρκεια της αρχικής περιόδου, μετά από το ξεκίνημα της καλλιέργειας, η ορμονική σύνθεση μπορούσε να ποικίλλει ευρέως. Ύστερα, ακολούθησε μια φάση κατά τη διάρκεια της οποίας η αυξίνη και η κυτοκινίνη θα μπορούσαν να προστεθούν στο θρεπτικό μέσο σε κατάλληλες συγκεντρώσεις. Στην τελική (τρίτη) φάση, η ορμονική σύνθεση θα μπορούσε να ποικίλλει πάλι εντός ευρέων ορίων. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν την ύπαρξη τριών φάσεων:

Φάση 1: Απόκτηση ικανότητας αντίδρασης στο ερέθισμα (*acquisition of competence*): Τα κύτταρα στην αρχή της ιστοκαλλιέργειας δεν είναι ικανά να αποκριθούν στον οργανογενετικό διεγέρτη.

Φάση 2: επαγωγή: Τα κύτταρα ανταποκρίνονται στην οργανογενετική διέγερση και προορίζονται να σχηματίσουν ένα συγκεκριμένο όργανο, π.χ. βλαστό.

Φάση 3: πραγματοποίηση: Όταν τα κύτταρα έχουν αποκτήσει τον προορισμό τους εισάγεται το νέο πρόγραμμα της διαφοροποίησης για να παραχθεί το συγκεκριμένο όργανο π.χ. βλαστός.

Το ίδιο σχήμα μπορεί να δοθεί στο σχηματισμό της ρίζας και του εμβρύου. Κατά τη διάρκεια της επέμβασης για παραγωγή ριζών από μικροβλαστούς μηλιάς, ο De Klerk *et.al.* (1995) χρησιμοποίησε αυξομειούμενες ποσότητες αυξίνης ή / και κυτοκινίνης. Ανακάλυψαν μια δυνατή αυξανόμενη ανταπόκριση (παρεμπόδιση από την κυτοκινίνη και προαγωγή από την αυξίνη) από 24 μέχρι 96 ώρες μετά από την αρχή της επέμβασης για ριζοβόληση, αποδεικνύοντας ότι κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου εμφανίζεται η διέγερση. Επίσης κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου υπάρχει μια αυξημένη ανταπόκριση στην αντί-αυξίνη *p*-γλωροφαινοξυ-ισοβουτυρικό οξύ (De Klerk 1995).

◆ **Επίκτητες ρίζες, τυχαίοι βλαστοί και σωματικά έμβρυα αναπτύσσονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων**

Η *in vitro* σωματική εμβρυογένεση, ωστόσο, μπορεί να λάβει χώρα σε διάφορα φυτικά όργανα. Συγκεκριμένα στα μονοκοτυλήδονα είδη, τα μη ώριμα έμβρυα είναι συχνά η καλύτερη (και πολλές φορές η μόνη) πηγή εκφύτων για την σωματική εμβρυογένεση. Σε πολλά είδη, τα σωματικά έμβρυα μπορούν επίσης να παραχθούν από νεαρά σπορόφυτα ή μεγάλης ηλικίας φυτά. Τυχαίοι βλαστοί μπορούν να παραχθούν από ποικίλα όργανα, αν και η αναγέννηση από ρίζες είναι συνήθως δύσκολη. Οι τυχαίες ρίζες σχηματίζονται συνήθως από τους βλαστούς. Ο σχηματισμός των πλευρικών ριζών είναι όμοιος με το σχηματισμό τυχαίων ριζών αφού οι πλάγιες ρίζες δεν εκφύονται κατευθείαν από ένα μερίστωμα της ρίζας.

Όπως σημειώθηκε πριν, οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες είναι οι σπουδαιότεροι ρυθμιστές της αύξησης που συντελούν στην αναγέννηση ριζών και βλαστών. Οι κυτοκινίνες και οι αυξίνες είναι φυτορμόνες, που συνθέτονται φυσικώς στα ανώτερα φυτά και επιδρούν στην αύξηση και ανάπτυξη. Παράγονται σε πολύ μικρές ποσότητες και δρουν σε διαφορετική θέση του φυτού από εκείνη που παράχθηκαν. Ξεχωριστά από αυτές τις φυσικές ουσίες, έχουν παραχθεί και συνθετικές ουσίες οι οποίες δρουν όπως και οι φυσικές. Οι φυσικές ορμόνες αλλά και οι συνθετικώς παραγόμενες ουσίες ονομάζονται ρυθμιστές της αυξήσεως, συμβάλλουν στη διασπορά των ουσιών που συνθέτει το φυτό και καθορίζουν τη σχετική αύξηση όλων των οργάνων στο φυτό.

Η λέξη 'ορμόνη' σημαίνει *θέτω σε κίνηση ή προάγω* και χρησιμοποιείται στην φυσιολογία των ζώων για να δηλώσει ένα χημικό αγγελιοφόρο. Η αυθεντική χρήση στην φυσιολογία των φυτών υιοθετήθηκε κατ'αντιστοιχία με την έννοια της ορμόνης στα θηλαστικά. Αυτό περιλαμβάνει μια εντοπισμένη περιοχή σύνθεσής της, τη μεταφορά της μέσω του ρεύματος του αίματος σε έναν ιστό στόχο, και τη ρύθμιση μιας φυσιολογικής αντίδρασης του ιστού στόχου μέσω της συγκέντρωσης της ορμόνης. Η αυξίνη θεωρήθηκε ότι παράγει, κατά παρόμοιο τρόπο, μια αντίδραση στην αύξηση του φυτού σε τμήμα που απέχει από την περιοχή σύνθεσής της. Η διαδικασία αυτή φάνηκε ότι ταιριάζει με τον ορισμό του *μεταφερόμενου* χημικού αγγελιοφόρου των ζώων. Όμως τώρα είναι ξεκάθαρο ότι οι φυτικές ορμόνες δεν εκπληρώνουν τις προϋποθέσεις μιας ορμόνης των θηλαστικών. Η σύνθεση των

φυτικών ορμονών μπορεί να εντοπιστεί σε ένα μέρος του φυτού, αλλά μπορεί επίσης να λάβει μέρος σε μια ευρεία σειρά ιστών ή κύτταρων μέσα στους ιστούς. Μολονότι μπορούν να μεταφερθούν και να δράσουν σε απόσταση, αυτό δεν είναι ο κανόνας. Μπορούν επίσης να δράσουν στον ιστό στον οποίο συνθέτονται ή ακόμα μέσα στο ίδιο το κύτταρο που παράγονται. Σε μια εξαιρετική περίπτωση διαπιστώνεται η μεταφορά των κυτοκινινών από τις ρίζες στα φύλλα όπου παρεμποδίζουν τη γήρανση και διατηρούν τη μεταβολική δραστηριότητα, ενώ σε μια άλλη περίπτωση η παραγωγή του αιθυλενίου μπορεί να φέρει αλλαγές μέσα στον ίδιο ιστό, ή μέσα στο ίδιο κύτταρο, όπου συντίθεται. Επιπλέον, εδώ και αρκετά χρόνια, εγκαταλείπεται η θεωρία ότι η μεταφορά συνιστά αναγκαία προϋπόθεση για τον ορισμό μιας ουσίας ως φυτική ορμόνη.

Στην *in vitro* καλλιέργεια, οι ρυθμιστές της αύξησης των ανώτερων φυτών, κυρίως οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες, είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες. Μπορεί να λεχθεί ότι η *in vitro* καλλιέργεια είναι συχνά αδύνατη χωρίς τους ρυθμιστές. Το εάν μια αυξίνη και/ή μια κυτοκινίνη πρέπει να προστεθεί σε ένα θρεπτικό μέσο για να επιτευχθεί η κυτταρική διόγκωση και/ή κυτταρική διαίρεση αυτό εξαρτάται απολύτως από τον τύπο του εκφύτου και το φυτικό είδος. Για παράδειγμα, έκφυτα τα οποία από μόνα τους παράγουν αρκετή αυξίνη δε χρειάζονται επιπλέον αυξίνη για την κυτταρική διόγκωση και/ή διαίρεση. Υπάρχουν επίσης έκφυτα τα οποία παράγουν επαρκείς ποσότητες κυτοκινίνης και έτσι δε χρειάζονται επιπλέον κυτοκινίνες να προστεθούν στο μέσο.

Ανάλογα με την απαίτηση σε αυξητικούς παράγοντες οι *in vitro* καλλιέργειες μπορούν να διακριθούν σε:

Καλλιέργειες που δε χρειάζονται ούτε αυξίνη ούτε κυτοκινίνη.

Καλλιέργειες που χρειάζονται μόνο αυξίνη.

Καλλιέργειες που χρειάζονται μόνο κυτοκινίνη.

Καλλιέργειες που χρειάζονται αυξίνη και κυτοκινίνη.

Στα πειράματα που περιγράφονται σε αυτή την πτυχιακή, χρησιμοποιήθηκαν ιστοκαλλιέργειες που δε χρειάζονταν καμιά ορμόνη για ανάπτυξη και αναγέννηση (σύστημα μασχαλιαίων βλαστών) ή ιστοκαλλιέργειες που χρειάζονταν μία από τις δύο ορμόνες (αυξίνη για τις ρίζες, αυξίνη και κυτοκινίνη για τους βλαστούς) ξεχωριστά ή μαζί για ανάπτυξη και αναγέννηση (σύστημα δίσκων).

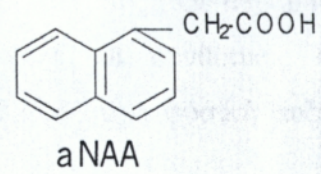
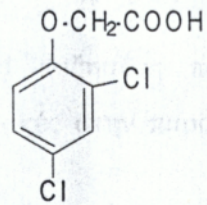
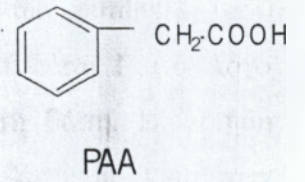
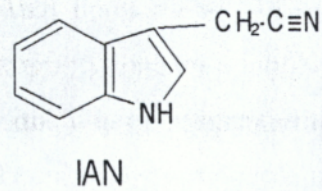
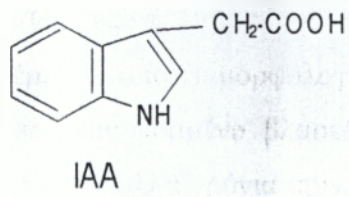
Σε μερικές περιπτώσεις χρησιμοποίησης ορμονών, ιδιαίτερα αυξινών ή κυτοκινινών, παρατηρήθηκε το φαινόμενο του 'εθισμού' (habituation). Εθισμός είναι

το φαινόμενο κατά το οποίο οι *in vitro* καλλιέργειες οι οποίες ενώ αρχικά απαιτούν έναν ρυθμιστή για εκδήλωση ανάπτυξης ή σχηματισμού οργάνου, μετά από μια περίοδο (μετά από μερικές ιστοκαλλιέργειες) δεν έχουν περαιτέρω απαίτηση ρυθμιστών ή απαιτούν μικρότερες συγκεντρώσεις ρυθμιστών. Αυτό συχνά παρατηρείται στις καλλιέργειες κάλων, και επίσης στην περίπτωση σχηματισμού μασχαλιαίων βλαστών κάτω από την επίδραση της κυτοκινίνης (π.χ. σε έκφυτα του είδους *Vriesea 'Poelmanii'*). Γενικά ο εθισμός δεν είναι μια μόνιμη αλλαγή και έτσι αν απομονωθούν έκφυτα από φυτά που σχημάτισαν 'εθισμένους' ιστούς, αυτά απαιτούν και πάλι ρυθμιστές. Με άλλα λόγια, οι αλλαγές που οφείλονται στον εθισμό είναι φυσικά επιγενετικές (αλλάζουν τη γονιδιακή δραστηριότητα σε ένα διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης του φυτού).

◆ Αυξίνες

Μερικά από τα πρώτα καταγραμμένα πειράματα που αφορούσαν τους παράγοντες ρύθμισης της αύξησης των φυτών διεξήχθησαν από τον Charles Darwin και το γιο του Francis και αναφέρθηκαν στο 'The power of movement in Plants' που εκδόθηκε το 1881. Οι Darwins έκαναν πρώτα συστηματικές παρατηρήσεις στην κάμψη των φυτών προς το φως, που είναι γνωστή ως φωτοτροπισμός, χρησιμοποιώντας σπορόφυτα του αγρωστώδους *Phalaris canariensis* και της βρώμης (*Avena sativa*). Κατόπιν έδειξαν πως αν κάλυπταν το άνω τμήμα του κολεοπτίλου με υλικό αδιαπέραστο από το φως και εξέθεταν το φυτό σε πλευρικό φως δεν συνέβαινε η χαρακτηριστική κάμψη. Αν όμως οι κορυφές καλύπτονταν με υλικό διαφανές η κάμψη συνέβαινε κανονικά. Αυτά τα πειράματα έδειξαν στους Darwins την ύπαρξη κάποιας 'επικοινωνίας' μεταξύ της κορυφής, δηλ. του ιστού που έπαιρνε το ερέθισμα του φωτός, και του υπόλοιπου κολεοπτίλου όπου συνέβαινε η ανταπόκριση της αύξησης. Και δήλωσαν: 'θα πρέπει να συμπεράνουμε πως όταν τα σπορόφυτα εκτίθενται ελεύθερα σε πλευρικό φως κάποια επιρροή μεταφέρεται από το ανώτερο στο κατώτερο μέρος, προκαλώντας την κάμψη του δευτέρου'.

Το 1926, ο Δανός φυσιολόγος φυτών Frits W. Went κατάφερε να απομονώσει αυτή την 'επιρροή' από τις κορυφές του κολεοπτίλου και έδειξε ότι η κορυφή του κολεοπτίλου ασκούσε την επίδρασή της μέσω κάποιας χημικής ουσίας παρά σαν κάποιος φυσικός διεγέρτης. Ο Went ονόμασε αυτή τη χημική ουσία αυξίνη (auxin) από την ελληνική λέξη αυξάνω. Η ουσία αυτή απομονώθηκε στις αρχές του 1930, προσδιορίστηκε ο χημικός τύπος της και ονομάστηκε ινδολυλο-3-οξικό οξύ (indol-3-acetic acid=IAA).



όνα 2: Συντακτικοί τύποι των φυτικών ορμονών: *Αυξίνες*: Ινδολυλο-3-οξεικό οξύ (IAA); ολυλο-οξεικό-νιτρύλιο (IAN); Φαινόξυ-οξεικό-οξύ (PAA); Διχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2,4 D); φθαλινοξικό οξύ (NAA).

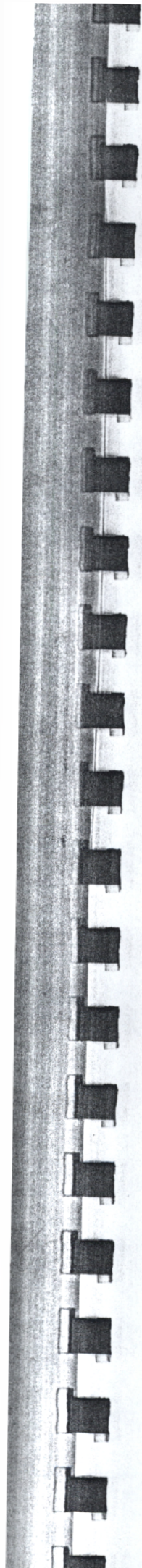
♦ Μεταφορά των αυξινών

Οι αυξίνες μεταφέρονται πολικά μέσα στους βλαστούς των φυτών, δηλαδή μεταφέρονται από τη μορφολογική κορυφή προς τη μορφολογική βάση. Για το λόγο αυτό σε έναν κομμένο βλαστό οι αυξίνες συσσωρεύονται στη βάση. Είναι ήδη γνωστό από πολλά χρόνια πριν ότι οι ρίζες σχηματίζονται στη βάση των κομμένων βλαστών σε πολλά φυτικά είδη. Σαν αποτέλεσμα αυτών των στοχασμών, ο Went έκανε πειράματα όπου έδειξε ότι η εφαρμογή των αυξινών στη βάση κομμένων βλαστών προκαλεί αυξημένη παραγωγή ριζών. Οι συνθετικές αυξίνες είναι περισσότερο δραστικές στην παραγωγή ριζών από ότι η φυσική αυξίνη ινδολυλοοξικό οξύ (IAA).

Οι ποικίλες επιδράσεις των αυξινών εξαρτώνται πρωτίστως από τον ρυθμό παραγωγής, αποθήκευσης και αποσύνθεσής τους από το φυτό. Το αμινοξύ τρυπτοφάνη χρησιμεύει σαν πρόδρομος ουσία για την παραγωγή του IAA. Το ινδολυλοασετικό οξύ μπορεί επίσης να συνδεθεί με ποικίλες ουσίες που σχηματίζουν ορμονικώς αδρανή μόρια, τα οποία μπορούν να χρησιμεύσουν σαν αποθηκευμένες πρόδρομες μορφές.

♦ Οι βιολογικοί ρόλοι των αυξινών

Οι ρόλοι του IAA σε ένα φυτό είναι πολλοί και διαφορετικοί. Ο ρόλος που αρχικά προσέλεξε την προσοχή ήταν η ικανότητα του να ελέγχει το ρυθμό της κυτταρικής διόγκωσης. Στους μίσχους και τα κολεόπτιλα οι αυξίνες προάγουν την κυτταρική επιμήκυνση, ενώ στις ρίζες εμποδίζουν κυρίως την κυτταρική επιμήκυνση. Αυτή η αντίδραση της ορμόνης έχει ευρέως μελετηθεί, εκ του λόγου ότι από μόνη της είναι μια ραγδαία αλλαγή. Για παράδειγμα, η επιμήκυνση των μίσχων και των κολεοπτίλων εκδηλώνεται με καθυστέρηση μόνο 10 λεπτά περίπου από την εφαρμογή της αυξίνης. Η αύξηση των κυττάρων στα φρούτα προάγεται επίσης από τις αυξίνες, αν και αυτή η αντίδραση είναι πολύ πιο αργή. Έχει υποτεθεί ότι η αυξίνη μπορεί να προκαλέσει μόνη της την αύξηση των φυτών και δεν απαιτεί την παρουσία άλλης ορμόνης. Σε μερικές περιπτώσεις αυτό δεν είναι απόλυτα σωστό. Στην παρεμποδιστική δράση της αυξίνης στην επιμήκυνση των ριζών μεσολαβεί, σε ένα μεγάλο βαθμό, το αιθυλένιο που παράγεται σε αντίδραση της παρουσίας αυξίνης.



αλλά και για την επιμήκυνση των άχρωμων κυττάρων του μίσχου μπορεί επίσης να απαιτείται η παρουσία των στεροειδών του χαλκού (μπρασινοστεροειδών). Η ικανότητα των φυτών να ρυθμίζουν την κατεύθυνση της ανάπτυξης του μίσχου και της ρίζας σε αντίδραση στο μονόπλευρο φωτισμό (φωτοτροπισμός) ή τη βαρύτητα (γεωτροπισμός) πιστεύεται ότι οφείλεται στη δευτερογενή ανακατανομή της αυξίνης που έχει ως αποτέλεσμα το διαφορετικό ρυθμό της κυτταρικής επιμήκυνσης στις δύο πλευρές του υφιστάμενου την επίδραση οργάνου.

Η διακλάδωση ενός φυτού συμβαίνει όταν οι πλάγιοι οφθαλμοί, οι οποίοι εισέρχονται σε λήθαργο λίγο μετά το σχηματισμό στη μασχάλη του φύλλου, χάνουν τον λήθαργο και ανακτούν την ανάπτυξή τους. Οι πλάγιοι οφθαλμοί τείνουν να παραμείνουν σε λήθαργο τόσο καιρό όσο ο κορυφαίος οφθαλμός είναι ενεργός και αναπτυσσόμενος (*κυριαρχία της κορυφής*), όμως με την απομάκρυνση ή το θάνατο του ακραίου οφθαλμού, οι πλάγιοι αρχίζουν να αναπτύσσονται. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί με προσθήκη αυξίνης στην περιοχή μετά από την απομάκρυνση του ακραίου μεριστώματος, ή με τη γενική αύξηση του επιπέδου της αυξίνης στα διαγονιδιακά φυτά. Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο η αυξίνη αίρει την κυριαρχία της κορυφής είναι σε αμφισβήτηση, υπάρχει μικρή αμφιβολία στο ότι η κατάσταση της αυξίνης στο φυτό έχει μεγάλη επίδραση στο ποσό των διακλαδώσεων.

Καθώς το φυτό αυξάνει σε διάμετρο, το δευτερογενές ξύλο σχηματίζεται από το κάμβιο. Η αυξίνη εμπλέκεται τόσο στον έλεγχο της διαίρεσης του καμβίου όσο και στην διαφοροποίηση των τραχειακών στοιχείων που ακολουθεί αμέσως μετά. Όταν οι αγγειακές δεσμίδες διαρρηγνύονται, τα κύτταρα του παρεγχύματος μπορούν να ξαναδιαφοροποιηθούν μέσα στα τραχειακά στοιχεία και να ξαναφτιάξουν τις αγγειακές λειτουργικές δεσμίδες. Αυτό συμβαίνει σε αντίδραση στα αυξανόμενα επίπεδα αυξίνης στην πληγωμένη περιοχή.

