

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ
ΕΚΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ *VITIS VINIFERA* L. (cv
SULTANINA) ΚΑΙ *NICOTIANA TABACUM* L. (cv
XANTHD

ΜΑΡΙΑ ΧΡΗΣΤΑΚΗ-ΧΑΜΨΑ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1995

**ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ
ΕΚΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ *VITIS VINIFERA* L. (cv
SULTANINA) ΚΑΙ *NICOTIANA TABACUM* L. (cv
ΧΑΝΤΗΔ)**

ΑΠΟ
ΜΑΡΙΑ ΧΡΗΣΤΑΚΗ-ΧΑΜΨΑ
Πτυχ. Βιολογίας, Πανεπ. Αθήνας

Υποβλήθηκε ως μέρος των απαιτήσεων για τον τίτλο του
Διδάκτορα Βιολογικών Επιστημών

με έμφραση την
Φυσιολογία και Βιοχημεία Φυτών

ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

Εγκρίθηκε από την Επαμελή Επιτροπή:

Κ.Α. Ρουμπελάκη-Άγγελάκη,
Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης
Ν. Πανόπουλο,
Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης
Ε. Στρατάκη,
Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης
Ι. Μανέτα,
Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Πατρών
Χ. Στουρνάρα
Αναπλ. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης
Δ. Γανωτάκη,
Αναπλ. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης
Κ. Κοτζαμπάση,
Επικ. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Στους γονείς μου.

Στον άνδρα μου.

Στα παιδιά μου.

...ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Κλείνοντας εδώ τον κύκλο των μεταπτυχιακών μου σπουδών αισθάνομαι την ανάγκη να απευθύνω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες καθώς και την ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Κ. Α. Ρουμπελάκη-Άγγελάκη για την επιστημονική παρακολούθηση και ηθική υποστήριξη αλλά, πάνω απ'όλα, για την υπομονή και την κατανόηση που από την αρχή μέχρι το τέλος αυτής της συνεργασίας μου έδειξε.

Όλους αυτούς, που μου προσέφεραν τη βοήθεια τους, τις γνώσεις τους, αλλά και τον πολύτιμο χρόνο τους, τους ευχαριστώ πολύ. Η αναφορά μου σ'αυτούς θα είναι χρονολογική, ξεκινώντας από τη Μαίρη Παπαδοκωστάκη και το Θεοδωρή Αντωνίου, που θα μου μείνουν πραγματικά αξέχαστοι.

Τον Dr Bernard Walter και τους συνεργάτες του, από το INRA, Colmar, Γαλλίας, για τις πολύτιμες γνώσεις, που μου προσέφεραν σε θέματα ιστοκαλλιέργειας, κατά το διάστημα της εκεί παραμονής μου τον Αύγουστο του 1985.

Τη συνάδελφο Πόπη Καταιρντάκη, που με "μόυσε" στην τεχνική απομόνωσης και καλλιέργειας πρωτοπλάστων.

Τον Τάκη Θεοδωρόπουλο, Λέκτορα τώρα της Βιοχημείας στην Ιατρική Σχολή, για τις τόσο χρήσιμες συμβουλές του σε θέματα πρόσληψης ουσιών από πρωτοπλάστες αλλά και για τη γενικότερη βοήθεια και στήριξη.

Το εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής και ιδιαίτερα τον

Αναπληρωτή καθηγητή κ. Χ. Στουρνάρα, που μου επέτρεψε τη χρήση του φασματοφθοριόμετρου για την ποσοτικοποίηση των πολυαμινών.

Την προπτυχιακή τότε και μεταπτυχιακή τώρα φοιτήτρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Φυτών, Στάσα Παπαδάκη, για το χρόνο που μου αφιέρωσε με μεγάλη προθυμία, κάθε φορά που χρειάστηκε την βοήθεια της.

Το Στέλιο Μαυράκη για την διάθεση φυτικού υλικού, προαπαιτησιών στην πειραματική διαδικασία της διατριβής.

Τη Σοφία Μακρυγιαννάκη-Τουφεξή γιατί, είτε ως τεχνικός εργαστηρίου ή ως γραμματέας δεν μου αρνήθηκε ποτέ τη βοήθεια της.

Τον Επίκουρο καθηγητή Φυσιολογίας Φυτών, Κυριάκο Κοτζαμπάση για τη συνεργασία μαζί του, που υπήρξε καθοριστική, αλλά και για την εμπύχωση του σε ώρες απογοήτευσης.

Την καθηγήτρια Kiem Tran Thanh Van, του C.N.R.S, Gif-Sur-Yvette, Γαλλίας, και τον καθηγητή Nello Bagni, από το Università di Bologna, Dip. di Biologia, Ιταλίας, για τις συζητήσεις που είχαμε και τις κατευθύνσεις, που μου έδωσαν.

Το Νικόλα Πριμγκύριο για την βοήθεια του στην επεξεργασία και παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Τους συναδέλφους και φίλους Κώστα Λουλακάκη και Μπάμπη Συμνή για την άψογη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια που δουλέψαμε στο ίδιο Εργαστήριο.

Τον Αριστείδη Τσατοάκη, Επίκουρο καθηγητή Τοξικολογίας, για τη βοήθεια στην τελική παρουσίαση της διατριβής.

Το Θανάση Αλεγκάκη, μεταπτυχιακό φοιτητή του Εργαστηρίου Τοξικολογίας, που πολύ με βοήθησε στις τελικές διορθώσεις των

κειμένων και τη διαμόρφωση των εικόνων.

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής που με τις εύστοχες παρατηρήσεις τους συνέβαλλαν σε σημαντική βελτίωση της διατριβής.

Θα ήταν παράληψη να μην αναφέρω το εργαστήριο Αιολικής Ενέργειας του ΤΕΙ Ηρακλείου και τον Ερευνητή του ΒΕΜΜΟ Λεωνίδα Ναουμίδη για την τεχνική υποστήριξη στην εκτύπωση του κειμένου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και στον άνδρα μου, στους οποίους η διατριβή αυτή είναι αφιερωμένη ως ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης για όσα μου προσέφεραν. Χωρίς την ηθική τους στήριξη και την ανοχή τους, όλα αυτά τα χρόνια, η πραγματοποίηση της θα ήταν αδύνατη. Από το Δημήτρη και το Γιώργο θέλω να ζητήσω συγγνώμη για τις ώρες που με στερήθηκαν και ελπίζω στην κατανόηση τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ	ii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	v
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	ix
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
SUMMARY	4
<i>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</i>	6
<i>ΙΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ ΓΕΝΙΚΑ</i>	10
A: ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ	10
B: ΕΝΖΥΜΑ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ	11
Γ: ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ	15
<i>Η ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ</i>	17
A: ΓΕΝΙΚΑ	17
B: ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	20
Γ: ΑΝΑΓΕΝΝΩΜΕΝΑ ΚΑΙ ΜΗ ΑΝΑΓΕΝΝΩΜΕΝΑ ΦΥΤΙΚΑ ΕΙΔΗ	22

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ ΣΕ ΦΥΛΛΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΕΣ ΑΠΟ IN VITRO ΦΥΤΑ ΑΜΠΕΛΙΟΥ (<i>Vitis vinifera</i> L. cv <i>Sultanina</i>) ΚΑΙ ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΚΑΠΝΟΥ (<i>Nicotiana tabaccum</i> L. cv <i>Xanthi</i>).	26
Περίληψη	27
Εισαγωγή	27
Υλικά και Μέθοδοι	30
Φυτικό Υλικό	30
Απομόνωση Πρωτοπλαστών	30
Εκχύλιση και Ανάλυση Πολυαμινών	31
Βενζυλίωση των Πολυαμινών	33
Ανάλυση Βενζυλιωμένων Πολυαμινών	33
Αποτελέσματα	34
Συζήτηση	46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΣΗΜΑΣΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ ΑΠΟ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΕΣ ΑΜΠΕΛΙΟΥ (<i>Vitis vinifera</i> L. cv <i>Sultanina</i>) ΚΑΙ ΚΑΠΝΟΥ (<i>Nicotiana tabaccum</i> L. cv <i>Xanthi</i>).	50
Περίληψη	51
Εισαγωγή	51
Υλικά και Μέθοδοι	56
Φυτικό Υλικό	56
Πειράματα Πρόσληψης Πολυαμινών	56

Αποτελέσματα	57
Συζήτηση	66

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ ΚΑΤΑ
ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ
ΑΜΠΕΛΙΟΥ (*Vitis vinifera* L. cv *Sultanina*) ΚΑΙ
ΚΑΠΝΟΥ (*Nicotiana tabaccum* L. cv *Xanthi*) ΚΑΙ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΤΥΧΗ ΡΑΔΙΟΕΝΕΡΓΑ ΣΗΜΑΣΜΕΝΗΣ
ΠΟΥΤΡΕΙΝΗΣ**

	70
Περίληψη	71
Εισαγωγή	71
Υλικά και Μέθοδοι	74
Φυτικό Υλικό	74
Απομόνωση Πρωτοπλαστών	75
Ανάλυση Ενδογενών Πολυαμινών	75
Μεταβολική τύχη ¹⁴ C-Put	75
Προσδιορισμός των μεταβολικών προϊόντων πολυαμίνης	76
Αποτελέσματα	77
Συζήτηση	88

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ ΚΑΙ ΤΑ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΑ
ΤΟΥΣ ΕΝΖΥΜΑ, ΑΠΟΚΑΡΒΟΣΥΛΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΡΝΙΘΙΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ
ΚΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΕ ΕΚΦΥΤΑ ΦΥΛΛΩΝ
ΑΜΠΕΛΙΟΥ (*Vitis vinifera* L. cv *Sultanina*).**

	91
Περίληψη	92

	viii
Εισαγωγή	92
Υλικά και Μέθοδοι	96
Φυτικό Υλικό	96
Προορισμός των Ενζυμικών Ενεργοτήτων ADC και ODC	96
Αποτελέσματα	97
Συζήτηση	104
<i>ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ</i>	110
<i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i>	112

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ:

- ACC:** 1-aminocyclopropane carboxylic acid
ADC : Arginine decarboxylase
Ars : Arsenate
6-BAP : Benzylaminopurine
Cad : Cadaverine
CCCP : Carbonylcyanide m-chlorophenyl-hydrazone
DAO : Diamine oxidase
DAP : 1,3-Diaminopropane
DFMA : α-Difluoromethylarginine
DFMO : α-Difluoromethylornithine
2,4 - DNP : 2,4-Dinitrophenol
DTT : Dithiothreitol
EDTA: Ethylene-diamine tetracetic acid
GA₃: Gibberellic acid
GCWR : Grapevine cell wall regenerating
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
K_m : σταθερά Michaelis
MES : 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid
NaSCN: Sodium Sulfocyanate
NAA : 1-Naphthaleneacetic acid
ODC : Ornithine decarboxylase
PA(s): Polyamine(s)
PCA : Perchloric acid
PH : Pellet Hydrolysed

POPOP: Bis(2,5 diphenyl oxazolyl)-benzene

PPO : 2,5 diphenyl oxazole

PUT : Putrescine

S : Soluble in PCA

SAM : S-adenosylmethionine

SH : Soluble Hydrolysed

SPD : Spermidine

SPM : Spermine

TCA : Trichloroacetic acid

TCL : Καλλιέργεια λεπτής στοιβάδας κυττάρων

TLC : Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

V_{max} : Μέγιστη ταχύτητα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κύριος στόχος αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί η πιθανή συμμετοχή των πολυαμινών στις μορφογενετικές εκφράσεις των φυτών κατά την *in vitro* αναγέννηση και ιδιαίτερα σε φυτά απείθαρχα. Αρχικά, μελετήθηκε η καθ' ύψος του βλαστού διαβάθμιση των ενδογενών πολυαμινών σε φύλλα αμπελιού (*Vitis vinifera* L. cv Sultanina) προερχόμενα από *in vitro* αναπτυγμένα φυτά. Ενώ, για λόγους σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν και φύλλα προερχόμενα από σπορόφυτα καπνού (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi), που είναι ένα εύκολο *in vitro* αναγεννώμενο είδος. Τόσο στα φύλλα από *in vitro* φυτά αμπελιού όσο και στα φύλλα από σπορόφυτα καπνού, μειώνεται η συγκέντρωση των πολυαμινών με την αύξηση της ηλικίας των φύλλων. Οι πολυαμίνες, που προσδιορίστηκαν (πουρεσίνη (Put), σπερμιδίνη (Spd), και σπερμίνη (Spm)) και στα τρία κλάσματα (ελεύθερο (S), δεσμευμένο διαλυτό (SH) και δεσμευμένο αδιάλυτο (PH)) είχαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωσή τους στα νεαρότερα φύλλα (της κορυφής). Για τα φύλλα καπνού η αύξηση αυτή είναι 10 φορές ενώ για τα φύλλα αμπελιού είναι 5 φορές. Ακόμη, έγινε απομόνωση πρωτοπλαστών από μεσόφυλλο, που προερχόταν από το μεσαίο τμήμα του βλαστού του φυτού, για να διαπιστωθεί αν η διακύμανση της συγκέντρωσης των ενδογενών πολυαμινών, είχε σχέση με αλλαγές που συμβαίνουν σε κύτταρα, όταν αυτά καλλιεργούνται με τη μορφή πρωτοπλαστών. Σε πρωτοπλάστες του καπνού επάγεται μιτωτική δραστηριότητα, δημιουργείται μικροκάλλος με μορφογενετική έκφραση και φυτο-αναγεννητική ικανότητα. Αντίθετα, πρωτοπλάστες αμπελιού εμφανίζουν χαμηλά ποσοστά βιωσιμότητας και μέχρι τώρα δεν έχει γίνει

δυνατή η δημιουργία κάλλου για την αναγέννηση φυτού. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι πολυαμινες συμβάλουν στη σταθερότητα των κυτταρικών μεμβρανών, στην εξουδετέρωση ριζών O_2 στην μιτωτική διαδικασία αλλά και στο ότι αυξάνονται κάτω από συνθήκες καταπόνησης, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί ο ρόλος τους στην μορφογενετική έκφραση εκφύτων και πρωτοπλαστών (Besford *et al.* 1993). Οι πρωτοπλάστες και των δύο φυτών είχαν την ικανότητα να προσλαμβάνουν εξωγενή Put και Spd σε χαμηλές ή σε υψηλές συγκεντρώσεις, με διαφορές ανάμεσα στα δύο είδη, στην ταχύτητα πρόσληψης και στα χαρακτηριστικά της. Επίσης, απομονωμένοι πρωτοπλάστες και από τα δύο φυτικά είδη καλλιεργήθηκαν για 9 ημέρες και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών. Παρατηρήθηκε διακύμανση στα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών και στα δύο είδη πρωτοπλαστών, που ταυτιζόταν με τις μορφολογικές τους διαφοροποιήσεις κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, δηλαδή, ανασύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, επιμήκυνση και κυτταροδιαίρεση. Η κατανομή της σημασμένης πούτρεσίνης, μετά από 7 h πρόσληψης, έδειξε ότι και στα δύο είδη υπήρχε τάση για μείωση στο διαλυτό και αντίστοιχα, αύξηση στο κλάσμα, που εντοπίζεται στο ίζημα, με το χρόνο. Τέλος μελετήθηκε η διακύμανση των πολυαμινών κατά τη διάρκεια καλλογένεσης σε έκφυτα φύλλου αμπελιού (*Vitis vinifera* L. cv Sultanina). Διαπιστώθηκαν δύο μέγιστα στη συγκέντρωση των ενδογενών πολυαμινών κατά τη διάρκεια της μορφογενετικής διαδικασίας. Το ένα μέγιστο συνδέεται με εμφάνιση καλλογενετικής δραστηριότητας ενώ το άλλο με τη ριζογένεση. Παράλληλα προσδιορίστηκε η ενεργότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων των πολυαμινών, αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (ADC) και της

ορνιθίνης (ODC). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των ενδογενών πολυαμινών συνδέεται με την αύξηση της ενεργότητας των βιοσυνθετικών τους ενζύμων.

SUMMARY

The main objective of this research was to investigate the possible role of polyamines in morphogenic processes of plants and particularly in plants recalcitrant to *in vitro* regeneration. The first approach was the determination of the titers of endogenous polyamines in leaves at different ontogenic stages (different position across the shoot). Leaves of the recalcitrant plant species, the grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Sultanina) from *in vitro* cultured plants and from tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi), an easy regenerating species, were used. In both plant species the endogenous polyamine concentration in leaves decreased with age. The polyamines Put, Spd, and Spm, in all the three fractions, free, soluble conjugated, and insoluble conjugated, had the highest concentration in the young leaves. In grapevine leaves the increase was 5-fold while in tobacco it was 10-fold. Furthermore, protoplasts from leaf mesophyll from the middle part of the shoot were isolated and cultured. Polyamines were determined, in order to ascertain if the variation of endogenous polyamines was correlated with cell growth and division. Tobacco protoplasts are easily regenerating giving microcallus, which may differentiate to root and shoot and give a new plant. Grapevine protoplasts, exhibit low viability and till now, the development of microcallus from protoplasts has been difficult. Keeping in mind that polyamines participate in cell membrane stability, accumulate in active growing cells or tissues, and that increase under stress conditions, the uptake characteristics of ^{14}C -Put and ^{14}C -Spd by protoplasts were studied. Both protoplast models exhibited high uptake

rates of polyamines from the culture medium; there were quantitative differences between the two plant species. Isolated protoplasts from both plant species were cultured for a period of 9 days, and the levels of endogenous polyamines were determined. In both species, a variation of endogenous polyamines, coinciding with cell elongation or cell division, was observed. The distribution of labeled Put after 7h of uptake showed that it decreased in both protoplast species in soluble fraction and increased in insoluble fraction, with time. Finally, the titers of polyamines during callogenesis in leaf explants from grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Sultanina) were determined. Two maxima in the endogenous concentrations of polyamines were detected during the morphogenic process. One maximum was related to rhizogenesis and the other to the appearance of callogenic activity. In parallel the enzymic activity of the polyamine biosynthetic enzymes, arginine (ADC) and ornithine (ODC) decarboxylase was determined. The results showed that the increase in endogenous polyamine concentration corresponded to the increase in the enzymic activity of ADC and ODC decarboxylase.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πολυαμίνες είναι χαμηλού μοριακού βάρους αλειφατικές μοριακές ενώσεις που περιέχουν δύο ή περισσότερες αμινομάδες (Morgan, 1967). Οι πολυαμίνες (PAa), πουτρεσίνη (Put), σπερμιδίνη (Spd) και σπερμίνη (Spm) βρίσκονται σ' όλα τα ανώτερα φυτά και έχουν βρεθεί σε φύλλα και έμβρυα αμπελιού (Adams *et al* 1990, Faure *et al* 1991). Οι πολυαμίνες και τα βιοσυνθετικά τους ένζυμα, αποκαρβοξυλάση της αργινίνης (Arginine decarboxylase, ADC EC 4.1.1.19) και της ορνιθίνης (Ornithine decarboxylase, ODC EC 4.1.1.17) έχουν συσχετισθεί με την κυτταρική διαίρεση, την αύξηση και το μεταβολισμό, την εμβρυική αύξηση, τη διαφοροποίηση και το σχηματισμό ανθικών καταβολών σε καλλιέργειες λεπτής στοιβάδας κυττάρων, την επαγωγή καλλογένεσης και το σχηματισμό ριζών (Bagni *et al* 1982, Biondi *et al* 1990, Burtin *et al* 1990, Desai and Metha, 1985, Friedman *et al* 1985, Kaur-Sawhney *et al* 1990, Martin-Tanguy *et al* 1988, Meijer *et al* 1988, Nielsen 1990, Torigiani *et al* 1987).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις των πολυαμινών αυξάνουν σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε στάδιο μετατροπής της κατάστασης διαφοροποίησης τους (Burtin *et al* 1989, Desai and Metha, 1985). Στα ανώτερα φυτά, που αποτελούνται από ιστούς και όργανα με πλήρως διαφοροποιημένες ομάδες κυττάρων, είναι δυνατόν να γίνει αποδιαφοροποίηση μετά από εξωτερική επέμβαση. Για παράδειγμα, μετά από τραυματισμό (π.χ. αποκεφαλισμένα φυτά, έκφυτα), τα κύτταρα επανεκφράζουν την ικανότητα τους να διαιρούνται, να σχηματίζουν ένα επουλωτικό κάλλο και να επαναδιαφοροποιούνται σε μερίστωμα βλαστού

ή ρίζας. Σε μερικά φυτικά είδη ο νεοσχηματισμός είναι η βάση για πολλαπλασιασμό. Έτσι η κυτταρική αποδιαφοροποίηση είναι μια σημαντική διαδικασία στην οποία στηρίζεται η ιστοκαλλιέργεια και ο μικροπολλαπλασιασμός. Η διαδικασία όμως της κυτταρικής αποδιαφοροποίησης σε ολόκληρο φυτό ή σε μεγάλα πρωτογενή έκφυτα, που καλλιεργούνται *in vitro* είναι δύσκολο να αναλυθεί λόγω της ετερογένειας του κυτταρικού πληθυσμού. Αντίθετα, πρωτοπλάστες απομονωμένοι από μεσόφυλλο φύλλου συνιστούν ένα πρωτογενές έκφυτο, που αποτελείται από ομοιογενή πληθυσμό κυττάρων. Σε καλλιέργεια, τα περισσότερα είδη πρωτοπλαστών ακολουθούν το ίδιο πρότυπο ανάπτυξης.

Το αμπέλι, όπως και πολλά άλλα ξυλώδη φυτικά είδη, είναι σχετικά απείθαρχο σε αναγέννηση *in vitro*. Ο όρος απείθαρχο (recalcitrant) έχει χρησιμοποιηθεί στην ιστοκαλλιέργεια για να υποδηλώσει έλλειψη κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή έλλειψη μορφογενετικής έκφρασης *in vitro*. Η αναγέννηση πρωτοπλαστών είναι η έκφραση των βασικών ιδιοτήτων όλων των ζώντων συστημάτων προκειμένου να διορθώσουν κάποια βλάβη που έγινε στη δομή τους και περιλαμβάνει επαναδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων, επιμήκυνση των πρωτοπλαστών και επαναφορά τους σε μια νέα γενιά κυττάρων (Necas, 1980). Μετά από αυτά, αναγέννηση μπορεί να προκύψει με συνεχείς κυτταροδιαιρέσεις, σχηματισμό κάλλου και άμεση οργανογένεση ή σωματική εμβρυογένεση (Εικόνα 1). Στην πρώτη περίπτωση, η βλαστογένεση προηγείται από τους μορφογενετικούς κάλλους και ακολουθεί ριζογένεση. Και στις δύο περιπτώσεις η επαγωγή της μίτωσης στους πρωτοπλάστες είναι προαπαιτησι.

Έχοντας δεδομένη την αδυναμία των πρωτοπλαστών του αμπελιού

να αναγεννώνται αλλά και την σχέση των πολυαμινών με μορφογενετικά φαινόμενα σε άλλα φυτικά είδη (κυρίως εύκολα αναγεννώμενα) το ερώτημα που τίθεται είναι: **ποιά είναι η σχέση που μπορεί να έχουν οι πολυαμίνες με την απειθαρχία σε *in vitro* μορφογενετική έκφραση πρωτοπλάστων και εκφύτων *Vitis Vinifera* L. cv *Sultanina*.**

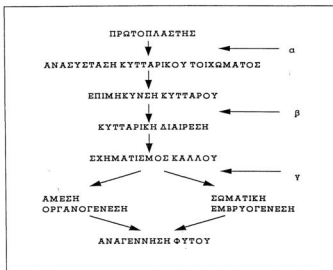
Σ τ ό χ ο ς της παρούσας διατριβής ήταν α: η κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών επαγωγής της μορφογενετικής έκφρασης σε πρωτοπλάστες με στόχο την βιοτεχνολογική εφαρμογή και β: η απάντηση του παραπάνω ερωτήματος με σύγκριση πρωτοπλάστων αμπέλιου, με πρωτοπλάστες από ένα εύκολα αναγεννώμενο φυτικό είδος τον καπνό, (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi).

Κατ' αρχήν μελετήθηκε η προέλευση των πρωτοπλάστων και πιο συγκεκριμένα τα ενδογενή επίπεδα των πολυαμινών στα φύλλα δότες και η σχέση τους με το υπόλοιπο φυτό μελετώντας τη διαβάθμιση τους καθ' ύψος του φυτού (που σημαίνει και κατά ηλικία). Έγινε σύγκριση στα επίπεδα των πολυαμινών ανάμεσα στα φύλλα και τους πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνού που είναι φυτικό είδος εύκολα αναγεννώμενο. Τα χαρακτηριστικά πρόσληψης εξωγενών πολυαμινών και οι συνθήκες (χρόνος σύστημα μεταφοράς, αναστολείς pH θεωρήθηκε αναγκαίο να μελετηθεί στη συνέχεια με σκοπό τη μελέτη της λειτουργίας των μεμβρανών και τη δυνατότητα παρέμβασης με εξωγενείς PAs.

Στη συνέχεια οι πρωτοπλάστες καλλιεργήθηκαν και προσδιορίστηκε η διακύμανση των ενδογενών PAs κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας όπου συμβαίνει η ανασύσταση του κυτταρικού τοιχώματος η επιμήκυνση του κυττάρου και οι πρώτες διαιρέσεις ενώ παράλληλα

δόθηκε ραδιοσημασμένη Put και μελετήθηκε η μεταβολική της τύχη και ενσωμάτωση στα κλάσματα των ΡAs.

Η αδυναμία σχηματισμού κάλλου από πρωτοπλάστες αμπελιού αλλά και η αναγκαιότητα μελέτης του μορφογενετικού αυτού φαινομένου, οδήγησε στην καλλιέργεια εκφύτων φύλλου αμπελιού επάγοντας την καλλογένεση ορμονικά, έγινε συσχετισμός της διακύμανσης των ενδογενών πολυαμινών με τα μορφογενετικά φαινόμενα που παρατηρήθηκαν.



Εικόνα 1. Στάδια αναγέννησης φυτού από πρωτοπλάστες. Τα βέλη α, β και γ, δείχνουν τα πιθανά σημεία που εκφράζεται η δυσκολία στην αναγέννηση των φυτών (Από Roubelakis-Angelakis, 1993).

ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ, ΓΕΝΙΚΑ

A: ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ

Η διαμίνη Put και οι πολυαμίνες Spd και Spm είναι διαδομένες σε ζώα, φυτά, και μικροοργανισμούς και συμμετέχουν σε πολλές λειτουργίες. Όπως αναφέρουν οι Cohen (1971) και Bachrach (1973), η πρώτη αναφορά στις πολυαμίνες έγινε το 1678, όταν ο Leeuwenhoeck, Ολλανδός έμπορος αλλά και κατασκευαστής μικροσκοπίων, παρατήρησε την παρουσία φωσφορικών κρυστάλλων σε παρασκεύασμα ανθρώπινου σπέρματος. Δύο αιώνες αργότερα, το βασικό συστατικό των κρυστάλλων αυτών ονομάστηκε σπερμίνη, ενώ η χημική σύσταση και δομή της προσδιορίστηκε το 1920. Την ίδια εποχή περίπου, ανακαλύφθηκε και ονομάστηκε η σπερμιδίνη. Η πουτρεσίνη απομονώθηκε το 1879 και συντέθηκε επτά χρόνια αργότερα (Morgan, 1967, Walters, 1967).

Με τις πολυαμίνες συνέχισαν να ασχολούνται κύρια οι χημικοί, για τον επόμενο μισό περίπου αιώνα, όταν το βιβλίο του Cohen κατεύθυνε την προσοχή των ερευνητών στην πιθανή βιολογική σημασία αυτών των ενώσεων και έδωσε ερεθίσματα για έρευνα σε πολλές περιοχές συμπεριλαμβανομένης της Φυσιολογίας των φυτών. Ανάμεσα στις προκλητικές του γενικεύσεις ήταν η παρατήρηση, ότι η μοντέρνα βιοχημεία έχει σχέση κύρια με τα ανιόντα και έχει την τάση να αδιαφορεί για τα κατιόντα, των οποίων οι πολυαμίνες είναι από τους σημαντικότερους αντιπροσώπους για το κύτταρο.

Ο ρόλος των πολυαμινών στη φυσιολογία και βιοχημεία των φυτών έχει μελετηθεί σε λίγα μόνο εργαστήρια. Στο εργαστήριο του

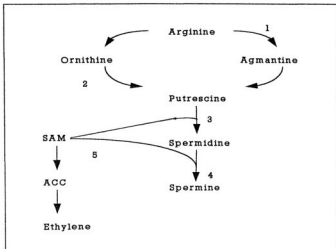
ερευνητικού σταθμού Long Ashton του Πανεπιστημίου του Bristol, για πρώτη φορά το 1960, άρχισε η έρευνα για τις πολυαμίνες στην βιοχημεία φυτών από τον Terrence Smith. Το 1973 ο Nello Bagni και η σύζυγος του Donatella Serafini-Fracassini, από το Πανεπιστήμιο της Bologna, ήταν οι πρώτοι, που πρότειναν, ότι οι πολυαμίνες έχουν ρυθμιστική δράση στα φυτά. Οι Brenneman and Galston (1975) θεώρησαν δεδομένη τη συμμετοχή των PAs στην αναγέννηση των πρωτοπλαστών, υποστηρίζοντας ότι ο γηρασμός των πρωτοπλαστών παρεμποδίζει την αναγέννηση τους.

