

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

Αποτελεί η επαγωγή έκφρασης του *Vngdha* και η αύξηση της ενεργότητας της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης μηχανισμό αντίδρασης στην Αλατότητα;



ΕΛΕΝΗ Δ. ΠΛΙΑΚΩΝΗ

**Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα
Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Ηράκλειο, 2003

ΑΠΟΤΕΛΕΙ Η ΕΠΑΓΩΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ *Vvgdha* ΚΑΙ Η ΑΥΞΗΣΗ
ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ;

Από την
Ελένη Δ. Πλιακώνη

Διατριβή
Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης
στη
Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών
από το
Πανεπιστήμιο Κρήτης



Επιτροπή Αξιολόγησης
Καθηγήτρια ΚΑΛΛΙΟΠΗ Α. ΡΟΥΜΠΕΛΑΚΗ-ΑΓΓΕΛΑΚΗ
Αναπλ. Καθηγητής ΚΥΡΙΑΚΟΣ ΚΟΤΖΑΜΠΑΣΗΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
A. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ.....	10
1. Εισαγωγή	10
2. Αφομοίωση αμμωνίας.....	11
2.1. Υποκυτταρικός εντοπισμός και δομή της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης. 13	
2.2 Φυσιολογική δράση της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης.....	14
3. Η αβιοτική καταπόνηση από Αλατότητα	16
3.1. Ενεργές Μορφές Οξυγόνου	19
3.2. Παραγωγή Ενεργών μορφών οξυγόνου.....	19
3.3. Αντιοξειδωτικός μηχανισμός.....	20
4. Σκοπός της Εργασίας.....	24
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
1. Φυτικό υλικό	25
1.1. Φυλλικοί δίσκοι καπνού και αμπέλου.....	25
1.2. Κάλλοι αμπέλου.....	25
1.3. Αιωρούμενη καλλιέργεια κυττάρων αμπέλου.....	26
2. Εκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl	26
3. Εκχύλιση πρωτεϊνών.....	27
4. Εκχύλιση ΕΜΟ σε κυτταροκαλλιέργεια και φυλλικούς δίσκους Αμπέλου.....	28
5. Ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών με την μέθοδο Lowry.....	28
6. Ποσοτικοποίηση με χρώση ολικών πρωτεϊνών (SDS).....	29
7. Προσδιορισμός ενζυμικών ενεργοτήτων	30
7.1. Γλουταμική Αφυδρογονάση	30
7.2. Σουπεροξειδική δισμουτάση	30
7.3. Κατάλαση	31
7.4. Ασκορβική Περοξειδάση	31

8. Φυσική ηλεκτροφόρηση και χρώση ενεργότητας σε πηκτή ακρυλαμίδης της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης.....	32
9. Ανοσοεντοπισμός της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης.....	32
10. Προσδιορισμός H_2O_2	34
10.1. Προσδιορισμός ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης H_2O_2	34
10.2. Προσδιορισμός εξωκυτταρικής συγκέντρωσης H_2O_2	35
11. Προσδιορισμός $O_2^{\bullet -}$	35
11.1. Προσδιορισμός ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης $O_2^{\bullet -}$	35
11.2. Προσδιορισμός εξωκυτταρικής συγκέντρωσης $O_2^{\bullet -}$	35
12. Εκχύλιση και ποσοτικός προσδιορισμός των α- και β- χλωροφυλλών...	36
13. Απομόνωση ολικού RNA και ανάλυση Northern	36
13.1. Παρασκευή ραδιενεργών μορίων ανιχνευτή.....	37
13.2. Πλυσίματα μεμβρανών και έκθεση.....	39
Γ .ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
1. Φυλλικοί δίσκοι <i>Vitis vinifera</i> cv Sultanina.....	40
1.1. Ειδική ενεργότητα Γλουταμικής Αφυδρογονάσης.....	41
1.2. Northern ανάλυση	41
1.3. Παραγωγή ΕΜΟ.....	42
1.4. Συγκέντρωση της α- και β- χλωροφύλλης.....	44
1.5. Συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών	45
1.6. Ειδική ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων	46
1.6.1. Σουπεροξειδική δισμουτάση.....	46
1.6.2. Καταλάση.....	46
1.6.3. Ασκορβική Περοξειδάση.....	47
2. Φυλλικοί δίσκοι 1103 Paulsen.....	47
2.1. Ειδική ενεργότητα της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης.....	48
2.2. Παραγωγή ΕΜΟ.....	49
2.3. Συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών	50
2.3. Ειδική ενεργότητα της καταλάσης	51
3. Αιωρούμενη καλλιέργεια κυττάρων αμπέλου <i>Vitis vinifera</i> cv Sultanina .	52
3.1. Ειδική ενεργότητα Γλουταμικής Αφυδρογονάσης.....	53