Στα φυλλοβόλα φυτά, τα φύλλα παραμένουν προσαρτώμενα στους μίσχους για τόσο καιρό όσο διαρκεί η μετακίνηση της αυξίνης από το έλασμα του φύλλου προς τα κάτω μέσω του μίσχου. Όταν αυτή η μετακίνηση διακοπεί, όπως συμβαίνει όταν το έλασμα του φύλλου αρχίζει να γηράσκει, μια ομάδα κυττάρων στη βάση του μίσχου, ονομαζόμενη *ζώνη αποκοπής ή αφοριστική στοιβάδα*, υφίστανται αλλαγές ανάπτυξης έτσι ώστε να εμφανίζεται αποσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων, με αποτέλεσμα να πέσει το φύλλο. Αυτή η διαδικασία, γνωστή ως πτώση, συμβαίνει και στα φρούτα όταν τα σπέρματα παύουν να εξάγουν αυξίνη μέσω του ποδίσκου των φρούτων.

Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων δραστηριοποιούνται μέσω των αυξινών. Σ' αυτά περιλαμβάνονται τα γονίδια SAUR και PAR, τα οποία δραστηριοποιούνται μέσα σε λίγα λεπτά και των οποίων οι ακριβείς ρόλοι είναι ακόμα άγνωστοι. Άλλα γονίδια, τα οποία επίσης διεγείρονται από τις αυξίνες είναι αυτά που κρυπτογραφούν τις κυτταρίνες, συμμετέχουν στην πτώση του φύλλου, και στη σύνθεση του ACC που εμπλέκεται στο σχηματισμό του αιθυλενίου. Ο ίδιος αγγελιοφόρος, η αυξίνη, ενεργοποιεί διαφορετικές περιοχές των γονιδίων, ανάλογα με την φυσιολογική κατάσταση των δεκτικών κυττάρων.

Πίνακας 1: Μερικοί βιολογικοί ρόλοι των αυξινών. Η εμπλοκή άλλων ορμονών ενδείκνυται ως: (+) αν η ορμόνη έχει την ίδια επίδραση όπως την αυξίνη και (-) αν παρεμποδίζει την επίδραση της αυξίνης. Ταχύτητα αντίδρασης: ταχεία (T), λαμβάνει μέρος σε λιγότερο από 1 ώρα; μέση (M), 1-24 ώρες; βραδεία (B)>1 μέρα. Άλλες ορμόνες: GA (γιββερελλίνη), CK (κυτοκίνη), ABA (αμπισικό οξύ), AUX (αυξίνη).

Διαδικασία	Επίδραση	Άλλες ορμόνες	Ταχύτητα
Κυτταρική επιμήκυνση: μίσχου/κολεόπτια	Προάγεται		T
Ρίζες	Παρεμποδίζεται	Εν μέρει μέσω του αιθυλενίου	T
Φρούτα	Προάγεται	GA+, CK+	M-B
Φωτοτροπισμός: μίσχου/κολεόπτια	Ελέγχεται		T
Γεωτροπισμός: μίσχου/κολεόπτια	Ελέγχεται		T
Ρίζες	Ελέγχεται?	ABA+?	T
Κυτταρική διαίρεση: κάλλος	Προάγεται	Απαιτεί CK	B
Σχηματισμός οφθαλμού: κάλλος/κομμένες επιφάνειες	Παρεμποδίζεται από Aux>CK		B
Σχηματισμός ρίζας: κάλλος/κομμένες επιφάνειες	Προάγεται από Aux>Ck		B
Κυριαρχία της κορυφής	Προάγεται	CK-	M
Διαφοροποίηση ξυλώματος	Προάγεται	CK-, GA+?	B
Αποκοπή του φύλλου	Παρεμποδίζεται	Αιθυλένιο, ABA+	M
Βιοσύνθεση του αιθυλενίου	Προάγεται		M
Εισαγωγή γονιδίου: SAUR γονίδια	Προάγεται		T
κυτταρίνη	Προάγεται		M

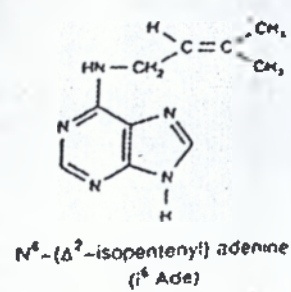
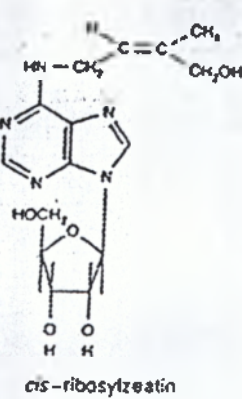
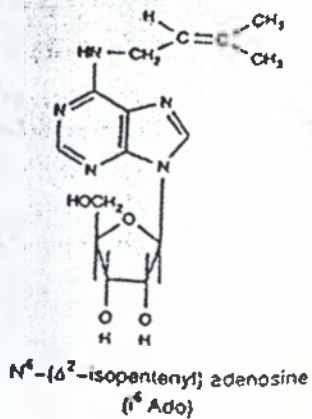
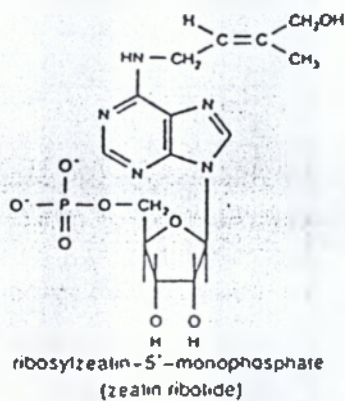
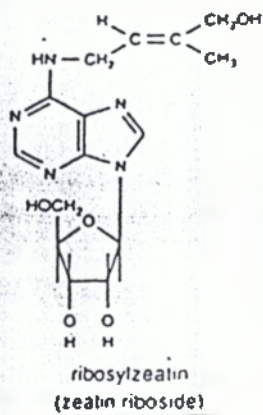
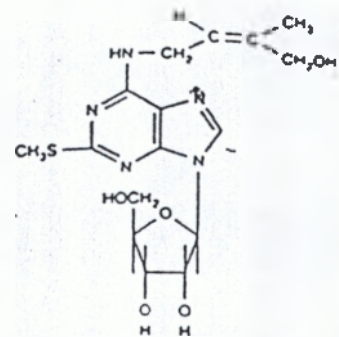
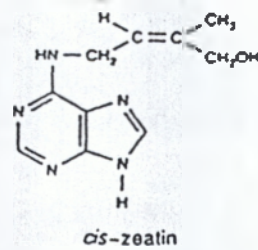
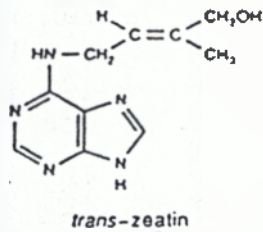
◆ Κυτοκινίνες

Μια άλλη ομάδα φυτορμονών που παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό τυχαίων βλαστών και ριζών είναι οι κυτοκινίνες. Η ανακάλυψη των κυτοκινινών ήταν το αποτέλεσμα των προσπαθειών προσδιορισμού των συντελεστών που πιθανόν διέγειραν τον πολλαπλασιασμό των ώριμων και μη διαιρούμενων φυτικών κυττάρων που χρησιμοποιούνταν στην ιστοκαλλιέργεια. Αρχικά, ο Folke Skoog στο πανεπιστήμιο του Wisconsin ανακάλυψε ένα συνθετικό παράγωγο της αδερίνης που το ονόμασε **κινετίνη**, ήταν ένας δυναμικός διεγέρτης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της εντεριώνης του καπνού, όταν αυτά καλλιεργούνταν παρουσία μιας αυξίνης. Το υγρό ενδοσπέρμιο πολλών φυτών, περιλαμβανομένου και αυτού της ινδικής καρύδας και ανώριμων κόκκων αραβόσιτου, έχει μια επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όμοια με αυτή της κινετίνης. Το μόριο που είναι υπεύθυνο για αυτή την δραστηριότητα στο ανώριμο ενδοσπέρμιο του αραβόσιτου είναι αυτό της 6-(4-υδροξύ-3-μέθυλ-*trans*-2-ενυλαμινο) πουρίνη, δηλαδή η **ζεατίνη**. Η ζεατίνη είναι μια αδερίνη, ή ένα παράγωγο της αμινοπουρίνης, με τη μια πλευρική αλυσίδα κοντά στο N⁶ άζωτο. Επειδή αυτή η πλευρική αλυσίδα της ζεατίνης έχει ένα διπλό δεσμό, μπορεί να υφίσταται σε *cis* ή *trans* μορφή. Η υπάρχουσα φυσική ζεατίνη των ανώτερων φυτών έχει *trans* μορφή, αν και τόσο η *cis* όσο και η *trans* μορφή της ζεατίνης είναι δραστήριες όπως οι κυτοκινίνες. Η ζεατίνη είναι η πιο διαδεδομένη κυτοκινίνη στα ανώτερα φυτά. Όμως και άλλα παράγωγα της αμινοπουρίνης, τα οποία δρουν όπως οι κυτοκινίνες, έχουν επίσης απομονωθεί από πολλά φυτά και είδη βακτηρίων. Αυτές οι κυτοκινίνες μπορούν να υπάρχουν στο φυτό σαν ένας ριβοζίτης, μία ριβοζιτίνη, ή ένας γλυκοζίτης.

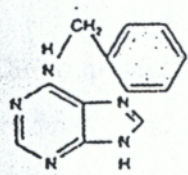
Μερικά βακτήρια και μύκητες είναι στενά συνδεδεμένα με τα ανώτερα φυτά. Σε πολλές περιπτώσεις αυτοί οι μικροοργανισμοί παράγουν και εκκρίνουν αρκετές ποσότητες κυτοκινινών και/ή προκαλούν τα φυτικά κύτταρα να συνθέτουν φυτικές ορμόνες, περιλαμβανομένων και των κυτοκινινών. Μόλυνση των φυτικών ιστών με αυτούς τους μικροοργανισμούς μπορεί να προκαλέσει τη διαίρεση των κυττάρων τους και, σε μερικές περιπτώσεις, να συμβάλλει στο σχηματισμό ειδικών κατασκευών όπως οι μυκόρριζες, στις οποίες ο μικροοργανισμός μπορεί να βρίσκεται σε μια κατάσταση συμβίωσης με το φυτό. Επίσης, μερικά παθογόνα βακτήρια μπορούν να υποκινήσουν τα φυτικά κύτταρα να διαιρευθούν. Ένα από αυτά είναι το βακτήριο

Agrobacterium tumefaciens, το οποίο είναι η πηγή για το γονίδιο IPT, για το οποίο θα γίνει συζήτηση αργότερα.

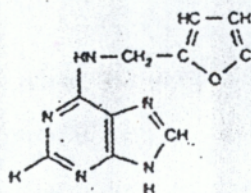
A. Η ζεατίνη και μερικά παραγωγά της



Β. Συνθετικές κυτοκινίνες



benzyladenine (BA)



kinetin

◆ **Οι κυτοκινίνες μεταφέρονται από τη ρίζα στο βλαστό μέσω των αγγείων του ξύλου**

Όμοια με τις αυξίνες, οι κυτοκινίνες μεταφέρονται επίσης πολικά. Τα ακραία μεριστώματα της ρίζας είναι οι κύριες θέσεις για τη σύνθεση της κυτοκινίνης. Οι κυτοκινίνες που συνθέτονται στις ρίζες μεταφέρονται μέσω των αγγείων του ξύλου στο βλαστό. Υπάρχουν όμως και ενδείξεις ότι όταν ένας βλαστός κοπεί από ένα ριζωμένο φυτό κοντά στο λαιμό, ο χυμός της ξυλώδους μοίρας μπορεί να συνεχίσει να ρέει από την τομή του εναπομείνοντος στελέχους για λίγο χρόνο και μετά τον αποκεφαλισμό του φυτού (Faiss *et. al.*, 1997). Αυτό το εξίδρωμα της ξυλώδους μοίρας περιέχει κυτοκινίνες. Αν το έδαφος που καλύπτει τις ρίζες κρατείται υγρό, η ροή του εξιδρώματος της ξυλώδους μοίρας, μπορεί να συνεχίσει για αρκετές μέρες. Καθώς η περιεκτικότητα της κυτοκινίνης δεν ελαττώνεται, αυτό σημαίνει ότι οι ρίζες μπορούν να συνθέτουν τις κυτοκινίνες που υπάρχουν στο εξίδρωμα. Επίσης, περιβαλλοντικοί παράγοντες που εμπλέκονται με τη λειτουργία της ρίζας, όπως το στρες από έλλειψη του νερού, μπορεί να μειώσουν την περιεκτικότητα της κυτοκινίνης στο εξίδρωμα της ξυλώδους μοίρας.

Οι ρίζες δεν είναι οι μόνες θέσεις όπου συντίθεται οι κυτοκινίνες. Με βάση παρατηρήσεις σε *in vitro* καλλιέργειες εκφύτων, αλλά και την περιεκτικότητα αυτών σε κυτοκινίνες καθώς και τη συμπεριφορά τους στην καλλιέργεια, μπορεί να λεχθεί ότι τόσο τα έμβρυα όσο και τα πολύ νεαρά φύλλα συνιστούν θέσεις της βιοσύνθεσης της κυτοκινίνης. Αντίθετα με το ακραίο μερίστωμα του βλαστού, τα έμβρυα συνεχίζουν να αυξάνουν και να αναπτύσσονται κανονικά ακόμη και μετά την απόσπασή τους από το φυτό και την καλλιέργειά τους σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει ορμόνες. Δεν είναι ακριβώς ξεκάθαρο πού και πότε αρχίζει η αυτονομία της κυτοκινίνης κατά την αύξηση του εμβρύου, αν και είναι πιθανόν ότι τα πολύ νεαρά έμβρυα δεν έχουν την ικανότητα να συνθέσουν κυτοκινίνες.

Οι κυτοκινίνες μεταφέρονται παθητικώς από τις ρίζες στο βλαστό μέσω των αγγείων του ξύλου. Μετακινούνται μέσα στο φυτό μέσω του ρεύματος της διαπνοής μαζί με το νερό και τα μέταλλα που απορροφούνται από τις ρίζες. Οι κυτοκινίνες που παρουσιάζονται στο εξίδρωμα της ξυλώδους μοίρας είναι κατά επικρατέστερο τρόπο νουκλεοτίδια. Όταν φτάσουν στα φύλλα, μπορούν να μετατραπούν σε ελεύθερες

βάσεις ή σε γλυκοζίτες. Οι γλυκοζίτες των κυτοκινίνων συσσωρεύονται σε υψηλά επίπεδα στα φύλλα.

◆ Οι βιολογικοί ρόλοι των κυτοκινίνων

Οι φυτικές ορμόνες σπανίως λειτουργούν μόνες τους. Ακόμα και σε περιπτώσεις στις οποίες μία αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα με προσθήκη μιας μόνης ορμόνης, ο ιστός μπορεί να περιέχει πρόσθετες ενδογενείς ορμόνες που συμβάλλουν στην αντίδραση. Οι κυτοκινίνες, όταν χορηγούνται σε ανώτερα φυτά μπορούν να προάγουν ή να εμποδίσουν ένα εύρος διαφορετικών φυσιολογικών, μεταβολικών και βιοχημικών αντιδράσεων καθώς και διαδικασιών ανάπτυξης. Η κυτταρική διαίρεση στα ανώτερα φυτά είναι άκρως ελεγχόμενη διαδικασία. Λαμβάνει χώρα μόνο σε ειδικευμένες θέσεις και ιστούς, όπως είναι τα μεριστώματα, τα αναπτυσσόμενα έμβρυα, οι καταβολές των φύλλων, το αγγειακό κάμβιο, και μερικοί άλλοι ιστοί. Ακόμα και σε αυτούς τους ιστούς, η κυτταρική διαίρεση συμβαίνει μόνο κάτω από κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα περισσότερα φυτικά κύτταρα έχουν αφήσει πίσω τους τον κύκλο της διαίρεσης και δεν ξαναδιαιρούνται κατά τη διάρκεια της ζωής του φυτού. Τα κύτταρα της εντεριώνης του στελέχους του βλαστού σχηματίζονται μέσω διαιρέσεων στο μερίστωμα που βρίσκεται ακριβώς κάτω από το ακραίο μερίστωμα του βλαστού. Αφού σχηματιστούν, υφίστανται εκτεταμένη κυτταρική επιμήκυνση, έτσι που ο όγκος τους μπορεί να αυξηθεί εκατό φορές, αλλά δε διαιρούνται. Αν ο ιστός της εντεριώνης του στελέχους του καπνού τοποθετηθεί σε *in vitro* καλλιέργεια επί ενός υποστρώματος που περιέχει ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, σακχαρόζη, μερικές βιταμίνες, και ταυτόχρονα μια αυξίνη και μια κυτοκινίνη, τα κύτταρα μπορεί να επανέλθουν στον κύκλο της κυτταρικής διαίρεσης και να διαιρεθούν επανειλημμένως για να σχηματίσουν κάλο. Στην πραγματικότητα, το μέγεθος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού θα καθορισθεί από την ποσότητα της κυτοκινίνης που προστέθηκε στο υπόστρωμα της καλλιέργειας. Αυτό δείχνει ότι ώριμα και μιτωτικώς αδρανή κύτταρα είναι ικανά για διαίρεση και πιστεύεται ότι αυτά δε διαιρούνται στο φυτό επειδή δε λαμβάνουν το κατάλληλο σήμα (σινιάλο). Δείχνει επιπλέον ότι η κυτοκινίνη θα μπορούσε να λειτουργήσει σαν ένα σήμα ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όταν και όπου αυτός συμβαίνει στο φυτό. Άλλες ορμόνες, ιδιαιτέρως η γιββεριλλίνη και το αψισικό οξύ, μπορούν επίσης να

έχουν ένα ρυθμιστικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που λαμβάνει χώρα σε μερικούς ιστούς και κάτω από ορισμένες συνθήκες, αλλά φαίνεται ότι η κυτοκινίνη εμφανίζεται να έχει την ικανότητα να προάγει τον πολλαπλασιασμό σε ένα ευρύ φάσμα ειδών κυττάρου. Η κυτοκινίνη μπορεί να είναι η πρωταρχική ορμόνη για τη κυτταρική διαίρεση στο φυτό.

Λίγο μετά την ανακάλυψη της κινετίνης, παρατηρήθηκε ότι καλλιεργούμενα τμήματα εντεριώνης προερχόμενα από ιστούς κάλου του καπνού, παρήγαγαν ρίζες ή βλαστούς, ανάλογα με τη σχέση της αυξίνης προς την κυτοκινίνη στο θρεπτικό μέσο της *in vitro* καλλιέργειας. Υψηλά επίπεδα αυξίνης σε σχέση με την κινετίνη προήγαγαν το σχηματισμό ριζών, ενώ υψηλά επίπεδα κυτοκινίνης σε σχέση με την αυξίνη οδήγησε στο σχηματισμό βλαστών. Στα μεσαία επίπεδα ο ιστός αυξήθηκε σαν ένας αδιαφοροποίητος κάλος. Έτσι, η σχέση αυξίνη/κυτοκινίνη είναι αυτή που ρυθμίζει την αύξηση και τη μορφογένεση σε αυτούς τους καλλιεργούμενους ιστούς. Αυτό σημαίνει ότι η αυξίνη και η κυτοκινίνη θα μπορούσαν να ασκήσουν μια μεγάλη επίδραση στον τύπο ανάπτυξης που εκδηλώνουν οι φυτικοί ιστοί. Οι κυτοκινίνες έχει δειχθεί ότι παίρνουν μέρος στη ρύθμιση πολλών πρόσθετων διαδικασιών της ανάπτυξης των φυτών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και τα ακόλουθα:

- Επαγωγή του σχηματισμού των χλωροπλαστών
- Καθυστέρηση της γήρανσης των φύλλων
- Αύξηση του μεγέθους των κυττάρων της κοτυληδόνας
- Μετακίνηση των θρεπτικών στοιχείων
- Σχηματισμός των οφθαλμών

Πίνακας 2: Μερικοί βιολογικοί ρόλοι των κυτοκινίνων. Η εμπλοκή άλλων ορμονών ενδεικνύεται σαν: (+) αν η ορμόνη έχει την ίδια επίδραση με την κυτοκινίνη και (-) αν παρεμποδίζει την επίδραση της κυτοκινίνης. Ταχύτητα αντίδρασης: ταχεία (T), λαμβάνει μέρος σε λιγότερο από 1 ώρα; μέση (M), 1-24 ώρες; αργή (A)>1 μέρα. CK=κυτοκινίνη, Aux=αυξίνη, ABA=αβισαϊκό οξύ, GA=γιββερελλικό οξύ

Διαδικασία	Αντίδραση	Άλλες ορμόνες	Ταχύτητα
Κυτταρική διαίρεση: κάλλος	Προάγεται	Απαιτεί Aux	A
Σχηματισμός βλαστού: κάλλος	Προάγεται από CK>Aux		A
Σχηματισμός ρίζας: κάλλος/τομές	Παρεμποδίζεται από CK>Aux		A
Κυριαρχία της κορυφής	Σπάει	Aux-	M
Σχηματισμός ξυλώματος	Παρεμποδίζεται	Aux-	M-A
Γηρασμός του φύλλου	Παρεμποδίζεται	ABA+	M-A
Μετακίνηση στερεών διαλυτών	Προάγεται?		T
Αύξηση ρίζας	Παρεμποδίζεται	Αιθυλένιο+, Aux+	T
Διαστολή της κοτυληδόνας	Προάγει	GA+	R

♦ Το γονίδιο της ισοπεντενυλικής τρανσφεράσης (*ipt* gene)