B: ENZYMA ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ

Πρόδρομες ουσίες των πολυαμινών είναι τρία βασικά αμινοξέα, η αργινίνη και η λυσίνη, που προσφέρουν το κύριο μέρος του ανθρακικού σκελετού των πολυαμινών, ενώ η μεθειονίνη συνεισφέρει προφυλάμινο-ομάδες στη διαμίνη Put για να σχηματίσει την τριαμίνη Spd και την τετρααμίνη Spm. Η cadaverine προκύπτει από την αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης μέσω ενός ανεξάρτητου μονοπατιού (Galston, 1983).

Στα ζώα και τους μικροοργανισμούς συναντάται μόνο το βιοσυνθετικό μονοπάτι της ODC (Cohen 1971), ενώ στα φυτά συναντάται και η ADC και κάθε βιοσυνθετική οδός επικρατεί σε ένα συγκεκριμένο είδος ή αναπτυξιακή δραστηριότητα (Smith 1977). Η αργινίνη και η ορνιθίνη είναι από μόνα τους μεταβολικά αλληλομετατρέψιμα στον κύκλο της ουρίας, όπου η αργινάση μετατρέπει την αργινίνη σε ορνιθίνη, αλλά και η ορνιθίνη μέσω άλλου μονοπατιού δίνει κιτρολίνη και αργινίνη (Galston, 1983, Roubelakis and Kliewer 1978α,β,γ).

Λίγα είναι γνωστά για την ODC στα ανώτερα φυτά. Το μοριακό



Εικόνα 2. Σύνθεση πολυαμιμών από την ορνιθίνη την αργινίνη και τη μεθειονίνη. 1. ADC, 2. ODC, 3. Spd Synthase, 4. Spm Synthase, 5. SAMDC (από Evans and Malberg, 1969)

βάρους, μερικά καθαρισμένης ODC από καπνό ήταν 107 kD, ενώ απαιτούσε την παρουσία φωσφορικής πυριδοξάλης καθώς και διθειοτριτόλης, που σημαίνει ότι υπάρχει μεγάλος αριθμός κυστεινών στο μόριο και γενικά παρουσιάζει όμοια χαρακτηριστικά με το ένζυμο των θηλαστικών (Heimer and Mizrahi, 1982). Εξωγενής Put ή Spd παρεμποδίζει την ενεργότητα του ενζύμου επάγοντας την σύνθεση ενός πρωτεϊνικού αναστολέα (antizyme), μηχανισμός που παρατηρείται και στα θηλαστικά (Canellakis *et al*, 1985, Heller *et al*, 1978, Koop *et al*, 1985, Tsirka *et al*, 1986).

Σε σπορόφυτα κριθαριού που αναπτύχθηκαν παρουσία GA_3 και ακτινομυκίνης D, το 75% της ενεργότητας της ODC συνδεόταν με την χρωματίνη και το υπόλοιπο 25% βρισκόταν στο κυττόπλασμα. Στον καπνό φαίνεται να υπάρχει παρόμοιος υποκυτταρικός εντοπισμός της ODC. Στα θηλαστικά υπάρχει περισσότερη πληροφορία για την ODC. Είναι ομοδιμερής πρωτεΐνη με MB κάθε υπομονάδας 51 kD (461 αμινοξέα). Κάθε υπομονάδα έχει 12 κυστείνες και δύο PEST περιοχές (χαρακτηριστικές πρωτεϊνών με βραχύ χρόνο ημιζωής), που συμφωνεί με τον υψηλό ρυθμό turnover του ενζύμου, που μπορεί να είναι και 5min. Η αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου παρουσιάζει ομολογία ανάμεσα στον ποντικό, αρουραίο και άνθρωπο μεγαλύτερη από 90%.

Οι ΡΑς δρουν αρνητικά στην σύνθεση του ενζύμου και η ρύθμιση εντοπίζεται στο επίπεδο της μετάφρασης ή μετα-μεταφραστικά. Το γονίδιο της ODC φέρει 11 ιντρόνια και στο 5' άκρο από το σημείο έναρξης της μεταγραφής βρίσκονται διάφοροι προαγωγείς και ενισχυτές: ένα TATA πλαίσιο, ένα CAAT πλαίσιο, ένα GC πλαίσιο, αλληλουχίες cAMP responsive element και μερικές θέσεις πρόδεσης του μεταγραφικού παράγοντα SPL. Η περιοχή του προαγωγέα της ODC του ποντικού είναι μεταγραφικά λίγο ισχυρότερη από τον προαγωγέα του SV40. Το mRNA της ODC ανήκει στη μικρή εκείνη κατηγορία mRNA των θηλαστικών που περιέχουν αλληλουχίες μακρύτερες των 200 νουκλεοτιδίων πριν την αρχή του ORF. Στα mRNA της ODC του ποντικού, αρουραίου και ανθρώπου οι αλληλουχίες αυτές είναι περίπου 300 νουκλεοτιδία και τόσο πλούσιες σε G και C, που είναι πιθανόν να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές με υψηλή ενέργεια σταθεροποίησης (Heby and Persson, 1990 McConlogue *et al.* 1984, Seely *et al.* 1982, Tabor

and Tabor, 1984).

Η ADC στα φυτά εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυττόπλασμα. Έχει καθαριστεί και χαρακτηριστεί στα λαθούρι, ρύζι και βρώμη. Στο *Lathyrus* το ένζυμο φαίνεται να είναι ομοεξαμερές με MB 220 kD και απαιτεί την παρουσία φωσφορικής πυριδοξάλης και διθειοτριτόλης για την επίδειξη ενεργότητας. Η ADC από το ρύζι παρουσιάζεται ομοδιμερές με MB 174 kD και επίσης απαιτεί την παρουσία φωσφορικής πυριδοξάλης και διθειοτριτόλης. Στην βρώμη το ένζυμο έχει βρεθεί να είναι ομοεξαμερές με MB υπομονάδας 39 kD (Smith, 1985). Η πρόσφατη απομόνωση ενός cDNA κλώνου που κωδικοποιεί την ADC από τη βρώμη έδειξε ότι το προϊόν του mRNA είναι ένα πεπτιδίο 66kD που ύστερα από μετα-μεταφραστική επεξεργασία δίνει ένα πεπτιδίο 24 kD (Bell and Malberg, 1990). Ο χρόνος ημιζωής της ADC στα φυτά είναι μισή έως τέσσερις ώρες (Smith, 1985). Η κλωνοποίηση του γονιδίου της ADC από τομάτα (*Lycopersicon esculentum* Mill) έδειξε ότι κωδικοποιεί ένα πολυπεπτιδίο με 502 αμινοξέα και έχει MB 55kD. Η αμινοξική αλληλουχία παρουσιάζει 47 και 38% ομολογία με την βρώμη και την *E. coli* αντίστοιχα (Rastogi *et al.* 1993).

Η μεθειονίνη συνεισφέρει στη βιοσύνθεση των πολυαμινών μέσω της S-adenosylmethionine (SAM), ενώ τα βακτήρια και τα φυτά μπορούν να παράγουν Spd μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου της μεθειονίνης. Η SAM είναι επίσης η πρόδρομη ουσία της φυτικής ορμόνης αιθυλένιο, μέσω του ενδιάμεσου σχηματισμού l-aminocyclopropane carboxylic acid (ACC). Επειδή το αιθυλένιο θεωρείται ότι διεγείρει το γηρασμό, ενώ οι πολυαμίνες τον αναστέλλουν, η τύχη της SAM φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο για τα φυτά (Adams and Yang, 1979, Galston, 1983, Kaur-

Sawhney and Galston, 1979).

Ο καταβολισμός των ΡΑΣ στα φυτά γίνεται από δύο οξειδάσες, την οξειδάση των διαμινών (DAO: EC 1.4.3.6) και την οξειδάση των πολυαμινών (PAO: EC 1.5.3.3) (Slocum *et al.* 1984, Smith, 1985). Και τα δύο ένζυμα έχουν ενηπαστεί στο κυτταρικό τοίχωμα κυτταρων που έχουν έντονα λιγνιτοποιημένα τοιχώματα (Slocum and Furey, 1991). Η DAO καταλύει την αντίδραση μετατροπής της Put και Cad σε πυρρολίνη, αμμωνία και H_2O_2 ενώ η PAO καταλύει την μετατροπή των Spd και Spm σε 1,3-διαμινοπροπάνιο, πυρρολίνη και H_2O_2 για την Spd και 1-(3-αμινοπροπυλ)-πυρρολίνη, 1,3-διάμινο-προπάνιο και H_2O_2 για την Spm. Στα θηλαστικά η Put όταν οξειδωθεί δίνει NH_3 , H_2O_2 4-αμινοβουτανάλδευδη, η Spd δίνει Put, H_2O_2 και 3-αμινοπροπανάλδευδη και η Spm δίνει Spd, H_2O_2 και 3-αμινοπροπανάλδευδη (Heby, 1981).

Γ: ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ

Στα φυτά, οι πολυαμίνες υπάρχουν σε ελεύθερη και σε δεσμευμένη μορφή. Οι δεσμευμένες πολυαμίνες έχουν συνδεθεί σε διάφορους φαινολικούς δευτερογενείς μεταβολίτες και μπορεί να έχουν εξ ίσου σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών, όπως οι ελεύθερες πολυαμίνες (Evans and Malberg, 1989).

In vitro πειράματα έδειξαν ότι οι πολυαμίνες έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με πολυανιόντα, ιδιαίτερα με φωσφορικά κατάλοιπα σε νουκλειικά οξέα και μεμβράνες (Chapel *et al.* 1984, Grimes *et al.* 1986, Srivastava and Smith 1982). Αυτή η ιδιότητα θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση του ρυθμού μεταγραφής και σε σταθεροποίηση μεμβρανών.

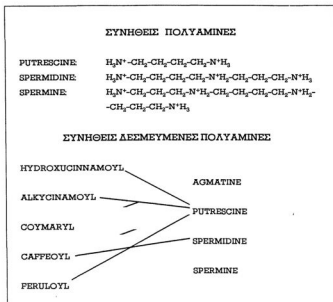


Εικόνα 3. Φυσιολογικά φαινόμενα των φυτών, που οι πολυαμίνες συμμετέχουν ως ρυθμιστές αύξησης

εξηγώντας έτσι την αύξηση, που προκαλούν σε πολλά συστήματα, που προέρχονται από ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς. Η σχέση ανάμεσα στο ρυθμό αύξησης και τη σύνθεση πολυαμινών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, αυτές έχουν σχέση με τη διαδικασία αύξησης. Η διέγερση της αύξησης από τις πολυαμίνες ίσως υποδεικνύει, ότι μπορεί ακόμα και να ρυθμίζουν την αύξηση *in vivo* (Galston, 1983, Slocum *et al.* 1984 Smith, 1985).

Οι πολυαμίνες συνδέονται σε ενδογενή υποστρώματα μέσω ενζυμικής αντίδρασης, η οποία δείχνει ομοιότητες με την τρανσγλουταμινάση, που ανιχνεύτηκε στα ζωικά κύτταρα, παρουσιάζει όμως και κάποια διαφορετικά χαρακτηριστικά από αυτήν, ενώ πρόσφατα εντοπίστηκε σε φωτοδεσμωτικό σύμπλοκο απομονωμένων χλωροπλαστών

(Del Duca et al. 1994, Serafini-Fracassini *et al.* 1988, Signorini *et al.* 1991).



Εικόνα 4. Πολυαμίνες και δεσμευμένες πολυαμίνες, που συναντώνται συνήθως (από Evans and Malberg, 1989).

II. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ

A: ΓΕΝΙΚΑ

Ο ρόλος των πολυαμινών για ορισμένους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς έχει αποδειχθεί. Για παράδειγμα, ο

Haemophilus parainfluenzae δεν αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο, χωρίς την παρουσία Put, Spd ή Sprn. Στην *E. coli* και *S. cerevisiae* είναι δυνατές μια σειρά από μοναδικές γονιδιακές μεταλλαγές, που αφορούν τη βιοσυνθετική αλυσίδα των πολυαμινών (Tabor and Tabor, 1984). Στην *E. coli* ένα μεταλλαγμένο στέλεχος, που απαιτεί πολυαμίνες, παρουσιάζει βλάβη σε μια ριβοσωμική πρωτεΐνη, που επιδιορθώνεται με την προσθήκη πολυαμίνης. Στο *Saccharomyces* που η Put προέρχεται μόνο από τη δράση της ODC, πολλά στελέχη με μεταλλαγές στη γονιδιακή περιοχή της ODC, αναπτύσσονται μόνο αν προστεθούν πολυαμίνες. Επίσης, μεταλλαγμένα στελέχη, που δεν είναι ικανά να μετατρέψουν την Put σε μια από τις ανώτερες πολυαμίνες, Spd και Sprn, δεν έχουν ικανότητα παραγωγής σπορίων. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι πολυαμίνες, είναι όχι μόνο απαραίτητες για την ανάπτυξη του οργανισμού αυτού, αλλά ότι κάτω από κατάλληλες συνθήκες, ειδικές πολυαμίνες μπορεί να ελέγχουν ειδικές μορφογενετικές λειτουργίες (Galston and Sawhney, 1990).

Δεν έχουν αναφερθεί παραδείγματα, που να δείχνουν την αναγκαιότητα ύπαρξης των πολυαμινών στα φυτά ή στα ζώα αλλά συμπεράσματα σχετικά με την αναγκαιότητα τους για ιδιαίτερες λειτουργίες προκύπτουν έμμεσα, από τη χρήση ειδικών αναστολέων για την ODC και ADC, αντίστοιχα. Αν το υδρογόνο στο α-άτομο άνθρακα, της αργινίνης ή της ορνιθίνης, αντικατασταθεί από μια διφθορομεθυλομάδα, οι ενώσεις που θα προκύψουν, DFMA και DFMO συνδέονται αντιστρεπτά στην ενεργή περιοχή της ODC και ADC, αντίστοιχα, εμποδίζοντας έτσι την ενζυμική τους δραστηριότητα. Χρησιμοποίηση του ενός ή και των δύο ή και άλλων λιγότερο ειδικών αναστολέων, έχει ως αποτέλεσμα τη

μείωση της συγκέντρωσης μιας ή και περισσότερων πολυαμινών στα κύτταρα. Αν η χρήση του αναστολέα αυτού αναστέλλει και κυτταρική λειτουργία, και αν αυτή είναι αντιστρεπτή με την εφαρμογή κάποιας πολυαμίνης, τότε είναι λογικό να βγει το συμπέρασμα ότι οι πολυαμίνες συμμετέχουν σε αυτήν την κυτταρική διαδικασία. Με τη χρήση τέτοιων έμμεσων τεχνικών έχει αποδειχθεί, ότι οι πολυαμίνες είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση της κυτταροδιαίρεσης σε μερικά ζωικά και ανώτερα φυτικά κύτταρα (Bachrach and Heimer, 1989, Kallio *et al.* 1981).

Η διαμίνη Put και η τριαμίνη Spd έχουν βρεθεί σ' όλα τα κύτταρα (Cohen, 1971, Bachrach, 1973). Το γεγονός αυτό ανάγκασε τους βιοχημικούς να δείξουν ενδιαφέρον, γιατί μόρια, που τόσο αυστηρά διατηρήθηκαν κατά την εξέλιξη, είναι πολύ πιθανόν να συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Μια άλλη συνήθης πολυαμίνη, η τετρααμίνη Spm, σχηματίζεται μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα αν και μερικά θερμοφιλα βακτήρια συνθέτουν άλλες τετρααμίνες ή και πεντααμίνες (Oshima, 1983). Η Spm έχει αναφερθεί ότι συγκεντρώνεται στους πυρήνες και πιθανολογείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση του DNA στην χρωματίνη (Sakai and Cohen, 1976).

Σης τελευταίες δεκαετίες έχει εκδηλωθεί έντονο ενδιαφέρον για τον πιθανό ρόλο των πολυαμινών στην ιατρική (Gaugas, 1980), επειδή ασθενείς με όγκους με μεταστατική ικανότητα βρέθηκε να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες πολυαμινών με τη μορφή ακετυλιωμένης Put, πιθανά προϊόν αποτοξίνωσης (Rosenblum, 1980). Είναι επίσης γνωστό ότι το αναγεννώμενο ουκώτι παράγει μεγάλες ποσότητες πολυαμινών, μέσω της δράσης του ενζύμου ODC. Η ODC επάγεται από μερική πλατεκτομή, από ορμόνες όπως η τεστοστερόνη και η οιστραδιόλη και από καρκινογένεση.

Ετσι επικρατεί η άποψη ότι η βιοσύνθεση πολυαμινών πρέπει να γίνεται συγχρόνως με τη βιοσύνθεση νουκλεϊκών οξέων, όταν συμπληρώνεται ο μιτωτικός κύκλος. Αυτή η άποψη ενισχύεται από το γεγονός ότι η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης πολυαμινών με κατάλληλους αναστολείς σταματά τα κύτταρα στη G₁ φάση του κυτταρικού κύκλου. Η μεγάλη αύξηση στον μεταβολισμό των πολυαμινών σε γρήγορα διαιρούμενα κύτταρα έχει επίσης αναφερθεί σε μικροοργανισμούς (Cohen, 1971). Οι Canellakis *et al* (1985) προτείνουν ότι η δραστηριοποίηση της ODC και της βιοσύνθεσης πολυαμινών συμβαίνει όταν υπάρχουν οι προϋποθέσεις για πρωτεϊνοσύνθεση, κυτταρική διαίρεση και αύξηση.

B: ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Οι πολυαμίνες έχουν βρεθεί στα χυμοτόμα, στο κυτόπλασμα των φυτικών κυττάρων (αλλά και σε μια σειρά απομονωμένων φωτοσυνθετικών υποσυμπλόκων από χλωροπλάστες σπανακιού (Kotsabasis *et al*, 1993a). Τα ενδογενή τους επίπεδα είναι ψηλά σε νεαρούς αυξανόμενους ιστούς και μειώνονται με την ηλικία (Bagni *et al*, 1981, Kaur-Sawhney *et al*, 1982, Palavan and Galston 1982). Υπάρχει η άποψη ότι μπορεί να αποτελούν μια νέα ομάδα φυτοορμονών (Galston and Kaur-Sawhney, 1988). Προωθούν την αύξηση και έχουν καθαρά φυσιολογικά και αναπτυξιακά αποτελέσματα, έτσι ώστε να θεωρηθούν μέλη μιας ασαφώς καθορισμένης ομάδας, των ρυθμιστών αύξησης. Συνδέονται με την κυτταροδιαίρεση και το μεταβολισμό, την σωματική εμβρυογένεση, την ανάπτυξη εμβρύου, τη διαφοροποίηση και σχημασμό οφθαλμών σε καλλιέργειες λεπτής στοιβάδας κυττάρων καπνού, καθώς επίσης την καλλογένεση και την ριζογένεση (Bagni *et al* 1982, Biondi *et al* 1990,

Burtin *et al* 1990, Desai and Metha, 1985, Friedman *et al* 1985, Kaur-Sawhney *et al* 1990, Martin-Tanguy *et al* 1988, Meijer *et al* 1988, Nielsen, 1990, Torrigiani *et al* 1987).

Ψηλές συγκεντρώσεις πολυαμινών σχετίζονται με ταχύτητα αυξανόμενους ιστούς και έχει παρατηρηθεί συσώρευση ψηλών τίτλων κατά τη διάρκεια αύξησης επαγόμενης από ορμόνες. Αναστολείς, που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση των πολυαμινών, αναστέλλουν επίσης την αύξηση, που προωθούν οι ορμόνες. Σε μερικές περιπτώσεις αυτές οι επιδράσεις μπορούν να ανασταλούν με την εφαρμογή πολυαμινών. Σε αιωρούμενες καλλιέργειες από φύλλα καρύδας, η κύτταροδιαίρεση αυξήθηκε από την παρουσία Spd, ενώ πολυαμιίνες προώθησαν την αύξηση εμβρύων *Cicer arietum* σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 1mM. Με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε αναστολή (Biondi *et al* 1990).

Η ικανότητα της Put και των πολυαμινών να επιδρούν στην διαφοροποίηση έχει σημαντικό ενδιαφέρον. Η εφαρμογή Put και Spd σε καλλιέργειες ιστών από φύλλα μπλιάς και κύτταρα σέλινου προκάλεσε αναγέννηση και γρήγορη διαφοροποίηση σε φυτάρια, αντίστοιχα. Τυχαία αύξηση ριζών στο φασόλι ενισχύθηκε από την εφαρμογή πολυαμινών. Σε πρωτοπλάστες από φύλλα βρώμης βρέθηκε, ότι οι πολυαμιίνες προκαλούν την σύνθεση DNA και την έναρξη μιτωτικής δραστηριότητας, όπως είχε ήδη βρεθεί σε πολλά ζωικά και μικροβιακά κύτταρα (Kaur-Sawhney *et al* 1980). Ενώ υπάρχουν ενδείξεις για τη ρύθμιση των παραπάνω διαδικασιών από τις πολυαμιίνες, δεν υπάρχει καμιά πληροφορία για δυνατότητα πολικής μετακίνησης και επομένως δεν μπορούν να ταξινομηθούν ως ορμόνες (Rabiti *et al* 1989). Τα αποτελέσματα αυτά

οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι πολυαμίνες είναι σημαντικοί παράγοντες αύξησης σε φυτά και ότι μπορεί να είναι μεσολαβητές σε ορμονικές λειτουργίες.

Υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις συγκεντρώσεις των πολυαμινών σε διάφορα φυτικά είδη και σε διαφορετικά μέρη του ίδιου φυτού (Felix and Harr, 1987).

Γ: ΑΝΑΓΕΝΝΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΜΗ ΑΝΑΓΕΝΝΟΜΕΝΑ ΦΥΤΙΚΑ ΕΙΔΗ

Απομονωμένα φυτικά κύτταρα και πρωτοπλάστες σε καλλιέργεια συνθήως έχουν μικρότερης χρονικής διάρκειας ζωή από όμοια κύτταρα σε άθικτο φυτό και τείνουν να γεράσουν γρήγορα (Altman *et al* 1977, Kaur-Sawhney *et al* 1980, Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis, 1989, 1990). Ετσι σήμερα θεωρείται ότι υπάρχουν δυο κατηγορίες φυτών, που ταξινομούνται ανάλογα με την ικανότητα τους να διαφοροποιούνται *in vitro* σε νέες δομές, τα αναγεννώμενα φυτικά είδη και αυτά, που δεν αναγεννώνται εύκολα ή καθόλου.

Το ενδιαφέρον των Φυτο-φυσιολόγων από την αρχή είχε εντοπιστεί στην αναγέννηση ολόκληρων φυτών από μεμονωμένα κύτταρα ή πρωτοπλάστες και είχαν εσπαστεί περισσότερο στις δυο πιο σημαντικές, οικονομικά, ομάδες φυτών τα σιτηρά και τα λαχανικά. Σήμερα, ενώ πρωτοπλάστες από μέλη των *Leguminosae* αλλά και άλλων οικογενειών, για παράδειγμα, το σπαράγγι, το γογγύλι, το καρότο, η πετούνια, και ο καπνός έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν κυτταρικό τοίχωμα, να υποστούν κυτταρική διαίρεση και ακόμα να αναγεννήσουν ολόκληρα φυτά, από τα σιτηρά μόνο το *Pennisetum americanum* έγινε δυνατό να δώσει νέα φυτά προερχόμενα από πρωτοπλάστες, που απομονώθηκαν

από αιωρούμενες καλλιέργειες κυτάρων εμβρυικής προέλευσης (Tiburcio *et al* 1986a,b, Vasil and Vasil 1980).

Η απειθαρχία των πρωτοπλαστών μπορεί να εκφραστεί σε τρία σημεία: α) λίγο μετά την απομόνωση, όταν οι απειθαρχοί πρωτοπλάστες έχουν μικρούς ρυθμούς βιωσιμότητας και πεθαίνουν πριν γίνει η ανασύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, β) οι απειθαρχοί πρωτοπλάστες δείχνουν μεγάλους ρυθμούς βιωσιμότητας, ανασυνθέτουν το κυτταρικό τοίχωμα αλλά είτε δεν διαιρούνται ή έχουν χαμηλή απόδοση (plating efficiencies) και γ) οι πρωτοπλάστες ή σταματούν να πολλαπλασιάζονται ή δεν παρουσιάζουν μορφογενετική ικανότητα (Εικ. 1) (Roubelakis-Angelakis 1993).

Μελέτες, που έχουν στόχο την ανακάλυψη των πιθανών παραγόντων, που συντελούν στην απειθαρχία μπορεί να έχουν ως αντικείμενο τους είτε πρωτοπλάστες κατά τις πρώτες μέρες μετά την απομόνωση ή κάλλους οι οποίοι προέρχονται από πρωτοπλάστες και δεν έχουν μορφογενετική δυνατότητα (Roubelakis-Angelakis 1993). Στην Εικόνα 5, παρουσιάζονται οι πιθανοί παράγοντες που εμποδίζουν την αναγέννηση των πρωτοπλαστών. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει παράγοντες που αφορούν το φυτό δότη και τη διαδικασία απομόνωσης και η δεύτερη περιλαμβάνει μοριακές, φυσιολογικές και βιοχημικές παραμέτρους κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών.

Το αμπέλι ανήκει στην οικογένεια *Vitaceae* και το γένος *Vitis* περιλαμβάνει δυο υπογένη, το *Euvitis* και *Muscadinia*. Τα πιο σπουδαία εμπορικά είδη του *Euvitis* είναι τα είδη *vinifera riparia* και *rupestris*. Όλες οι ποικιλίες που καλλιεργούνται για τον καρπό τους, όπως η

Σουλτανίνα, ανήκουν στο είδος *vinifera* ενώ όλα τα ανθεκτικά σε παθογόνα και περιβαλλοντικό στρες είναι κλώνοι ή ενδοειδικά υβρίδια. Το αμπέλι ανήκει στην κατηγορία των φυτών που δύσκολα αναγεννώνται *in vitro*. Η αναγέννηση και ο μικροπολλαπλασιασμός του έχει ήδη επιτευχθεί από διαφορετικά μέρη του φυτού, όπως τεμαχισμένο ακραίο μερίσιωμα, μεσογονάτιο τμήμα, φύλλα και κοτυληδόνες (Vilariana *et al*, 1989, Roubelakis and Zivanovita, 1991, Stamp *et al* 1990 αβ). Αντίθετα ο καπνός είναι φυτό εύκολα αναγεννώμενο ακόμη και από πρωτοπλάστη.



Εικόνα 5. Πιθανοί παράγοντες που συμβάλλουν στην απειθαρχία των φυτών σε αναγέννηση (από Roubelakis-Angelakis, 1993).

Η εργασία αυτή περιλαμβάνει τις παρακάτω ενότητες:

1. Ενδογενείς πολυαμίνες σε φύλλα και πρωτοπλάστες από in vitro φυτά αμπελιού (Vitis vinifera L. cv Sultanina) και σπορόφυτα καπνού (Nicotiana tabaccum L. cv Xanthi).

2. Χαρακτηριστικά πρόσληψης σημασμένων πολυαμινών από πρωτοπλάστες αμπελιού (Vitis vinifera L. cv Sultanina) και καπνού (Nicotiana tabaccum L. cv Xanthi).

3. Ενδογενείς πολυαμίνες κατά τη διάρκεια καλλιέργειας πρωτοπλάστων αμπελιού (Vitis vinifera L. cv Sultanina) και καπνού (Nicotiana tabaccum L. cv Xanthi) και μεταβολική τύχη ραδιενεργά σημασμένης πουτρεσίνης.

4. Πολυαμίνες και τα βιοσυνθετικά τους ένζυμα, αποκαρβοξυλάση της αργινίνης και της ορνιθίνης κατά τη διάρκεια καλλογένεσης σε έκφυτα φύλλων αμπελιού (Vitis vinifera L. cv Sultanina).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

*ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ ΣΕ ΦΥΛΛΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ
ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΕΣ ΑΠΟ IN VITRO ΦΥΤΑ ΑΜΠΕΛΙΟΥ ΚΑΙ
ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΚΑΠΝΟΥ.*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα επίπεδα και η κατανομή των ενδογενών πολυαμινών, προσδιορίστηκαν σε φύλλα διαφορετικής ηλικίας κατά μήκος του βλαστού από *in vitro* φυτά αμπελιού (*Vitis Vinifera* L. cv Sultanina) και σπορόφυτα καπνού (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi). Επίσης, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ενδογενών πολυαμινών σε πρωτοπλάστες που προήλθαν από τα παραπάνω φυτά. Για τον προσδιορισμό των πολυαμινών χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά κολώνα στενού διαμετρήματος C-18 21x200mm σε χρωματογράφο υψηλής πίεσης, ενώ το εκχύλισμα των πολυαμινών, όταν επαναδιαλύθηκε σε 63% διάλυμα μεθανόλης, έδωσε τις πιο ψηλές και λεπτές κορυφές στην HPLC κατανομή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις πολυαμινών βρέθηκαν στα νεαρότερα φύλλα και για τα τρία κλάσματα S, SH και PH και για μεν τον καπνό βρέθηκαν να είναι μέχρι και 10 φορές μεγαλύτερες, από το φύλλα της βάσης του φυτού, για δε το αμπέλι έως 5 φορές, αντίστοιχα. Η ολική Put στα φύλλα καπνού αποτελεί το 40% των ολικών PAs ενώ στα φύλλα αμπελιού το 10%. Διαφορά παρουσίασε και η ποσοστιαία συμμετοχή των δύο διαλυτών κλασμάτων S και SH στους πρωτοπλάστες των δύο φυτικών ειδών. Στους πρωτοπλάστες καπνού ήταν 42% και 46% ενώ στους πρωτοπλάστες αμπελιού 60% και 27% τα κλάσματα S και SH αντίστοιχα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πολυαμίνες σχετίζονται με διάφορα φυσιολογικά φαινόμενα στα φυτά όπως η αύξηση, η κυτταροδιαίρεση και ο γηρασμός (Altman *et al* 1982, Huntinen *et al* 1982). Λόγω της μεταβολικής σχέσης ανάμεσα στις

πολυαμίνες και το αιθυλένιο μέσω της προπυλαμινικής ομάδας της SAM (S-adenosylmethionine), έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στην σχέση των πολυαμινών με την ηλικία. Εξωγενής εφαρμογή PAs καθυστερεί το γηρασμό και η μείωση της συγκέντρωσης τους είναι ένα σημαντικό πρώτο βήμα στην έναρξη του γηρασμού (Evans and Malberg, 1989).