3.2 Παραγωγή ΕΜΟ.....	54
4. Κάλλοι αμπέλου <i>Vitis Vinifera</i> cv Sultanina	56
4.1. Ειδική ενεργότητα της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης.....	56
5. Καπνός <i>Nicotiana tabacum</i> cv Xanthi.....	57
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64

Στην Οικογένεια μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε κατά την διάρκεια των ακαδημαϊκών ετών 2001-2003 στο εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Για την διεκπεραίωσή της, εκτός από την προσωπική προσπάθεια, αποφασιστική και ουσιαστική ήταν και η συμβολή αρκετών ανθρώπων τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος και επιβλέπουσα της διατριβής μου καθηγήτριας Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη η οποία μου προσέφερε την ευκαιρία να εργαστώ στο εργαστήριό της καθώς και τα απαραίτητα μέσα για να φέρω σε πέρας την εργασία μου. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την καθοδήγησή της και την συμβολή της στην συγκρότηση της ερευνητικής μου προσπάθειας. Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Κ. Κοτζαμπάση για την συμβολή του στην περάτωση αυτής της διατριβής.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναστασία Παπαδάκη για την πολύ σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε σε όλες τις δύσκολες στιγμές, καθώς επίσης και τον Δαμιανό Σκοπελίτη για τις πολύτιμες συμβουλές του στα πρώτα μου βήματα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα άτομα που συνέβαλαν σε αυτή την εργασία, με την επιστημονική και ηθική συμπαράστασή τους και ιδιαίτερα τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών, Ευθύμη Ανδρώνη, Δημήτρη Γιακουμάκη, Ιωάννη Ντελή και Κωνσταντίνο Πασχαλίδη. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συμφοιτητές στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, με τους οποίους μοιραστήκαμε κοινές αγωνίες και χαρές τα δύο αυτά χρόνια.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια και τους φίλους μου για την κατανόηση, την υπομονή και την στήριξη που μου έδωσαν σε όλη τη διάρκεια της προσπάθειας αυτής.

Ελένη Δ. Πλιακώνη
Σεπτέμβριος 2003

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γλουταμική αφυδρογονάση (Glutamate dehydrogenase, GDH, EC 1.4.1.2) καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του ακετογλουταρικού οξέος σε γλουταμικό οξύ, στα μιτοχόνδρια, όμως ο ακριβής φυσιολογικός της ρόλος δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Ένας σημαντικός παράγοντας αβιοτικής καταπόνησης στα φυτά είναι η αλατότητα. Πρόκειται για μια πολυσήμαντη καταπόνηση, η οποία συνίσταται από ωσμωτική και ιοντική καταπόνηση, και περιλαμβάνει δευτερεύοντες παράγοντες όπως η έντονη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (EMO) που συνιστούν την οξειδωτική καταπόνηση επίσης. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε ο πιθανός ρόλος της GDH στην καταπόνηση αλατότητας. Ειδικότερα μελετήθηκε η επίδρασή της αλατότητας NaCl στην παραγωγή EMO και στην επαγωγή του μετάγραφου και της ενεργότητας της GDH. Χρησιμοποιήθηκαν φυλλικοί δίσκοι αμπέλου και καπνού, καθώς επίσης κάλλοι και αιωρούμενη καλλιέργεια κυττάρων αμπέλου. Βρέθηκε ότι κατά την καταπόνηση αλατότητας προκαλείται έντονη συσσώρευση EMO, επαγωγή έκφραση του γονιδίου *Vngdha*, συσσώρευση των ανοδικών ισοενζύμων και σύνθεση της υπομονάδας της GDH, καθώς και έντονη αύξηση της ειδικής ενεργότητας της GDH. Όμως, στον ανθεκτικό στην αλατότητα γενότυπο αμπέλου, παρατηρήθηκε απουσία επαγωγής της GDH παρά την παρουσία αυξημένων επιπέδων EMO, γεγονός που δεν επιτρέπει την άμεση συσχέτιση της επαγωγής των EMO και της GDH. Πιθανώς οι EMO διαδραματίζουν έμμεσο ρόλο κατά για την επαγωγή της GDH, όπως το να συμμετέχουν στο δίκτυο σηματοδότησης. Η GDH όμως φαίνεται να σχετίζεται με καταστάσεις καταπόνησης.