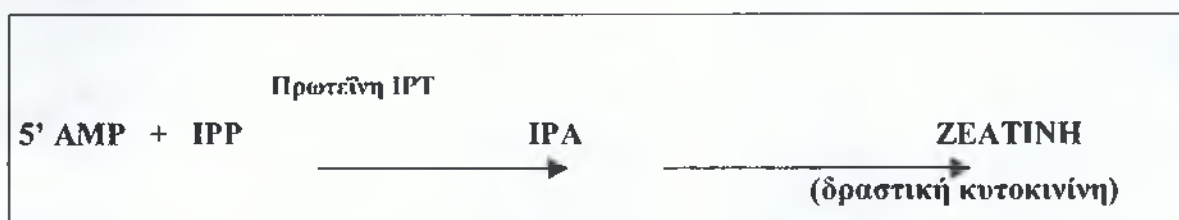
Μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος μελέτης του τρόπου μεταφοράς γονιδίων στα δικοτυλήδονα φυτά βασίζεται στο πλασμίδιο (Ti) του *Agrobacterium tumefaciens* το οποίο προκαλεί το εξέλκωμα (καρκίνο) στη βάση του βλαστού. Όταν ένα φυτικό κύτταρο τραυματίζεται και μολύνεται με το *A. Tumefaciens*, ένα συγκεκριμένο τμήμα του πλασμιδίου Ti, που ονομάζεται T-DNA, μεταφέρεται και ενσωματώνεται μέσα στο πυρηνικό γονιδίωμα του φυτού. Δύο από τα γονίδια T-DNA, που εκφράζονται στον ενζυμικό κώδικα των φυτικών κυττάρων, εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της αυξίνης, και ένα τρίτο γονίδιο, που κωδικοποιεί την ισοπεντενυλική τρανσφεράση (ένα ένζυμο κλειδί στη βιοσύνθεση της κυτοκινίνης), μεταφέρει, με τον ίδιο τρόπο όπως και η συνθετάση της κυτοκινίνης, την ισοπεντενυλική ομάδα από το ισοπεντενυλικό πυροφωσφορικό οξύ στο αδενοσίνω-μονοφωσφορικό οξύ (AMP) για το σχηματισμό της ισοπεντενυλικής ριβοζιτίνης της αδενίνης. Έκφραση του γονιδίου της ισοπεντενυλικής τρανσφεράσης (*ipt*), που αποδικοποιεί το πρώτο ένζυμο στην πορεία της βιοσύνθεσης της κυτοκινίνης, αποτελεί η συσσώρευση της ζεατίνης και των κυτοκινινών τύπου ριβοζίτου της ζεατίνης σε μεταμορφωμένα φυτικά κύτταρα. Υπερέκφραση του *ipt* από συνθετικούς διεγέρτες προκαλεί βλαστικές τερατογενέσεις και σχεδόν ταυτόχρονα εμποδίζει τελείως την αύξηση της ρίζας και την αναγέννηση ενός τέλειου φυτού. Παροδική υπερπαραγωγή της κυτοκινίνης, με τη χρήση διεγερτών οι οποίοι ελέγχονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και παράγοντες της ανάπτυξης, είχε ως αποτέλεσμα την αναγέννηση διαγονιδιακών φυτών καπνού τα οποία ήταν γενικά κοντύτερα, είχαν ένα λιγότερο αναπτυσσόμενο ριζικό σύστημα, εμφάνισαν καθυστερημένη γήρανση των φύλλων και, σε μερικές περιπτώσεις, ανώμαλη ανάπτυξη ανθέων. Στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες, η έκφραση του γονιδίου *ipt* δεν εντοπιζόταν σε κάποιο συγκεκριμένο ιστό ή όργανο και οι χρησιμοποιούμενοι διεγέρτες εμφάνιζαν μια αφυσικότητα.

Εν δυνάμει, ο έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *ipt* από έναν προαγωγέα ρύθμισης της ανάπτυξης, που προέρχεται από ένα γονίδιο το οποίο δραστηριοποιείται στις ρίζες όταν παύει η αύξηση του φυτού, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον χειρισμό της παραγωγής της κυτοκινίνης στη ρίζα.

Η αδρανοποίηση οποιουδήποτε φυτορμονικού γονιδίου στο DNA του πλασμιδίου Ti (T-DNA), μέσω μιας μετατοπιζόμενης εισαγωγής, οδηγεί τόσο σε αλλαγή των ισορροπιών της αυξίνης προς κυτοκίνη στους όγκους της περιοχής του λαιμού του καρπού που υποκινείται από το μεταλλαγμένο T-DNA όσο και σε αλλαγή στη μορφολογία του όγκου. Έτσι, η αδρανοποίηση του πρόδρομου γονιδίου της κυτοκίνης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός ριζόμορφου όγκου, ενώ η αδρανοποίηση και των γονιδίων οποιασδήποτε αυξίνης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός βλαστόμορφου όγκου. Η βλαστόμορφη αντίδραση του όγκου αποδίδεται στην ισοπεντενυλική τρανσφεράση (*ipt*) που βρίσκεται στο DNA του πλασμιδίου Ti (T-DNA).

Σε αυτή την εργασία, περιγράφονται πειράματα που θα μπορούσαν να έχουν ως αποτέλεσμα ένα σύστημα μιας εξαρτημένης παρεμπόδισης σχηματισμού των τυχαίων ριζών. Γι'αυτό χρησιμοποιείται η ανταγωνιστική δράση των κυτοκινινών προς την αυξίνη μέσω της εισαγωγής του γονιδίου *ipt*. Χρησιμοποιώντας το επαγωγικό σύστημα του χαλκού σε συνδυασμό με το γονίδιο *ipt*, η παρεμπόδιση του σχηματισμού των τυχαίων ριζών γίνεται μια εξαρτημένη διαδικασία.

Η πρωτεΐνη του *ipt* καταλύει το σχηματισμό της ισοπεντενυλικής αδενοσίνης (IPA) χρησιμοποιώντας το 5-αδεσινομονοφωσφορικό οξύ (5'-AMP) και το ισοπεντενυλικό πυροφωσφορικό οξύ (IPP) όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Τα ένζυμα που φυσικώς βρίσκονται στον καρπό μετατρέπουν τη IPA σε ζεατίνη. Η ζεατίνη που είναι μια δραστική κυτοκίνη μπορεί να παρεμποδίσει τη δράση της αυξίνης και συνεπώς παρεμποδίζει το σχηματισμό μιας λειτουργικής περιοχής τροφοδότησης.



Η εισαγωγή ξένων γονιδίων αποτελεί ένα δυναμικό εργαλείο με το οποίο μελετούνται και βελτιώνονται οι γενετικοί πόροι των φυτών. Τα επίπεδα της διαγονιδιακής έκφρασης και η έκφραση των μορφών μπορεί να ρυθμιστούν συνδυάζοντας την περιοχή κωδικοποίησης της πρωτεΐνης με έναν κατάλληλο υποκινητή. Υπάρχει μία μεγάλη σειρά ενδογενών φυτικών υποκινητών που πρόσφατα έχει διευρυνθεί ακόμη περισσότερο με την ανάπτυξη χημικών προωθητών, οι

οποίοι αντιδρούν με χημικές ενώσεις που υπό άλλες συνθήκες θα ήταν αδρανείς. Αυτή η σειρά περιλαμβάνει προωθητές που αντιδρούν σε επαγωγείς, όπως π.χ. το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, το στεροειδές δεξαμεθαζόνη, το ιόν του χαλκού, η αιθανόλη ή το αγροχημικό RH-5992. Αυτοί οι χημικοί προωθητές προσφέρουν μια σειρά επιλογών για διαγονιδιακούς σχεδιασμούς για πειραματική χρήση.

Επιπλέον, πολλές ενζυματικές αναλύσεις έχουν γίνει για μια ποικιλία πρωτεϊνών που αποκωδικοποιούνται από γονίδια όπως το γονίδιο GUS (reporter gene-γονίδιο αναφοράς). Στην πλειοψηφία των πρόσφατων μελετών, το γονίδιο GUS συμπεριλήφθηκε σαν δείκτης αναφοράς που επιτρέπει όχι μόνο τον ποσοτικό προσδιορισμό της διαγονιδιακής δραστηριότητας σε μια μη ραδιενεργό ανάλυση, αλλά επίσης και των ιστολογικών αναλύσεων της έκφρασης ορισμένων κυττάρων.

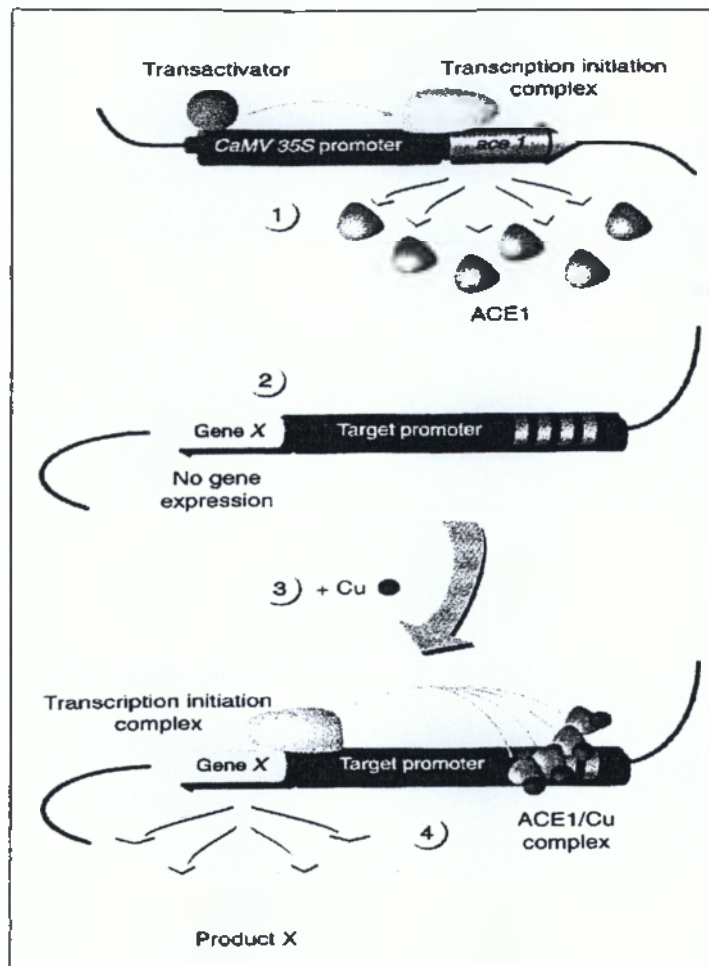
Σπόροι καπνού που περιλαμβάνουν αυτό το σύστημα παράχθηκαν από την εταιρία Marian Jane McKenzie, η οποία έφτιαξε επίσης τη δομή του συστήματος και το μετέφερε στην ποικιλία L του καπνού (McKenzie *et al.*, 1998). Το επαγωγικό σύστημα του χαλκού που απομονώθηκε πρώτα από τον Vadim Mett (1993) από μια ζύμη, περιλαμβάνει δύο μέρη:

α) Το γονίδιο ACE1 (που δραστηριοποιεί την έκφραση του χαλκού-MT) που αποκρυπτογραφεί έναν παράγοντα μεταγραφής κάτω από τον έλεγχο του διεγέρτη CaMV 35S RNA. (CaMV = ιός του μωσαικού του κουνουπιδιού).

β) Τέσσερα χημικά στοιχεία που αντιδρούν στα μέταλλα (MRE), δεσμευμένα σε περιοχές του ACE1 που συνδέει περιοχές μπροστά από το κύριο μέρος του διεγέρτη CaMV 35S RNA δεμένο με το γονίδιο του *ipt* ή με το γονίδιο του *gus* σε μία ελεγχόμενη κατασκευή.

Για να δραστηριοποιηθεί η έκφραση του γονιδίου *ipt*, το ACE1 χρειάζεται να δεθεί σε ένα από τα στοιχεία MRE. Για να γίνει δυνατή η σύνδεση του παράγοντα αντιγραφής του ACE1 στο στοιχείο του MRE χρειάζεται το ιόν του χαλκού.

Πριν γίνουν τα πειράματα με αυτό το σύστημα του Cu-IPT, ερευνήθηκε η φυσιολογική κατάσταση σχετικά με το χρόνο εφαρμογής και τις μέγιστες συγκεντρώσεις των ορμονών και του χαλκού στο σύστημα.



Εικόνα 6: Έκφραση του επαγωγικού συστήματος του χαλκού (The copper-inducible expression system). (1) Ο ACE1 παράγοντας αντιγραφής της ζύμης εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο ενός δυνατού διεγέρτη (π.χ. του διεγέρτη CaMV 35S). (2) Απουσία του χαλκού, δε μπορεί να συνδεθεί με τον διεγέρτη στόχο του. (3) Η σύνδεση του χαλκού προάγει μια διαρθρωτή αλλαγή, η οποία καθιστά ικανό το ACE1 να συνδεθεί με τη συγκεκριμένη αλληλουχία cis του διεγέρτη στόχου. (4) Η αντιγραφή από το διεγέρτη στόχο έχει ήδη προαχθεί.

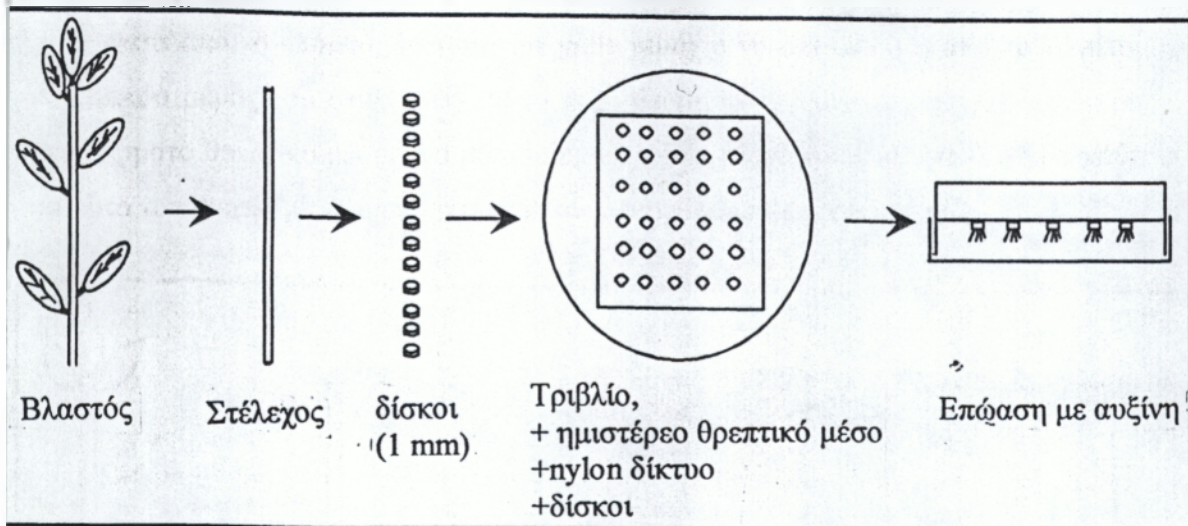
ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός των πειραμάτων όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή ήταν η μελέτη του ανταγωνιστικού ρόλου των αυξινών (IBA και NAA) με τις κυτοκινίνες (BAP) στην παραγωγή τυχαίων ριζών και βλαστών στον καπνό. Αποσκοπούσαν στη μελέτη της ιζογένεσης και βλαστογένεσης από ποικιλίες καπνού που δεν περιείχαν το γονίδιο ρι (SR1, L, Wisconsin) και από διαγονιδιακά φυτά (ID8, ID10).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τη μελέτη του ρόλου των αυξινών και κυτοκινινών στο σχηματισμό τυχαίων ριζών και βλαστών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δίσκων του στελέχους του βλαστού (Van der Kriecken *et. al.*). Σε αυτό το σύστημα ένας μεγάλος αριθμός ριζών μπορεί να σχηματισθεί σε ένα πολύ μικρό μέγεθος ιστού. Σε προηγούμενα πειράματα αποδείχθηκε ότι στο ίδιο σύστημα ο σχηματισμός ριζών εξαρτάται από την αυξίνη. Αυτή ήταν η επικρατούσα περίπτωση σε διαφορετικούς τύπους ιστών που προέρχονται από διαφορετικά φυτικά είδη όπως είναι η μηλιά, ο καπνός, η τριανταφυλλιά και η πατάτα. Η ριζοβολία είναι ταυτόχρονη και ραγδαία.

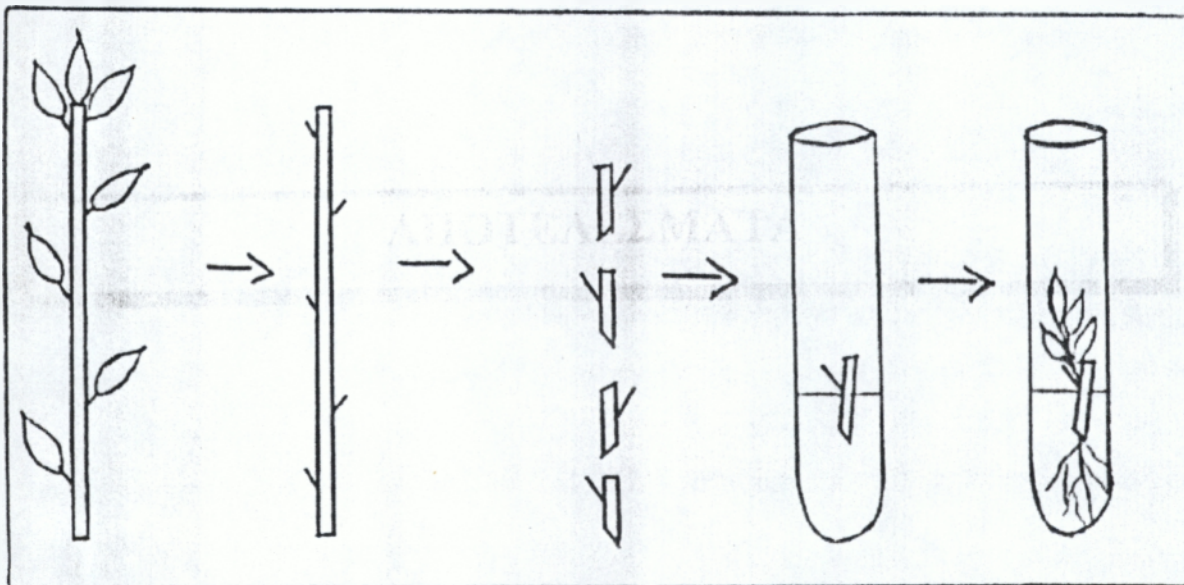
Το πειραματικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν έκφυτα καπνού προερχόμενα είτε από τις ποικιλίες SR1, L, Wisconsin είτε από διαγονιδιακά φυτά τα οποία παράχθηκαν με τη χρήση της ισοπεντενυλικής μεταφοράς του χαλκού (Cu-IPT) και την εισαγωγή του γονιδίου Cu-gus. Τα έκφυτα μεταφέρθηκαν και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο MS (Murashige και Skoog, 1962) που περιέχει 165mM σακχαρόζη, 4,4gr MS και 0,6% (w/v) άγαρ (Baltimore Biological Laboratory) και επώασθηκαν στους 25°C, με 16 ώρες περίοδο φωτός (PAR 60μmol m⁻²s⁻¹). Πειράματα ριζοβολίας έγιναν σε έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού πάχους 1mm και διαμέτρου περίπου 2mm, τα οποία αποκόπηκαν με ένα ξυραφάκι. Ομάδα 10 εκφύτων τοποθετήθηκαν σε τριβλία petri 9cm με την πάνω μεριά προς τα κάτω επί ενός nylon δικτύου τοποθετημένου πάνω στο θρεπτικό μέσο ριζοβολίας (όπως περιγράφεται στο παράρτημα) με ποικίλες συγκεντρώσεις ρυθμιστών της αυξήσεως. Όταν χρησιμοποιούνταν ευαίσθητες στο φως αυξίνες όπως το IBA, η επώαση ελάμβανε χώρα σε απόλυτο σκότος. Όλες οι επεμβάσεις έγιναν σε 3 ή σε 5 επαναλήψεις. Τα τριβλία petri με τα έκφυτα τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 25°C με την πάνω μεριά στραμμένη προς τα κάτω και με το φως κατευθυνόμενο από τα πλάγια.



Διάγραμμα της μεθόδου για την αναγέννηση ριζών από *in vitro* καλλιέργεια εκφύτων από δίσκους στελέχους βλαστού του καπνού.

Οποτεδήποτε τα υλικά μεταφέρονταν από το ένα θρεπτικό μέσο σε άλλο, το nylon δίκτυο (σήτα) με τα έκφυτα τοποθετούνταν πρώτα σε αποστειρωμένο υγρό χαρτί για ένα λεπτό για να ελαττωθούν οι ποσότητες των μεταφερόμενων ορμονών. Για καλή σύγκριση των αποτελεσμάτων, όλα τα έκφυτα σε ένα συγκεκριμένο πείραμα διανέμονταν τυχαίως πάνω στις διαφορετικές επεμβάσεις των ορμονών.

Στην περίπτωση απόκτησης εκφύτων μασχαλιαίων οφθαλμών, αποκόπτονταν τα γόνατα από το βλαστό, έτσι που το κάθε τεμάχιο να αποτελείται από το γόνατο, ένα μικρό μέρος του στελέχους, πάνω και κάτω από το γόνατο και, για καλύτερη στήριξη στο θρεπτικό μέσο, ένα μικρό μέρος από το μίσχο του φύλλου. Ύστερα κάθε έκφυτο τοποθετήθηκε στο σωλήνα, ο οποίος περιείχε το θρεπτικό μέσο.