Μελέτες που έγιναν το 1975 από τους Smith and Wiltshire έδειξαν, ότι τα επίπεδα των πολυαμινών σε πολλούς φυτικούς ιστούς σχετίζονται με την ηλικία τους και το στάδιο ανάπτυξης. Όμως, οι πολυαμίνες και ο μεταβολισμός, σε σχέση με το γηρασμό, είχαν μελετηθεί πολύ λίγο μέχρι το 1982. Οι Altman and Bachrach (1981) πρώτοι, είπαν ότι η αύξηση της ηλικίας σχετίζεται με πτώση στα επίπεδα Put και άλλων PAs, σε ολόκληρα φύλλα, που γηράσκουν, και σε τεμαχισμένα. Οι Kaur-Sawhney *et al* (1982) έδειξαν ότι η ενεργότητα της ADC και ODC, που είναι τα βιοσυνθετικά ένζυμα της Put, μειώνονται σταδιακά σε αποκομμένα φύλλα, που μένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο σκοτάδι. Επίσης, οι συγκεντρώσεις των ενδογενών Put, Spd και Spm ήταν υψηλές σε νεαρά φύλλα και αναπτυσσόμενους φυτικούς ιστούς και μειώθηκαν με την αύξηση της ηλικίας (Bagni *et al*, 1981, Galston and Sawhney 1987, Kaur-Sawhney *et al* 1982, Palavan and Galston 1982), ενώ ο ρυθμός της μείωσης των επιπέδων των πολυαμινών ήταν ίδιος με το ρυθμό εμφάνισης των συμπτωμάτων του γηρασμού (Galston and Sawhney 1990).

Μέχρι τώρα έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές τεχνικές για την ανάλυση των πολυαμινών σε εκχυλίσματα ιστών. Χρωματογραφικές τεχνικές που περιλαμβάνουν χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έχουν χρησιμοποιηθεί για να διαχωρίσουν χρωματικά ή φθορίζοντα παράγωγα των πολυαμινών (Smith and Davies, 1985). Η πιο διαδεδομένη αναλυτική μέθοδος για τις πολυαμίνες περιλαμβάνει το διαχωρισμό τους με χρωματογραφία λεπτής

στοιβάδας μετά από τη δημιουργία παραγώγων με dansyl chloride (1-dimethylamino-naphthalene-5-sulfonyl chloride) (βλ. κεφ. 4). Οι dansylated πολυαμίνες φθορίζουν ισχυρά και είναι ανιχνεύσιμες σε μικρές ποσότητες. Παράγωγα επίσης μπορούν να δημιουργηθούν με το benzoyl-chloride. Το κύριο πλεονέκτημα των Dns-Cl παραγώγων έναντι των βενζυλιωμένων παραγώγων, είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία λόγω της χρήσης ανιχνευτή φθορισμού αντί για UV-ανιχνευτή για τα παράγωγα της βενζυλίωσης, ενώ παρουσιάζει μειονεκτήματα επειδή αντιδρά με αμινοομάδες διαφόρων ενώσεων, με φαινόλες, μερικές αλκοόλες και υδρογονάνθρακες και επίσης δημιουργεί πλευρικά παράγωγα (side products) αντιδρώντας με τον εαυτό του, όπως dansyl-dimethylamine και άλλα προϊόντα. Από αυτή την άποψη, το benzoyl chloride πλεονεκτεί, διότι έχει μικρό αριθμό πλευρικών παραγώγων της αντίδρασης βενζυλίωσης και επιτρέπει την εφαρμογή μικρών προγραμμάτων έκλουσης σε χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).

Στο κεφάλαιο αυτό, περιγράφεται μια τροποποιημένη μέθοδος με την χρήση HPLC για τον διαχωρισμό και την ποσοτική εκτίμηση των βενζυλιωμένων πολυαμινών σε όλα τα κλάσματα (S, SH, PH) από φυτικά εκχυλίσματα με την χρήση C-18 στενού διαμετρήματος 21 x 200 mm, στήλης με 5μm μέγεθος σωματιδίων (Hypersil) για την ανάλυση των PA και καμπύλες για την ποσοτική εκτίμηση (Kotzabasis *et al*, 1993a). Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 5-10 φορές μεγαλύτερη και απαιτεί περίπου 80% λιγότερους διαλύτες σε σύγκριση με τις προϋπάρχουσες HPLC μεθόδους.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κατανομής και των επιπέδων των PAs σε φύλλα διαφορετικής ηλικίας κατά μήκος του βλαστού δύο φυτικών ειδών, του αμπελιού και του καπνού, ενώ προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ενδογενών

πολυαμινών και σε πρωτοπλάστες, που προήλθαν από τα παραπάνω φυτά, προκειμένου να συσχετισθούν με την αναγεννητική ικανότητα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Φυτικό Υλικό: *In vitro* φυτά αμπελιού (*Vitis Vinifera* L. cv Sultanina), που προήλθαν από κόμβους φυτών απαλλαγμένων από ιώσεις και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς ορμόνες για δύο μήνες, όπως έχει ήδη περιγραφεί (Roubelakis-Angelakis and Zivanovita, 1991), και σπορόφυτα καπνού (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi), που αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο κάτω από ρυθμιζόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των πολυαμινών σε φύλλα διαφόρων ηλικιών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν φύλλα τριών διαφορετικών ηλικιών, που αντιστοιχούν σε α: ώριμα, στα πρώτα στάδια γήρασμού, το φύλλο από τη βάση του φυτού) β: νεαρά φύλλα πλήρως εκπτυγμένα, όπου δεν υπάρχει μεριστωματική δραστηριότητα (5ο ή 6ο φύλλο) και γ: νεαρά φύλλα όπου υπάρχει μεριστωματική δραστηριότητα. Για τα πειράματα, που αφορούν την τροποποιημένη μέθοδο μέτρησης των πολυαμινών, χρησιμοποιήθηκαν φύλλα πλήρως αναπτυγμένα από φύλλα αμπελιού *Vitis champignoi* L. cv Dogridge παράλληλα με τη Σουλτανίνα και τον καπνό.

Απομόνωση Πρωτοπλαστών: Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν από φύλλα αμπελιού και καπνού όπως έχει ήδη περιγραφεί (Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis, 1990). Συνοπτικά, το έλασμα πλήρως αναπτυγμένων φύλλων τεμαχίστηκε σε κομμάτια 0.5 cm^2 περίπου κάτω από ασπτικές συνθήκες. Τα κομμάτια αυτά τοποθετήθηκαν σε ισοτονικό διάλυμα μαννιτόλης (0.7M mannitol, 0.01M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), στο οποίο είχε προστεθεί 1 και 0.5 % (w/v) Cellulase και Macrozyme (Onozuka), αντίστοιχα και τοποθετήθηκαν στους 27°C στο σκοτάδι. Μετά από 16-18 h

επώασης αφαιρέθηκε προσεκτικά το διάλυμα των ενζύμων από το τρυβλίο και προστέθηκε διάλυμα σακχαρόζης (0.7M sucrose και 0.01M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Αναδεύτηκαν για 10 min στις 80 στροφές περίπου, ακολούθησε φιλτράρισμα με αποστειρωμένες γάζες σε κωνικούς σωλήνες φυγοκέντρησης, για την απομάκρυνση ιστών κ.ά και μετά την δημιουργία δεύτερης φάσης διαφορετικής πυκνότητας με την προσθήκη 2ml διαλύματος μαννιτόλης, φυγοκεντρήθηκαν σε 1100 rpm για 10 min. Οι πρωτοπλάστες μετά την φυγοκέντρηση "συγκεντρώθηκαν" στη μεσόφαση, απ' όπου και συλλέχθηκαν, μεταφέρθηκαν σε άλλο σωλήνα για να πλυθούν εκ νέου με διάλυμα μαννιτόλης και να φυγοκεντρηθούν για να απομακρυνθεί πλήρως η σακχαρόζη. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση επαναιωρήθηκαν σε μικρό όγκο θρεπτικού διαλύματος GCWR (Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1992). Το GCWR (Grapevine Cell Wall Regeneration) θρεπτικό μέσο αποτελείται από τα μακρο- και μικρο- στοιχεία και τις βιταμίνες του θρεπτικού διαλύματος των Murashige και Skoog (1962) cellobiose 250 mg/l (σαν υπόστρωμα της cellulose που τυχόν παρέμεινε κατά την απομόνωση) mannitol 0.6 M, sucrose 2% (w/v), 0.5 mg/l 6-BAP, 3 mg/l NAA και pH=6.2. Ο αριθμός των πρωτοπλαστών προσδιορίστηκε με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου και η βιωσιμότητα τους με χρώση 0.5 % (w/v) Evans blue.

Εκχύλιση και Ανάλυση Πολυαμμών: Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε 5% υπερχλωρικό οξύ (PCA) σε αναλογία 100 mg φρέσκου βάρους ιστού ανά ml PCA, σύμφωνα με την μέθοδο των Tiburcio et al (1985, 1986). Μετά από φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος σε 27000g το υπερκείμενο απομακρύνθηκε (εκχύλισμα S) και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ίσο όγκο 1N NaOH (με τον αρχικό όγκο PCA που χρησιμοποιήθηκε). Διακόσια μl από το υπερκείμενο (εκχύλισμα S) και από το διαλυτοποιημένο ίζημα αναμίχθηκαν αντίστοιχα 1 : 1 με 200μl HCl 12N

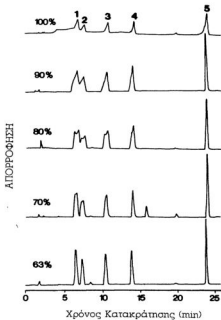
και υδρολύθηκαν σε γαλίνες αμπούλες, που έκλεισαν με τη βοήθεια φλόγας. Η υδρολύση έγινε στους 110 °C για 18 ώρες. Το υδρολυμένο προϊόν μετά από φιλτράρισμα εξατμίστηκε στους 75 °C κάτω από ρεύμα αέρα. Το ξηρό υπόλειμμα επαναωρρήθηκε σε 200μl PCA. Από το υπερκείμενο, που περιείχε τις ελεύθερες πολυαμίνες (S), το υδρολυμένο υπερκείμενο με τις δεσμευμένες πολυαμίνες (SH), και το υδρολυμένο ίζημα με τις πολυαμίνες που ήταν δεσμευμένες σε πρωτεΐνες και άλλα μεγαλομόρια (PH), 200μl αντίστοιχα χρησιμοποιήθηκαν για σύνδεση με την φθορίζουσα ουσία dansylchloride, όπως οι Flores and Galston (1982) έχουν περιγράψει. Σύντομα, σε 200μl εκχύλισμα προστέθηκαν 400μl dansyl chloride και 200μl κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 και αναμιχθηκαν καλά. Έμειναν 18h σε σκοτάδι και θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια η περίσσεια του dansyl chloride απομακρύνθηκε με 100 μl proline (100mg/ml) και επώαση 30 min. Οι dansylated PAs εκχυλίστηκαν σε 0.5ml benzene με ισχυρή ανάδευση για 30 sec. Η οργανική φάση φυλάγεται στους -20°C. Με τον ίδιο τρόπο επεξεργάστηκαν πρότυπα διαλύματα πολυαμινών με συγκέντρωση 20 nM ο ή κάθε μια, χωριστά ή σε συνδυασμό. Τα δείγματα αναλύθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε υψηλής καθαρότητας silica gel πλάκες (Sigma T 6645). Σαράντα μl επεξεργασμένου εκχυλίσματος φορτώθηκαν για κάθε δείγμα και το χρωματογράμμο αναπτύχθηκε για δύο περίπου ώρες με σύστημα διαλυτών κυκλοεξάνιο: οξικό αιθύλιο, σε αναλογία 8:4 (κ.ο.). Μετά το τέλος του χρόνου ανάπτυξης και αφού η πλάκα στεγνώσει, οι ζώνες που προέκυψαν περιγράφησαν, η κάθε μια χωριστά, με μολύβι πάνω από λάμπα υπεριώδους φωτός. Για την ταυτοποίηση των αγνώστων, οι ζώνες κόπηκαν ή ξύστηκαν και εκχυλίστηκαν σε 2ml οξικού αιθυλίου και ποσοτικοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού με διέγερση στα 350nm και εκπομπή στα 495nm.

Βενζυλίωση των Πολυαμινών: Για την ανάλυση των πολυαμινών ως βενζυλιωμένων παραγώγων με τη χρήση HPLC χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Flores and Galston (1982) με κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, 1 ml 2N NaOH και 10 μl benzylchloride προστέθηκε σε 200 μl φυτικού εκχυλίσματος και ακολούθησε ταχεία ανάδευση για 30 sec. Μετά από επώαση 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, 2 ml κορεσμένου διαλύματος NaCl προστέθηκαν στα δείγματα για να σταματήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 3000 g, για 10 min (Econosepri, Sorvall-Instrument, DUPONT). Οι βενζυλιωμένες πολυαμίνες εκχυλίστηκαν σε 3 ml διεθυλαιθέρα (σταθεροποιημένο με 7 ppm περίπου 2,6-δι-τετρα-βουτυλ-4-μεθυλφαινόλη). Στη συνέχεια, όλη η φάση του αιθέρα συλλέχθηκε, εξατμίστηκε πάνω από υδατόλουτρο στους 60°C και το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μl 63 % v/v μεθανόλη και 20 μl χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση σε χρωματογράφο υψηλής πίεσης (HPLC).

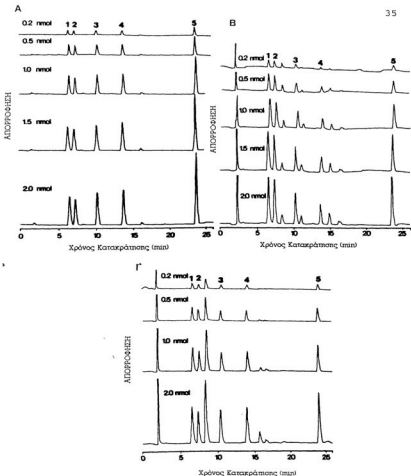
Ανάλυση Βενζυλιωμένων Πολυαμινών: Η ανάλυση των βενζυλιωμένων πολυαμινών έγινε με χρωματογράφο υψηλής (απόδοσης) της Hewlett Packard με ενσωματωμένο diode array system και ένα 85B personal computer σύμφωνα με την μέθοδο των Kotzabasis *et al.* (1993). Συγκεκριμένα για το διαχωρισμό των πολυαμινών χρησιμοποιήθηκε στήλη στενού διαμετρήματος C-18 21x200 mm με μέγεθος σωματιδίων 5 μm (Hypersyl, Hewlett Packard). Οι βενζυλιωμένες πολυαμίνες ενέθηκαν αυτόματα σε όγκο 20 μl και ο διαχωρισμός έγινε με σύστημα δύο διαλυτών (MeOH + H₂O) με σταδιακή διαβάθμιση του ποσοστού της MeOH (55-84%) σε θερμοκρασία 25±1°C. Ο ρυθμός ροής της έκλουσης ήταν 200 μl/min. Καμπύλες παλινδρόμησης για κάθε πολυαμίνη έδωσαν τη δυνατότητα ποσοπκής εκτίμησης των πολυαμινών στα φυτικά εκχυλίσματα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Καλός διαχωρισμός των βενζυλιωμένων παραγώγων των πολυαμινών Put, Cad, Spd, Spm και Agm, έγινε δυνατός με σύστημα δύο διαλυτών, που περιέχει μεθανόλη και δις-αποσταγμένο νερό. Η πιο



Εικόνα 1. HPLC προφίλ από πρότυπα διαλύματα πολυαμινών (1 nMole) σε 100, 90, 80, 70, και 63% μεθανόλη. 1.PUT, 2.CAD 3.SPD 4.SPM 5.AGM



Εικόνα 2 HPLC προφίλ από διαφορετικές ποσότητες προτύπων διαλυμάτων πολυαμινών (2.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.2 nmole) σε 63% (v/v) μεθανόλη. Τα πρότυπα διαλύματα επεξεργάστηκαν ως Α. S πολυαμίνες, Β. SH πολυαμίνες και Γ. PH πολυαμίνες. 1: PUT, 2: CAD, 3: SPD, 4: SPM, 5: AGM.

Πίνακας 1 Συγκέντρωση Put, Spd και Sprm σε εκχύλισμα φύλλου *Vitis californica* εν Dogridge μετά από HPLC ανάλυση των κλασμάτων τους CS, SH, PH. Το SD είναι περίπου $\pm 2\%$

nmol(gr.fr.weight) ⁻¹				
Κλάσματα	Put	Spd	Spm	Ολικές
S	27,0	32,5	15,0	74,5
SH	57,5	93,0	77,0	227,5
PH	32,0	84,5	14,5	131,0
ολική	116,5	210,0	106,5	433,0

κατάλληλη διαβάθμιση συγκέντρωσης των δύο διαλυτών για το διαχωρισμό της Put από την Cad ήταν 55 % μεθανόλη αρχικά που αυξάνεται έως τα 84 % μέχρι τα 23 min και σταθεροποιείται έως τα 26 min. Το υπόλοιπο του benzoylchloride έχει χρόνο κατακράτησης 8.3 min μεταξύ της Cad και της Spd. Η HPLC κατανομή των προτύπων πολυαμινών, που χρησιμοποιήθηκαν, έδωσε τους παρακάτω χρόνους κατακράτησης (min) Put6.6, Cad7.5, Spd10.5, Sprm13.9 και Agm23.9 (Εικ. 1). Το πρότυπο έκλυσης των πολυαμινών είχε σχέση με τη συγκέντρωση του νερού στο εκχύλισμα των πολυαμινών. Πρότυπα πολυαμινών (1 nmol από κάθε πολυαμίνη) μετά από βενζυλίωση διαλύθηκαν σε 100%, 90%, 80%, 70% και 63% (v/v) μεθανόλη (HPLC grade). Τα HPLC-προφίλ των δειγμάτων αυτών, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μεθανόλης, δείχνουν αύξηση στο

Πίνακας 2. Ενδογενείς πολυαμίνες σε φύλλα καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Χανθί). Ο προσδιορισμός έγινε με TLC.

nmol(gr.fr.weight) ⁻¹				
Κλάσμα	Put	Spd	Spm	Ολικές
S	142 ± 6	154 ± 3	140 ± 9	436 ± 18
SH	210 ± 14	165 ± 11	155 ± 7	530 ± 32
PH	170 ± 8	168 ± 10	135 ± 5	473 ± 23
Ολική	522 ± 28	487 ± 24	430 ± 21	1439 ± 73

ύψος και μείωση στο πλάτος των κορυφών του HPLC-προφίλ από την 100% στην 63% συγκέντρωση μεθανόλης στα δείγματα (Kotzabasis *et al.* 1993a).

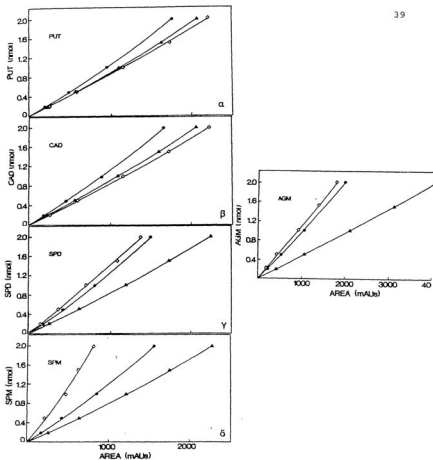
Προσθήκη εσωτερικών standards πολυαμινών στα εκχυλίσματα των ιστών δεν άλλαξε τους χρόνους έκλουσης. Η προσθήκη μείγματος πολυαμινών (90pmol Put + 30pmol Spm; 160pmol Put + 45 pmol Spm ή 174pmol Put + 50 pmol Spm) σε φυτικό εκχύλισμα, που περιείχε 32pmol Put, 241pmol Spd και 147pmol Spm έδωσε αποτελέσματα με διακύμανση ±21% από τις αναμενόμενες τιμές. Σε όλα τα δείγματα το ποσό Spd ήταν σχεδόν το ίδιο. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται αποτελέσματα από την μέτρηση των επιπέδων πολυαμινών σε εκχυλίσματα φύλλου από *Vitis champini* cv Dogridge.

Πίνακας 3. Εξισώσεις καμπυλών παλινδρόμησης για τον υπολογισμό των πολυαμινών σε κλάσματα των S, SH και PH.

HPLC PAs	$y = PA \text{ (}\mu\text{mol)}^a$	Συντελεστής παλινδρόμησης (r^2)
S Put	$y = 4.59 + 0.85x$	0.9904
S Cad	$y = 1.79 + 0.99x$	0.9997
S Spd	$y = -1.02 + 0.83x$	1.0000
S Spm	$y = -0.88 + 0.77x$	0.9996
S Agm	$y = 0.54 + 0.48x$	0.9999
SH Put	$y = 6.06 + 0.86x$	0.9991
SH Cad	$y = -2.47 + 0.95x$	0.9983
SH Spd	$y = 3.25 + 1.40x$	0.9986
SH Spm	$y = 17.03 + 1.92x$	0.9999
SH Agm	$y = 1.28 + 1.09x$	0.9980
PH Put	$y = 3.01 + 1.01x$	0.9995
PH Cad	$y = 5.42 + 1.21x$	0.9993
PH SPd	$y = 2.28 + 1.20x$	0.9988
PH Spm	$y = 9.95 + 1.08x$	0.9972
PH Agm	$y = 4.42 + 0.88x$	0.9989
TLC PAs	$y = PA \text{ (}\mu\text{mol)}^b$	
S Put	$y = -6.02 - 1.55x + 0.61x^2$	0.9874
S Cad	$y = 22.70 - 5.56x - 0.70x^2$	0.9026
S Spd	$y = -31.2 - 2.03x + 0.55x^2$	0.9909
S Spm	$y = -7.67 + 4.15x + 0.55x^2$	0.8293
S Put	$y = 12.09 - 8.72x + 3.06x^2$	0.9870
SH Cad	$y = -3.94 - 0.59x + 1.60x^2$	0.9345
SH Spd	$y = -3.30 - 0.59x + 1.60x^2$	0.9905
SH Spm	$y = -5.70 - 4.61x + 2.25x^2$	0.9800
PH Put	ανάλυση αδύνατη	-
PH Cad	ανάλυση αδύνατη	-
PH SPd	ανάλυση αδύνατη	-
PH Spm	ανάλυση αδύνατη	-

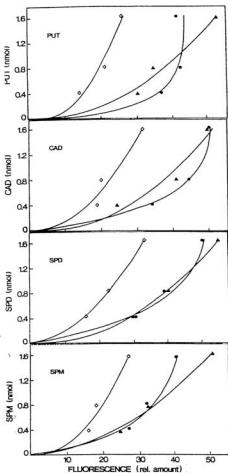
^a x = Εμβαδόν καμπύλης πολυαμινών (mAU) από dansyl-πολυαμίνες ακολουθώντας διαχωρισμό με HPLC

^b x = Σχετική τιμή φθορισμού από dansyl-πολυαμίνες ακολουθώντας διαχωρισμό με TLC



Εικόνα 3. Καμπύλες παλινδρόμησης των εμβαδών των HPLC κορυφών και των αντιστοιχών συγκεντρώσεων α. Put, β. Cad, γ. Spd, δ. Spm, ε. Agm.

▲ S κλάσμα, ◇ SH κλάσμα, ● PH κλάσμα.



Εικόνα 4. Καμπύλες παλινδρόμησης των συγκεντρώσεων πολυαμινών των τριών κλασμάτων (S, SH, PH) και της ποσότητας φθορισμού από τις αντίστοιχες ζώνες μετά από TLC ανάλυση α. Put, β. Cad, γ. Spd, δ. Spm. ▲ S κλάσμα, ○ SH κλάσμα, ● PH κλάσμα.

Πίνακας 4α : Ενδογενείς πολυαμίνες σε φύλλα καπνού (*Nicotiana tabacum* cv Xanthή) Ο προσδιορισμός έγινε με HPLC.

nmoles(gr.fr.weight) ⁻¹				
	Put	Spd	Spm	Ολική
S	21,46±2,2	19,12±3,8	2,96±1,1	43,55±7,1
SH	29,61±2,6	40,13±7,1	8,09±3,1	77,83±12,8
PH	2,47±0,6	3,81±1,4	1,31±0,8	7,58±2,8
Ολικό	53,54±5,4	63,06±12,3	12,37±5,0	128,96±22,7

Πίνακας 4β. Ενδογενείς πολυαμίνες σε φύλλα *Vitis vinifera* L. Ο προσδιορισμός έγινε με HPLC.

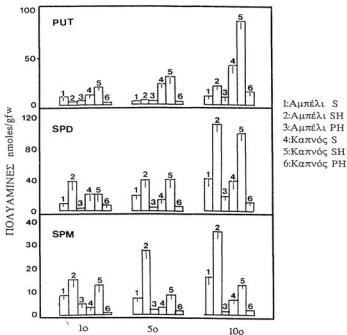
nmoles(gr.fr.weight) ⁻¹				
	Put	Spd	Spm	Ολική
S	3,12±1,4	13,84±5,8	7,18±2,8	24,14±10
SH	4,07±1,3	40,32±11	27,08±6,3	71,47±18,6
PH	3,20±1,8	4,79±3,8	1,92±1,2	9,91±6,8
ολικό	10,39±4,5	58,95±20,6	36,18±10,3	105,52±35,4

Πίνακας 5α. Ενδογενείς πολυαμίνες σε πρωτοπλάστες *Nicotiana tabacum* L. Ο προσδιορισμός έγινε με HPLC.

pmoles/μl όγκου πρωτοπλαστών ⁻¹				
	Put	Spd	Spm	Ολικές
S	10,8±2,5	5,9±0,5	11±0,3	17,8±3,3
SH	9,1±1,5	5,0±1,0	5,7±0,8	19,4±3,3
PH	1,0±0,1	1,8±0,5	2,3±0,9	5,1±1,5
Ολικές	20,9±4,1	12,7±2,0	8,7±2,0	42,3±8,1

Πίνακας 5β. Ενδογενείς πολυαμίνες σε πρωτοπλάστες *Vitis Vinifera* L. Ο προσδιορισμός έγινε με HPLC.

pmoles/μl όγκου πρωτοπλαστών ⁻¹				
	Put	Spd	Spm	ολικές
S	240 ± 21	271 ± 42	97 ± 14	608 ± 84
SH	72 ± 10	68 ± 9,6	132 ± 12	272 ± 31,6
PH	57 ± 7,8	4 ± 1,1	61 ± 5,9	122 ± 14,8
Ολικές	369 ± 38,8	343 ± 59,0	290 ± 31,9	1002 ± 130



Εικόνα 5. Επίπεδα πολυαμινών σε φύλλα διαφορετικής ηλικίας (από τη βάση (10 φύλλο), τη μέση (50 φύλλο) και την κορυφή (100 φύλλο) από *in vitro* φυτά *Vitis vinifera* L. cv Sultanina και σπορόφυτα *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi.

Οι εξισώσεις και οι συντελεστές παλινδρόμησης των benzoylated και dansylated πολυαμινών, μετά από διαχωρισμό με HPLC και TLC, αντίστοιχα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Στην Εικόνα 3, παρουσιάζονται οι καμπύλες παλινδρόμησης για κάθε πολυαμίνη μετά

από διαχωρισμό με τη χρήση HPLC ενώ στην Εικόνα 4 μετά από διαχωρισμό με TLC (Kotzabasis *et al* 1993α).

Οι τίτλοι των ενδογενών πολυαμινών, που προσδιορίστηκαν σε νεαρά, πλήρως εκπτυγμένα, φύλλα από *Nicotiana tabacum* και *Vitis vinifera* με την παραπάνω μέθοδο παρουσιάζονται στους Πίνακες 4α και 4β. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται επίπεδα πολυαμινών σε φύλλα *Nicotiana tabacum* όταν μετρήθηκαν με TLC, ενώ στον Πίνακα 1 του Κεφαλαίου 4 (σελ 96) παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές για *Vitis vinifera*. Το μέσον του βλαστού είναι η περιοχή από την οποία προήλθαν τα φύλλα, που χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση πρωτοπλαστών και όπως έχει φανεί και σε προηγούμενες μελέτες (Κατσιρντάκη, 1991) έχουν τη μεγαλύτερη απόδοση σε αριθμό πρωτοπλαστών και παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό βιωσιμότητας. Οι ενδογενείς πολυαμίνες στα φύλλα αμπελιού και καπνού προσδιορίστηκαν και με τις δύο μεθόδους (TLC και HPLC). Στα αποτελέσματα που προέκυψαν παρατηρείται υπερεκτίμηση από την TLC μέθοδο που κυμαίνεται από 8 έως και 60 φορές. Στα φύλλα καπνού οι ολικές PAs αποτελούνται κατά 50% περίπου από Spd ενώ 40% είναι Put και 10% Spm. Στους πρωτοπλάστες τα ποσοστά αυτά είναι 50% Put, 30% Spd και 20% Spm. Στα φύλλα αμπελιού η ολική Spd έχει το μεγαλύτερο ποσοστό, 55%, ενώ η Put έχει 10% και η Spm 35%. Στους πρωτοπλάστες αμπελιού οι ολικές PAs αποτελούνται κατά το ένα τρίτο από κάθε μία από τις Put, Spd και Spm.