ABSTRACT

Glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2) catalyses the bidirectional reaction of the reductive amination of α -ketoglutarate to glutamate in the mitochondria, though its precise physiological role hasn't been determined. One important abiotic stress factor in plants is salinity. Salinity is a major stress, which incorporates osmotic and ionic stress, as well as secondary stresses, such as the over-production of reactive oxygen species (ROS), which is termed oxidative stress. In this work the possible role of GDH while under salinity stress was investigated. In particular the production of ROS was studied, under NaCl stress, as well as the induction of the GDH transcript and specific activity. Grapevine and tobacco leaf discs, as well as calli and grapevine cell suspension cultures. Salinity stress led to the critical accumulation of ROS expression of the *Vvgdha* gene, accumulation of the anodic isoenzymes and synthesis of the α -subunit of GDH, as well as the significant increase of the GDH specific activity. Nevertheless in the NaCl tolerant grapevine genotype GDH was not induced despite the accumulation of ROS, which prevents the establishment of a direct correlation between the induction of ROS and GDH. Possibly ROS indirectly induce GDH by participating in the signaling network. GDH nevertheless appears to be associated with stress responses.

A. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το άζωτο αποτελεί τον κύριο δομικό λίθο για τη σύνθεση πλήθους βιομορίων, εξαιρετικής σπουδαιότητας για τη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη, όπως τα νουκλειικά οξέα, οι πρωτεΐνες, η χλωροφύλλη, οι ορμόνες κ.α. Μολονότι η ατμόσφαιρα είναι πλούσια σε μοριακό άζωτο (80%), η χρήση του με τη μορφή αυτή από τη πλειοψηφία των οργανισμών δεν είναι δυνατή, λόγω της χαμηλής χημικής δράσης του (το μοριακό άζωτο χαρακτηρίζεται ως αδρανές αέριο). Μόνον ορισμένα βακτήρια έχουν την ικανότητα της απευθείας ενσωμάτωσης ατμοσφαιρικού αζώτου σε μόρια ανθρακικών σκελετών. Τέτοια είναι τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, τα οποία είτε ζουν ελεύθερα στο έδαφος ή συμβιώνουν με τα ψυχανθή φυτά προμηθευοντάς τα με άζωτο. Οι υπόλοιποι φυτικοί οργανισμοί προμηθεύονται το άζωτο από το έδαφος με μορφές προσιτές σε αυτούς, όπως τα νιτρικά και τα αμμωνιακά ιόντα.

Η βασικότερη πηγή αζώτου για όλους τους αυτότροφους οργανισμούς είναι τα νιτρικά ιόντα τα οποία προσλαμβάνονται μέσω του ριζικού συστήματος από το έδαφος (Beever and Hageman 1980; Haynes 1986a). Επιπλέον άλλη πηγή αζώτου για τα φυτά αποτελούν τα αμμωνιακά ιόντα τα οποία είναι άμεσα προσλήψιμα από το ριζικό σύστημα, όμως αυτά μετατρέπονται πολύ γρήγορα στο έδαφος σε νιτρικά με τη διαδικασία της νιτροποίησης, στην οποία συμμετέχουν δύο ομάδες βακτηρίων (νιτροποιητικά, *Nitrosomonas* και *Nitrobacter*).



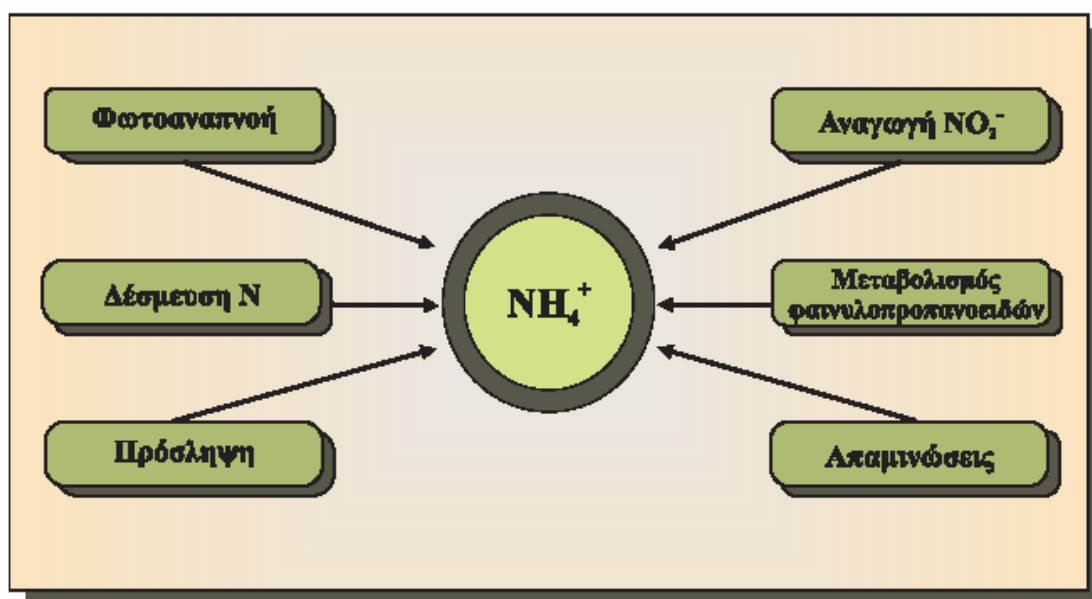
Εικόνα 1. Αναγωγή του αζώτου.