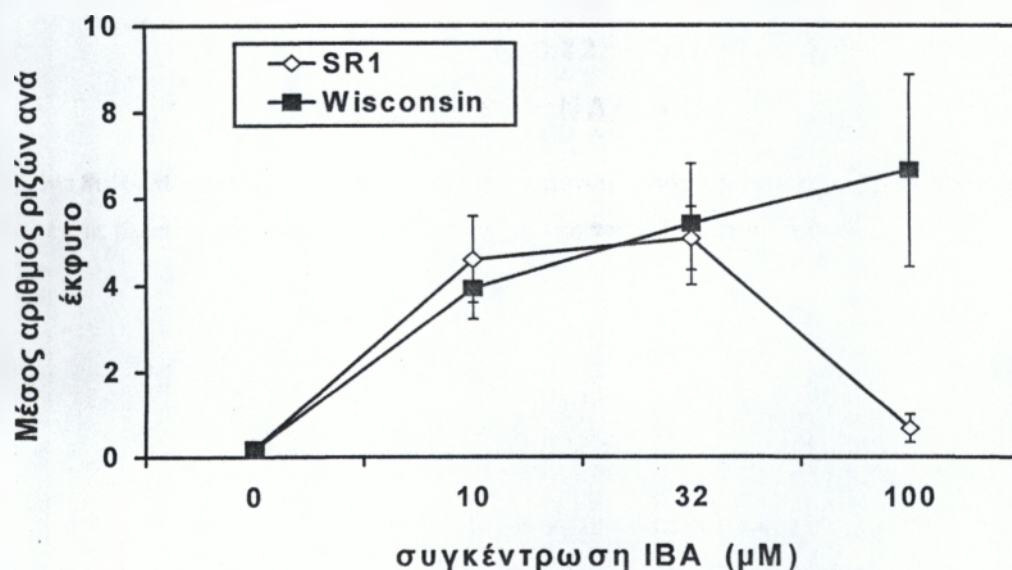


Διάγραμμα της μεθόδου για την αναγέννηση ριζών και βλαστών από *in vitro* καλλιέργεια εκφύτων μασχαλιαίων οφθαλμών καπνού.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

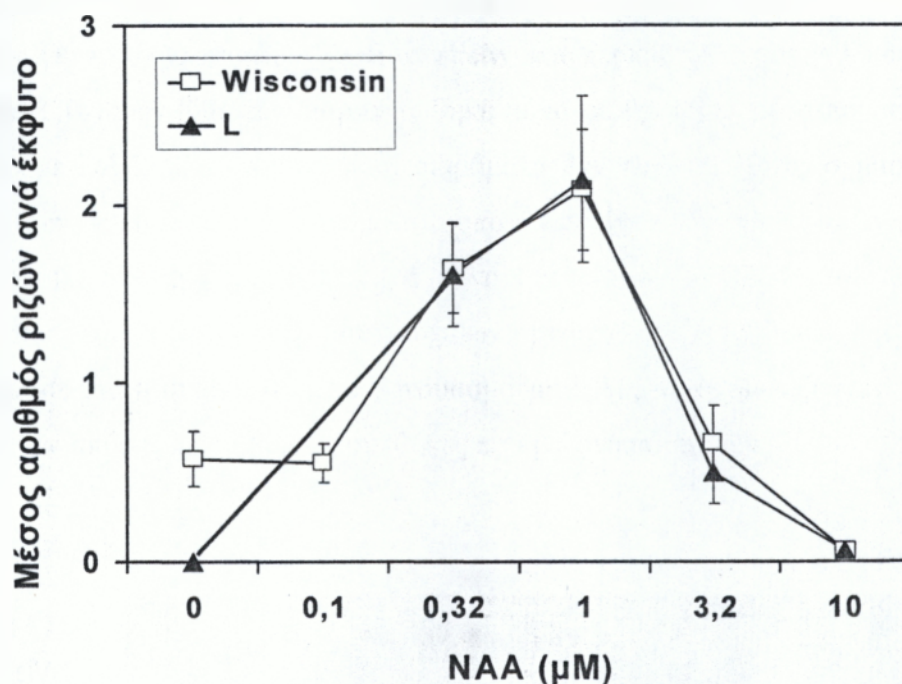
I. Διερεύνηση της άριστης συγκέντρωσης αυξίνης σε in vitro καλλιέργεια εκφύτων δίσκων διαφορετικών ποικιλιών καπνού

Στο πρώτο πείραμα ερευνήθηκε η επίδραση της αυξίνης IBA στη ριζοβολία του καπνού από έκφυτα της ποικιλίας SR1 και της ποικιλίας Wisconsin. Τα έκφυτα επωάστηκαν αρχικά σε θρεπτικό μέσο με διαφορετικές συγκεντρώσεις αυξίνης (εικόνα 7) στο σκοτάδι για 1 ημέρα. Ύστερα τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε μέσο που δεν περιείχε καμία ορμόνη και επωάστηκαν στο φως για άλλες 13 ημέρες. Η άριστη συγκέντρωση της IBA για το σχηματισμό τυχαίων ριζών από έκφυτα της ποικιλίας SR1 κυμάνθηκε μεταξύ 10 μ M και 32 μ M, με αποτέλεσμα ο μέγιστος αριθμός ριζών ανά έκφυτο να είναι περίπου 4,5-5 (εικόνα 7). Για τα έκφυτα της ποικιλίας Wisconsin, χρησιμοποιήθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση του IBA (100 μ M), και είχε ως αποτέλεσμα να μην μεγαλύτερο αριθμό ριζών απ'ό,τι στα έκφυτα της SR1, αλλά δε διαπιστώθηκε το πραγματικά άριστο επίπεδο. Επώαση των εκφύτων σε αυτό το καθεστώς της μεγαλύτερης συγκέντρωσης IBA είχε ως αποτέλεσμα, παράλληλα με το μέγιστο αριθμό ριζών, το σχηματισμό σκληρού κάλου.



Εικόνα 7: Η επίδραση της αυξίνης IBA στο σχηματισμό τυχαίων ριζών από έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού της ποικιλίας Wisconsin και της ποικιλίας SR1 του καπνού.

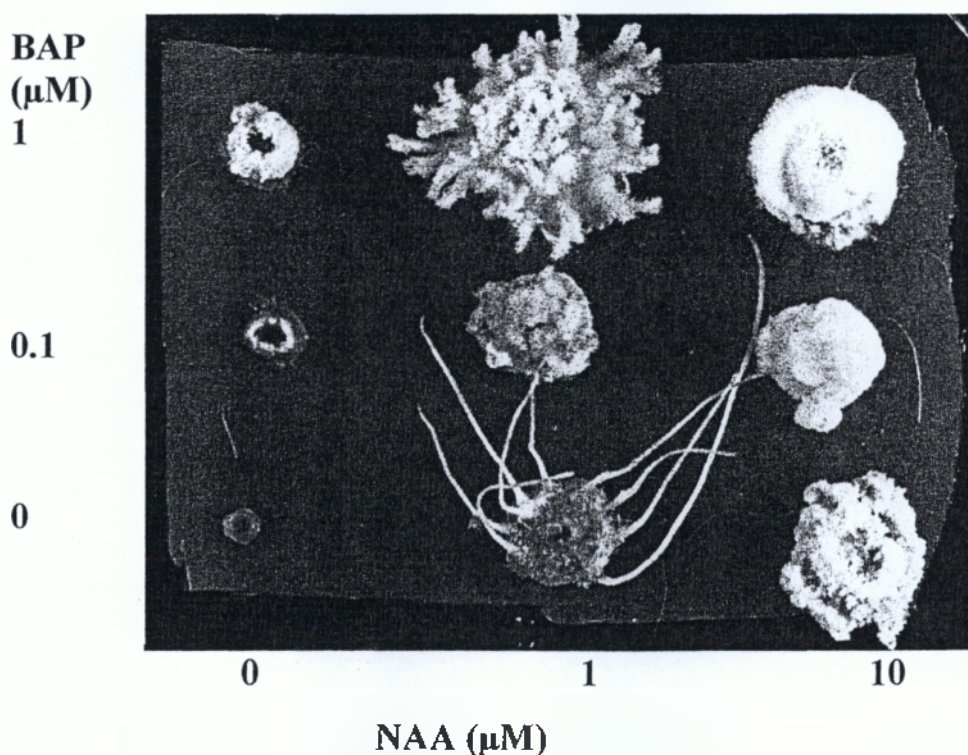
Το άριστο επίπεδο συγκέντρωσης της αυξίνης NAA μελετήθηκε σε έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού στην ποικιλία Wisconsin και στην ποικιλία L του καπνού. Τα έκφυτα επωάσθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει διαφορετικές συγκεντρώσεις NAA για περίοδο 14 ημερών. Η επώαση έγινε κάτω από συνεχή φωτισμό. Η άριστη συγκέντρωση του NAA για τα έκφυτα Wisconsin και L ήταν το 1μM (εικόνα 8), και είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό περίπου 2 ριζών ανά έκφυτο ως μέγιστο αριθμό.



Εικόνα 8: Η επίδραση της αυξίνης NAA στο σχηματισμό τυχαίων ριζών από έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού της ποικιλίας Wisconsin και της ποικιλίας L του καπνού.

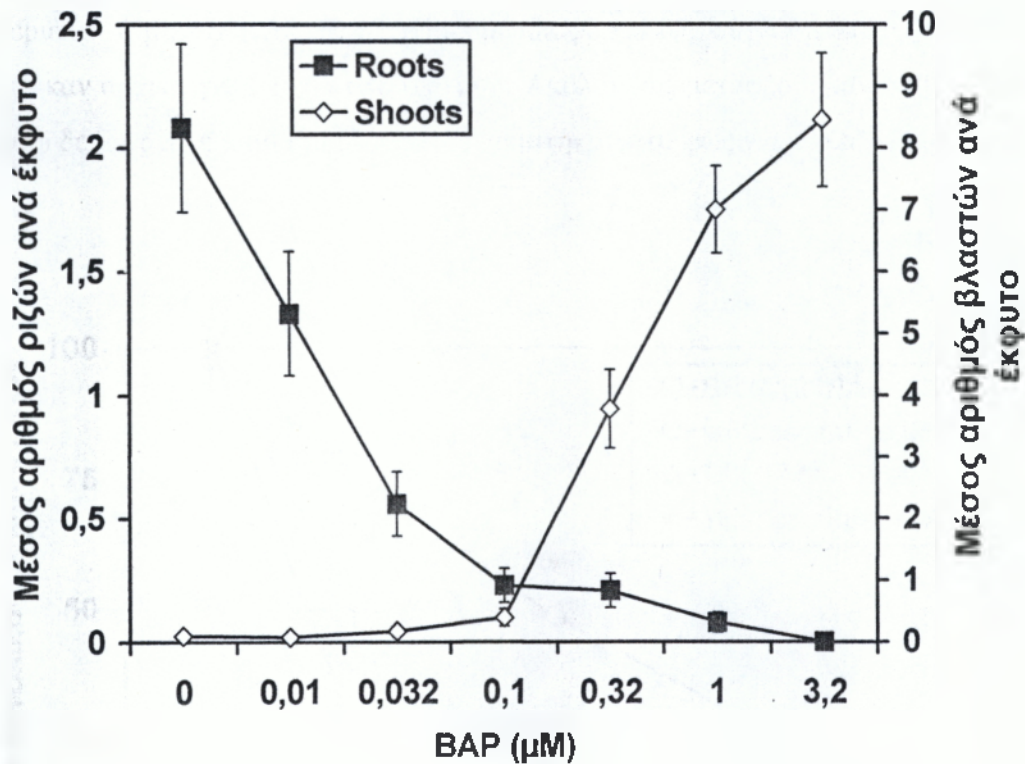
II. Η επίδραση του BAP στην ανάπτυξη (παρεμπόδιση) του σχηματισμού ριζών και στην επαγωγή του σχηματισμού βλαστών σε έκφυτα δίσκων στελέχους του βλαστού της ποικιλίας *Wisconsin*

Η κυτοκινίνη BAP εμποδίζει το σχηματισμό τυχαίων ριζών στον καπνό και προάγει το σχηματισμό τυχαίων βλαστών όπως φαίνεται στην εικόνα 9. Για τη μελέτη της επίδρασης του BAP και του NAA στην αναγέννηση τυχαίων ριζών και βλαστών, τα έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού της ποικιλίας *Wisconsin* επωάσθησαν σε θρεπτικό μέσο με διαφορετικές συγκεντρώσεις NAA και/ή BAP. Άριστο θρεπτικό υπόστρωμα για το σχηματισμό ριζών ήταν εκείνο που περιείχε μόνο την αυξίνη NAA. Σχηματισμός τυχαίων βλαστών παρατηρήθηκε μόνο σε θρεπτικό μέσο που περιείχε NAA μαζί με BAP. Σε αυτό και άλλα πειράματα δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός τυχαίων ριζών σε θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί η αυξίνη NAA. Σε θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν μόνο την κυτοκινίνη BAP, παρατηρήθηκε αναγέννηση ενός μικρού αριθμού τυχαίων βλαστών. Όταν αντί της NAA χρησιμοποιούνταν η αυξίνη IBA σε συνδυασμό με BAP, δε σχηματίζονταν τυχαίοι βλαστοί κάτω από τις πειραματικές συνθήκες που μελετήσαμε.



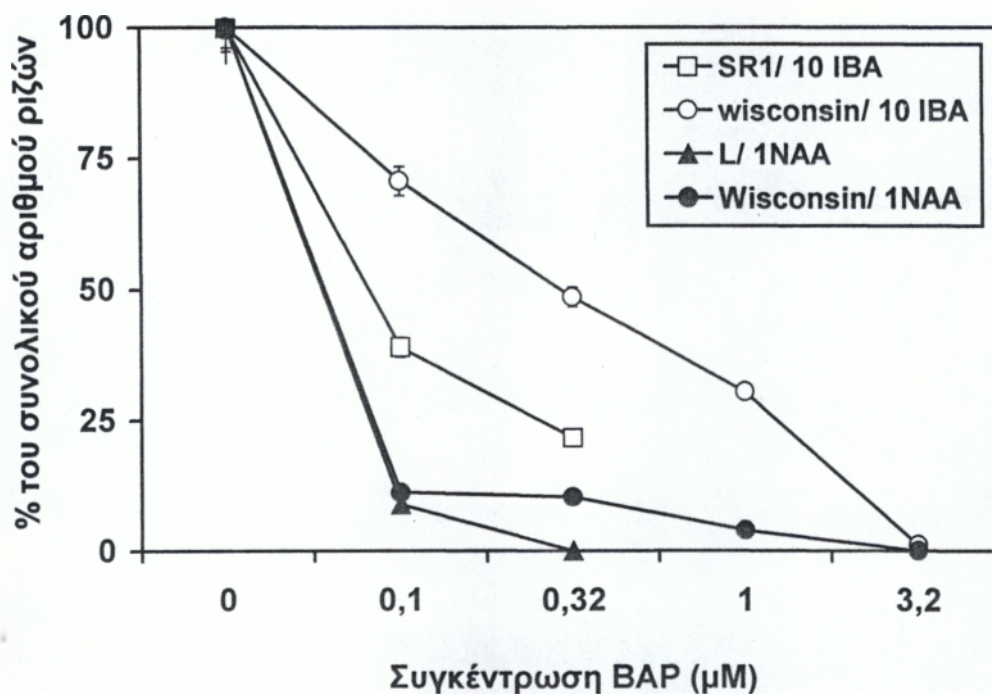
Εικόνα 9: Επίδραση του NAA και BAP στο σχηματισμό τυχαίων ριζών και βλαστών σε έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού της ποικιλίας *Wisconsin* του καπνού.

Για να μελετήσουμε την επίδραση του BAP σε περισσότερη λεπτομέρεια, τα έκφυτα δίσκων στελέχους του βλαστού επώασθησαν για 14 μέρες σε θρεπτικό μέσο με 1μM NAA και σε συνδυασμό με μια μεγαλύτερη σειρά συγκεντρώσεων BAP. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα μια σταδιακή μείωση του ρυθμού της ριζογένεσης και αντίστοιχη αύξηση του ρυθμού της βλαστογένεσης καθώς αυξάνονταν η συγκέντρωση της κυτοκινίνης BAP στο θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 10: Επίδραση της κυτοκινίνης BAP στο σχηματισμό τυχαίων ριζών και βλαστών σε έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού της ποικιλίας Wisconsin του καπνού, τα οποία επώαστηκαν για 14 ημέρες σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ως σταθερό συστατικό του την αυξίνη NAA σε συγκέντρωση 1μM.

Για να συγκρίνουμε την επίδραση της κυτοκινίνης BAP επί της υπό της αυξίνης εξαρτώμενης τυχαίας ριζογένεσης από έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού έγιναν διαφορετικά πειράματα. Η παρεμποδιστική δράση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του BAP υπολογίστηκε ως επί τοις εκατό αναλογία του αριθμού των τυχαίων ριζών ανά έκφυτο ως προς τον μέγιστο αριθμό ριζών που σχηματίστηκαν σε παρόμοια έκφυτα όταν αυτά καλλιεργούνταν σε θρεπτικά μέσα στα οποία δεν χρησιμοποιούνταν BAP (εικόνα 11). Στα δύο από αυτά τα πειράματα τα έκφυτα της ποικιλίας Wisconsin ή της ποικιλίας L του καπνού τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 10μM IBA σε συνδυασμό με διαφορετικές συγκεντρώσεις BAP και επώαστηκαν αρχικά για 1 μέρα στο σκοτάδι. Ακολούθως μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε καμία ορμόνη και επώαστηκαν στο φως για άλλες 13 ημέρες.



Εικόνα 11: Επίδραση της κυτοκινίνης BAP στην παρεμπόδιση σχηματισμού τυχαίων ριζών από έκφυτα στελέχους βλαστού του καπνού σε σχέση με το σύνολο των τυχαίων ριζών που παράγονταν από τα ίδια έκφυτα όταν αυτά καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε μόνο μια αυξίνη (IBA ή NAA).

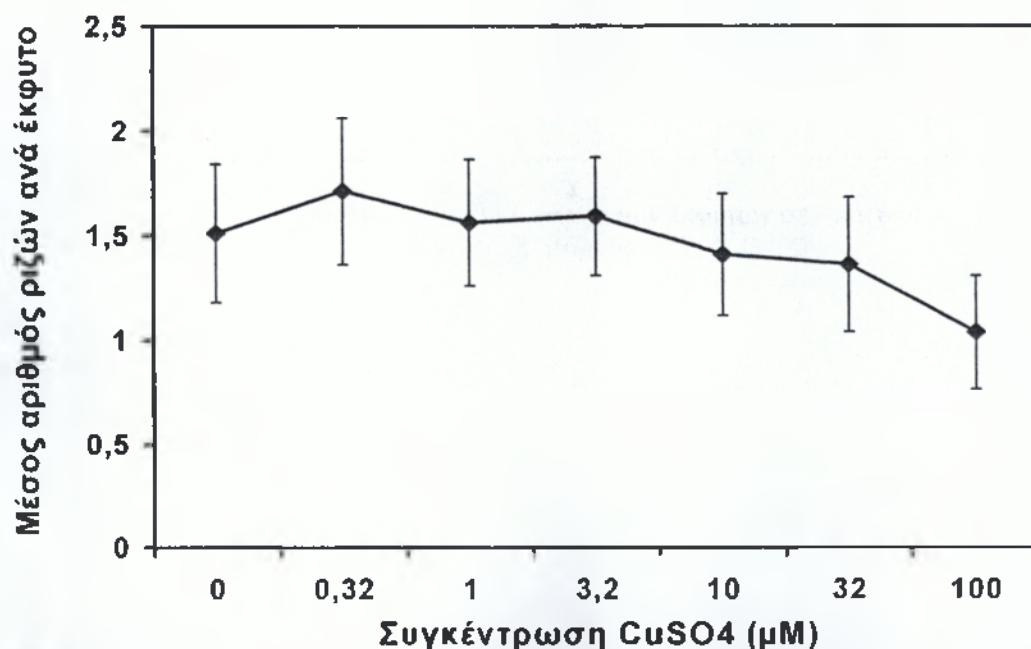
Στα άλλα δύο πειράματα τα έκφυτα δίσκων της ποικιλίας Wisconsin και της ποικιλίας L τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 1μM NAA σε συνδυασμό

με ποικίλες συγκεντρώσεις BAP στο φως και επωάστηκαν για 14 μέρες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα μια πιο μεγάλη παρεμπόδιση του σχηματισμού ρίζας ιδιαίτερα σε έκφυτα της ποικιλίας L. Η συγκέντρωση 0.32μM BAP παρεμπόδισε κατά 90% το σχηματισμό ριζών σε σύγκριση με το αποτέλεσμα ριζογένεσης σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε μόνο NAA (σχηματισμός περίπου 2 ριζών ανά έκφυτο), ενώ παρεμπόδισε μόνο κατά 25% με 50% το σχηματισμό ριζών σε σύγκριση με το αποτέλεσμα ριζογένεσης σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε μόνο την αυξίνη IBA (σχηματισμός περίπου 8 ρίζες ανά έκφυτο).