Τα κλάσματα ολικό διαλυτό, ολικό διαλυτό συνδεδεμένο και ολικό αδιάλυτο συνδεδεμένο συμμετέχουν ποσοστιαία εις μιν τα φύλλα καπνού κατά 34, 60 και 6% αντίστοιχα, εις δε τα φύλλα αμπελιού κατά 23, 68, και 9% για κάθε κλάσμα αντίστοιχα. Παρατηρείται δηλαδή ότι και στα δύο φυτικά είδη το διαλυτό συνδεδεμένο υπερέχει των δύο άλλων κλασμάτων. Στους πρωτοπλάστες καπνού τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 42,

Καπνός		Put	Spd	Spm
	Φύλλα	40%	50%	10%
	Πρωτοπλάστες	50%	30%	20%
		S	SH	PH
Αμπέλι	Φύλλα	34%	60%	6%
	Πρωτοπλάστες	42%	46%	12%
		Put	Spd	Spm
	Φύλλα	10%	55%	35%
	Πρωτοπλάστες	36,9%	34,1%	29%
		S	SH	PH
	Φύλλα	23%	68%	9%
	Πρωτοπλάστες	60%	27%	13%

Πίνακας 6. Ποσοστιαία συμμετοχή των τριών κυριωτέρων ΡAs (Put, Spd, Spm) και των κλασμάτων τους στα φύλλα δότες και στους πρωτοπλάστες που προκύπτουν.

46 και 12%, ενώ στους πρωτοπλάστες αμπελιού ήταν 60, 27 και 13%.

Οι πολυαμινες σε φύλλα διαφορετικής ηλικίας παρουσίασαν αύξηση αντιτρόφως ανάλογη της ηλικίας τους (Εικόνα 5). Στο 10ο φύλλο βρέθηκαν οι μέγιστες συγκεντρώσεις των πολυαμινών που προσδιορίστηκαν. Η τάση αύξησης είναι σταθερή στον καπνό και για τις τρεις πολυαμινες ενώ στο αμπέλι στο 5ο φύλλο παραμένουν στα επίπεδα του Ιου με μια εξαίρεση για την Spm στο κλάσμα PH όπου παρουσιάζει μέγιστο στο 1ο φύλλο (μεγαλύτερης ηλικίας).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με την χρησιμοποιούμενη μέθοδο ανάλυσης έγινε καλύτερος διαχωρισμός και των τριών κλασμάτων των πολυαμινών. Η υψηλότερη ευαισθησία της χρησιμοποιούμενης HPLC-μεθόδου, όριο ανίχνευσης είναι περίπου τα 5 pmole- που είναι όμοια με τον φθορισμό των dansylated-ΡΑα, δεν παρουσιάζει το μειονέκτημα των πλευρικών παραγώγων. Έτσι η HPLC-μέθοδος, των Kotzabasis *et al.* (1983β) με τη χρήση χρωματογραφικής στήλης στενού διαμετρήματος, προσφέρει την δυνατότητα διαχωρισμού και χαρακτηρισμού μικρών συγκεντρώσεων πολυαμινών, χωρίς τη χρήση εσωτερικών standards (Slocum *et al.* 1984). Αύξηση της ποσότητας των πολυαμινών (από 0.2 σε 2nmol) σε 63% (v/v) μεθανόλη δεν άλλαξε τους χρόνους έκλουσης, που δείχνει, όχι μόνο ποσοπικά αλλά και ποιοτικά ακρίβεια της μεθόδου (Εικ. 2).

Για τις καμπύλες παλινδρόμησης κάθε πολυαμίνης χρησιμοποιήθηκε το εμβαδόν κάθε κορυφής και η αντίστοιχη γνωστή συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων πολυαμινών και υπολογίστηκαν ως πολυώνυμα πρώτου βαθμού (Πίν. 3, Εικ. 3). Αν και τα υδρολυμένα πρότυπα των SH και PH πολυαμινών έδωσαν διαφορετικές καμπύλες παλινδρόμησης, σε σύγκριση με τις ελεύθερες (S) (Εικ. 3), οι συγκεντρώσεις πολυαμίνης σε κάθε κλάσμα σχετιζόταν ποσοπικά με το εμβαδόν της αντίστοιχης κορυφής (Εικ. 2). Οι συντελεστές παλινδρόμησης στον Πίνακα 3 ποσοποιούν την ακρίβεια αυτής της εκτίμησης.

Στον διαχωρισμό με TLC των standards πολυαμινών, που έγινε σύμφωνα με την μέθοδο των Flores and Galston (1984) η συγκέντρωση των πολυαμινών των τριών κλασμάτων S, SH και PH στα φυτικά εκχυλίσματα, υπολογίστηκε από το φθορισμό των αντίστοιχων ζωνών των προτύπων

διαλυμάτων και έδωσε καμπύλες παλινδρόμησης διαφορετικές από τις αντίστοιχες της HPLC-κατανομής (Εικ. 4). Ο σχετικά σύντομος κορεσμός των καμπυλών αυτών ίσως οφείλεται στην απόσβεση του φθορισμού σε σχετικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Ο προσδιορισμός της αγματινής (Agpm) μετά από dansylation δεν ήταν δυνατός.

Προκαταρκτικά αποτελέσματα από την μέτρηση των πολυαμινών σε φυτικά εκχυλίσματα μετά από τον διαχωρισμό με HPLC και TLC και χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις του Πίνακα 3 έδειξαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο μεθόδους (την προτεινόμενη HPLC μέθοδο και την TLC). Οι διαφορές εξαρτώνται από το φυτικό εκχύλισμα. Οι τιμές από την TLC μέτρηση είναι μεγαλύτερες, μερικές φορές 15 ή 20 φορές, σε σύγκριση με τις τιμές από την HPLC μέτρηση. Αυτό μπορεί να οφείλεται, εν μέρει, στο γεγονός ότι το dansylchloride δεν είναι ειδικό για αμινομάδες και η παρουσία υδατανθράκων και φαινολών στα φυτικά εκχυλίσματα προκαλεί ουσιώδεις παρεμβολές και μειώνει την ακρίβεια της ποσοπικής ανάλυσης, ενώ αυτό το πρακτικό πρόβλημα δεν υφίσταται για τις βενζυλιωμένες πολυαμίνες, διότι μπορούσαν να αναλυθούν αμέσως με HPLC με τη χρήση κολώνας στενού διαμετρήματος η οποία αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου.

Η συγκέντρωση των πολυαμινών γενικά έχει βρεθεί να είναι μεγάλη σε νεαρά φυτικά όργανα, όπως νεαρά φύλλα, νεαρούς καρπούς, τομάτες, ρίζες από φυτά καπνού, ριζικά φυμάτια από φυτά *Vigna mungo* κ.ά. (Egea-Cortines *et al* 1993, Lahiri *et al* 1992, Mengoli *et al* 1992) ενώ μειώνονται όσο αυξάνει η ηλικία και γηράσκουν. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί σε φυτικά κύτταρα, που βρίσκονται σε ενεργή φάση αύξησης, ότι οι πολυαμίνες είναι αυξημένες (Fienberg *et al* 1984, Galston and Kaur-Sawhney 1990, Tiburcio *et al* 1990). Τόσο σε φύλλα από *in vitro* φυτά αμπελιού όσο και σε φύλλα από σπορόφυτα καπνού φαίνεται να

ισχύει η μείωση αυτή της συγκέντρωσης των πολυαμινών με την αύξηση της ηλικίας. Οι πολυαμίνες που προσδιορίστηκαν (Put, Spd και Spm) και στα τρία κλάσματα (ελεύθερο, δεσμευμένο διαλυτό και δεσμευμένο αδιάλυτο σε υπερχλωρικό οξύ) είχαν την μεγαλύτερη συγκέντρωση τους στα νεαρότερα φύλλα (της κορυφής). Η αύξηση αυτή στα φύλλα του καπνού φτάνει συχνά τις 10 φορές σε σχέση με τα φύλλα της βάσης του φυτού, ενώ στο αμπέλι φτάνει μέχρι και τις 5 φορές, με μια εξαίρεση στην Spm στο κλάσμα PH που βρέθηκε να είναι μέγιστο στα φύλλα της βάσης. Σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι, όταν τα φύλλα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα μορφογένεσης ή για απομόνωση πρωτοπλάστων, έδωσαν καλλίτερης ποιότητας κάλλους, ενώ οι πρωτοπλάστες έδειξαν μεγαλύτερα ποσοστά βιωσιμότητας (Roubelakis-Angelakis and Katsirdakis, 1990).

Στα φύλλα των δύο φυτικών ειδών παρατηρείται ότι η ποσοστιαία συμμετοχή της Spd είναι 50% και 55% για τον καπνό και το αμπέλι, αντίστοιχα. Μεγάλη διαφορά παρουσιάζει το ποσοστό της ολικής Put που στα φύλλα καπνού είναι 40% ενώ στα φύλλα αμπελιού είναι 10% των ολικών PAs. Το όλικό διαλυτό ελεύθερο κλάσμα (S) και το όλικό διαλυτό συνδεδεμένο (SH) στους πρωτοπλάστες καπνού συμμετέχει με περίπου ίσο ποσοστό (42 και 46% αντίστοιχα), ενώ στους πρωτοπλάστες αμπελιού το S κλάσμα είναι διπλάσιο σε ποσοστό από το SH, 60 και 27% αντίστοιχα. Η ποσοστιαία αύξηση της Put στους πρωτοπλάστες είναι αποτέλεσμα ανταπόκρισης στο στρες που παρατηρείται γενικά στα φυτά. Γενικά η συσσώρευση ελεύθερων πολυαμινών μπορεί να έχει δραστικές συνέπειες για τη ρύθμιση του μεταβολισμού του αζώτου, την πρωτεϊνοσύνθεση και τη διατήρηση του κυτταρικού pH (Slocum *et al.* 1984). Η μεγαλύτερη επί τοις εκατό συσσώρευση Put σε πρωτοπλάστες αμπελιού (269 μονάδες έναντι 10 για τον καπνό) δείχνουν μεγαλύτερη αντίδραση των

πρωτοπλαστών αμπελιού στο στρες, όμως η μη μετατροπή σε Spm και Spm που είναι γνωστές για την δράση τους ενάντια στο γηρασμό (λόγω της σταθεροποίησης των μεμβρανών με τη δέσμευση τους σε αυτές) είναι ένα μειονέκτημα των πρωτοπλαστών αμπελιού σε σχέση με τους πρωτοπλάστες του καπνού, όπου παρατηρείται ποσοστιαία αύξηση κατά 10 μονάδες της Spm. Το ίδιο φαίνεται και από την ποσοστιαία αύξηση του ΡΗ κλάσματος όπου στους πρωτοπλάστες καπνού διπλασιάζεται ενώ στο αμπέλι αυξάνεται μόνο κατά 4 μονάδες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΣΗΜΑΣΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ
ΑΠΟ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΕΣ ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΙΟΥ.**



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ραδιενεργή ^{14}C -Put και ^3H -Sprd χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των χαρακτηριστικών πρόσληψης τους από πρωτοπλάστες αμπελιού (*Vitis Vinifera* L. cv Sultanina) και καπνού (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η Put και η Sprd μεταφέρονται ενεργά μέσω ενός συστήματος που χρησιμοποιεί ενέργεια κύρια από τη σύνθεση ATP μέσω γλυκόλυσης και φθάνουν σε κορεσμό εντός 3-5min. Μεγαλύτερη ταχύτητα πρόσληψης για την Put παρατηρήθηκε σε pH 8 για πρωτοπλάστες αμπελιού, ενώ για πρωτοπλάστες καπνού σε pH 5 και 8. Για τη Sprd η max ταχύτητα πρόσληψης παρατηρήθηκε σε pH 7. Η παρουσία ιόντων ασβεστίου δεν επηρέασε την ταχύτητα πρόσληψης Put από πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνού. Η ταχύτητα πρόσληψης Sprd από πρωτοπλάστες αμπελιού επίσης δεν επηρεάστηκε από την παρουσία ιόντων Ca^{2+} , ενώ σε πρωτοπλάστες καπνού παρατηρήθηκε αναστολή σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 5mM.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γνωστό ότι οι εξωγενείς πολυαμίνες (PAs) μπορούν να προάγουν την κυτταρική διαίρεση σε φυτικούς ιστούς, που περιστασιακά στερούνται πολυαμινών (Bagri *et al* 1989). Ομως διαφορετικοί ιστοί και όργανα ανταρούν διαφορετικά, σε προσθήκη εξωγενών πολυαμινών και αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στις συγκεντρώσεις των ενδογενών, ελεύθερων ή συνδεδεμένων πολυαμινών, ή στο ρυθμό σύνθεσης πολυαμινών και/ή οξειδωσης τους.

Τα βασικά χαρακτηριστικά της πρόσληψης πουτρεσίνης (Put) από

κύτταρα έχουν περιγραφεί για μερικούς μικροοργανισμούς, όπως *Anacyrtis nidulans* (Guarino and Cohen 1979) και *Aspergillus nidulans* (Spathas *et al.* 1982), αλλά και για ζωικά κύτταρα σε ανθρώπινα αιμοπετάλια και σε άλλους ιστούς (Nadler and Takahashi, 1985, Seiler and Deseure, 1990). Έχει μελετηθεί *in vivo* ο μεταβολισμός σημασμένων πολυαμινών και βρέθηκε ότι οι πολυαμίνες μπορούν να προσληφθούν από τους ιστούς θηλασικών με το αίμα. Είναι επίσης γνωστό ότι ιστοί με μεγάλες ανάγκες σε PAs, όπως ο προστάτης, οι όγκοι και φυσιολογικά αλλά γρήγορα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, προσλαμβάνουν πολυαμίνες σε αυξημένα επίπεδα (Seiler *et al.* 1990). Σε ευκαρυωτικά κύτταρα έχει αναφερθεί ότι διαφορετικές PAs μπορεί να έχουν το ίδιο σύστημα μεταφοράς, ενώ η πρόσληψη τους εξαρτάται από τη συγκέντρωση Na^+ (Porter *et al.* 1984, Rinehart *et al.* 1984). Σε προκαρυωτικά κύτταρα έχει βρεθεί ενεργό σύστημα πρόσληψης Put για την *E. coli* B, ενώ για την *E. coli* K-12 που αναπτύσσεται σε μέσο χαμηλού οσμωτικού έχουν βρεθεί δυο συστήματα μεταφοράς (Kashiwagi *et al.* 1986).

Στα φυτά αρχικά βρέθηκε ότι οι πολυαμίνες δεν προσλαμβάνονται *in vivo* αλλά τα πρόδρομα τους αμινοξέα μετακινούνται, από περιοχές συσώρευσης μέσα στο φυτό, σε σημεία ενεργού αύξησης, όπου και μετατρέπονται σε πολυαμίνες (Young and Galston, 1983). Αργότερα, μελετήθηκε η πρόσληψη των πολυαμινών και η μεταφορά τους σε ολόκληρο φυτό, ιστούς, κύτταρα, πρωτοπλάστες και χυμοτόμα (Bagpi and Pistocchi, 1985, Pistocchi *et al.* 1986, 1987, 1988). Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι οι πολυαμίνες προσλαμβάνονται από τα φυτά και μετακινούνται σ' αυτά μέσω των αγγείων του ξύλου (Rabiti *et al.* 1989). Οι μηχανισμοί πρόσληψης πολυαμινών μελετήθηκαν σε επίπεδο α. Φυτού, σε *Lycopersicon esculentum miller*, cv Earlypak 7, *Zea mays* L., και *Pinus*

pinus (Rabiti *et al.* 1989). β: Ιστού, σε πέταλα *Saintraulia ionatha* όπου η πρόσληψη από την πάνω επιφάνεια τους, της ^{14}C -Put ήταν γραμμική για περίπου 60 min. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις Put (0.5 μM) μέγιστη πρόσληψη ^{14}C -Put ήταν 100 pmol (gr.fr.weight.h)⁻¹ σε pH 4 και είχε 2 pH optima, ένα σε pH 4.5 και ένα μικρότερο σε pH 8.0. Σε υψηλές συγκεντρώσεις Put (50 mM) μέγιστη πρόσληψη ήταν 2250 pmol(gr.fr.weight.h)⁻¹ σε pH 8.0 και είχε ένα δεύτερο μικρότερο μέγιστο σε pH 4.0. Η Vmax κυμαινόταν από περίπου 0.3 έως 3.0 pmol(gr.fr.weight.h)⁻¹ και η Km από περίπου 24 ως 120 mM ανάλογα με την εξωτερική συγκέντρωση, το pH και τη μέθοδο προσδιορισμού της (Bagni and Pistocchi, 1985).

Οι αποσυζευκτές dinitrophenole (DNP) και CCCP (carbonylcyanide-m-chlorophenyl-hydrazone) σε συγκέντρωση 0.01 και 0.1 mM δεν είχαν επίδραση στην πρόσληψη της Put. Η ελεύθερη Put ήταν 103 nmol(gr.fr.weight)⁻¹ και θεωρώντας ότι το 90% είναι H₂O στα πέταλα, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της Put εκτιμάται στα 114 μM, η οποία ξεπερνά περίπου 200 φορές την συγκέντρωση της Put στο διάλυμα. Έτσι η πρόσληψη της Put θεωρείται ότι δεν εξαρτάται από το ATP και θα μπορούσε να είναι παθητική διαδικασία σε μεγάλες εξωτερικές συγκεντρώσεις (100μM-100mM) καθώς και σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων σε χαμηλές εξωτερικές συγκεντρώσεις Put (0.5-100 μM) (Bagni and Pistocchi, 1985).

Οι ρυθμοί πρόσληψης της Put, Spd και Spr από 17 μM εξωτερική συγκέντρωση από πέταλα *Saintraulia* ήταν περίπου 7.0, 14.0 και 10 nmol(gr.fr.weight.h)⁻¹. Σε χαμηλή συγκέντρωση Spd (1.7 mM) μέγιστο πρόσληψης 18 nmol(gr.fr.weight.h)⁻¹ παρατηρήθηκε σε pH 8. Σε υψηλές εξωτερικές συγκεντρώσεις Spd (25 mM) το μέγιστο πρόσληψης (πάνω από 2.000 nmol(gr.fr.weight.h)⁻¹ ήταν σε pH 4.5 με ένα δεύτερο μικρότερο σε

pH 8.0. Η πρόσληψη Put, Spd και Spm επηρεάστηκε από το εξωτερικό pH σε υψηλές εξωτερικές συγκεντρώσεις πολυαμινών με τιμές Km 86, 12 και 21 mM, αντίστοιχα.

Η πρόσληψη Put και Spd δεν αναστάλλει από Ca^{2+} , Mg^{2+} και K^+ στις ίδιες συγκεντρώσεις (17 mM) ενώ σε 17 mM τα ιόντα Ca^{2+} ανέστειλαν και τα K^+ ενίσχυσαν την πρόσληψη της Spd. Το 24-DNP και το dimethylstilbestrol δεν ανέστειλαν την πρόσληψη, ενώ 20 mM NaSCN είχε ως αποτέλεσμα 68% αναστολή της πρόσληψης της Spd (Pistocchi *et al.* 1986).

Σε ρίζες από σπορόφυτα *Zea mays* η πρόσληψη της Put μπορεί να αναλυθεί σε μια γρήγορη φάση πρόσληψης και δέσμευσης στον αποπλάστη και ακολουθείται από μεταφορά μέσω της πλασματικής μεμβράνης, η οποία είναι γραμμική για 30-40 min. Η κινητική της πρόσληψης σε συγκεντρώσεις από 0.05 έως 1mM δεν έδειξε να είναι κορέσιμη αλλά θα μπορούσε να αναλυθεί σε μια κορέσιμη (V_{\max} 0.397 $\mu\text{moles}(\text{gr. fr. weight})^{-1}$, και Km 120 mM) και μια γραμμική περιοχή. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ένα μέρος της εξωγενούς Put μπορεί να μεταβολισθεί στα κυτταρικά τοιχώματα στις ρίζες καλαμποκιού από την DAO (diamine oxidase), αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό της Put μεταφέρθηκε μέσω της πλασματικής μεμβράνης μέσω ενός μεταφορέα, με μια διαδικασία όμοια με αυτή που προτείνεται για ζωικά συστήματα (Di Tomaso *et al.* 1992).

Σε κυτταρικό επίπεδο, η πρόσληψη PAs έχει μελετηθεί σε κύτταρα καρόττου καθώς και σε πρωτοπλάστες και χυμοτόπα απομονωμένα από ακρορίζα καρόττου. Τα κύτταρα έδειξαν γρήγορη πρόσληψη με κορεσμό μετά από 1-2 min (Bagni and Pistocchi, 1988). Η πρόσληψη της Spd ήταν γραμμική στις υψηλές συγκεντρώσεις για τους πρωτοπλάστες ενώ στα χυμοτόπα έδειξε κινητική Michaelis-Menten κάτω από 1mM (Km=618 μM)

και ήταν γραμμική για συγκεντρώσεις 1-50mM. Η πρόσληψη Spd αυξανόταν γραμμικά σε τιμές pH μεταξύ 5.5 και 7, ενώ για τα χυμοτόμα υπήρχε μέγιστο σε pH 7.0 (Pistocchi *et al.* 1988). Η πρόσληψη πολυαμινών από πρωτοπλάστες και χυμοτόμα καρότου έδειξε μέγιστο επίσης σε 1-2 min. Ο αναστολέας CCCP δεν είχε επίδραση στην πρόσληψη της Put σε πέταλα *Saintpaulia* (Bagρί *et al.* 1985), ενώ σε κύτταρα καρότου η πρόσληψη πολυαμινών αναστέλετο εν μέρει από μεταβολικούς αναστολείς (Pistocchi *et al.* 1987). Τα χαρακτηριστικά πρόσληψης πολυαμινών από πρωτοπλάστες και χυμοτόμα προβάλλουν την υπόθεση μιας παθητικής εισόδου των PAs μέσω του πλασμαλήμματος και την παρουσία μεταφοράς, που εντοπίζεται στον τονοπλάστη (Pistocchi *et al.* 1988).

Η αναγέννηση των πρωτοπλαστών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα τους να προσλαμβάνουν στοιχεία από το περιβάλλον, επειδή κατά την καλλιέργεια εκτίθενται σε μεγάλο αριθμό ανοργανων και οργανικών ουσιών και η πρόσληψη τους μπορεί να γίνει με διαφορετικούς μηχανισμούς. Εται θεωρήθηκε σημαντικό να κατανοηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο ρυθμίζεται η κυτταρική συγκέντρωση των πολυαμινών. Για την μελέτη των μηχανισμών αυτών, χρησιμοποιήσαμε πρωτοπλάστες από μεσόφυλλο φύλλου αμπελιού (*Vitis vinifera* L. cv Sultanina) και πρωτοπλάστες μεσόφυλλου από ένα άλλο φυτικό είδος εύκολα αναγεννώμενο, τον καπνό (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi). Για την μελέτη των χαρακτηριστικών πρόσληψης ελέγχθηκε η επίδραση του pH και της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς CCCP, Na_2VO_4 και Ars για να μελετηθεί η επίδραση τους στο σύστημα πρόσληψης και ο τύπος ενεργοποίησης του συστήματος μεταφοράς.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Φυτικό υλικό: Φυτά αμπελιού, *Vitis vinifera* L. cv Sultanina) προερχόμενα από κόμβους φυτών απαλλαγμένους από ιώσεις αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς ορμόνες, όπως έχει ήδη περιγραφεί (Roubelakis-Angelakis and Zivanovits, 1991). Φύλλα από το μεσαίο τμήμα του βλαστού χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση πρωτοπλαστών (βλέπε Κεφ. 1) Επίσης σπορόφυτα καπνού (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi), αναπτύχθηκαν σε υαλόφρακτο θερμοκήπιο κάτω από ρυθμιζόμενες συνθήκες. Φύλλα από το 4ο έως το 10ο χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση πρωτοπλαστών.

Πειράματα πρόσληψης: Μετά την απομόνωση τους οι πρωτοπλάστες επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα μαννιτόλης (0.7M mannitol σε 0.02M MES, Διάλυμα Α) σε πυκνότητα 4×10^5 για πρωτοπλάστες αμπελιού και 1.5×10^5 για πρωτοπλάστες καπνού ανά ml διαλύματος. Ραδιοσημασμένες πολυαμίνες προστέθηκαν σε συγκέντρωση $1 \mu\text{Ci/ml}$ Η ^{14}C -putrescine dihydrochloride, [2,3- $^3\text{H}(\text{N})$]-Putrescine dihydrochloride και (terminal methylene- $^3\text{H}(\text{N})$)-Spermidine-trihydrochloride ήταν από την New England Nuclear και η ειδική ενεργότητα τους ήταν $3.3 \text{ GBq} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ($90 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$), $1.1 \text{ TBq} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ($300 \text{ Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$) και $666.0 \text{ GBq} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ($18.0 \text{ Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$), αντίστοιχα. Η επίδραση της συγκέντρωσης πολυαμίνης ελέγχθηκε στις συγκεντρώσεις μηδέν μέχρι 1 mM και από 1 μέχρι 100 mM με ^3H -Putrescine ή ^3H -Spermidine, $1 \mu\text{Ci/ml}$.

Για τη μελέτη της επίδρασης του pH, δείγματα πρωτοπλαστών ιζηματοποιήθηκαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν στο διάλυμα Α, όπου προηγουμένως είχαν ρυθμιστεί οι τιμές pH μεταξύ 4 και 9 (για την ρύθμιση του pH χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα τα ρυθμιστικά MES, MOPS και TRIZMA). Η παρουσία ιόντων ασβεστίου μελετήθηκε σε

συγκεντρώσεις μπδέν έως 10mM με τη μορφή $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

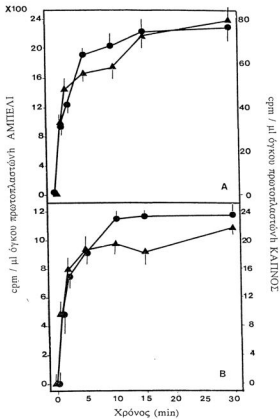
Στο τέλος του χρόνου επώασης, δείγματα 250μl τοποθετήθηκαν σε φίλτρα αντλίας κενού (Millipore) και κατακρατούντο σε 0.45μm φίλτρα νιτροκυτταρίνης (Cellulose nitrate filters, Sartorius) πλύθηκαν με 2ml διάλυμα A μαζί με 100mM Put, στεγνώσαν και αφού τοποθετήθηκαν σε ειδικά φιαλίδια με υγρό σπινθηριστικό μετρήθηκαν σε Beckman Scintillation Counter LS 6000SE. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές με 3-5 μετρήσεις ανά πείραμα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ανά μικρόλιτρο πακεταρισμένων πρωτοπλαστών.

Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση των παρακάτω αναστολέων. Του αποουζευκτί, carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone (CCCP), του αναστολέα της ATPase της πλασματικής μεμβράνης, sodium orthovanadate (Na_3VO_4) καθώς και του αναστολέα της σύνθεσης ATP, sodium arsenate (Ars). Οι αναστολείς προστέθηκαν στο μέσο επώασης στις συγκεντρώσεις 1, 5 και 10mM για το Na_3VO_4 , 1, 2 και 5mM για το Ars και 0.1 και 0.2 για το CCCP, 30s πριν από τη ραδιοσημασμένη ουσία.

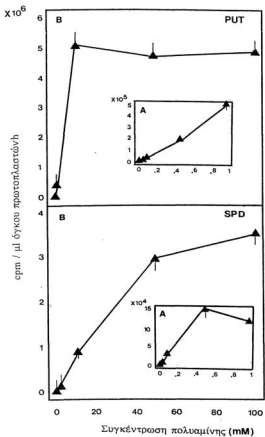
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να προσδιορισθούν τα χαρακτηριστικά πρόσληψης πολυαμινών από πρωτοπλάστες δύο φυτικών ειδών, που δείχνουν διαφορετική *in vitro* μορφογενετική συμπεριφορά. Το ένα προέρχεται από ένα εύκολα αναγεννώμενο φυτικό είδος, τον καπνό (*Nicotiana tabacum*) και το άλλο από ένα μη αναγεννώμενο από πρωτοπλάστες, φυτικό είδος, το αμπέλι (*Vitis vinifera*).

Η ενδογενής συγκέντρωση των πολυαμινών στους πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνού ήταν 240 και 108 pmoles Put /μl όγκου πρωτοπλαστών, αντίστοιχα, και 271 και 59 pmoles Spd /μl όγκου πρωτοπλαστών, αντίστοιχα για κάθε είδος (Κεφ. 1. Πίν. 5 α,β). Αν ληφθεί



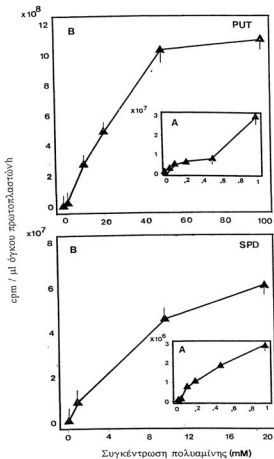
Εικόνα 1 Πρόσληψη πολυαμινών από πρωτοπλάστες *Vitis vinifera* L. (▲) και *Nicotiana tabacum* L. (●) A. Put B. Spd.



Εικόνα 2 Πρόσληψη Put και Spd από πρωτοπλάστες *Nicotiana tabacum* L σε συγκεντρώσεις A: 10^{-5} έως 10^{-3} M και B: 10^{-3} έως 10^{-1} M.