Για την ενσωμάτωση του αζώτου σε βιομόρια απαραίτητη είναι η μετατροπή των νιτρικών ιόντων σε μορφές υψηλότερης ενεργειακής

κατάστασης (αμμωνία). Αυτή η μετατροπή γίνεται σε δύο στάδια: α) αναγωγή του NO_3^- σε NO_2^- από το ένζυμο νιτρική αναγωγάση (Nitrate reductase, NR E.C. 1.6.6.1-2) και β) αναγωγή του NO_2^- σε NH_3 από το ένζυμο νιτρώδης αναγωγάση (Nitrite reductase, NiR E.C. 1.7.7.1) (Εικ. 1).

2. ΑΦΟΜΟΙΩΣΗ ΑΜΜΩΝΙΑΣ

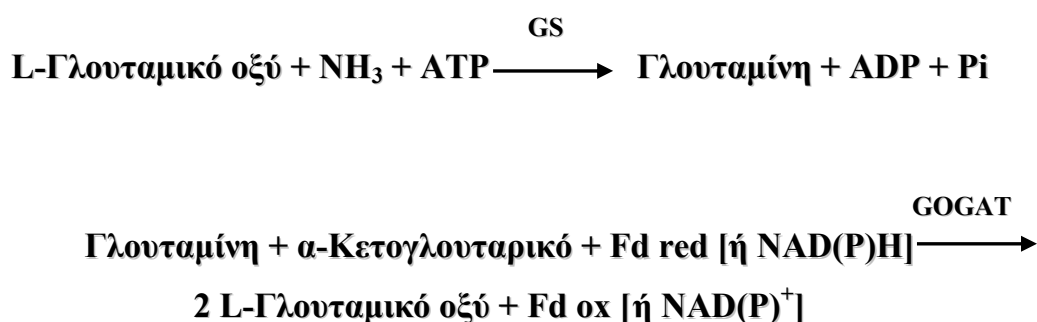
Εκτός από την αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε αμμωνιακά, ιόντα αμμωνίας παράγονται από διάφορες αντιδράσεις, όπως η φωτοαναπνοή, η αποδόμηση των πρωτεϊνών και η απαμίνωση των αμινοξέων και άλλων υδρολυτικών αντιδράσεων (Εικ. 2).



Εικόνα 2. Πηγές αμμωνιακών ιόντων (από. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003)

Τόσο η αμμωνία που παράγεται από την αναγωγή των νιτρικών ιόντων όσο και αυτή που απελευθερώνεται από τις παραπάνω αντιδράσεις ενσωματώνονται σε μόρια ανθρακικών σκελετών (κύκλος του Krebs) διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην διαδικασία βιοσύνθεσης αζωτούχων βιομορίων όπως τα αμινοξέα.

Οι σημαντικότερες αντιδράσεις αφομοίωσης της αμμωνίας είναι η ενσωμάτωση της σε γλουταμικό οξύ και αντίστοιχη παραγωγή γλουταμίνης με τη δράση του ενζύμου της γλουταμινικής συνθετάσης (Glutamine synthetase, GS, EC 6.3.1.2) και την αντίδραση γλουταμίνης και α-κετογλουταρικού για τη σύνθεση δύο μορίων γλουταμικού οξέως με τη δράση της γλουταμικής συνθάσης (Glutamate synthase, NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14, NADPH-GOGAT, EC 1.4.1.13, Fd-GOGAT, EC 1.4.1.7), όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.