III. Η επίδραση του CuSO_4 στη ριζογένεση και βλαστογένεση από έκφυτα δίσκων στελέχους καπνού

1. Έκφυτα καπνού ποικιλίας L

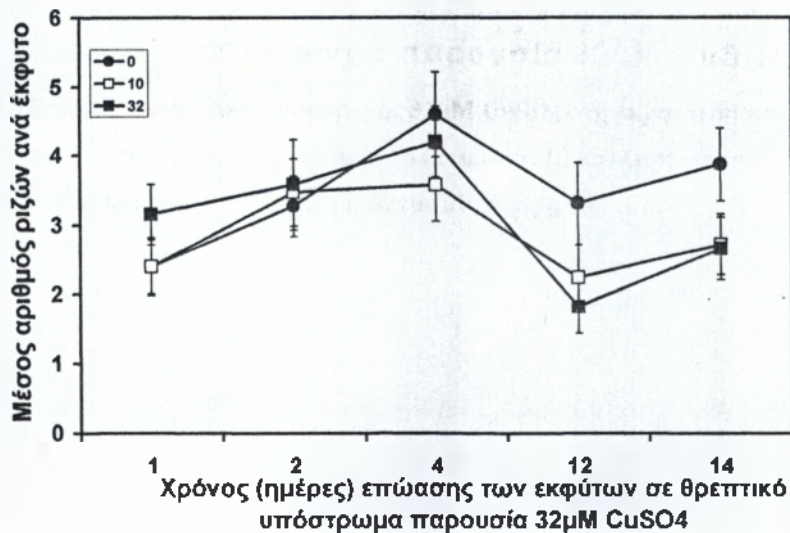
Η επίδραση του CuSO_4 στο σχηματισμό τυχαίων ριζών και βλαστών μελετήθηκε σε έκφυτα δίσκων στελέχους καπνού της ποικιλίας L τα οποία επωάσθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε $1\mu\text{M}$ NAA (άριστη συγκέντρωση) και ποικίλες συγκεντρώσεις CuSO_4 για μία μέρα. Αμέσως μετά τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο εφοδιασμένο αποκλειστικά και μόνο με $1\mu\text{M}$ NAA. Αποδείχθηκε (εικόνα 12) ότι η μέγιστη συγκέντρωση του CuSO_4 η οποία δεν έχει καμία επίδραση στο σχηματισμό τυχαίων ριζών είναι τα $32\mu\text{M}$. Σε αυτή τη συγκέντρωση, ο αριθμός των ριζών που σχηματίσθηκαν ήταν ο ίδιος όπως στο μάρτυρα (control), περίπου 1.4 ρίζες ανά έκφυτο. Επίσης δεν υπήρχαν άλλες φυσιολογικές αντιδράσεις που να οφείλονταν στην επώαση των εκφύτων παρουσία του CuSO_4 . Συγκεντρώσεις CuSO_4 μεγαλύτερες από $32\mu\text{M}$ είχαν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό λιγότερων ριζών και ήταν επιζήμιες για τα έκφυτα.



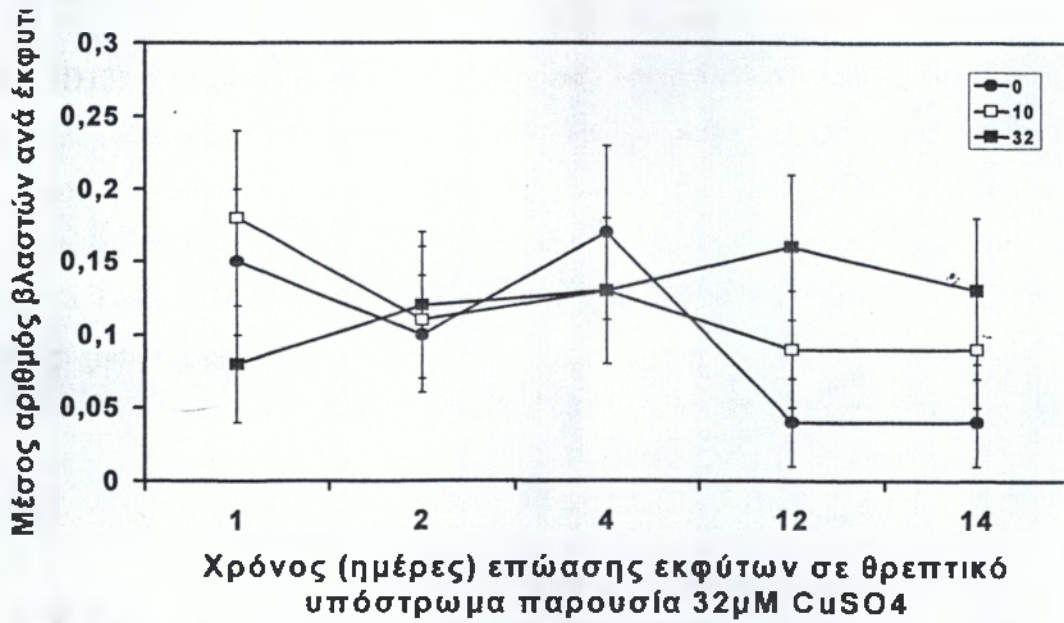
Εικόνα 12: Επίδραση του CuSO_4 στο σχηματισμό τυχαίων ριζών από έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού καπνού (ποικιλίας L) που καλλιεργήθηκαν *in vitro* για 14 ημέρες σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ως σταθερό συστατικό $1\mu\text{M}$ NAA.

Για να ερευνηθεί η χρονική διάρκεια κατά την οποία τα έκφυτα μπορούν να ανεχθούν την υψηλότερη συγκέντρωση των 32μM CuSO₄ που προσδιορίστηκε στο προηγούμενο πείραμα, τα έκφυτα δίσκων βλαστού της ποικιλίας L του καπνού επωάσθησαν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την ανωτέρω συγκέντρωση CuSO₄ μαζί με 1μM NAA για 2, 4, 12 και 14 ημέρες. Με το πέρας αυτής της περιόδου, τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο εφοδιασμένο μόνο με 1μM NAA. Τα αποτελέσματα (εικόνα 13) δείχνουν ότι μία μεγάλη διάρκεια επώασης δεν έχει αρνητική επίδραση στο σχηματισμό ριζών, γι' αυτό η παρουσία 32μM CuSO₄ μπορεί να περιοριστεί στις 4 ημέρες.

Α. Ριζογένεση



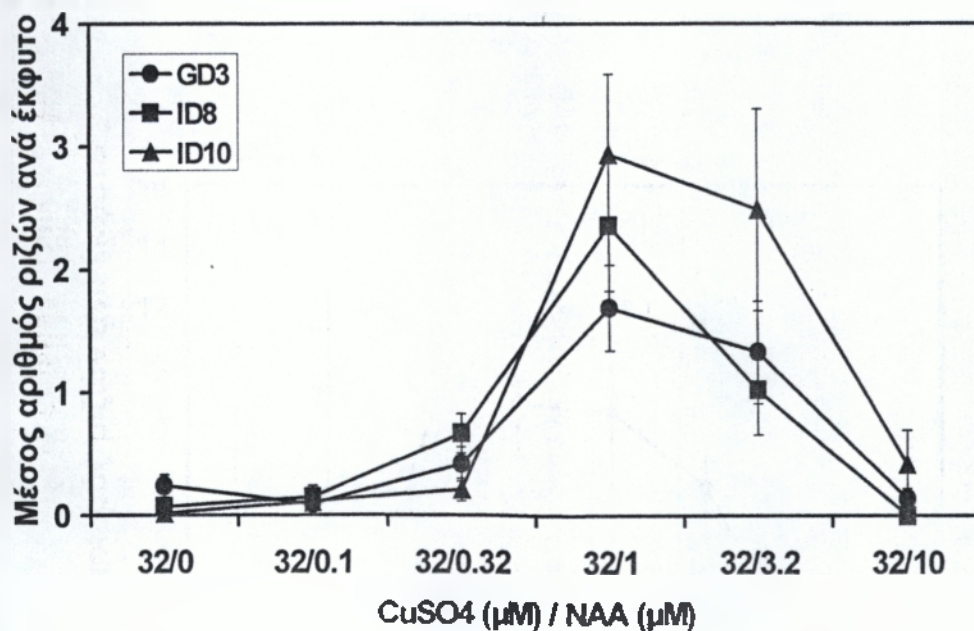
Β. Βλαστογένεση



Εικόνα 13: : Επίδραση του χρόνου εφαρμογής 32μM CuSO₄ στη ριζογένεση και βλαστογένεση από έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού καπνού (ποικιλίας L) καλλιεργούμενων σε θρεπτικό υπόστρωμα εφοδιασμένου με την αυξίνη NAA σε συγκέντρωση 1μM.

2. Έκφυτα από διαγονιδιακά φυτά καπνού

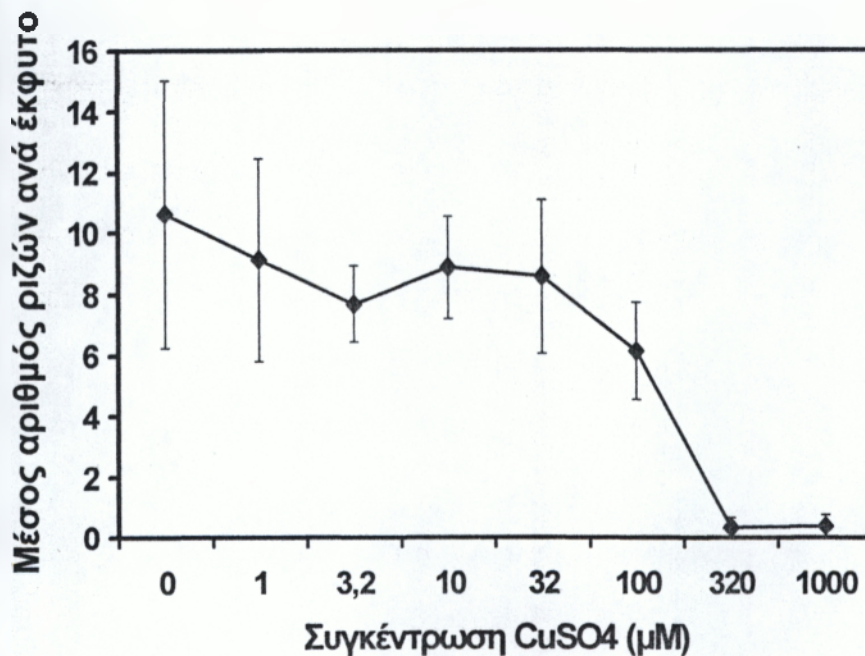
Σε αυτό το πείραμα, τα έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού αποσπάστηκαν από διαγονιδιακά φυτά καπνού με την ονομασία Cu-gus (GD3), Cu-ipt (ID8) και Cu-ipt (ID10) και επωάσθηκαν για 3 ημέρες σε θρεπτικό μέσο εφοδιασμένο με 32 μ M CuSO₄ και ποικίλες συγκεντρώσεις NAA. Ύστερα μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο με διάφορες συγκεντρώσεις NAA για τις υπόλοιπες 11 ημέρες. Περιμέναμε ότι τα διαγονιδιακά έκφυτα (ID8, ID10) θα σχημάτιζαν λιγότερες ρίζες από ότι ο μάρτυρας (GD3). Γιατί όπως αναφέρθηκε στην αρχή η έκφραση του *ipt* γονιδίου παρεμποδίζει την αύξηση της ρίζας.

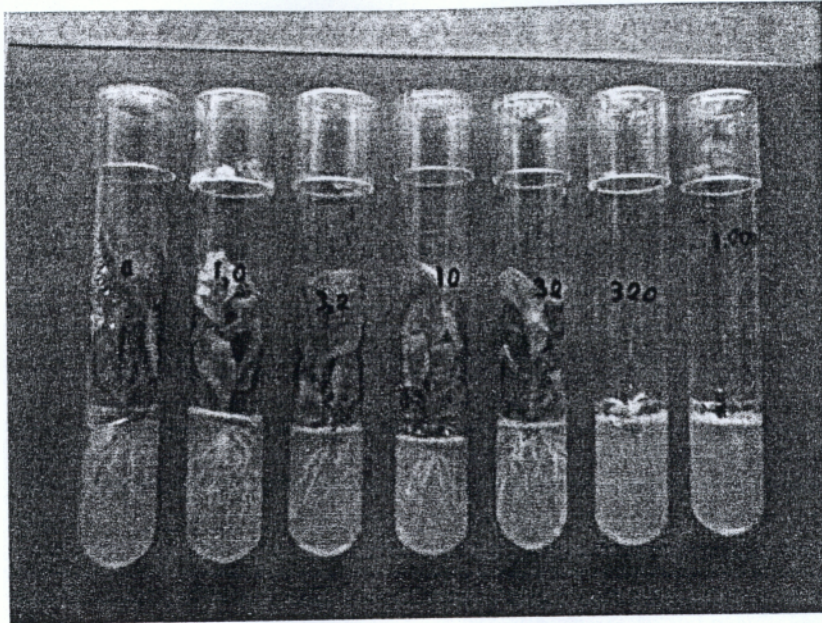


Εικόνα 14: : Επίδραση του CuSO₄ και NAA στη ριζογένεση από έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού καπνού των διαγονιδιακών τύπων Cu-gus (GD3), Cu-ipt (ID8) και Cu-ipt (ID10) για 14 ημέρες (3 ημέρες σε θρεπτικό μέσο με CuSO₄ και NAA και τις υπόλοιπες 11 ημέρες μόνο σε συγκεντρώσεις NAA).

IV. Επίδραση του CuSO_4 στο σχηματισμό τυχαίων ριζών από αναπτυσσόμενους *in vitro* μασχαλιαίους οφθαλμούς καπνού

Η μελέτη της επίδρασης του CuSO_4 στο σχηματισμό τυχαίων ριζών, έλαβε χώρα σε έκφυτα μασχαλιαίων οφθαλμών της ποικιλίας L, τα οποία τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο MS εφοδιασμένου αποκλειστικά και μόνο με CuSO_4 , σε ποικίλες συγκεντρώσεις χωρίς κανένα αυξητικό παράγοντα (αυξίνη ή κυτοκίνη). Η καλλιέργεια των εκφύτων πραγματοποιήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και οι παρατηρήσεις ελήφθησαν την 14^η ημέρα. Διαπιστώθηκε ότι η καλύτερη ριζογένεση εκδηλώθηκε σε συγκέντρωση CuSO_4 μεταξύ 0,0 και 32 μM (εικόνα 15). Σε συγκεντρώσεις CuSO_4 μεταξύ 32 μM και 320 μM , ο αριθμός των ριζών ανά έκφυτο μειώνεται, σταδιακά, ενώ στις συγκεντρώσεις 320 και 1000 μM δεν εμφανίστηκαν καθόλου ρίζες.





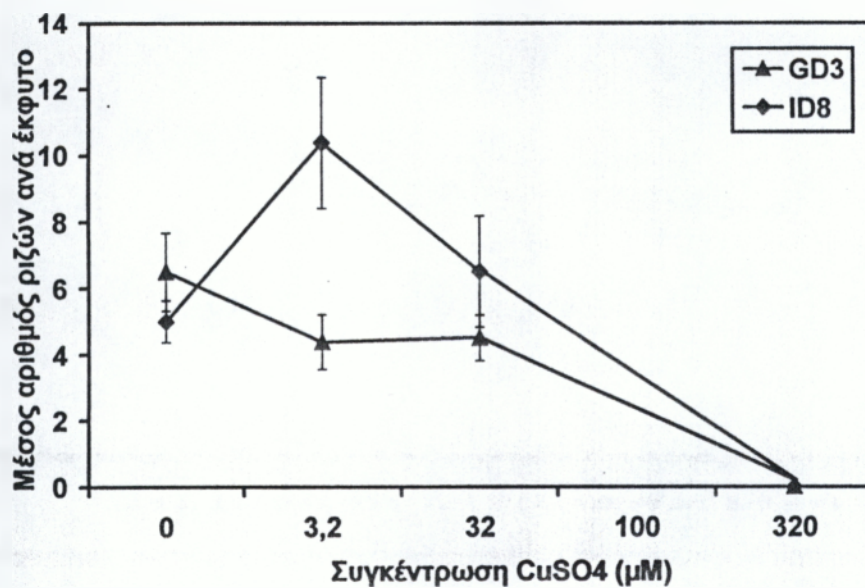
Εικόνα 15: Επίδραση του CuSO_4 στη ριζογένεση από έκφυτα μασχαλιαίων οφθαλμών καπνού της ποικιλίας L.

V. Επίδραση του CuSO₄ στο σχηματισμό ριζών και/ή στην ανάπτυξη των εκφύτων μασχαλιαίων οφθαλμών από διαφορετικές διαγονιδιακές ποικιλίες

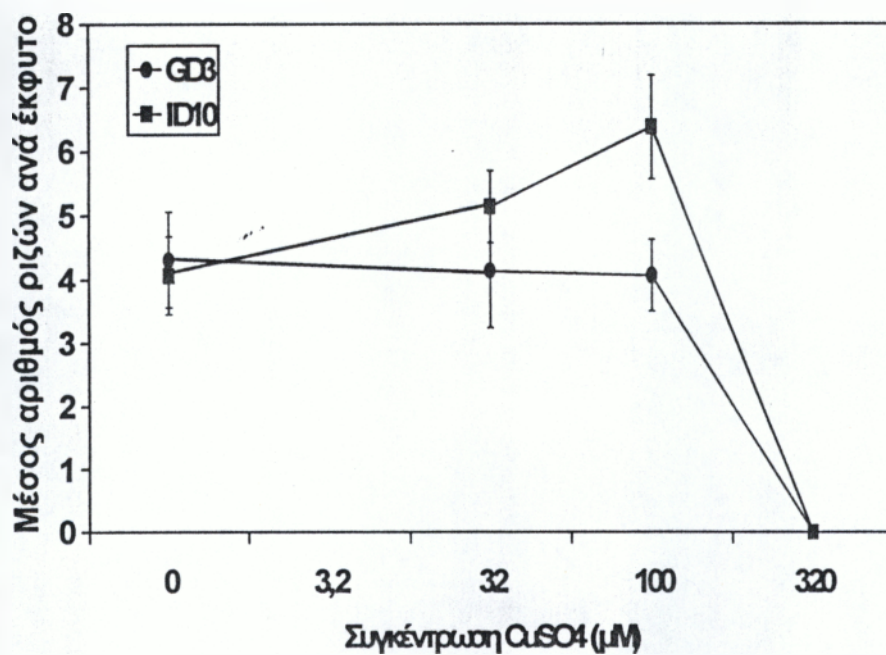
Σε αυτό το πείραμα, έκφυτα μασχαλιαίων οφθαλμών καπνού των διαγονιδιακών ποικιλιών Cu-gus (GD3) και Cu-ipt (ID8) επωάσθηκαν σε θρεπτικό μέσο MS εφοδιασμένο με ποικίλες συγκεντρώσεις CuSO₄. Το θρεπτικό μέσο μαζί με τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και οι παρατηρήσεις ελήφθησαν από καλλιέργεια ηλικίας 14 ημερών. Στη συγκέντρωση των 3.2μM CuSO₄, παρατηρήθηκε ο μέγιστος αριθμός 10 ριζών ανά οφθαλμό σε έκφυτα του ID8 και 4 ρίζες ανά οφθαλμό σε έκφυτα του GD3. Πάνω από αυτή τη συγκέντρωση ο αριθμός των ριζών μειώνεται (Εικόνα 16A).

Σε ένα παρόμοιο πείραμα (που πραγματοποιήθηκε σε διαφορετική χρονική περίοδο) η διαδικασία ήταν η ίδια αλλά χρησιμοποιήσαμε το Cu-gus (GD3) και το Cu-ipt (ID10) του καπνού. Παρατηρήθηκε ότι CuSO₄ είχε την ίδια επίδραση στα έκφυτα οφθαλμών του γονότυπου GD3. Στα έκφυτα οφθαλμών του γονότυπου ID10 ο αριθμός των ριζών (περίπου 6 ανά βλαστό) ήταν χαμηλότερος από ότι στα έκφυτα του γονότυπου ID8. Στη συγκέντρωση των 320μM CuSO₄ δεν εμφανίστηκαν ρίζες στα έκφυτα και των δύο γονότυπων (Εικόνα 16B).

A



B



Εικόνα 16: Επίδραση του CuSO₄ στο σχηματισμό τυχαίων ριζών σε έκφυτα μασχαλιαίων οφθαλμών του καπνού από τις ποικιλίες Cu-gus (GD3), Cu-ipt (ID8) και Cu-ipt (ID10).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ / ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανταγωνιστική δράση αυξίνης και κυτοκινίνης μελετήθηκε στο σχηματισμό τυχαίων βλαστών και ριζών σε έκφυτα του καπνού. Σε αυτή την εργασία φαίνεται πράγματι ότι η κυτοκινίνη BAP ανταγωνίζεται τις αυξίνες IBA και NAA παρεμποδίζοντας τόσο στο σχηματισμό τυχαίων ριζών σε έκφυτα δίσκων βλαστού του καπνού όσο και τον αυτόνομο σχηματισμό ριζών στους μασχαλιαίους βλαστούς. Αυτό διαπιστώθηκε και στις τρεις ποικιλίες καπνού που εξετάστηκαν. Επιπλέον, σε υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης όταν αυτές συνδυάστηκαν με την αυξίνη NAA προάχθηκε ο σχηματισμός τυχαίων βλαστών. Η εισαγωγή του συστήματος της ισοπεντενυλικής μεταφοράς του χαλκού δεν είχε καμία αρνητική επίδραση στο σχηματισμό τυχαίων ριζών στους μασχαλιαίους βλαστούς ή στους δίσκους στελέχους του βλαστού. Το σύστημα επαγωγής της ισοπεντενυλικής μεταφοράς του χαλκού φαίνεται να είχε μάλλον μία θετική επίδραση στη ριζοβολία. Αυτό συνέβη σε έκφυτα δίσκων στελέχους καθώς και σε έκφυτα μασχαλιαίων οφθαλμών.