υπ' όψιν ότι η περιεκτικότητα σε νερό στους πρωτοπλάστες είναι γύρω στο 90% εκτιμάται ότι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση τελικά είναι 266μM και 12 μM για την Put στους πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνυ. αντίστοιχα ενώ για την Sprd οι αντίστοιχες τιμές είναι 301 και 6,5 μM. Η πρόσληψη της Put από εξωτερική συγκέντρωση σημασμένης Put 20μM και της σημασμένης Sprd από εξωτερική συγκέντρωση 0,1μM ήταν πολύ γρήγορη από τους πρωτοπλάστες του αμπελιού και του καπνυ. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 και οι δύο πολυαμιίνες χρειάστηκαν περίπου 5 min για να φθάσουν σε κορεσμό με ταχύτητες 10 και 19,9 nmoles/10⁶ πρωτοπλαστών/h για την Put και 22,8 και 30,75 nmoles/10⁶ πρωτοπλαστών/h για την Sprd στο αμπέλι και τον καπνύ, αντίστοιχα και δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση μέχρι 24 ώρες. Η πυκνότητα των πρωτοπλαστών του αμπελιού και του καπνυ ανά ml διαλύματος επηρέασε, όπως αναμενόταν, την ταχύτητα πρόσληψης της Put και της Sprd. Αύξηση του αριθμού των πρωτοπλαστών ανά ml διαλύματος μείωσε την ταχύτητα πρόσληψης.

Η πρόσληψη της Put από πρωτοπλάστες καπνυ, σε συγκεντρώσεις 0 έως 100 mM ακολούθησε κινητική Michaelis-Menten. $V_{max}=4,07$ μmoles/10⁶ πρωτοπλ.η στον καπνύ ($K_m=5mM$) (Εικ. 2). Η πρόσληψη Sprd έδειξε επίσης Michaelis-Menten σύστημα πρόσληψης για συγκεντρώσεις μέχρι 1mM, με $V_{max}=0,15$ μmoles/10⁶ πρωτοπλ.η στον καπνύ ($K_m=0,25mM$), ενώ για συγκέντρωση μέχρι 100mM η $V_{max}=4,7$ μmoles/10⁶ πρωτοπλ.η στον καπνύ ($K_m=27mM$). Η πρόσληψη της Put από πρωτοπλάστες αμπελιού έδειξε μια καμπύλη κορεσμού σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0-0,5mM, $V_{max}=97,5$ nmoles/10⁶ πρωτοπλ.η στο αμπέλι $K_m=0,1mM$), ενώ για συγκεντρώσεις 1-100mM η αύξηση ήταν γραμμική μετά 50mM ($V_{max}=13,8$ μmoles/10⁶ πρωτοπλ.η στο αμπέλι και $K_m=20mM$). Για την Sprd, η πρόσληψη ήταν γραμμική για τις χαμηλές συγκεντρώσεις (0-1mM) και



Εικόνα 3 πάνω. Πρόσληψη Put από πρωτοπλάστες αμπελιού (*Vitis vinifera* L) σε συγκεντρώσεις A: 10^{-5} έως 10^{-3} M και 10^{-3} έως 10^{-1} M.

3 κάτω. Πρόσληψη Spd από πρωτοπλάστες αμπελιού (*Vitis vinifera* L) σε συγκεντρώσεις A: 10^{-5} έως 10^{-3} M και 10^{-3} έως 2×10^{-2} M.

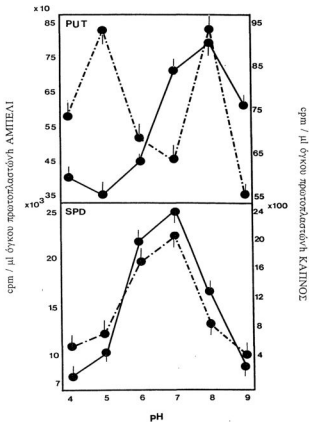
Πίνακας 1 : Κινητικές σταθερές πρόσληψης Put και Spd από πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνού.

	ΡΑζ	Συγκ.	Τύπος	V_{max} ($\mu\text{moles}/10^6 \text{ prxh}$)	K_m
Κ α π ν ό ς	Put	0-1	linear	-	-
		1-100	Mich-Menten	4.07	5mM
	Spd	0-1	Mich-Menten	0.15	0.25mM
		1-100	linear	4.7	27mM
Α μ π έ λ ι	Put	0-0.5	Mich-Menten	0.097	0.1mM
		0.5-100	Mich-Menten	13.8	20mM
	Spd	0-1	linear	-	-
		0-20	linear	-	-

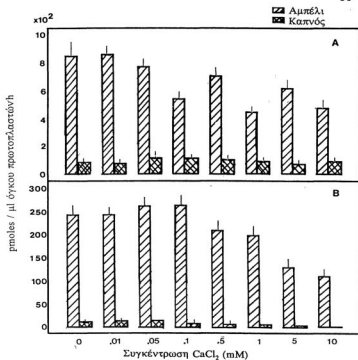
συνέχισε να είναι γραμμική σε συγκεντρώσεις 1-20mM (Εικ. 3α, β).

Η πρόσληψη των πολυαμινών εξαρτάται σημαντικά από το εξωτερικό pH και για τα δύο φυτικά είδη. Σε 20 μ M εξωτερική συγκέντρωση Put, μέγιστο πρόσληψης από πρωτοπλάστες καπνού παρατηρήθηκε σε δύο τιμές pH, 5 και 8 και ήταν 28 $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$ όγκου, ενώ για πρωτοπλάστες αμπελιού το μέγιστο pH 8, $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$ όγκου πρωτοπλαστών. Για την Spd, το άριστο pH ήταν 7 και για τα δύο είδη και η πρόσληψη ήταν 37.8 και 3.07 $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$ όγκου πρωτοπλαστών για το αμπέλι και τον καπνό αντίστοιχα. Για τα πειράματα πρόσληψης χρησιμοποιήθηκε pH 8 για την Put και pH 7 για την Spd (Εικ. 4).

Η επίδραση των ιόντων ασβεστίου ήταν διαφορετική για την Put και για την Spd στα δύο φυτά, που μελετήθηκαν. Σε πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνού η παρουσία CaCl_2 σε συγκεντρώσεις από 0.01 έως 10 mM έδειξε μικρή αναστολή στην πρόσληψη Put από εξωτερική συγκέντρωση 20 μ M. Για την πρόσληψη της Spd (συγκέντρωση διαλύματος



Εικόνα 4: Επίδραση του pH την πρόληψη Put και Spd από πρωτοπλάστες *Vitis vinifera* L. (—) *Nicotiana tabacum* L. (---).



Εικόνα 5. Επίδραση της συγκέντρωσης ιόντων Ca^{2+} στην πρόκληση A:Put και B: Spd από πρωτοπλάστες *Vitis vinifera* L. και *Nicotiana tabacum* L.

0.1 μM , συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου μεγαλύτερες από 0.1mM είχαν ανασταλτικό αποτέλεσμα και για τα δύο είδη (Εικ. 5).

Για να μελετηθεί το σύστημα μεταφοράς των πολυαμινών Put και Spd στους πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνού καθώς και ο τρόπος ενεργοποίησής του, χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς, Na-orthovanadate, αναστολέας της ATPase της πλασματικής μεμβράνης, sodium Arsenate

Πίνακας 1. Επίδραση των αναστολέων sodium orthovanadate, sodium arsenate και CCCP στην πρόσληψη Put και Spd από πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνού. Η συγκέντρωση της Put και της Spd ήταν 20 μmol^{-3} και η πρόσληψη, προσδιορίστηκε μετά από επίθεση 10 min. Με (-) σημειώνεται η έλλειψη αναστολής

Αναστολέας	Συγκέντρωση, mM	Ποσοστό αναστολής			
		Put		Spd	
		Vit.	Tab.	Vit.	Tab.
Na_2VO_4	1	-	3	-	76
	5	-	10	-	81
	10	-	35	-	83
Ars	1	50	48	8	55
	2	64	54	44	56
	5	76	56	66	65
CCCP	0.1	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-

(Ars), αναστολέας της σύνθεσης ATP μέσω γλυκόλυσης και CCCP που αναστέλλει την ενεργοποίηση ουστημάτων πρόσληψης, διά μέσου της ύπαρξης διαφοράς ηλεκτροχημικού δυναμικού H^+ , εκατέρωθεν της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Stein, 1986). Κάθε αναστολέας χρησιμοποιήθηκε σε δύο ή τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το Na_2VO_4 , σε συγκέντρωση 5-20mM ανέστειλε την πρόσληψη της Put έως 35% και της Spd έως 83% σε πρωτοπλάστες καπνού, ενώ σε πρωτοπλάστες αμπελιού η πρόσληψη και των δύο πολυαμινών, που μελετήθηκαν, δεν επηρεάστηκε. Το Ars, που χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 1-5mM, ανέστειλε την πρόσληψη των δύο πολυαμινών και στα δύο είδη πρωτοπλαστών, που μελετήθηκαν, σε ποσοστό 54-76%. Ο αναστολέας CCCP δεν ανέστειλε την πρόσληψη των δύο πολυαμινών, που μελετήθηκαν, στα δύο είδη πρωτοπλαστών.

ΕΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πρωτοπλάστες μεσοφύλλου *Vitis* και *Nicotiana* προσλαμβάνουν πολυαμίνες (Put, Spd) από εξωτερικές συγκεντρώσεις 0-100mM με διαφορές στις ταχύτητες πρόσληψης ($V_{max}=138$ $\mu\text{moles}/10^6$ πρωτοπλαστών/η στο αμπέλι και 40 $\mu\text{moles}/10^6$ πρωτοπλαστών/η στον καπνό για την Put και 13 $\mu\text{moles}/10^6$ πρωτοπλαστών/η στο αμπέλι και 47 $\mu\text{moles}/10^6$ πρωτοπλαστών/η στον καπνό για την Spd). Κορεσμός παρατηρήθηκε εντός περίπου 5 min, όταν ο αριθμός των πρωτοπλαστών ήταν $4 \times 10^5/\text{ml}$ διαλύματος για το αμπέλι και $15 \times 10^5/\text{ml}$ για τον καπνό. Από τις τιμές Km της Put (5mM για τον καπνό και 20mM για το αμπέλι) φαίνεται ότι υπάρχει μεγαλύτερη συγγένεια της Put με το μόριο-μεταφορέα στον καπνό. Σε υψηλές εξωτερικές συγκεντρώσεις Put (0-100mM) η πρόσληψη ήταν 980 και 45 $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$ όγκου πρωτοπλαστών για το αμπέλι και τον καπνό αντίστοιχα ενώ για την Spd οι αντίστοιχες τιμές ήταν 924 και 52 $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$ ανά όγκο πρωτοπλαστών. Σε κύτταρα καρότου, πρωτοπλάστες και χυμοτόμα, max πρόσληψης παρατηρήθηκε σε 1-2 min (Pistocchi *et al.*, 1988). Στους πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνού δεν υπήρξε φάση υστέρησης στην έναρξη πρόσληψης σε αντίθεση με τους πρωτοπλάστες μπζελιού, οι οποίοι αρχίζουν να προσλαμβάνουν εξωγενή Spd μόνο μετά από μια περίοδο επώασης 20 h (Joshi *et al.*, 1983). Κατά την διεξαγωγή πειραμάτων πρόσληψης παρατηρήθηκε δέσμευση πολυαμινών σε μεμβράνες, το ποσό δε της ενωματοποιημένης ραδιενέργειας μειώθηκε όταν τα οργανίδια πλύθηκαν με 100mM μη σημασιμένης Put (Bagni and Pistocchi, 1990).

Η επίδραση του pH στην πρόσληψη Put από πρωτοπλάστες καπνού με δυο max, ένα σε pH 5 και ένα σε pH 8 συμφωνεί με τη max πρόσληψη σε pH 5-5.5 και 8, που αναφέρθηκε, σε πέταλα από *Saintpaulia ionantha* (Bagni and Pistocchi, 1985). Η ύπαρξη δύο τιμών pH, με max στην

πρόσληψη σημασμένης Put από πρωτοπλάστες καπνού, μπορεί να ερμηνευτεί από το ουδέτερο φορτίο σε βασικό pH και από θετικό φορτίο Put σε τιμές όξινου pH (Bagni and Pistocchi, 1985). Σε τιμές ενδοκυτταρικού pH, οι πολυαμίνες είναι πρωτονιωμένες και συνδέονται με τις μεμβράνες και τα κυτταρικά τοιχώματα (Morris and Harada, 1980, Young and Kaus, 1983). Τόσο το κυτταρικό τοίχωμα όσο και η πλασματική μεμβράνη αποτελούν τόπο σύνδεσης των πολυαμινών. Ως πολυκαπόντα, αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τα ανιονικά συστατικά των μεμβρανών ή με φωσφολιπίδια τεχνητών συστημάτων (πρωτοπλάστες), με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση των πρωτοπλαστών και άλλων οργανιδίων.

Στα ανώτερα φυτικά κύτταρα υπάρχουν πολλοί τύποι καναλιών ιόντων Ca^{2+} , που ρυθμίζονται από διάφορους μηχανισμούς (Schroeder and Thibaut, 1991). Ειδικότερα, σε κύτταρα καρότου, ιόντα ασβεστίου σε συγκέντρωση 10mM αύξησαν την πρόσληψη Put ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είχαν παρεμποδιστικό αποτέλεσμα (Pistocchi and Bagni, 1990, Kanchanaroom *et al.* 1991). Η πρόσληψη της Spd και Spm αυξήθηκε σε συγκέντρωση Ca^{2+} μεταξύ 10 μ M και 1 mM (Bagni and Pistocchi, 1988). Η απομάκρυνση των ιόντων ασβεστίου από το διάλυμα μεταφοράς προκάλεσε γρήγορη πτώση του ρυθμού πρόσληψης της σερίνης από καλλιεργούμενα κύτταρα καπνού (Smith, 1978). Στους πρωτοπλάστες καπνού και αμπελιού η παρουσία Ca^{2+} έδειξε μικρή αναστολή στην πρόσληψη Put, σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 0,1 μ M όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, ενώ για την πρόσληψη Spd, μόνο σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 5mM παρατηρήθηκε παρεμπόδιση και στα δύο φυτικά είδη.

Σε πέταλα *Saintpaulia ionantha* οι Pistocchi *et al.* (1986) έδειξαν ότι συγκεντρώσεις Ca^{2+} 17 mM αύξησαν την πρόσληψη Put. Όμως σε

μεταγενέστερη αναφορά (Pistocchi *et al* 1987) όπου χρησιμοποίησαν καλλιέργειες αιωρούμενων κυττάρων καρόττου αναφέρουν ότι τα Ca^{2+} σε συγκέντρωση 1 μM αυξάνουν την πρόσληψη Put κατά 35% αλλά την αναστέλλουν σε συγκεντρώσεις μεταξύ 50 μM και 1 mM. Πρότείνουν έτσι ότι τα Ca^{2+} αναστέλλουν ανταγωνιστικά την διέλευση της Put από το πλασμαλήμμα. Οι Davis and Riston (1988) αναφέρουν ότι τα ιόντα Ca^{2+} είναι ανταγωνιστικός αναστολέας της πρόσληψης Put στο νηματοειδή μύκητα *Neurospora crassa*. Οι DiTomaso *et al* (1992) μελέτησαν την επίδραση ανόργανων κατιόντων στην πρόσληψη Put από ρίζες σπορόφυτων καλαμποκιού και βρήκαν ότι το σύστημα μεταφοράς της Put αναστέλλεται ανταγωνιστικά από διοθενή κατιόντα (όπως Ca^{2+} και paraquat) όπου το +2 φορτίο προκύπτει από διαφορετικές μονοσθενείς αμινικές ομάδες και που διαχωρίζονται από τις ίδιες ατομικές διαστάσεις όπως στην Put. Όμως η πρόσληψη της Put αναστέλλεται μη ανταγωνιστικά από άλλα πολυσθενή κατιόντα, συμπεριλαμβανομένων την Ca^{2+} , Mg^{2+} , La^{3+} και της Spm τα οποία δεν έχουν όμοια κατανομή φορτίων. Το μη ανταγωνιστικό αποτέλεσμα είναι προφανώς λόγω της κάλυψης του φορτίου, πρόσδεσης στην πρωτεϊνη μεταφοράς της Put, ή σε αλληλεπιδράσεις με τη λιπδική διπλοστοιβάδα.

Από τη χρήση των αναστολέων Na-orthovanadate, Sodium Arsenate (Ars), και CCCP προέκυψε ότι οι πολυαμίνες Put και Spd μεταφέρονται ενεργά σε πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνού, η δε ενέργεια προέρχεται κυρίως από το ATP που συντίθεται μέσω γλυκόλυσης. Η πρόσληψη PAs από πρωτοπλάστες καπνού ενεργοποιείται από την ATPase της πλασματικής μεμβράνης, ενώ δεν ισχύει το ίδιο για τους πρωτοπλάστες αμπελιού. Ενεργά συστήματα πρόσληψης PAs έχουν επίσης περιγραφεί σε κύτταρα και πρωτοπλάστες καρόττου (Pistocchi and Bagni, 1990). Σε πρωτοπλάστες αμπελιού, η πρόσληψη γλυκόζης και

αμινοξέων αναστάλη από τους αναστολείς του ATP μεταβολισμού (Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis, 1989, 1991).

Η παρουσία πολυαμινών αποθηκευμένων στο χυμότοπο, ο εντοπισμός τους σε άλλα οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, η αλληλεπίδραση τους με συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και η ύπαρξη συνδεδεμένων πολυαμινών καθώς και των οξειδωσών των πολυαμινών σημαίνουν ότι η ρύθμιση των ενδογενών επιπέδων των πολυαμινών είναι πολυπαραγοντικό φαινόμενο. Έτσι παρόλη την υψηλή εσωτερική συγκέντρωση (σε millimolar), με μέγιστο σε κύτταρα φυτικών όγκων (tumors) που φθάνουν τα 30mM, υπάρχει αναγκαιότητα για εξωγενείς πολυαμίνες (σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 10 έως 100μM) για επαγωγή κυτταρικής διαίρεσης όταν η ενδογενής συγκέντρωση είναι μικρότερη από 10μM. Η παρουσία μιας τέτοιας υποκυτταρικής κατανομής, η γρήγορη μετατροπή τους από ελεύθερες σε δεσμευμένες και η ενεργή διέλευση τους στη μήτρα των μιτοχονδρίων και μέσω του πλασμαλλήματος είναι μερικές υποθέσεις για το πως τα φυτά ρυθμίζουν ή ανταποκρίνονται στις πολυαμίνες (Bagni and Pistocchi, 1990).

Συμπερασματικά, οι πρωτοπλάστες και από τα δύο φυτικά είδη, που μελετήθηκαν προσλαμβάνουν πολυαμίνες, με σύστημα μεταφοράς ενεργοποιούμενο από τη σύνθεση ATP μέσω γλυκόλυσης φθάνοντας σε κορεσμό εντός 5 min. Διαφορές παρουσιάζουν οι πρωτοπλάστες καπνού στους οποίους η πρόσληψη ενεργοποιείται και από την ATPase της πλασματικής μεμβράνης, επίσης παρουσιάζουν μέγιστα πρόσληψης Put σε δύο τιμές pH 5 και 8, ενώ οι πρωτοπλάστες αμπελιού μόνο σε pH 8. Τα ιόντα ασβεστίου σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10 μM αναστέλλουν την πρόσληψη Put. Η πρόσληψη Spd αναστέλλεται από συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0.1mM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

**ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ
ΣΗΜΑΣΜΕΝΗΣ ΕΣΩΓΕΝΟΥΣ PUT ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΟΥΣ
ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΕΣ ΑΜΠΕΛΙΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΝΟΥ.**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε πρωτοπλάστες αμπελιού (*Vitis vinifera* L. cv Sultanina) και καπνού (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi), που καλλιεργηθήκαν για 9 μέρες, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών και η κατανομή τους στα ενδοκυτταρικά κλάσματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ολική Put αυξήθηκε στους πρωτοπλάστες καπνού ενώ στους πρωτοπλάστες αμπελιού παρουσίασε διακύμανση με max την 1η, 5η και 9η μέρα. Η αύξηση στους πρωτοπλάστες καπνού προήλθε από τα συνδεδεμένα κλάσματα Put ενώ στο αμπέλι παρουσιάζεται ίδιο πρότυπο διακύμανσης και στα τρία κλάσματα. Η ολική Spd στον καπνό μειώνεται την 1η μέρα και αυξάνεται στη συνέχεια ενώ στο αμπέλι, μη παρουσιάζεται την 3η μέρα. Η ολική Spm παρουσίασε τη μικρότερη διακύμανση κατά το ίδιο χρονικό διάστημα. Η μεταβολική τύχη ραδιενεργά σημασμένης Put στα δύο φυτικά είδη-μοντέλα που μελετήθηκαν, έδειξε ότι στους πρωτοπλάστες αμπελιού μεγαλύτερο ποσοστό μετατρέπεται σε άλλες πολυαμίνες. Η ενσωμάτωση της σημασμένης Put διέφερε στα PH κλάσματα των πολυαμινών των δύο φυτικών ειδών, παρουσιάζοντας αύξηση στον καπνό, ενώ στο αμπέλι σταθερή μείωση με το χρόνο.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι λόγοι της αποτυχίας των πρωτοπλαστών από σιτηρά και άλλα δύσκολα αναγεννώμενα φυτικά είδη να επανενταχθούν στον κυτταρικό κύκλο και να αναγεννηθούν *in vitro* είναι κατά το πλείστον άγνωστοι (Flores *et al.* 1981, Vasil and Vasil, 1980). Το αμπέλι (*Vitis vinifera* L) είναι ένα φυτικό είδος, του οποίου οι πρωτοπλάστες μεσοφύλλου δεν

αναγεννώνται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τους ενώ ο καπνός (*Nicotiana tabacum*) είναι ένα φυτικό είδος με μεγάλη δυνατότητα αναγέννησης (Burtin *et al* 1989). Οι πρωτοπλάστες αμπελιού δείχνουν κανονικά χαρακτηριστικά πρόσληψης σακχάρων και αμινοξέων από το διάλυμα καλλιέργειας (Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis, 1990, 1991), αποδεικνύοντας έτσι ότι οι μηχανισμοί μεταφοράς των κυτταρικών μεμβρανών λειτουργούν κατάλληλα. Έχουν επίσης την ικανότητα να ενσωματώνουν σημασμένα πρόδρομα στοιχεία σε νεοσυνηθέμενα κυτταρικά τοιχώματα (Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1991a). Παραπέρα τροποποιήσεις στην σύνθεση του διαλύματος καλλιέργειας αν και είχαν ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση των ποσοτών βιωσιμότητας, δεν προώθησαν την ικανότητα των πρωτοπλαστών για διαίρεση και σχηματισμό μικροκάλλων (Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1991β). Το οξειδωτικό στρες που επάγεται κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών και την επακόλουθη καλλιέργεια θεωρείται ως ένας από τους πιθανούς παράγοντες που συντελούν στην μη αναγέννηση των εκφύτων και πρωτοπλαστών (Benson and Roubelakis-Angelakis, 1993, 1994; Ishii 1988; Siminis *et al* 1993; 1994) και οι πολυαμίνες έχουν προταθεί ότι δρουν σαν κυτταρικά αντιοξειδωτικά μαζί με τη γλουταθειόνη, α-τοκοφερόλη και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, ασκορβικό οξύ, φλαβονοειδή, καρτενοειδή.

Οι Flores and Galston (1984) αναφέρουν ότι κύτταρα μεσοφύλλου βρώμης, ένα άλλο δύσκολα αναγεννώμενο φυτικό είδος, όταν εκτίθενται στο ωσμωτικό που χρησιμοποιείται στην απομόνωση των πρωτοπλαστών, έδειξε γρήγορη και μεγάλη αύξηση της Put με βαθμιαία μείωση της Spd και Spm. Αυτή η ανταπόκριση παρατηρήθηκε επίσης και σε άλλα αγρωστώδη. Δείχθηκε επίσης ότι ωσμωτικά επαγόμενη συσσώρευση Put σε αγρωστώδη ήταν αποτέλεσμα ενεργοποίησης όχι μόνο του μονοαμινοξειδωτικού

της ADC (Arginine decarboxylase), αλλά επίσης της αναστολής της Spd synthase, του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή της Put σε Spd. Προμεταχείριση φύλλων βρώμης με DFMA, αναστολέα της ADC, είχε ως αποτέλεσμα, αυξημένα επίπεδα Spd και Spm μετά από ωσμωτική μεταχείριση και αύξηση της βιωσιμότητας των πρωτοπλαστών βρώμης (Tiburcio *et al.* 1986). Όταν κομμάτια φύλλου που είχαν υποστεί καταπόνηση λόγω οξίνισης, τροφοδοτήθηκαν με ραδιοσημασμένη αργινίνη, η Put σημάνθηκε γρήγορα ενώ η Spd και η Spm όχι (Young, 1984).

Ευχρονισμένα κύτταρα *Catharanthus roseus* σε υγρή αιωρούμενη καλλιέργεια, που υπέστησαν μεταχείριση με αναστολείς των ADC και ODC συσσωρεύθηκαν στην G1 φάση, ενώ προσέθηκε αναστολέων της Spd synthase δεν είχε αποτέλεσμα στην κατανομή των κυττάρων. Κατά τον κυτταρικό κύκλο, παρατηρήθηκαν 2 max στην ενδογενή Put και Spd, ένα πριν την σύνθεση DNA και ένα δεύτερο πριν από την κυτοκίνηση. Οι ενεργότητες της ADC ήταν πολύ υψηλότερες από της ODC κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Maki *et al.* 1991). Σε ιστό *Helianthus tuberosus* αξιολογήθηκε αύξηση πολυαμινών συμβαίνει πολύ νωρίς κατά την G1 φάση, επακόλουθο της σύνθεσης του RNA, ενώ δεύτερη σύνθεση Put και συσώρευση PAs αρχίζει κατά την διάρκεια της S-phase. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης μειώνεται η σύνθεση και η συσώρευση PAs (Serafini-Fracassini *et al.* 1980). Επίσης 1-hydroxycinnamoyl Put παρεμβαίνει *in vitro* μαζί με τις ορμόνες στη ρύθμιση της κυτταροδιαίρεσης και τη διαφοροποίηση των εκφύτων φύλλων καπνού (Martin *et al.* 1985). Μια στενή σχέση μεταξύ μερισωματικής δραστηριότητας και των πολυαμινών *in situ* σε ρίζες καλαμποκιού ενισχύει την άποψη ότι οι πολυαμίνες ίσως συμμετέχουν στην επαγωγή της μερισωματικής ενεργότητας (Schwartz *et al.* 1986). Σε καρπούς

μπλιάς (Bagri *et al.* 1984) βρέθηκε ότι εξωγενής Put μετακινήθηκε στο φύλλο και μεταβολίσθηκε σε Spd και Spm. Σε σπορόφυτα σόγιας που είχαν σμυανθεί με ^{14}C -Put, συντέθηκαν σημασμένα γ-αμινοβουτυρικό οξύ, γλουταμίνη, ασπαραγίνη και οργανικά οξέα. Τα τρία πρώτα επίσης παράχθησαν από Put σε καλλιέργεια κοτυληδόνων πεύκου (Kumar and Thorpe, 1989).

Οι πολυαμίνες και το αιθυλένιο είναι ανταγωνιστικά στο γηρασμό και τα δύο μοιράζονται ένα κοινό ενδιάμεσο, S-adenosylmethionine για τη βιοσύνθεση τους (Smith, 1985). Όταν η αποδόμηση των PAs μπορεί εν μέρει να ρυθμίζει τα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών, είναι δυνατόν οι δύσκολα αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες να διαθέτουν ένα διαφορετικό καταβολισμό ή σύνδεση των πολυαμινών, από ότι οι αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες.

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο φυτικά είδη, ένα δύσκολα αναγεννώμενο (*Vitis vinifera*) και ένα εύκολα αναγεννώμενο (*Nicotiana tabacum*) για απομόνωση πρωτοπλαστών μεσοφύλλου. Προσδιορίθηκαν τα ενδογενή επίπεδα Put, Spd και Spm στο διαλυτό (S), διαλυτό συνδεμένο (SH) και αδιάλυτο συνδεμένο (PH) κλάσμα, μετά την απομόνωση και κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Επίσης μελετήθηκε η μεταβολική τύχη ^{14}C -Put στους ίδιους πρωτοπλάστες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Φυτικό υλικό: Χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* φυτά αμπελιού (*Vitis vinifera* L. cv Sultanina), που προήλθαν από έκφυτα ενός κόμβου φυτών απαλλαγμένων από ιώσεις και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς ορμόνες, όπως έχει ήδη περιγραφεί (Roubelakis-Angelakis and Zivanovita, 1991), και σπορόφυτα καπνού (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi),

που αναπύχθηκαν σε υαλόφρακτο θερμοκήπιο κάτω από ρυθμιζόμενες συνθήκες. Φύλλα από το 4ο έως το 10ο χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πρωτοπλαστών.

Απομόνωση Πρωτοπλαστών: Πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνού απομονώθηκαν, όπως ήδη έχει περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Μετά το τέλος της διαδικασίας απομόνωσης, οι πρωτοπλάστες επαναωθήθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα καλλιέργειας, σε πυκνότητα $5 \cdot 10^5$ πρωτοπλάστες αμπελιού ή $1,5 \cdot 10^4$ πρωτοπλάστες καπνού ανά ml θρεπτικού διαλύματος, μοιράστηκαν σε τρυβλία (4ml στο καθένα) και τοποθετήθηκαν για καλλιέργεια σε σκοτεινό θάλαμο στους 27°C . Δειγματοληψίες έγιναν σε χρόνο μηδέν (στο τέλος του χρόνου επώασης με το ραδιενεργό προϊόν) και μετά 1, 3, 5, 7, και 9 μέρες καλλιέργειας.