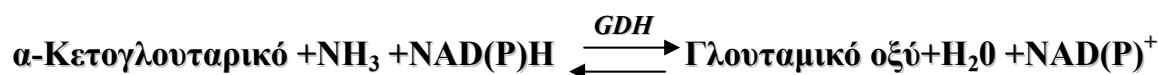


Εικόνα 3. Ενζυμικό σύστημα GS/GOGAT.

Η GS εντοπίζεται σε όλους τους φυτικούς ιστούς και παρουσιάζει πολύ υψηλή ενεργότητα στη ρίζα. Στα ανώτερα φυτά εμφανίζεται ως οκταμερής πρωτεΐνη μεγέθους 320-380 kD. Έχει υψηλή συγγένεια για την αμμωνία και για το λόγο αυτό θεωρείται κύριο ένζυμο για την αφομοίωση της (Lea, 1993; Lea and Mifflin, 2003).

Η GOGAT (Glutamine Oxoglutarate Amino Transferase) εμφανίζεται στο φυτικό κύτταρο με τρεις κύριες μορφές, τις Fd-GOGAT, NADPH-GOGAT και την NADH-GOGAT, οι οποίες έχουν διαφορετικά λειτουργικά και τοπολογικά χαρακτηριστικά. Η Fd-GOGAT εμφανίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα φύλλα και εντοπίζεται κυρίως στους χλωροπλάστες (Wallsgrave *et al.*, 1983), σε αντίθεση οι άλλες δύο μορφές που εμφανίζονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα φύλλα αλλά αρκετά μεγάλες στη ρίζα, εδρεύουν κυρίως στο κυτταρόπλασμα.

Ένα άλλο ένζυμο του οποίου ο φυσιολογικός του ρόλος παραμένει άγνωστος και σχετίζεται με την αφομοίωση της αμμωνίας είναι η γλουταμική αφυδρογονάση (Glutamate dehydrogenase, GDH, EC 1.4.1.2).



Εικόνα 4. Αμφίδρομη αντίδραση αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού από τη γλουταμική αφυδρογονάση και αντιστρόφως.

Η GDH καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού οξέος, που παράγεται από τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (Κύκλος Krebs), σε γλουταμικό οξύ με την αντίδραση που φαίνεται στην Εικόνα 4.

2.1. Υποκυτταρικός εντοπισμός και δομή της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης

Η GDH εντοπίζεται ενδοκυτταρικά κυρίως στα μιτοχόνδρια (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990). Παράλληλα, ενεργότητα του ενζύμου έχει εντοπιστεί στο κυτταρόπλασμα και τους χλωροπλάστες (Paczek *et al.*, 2002). Χρησιμοποιεί ως αναγωγικό μέσο το NADH ή το NAD(P)H για την αμινωτική της δράση, ενώ στην απαμινωτική της δράση χρησιμοποιεί NAD ή NAD(P). Εντοπίζεται με τη μορφή ενός ολοενζύμου με μοριακό βάρος 252 kD και αποτελείται από δύο υπομονάδες. Οι υπομονάδες αυτές ονομάζονται συμβατικά α- και β- με μοριακά βάρη 43 και 42,5 kD, αντίστοιχα. Το ολοένζυμο στο αμπέλι εμφανίζεται ως ένα εξαμερές, αποτελούμενο από τις υπομονάδες α- και β-, οι οποίες εμφανίζουν παρόμοιο μοριακό βάρος και αντιγονικές ιδιότητες, αλλά διαφορετικό φορτίο (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990).

Στο αμπέλι υπάρχουν 7 ισοένζυμα, που χαρακτηρίζονται από διαφορετική αναλογία των δύο υπομονάδων στη σύσταση του εξαμερούς ενζύμου. Τα ισοένζυμα 1 και 7 αποτελούν ομοεξαμερή των υπομονάδων α- και β- αντίστοιχα, ενώ όλα τα ενδιάμεσα ισοένζυμα αποτελούν υβρίδια των δυο υπομονάδων οι οποίες συμμετέχουν σε μια αντίστροφα κλιμακωτή διαβάθμισή τους (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991). Ο φυσιολογικός και

μεταβολικός ρόλος των διάφορων ισοενζύμων δεν είναι γνωστός. Αρχικά, από την σύγκριση των ισοενζυμικών προτύπων με τον λόγο NADH-GDH/NAD-GDH προέκυψε ότι κάθε ισοένζυμο έχει διαφορετικό αναβολικό ή καταβολικό ρόλο (Cammaerts and Jacobs, 1985; Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991). Από περαιτέρω μελέτες βρέθηκε ότι τα διάφορα ισοένζυμα έχουν την ίδια αναλογία *in vitro* αναβολικής και καταβολικής ενεργότητας (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1996).

Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί τα γονίδια της GDH, από έξι διαφορετικά φυτικά είδη, *Zea mays*, *Vitis vinifera*, *Arabidopsis*, *Lycopersicum esculentum*, *Nicotiana plumbaginifolia* και *Asparagus officinalis* (Sakakibara, *et al.*, 1995; Syntichaki *et al.*, 1996; Melo-Oliveira *et al.*, 1996; Turano *et al.*, 1997; Purnell *et al.*, 1997; Ficarelli *et al.*, 1999; Restivo *et al.*, 2000).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την κάθε υπομονάδα του ολοενζύμου μπορεί να επάγεται από διαφορετική πηγή αζώτου ή άνθρακα. Αποδείχτηκε ότι σε κάλλους αμπέλου, που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε αμμωνιακά άλατα, επάχθηκε σημαντικά η αμινωτική δράση της GDH. Η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας της GDH συνοδεύτηκε από *de novo* σύνθεση της α- υπομονάδας ενώ δεν παρατηρήθηκε αύξηση της β- υπομονάδας από την επίδραση της αμμωνίας (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1992). Από την μελέτη της μεταβολής του προτύπου των ισοενζύμων έπειτα από επαγωγή με αμμωνία, βρέθηκε ότι η αμμωνία προκάλεσε αύξηση των πιο ανοδικών ισοενζύμων που αποτελούνται κυρίως από την α- υπομονάδα. (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1992).

2.2 Φυσιολογική δράση της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης

Παρά το ότι η GDH είναι ένα ένζυμο που απαντάται σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ο φυσιολογικός της ρόλος δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί και αποτελεί σημείο αιχμής της ενεργής έρευνας. Έχουν διατυπωθεί πολλές θεωρίες για την πιθανή λειτουργία του ενζύμου. Αρχικά κυριαρχούσε η αντίληψη ότι ο βασικός λειτουργικός ρόλος της GDH ήταν η

αφομοίωση της ενδοκυτταρικής αμμωνίας για τον σχηματισμό γλουταμικού οξέος. Στη πορεία όμως προτάθηκε η συμπληρωματική δράση του ενζύμου, παράλληλα με την δράση του ενζυμικού συστήματος GS/GOGAT σε ένα μοντέλο που προτείνει την συνεργιστική δράση GDH/GS/GOGAT στην αφομοίωση της αμμωνίας (Yamaya *et al.*, 1984; Srivastava and Singh, 1987; Rhodes *et al.*, 1989; Dubois *et al.*, 2003). Αντίρρηση στη θεωρία αυτή είναι ότι η GDH εμφανίζει υψηλό Km για την αμμωνία.

Μια άλλη θεωρία υποστηρίζει ότι η GDH έχει περισσότερο καταβολική δράση παρά αναβολική. Αυτό σημαίνει ότι η ισορροπία της αντίδρασης στην οποία συμμετέχει ευνοείται προς την πλευρά της απαμίνωσης του γλουταμικού οξέως, με αποτέλεσμα το σχηματισμό αμμωνίας και α-κετογλουταρικού οξέος (Εικ. 4, Wallsgrove *et al.*, 1983, 1987; Robinson *et al.*, 1991, 1992). Αυτή η αντίδραση είναι πιθανόν να λαμβάνει χώρα σε καταστάσεις, όπου η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ανθρακικών σκελετών είναι μειωμένη, όπως στην περίπτωση της έλλειψης υδατανθράκων.

Τέλος, μια διαφορετική πρόταση σχετικά με το φυσιολογικό ρόλο της GDH, είναι ότι το ένζυμο αυτό συμμετέχει σε διαδικασίες αποτοξίνωσης του κυττάρου από αμμωνία σε καταστάσεις καταπόνησης, όπου τα επίπεδα της είναι πολύ υψηλά και κατά συνέπεια τοξικά για το φυτό (Givan, 1979, Benachenhou-Lahfa, 1994; Primikirios and Roubelakis-Angelakis, 1999, 2001; Dubois *et al.*, 2003). Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι το ένζυμο αυξάνει την ενεργότητα του σε συνθήκες βιοτικής και αβιοτικής καταπόνησης (Ramanjuly, 1994; Osuji, 1996). Η θεωρία αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η α-υπομονάδα της GDH από *Vitis vinifera* cv Sultanina παρουσιάζει υψηλή αμινοξική ομολογία με το αντίστοιχο ένζυμο από αρχαιοβακτήρια (Syntichaki *et al.*, 1996), γεγονός που αποτελεί ένδειξη λειτουργικής ή εξελικτικής σχέσης μεταξύ των GDH στα φυτά και στα αρχαιοβακτήρια τα οποία επιβιώνουν σε συνθήκες υψηλής καταπόνησης.