Για να καταστεί δυνατή η αξιολόγηση της παρεμποδιστικής δράσης της κυτοκινίνης επί της αυξίνης που προάγει το σχηματισμό τυχαίων ριζών σε έκφυτα δίσκων στελέχους, προσδιορίστηκε κατ'αρχήν η άριστη συγκέντρωση της αυξίνης. Αυτό πραγματοποιήθηκε σε έκφυτα τριών διαφορετικών ποικιλιών του καπνού (SR1, Wisconsin και L) με τη χρήση των αυξινών IBA ή NAA. Το IBA χρησιμοποιήθηκε γιατί μπορεί να παράγει μια μεγάλη ποσότητα ριζών (μέχρι 8 ρίζες ανά δίσκιο). Το NAA έχει το πλεονέκτημα ότι δεν είναι ευαίσθητο στην φωτόλυση, γεγονός που βοηθάει να εφαρμοστούν μακρύτερες περίοδοι επώασης των εκφύτων σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν αυτή την αυξίνη. Η άριστη συγκέντρωση IBA για την παραγωγή τυχαίων ριζών από έκφυτα δίσκων βλαστού της ποικιλίας SR1 ήταν αυτή που κυμαίνονταν μεταξύ 10 μ M και 32 μ M αρκεί τα έκφυτα αυτά να παρέμειναν στο ανωτέρω θρεπτικό υπόστρωμα για 24 ώρες και αμέσως μετά να μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο δεν περιέχονταν καμία ορμόνη. Για έκφυτα της ποικιλίας Wisconsin δε διερευνήθηκε το άριστο της συγκέντρωσης IBA για την παραγωγή τυχαίων ριζών. Η υψηλότερη συγκέντρωση IBA που χρησιμοποιήθηκε (100 μ M) παρήγαγε το μέγιστο αριθμό ριζών, αλλά οδήγησε και στο σχηματισμό κάλου. Από αυτό και από άλλα πειράματα παρατηρήθηκε ότι γενικά όποτε παρουσιάζεται σχηματισμός κάλου σε συγκεκριμένη συγκέντρωση αυξίνης, τότε υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτής της ορμόνης έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό

περισσότερου κάλου και λιγότερων ριζών. Η άριστη συγκέντρωση της αυξίνης NAA, όταν αυτή παρίσταται συνεχώς στο θρεπτικό υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας, για την παραγωγή ριζών από έκφυτα των ποικιλιών καπνού Wisconsin και L ήταν αυτή του 1μM. Στα πειράματα στα οποία το υπόστρωμα περιείχε μία κυτοκινίνη, ήταν αναγκαία η παρουσία 10μM της αυξίνης IBA ή 1μM της αυξίνης NAA προκειμένου να προκληθεί σχηματισμός τυχαίων ριζών από τα ίδια έκφυτα.

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της κυτοκινίνης (BAP) και μιας αυξίνης που προάγει το σχηματισμό τυχαίων ριζών σχεδιάστηκαν 2 τύποι πειραμάτων. Στον ένα τύπο, η ευαίσθητη στο φως αυξίνη IBA χρησιμοποιήθηκε μαζί με BAP για μία μέρα σε καλλιέργεια υπό καθεστώς σκότους και στον άλλο τύπο, η πιο σταθερή αυξίνη NAA χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με BAP για 14 ημέρες. Και στις δύο περιπτώσεις το BAP παρεμπόδιζε το σχηματισμό ριζών, αλλά αναγέννηση βλαστών λαμβάνει χώρα μόνο όταν η BAP συνδυάζεται με το NAA. Επίσης, η ζεατίνη έχει την ίδια επίδραση όπως η BAP (παράρτημα: K). Η BAP σε συνδυασμό με το IBA ποτέ δεν ήταν ικανή να προωθήσει το σχηματισμό τυχαίων βλαστών. Η αιτία για την ανικανότητα αυτή θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι το IBA τόσο από μόνο του όσο και σε συνδυασμό με τη BAP εφαρμόστηκε στα θρεπτικά υποστρώματα μόνο για 1 μέρα. Το αν η μία ή και οι δύο ορμόνες είναι απαραίτητες στο θρεπτικό υπόστρωμα είτε από την αρχή της καλλιέργειας είτε και στα επόμενα στάδια της πορείας της αναγέννησης (γεγονός που εξηγεί τις διαφορές στο σχηματισμό τυχαίων βλαστών μεταξύ των δύο τύπων πειραμάτων), αυτό θα μπορούσε να εξεταστεί με την προσθήκη στο θρεπτικό υπόστρωμα της αυξίνης NAA και της κυτοκινίνης BAP είτε συνεχώς είτε μόνο για συγκεκριμένες περιόδους (1η, 2η,.....14η μέρα).

Για τη σύγκριση των πειραματικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ριζογένεσης η εκατοστιαία αναλογία του αριθμού των ριζών ανά έκφυτο σε ένα οποιοδήποτε θρεπτικό υπόστρωμα σε σχέση με τον αριθμό των ριζών που παράχθηκε στο άριστο υπόστρωμα. Διαπιστώθηκε μια μεγάλη διαφορά στην παρεμποδιστική δράση της κυτοκινίνης BAP σε δύο τύπους πειραμάτων. Έτσι, απαιτείτο πολύ μικρότερη συγκέντρωση κυτοκινίνης προκειμένου να παρεμποδιστεί πλήρως τη ριζογένεση σε θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν την αυξίνη NAA απ' ό,τι σε εκείνα που περιείχαν την αυξίνη IBA. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι ο μέγιστος αριθμός ριζών ανά έκφυτο στα μεν θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν την αυξίνη IBA ήταν περίπου 8, ενώ σ' εκείνα που περιείχαν NAA ο

αντίστοιχος αριθμός ήταν περίπου 2. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι μια συγκεκριμένη ποσότητα της κυτοκινίνης BAP παρεμπόδιζε το σχηματισμό ορισμένου αριθμού ριζών. Είναι επίσης πιθανό ότι η μοριακή σχέση είναι ένας σημαντικός παράγοντας (1mol BAP παρεμπόδιζει τη δράση 1mol αυξίνης), έτσι που να χρειάζεται μικρότερη συγκέντρωση BAP για να εμποδίσει τη χαμηλή συγκέντρωση του NAA, συγκρινόμενη με την υψηλή συγκέντρωση του IBA. Μια τρίτη υπόθεση είναι ότι για την παρεμπόδιση του σχηματισμού τυχαίων ριζών παίζει σημαντικό ρόλο και ο χρόνος επώασης. Χρειάζεται να γίνουν περαιτέρω πειράματα για να βρεθεί ποια υπόθεση μπορεί να εξηγήσει τις διαφορές.

Για τη μέγιστη επαγωγή του Cu-IPT, χρειάζεται να καθοριστεί η υψηλότερη δυνατή συγκέντρωση CuSO_4 , η οποία όμως δεν θα έχει καμία αρνητική επίδραση τόσο στο σχηματισμό ριζών όσο και στην αύξηση. Στην περίπτωση του CuSO_4 , βρέθηκε ότι για τα έκφυτα της ποικιλίας L η μέγιστη συγκέντρωσή του η οποία δεν έχει καμία αρνητική επίδραση στο σχηματισμό ρίζας είναι τα $32\mu\text{M}$, η οποία μπορεί να παραμείνει το λιγότερο 4 ημέρες στα έκφυτα στελέχους βλαστού και περισσότερο από 14 ημέρες στα έκφυτα των μασχαλιαίων βλαστών. Μετά από αυτή την περίοδο, υποθέτουμε ότι θα μπορούσε να έχει μια αρνητική επίδραση. Στα πειράματα ριζοβολίας η συγκέντρωση των $32\mu\text{M}$ CuSO_4 χρησιμοποιήθηκε για να προάγει το σύστημα του διεγέρτη της ισοπεντενυλικής μεταφοράς. Αυτό προέκυψε από παρόμοια πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τους Mett *et.al.* (1996) κατά τα οποία η επαγωγή του συστήματος του διεγέρτη (της ισοπεντενυλικής μεταφοράς του χαλκού) ελάμβανε χώρα σε συγκεντρώσεις CuSO_4 κυμαινόμενες μεταξύ 5 και $50\mu\text{M}$.

Για τον έλεγχο της ριζογένεσης από έκφυτα των διαγονιδιακών φυτών καπνού των γονότυπων IPT (ID8) και IPT (ID10), που δέχτηκαν το ερέθισμα του CuSO_4 , χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση των $32\mu\text{M}$ CuSO_4 , σε συνδυασμό με ποικίλες συγκεντρώσεις NAA. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν παρόμοια έκφυτα του γονότυπου Cu-gus (GD3) του καπνού. Αναμένετο την παραγωγή λιγότερων ριζών από τα έκφυτα δίσκων των διαγονιδιακών γονότυπων IPT (ID8, ID10) από ό,τι θα έδιναν τα έκφυτα του μάρτυρα GD3. Όμως παραδόξως αυτό δε συνέβη. Διαπιστώθηκε ότι σε όλα τα πειράματά μας, παρουσία της ίδιας συγκέντρωσης CuSO_4 θρεπτικό υπόστρωμα, στο τα έκφυτα τόσο των δίσκων στελέχους όσο και των μασχαλιαίων βλαστών που προέρχονταν από τα διαγονιδιακά φυτά παρήγαγαν τον ίδιο ή και μεγαλύτερο αριθμό με εκείνα τα έκφυτα του μάρτυρα (GD3).

Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορεί να διατυπωθούν οι κατωτέρω υποθέσεις:

- **Το υλικό εθίζεται στην κυτοκινίνη.** Μια διαδικασία που περιγράφηκε νωρίτερα (δες επίσης στην εισαγωγή). Ωστόσο στα πειράματα που περιγράφηκαν σε αυτή την εργασία το φυτικό υλικό είτε πολλαπλασιάστηκε μόνο τρεις φορές (πειράματα μασχαλιαίων οφθαλμών) είτε προήλθε από σπορόφυτα (δίσκοι στελέχους βλαστού). Έτσι ο 'εθισμός' δε φαίνεται να είναι η αιτία. Ένας άλλος λόγος ενάντια στον 'εθισμό' είναι ότι τα έκφυτα των διαγονιδιακών φυτών IPT (ID8, ID10) παρήγαγαν τον ίδιο ή μεγαλύτερο αριθμό ριζών απ'ό,τι τα έκφυτα του μάρτυρα (GD3), ενώ είναι γνωστό ότι τα ευαίσθητα στον εθισμό έκφυτα δεν αντιδρούν καθόλου στο ερέθισμα της κυτοκινίνης.
- **Η πρωτεΐνη που εκφράζει την εκδήλωση της αντίδρασης δεν είναι ακριβώς γνωστή.** Ο Mett και οι συνεργάτες του (1993) ισχυρίστηκαν ότι μία αύξηση της έκφρασης του Cu-gus άρχισε να φανερώνεται 24 ώρες μετά την προσθήκη χαλκού στο υπόστρωμα και ότι η έκφραση αυτή ακολουθούσε μια αυξητική τάση. Όμως, μέχρι σήμερα, δεν διερευνήθηκε πειραματικώς, τόσο από μας όσο και από άλλους, η επίδραση της κυτοκινίνης σε καλλιέργεια εκφύτων για 4 ή περισσότερες ημέρες μετά την απόσπασή τους από το φυτό. Έτσι, δεν είναι ξεκάθαρο τι είδους αντίδραση μπορεί να αναμένεται. Ωστόσο δεν είναι πιθανό ότι η κυτοκινίνη αυξάνει το σχηματισμό ριζών.
- **Το γονίδιο Cu-gus του μάρτυρα εκδήλωσε μια αρνητική επίδραση στη ριζοβολία.** Φαίνεται ότι η εισαγωγή (μεταφορά) αυτού του γονιδίου σε ένα γονότυπο επηρεάζει άλλα γονίδια, τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν στην απώλεια της ικανότητας ριζογένεσης. Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε να ελεγχθεί με τη σύγκριση ιστών αυτών των γονότυπων με ιστούς που προέρχονται από άγριους τύπους του καπνού.
- **Το γονίδιο IPT δεν εκφράζεται.** Αυτή δεν μπορεί να είναι και η πιο πιθανή περίπτωση, διότι η προσθήκη CuSO₄ φαίνεται να έχει μία επίδραση, αλλά αντίθετη από αυτή που αναμένετο. Υπάρχουν επιπλέον παρατηρήσεις (που δεν παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία) ότι διαγονιδιακά φυτά καπνού, που περιέχουν το γονίδιο της ισοπεντενυλικής τρανσφεράσης του χαλκού (Cu-IPT) και αναπτύχθηκαν σε συνθήκες θερμοκηπίου, εισήλθαν στην φάση

αναπαραγωγής πολύ αργότερα απ' ό,τι άγρια φυτά της ίδιας ποικιλίας, γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχει μια επίδραση της κυτοκινίνης.

- Η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι το CuSO_4 παρεμποδίζει το επαγωγικό σύστημα της κυτοκινίνης που σχετίζεται με την αναχαίτιση της ριζογένεσης. Ή ότι το CuSO_4 μπλοκάρει οποιοδήποτε παρεμποδιστή της ριζογένεσης. Οποιοσδήποτε ενδογενής παρεμποδιστής περιλαμβανομένης και της κυτοκινίνης, μπλοκάρεται, με αποτέλεσμα το σχηματισμό περισσότερων ριζών. Αυτό εξηγεί επίσης τη θετική επίδραση του CuSO_4 στο σχηματισμό τυχαίων ριζών.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. TAIZ,L. & ZEIGER,E. (1998). *Plant Physiology*. 2nd edition, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland
2. FOSKET,E.D. (1994) *Plant Growth and Development – A molecular Approach*. Academic Press, California
3. PIERIK,R.L.M. (1987). *In vitro Culture of Higher plants*. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands
4. HOOYKAAS,P.J.J & HALL,M.A. & LIBBENGA, K.R. (1999). *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*, Elsevier
5. ARDITTI,J. & DUNN,A. (1969). *Experimental Plant Physiology – Experiments in Cellular and Plant Physiology*, Holt, Rinehart and Winston Inc, USA
6. DAVIES, J.P.. (1995). *Plant Hormones – Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd Edition, Academic Publisher, The Netherlands
7. GATZ,C. & LENK,I. (1998). *Promoters that respond to chemical inducers*. Elsevier Science Ltd, (p.352-358)
8. Van der KRIEKEN,W.M. & BRETELER,H. & VISSER,H.M. (1993). *The role of the conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system*. Plant Cell Reports, (p.203-206)
9. METT,L.. (1996). A system for tissue-specific copper-controllable gene expression in transgenic plants: nodule-specific antisense of aspartate aminotransferase-P₂. *Transgenic Research* 5, (p.105-113)
10. McKENZIE,M.J. & METT,V. (1998). *Controlled Cytokinin Production in Transgenic Tobacco Using a Copper-Inducible Promoter*. *Plant Physiology* 116, p.969-977

A.

• Προετοιμασία του θρεπτικού μέσου

Ένας μεγάλος αριθμός ουσιών και μερικές φορές ακόμα και μείγματα ουσιών προστίθενται στο θρεπτικό μέσο. Συνιστάται να χρησιμοποιείται διαφορετική σπάτουλα για κάθε ουσία για να αποφευχθεί η 'μόλυνση', με την έννοια της ανάμειξης ουσιών που δεν πρέπει να αναμειχθούν, ιδιαίτερα όταν η χρήση των ουσιών αυτών πρέπει να γίνει στην απόλυτα καθαρή μορφή τους. Αχρησιμοποίητες χημικές ουσίες δεν πρέπει να επιστρέφονται στα βάζα που αποθηκεύονται.

1 λίτρο θρεπτικού μέσου ριζοβολίας περιέχει::	
Ιχνοστοιχεία	
Fe ³⁺ NaEDTA	40.0 mg
ZnSO ₄ .7aq	8.6 mg
H ₃ BO ₃	6.2 mg
MnSO ₄ .aq	0.72 mg
CuSO ₄ .5aq	0.025 mg
Na ₂ MoO ₄ .2aq	0.25 mg
CoCl ₂ .6aq	0.025 mg
KI	0.08 mg
H ₂ PO ₄	135.0 mg
KNO ₃	950.0 mg
Βιταμίνες	
Θειαμίνη (Thiamine.HCL)	1.00 mg
Μυο-ινοσιτόλη (Myo-Inositol)	100.00 mg
Νικοτινικό οξύ	0.50 mg
Πυριδοξίνη (Pyridoxine.HCL)	0.50 mg
Προλίνη	100.00 mg
Κύρια στοιχεία (μακροστοιχεία)	
- MgSO ₄ .7H ₂ O (Πυκνό διάλυμα : 3.7 g/l)	: 50 ml
- Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (Πυκνό διάλυμα : 12 g/l)	: 50ml
- NH ₄ NO ₃ (Stock : 16.5 g/l)	: 12ml
Λοιπά	
- Σακχαρόζη	: 30gr
- PH	: 5.5
- Άγαρ	: 6.0 gr

Το θρεπτικό μέσο (για 1 λίτρο) παρασκευάστηκε ως ακολούθως: Τα διάφορα συστατικά, εκτός από το άγαρ, διαλύονταν σε αποσταγμένο νερό. Το pH ρυθμίστηκε στο 5.5 χρησιμοποιώντας NaOH ή HCL. Το υγρό μείγμα τοποθετείται σε μπουκάλια στα οποία προστίθεται το κατάλληλο άγαρ (6g/l). Το μείγμα αποστειρώνεται για 15 λεπτά στους 115°C στον αυτοκαυστήρα (για πολλά μπουκάλια που περιείχαν θρεπτικό μέσο) ή στους 121°C στο δοχείο υγρής αποστείρωσης (για λιγότερα μπουκάλια). Πριν το γέμισμα των τριβλίων ή των σωλήνων, το μείγμα αφήνεται να κρυώσει στους 60°C σε ένα υδρόλουτρο. Οι απαραίτητοι ρυθμιστές της αυξήσεως προστίθεντο πριν τη διανομή του θρεπτικού διαλύματος στα τριβλία petri ή τους δοκιμαστικούς σωλήνες. Γι'αυτό οι ρυθμιστές αυξήσεως διαλύονταν κατ'αρχήν σε αποσταγμένο νερό σε συγκέντρωση 1.000 φορές μεγαλύτερη της τελικής συγκέντρωσης. Το NAA και η BA διαλύονταν πρώτα στη μικρότερη δυνατή ποσότητα NaOH. Το διάλυμα των ρυθμιστών της αυξήσεως αποστειρώνονταν με φιλτράρισμα μέσω μικροφίλτρων διαμέτρου οπών 0.2μM με τη χρήση σύριγγας 10ml και αποθηκεύονταν στους 4°C. Το IBA αποθηκεύονταν στο σκοτάδι για να αποφευχθεί η φωτόλυση.

B.

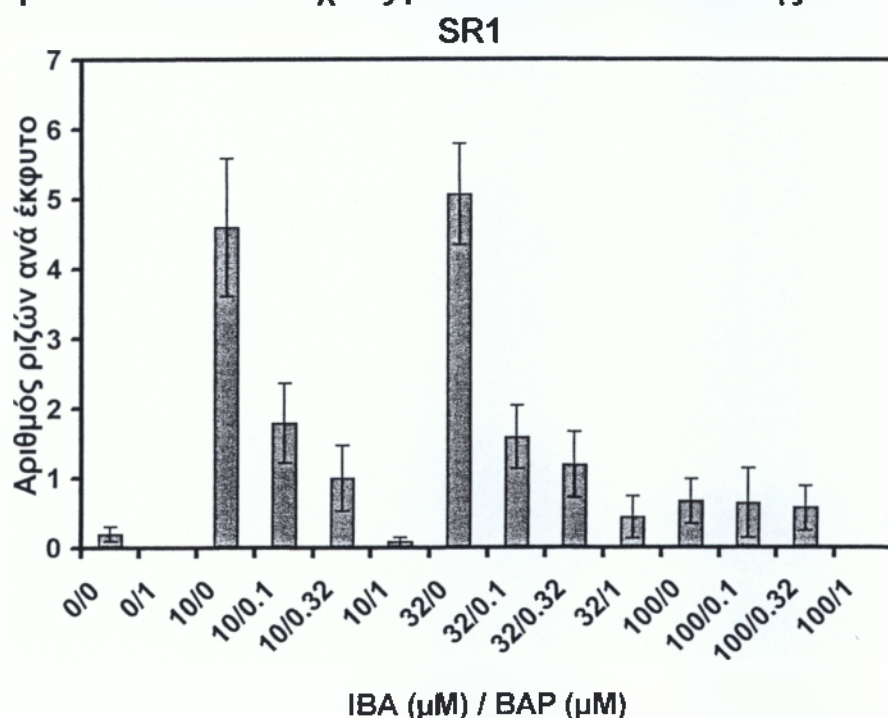
ΛΙΣΤΑ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ **ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**

1. Φιάλες (500ml, 1000ml)
2. Ογκομετρικές φιάλες
3. Κύλινδροι ογκομετρικοί (25ml, 50ml, 100ml, 500ml, 1000ml)
4. Διαβαθμισμένοι ογκομετρικοί σωλήνες (σιφώνια)
5. Σιφώνια 'Παστέρ'
6. Φιαλίδια καλλιέργειας (σωλήνες καλλιέργειας, βιδωτά μπουκάλια διαφορετικών μεγεθών, τριβλία)
7. Πλυντήρια για τα γυαλικά
8. Συσκευές απόσταξης νερού ή απιονίσης νερού
9. Ζυγαριές: μία για να ζυγίζει μικρές ποσότητες και μία για μεγαλύτερες ποσότητες των συστατικών.
10. Μαγνητικοί αναδευτήρες
11. Πλαστικά μπουκάλια διαφορετικού μεγέθους, για αποθήκευση των διαλυμάτων στην κατάψυξη.
12. Ψυγείο, για αποθήκευση των χημικών διαλυμάτων, των πυκνών διαλυμάτων του θρεπτικού μέσου και των φυτικών υλικών
13. Βραστήρας, για να διαλύει το άγαρ και να λιώνει το θρεπτικό μέσο.
14. Μετρητής του pH, για ρύθμιση του pH στο θρεπτικό διάλυμα και στα διαλύματα.
15. Δοχείο υγρής αποστείρωσης ή χύτρα ταχυβραστήρας, για αποστείρωση με υδρατμό του θρεπτικού μέσου και των υλικών.
16. Μembrάνες φίλτρων, για αποστείρωση των διαλυμάτων.
17. Υποδερμικές σύριγγες, για αποστείρωση με φιλτράρισμα των διαλυμάτων.
18. Καρότσι με κατάλληλους δίσκους, για μεταφορά των καλλιιεργειών, του θρεπτικού μέσου και των υλικών.
19. Τράπεζα απαγωγού νηματικής ροής του αέρα, για ασηπτικούς χειρισμούς.
20. Λύχνος bunsen, για αποστείρωση των εργαλείων και του θαλάμου εργασίας (για τον ενοφθαλμισμό).
21. Υποστήριγμα των εργαλείων, για τα αποστειρωμένα εργαλεία κατά τη διάρκεια των ασηπτικών χειρισμών.
22. Μεγάλες λαβίδες με τραχιές άκρες, για τον ενοφθαλμισμό και τις καλλιιεργειες.