Ανάλυση ενδογενών πολυαμινών: Τέσσερα ml από το αιώρημα της καλλιέργειας με $2 \cdot 10^5$ πρωτοπλάστες αμπελιού ή $6 \cdot 10^5$ πρωτοπλάστες καπνού φυγοκεντρήθηκαν σε 1000g, για 10min επαναωθήθηκαν σε διάλυμα 2,5% KCl και 1% MgSO_4 (διάλυμα πλυσίματος) και μετά από νέα φυγοκέντρηση, το ίζημα με τους πρωτοπλάστες καταψύχθηκε στους -20°C μέχρι την ανάλυση. Για την μέτρηση των ενδογενών πολυαμινών, έγινε ανάλυση με τη χρήση χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC), όπως έχει ήδη περιγραφεί στο Κεφ. 1 (Kotzabasis *et al* 1993).

Μεταβολική τύχη ^{14}C -Put: Για να μελετηθεί η μεταβολική τύχη της εξωγενούς ^{14}C -Put, το ραδιοσημασμένο υπόστρωμα προστέθηκε στο αιώρημα των πρωτοπλαστών, αμέσως μετά την απομόνωση, επί 7 ώρες, σε συγκέντρωση $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ αιωρήματος με $5 \cdot 10^5$ πρωτοπλάστες αμπελιού ή $1,5 \cdot 10^4$ πρωτοπλάστες καπνού ανά ml διαλύματος πρόσληψης, όπως προέκυψε από το Κεφ. 2. Στη συνέχεια, οι πρωτοπλάστες φυγοκεντρήθηκαν στα 1000g για 10min, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, που περιείχε το ραδιενεργό υπόστρωμα και επαναωθήθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα GCWR

(Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1992) στην αρχική τους συγκέντρωση, μοιράστηκαν σε τρυβλία (4ml στο καθένα) και τοποθετήθηκαν για καλλιέργεια, όπως και για τον προσδιορισμό των ενδογενών πολυαμινών.

Προσδιορισμός μεταβολικών προϊόντων πολυαμίνης: Για να προσδιοριστούν τα μεταβολικά προϊόντα της ραδιενεργά σημασμένης Put στους πρωτοπλάστες, έγινε ανάλυση πολυαμινών, με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε 5% υπερχλωρικό οξύ (PCA) σύμφωνα με την μέθοδο των Tiburcio et al (1985, 1986). Μετά από φυγοκέντρηση σε 27000g, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε (εκχύλισμα S) και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ίσο όγκο 1N NaOH. Διακόσια μl από το υπερκείμενο (εκχύλισμα S) και από το διαλυτοποιημένο ίζημα αναμίχθηκαν (L1) με 200μl HCl 12N και υδρολύθηκαν σε γυάλινες αμπούλες, που έκλεισαν με τη βοήθεια φλόγας. Η υδρόλυση έγινε στους 110°C για 18 ώρες και το προϊόν εξατμίστηκε στους 75°C κάτω από ρεύμα αέρα. Το ξηρό υπόλειμμα επαναιωρήθηκε σε 200μl PCA. Από το υπερκείμενο, που περιείχε τις ελεύθερες πολυαμίνες (S), το υδrolυμένο υπερκείμενο με τις δεσμευμένες πολυαμίνες (SH), και το υδrolυμένο ίζημα με τις πολυαμίνες που ήταν δεσμευμένες σε πρωτεΐνες και άλλα μεγαλομόρια (PH), χρησιμοποιήθηκαν 200μl για σύνδεση με την φθορίζουσα ουσία dansylchloride, όπως οι Flores and Galston (1982) έχουν περιγράψει. Με τον ίδιο τρόπο επεξεργάστηκαν πρότυπα διαλύματα πολυαμινών με συγκέντρωση 20 nM οπότε η κάθε μια, χωριστά ή σε συνδυασμό. Τα δείγματα αναλύθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε υψηλής καθαρότητας silica gel πλάκες (Sigma T 6645). Σαράντα μl επεξεργασμένου εκχυλίσματος φορτώθηκαν από κάθε δείγμα και το χρωματόγραμμα αναπτύχθηκε για δύο περίπου ώρες με σύστημα

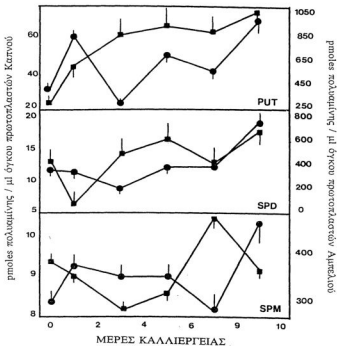
διαλυτών κυκλοεξάνια: οξικό αιθύλιο, σε αναλογία 8:4 (κ.ο). Μετά το τέλος του χρόνου ανάπτυξης και αφού η πλάκα στέγνωσε, οι ζώνες που προέκυψαν περιγράφησαν, η κάθε μια χωριστά, με μολύβι πάνω από λάμπα υπεριώδους φωτός. Μετά την ταυτοποίηση των ζωνών, που προέκυψαν, με τη χρήση γνωστών πολυαμινών, προσδιορίστηκε το ποσό της ραδιενέργειας, που περιείχαν, κόβοντας την πλάκα της χρωματογραφίας σε ταινίες πλάτους 0,5cm, που στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια με υγρό σπινθηριστικό και μετρήθηκαν σε Beckman Scintillation Counter LS 6000SE μετρητή ραδιενέργειας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η διακύμανση των ενδογενών πολυαμινών κατά τη διάρκεια των 9 πρώτων ημερών καλλιέργειας φαίνονται στις Εικόνες 1,2,3 και 4. Η ολική Ρut αυξάνει στους πρωτοπλάστες καπνού ενώ στους πρωτοπλάστες αμπελιού μειώνεται την 3η μέρα και στις επόμενες αυξάνεται. Η αύξηση αυτή για τον καπνό προέρχεται από την αύξηση στα δύο κλάσματα συνδεδεμένων πολυαμινών (SH και PH), όπως φαίνεται στις Εικόνες 2 και όχι από τις ελεύθερες πολυαμίνες (Εικ. 2α). Στους πρωτοπλάστες αμπελιού παρατηρείται αύξηση στο κλάσμα S και PH την 2η μέρα, ενώ μειώνεται το κλάσμα SH. Την 3η μέρα μειώνονται και τα τρία κλάσματα για να αυξηθούν στη συνέχεια το S και το SH κλάσμα, ενώ το αδιάλυτο παραμένει στα ίδια επίπεδα της 3ης μέρας. Η ολική Spd στον καπνό, μειώνεται την 1η μέρα για να αυξηθεί στη συνέχεια. Στο αμπέλι την αρχική τάση μείωσης μέχρι την 3η μέρα ακολουθεί αύξηση τις επόμενες μέρες (Εικ. 1β, 3). Η Spm φαίνεται να έχει τη μικρότερη διακύμανση κατά το χρονικό διάστημα της καλλιέργειας και στα δύο είδη πρωτοπλαστών και δεν παρουσιάζει διαφορές ανάμεσα στα τρία κλάσματα (Εικ. 1γ, 4).

Σε χρόνο μηδέν, αμέσως μετά την πρόσληψη ραδιενεργά

σημασμένης πουτρεΐνης από πρωτοπλάστες αμπελιού, το 77,5% της συνολικής ραδιενέργειας ήταν σε Put, ενώ το 19,1% μεταβόλιστηκε σε Spd και το 3,3% σε Spm, ενώ στον καπνό τα ποσοστά ήταν 81%, 15% και 3,3%,



Εικόνα 1. Ενδογενείς πολυαμίνες (α: ολική Put β: ολική Spd και γ: ολική Spm) σε πρωτοπλάστες καπνού (*Nicotiana tabacum* L, αριστερή κλίμακα ■) και αμπελιού (*Vitis vinifera* L, δεξιά κλίμακα ●) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας.

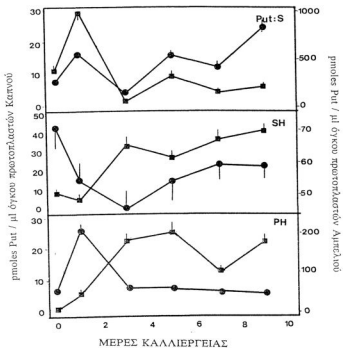
αντίστοιχα.

Κατά τις μέρες καλλιέργειας, η κατανομή των ραδιενεργών ΡΑς και στα δύο είδη πρωτοπλαστών, είναι όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 5. Η μείωση του συνολικού ποσού ραδιενεργών πολυαμινών που παρατηρείται πρέπει να οφείλεται στην μετατροπή τους σε άλλα προϊόντα μεταβολισμού εκτός των Ρut, Spd και Spm που προσδιορίστηκαν. Η ραδιενεργές ΡΑς κατανέμονται όπως περιγράφεται παρακάτω και για τα δύο είδη πρωτοπλαστών.

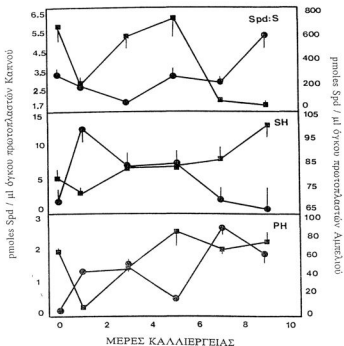
α. Ελεύθερες διαλυτές πολυαμίνες. Η αρχική ποσότητα σημασμένης Ρut μειώθηκε συνεχώς κατά τις μέρες καλλιέργειας. Συγχρόνως την πρώτη μέρα αυξήθηκαν τα επίπεδα της σημασμένης Spd και Spm. Τις επόμενες μέρες μειώθηκαν, όπως και η Ρut και στα δύο είδη πρωτοπλαστών (Εικ. 6α, 7α, 8α).

β. Δεσμευμένες διαλυτές πολυαμίνες. Στις διαλυτές δεσμευμένες πολυαμίνες οι σημασμένες ΡΑς ήταν ανάλογες με τις ελεύθερες με διαφοράς την πρώτη μέρα ανάμεσα στα δύο είδη πρωτοπλαστών για την Spd και την Spm. Πιο συγκεκριμένα, η Spd παρέμεινε μέχρι και την 1η μέρα στα αρχικά επίπεδα, ενώ η Spm αυξήθηκε για λίγο. Μετά μειώθηκε στο αμπέλι ενώ στον καπνό παρουσίασε θεαματική αύξηση την 1η μέρα, μειώθηκε σημαντικά τις επόμενες και επανήλθε στα αρχικά σχεδόν επίπεδα (Εικ. 6β, 7β, 8β).

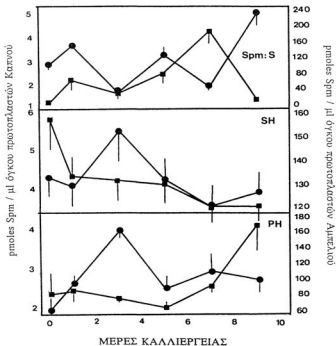
γ. Αδιάλυτο κλάσμα δεσμευμένων πολυαμινών. Σαυτό το κλάσμα παρατηρήθηκαν διακριτές διαφορές ανάμεσα στα δύο είδη πρωτοπλαστών (Εικ. 6γ, 7γ, 8γ). Για την Ρut, στο αμπέλι υπήρξε μια μικρή αύξηση, μετά μειώθηκε όπως και στα άλλα κλάσματα. Αντίθετα στους πρωτοπλάστες καπνού παρατηρήθηκε αύξηση στο κλάσμα αυτό της δεσμευμένης Ρut μέχρι την τρίτη μέρα και μετά έμεινε σταθερή. Η ολική Spd στους πρωτοπλάστες καπνού παρέμεινε στα ίδια περίπου επίπεδα



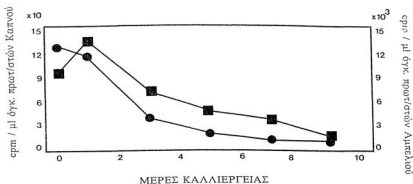
Εικόνα 2 Κλάσματα α: S, β: SH, γ: PH Put σε πρωτοπλάστες καπνού (*Nicotiana tabacum* L, αριστερή κλίμακα ■) και αμπέλιου (*Vitis vinifera* L, δεξιά κλίμακα ●) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας.



Εικόνα 3. Κλάσματα α: S, β: SH, γ: PH Spd σε πρωτοπλάστες καπνού (*Nicotiana tabacum* L, αριστερή κλίμακα ■) και αμπελιού (*Vitis vinifera* L, δεξιά κλίμακα ●) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας

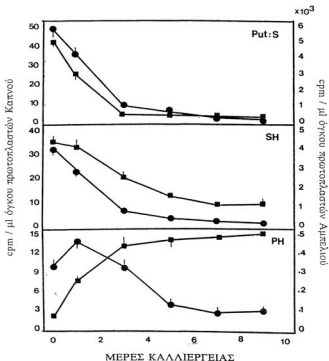


Εικόνα 4. Κλάσματα α: S, β: SH, γ: PH Spm σε πρωτοπλάστες καπνού (*Nicotiana tabacum* L, αριστερή κλίμακα ■) και αμπελιού (*Vitis vinifera* L, δεξιά κλίμακα ●) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας.

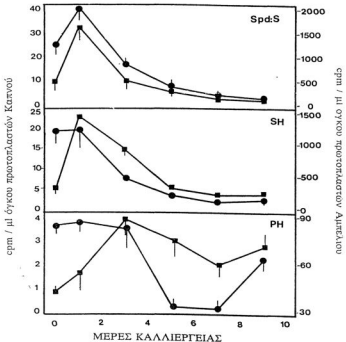


Εικόνα 5. Μεταβολή της ραδιενέργειας (ενωματοωμένης σε πολυαμίνες) σε πρωτοπλάστες καπνού (*Nicotiana tabacum* L, αριστερή κλίμακα ■) και αμπελιού (*Vitis vinifera* L, δεξιά κλίμακα ●) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας.

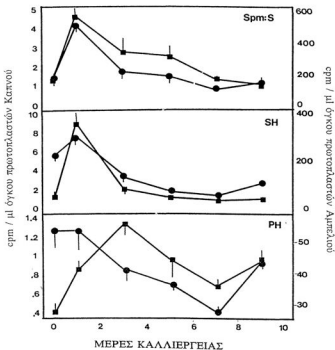
μέχρι την πρώτη μέρα. Στους πρωτοπλάστες καπνού παρατηρήθηκε αύξηση μέχρι την τρίτη μέρα και στη συνέχεια μειώθηκε χωρίς όμως να επανέλθει στα αρχικά επίπεδα μέχρι την 9η μέρα (Εικ. 9β). Η Spm στους πρωτοπλάστες καπνού και αμπελιού παρουσίασε και αυτή αύξηση μέχρι την 1η μέρα, ενώ μειώθηκε στη συνέχεια μέχρι την 9η (Εικ. 9).



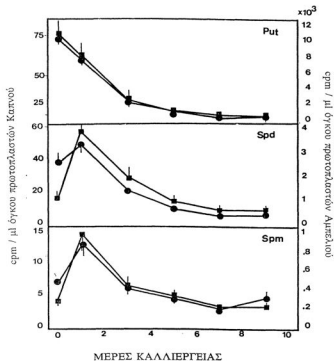
Εικόνα 6. Ενσωμάτωση ραδιοενεργού Put στα τρία κλάσματα της (α: S, β: SH, γ: PH) σε πρωτοπλάστες καπνού (*Nicotiana tabacum* L., αριστερή κλίμακα ■) και αμπελιού (*Vitis vinifera* L., δεξιά κλίμακα ●) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας.



Εικόνα 7. Ενωμάτωση ραδιενέργειας σε Spd ως μεταβολικό προϊόν της ραδιενεργού Put και στα τρία κλάσματα της (α: S, β: SH, γ: PH) σε πρωτοπλάστες καπνού (*Nicotiana tabacum* L., αριστερή κλίμακα ■) και αμπελιού (*Vitis vinifera* L., δεξιά κλίμακα ●) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας.



Εικόνα 8. Ενσωμάτωση ραδιενέργειας σε Spm ως μεταβολικό προϊόν της ραδιενεργού Put και στα τρία κλάσματα της (α: S, β: SH, γ: PH) σε πρωτοπλάστες καπνού (*Nicotiana tabacum* L., αριστερή κλίμακα ■) και αμπελιού (*Vitis vinifera* L., δεξιά κλίμακα ●) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας.



Εικόνα 9. Ενσωμάτωση ραδιενέργειας στις πολυαμίνες α: Put, β: Spd και γ: Spm, σε πρωτοπλάστες καπνού (*Nicotiana tabacum* L, αριστερή κλίμακα ■) και αμπελιού (*Vitis vinifera* L, δεξιά κλίμακα ●) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας.

ΕΥΖΗΤΗΣΗ

Μετά τη μελέτη των συνθηκών πρόσληψης πολυαμινών από δυο είδη πρωτοπλαστών, που το ένα προέρχεται από ένα εύκολα αναγεννώμενο φυτικό είδος (*Nicotiana tabacum*) και το άλλο από ένα μη αναγεννώμενο (*Vitis vinifera*) (Κεφ. 2), μελετήθηκαν οι ενδογενείς πολυαμίνες και συσχετίσθηκαν με φυσιολογικές λειτουργίες του πρωτοπλάστη, όπως η ανασύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και η επιμήκυνση του, προκειμένου να μπει στη διαδικασία της διαίρεσης καθώς και η μεταβολική τύχη της προσληφθείσας ^{14}C -Put.

Η μέση διάμετρος των πρωτοπλαστών αμπελιού κυμαίνεται από 12-44 μm και η απόδοση σε πρωτοπλάστες ανά γραμμάριο φρέσκου βάρους είναι 25-30X10⁶ (Roubelakis-Angelakis and Theodoropoulos, 1990). Συγκρίνοντας όμως τα αποτελέσματα των ενδογενών πολυαμινών στα φύλλα και στους πρωτοπλάστες θα ανεμένετο οι διαφορές να είναι της τάξης 25-30 φορές λιγότερες πολυαμίνες στους πρωτοπλάστες από τα φύλλα. Η 14 φορές αυξημένη συγκέντρωση πολυαμινών στους πρωτοπλάστες αμπελιού ίσως είναι αποτέλεσμα των συνθηκών καταπόνησης, στη διάρκεια απομόνωσης (ενζυματική δράση, απομάκρυνση κυτταρικού τοιχώματος και σαν συνέπεια ωσμωτικό στρες), που όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι δυνατόν να αυξήσουν τα επίπεδα των πολυαμινών μέχρι και 60 φορές. Η αύξηση στα επίπεδα της Put έχει παρατηρηθεί ότι γίνεται πολύ γρήγορα μετά την εφαρμογή του παράγοντα, που προκαλεί το στρες, ενώ συγχρόνως αυξάνεται και η ενεργότητα της ADC και έτσι εξηγείται και η αύξηση στην πρωτεϊνοσύνθεση, που παρατηρείται κατά την ίδια χρονική περίοδο (Flores and Galston, 1982, 1984, Flores *et al.*, 1984, Siminis *et al.*, 1993).

Κατά την περίοδο καλλιέργειας των 9 ημερών σε πρωτοπλάστες αμπελιού και καπνού μπορεί κανείς να παρατηρήσει μια μικρή πτώση της ολικής Put, Spd και Spm την 1η μέρα καλλιέργειας στον καπνό, ενώ αμέσως μετά παρατηρείται αύξηση στην ολική Put και Spd, που παραμένει σταθερή σ' όλη τη χρονική διάρκεια, που προσδιορίστηκε (Εικ. 1, ολικές). Από την σύγκριση της διακύμανσης των ενδογενών πολυαμινών και των κλασμάτων τους φαίνεται ότι η αύξηση της ολικής Put και Spd προέρχεται από τα κλάσματα των συνδεδεμένων πολυαμινών, ενώ στις ελεύθερες τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Έχει αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια μιας αλλαγής στη μορφολογία ή την αύξηση, οι μεγαλύτερες αλλαγές συμβαίνουν ειδικά στα επίπεδα της δεσμευμένης Put (Martin-Tanguy *et al.* 1988). Σε έκφυτα από φύλλα καπνού ανιχνεύθηκαν αλλαγές στη δεσμευμένη Put πριν από την ορατή εμφάνιση των ριζών. Ενώ όμως η διακύμανση της Put και Spd στους πρωτοπλάστες καπνού φαίνεται να ταυτίζεται με φυσιολογικές διεργασίες, δεν υπάρχει ταυτόχρονη ανταπόκριση στους πρωτοπλάστες αμπελιού, όπου αυξάνει την 1η μέρα για να μειωθεί την 3η και να αυξηθεί ξανά την 5η μέρα. Η έλλειψη συγχρονισμού ανάμεσα στα δύο είδη πρωτοπλαστών είναι κατ' αρχήν αναμενόμενη, εφόσον πρόκειται για δύο είδη διαφορετικής προέλευσης και έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες βιοχημικές και φυσιολογικές μελέτες, όπου χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια φυτά-μοντέλα (Κατσιρντάκη, 1991).

Σε ότι αφορά τη μεταβολική τύχη εξωγενών πολυαμινών σε κύτταρα καρόττου, η Put που προσλήφθηκε, εντοπίστηκε κύρια στο διαλυτό κυττοπλασματικό κλάσμα και η Spd βρέθηκε περισσότερο στα κυτταρικά τοιχώματα. Σε πέταλα *Saintpaulia* η Put εντοπίστηκε κύρια στο διαλυτό και χυμοτοπακό κλάσμα (78 και 96%, αντίστοιχα) (Bagni *et al.* 1985, Pistocchi *et al.* 1987). Η κατανομή της σημασμένης Put μετά από 7

η πρόληψης έδειξε μείωση και στα δύο είδη, στο διαλυτό και μια αντίστοιχη αύξηση στο ΡΗ κλάσμα, με το χρόνο. Ειδικά σε πρωτοπλάστες καπνού, όπως φαίνεται στην Εικ. 6 είναι περισσότερο εμφανές, ενώ στους πρωτοπλάστες αμπελιού η τάση για μείωση είναι σταθερή. Επίσης, και στα δύο είδη πρωτοπλαστών, η Put μεταβολίζεται και μετατρέπεται σε ραδιενεργό Spd και Spm. Διαφορετική είναι η ενσωμάτωση στο αδιάλυτο κλάσμα ανάμεσα στα δυο είδη.

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να δει κανείς ότι η βασική διαφορά στη διακύμανση των επιπέδων των PAs στα δύο φυτικά είδη, που μελετήθηκαν, βρίσκεται στην ολική Put, όπου στους πρωτοπλάστες καπνού αυξάνεται και παραμένει στα ίδια επίπεδα ενώ στους πρωτοπλάστες αμπελιού παρουσιάζει πια την 1η, 5η και 9η μέρα. Διαφορετική ήταν και η ενσωμάτωση ραδιενεργού Put στα δύο φυτικά είδη και πιο συγκεκριμένα στο ΡΗ κλάσμα, όπου στον καπνό παρουσίασε αύξηση ενώ στο αμπέλι μειώθηκε με το χρόνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

**ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ ΚΑΙ ΤΑ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΤΟΥΣ ΕΝΖΥΜΑ
ΑΠΟΚΑΡΒΟΣΥΛΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΡΝΙΘΙΝΗΣ ΚΑΤΑ
ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΚΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΕ ΕΚΦΥΤΑ ΦΥΛΛΩΝ
ΑΜΠΕΛΙΟΥ.**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των ενδογενών, ελεύθερων και συνδεδεμένων πολυαμινών, πουτρεοΐνης οπερμίδινης και οπερμίνης (Put, Spd, Spm) αντίστοιχα και των βιοσυνθετικών τους ενζύμων, αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης και της αργινίνης (ODC και ADC) καταγράφηκαν σε εβδομαδιαία βάση, κατά την διάρκεια καλλογένεσης από έγκυτα φύλλων αμπελιού (*Vitis vinifera* L. cv Sultanina), που μεγάλωσαν σε υπόστρωμα Murashige-Skoog παρουσία 2 μM BAP και 5μM NAA στο σκοτάδι στους 25°C κατά την διάρκεια 10 εβδομάδων. Παρατηρήθηκε αύξηση στις πολυαμίνες, όταν εμφανίστηκαν οι ρίζες. Η διαμίνη Put κυριαρχούσε σε όλα τα κλάσματα (ελεύθερο, συνδεδεμένο διαλυτό και συνδεδεμένο αδιάλυτο) σε σύγκριση με τις άλλες δύο πολυαμίνες, ειδικά μεταξύ της 3ης και 5ης εβδομάδας, όταν η ριζογένεση ήταν φανερά. Οι ενεργότητες και των δύο ενζύμων αυξήθηκαν κατά την διάρκεια της καλλογένεσης και του σχηματισμού ριζών. Η ενεργότητα της ODC ήταν περίπου πέντε φορές μεγαλύτερη από της ADC.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι τεχνικές καλλιέργειας φυτικών ιστών, συμπεριλαμβανομένης της τεχνολογίας πρωτοπλαστών, έχουν βασισθεί σε μια μοναδική ικανότητα των φυτικών κυττάρων την ολοδυναμικότητα (totipotency). Αυτή η ικανότητα επιτρέπει στα φυτικά κύτταρα να αλλάζουν την σειρά της αναπτυξιακής έκφρασης του γενετικού τους κώδικα και αντί να εκφράσουν γονίδια, που περιλαμβάνονται σε αναπτυξιακή διαδικασία

κατάλληλη για τον ιστό, που ανήκουν τα κύτταρα, γίνονται ικανά να εκφράσουν μιτωτική δραστηριότητα (Roubelakis-Angelakis, 1993). Η αναγεννητική διαδικασία περιλαμβάνει εκτός από την κυτταρική διαίρεση και τη μορφογενετική έκφραση.

Η οργανογένεση είναι η διαδικασία με την οποία κύτταρα και ιστοί εξαναγκάζονται να υποστούν αλλαγές, που οδηγούν στην παραγωγή μιας μονόπολης δομής, δηλαδή αρχικά βλαστού ή ρίζας, των οποίων το αγγειακό σύστημα συχνά είναι σε επαφή με τους μητρικούς ιστούς (Thorpe 1993). Είναι γνωστό ότι οι πρωτοπλάστες και τα φυτικά παράγωγα από πολλά σημαντικά για την γεωργία φυτικά είδη, συμπεριλαμβανομένου και του αμπελιού, παρουσιάζουν άρνηση για πλήρη αναπαραγωγή φυτού, δηλαδή είναι ανίκανα να υποστούν κυτταρική αναπαραγωγή και/ή μορφογενετική έκφραση.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυαμίνες συμμετέχουν στην διαδικασία ριζογένεσης, που επάγεται από αυξίνες, αν και ο ιδιαίτερος ρόλος τους πρέπει να διευκρινισθεί ώστε να αποδειχθεί μια συναφής σχέση (Chriqui *et al* 1986, Friedman *et al* 1982, Heasser and Hess, 1972). Αλλαγές στην μορφολογία ή την αύξηση ενός εύκολα αναγενόμενου φυτικού είδους *in vitro* των εκφύτων καπνού, συνοδεύονταν από αλλαγές στα επίπεδα Put και οι μεγαλύτερες αλλαγές συνέβαιναν ειδικά στη συνδεμένη Put (Burtin, *et al* 1989, Martin-Tanguin *et al* 1988). Στο ίδιο φυτικό είδος οι Burtin *et al* (1990) βρήκαν σημαντική αύξηση στα επίπεδα υδροκιναμουλπουτρεσίνης κατά τις πρώτες 14 μέρες σε καλλιέργειες και μείωση μετά από 20 μέρες. Η ελεύθερη Put, Spd, και Spm σε έκφυτα φύλλου και ρίζες ήταν πάντα σε χαμηλά επίπεδα και παρατηρήθηκαν μικρές αλλαγές στις συγκεντρώσεις τους. Σε έκφυτα *Datura innoxia* μετά

από 2 μέρες καλλιέργειας η ελεύθερη Put ήταν 5-7 φορές μεγαλύτερη και η Spd 3-4 φορές μεγαλύτερη από ότι στα νεαρά φύλλα. Μετά από 2 εβδομάδες τα επίπεδα PA παρέμειναν υψηλά στις καλλιέργειες που επαγόταν ριζογένεση. Η Spm ήταν *in vivo* σε μετρήσιμες ποσότητες αλλά μόνο σε ίχνη *in vitro* (Chiriquí *et al* 1986). Επίσης, σε καλλιέργειες δίσκων φύλλων από *Passiflora* η ελεύθερη Put αυξήθηκε συνεχώς κατά τη διάρκεια 2 ημερών επαγωγής καλλογένεσης, η ελεύθερη Spd αυξήθηκε από τις 3 έως τις 7 μέρες και παρέμεινε σταθερή μετά, ενώ η ελεύθερη Spm δε μεταβλήθηκε (Desai and Metha, 1985). Στην ίδια εργασία, κατά την διάρκεια έναρξης ριζογένεσης, η ελεύθερη Put έδειξε μια μικρή αύξηση την 2η μέρα, ακριβώς πριν την εμφάνιση ορατών ριζών, ενώ ελεύθερη Spd και Spm παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα.