3. Η ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΑΠΟ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ

Σήμερα, το 20% της παγκόσμιας καλλιεργούμενης γης και περίπου το 50% της αρδευόμενης εμφανίζει πρόβλημα αλατότητας (Zhu, 2001). Η χαμηλή βροχόπτωση, η υψηλή εξάτμιση, τα τοπικά πετρώματα, το υφάλμυρο νερό αρδύσεως και η κακή διαχείριση του νερού μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα αλατότητας στις αγροτικές περιοχές. Η αντιμετώπιση του προβλήματος γίνεται συνήθως με τη λήψη ειδικών μέτρων, όπως η απαλλοτρίωση αλατούχων εδαφών, η βελτίωση του αλμυρού νερού άρδευσης και ειδικές τεχνικές καλλιέργειας. Οι παραπάνω λύσεις συνήθως έχουν υψηλό κόστος και αντιμετωπίζουν προσωρινά το πρόβλημα της αλατότητας. Ως πιο μόνιμη λύση προτείνεται η επιλογή και καλλιέργεια ποικιλιών που είναι ανεκτικές ή ανθεκτικές σε συνθήκες αλατότητας (Dasgan *et al.*, 2002). Για να είναι υλοποιήσιμη η παραπάνω πρόταση είναι απαραίτητη η κατανόηση των μηχανισμών, με τους οποίους τα φυτά αντιλαμβάνονται τα περιβαλλοντικά σήματα και τα μεταφέρουν στην κυτταρική μηχανή, καθώς και η γνώση του μηχανισμού σηματοδότησης (stress signal transduction) (Xiong *et al.*, 2002).

Η αλατότητα είναι ένας πολύπλοκος περιβαλλοντικός αναστολέας που προκαλεί καταπόνηση στα φυτά με τρεις κυρίως τρόπους:

(α) Υψηλή συγκέντρωση ιόντων Na^+ και Cl^- στο εδαφικό διάλυμα και επακόλουθη αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης σε τοξικά για το κύτταρο επίπεδα, οδηγεί στην ιοντική καταπόνηση. Η καταπόνηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση ενζύμων και την παρεμπόδιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης.

(β) Συσσώρευση μεγάλης ποσότητας αλάτων στο εδαφικό διάλυμα προκαλεί πτώση του ωσμωτικού δυναμικού του εδάφους το οποίο οδηγεί στην ωσμωτική καταπόνηση των κυττάρων. Μειώνεται η πρόσληψη νερού και αυξάνεται η συγκέντρωση των ανόργανων ιόντων στο κύτταρο.

(γ) Αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Na^+ και μείωση της συγκέντρωσης των ιόντων K^+ και Ca^{2+} , που είναι απαραίτητα για τη θρέψη του φυτού (Dasgan, 2002). Επίσης, η αλατότητα προκαλεί αποδόμηση των

μεμβρανών, αύξηση των ενεργών μορφών οξυγόνου, παρεμπόδιση της φωτοσύνθεσης, μείωση πρόσληψης των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, που είναι δυνατόν να οδηγούν σε καταστροφικά γεγονότα μέχρι και στο θάνατο του φυτού (Hasegawa *et al.*, 2000; Dasgan, 2002). Τα φυτά προκειμένου να αντιμετωπίσει τις αρνητικές επιδράσεις της αλατότητας έχουν αναπτύξει κατάλληλους μηχανισμούς αντίδρασης.