23. Λαβίδες λεπτές
24. Νυστέρια, για ξέφτισμα των ιστών.
25. Σπάτουλες για ζύγιση των συστατικών.
26. Στερεοσκόπιο, για παρατήρηση των ριζών και βλαστών.
27. Συσκευές κλιματισμού, για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας στο δωμάτιο ιστοκαλλιέργειας.
28. Ψεκαστήρας, για τον ψεκασμό οίνοπνεύματος στην τράπεζα ενοφθαλμισμών.

C.

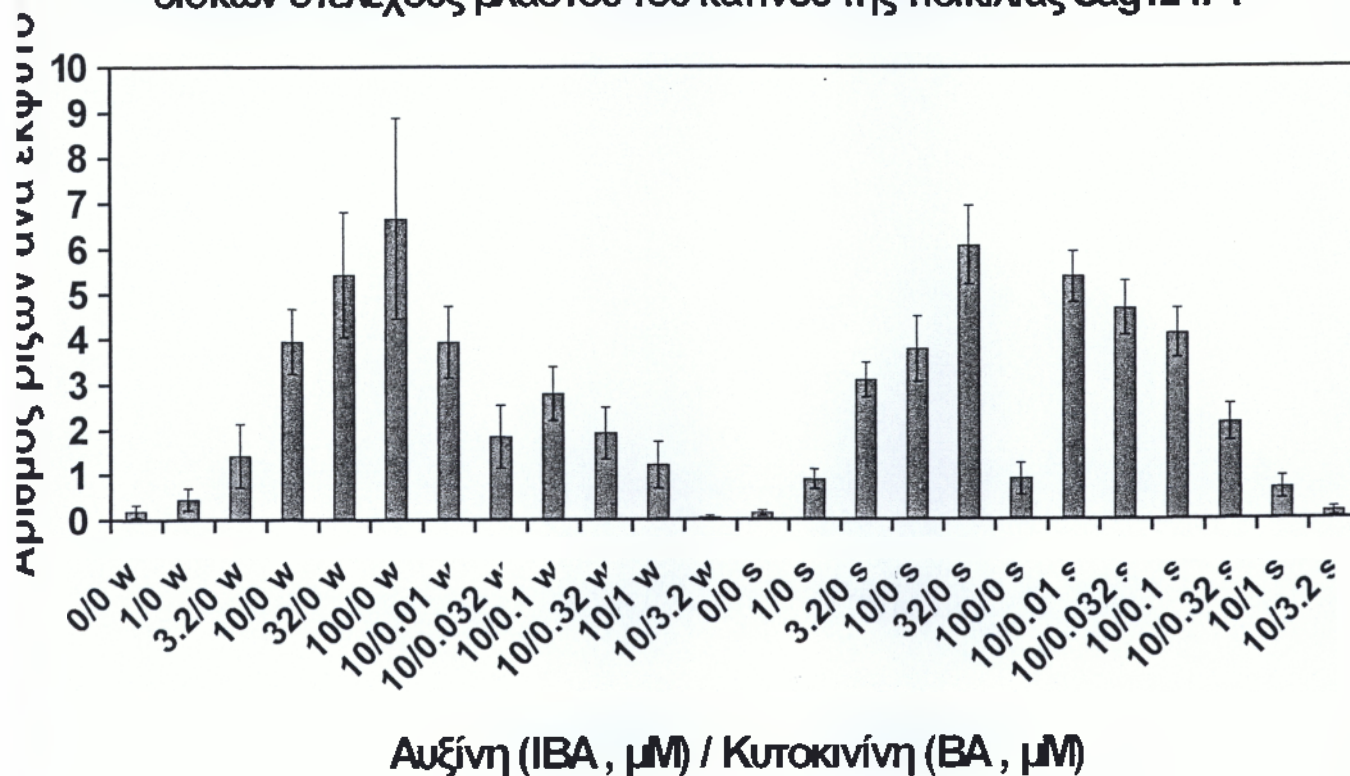
Η επίδραση της αυξίνης IBA και/ή της κυτοκίνινης BAP σε
έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού του καπνού της ποικιλίας



Τα έκφυτα των δίσκων του στελέχους του βλαστού της ποικιλίας SR1 του καπνού επωάσθησαν σε θρεπτικό μέσο με διαφορετικές συγκεντρώσεις αυξίνης στο σκοτάδι για 1 μέρα. Μετά τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς καμία ορμόνη και τοποθετήθηκαν στο φως για άλλες 13 μέρες.

D.

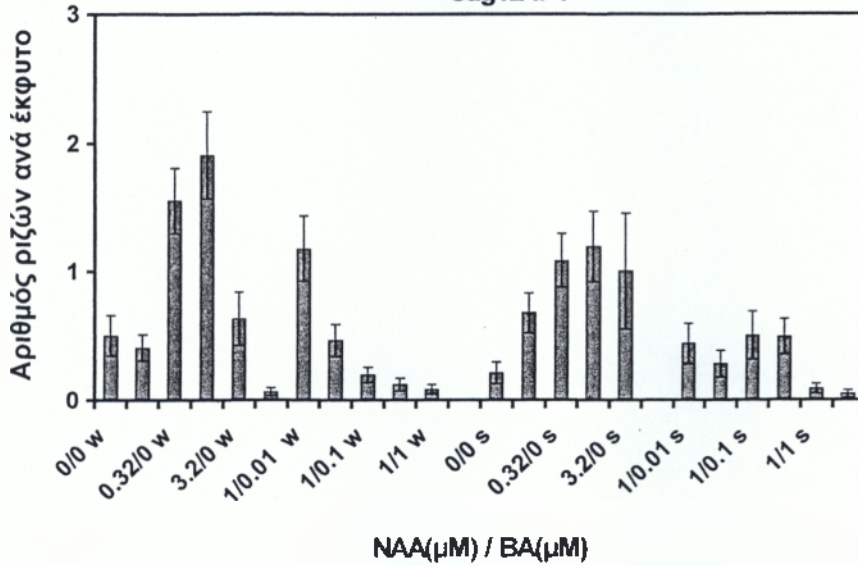
Η επίδραση του IBA και της BAP στο σχηματισμό ριζών σε έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού του καπνού της ποικιλίας Sag12-IPT



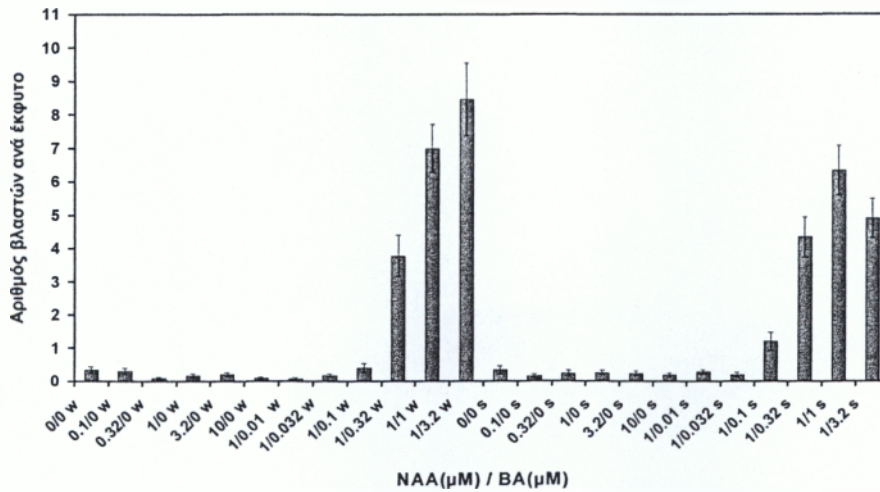
Τα έκφυτα δίσκων των ποικιλιών Wisconsin και Sag12-IPT επωάσθησαν σε θρεπτικό μέσο με ποικίλες συγκεντρώσεις αυξίνης σε συνδυασμό με ποικίλες συγκεντρώσεις κυτοκινίνης στο σκοτάδι για 1 μέρα. Μετά τα δισκία μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς καμία ορμόνη για 13 ημέρες.

Ε.

Η επίδραση του NAA και της BAP στο σχηματισμό ριζών σε έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού του καπνού της ποικιλίας Wisconsin και Sag12-IPT



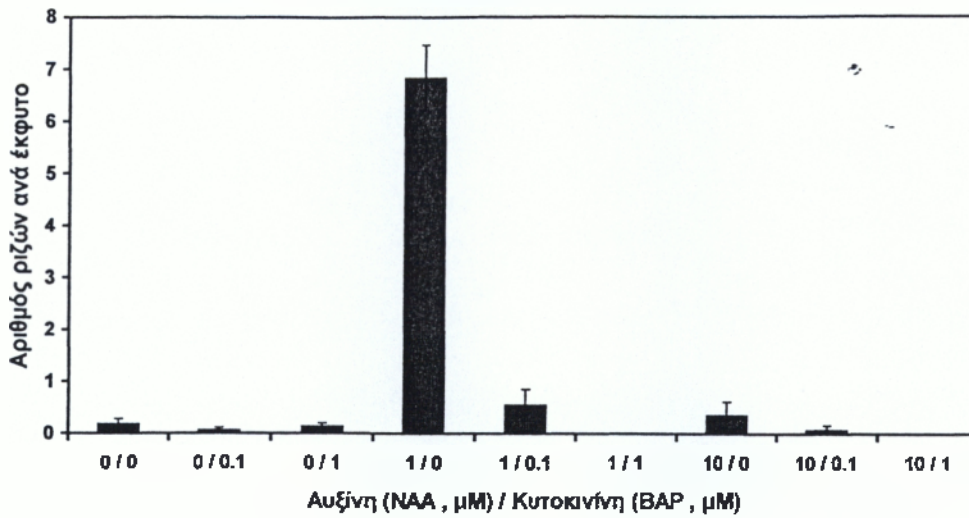
Η επίδραση του NAA και της BAP στο σχηματισμό βλαστών σε έκφυτα δίσκων στελέχους βλαστού του καπνού της ποικιλίας Wisconsin και Sag12-IPT



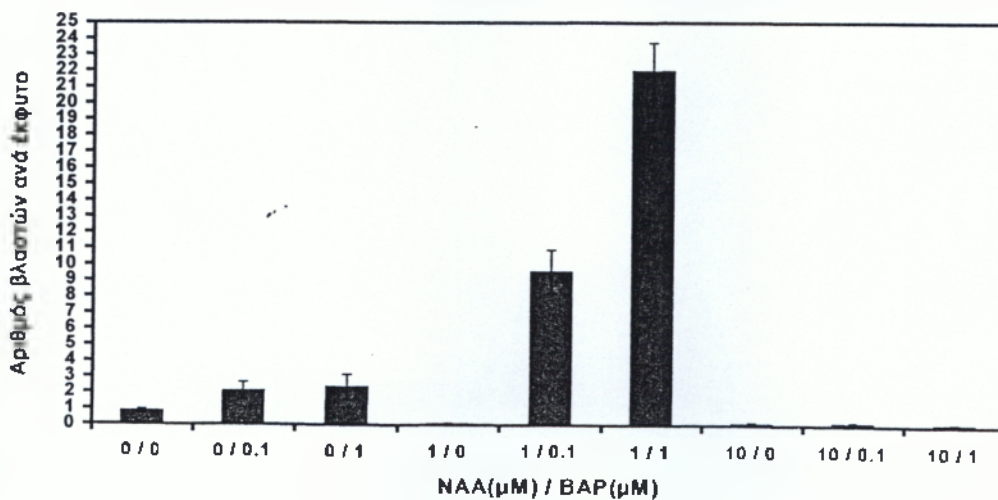
Τα έκφυτα δίσκων της ποικιλίας Wisconsin και Sag12-IPT επωάσθησαν σε θρεπτικό μέσο με ποικίλες συγκεντρώσεις NAA σε συνδυασμό με ποικίλες συγκεντρώσεις BA συνεχόμενα στο φως.

F.

Η επίδραση της αυξίνης NAA και/ή της κυτοκίνινης BAP στο σχηματισμό ριζών σε έκφυτα δίσκων στελέχους καπνού της ποικιλίας L



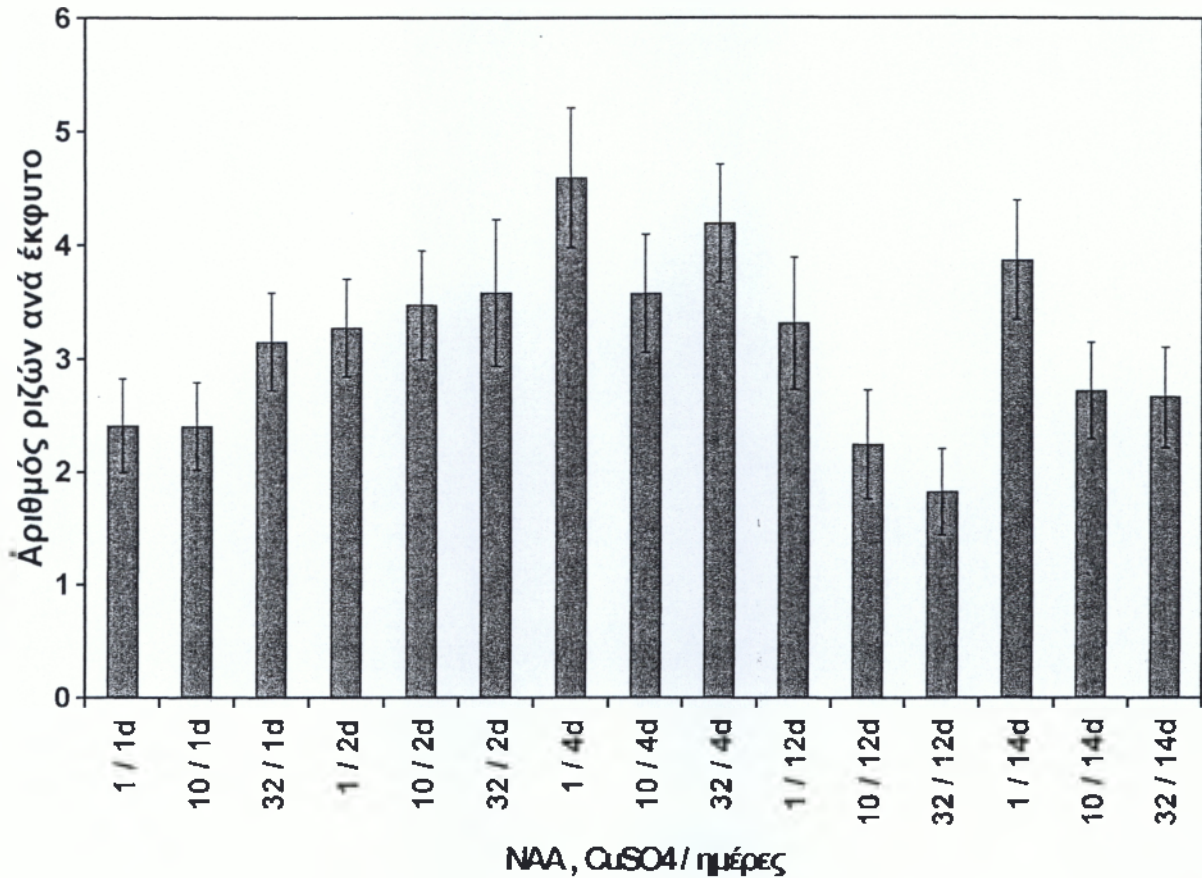
Η επίδραση της αυξίνης (NAA) και/ή της κυτοκίνινης(BAP) στο σχηματισμό βλαστών σε έκφυτα της ποικιλίας L του καπνού



Τα έκφυτα δίσκων της ποικιλίας L του καπνού επωάσθησαν σε θρεπτικό μέσο με NAA και ποικίλες συγκεντρώσεις BA συνεχόμενα για 14 ημέρες. (Αναφορά στην εικόνα 9)

G.

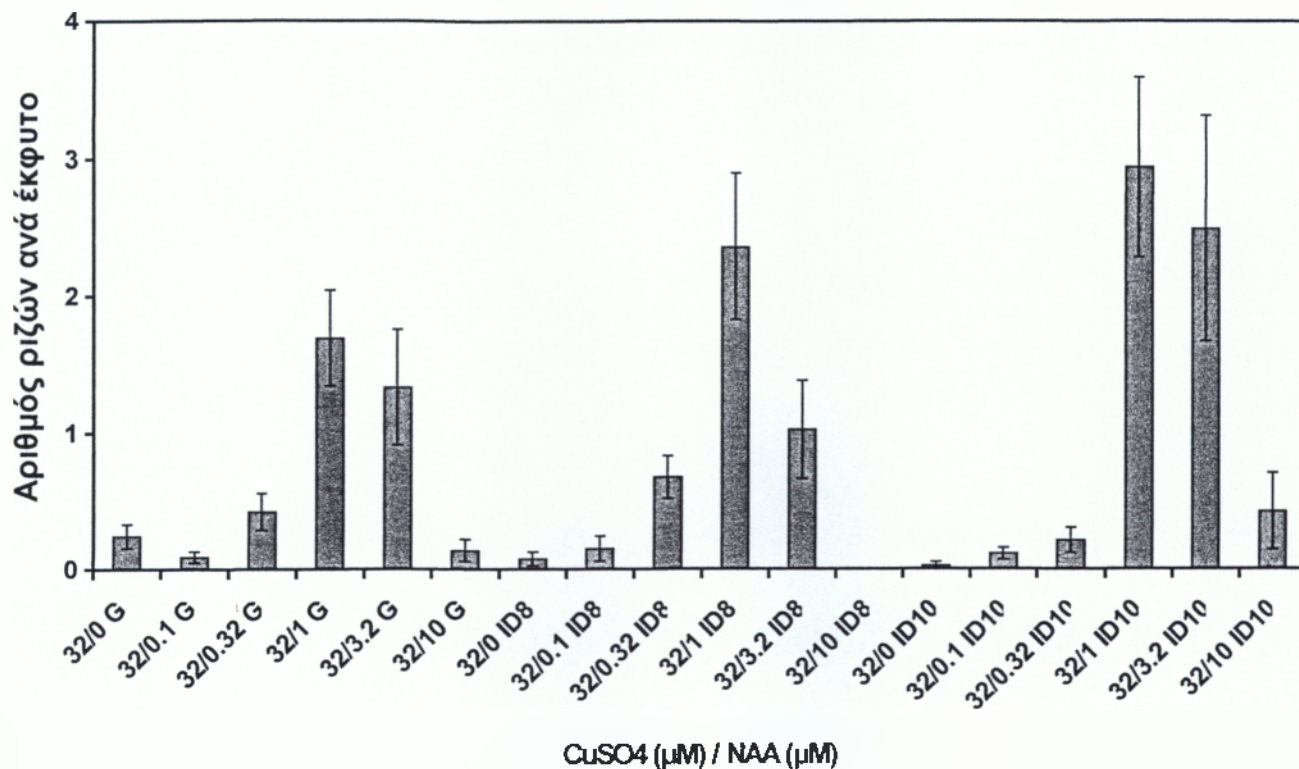
Η επίδραση της αυξίνης (NAA) και του CuSO_4 στο σχηματισμό ριζών της ποικιλίας L του καπνού (-μασχαλιαίους βλαστούς)



Τα έκφυτα δίσκων της ποικιλίας L του καπνού επώασθησαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε CuSO_4 μαζί με $1\mu\text{M}$ NAA για 2, 4, 12 και 14 ημέρες και μετά μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε μόνο $1\mu\text{M}$ NAA.

H.