Παρ' όλη την πρόοδο, που έγινε στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με την δράση των PAs σε κυτταρικές λειτουργίες, ο ρόλος των ενδογενών PAs στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την οργανογένεση παραμένει ασαφής. Πρόσφατα οι Leshem *et al* (1991) χρησιμοποιώντας κοτυληδόνες πεπονιού βρήκαν ότι τα επίπεδα διαλυτών PAs ανά πρωτεΐνη αυξάνονταν με το χρόνο και στις βασικές (οργανογενετικές) περιοχές και στις κεντρικές (μη οργανογενετικές) περιοχές των κοτυληδόνων. Αυτό ίσως υποδηλώνει ότι οι αλλαγές, που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα των πολυαμινών, δεν προκλήθηκαν ή εξαρτήθηκαν από την αναγέννηση ρίζας και/ή βλαστού. Αντίθετα πρέπει να είναι ενδείξεις ή να προκαλούν συνθήκες, που να οδηγούν σε οργανογένεση.

Η Put, Spd, Spm συνδέονται μεταξύ τους με κοινό βιοσυνθετικό μονοπάτι, που προέρχεται από την αποκαρβοξυλίωση της ορνιθίνης ή της

αργινίνης για σύνθεση Put, η οποία μετά αμινοπροπυλιώνεται σε Spd και Spm (Tabor and Tabor, 1984). Ενώ η αποκαρβοξυλίωση της ορνιθίνης σε Put από την ODC είναι κοινό μονοπάτι για όλα τα ζωντανά κύτταρα, το μονοπάτι που οδηγεί από την αργινίνη σε αγματίνη, που καταλύεται από την ADC, και από την αγματίνη σε Put είναι αποκλειστικό για τα βακτήρια και τα φυτά (Schwartz *et al* 1986). Η ODC ρυθμίζει την βιοσύνθεση της Put κατά τα πρώτα και τα τελευταία στάδια ανάπτυξης ριζών στον καπνό. Σε έκφυτα φύλλου *Fassiflora* και *Distura innoxia* η ADC συμμετείχε κύρια στα τελευταία στάδια διαφοροποίησης και αύξησης των ριζών (Chriqui *et al*, 1986, Burtin *et al*, 1990, Geneve and Kester, 1991). Το DMFO, ένας αναστολέας της ODC, ήταν πιο δραστικό στην αναστολή του σχηματισμού συνδεμένης Put, ενώ το DFMA, αναστολέας της ADC, ανέστειλε επιτυχώς τη βιοσύνθεση Put. Σε έκφυτα φύλλου καπνού, η ODC ήταν ενεργή ως προς τη βιοσύνθεση υψηλών συγκεντρώσεων συνδεμένης Put (Burtin *et al* 1989, 1990).

Τα φυτικά κύτταρα έχουν την μοναδική ικανότητα να αναγεννώνται σε ολόκληρα φυτά, όταν μεγαλώνουν σε διάλυμα καλλιέργειας, που περιέχει τα κατάλληλα ορμονικά και θρεπτικά συστατικά. Έτσι, η ιστοκαλλιέργεια αποτελεί ένα καλό μοντέλο για την μελέτη της σχέσης ανάμεσα στις PAs και οργανωμένη καθώς και μη οργανωμένη αναπτυξιακή διαδικασία. Σε αυτό το κεφάλαιο προσδιορίστηκαν οι ενδογενείς συγκεντρώσεις των διαλυτών, διαλυτών συνδεμένων και αδιάλυτων συνδεμένων Put, Spd και Spm κατά την διάρκεια καλλογένεσης και επακόλουθης μορφογένεσης σε ένα σημαντικό για την αγροτική παραγωγή φυτικό είδος, το αμπέλι (*Vitis vinifera* L), το οποίο δεν ανταποκρίνεται σε ορισμένες αναγεννητικές

διαδικασίες, όπως αναγέννηση πρωτοπλαστών και σχημασμό βλαστών από κάλλους. Επίσης μετρήθηκαν οι ενεργότιες των ODC και ADC. Η σχέση ανάμεσα στην διακύμανση των τριών κλασμάτων ενδογενών πολυαμινών, των ενζύμων, της ανάπτυξης κάλλου και το σχημασμό ριζών συζητείται.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Φυτικό Υλικό: Φυτά αμπελιού *in vitro* μεγάλωσαν σε συνθήκες καλλιέργειας που ήταν: 25° C, φωτοπερίοδο 16/8 και ένταση φωτός 1500μWcm⁻² από λάμπες ψυχρού λευκού φθορισμού. Κομμάτια φύλλου 0.5mm² κόπηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο Murashige and Skoog (1962) με 2μM BAP και 5μM NAA (Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1991, Roubelakis-Angelakis and Katsirdakis, 1990). Τα τρυβλία έμειναν σε θερμοκρασία 25°C στο σκοτάδι. Μετά από 4 εβδομάδες καλλιέργειας έγινε μεταφορά σε νέο θρεπτικό διάλυμα (υποκαλλιέργεια), αφού πρώτα αφαιρέθηκαν οι ρίζες και τα νεκρά τμήματα. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες η καλλιέργεια συνεχίστηκε για 4 ακόμη εβδομάδες. Δειγματοληψίες έγιναν κάθε 7 ημέρες. Η ανάλυση και ο προσδιορισμός των πολυαμινών έγινε με τη διαδικασία που αναφέρεται στο Κεφ 1.

Προσδιορισμός των Ενζυμικών Ενεργοτήτων της ADC και ODC: Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε παγωμένα γουδιά με υγρό άζωτο. Ρυθμιστικό διάλυμα, από 100mM Tris-HCl, pH 7.6, EDTA 50mM, pyridoxal phosphate 50μM και DTT 25mM προστέθηκε στον ιστό σε αναλογία 0.6 mg ιστού /ml ρυθμιστικού διαλύματος. Το εκχύλισμα ομογενοποιήθηκε επί πλέον για ένα λεπτό σε Turex ομογενοποιητή,

φυγοκεντρήθηκε σε 1500g για 20 λεπτά και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας σύμφωνα με την μέθοδο των Birecha *et al* (1985). Το διάλυμα αντίδρασης αποτελείται από 0.3ml εκχύλιμα και 0.05ml ενζυμικό υπόστρωμα. Για την μέτρηση της ADC, το υπόστρωμα αποτελείται από 4μCi/ml L-¹⁴C(U)-arginine (3394 mCi/mmol; New England Nuclear) διαλυμένο με μη σημασμένη αργινίνη για να δώσει τελική συγκέντρωση 10mM. Για τη μέτρηση της ενεργότητας της ODC, 4μCi/ml σημασμένης ορνιθίνης (L-¹⁴C)-ornithine, 58mCi/mmol) διαλύθηκαν με μη σημασμένη για να δώσουν τελική συγκέντρωση 50mM. Τα διαλύματα αντίδρασης επωάστηκαν σε πλαστικούς σωλήνες κλειστούς και με ένα δίσκο εμποτισμένο με 40μl 1N KOH ως παγίδα για το σημασμένο CO₂. Η επώαση έγινε στους 37° με σύγχρονη ανάδευση για 1h. Η αντίδραση σταμάτησε με την έγχυση με σύριγγα 0.2ml 10% (v/v) TCA. Η επώαση συνεχίστηκε για μια ακόμα ώρα για να δεσμευτεί όλο το CO₂ στον εμποτισμένο με KOH δίσκο, ο οποίος στη συνέχεια απομακρύνθηκε, στεγνώσει και τοποθετήθηκε σε υγρό σπινθηρισμού, αποτελούμενο από 5gr PPO, 0.5 POPOP ανά lit τολουολίου.

Η ποσότητα της ραδιενέργειας, που δεσμεύτηκε στο δίσκο και ελευθερώθηκε κατά την ενζυμική αντίδραση, προσδιορίστηκε με μέτρηση για 10min σε Beckman LS 6000SE Scintillation counter. Η ενζυμική ενεργότητα εκφράστηκε ως μmolCO₂/gr.fr.weight.h. Όλα τα πειράματα έγιναν σε τρεις επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα δίνονται ως μέσες τιμές από 3-5 μετρήσεις.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών σε ολόκληρα φύλλα από

in vitro φυτά αμπελιού παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Ενδογενείς πολυαμίνες σε φύλλα αμπελιού (*Vitis vinifera* L. cv Sultanina) από *in vitro* φυτά (οι μετρήσεις έγιναν με TLC)

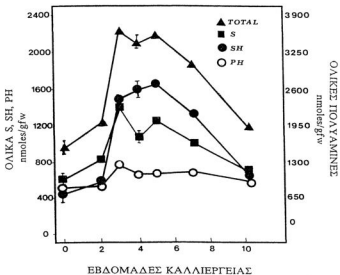
nmoles/gr.fr.weight				
κλάσμα	Put	Spd	Spm	Ολικές
S	284 ± 37.0	174 ± 15.0	133 ± 8.0	591 ± 60
SH	196 ± 36.0	157 ± 19.0	75 ± 11	428 ± 66
PH	149 ± 8.2	157 ± 2.0	199 ± 15.0	505 ± 25
ολική	629 ± 81.0	488 ± 36.0	407 ± 34.0	1524±151

Οι ολικές PAs αποτελούνται περίπου κατά το ένα τρίτο από κάθε ένα, από το διαλυτό, διαλυτό συνδεδεμένο ή αδιάλυτο συνδεδεμένο κλάσμα. Η ολική συγκέντρωση Put ήταν υψηλότερη από την ολική Spd, η οποία με την σειρά της ήταν υψηλότερη από την ολική Spm (Πίν. 1). Η κατανομή της κάθε μιας από τις τρεις μορφές πολυαμινών, διαλυτές, διαλυτές συνδεδεμένες και αδιάλυτες συνδεδεμένες διέφεραν. Πιο συγκεκριμένα, η ολική Put αποτελείται κατά 40% από τη διαλυτή της μορφή, κατά 40% από τη διαλυτή της συνδεδεμένη και κατά 20 % από την αδιάλυτη συνδεδεμένη μορφή της. Για την Spd οι αντίστοιχες ημές ήταν περίπου 40, 30 και 30 % και για την Spm 30 , 20 και 50 %.

Κατά την διάρκεια καλλιέργειας τεμαχίων φύλλων, κυτταρικές διαιρέσεις ήταν ορατές μετά από περίπου 7-10 μέρες και 14 μέρες μετά ήταν ορατές οι ρίζες (μήκος περίπου 1-2 mm). Την τρίτη εβδομάδα οι

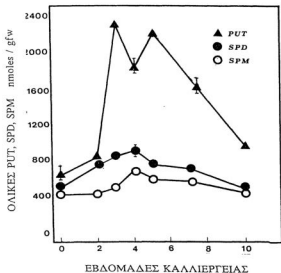
ρίζες ήταν μεγαλύτερες και ο σχηματισμός κάλλου έντονος. Πριν την μεταφορά σε νέο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, οι ρίζες που ήταν επάνω από 2 cm μήκος και το υπόλοιπο του φύλλου απομακρύνθηκαν. Επτά μέρες αργότερα (5η εβδομάδα) οι ρίζες που υπήρχαν απομακρύνθηκαν επίσης. Η εξάπλωση του κάλλου συνεχίστηκε και πριν από κάθε δειγματοληψία οι οξειδωμένες και εύθρυπτες περιοχές απομακρύνθηκαν. Οι ολικές πολυαμίνες αυξήθηκαν ελαφρά κατά τις δύο πρώτες εβδομάδες καλλιέργειας των έκφυτων φύλλων. Διπλασιασμός των συγκεντρώσεων της ΡΑs έγινε από την 3η μέχρι την 5η εβδομάδα καλλιέργειας. Μετά οι ΡΑs μειώθηκαν φθάνοντας σχεδόν την συγκέντρωση του αρχικού φύλλου την 10η εβδομάδα (Εικ. 1). Οι αντίστοιχες αλλαγές σε ολικές S, SH και PH ΡΑs φαίνονται επίσης στην Εικόνα 1. Τα S και SH κλάσματα των ολικών ΡΑs αυξήθηκαν σημαντικά από την 3η ως την 5η εβδομάδα συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση των ολικών ΡΑs. Το PH κλάσμα έδειξε μικρή αύξηση την 3η εβδομάδα και μειώθηκε μετά πλησιάζοντας την αρχική συγκέντρωση (Εικ. 1).

Πιο αναλυτικά, η Put ήταν η πολυαμίνη, που συνέβαλε ως επί το πλείστον στην αύξηση των ΡΑs κατά την καλλογένεση και ριζογένεση των έκφυτων φύλλων αμπελιού (Εικ. 2). Αυτή η αύξηση ήταν περίπου 3 φορές την 3η και την 5η εβδομάδα και μειώθηκε μετά. Η ολική Spd αυξήθηκε την 3η και 4η εβδομάδα και μετά μειώθηκε. Παρόμοιου τύπου αλλαγή βρέθηκε για την Spm (Εικ. 2). Οι αντίστοιχες αυξήσεις ήταν περίπου 3 φορές, 2 φορές και 0,5 φορές για την ολική Put, Spd και Spm αντίστοιχα. Την 5η εβδομάδα, οι ολικές ΡΑs αποτελούνταν περίπου από 55, 25 και 20 % από Put, Spd, και Spm, αντίστοιχα. Σε ολόκληρο φύλλο, αντίστοιχα, το ποσοστό επί τοις εκατό ήταν περίπου 40, 35 και 25 (Πίν. 1).



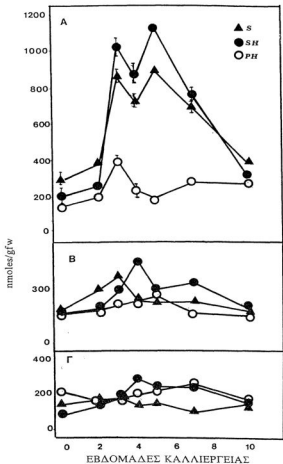
Εικόνα 1. Ολικές πολυαμίνες κατά τη διάρκεια καλλιέργειας εκφύτων *Vitis vinifera* L.

Αξίζει να σημειωθεί ότι και στις τρεις ΡAs, οι συγκεντρώσεις στο τέλος της καλλιέργειας μειώθηκαν, φθάνοντας έτσι τα επίπεδα των συγκεντρώσεων του αρχικού ιστού φύλλου (Πίν. 1). Κατά την διάρκεια της καλλογένεσης, η διαλυτή Put αυξήθηκε 2 έως 3 φορές, η επί τοις εκατό συμμετοχή των S και PH κλασμάτων μειώθηκε και του SH αυξήθηκε. Στην Spd η αύξηση των S, SH και PH κλασμάτων ήταν πάνω από 2-, 3- και

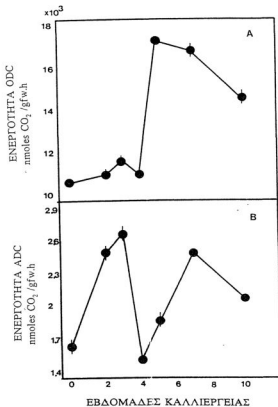


Εικόνα 2 Επίπεδα ολικής Put, Spd και Spm κατά τη διάρκεια καλλιέργειας εκφύτων *Vitis vinifera* L.

0,5 φορές, η επί τοις εκατό συμμετοχή αυτών των κλασμάτων στην ολική Spd αυξανόταν πάνω από 4 φορές. Ως αποτέλεσμα, τα εκατοστιαία ποσοστά των S και PH κλασμάτων μειώνονταν και μόνο το SH κλάσμα αυξάνονταν (Εικ. 3).



Εικόνα 3. Διακύμανση των πολυαμινών Put (Α), Spd (Β) και Spm (Γ) και των κλασμάτων τους S, SH και PH κατά τη διάρκεια καλλιέργειας εκψύτων *Vitis vinifera* L.



Εικόνα 4. Ενεργότητες της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (Α) και της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (Β) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας εκφύτων *Vitis vinifera* L.

Σε ολόκληρο φύλλο, η ενεργότητα της ODC ήταν 65 φορές μεγαλύτερη από την ADC (Εικ. 4Α,Β). Η ODC αυξήθηκε ελαφρά κατά τις τρεις πρώτες εβδομάδες και έδειξε μια περίπου 2 φορές αύξηση την 5η εβδομάδα, ακολουθούμενη από μια σταδιακή μείωση (Εικόνα 4Α). Η ADC αυξήθηκε κατά την 2η και 3η εβδομάδα, ενώ μειώθηκε την 4η εβδομάδα. Όταν οι κάλλοι υποκαλλιεργήθηκαν και απομακρύνθηκαν οι ρίζες από τα κομμάτια φύλλου το ένζυμο μειώθηκε και τις επόμενες 5η και 6η εβδομάδες η ADC αυξήθηκε πάλι (Εικ. 4Β).

ΕΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φυτικά είδη διαφέρουν ως προς την ανταπόκριση τους σε παράγοντες, που διεγείρουν την επαγωγή της μιτωτικής δραστηριότητας και έκφρασης της οργανογένεσης *in vitro*. Όπως πολλές επίσεις και ξυλώδεις καλλιέργειες, το αμπέλι είναι σχετικά απειθαρχο σε *in vitro* τυχαία αναγέννηση και απειθαρχο σε πλήρη αναγέννηση φυτού από πρωτοπλάστες. Τα επίπεδα των ενδογενών PAs στα φύλλα αμπελιού ήταν ίδιας τάξης μεγέθους $\mu\text{mol}(\text{gr.fr. weight})^{-1}$ όπως στον καπνό, που είναι φυτικό είδος ευκόλως αναγεννώμενο ή σε κοτυληδόνα πεπονιού (Leshem *et al* 1991) και σε σπέρματα πολλών φυτικών ειδών (Felix and Harr, 1987). Σε φύλλα αμπελιού από *in vitro* φυτά οι λόγοι Put/Spd + Spm ήταν 0,93, 0,84 και 0,42 για S, SH και PH κλάσμα, αντίστοιχα (Πίν. 1). Ο λόγος της ολικής Put/ολική Spd + ολική Spm ήταν 0,70. Οι αναλογίες των S/SH+PH ήταν 0,45, 0,49 και 0,49 για την Put, Spd και Spm, αντίστοιχα. Σε φύλλα βρώμης, που είναι ένα επίσης απειθαρχο σε αναγέννηση αγρωστώδες, ο λόγος ολικής Put/ ολικής Spm+ ολικής Spd ήταν 0,13 (Flores and Galston, 1984) και οι αντίστοιχες τιμές των πολυαμινών ήταν 21 ± 2 , 124 ± 3 και 43

± 6 nmol(gr.fr.weight)⁻¹, ενώ για φύλλα αμπελιού ήταν 629 ± 81 , 488 ± 36 και 407 ± 34 nmol(gr.fr.weight)⁻¹, αντίστοιχα. Σε φύλλα *Passiflora* τα επίπεδα ελεύθερων Put, Spd και Spm, όπως εκτιμήθηκαν από την γραφική απεικόνιση, ήταν σημαντικά υψηλότερες από τα φύλλα βρώμης και αμπελιού (Desai and Metha, 1985, Flores and Galston, 1984).

Ο σχηματισμός κάλλου σε αυτές τις μελέτες προκλήθηκε με BAP και NAA σε συγκεντρώσεις 5×10^{-6} M και 2×10^{-6} M, αντίστοιχα (Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis 1991), που είναι 25 και 20 φορές χαμηλότερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις BAP και 2,4-D, που χρησιμοποιήθηκαν για τη επαγωγή καλλογένεσης σε φυλλάδια έκφυτα καπνού (Burtin *et al.* 1989). Πρέπει να σημειωθεί ότι σε αυτή την εργασία η επαγωγή της καλλογένεσης έγινε στο σκοτάδι ενώ σε όλα τα φυτικά γένη, που έχουν τελευταία χρησιμοποιηθεί (*Nicotiana glauca* και *Passiflora*) η επαγωγή της καλλογένεσης έγινε είτε σε συνεχές είτε σε διακοπόμενο φως (Burtin *et al.* 1989, 1990, Chriqui *et al.* 1986, Desai and Metha, 1985). Εκθεση των μέσων καλλιέργειας φυτικών ιστών σε φως από λαμπτήρες φθορισμού αλλάζει τις ρυθμιστικές ιδιότητες αύξησης των μέσων (Stasinopoulos and Hangarter, 1990). Επίσης, φως από λάμπες φθορισμού μπορεί να επάγει την παραγωγή φορμαλδεύδης και πενία σιδήρου σε θρεπτικό διάλυμα καλλιέργειας φυτού. Η φορμαλδεύδη, που παράγεται από το EDTA οξειδώνεται (Hangarter and Stasinopoulos, 1991). Σε δίσκους φύλλων καπνού κατά την διάρκεια καλλιέργειας 35 ημερών, η εμφάνιση ριζών παρατηρήθηκε την 8η μέρα. Η ελεύθερη Put αυξανόταν αργά τις πρώτες 10 μέρες καλλιέργειας με ένα μέγιστο μεταξύ 11ης και 14ης μέρας (Burtin *et al.* 1990). Η ελεύθερη Spd και Spm δεν μεταβλήθηκε σε όλη την περίοδο καλλιέργειας. Σε έκφυτα φύλλου *Datura* η ελεύθερη Put μετά

από 2 μέρες καλλιέργειας ήταν 5 έως 7 φορές μεγαλύτερη και παρέμεινε υψηλή τις επόμενες 2 εβδομάδες. Η αύξηση της ελεύθερης Spd κατά την ίδια περίοδο ήταν 3-4 φορές. Η Spm βρέθηκε μόνο σε ίχνη (Chriqui *et al.* 1986). Σε δίσκους φύλλων *Passiflora* οι ρίζες εμφανίστηκαν την 23η μέρα, η ελεύθερη Put αυξήθηκε 12 φορές την 9η μέρα, όταν εμφανίστηκε κάλλος μετά μειώθηκε και αυξήθηκε ξανά την 21η μέρα. Η Spd αυξήθηκε την 12η μέρα και παρέμεινε σταθερή μετά, ενώ η Spm δεν μεταβλήθηκε (Desai and Metha, 1985). Στο δικό μας σύστημα, το αμπέλι, η ελεύθερη Put αυξήθηκε 2-3 φορές, η ελεύθερη Spd 2 φορές, ενώ η ελεύθερη Spm δεν άλλαξε (Εικ. 3,4,5). Η ελεύθερη Put αυξήθηκε από την 3η έως 5η εβδομάδα (21η ημέρα έως 35η ημέρα) καλλιέργειας και μειώθηκε στη συνέχεια (Εικ. 3). Η ελεύθερη Spd έδειξε αύξηση στο διπλάσιο την 3η εβδομάδα και μετά μειώθηκε απότομα, πλησιάζοντας τα επίπεδα του αρχικού έκφυτου και στην συνέχεια αυξήθηκε ελαφρά (Εικ. 4).

Από τα δεδομένα, που έχουν δημοσιευθεί πρόσφατα και από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι, σε όλα τα φυτικά είδη που μελετήθηκαν, η ελεύθερη Put αυξανόταν κατά την διάρκεια της καλλογένεσης και ριζογένεσης. Σε έκφυτα φύλλου καπνού και *Passiflora* η αύξηση ήταν πιο αργή, αυξήθηκε την 10η έως 21η μέρα και μειώθηκε στην συνέχεια. Στην *Datura* η αύξηση ήταν μεγάλη μετά την δεύτερη μέρα και παρέμεινε υψηλή τις ακόλουθες 2 εβδομάδες, ενώ στο αμπέλι, η αύξηση παρατηρήθηκε την 3η έως 5η εβδομάδα. Η ελεύθερη Spd δεν άλλαξε στον καπνό ενώ αυξήθηκε στην *Datura*, *Passiflora* και αμπέλι και η ελεύθερη Spm δεν σημείωσε αλλαγή σε όλα τα φυτικά είδη. Σε μετασχηματισμένα με *Agrobacterium tumefaciens* έκφυτα καπνού που

σχηματίζουν κάλλους, μη διαφοροποιημένους (crown gall) ή διαφοροποιημένους με βλαστούς (teratoma, shooty tumor) η Put:Sprd:Spm, στην πρώτη περίπτωση, ενώ στο διαφοροποιημένο κάλλο η σειρά αναστράφηκε (Srivastava and Guha-Mukherjee, 1992).

Τα δεδομένα σε αλλαγές των συνδεδεμένων PAs κατά την διάρκεια της καλλογένεσης και μορφογένεσης σε έκφυτα φύλλου είναι πολύ περιορισμένα. Στον καπνό η συνδεδεμένη Put, που εμφανίστηκε την 1η μέρα, είχε μέγιστο την 14η μέρα και αποτελούσε το 80-95 % της ολικής Put (Burtin *et al* 1990). Στην *Datura* η SH-Put αποτελούσε το 28% και η PH Put το 34 % της ολικής Put (Chiriqui *et al* 1986). Στο αμπέλι, η αύξηση της SH-Put συνέπτε χρονικά με την αύξηση της S-Put, ενώ η PH-Put αυξήθηκε στο διπλάσιο την 3η εβδομάδα, μετά μειώθηκε και παρέμεινε χαμηλή (Εικ. 3). Η διαλυτή συνδεδεμένη Sprd επίσης αυξήθηκε την 4η εβδομάδα, μετά μειώθηκε, έδειξε μικρότερη αύξηση την 7η εβδομάδα, ενώ η PH-Sprd έδειξε μικρή αύξηση την 5η εβδομάδα και μειώθηκε στην συνέχεια. Η μορφή των αλλαγών της Sprd μπορεί να δείχνει ότι η αύξηση της SH-Sprd την 7η εβδομάδα ήταν λόγω της απελευθέρωσης της από το PH-κλάσμα (Εικ. 4). Τελικά, στη Spm μόνο τα SH και τα PH κλάσματα έδειξαν μικρή αύξηση την 4η και 6η εβδομάδα, αντίστοιχα (Εικ. 5). Εδώ, επίσης η αύξηση της PH-Spm την 6η εβδομάδα μπορεί να οφείλεται στην αντίστοιχη μείωση του SH-κλάσματος. Η αύξηση των S-, SH-, και PH-Put την 5η εβδομάδα πιθανά να δείχνει ότι η σύνθεση των κλασμάτων έγινε μέσω της αποκαρβοξυλίωσης της ορνιθίνης. Στον αραβόσιτο, τομάτα, και πατάτα δείχθηκε μια σχέση ανάμεσα στην μεριστωματική δραστηριότητα και τις PAs, που δείχνει ότι τα επίπεδα PAs και η βιοσύνθεση τους μπορεί να παίζουν ρόλο στην μεριστωματική δραστηριότητα στις ρίζες

(Cohen *et al.* 1982, Schartz *et al.* 1986). Σε έκφυτα φύλλου καπνού, η ADC και ODC ρυθμίζει την βιοσύνθεση της Put και κατά τα πρώτα και κατά τα μετέπειτα στάδια καλλογένεσης. Στο δικό μας σύστημα-μοντέλο οι ενεργότιες και των δύο βιοσυνθετικών ενζύμων επηρεάστηκαν από τα μορφογενετικά φαινόμενα. Η ODC υπερέχει της ADC περίπου 6,5 φορές στα φύλλα αμπελιού, ενώ στα νεαρά φύλλα από άνθη τομάτας, η διαφορά ήταν περίπου 5 φορές. Μέχρι την τρίτη εβδομάδα, η ODC αυξανόταν ελαφρά ενώ την 5η εβδομάδα η αύξηση ήταν 1,5 φορά. Η ADC αυξήθηκε την 3η εβδομάδα περίπου 1,5 φορά όπως και την 5η εβδομάδα.

Στην *Datura* και τον καπνό κατά την καλλογένεση η ADC και η ODC αυξήθηκαν ελαφρά. Αυτό μπορεί να δείχνει ότι η ADC είναι το υπεύθυνο ένζυμο για την αύξηση των PAs μέχρι την 3η εβδομάδα, ενώ μετά και τα δύο ένζυμα δείχνουν ίδιας τάξης μεγέθους αύξηση (1,5 φορά). Η μικρή αύξηση της ODC μέχρι και την 14η μέρα, με την μικρή αύξηση των SH και PH κλασμάτων της Put στο αμπέλι (Εικ. 3) συμφωνεί με τους Burtin *et al.* (1989) που ανέφεραν, ότι η ODC είναι ενεργή μόνο κατά την βιοσύνθεση υψηλών επιπέδων συνδεδεμένης Put. Τις επόμενες εβδομάδες, η ODC αυξήθηκε περισσότερο καθώς και το SH-κλάσμα της Put (Εικ. 3).

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι και οι τρεις πολυαμίνες, που μετρήθηκαν, επηρεάστηκαν από την καλλογένεση και ριζογένεση. Πιο συγκεκριμένα, η ελεύθερη Put αυξήθηκε κατά τη διάρκεια καλλογένεσης και ριζογένεσης κατά την 3η έως 5η εβδομάδα και η ελεύθερη Spd αυξήθηκε την 3η εβδομάδα. Η συνδεδεμένη SH-Put αυξήθηκε συγχρόνως με την S-Put ενώ η PH-Put διπλασιάστηκε την τρίτη εβδομάδα. Η SH-Spd αυξήθηκε την 4η και 7η

εβδομάδα και η PH-Spd έδειξε μικρή αύξηση την 5η εβδομάδα. Στην Spm μόνο τα SH και PH κλάσματα αυξήθηκαν την 4η και 6η εβδομάδα αντίστοιχα. Οι ενεργότητες και των δύο βιοσυνθετικών ενζύμων, που μελετήθηκαν, επηρεάστηκαν από τα μορφογενετικά φαινόμενα, ριζογένεσης και καλλογένεσης.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή για πρώτη φορά αναφέρονται αποτελέσματα που αφορούν μετρήσεις των τριών κλασμάτων των πολυαμινών (S, SH και PH) σε μοντέλα όπως οι πρωτοπλάστες καθώς και την διακύμανση τους κατά τη διάρκεια επαγωγής μορφογενετικών φαινομένων.