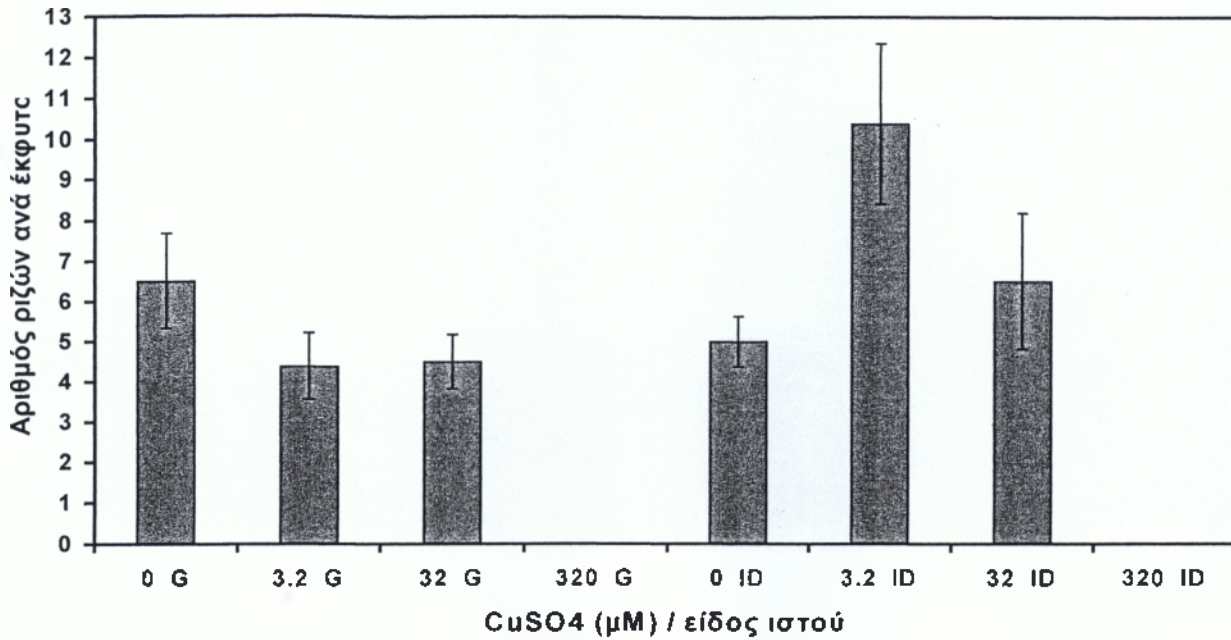
Η επίδραση του NAA και του CuSO₄ στο σχηματισμό ριζών στα GD3, ID8 και ID10 του καπνού



Τα έκφυτα δίσκων των ποικιλιών GD3, ID8 και ID10 του καπνού επωάσθησαν σε θρεπτικό μέσο με 32μM CuSO₄ σε συνδυασμό με ποικίλες συγκεντρώσεις NAA για 3 ημέρες, και μετά μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε μόνο NAA.

I.

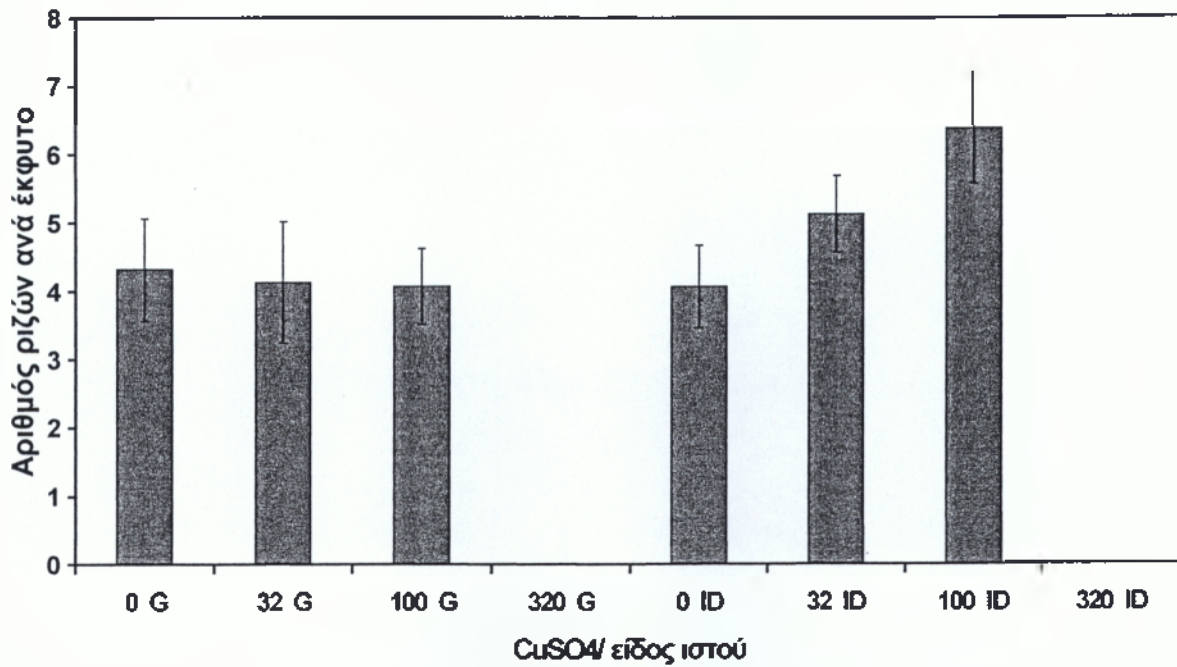
Η επίδραση του CuSO_4 σε ιστούς καπνού που περιείχαν το γονίδιο Cu-gus (GD3) και τη Cu-IPT (ID8) τρανσφεράση



Τα έκφυτα των μασχαλιαίων οφθαλμών από το GD3 και ID8 επωάθησαν σε MS θρεπτικό μέσο σε συνδυασμό με ποικίλες συγκεντρώσεις CuSO_4 , στους σωλήνες για 14 ημέρες.

J.

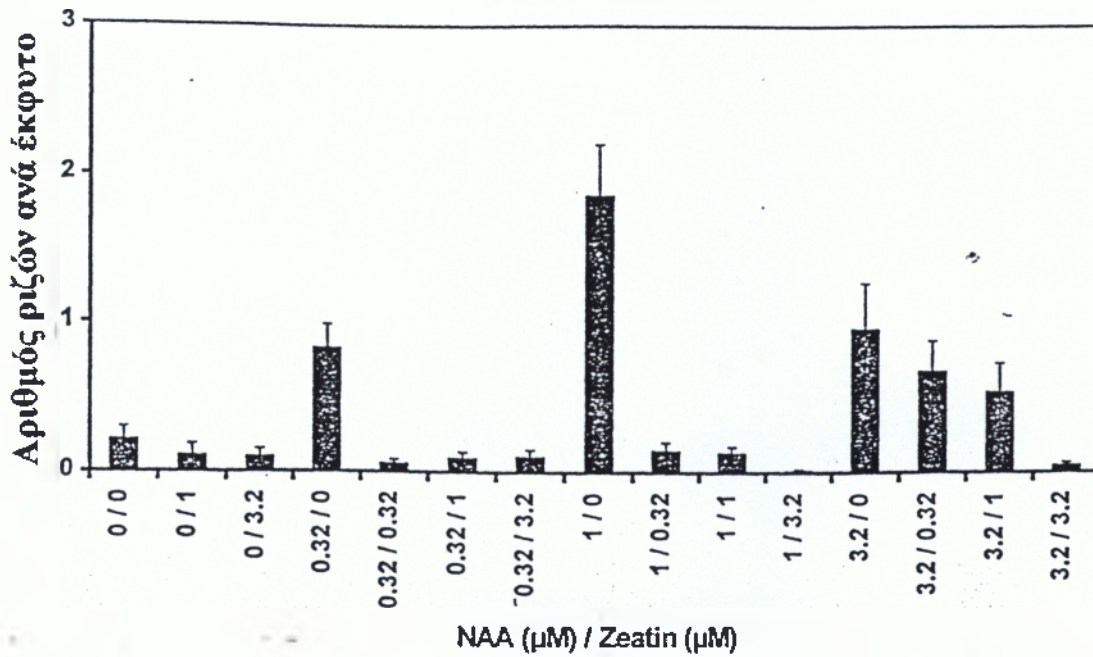
Η επίδραση του CuSO_4 σε ιστούς καπνού που περιείχαν το γονίδιο Cu-gus (GD3) και τη Cu-IPT (ID10) μεταφοράση στους σωλήνες 'in vitro'



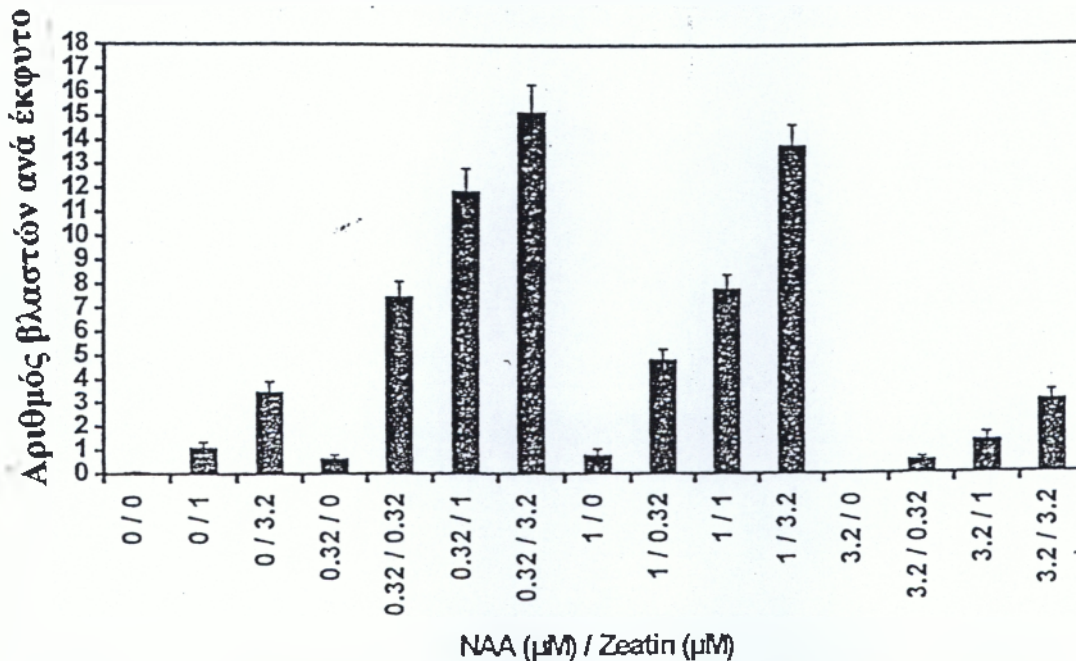
Τα έκφυτα των μασχαλιαίων οφθαλμών των GD3 και ID10 ποικλιών επώασθησαν σε MS θρεπτικό μέσο μαζί με ποικίλες συγκεντρώσεις CuSO_4 για 14 ημέρες.

Κ.

Η επίδραση του NAA και της Ζεατίνης στο σχηματισμό ριζών σε διαφορετικά είδη διαγονιδιακών φυτών του καπνού



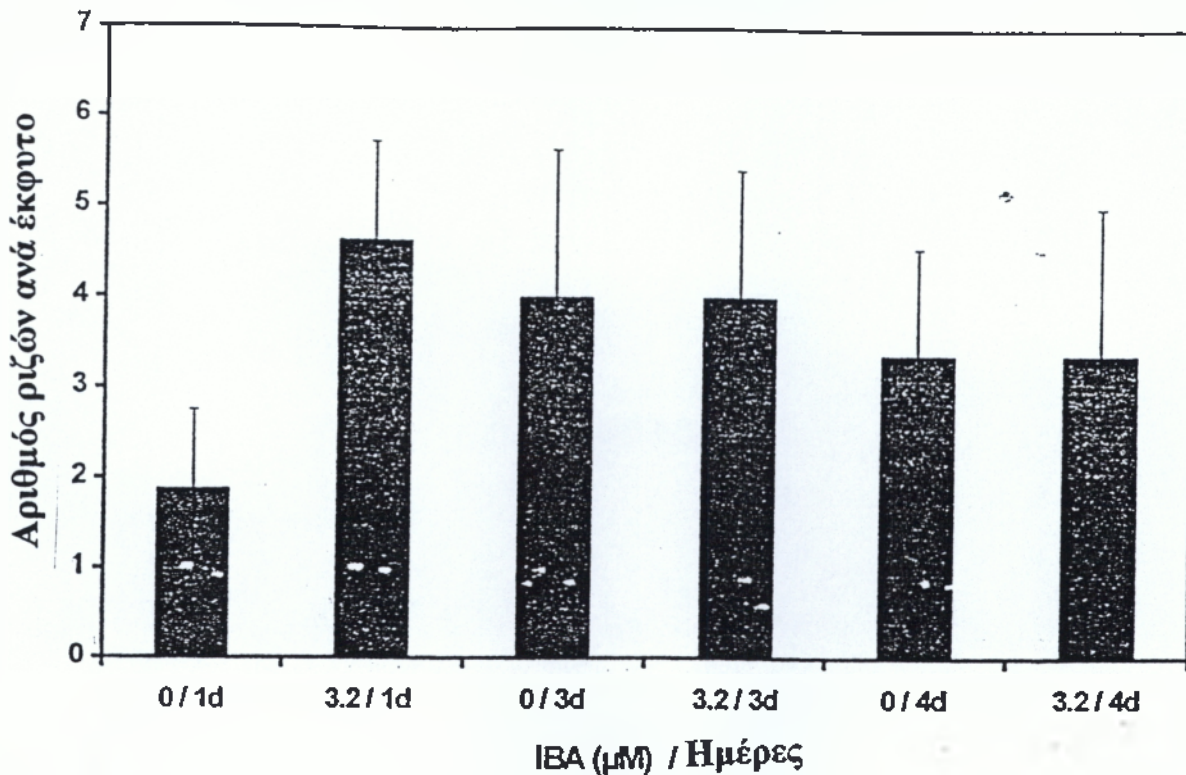
Η επίδραση του NAA και της Ζεατίνης στο σχηματισμό βλαστών σε διαφορετικά είδη διαγονιδιακών φυτών του καπνού



Τα έκφυτα δίσκων από διαφορετικές διαγονιδιακές ποικιλίες επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο με ποικίλες συγκεντρώσεις NAA σε συνδυασμό με ποικίλες συγκεντρώσεις ζεατίνης καθ'όλη τη διάρκεια της in vitro καλλιέργειας.

L.

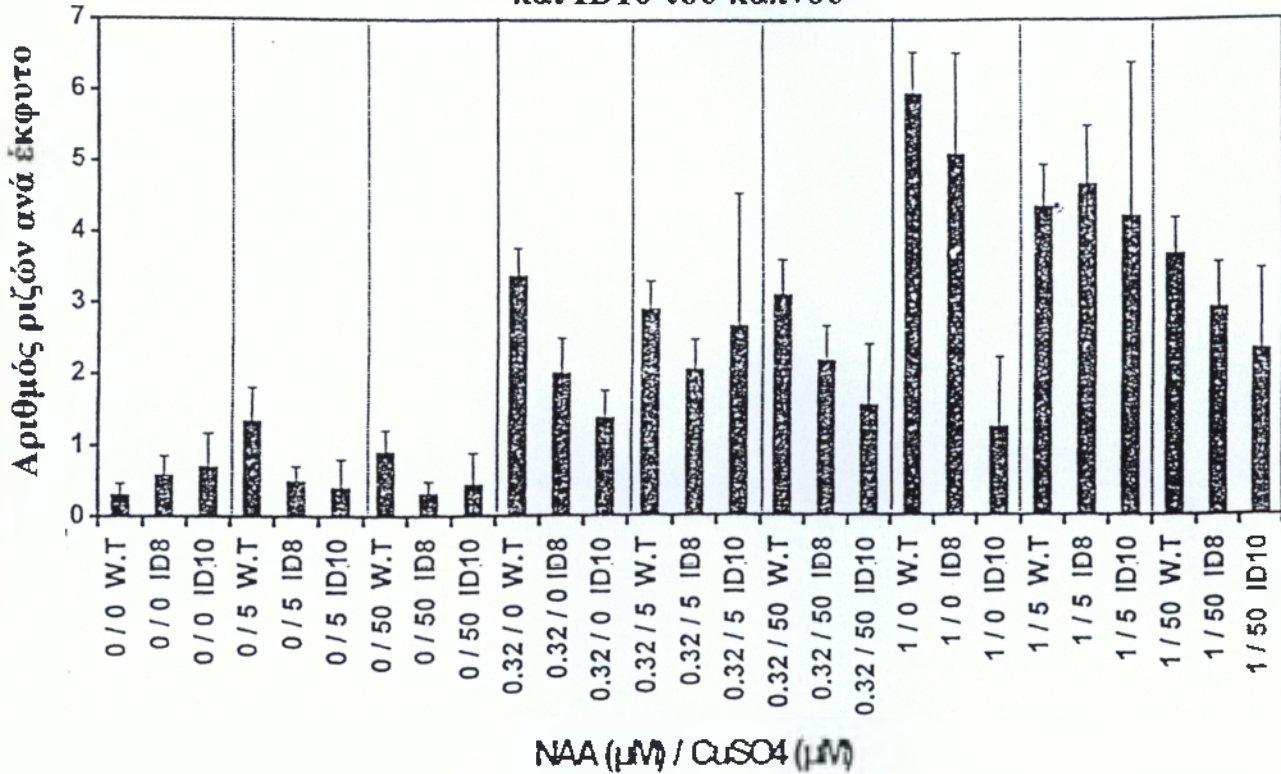
Η επίδραση του BAP και του IBA στο σχηματισμό ριζών της ποικιλίας L του καπνού στους σωλήνες *in vitro*



Τα έκφυτα των μασχαλιαίων οφθαλμών από την ποικιλία L επώασθηκαν σε MS θρεπτικό μέσο που περιείχε 1μM BAP για 1 μέρα. Την επόμενη μέρα μερικά από αυτά μεταφέρθηκαν σε MS θρεπτικό μέσο που περιείχε IBA και τα υπόλοιπα σε MS μέσο χωρίς καμία ορμόνη. Μετά οι βλαστοί που ήταν σε θρεπτικό μέσο χωρίς καμία ορμόνη μεταφέρθηκαν σε MS θρεπτικό μέσο μαζί με IBA. Το πείραμα έγινε για 14 ημέρες.

M.

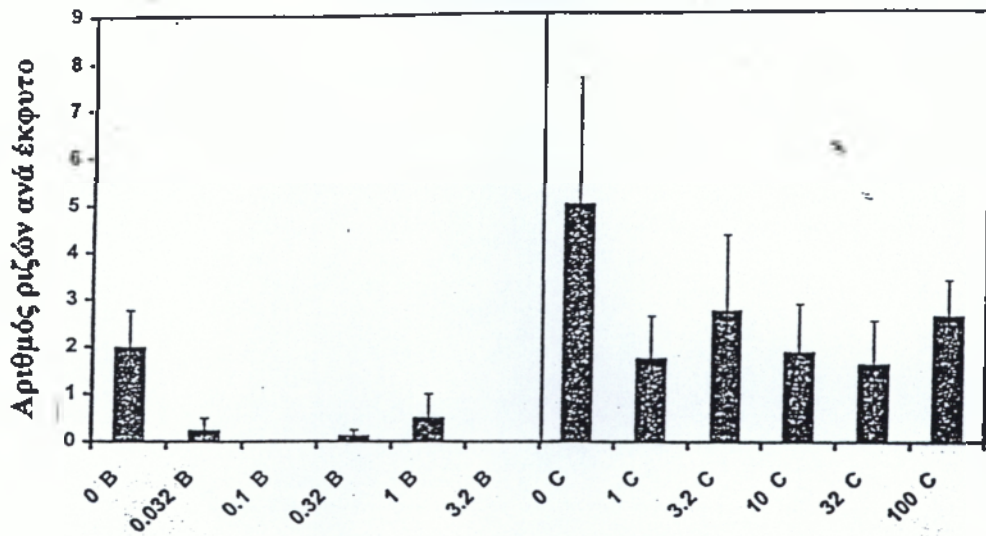
Η επίδραση του Cu-IPТ στο σχηματισμό ριζών στις ποικιλίες L, ID8 και ID10 του καπνού



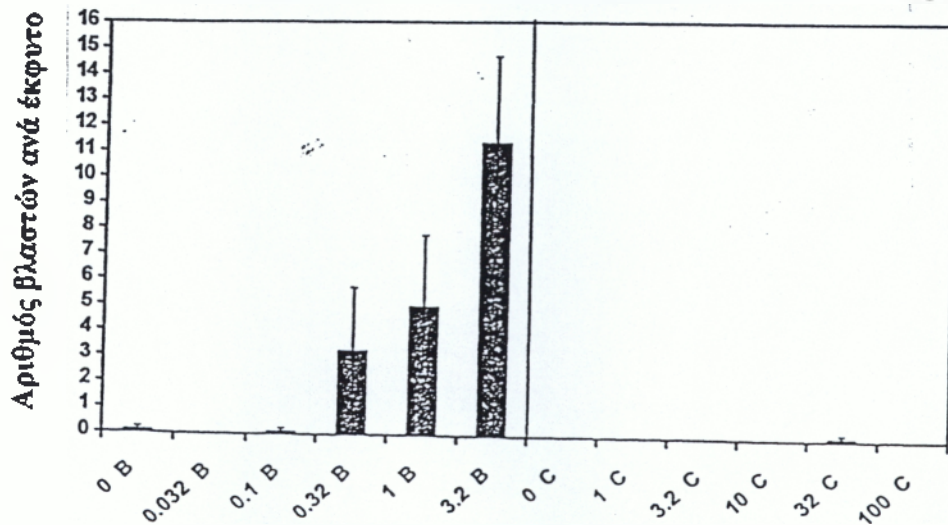
Τα έκφυτα δίσκων των ποικιλιών L, ID8 και ID10 επωάσθησαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε NAA μαζί με CuSO₄ καθ' όλη τη διάρκεια της in vitro καλλιέργειας.

Ζ.

Η επίδραση του BAP και CuSO₄ στο σχηματισμό ριζών της ποικιλίας L του καπνού στους σωλήνες in vitro



Η επίδραση του BAP και CuSO₄ στο σχηματισμό βλαστών της ποικιλίας L του καπνού στους σωλήνες in vitro



Τα έκφυτα των μασχαλαίων οφθαλμών από την L ποικιλία επώασθησαν συνεχόμενα σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 1μM NAA μαζί με ποικίλες συγκεντρώσεις BA και σε θρεπτικό μέσο με 1μM NAA μαζί με ποικίλες συγκεντρώσεις CuSO₄.