Τα βασικότερα συμπεράσματα που προκύπτουν από την εργασία αυτή είναι:

1. Η HPLC μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πολυαμινών έδωσε την δυνατότητα μεγαλύτερης ποσοτικής και ποιοτικής ακρίβειας στον χαρακτηρισμό των ΡAs στις μετρήσεις.

2. Τα πλήρως εκπτυγμένα φύλλα που αποτελούν τον ιδανικό δότη για πρωτοπλάστες περιέχουν μικρότερες συγκεντρώσεις ολικών πολυαμινών από τα φύλλα της κορυφής και μεγαλύτερες από τα φύλλα της βάσης και για τα δύο φυτικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν. Παρουσιάζονται έτσι ενδείξεις ότι το οντογενετικό στάδιο του φύλλου (δότη) σε συνδυασμό με τα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών επηρεάζουν την ποιότητα των πρωτοπλαστών.

3. Οι πρωτοπλάστες αμπελιού έδειξαν μεγαλύτερη ποσοτική συσσώρευση Put αμέσως μετά την απομόνωση τους ενδεχομένως ως αντίδραση τους στο stress της απομόνωσης. Δεν παρατηρήθηκε όμως αντίστοιχη αύξηση στο ποσοστό της Spd ή της Spm που πιθανά θα οδηγούσε σε σταθεροποίηση των μεμβρανών, όπως συνέβη στον καπνό, κυτταροδιαίρεση και περαιτέρω αύξηση με αποτέλεσμα την επικράτηση φαινομένων γηρασμού. Ενώ δεν αποκλείεται και αρνητική επίδραση

στην βιωσιμότητα λόγω φαινομένων τοξικότητας, προκύπτει από την αύξηση της ενδογενούς Put.

4. Οι πρωτοπλάστες αμπελιού δείχνουν μικρότερη συγγένεια του μορίου μεταφορέα της Put σε σύγκριση με τους πρωτοπλάστες καπνού στους οποίους η πρόσληψη ενεργοποιείται από την ATPase της πλασματικής μεμβράνης, ενώ παρουσιάζουν δύο τμές οπτιμά pH για την πρόσληψη της Put.

5. Στους πρωτοπλάστες καπνού, τα μορφογενετικά φαινόμενα, αύξηση μεγέθους πρωτοπλαστών, επιμήκυνση, μετακίνηση χλωροπλαστών γύρω από τον πυρήνα και πρώτη διαίρεση κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τους συνοδεύταν από αντίστοιχη διακύμανση των ενδογενών πολυαμινών. Στο αμπέλι, τα αντίστοιχα φαινόμενα δεν συνοδεύτηκαν από την αναμενόμενη διακύμανση. Αυτό, ενισχύει την υπόθεση για τη συμμετοχή των πολυαμινών στα μορφογενετικά αυτά φαινόμενα.

6. Η εξωγενής ραδιενεργή Put μεταβολίζεται μέσα στον πρωτοπλάστη σε Spd και Spm, ενώ ραδιενέργεια ανιχνεύεται και στα τρία κλάσματα S, SH και PH. Διαφορές παρουσιάζει η ενσωμάτωση στο PH-κλάσμα ανάμεσα στα δύο είδη πρωτοπλαστών.

7. Κατά τη διάρκεια καλλογένεσης εκφύτων φύλλου αμπελιού η ριζογένεση και η καλλογένεση συνοδεύταν από αντίστοιχη αύξηση στα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών και ιδιαίτερα των ελεύθερων.

8. Η αύξηση της Put κατά τη διάρκεια καλλογένεσης φύλλου αμπελιού φαίνεται να προέρχεται κύρια από τη δράση του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της αργινίνης (ADC).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams DO and Yang SF (1979). Ethylene biosynthesis identification of 1-aminocyclopropane-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 170-174.

Adams DO, Franke K and E Christensen P (1990). Elevated putrescine levels in grapevine leaves that display symptoms of potassium deficiency. *Amer. J. Enol. Vitic.* 41: 121-125.

Altman A and Bachrach U (1981). Involvement of Polyamines in plant growth and senescence. *Adv. Polyamine Res.* 3: 365-376.

Altman AR, Kaur-Sawhney and Galston AW (1977). Stabilization of cat leaf protoplasts through polyamine-mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol.* 60:570-574.

Altman AR, Friedman D, Amir and Levin N (1982). Polyamine effects and metabolism in plants under stress conditions. *In: Plant Growth Substances* P.F.Wareing (ed), Academic Press pp 483-494.

Bachrach U (1973). Function of Naturally Occuring Polyamines. Academic Press, New York.

Bachrach UM, Heimer YM, (Eds) (1989). The Physiology of Polyamines. Vols I and II. CRS Press, Boca Raton, FL.

Bagni N, Baraldi R and Costa G (1984). Uptake, translocation and metabolism of aliphatic polyamines in leaves and fruits of *Malus domestica* (cv 'Ruby-spur'). *Acta Hort.* 149: 173-178.

Bagni N, Torrigiani P and Barbieri P (1989). Effect of various inhibitors of polyamine synthesis on the growth of *Helianthus tuberosus* *Med. Biol.* 59: 403-409.

Bagni N, Serafini-Fracassini D and Torrigiani P (1982). Polyamines and cellular growth processes in higher plants. *In: Plant Growth Substances* P.F.Wareing (ed), Academic Press pp 473-482.

Bagni N and Pistocchi R (1985). Pyrescine uptake in *Saintpaulia* petals. *Plant Physiol.* 77:398-402.

Bagni N and Pistocchi R (1988). Polyamines as growth substances in higher plants. *In* Progress in Polyamines research V Zappia, AE Pegg (eds), Plenum, New York, pp 547-588.

Bagni N and Pistocchi R (1990). Binding, Transport and Subcellular Compartmentation of Polyamines in Plants. *In* Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology and Interactions, HE Flores, RN Aztecs, JC Shannon (eds), Am. Soc. Plant Physiol.

Bell E. and Malmberg R.L. (1990). Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *E. coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing. *Mol. Gen. Genet.* 224:431-436.

Benson EE and Roubelakis-Angelakis KA (1992). Fluorescent lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in tissue culture of *Vitis vinifera* L. *Plant Sci.* 84:83-90.

Benson EE and Roubelakis-Angelakis KA (1994). Oxidative stress in recalcitrant tissue cultures of grapevine. *Free Radical Biol. Med.* 16(3): 255-362.

Besford RT, Richardson CM, Campos JL and Tiburcio AP et al. (1993). Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta*, 189: 201-206.

Brenneman F and Galston AN (1975). Experiments on the cultivation of agriculturally important plants. I. Oat (*Avena sativa* L.) *Biochem. Physiol. Pflanzen* 168:453-471.

Birecha H, Bitonti AJ and McCann PP (1985). Assaying ornithine and arginine decarboxylase in some plants species. *Plant Physiol.* 79:509-514.

Biondi S, Diaz T, Inglesias I, Gamerini G and Bagni N (1990). Polyamines and ethylene in relation to adventitious root formation in *Prunus avium* shoot cultures. *Physiol. Plant.* 78:474-483.

Burtin D, Martin-Tanguy J, Paynot M and Rossin N (1989). Effects of the suicide inhibitors of arginine and ornithine decarboxylase activities on organogenesis, growth, free polyamine and hydroxycinnamoyl putrescine levels in leaf explants of *Nicotiana Tabacum* cv Xanthi cultivated *in vitro* in a medium producing callus formation. *Plant Physiol.* 89: 104-110.

Burtin D, Martin-Tanguy J, Paynot Carre M and Rossin N (1990). Polyamines, hydroxycinnamoyl-putrescines, and root formation in leaf explants of tobacco cultivated *in vitro* *Plant Physiol.* 93: 1398-1404.

Canellakis ES, Kyriakidis DA, Rinehart CA, Huang Jr SC, Panagiotidis C and Pong WF (1985). Regulation of polyamine biosynthesis by antizyme and some recent developments relating the induction of polyamine biosynthesis to cell growth. *Bioscience Reports* 5: 189-204.

Canellakis ZN, Bondy PK and Infante AA (1985). Spermidine is bound to a unique protein in early sea urchin embryos. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82:7613-7615.

Chapel M, Teissie J and Alibert G (1984). Electrofusion of spermine treated plant protoplasts. *FERS Lett.* 173:331-336.

Chriqui DD, D'Orazi D and Bagni N (1986). Ornithine and arginine decarboxylases and polyamine involvement during *in vivo* differentiation and *in vitro* dedifferentiation of *Deturs innoxia* leaf explants. *Physiol. Plant.* 68:589-596.

Cohen SS (1971). Introduction to the polyamines Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Cohen E, Arad S, Heimer YM and Mizrahi Y. (1982).

Participation of ornithine decarboxylase in early stages of tomato fruit development. *Plant Physiol.* 70:540-543.

Del Duca S, Beninati S and Serafini-Fracassini D (1994). Polyamines in chloroplasts: Identification of their glutamyl and acetyl derivatives. *Biochem J.* 305:233-237.

Desai HV and Mehta AR (1985). Changes in Polyamine levels during shoot formation, root formation, and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. *J. Plant Physiol.* 119: 45-53.

DiTomaso JM, Jonathan JH and Kochian LV (1992). Transport Kinetics and Metabolism of Exogenously Applied Putrescine in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiol.* 98:611-620.

DiTomaso JM, Hart JJ Linscott DL and Kochian LV (1992). Effect of inorganic cations and metabolic inhibitors on putrescine transport in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiol.* 99 : 508-514.

Del Duca S, Tidu V, Bassi R, Esposito C and Serafini-Fracassini (1994). Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L. *Planta* 193:283-289.

Egea-Cortines M, Cohen E, Arad S, Bagni N and Mizrahi Y (1993). Polyamines levels in pollinated and auxin-induced fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during development. *Physiol. Plant.* 87:14-20.

Evans PT and Malberg RL (1989). Do polyamines have role in plant development? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:235-269.

Faure O, Mengoli M, Nougarede A and Bagni N (1991). Polyamine pattern and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages of *Vitis Vinifera*. *Plant Physiol.* 138:545-549.

Felix H and Harr J (1987). Association of polyamines to different parts of various plant species. *Physiol. Plant.* 71:245-250.

Pienberg AA, Choi JH, Lubich WP and Sung ZR (1984). Developmental regulation of polyamine metabolism in growth and differentiation of carrot culture. *Planta* 162:532-539.

Flores HE and Galston AW (1982). Analysis of polyamines in higher plants by HPLC. *Plant Physiol.* 69:701-706.

Flores HE and Galston AW (1982). Polyamines and plant stress: activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. *Science* 217:1259-1261.

Flores HE and Galston AW (1984). Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. I Physiological parameters of the response. *Plant Physiol.* 75:102-109.

Flores HE, Young ND and Galston AW (1984). Polyamine metabolism and plant stress. *In* Cellular and Molecular Biology of Plant stress, J.L. Key, T. Kosuge (eds), Allan R. Liss New York, pp

Friedman R, Altman A and Bachrach U (1982). Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings I Effects of exogenous compounds and changes in endogenous polyamine content. *Plant Physiol.* 70:844-848.

Friedman R, Altman A and Bachrach U (1985). Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings II Incorporation of precursors into polyamines. *Plant Physiol.* 79: 80-83.

Galston AW (1983). Polyamines as modulators of plant development. *BioScience*, 33:382-388.

Galston AW and Kaur-Sawhney R (1987). Polyamines and senescence in plants. *In* Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology (eds) W.W. Thomson, E.A. Nothnagel and R.C. Huffaker American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, pp 167-181.

Galston AW and Sawhney RK (1988). Polyamines as endogenous

growth regulators. In *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. P.J. Davis ed. (Kluwer Academic Publishers), pp. 280-295.

Galston AW and Sawhney RK (1990). Polyamines in Plant Physiology. *Plant Physiol.* 94, 406-410.

Gaugas JM (1980). Polyamines in Biochemical Research. John Wiley and Sons, New York.

Geneve RL and Kester ST (1991). Polyamines and adventitious root formation in the juvenil and mature phase of English ivy. *J. Exp. Bot.* 42:71-75.

Grimes HD, Slocum RD and Boss WF (1986). α -Difluoromethylarginine treatment inhibits protoplasts fusion in fusogenic wild carrot protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 866: 130-34.

Guarino LA and Cohen SS (1979). Uptake and accumulation of putrescine and its lethality in *Anacystis nidulans*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76:3184-3188.

Haddox MK and Russell DH (1981). Increased nuclear conjugated polyamines and transglutaminase during liver regeneration. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78:1712-1716.

Hangarter RP and Stasinopoulos TC (1991). Effect of Fe-catalysed photooxidation of EDTA in root growth in plant culture media. *Plant Physiol.* 96: 843-847.

Heaser CW and Hess CE (1972). Endogenous regulation of root initiation in mung bean hypocotyles. *J. Am. Soc. Hortic Sci.* 97:392-396.

Heby O (1981). Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19:1-20.

Heby O. and Person L (1990). Molecular genetics of polyamine

synthesis in eukariotic cells. *TIBS* 15: 153-158.

Heimer Y.M. and Mizrahi Y. (1982). Characterization of ornithine decarboxylase of tobacco cells and tomato ovaries. *Biochem. J.* 201: 373-376.

Heller J.S., Chen K.Y., Kyriakidis D.A., Fong W.F. and Canellakis E.S. (1978). The modulation of induction of ornithine decarboxylase by spermine, spermidine and diamines. *J. Cell. Physiol.* 96:225-234.

Huntinen O., Honkanen J and Simola LK (1982). Ornithine- and putrescine-supported divisions and cell colony formation in leaf protoplasts of alders (*Alnus glutinosa* A. incana). *Plant Sci. Lett.* 28:3-9.

Isekson I and Apelbaum A (1987). Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiol.* 84:972-974.

Ishii S (1988). Factors influencing protoplast viability of suspension-cultured rice cells during isolation process. *Plant Physiol.* 88:26-29.

Joshi S, Pleyi CWA, Haenni AL and Bosch L (1983). Age dependence of cowpea protoplasts for uptake of spermidine and infectibility by alfalfa mosaic virus. *Plant Mol. Biol.* 2:89-94.

Kallio A, McCann P and Bey P (1981). DL-α-(Difluoromethyl)arginine a potent enzyme-activated irreversible inhibitor of bacterial arginine decarboxylase. *Biochemistry* 20:3163-3166.

Kanchanapoom M, Antognoni F, Pistocchi R and Bagni N (1991). Effect of auxins on spermidine uptake into carrot protoplasts. *Physiol. Plant.* 82:19-23.

Kashiwagi K, Kobayashi H and Igarashi K (1986). Apparently unidirectional polyamine transport by proton motive force in polyamine-deficient *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 165:972-977.

Κατσιρντάκη ΚΧ (199D). Κυτταρολογική, Βιοχημική και Υπερμικροσκοπική Μελέτη της Αναγεννητικής Ικανότητας Πρωτοπλάστων. *Vitis vinifera* L. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο.

Katsirdakis KC and Roubelakis-Angelakis KA (1991). Callogenic potentiality of leaf segments and shoot proliferation response of *Vitis spp.* genotypes. *J. Wine Res.* 2: 83-95.

Katsirdakis KC and Roubelakis-Angelakis KA (1992α). Modified culture conditions for increased viability and cell wall synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L) leaf protoplasts. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 28:255-260.

Katsirdakis KC and Roubelakis-Angelakis KA (1992β). Ultrastructural and biochemical aspects of cell wall regeneration in recalcitrant *in vitro* and non regenerating leaf protoplasts. *Cell Dev. Biol.* 28: 90-97.

Kaur-Sawnhey R and Galston AW (1979). Interaction of polyamines and light on biochemical processes involved in leaf senescence. *Plant Cell Environ.* 2:189-196.

Kaur-Sawnhey R, Kadpal G, McGonigle B and Galston AW (1990). Further experiments on spermidine-mediated floral-bud formation in thin-layer explants of Wisconsin 38 tobacco. *Planta* 181:212-215.

Kaur-Sawnhey R, Shihi LM, Flores HE and Galston AW (1982). Relation of polyamine synthesis and titer to aging and senescence in oat leaves. *Plant Physiol* 69:405-410.

Kaur-Sawnhey R, Flores HE and Galston AW (1980). Polyamine-induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. *Plant Physiol* 65:368-371.

Klinguer S, Martin-Tanguy J and Martin C (1986) K-nutrition, growth bud formation, and amine and hydroxycinnamic acid amide

contents in leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv Xanthi n.c. cultivated in vitro. Plant Physiol. 82: 561-565.

Kotzabasis K, Christakis-Hampsas MD and Roubelakis-Angelakis KA (1993a). A narrow bore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated, and bound polyamines. Anal. Biochem. 214: 484-489.

Kotzabasis K, Fotinou C, Roubelakis-Angelakis KA and Chanotakis D (1993b). Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosynthesis Research. 38: 83-88.

Koop H.U. and Schweiger H.G. (1985). Regeneration of plants from individually cultivated protoplasts using an improved microculture system. J. Plant Physiol. 121: 245-257.

Kumar PP and Thorpe TA (1989). Putrescine metabolism in excised cotyledons of *Pinus radiata* cultured in vitro. Physiol. Plant. 76: 521-526.

Lahiri K, Chattopadhyay S, Chattopadhyay S and Ghosh B (1992). Polyamine metabolism in nodules of *Vigna mungo* during senescence. Phytochemistry 31: 4087-4090.

Leshem B, Kaur-Sawnhey R and Galston AW (1991). Changes in polyamine levels during organ induction in cultured melon cotyledons. J. Plant Physiol. 138:757-759.

Maki H, Ando S, Kodama H. and Komamine A. (1991). Polyamines and the cell cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture. Plant Physiol. 96:1008-1013.

Martin-Tanguy J, Martin C, Paynot M and Rossin N (1988). Effect of hormone treatment on growth bud formation and free amine and hydroxycinnamoyl putrescine levels in leaf explant of *Nicotiana tabacum* cultivated in vitro. Plant Physiol. 88:600-604.

- McConlogue L, Gupta M, Wu L, and Coffino P (1984).** Molecular cloning and expression of the mouse ornithine decarboxylase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:540-544.
- Meijer EGM and Simmonds J (1988).** Polyamine levels in relation to growth and somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* L. J. Exp. Bot. 39(203):787-794.
- Mengoli M, Chriqui D and Bagni N (1992).** Protein, free amino acid and polyamine contents during development of hairy root *Nicotiana tabacum* plants. J Plant Physiol. 139:697-702.
- Morgan DML (1987).** Polyamines. In Essays in Biochemistry 23:82-107.
- Morris DR and Harada JJ (1980).** Participation of polyamines in the proliferation of bacterial and animal cells. In Polyamines in Biochemical Research, JM Gaugas (ed), Ch. J. NY: Wiley, pp
- Murashige T and Skoog F (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-497.
- Nadler SG and Takahashi MT (1985).** Putrescine transport in human platelets BBA 812:345-352.
- Necas O (1980).** Regeneration of protoplasts. In: Advance in Protoplasts Research, Ferenczy L, Farkas GL (eds), Pergamon Press, Oxford, pp. 151-161.
- Nielsen KA (1990).** Polyamine content in relation to embryo growth and dedifferentiation in Barley (*Hordeum vulgare* L.). J. Exp. Bot. 41:849-854.
- Oshima T (1983).** Novel polyamines in *Thermus thermophilus* Methods Enzymol. 94:401-410.

Palavan N and Galston AW (1982). Polyamine biosynthesis and titer during various development stages of *Phaseolus vulgaris* *Physiol. Plant.* 55: 437-444.

Pistocchi R, Bagni N and Creus JA (1986). Polyamine uptake, kinetics, and competition among polyamines and between polyamines and inorganic cations *Plant Physiol.* 80:556-560.

Pistocchi R, Bagni N and Creus JA (1987). Polyamine uptake in carrot cell culture. *Plant Physiol.* 84:374-380.

Pistocchi R, Keller F, Bagni N and Matile P (1988). Transport and subcellular localization of polyamines in carrot protoplasts and vacuoles *Plant Physiol.* 87:514-518.

Pistocchi R and Bagni N (1990). Effect of calcium on spermidine uptake in carrot cell cultures and protoplasts. *J. Plant Physiol.* 136:729-733.

Porter CW, Miller J. and Raymond Bergeson J. (1984). Aliphatic Chain Length Specificity of the Polyamine Transport System in Ascites L1210 Leukemia Cells. *Cancer Research* , 44:126-128.

Rabiti AL, Pistocchi R and Bagni N (1989). Putrescine uptake and translocation in higher plants. *Physiol. Plant.* 77:225-230.

Rastogi R., Dulson J. and Rothstein SJ. (1993). Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) Arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. *Plant Physiol.* 103:829-834.

Rinehart CA, Jr and Kuang YC (1984). Characterization of the Polyamine Transport System in Mouse Neuroblastoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry.* USA, Vol 259, pp. 4750-4756.

Rosenblum MG (1980). Conjugated polyamines in plasma and urine. *In* Polyamines in Biomedical Research. J.M. Gaugas (ed), John Wiley and Sons, New York, pp. 401-413.

Roubelakis KA and Kliewer WM (1978a). Enzymes of Krebs-Henseleit cycle in *Vitis Vinifera* L. I Ornithine transcarbamoylase: isolation and some properties. *Plant Physiol.* 62:337-339.

Roubelakis KA and Kliewer WM (1978b). Enzymes of Krebs-Henseleit cycle in *Vitis Vinifera* L. II Arginosuccinate synthetase and lyase. *Plant Physiol.* 62:340-343.

Roubelakis KA and Kliewer WM (1978y). Enzymes of Krebs-Henseleit cycle in *Vitis Vinifera* L. III. *In vivo* and *in vitro* studies of arginase. *Plant Physiol.* 62:344-347.

Roubelakis-Angelakis KA (1993). An assessment of possible factors contributing to recalcitrance of plant protoplasts. *In Morphogenesis in Plants : Molecular Approaches*, KA Roubelakis-Angelakis, K. Tran Than Van (eds), Plenum Publ. Co, New York, pp. 201-220.

Roubelakis-Angelakis KA and Katsirdakis KC (1990). *In vitro* micromultiplication of grapevine: Effect of age, genotype and culture conditions on induction of callus in *Vitis spp* leaf segments. *In Plant Aging: Basic and Applied Approaches*, (eds), Plenum Press, New York, pp 89-95.

Roubelakis-Angelakis KA and Theodoropoulos PA (1990). Uptake characteristics of sugars and amino acids by *Vitis vinifera* L. protoplasts. *In Plant Aging: Basic and Applied Approaches*, R. Rodridges, RT Tames and DJ Durzan, eds, Plenum Publ. Corp, New York, pp 153-159.

Roubelakis-Angelakis KA and Zivanovits S (1991). A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis spp*) genotypes. *Hortscience* 26:1552-1555.

Sakai TT and Cohen S (1976). Effects of polyamines on the structure and reactivity of tRNA. *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* 17: 15-42.

Schroeder JI and Thuleau P (1991). Ca²⁺ channels in higher plant cells. *The Plant Cell* 3:555-559.

- Schwartz M, Altman A, Cohen Y and Arzee T (1986).** Localization of ornithine decarboxylase and changes in polyamine content in root meristems of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 67:485-492.
- Seely JE, Poso H. and Pegg AE. (1982).** Purification of ornithine decarboxylase from kidneys of androgen-treated mice. *Biochem.* 21:3394-3399.
- Seller N and Dezeure F (1990).** Polyamine transport in mamalian cells. *Int. J. Biochem.* 22:211-218.
- Serafini-Fracassini D, Bagni N, Cionini PG and Bennici A. (1980).** Polyamines and nucleic acids during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* tissue after the dormancy break. *Planta* 148:332-337.
- Serafini-Fracassini D, Del Duca S and D' Orazi Dario (1988).** First evidence for polyamine conjugation mediated by an enzymic activity in plants. *Plant Physiol.* 87:757-761.
- Signorini M, Beninati S and Bergamini CM (1991).** Identification of Transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta Vulgaris* L.). *J. Plant Physiol.* 137:547-552.
- Siminis CI, Kanellis AK, Roubelakis-Angelakis KA (1990).** Protein pattern and peroxidase isoenzyme in tobacco and grapevine protoplasts during culture. *Proc. IHC, Florence, Abstr.* 1303:1442.
- Siminis CI, Kanellis AK and Roubelakis-Angelakis KA (1993).** *De novo* protein synthesis and peroxidase isoenzymes in tobacco and grapevine protoplasts during culture. *Physiol. Plant.* 79:483.
- Siminis CI, Kanellis A. and Roubelakis-Angelakis A (1994).** Catalase is differentially expressed in dividing and nondividing protoplasts. *Plant Physiol.* 106:1375-1383.
- Slocum RD and Furey MJ (1990).** Electron microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidases in pea and

maize tissues. *Planta* 183:443-450.

Slocum RD, Kaur-Sawnhey R and Galston AW (1984). The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 235:283-303.

Smith IK (1978). Role of calcium in serine transport into tobacco cells. *Plant Physiol.* 62:941-948.

Smith MA and Davies PJ (1985). Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiol.* 78:89-91.

Smith TA (1977). Further properties of the polyamine oxidase from oat seedlings. *Phytochemistry* 16: 1647-1649.

Smith TA (1985). Polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:117-143.

Spathas DH, Pateman JA and Clutterbuck AJ (1982). Polyamine transport in *Aspergillus nidulans* J. *Gen. Microb.* 128:557-563.

Srivastava SK and Smith TA (1982). The effect of some oligoamines and guanidines on membrane permeability in higher plants. *Phytochemistry* 21:991-1008.

Srivastava V and Guha-Mukherjee S (1992). Polyamine levels in crown gall tumor and teratoma. *Phytochemistry* 31(10):3357-3358

Stasinopoulos TC and Hangarter RP (1990). Preventing Photochemistry in culture media by long-pass light filters alters growth of cultures tissues. *Plant Physiol.* 93:1365-1369.

Stamp JA, Colby SM and Meredith CP (1990). Improved shoot organogenesis from leaves of grape. *J. Amer. Soc. Sci.* 115:1038-1042.

Stamp JA, Colby SM and Meredith CP (1990). Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis spp*)

Plant Cell Tiss. Org. Cult. 22:127-133.

Steiner F (199D). *In* Application of Narrow-Bore columns Hewlett-Packard (ed), Publication Number 12-5091-2736E.

Tabor H (198D). Polyamine biosynthesis in *Escherichia coli* Construction of polyamine-deficient mutants. Med. Biol. 59:389-393.

Tabor CW (198D). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in polyamine biosynthesis: Studies on the regulation of ornithine decarboxylase. Med. Biol. 59:272-278.

Tabor CW and Tabor H (1984). Polyamines. Annu. Rev. Biochem. 53:749-790.

Theodoropoulos PA and Roubelakis-Angelakis KA (1989). Mechanism of arginine transport in *Vitis Vinifera* L. protoplasts. J. Exp. Bot. 40:1223-1230.

Theodoropoulos PA and Roubelakis-Angelakis KA (1990). Progress in leaf protoplast isolation and culture from virus-free axenic shoot cultures of *Vitis vinifera* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 20: 15-23.

Theodoropoulos PA and Roubelakis-Angelakis KA (199D). Glucose transport in *Vitis vinifera* L. protoplasts. J. Exp. Bot. 42:477-483.

Thorpe TA (1993). *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: Physiological and biochemical aspects. *In* Morph. pp. 19-38.

Tiburcio AF, Figmenas X, Chaparas I, Santos M and Torne JM (1990). Polyamines and aging: effect of polyamine biosynthetic inhibitors on plant regeneration in maize cultured *in vitro*. *In* Plant Aging: Basic and Applied Approaches, Rodriguez R, Tames KS, Buczan D.J. (eds), NATO ASI Series, Plenum Press, New York, pp. 277-284.

Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, Ingersol RB and Galston AW

(1985). Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus. *Plant Physiol.* 78:323-326.

Tiburcio AP, Masdeu MA, Dumortier FM and Galston AW (1986). Polyamine metabolism and osmotic stress. I. Relation to protoplast viability. *Plant Physiol.* 82:369-374.

Tiburcio AP, Kaur-Sawhney R and Galston AW (1986). Polyamine metabolism and osmotic stress. II. Improvement of oat protoplasts by an inhibitor of arginine decarboxylase. *Plant Physiol.* 82:375-378.

Tiburcio AP, Gendy CA and Tran Than Van K (1989). Morphogenesis in tobacco subepidermal cells: Putrescine as marker of root differentiation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 19:43-54.

Torrigiani P, Altamura MM, Pasqua G, Monacelli B, Serafini-Fracassini D and Bagni N (1987). Free and conjugated polyamines during de novo floral and vegetative bud formation in thin cell layers of tobacco. *Physiol. Plant.* 70:453-460.

Tsirka SA, Sklaviadis TK and Kyriakidis DA (1986). Non-competitive inhibition of ornithine decarboxylase by a phosphopeptide and phosphoamino acids. *BBA* 884:482-489.

Vasil V and Vasil IK (1980). Isolation and culture of cereal protoplasts: Part 2. Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theor. Appl. Genet.* 56:97-99.

Vilaplana M and Mulins MG (1989). Regeneration of grapevines (*Vitis spp*) *in vitro*. Formation of adventitious buds on hypocotyls and cotyledons of somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 134:413-419.

Walters D (1987). Polyamines: the Cinderellas of cell biology. *Biologist* 34:73-76.

Young DH and Kaus H (1983). Release of calcium from

suspension-cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations and polyamines in relation to effects on membrane permeability. *Plant Physiol.* 73: 698-702.

Young ND and Galston AW (1983). Are polyamines transported in etiolated peas? *Plant Physiol.* 73:912-914.

Zappia V and Pegg AE eds (1988). Progress in polyamine research. *Adv. Exp. Med. Biol.* pp 250.