Όσον αφορά την ιοντική ισορροπία στα φυτά, αυτή μεταβάλλεται εξαιτίας της εισροής ιόντων Na^+ από τα κανάλια μεταφοράς ιόντων K^+ . Η ομοιότητα των δύο ιόντων δυσκολεύει το διαχωρισμό τους από το φυτό, με αποτέλεσμα αυτό να αποτελεί τη βάση του προβλήματος της τοξικότητας από ιόντα Na^+ . Ο βασικότερος μηχανισμός απομάκρυνσης των ιόντων Na^+ ρυθμίζεται από τις H^+ -ΑΤΡάσες της κυτταρικής μεμβράνης και του τονοπλάστη (Sussman, 1994). Οι H^+ -ΑΤΡάσες χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του αδενοσίνου-τριφωσφορικού οξέος (ΑΤΡ) για να αντλήσουν H^+ έξω στο κύτταρο δημιουργώντας ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό H^+ . Αυτή η μετακίνηση πρωτονίων, που δημιουργείται, χρησιμοποιείται για την λειτουργία των αντιμεταφορέων Na^+/H^+ οι οποίοι βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και στον τονοπλάστη και προκαλούν την ανταλλαγή των τοξικών ιόντων Na^+ με ιόντα H^+ μεταξύ των μεμβρανών (Blumwald *et al.*, 2000; Dasgan, 2002; Allakhverdiev, 2000; Maunsour, 2003).

Η αντίδραση των φυτών στην ωσμωτική καταπόνηση γίνεται επίσης με τη βιοσύνθεση οργανικών μορίων, των ωσμωλυτών, μορίων που παρουσιάζουν υψηλή διαλυτότητα και δεν εμπλέκονται στο κυτταρικό μεταβολισμό ακόμα και σε αυξημένες συγκεντρώσεις. Οι ωσμωλύτες που συναντώνται συχνότερα είναι απλά και σύνθετα σάκχαρα (σακχαρόζη, φρουκτόζη, τρεχαλόζη, ραφινόζη, φρουκτάνες), πολυαμίνες, μεθυλιωμένες ινοσιτόλες, αλκοόλες (πινιτόλη, μαννιτόλη, γλυκερόλη, σορβιτόλη) ή φορτισμένοι μεταβολίτες, όπως γλυκίνη-μπεταΐνη και ακόμη προλίνη και εκτοΐνη. Διαμερισματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, στο στρώμα και στις κοιλότητες των οργανιδίων, προσφέροντας ωσμωτική εξισορρόπηση με το χυμοτόπιο (Blumwald, 2000; Hasegawa *et al.*, 2000).

Κατά την καταπόνηση από αλατότητα παρουσιάζεται επίσης έντονη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ΕΜΟ). Οι οργανισμοί για να αντεπεξέλθουν έχουν οδηγηθεί στην ανάπτυξη αντιοξειδωτικής άμυνας για την απόσβεση και εξουδετέρωση των ΕΜΟ και για την αντιμετώπιση της βλάβης που αυτές προκαλούν. Ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των ΕΜΟ γίνεται και η αντίστοιχη ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις των ΕΜΟ μπορεί να οδηγήσουν σε προγραμματισμένο θάνατο των κυττάρων (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001).

Η μεταφορά του σήματος κατά την καταπόνηση από αλατότητα ξεκινάει με την πρόσληψη του ερεθίσματος (του ιοντικού και ωσμωτικού παράγοντα) από μεμβρανικούς υποδοχείς και ακολουθείται από τη δημιουργία ενός δευτερεύοντος σήματος, π.χ. ενεργών μορφών οξυγόνου, το οποίο μεταβάλλει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ιόντων Ca^{+} και οδηγεί σε φωσφορυλίωση πρωτεϊνών ή σε ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, με στόχο την προστασία του κυττάρου από την καταπόνηση. Τα μονοπάτια μεταφοράς σήματος για την αλατότητα θα μπορούσαν να χωριστούν σε τρεις τύπους σηματοδότησης (Xiong *et al.*, 2002):

(1) Η ωσμωτική καταπόνηση χρησιμοποιεί ως μέσο σηματοδότησης τις MAP κινάσες, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα, ένζυμα βιοσύνθεσης των ωσμωλυτών καθώς επίσης και γονίδια που συνδέονται με τον κυτταρικό κύκλο και ρυθμίζονται θετικά κάτω από συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης.

(2) Κατά τη σηματοδότηση που γίνεται μέσω καναλιών Ca^{+} γίνεται αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{+} . Αποτέλεσμα αυτού είναι η ενεργοποίηση κινασών, που εξαρτούνται από αυτό και μέσω φωσφορυλίσεων ενεργοποιούνται μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη μεταφορά σήματος κατά την αλατότητα για την ενεργοποίηση ειδικών γονιδίων όπως των *lea* (late embryogenesis abundant).

(3) Κατά την ιοντική καταπόνηση έχουμε ενεργοποίηση ενός σήματος ιόντων Ca^{+} το οποίο έχει αποδειχθεί ότι είναι συγκεκριμένο για καταπόνηση

από ιόντα Na^+ (Lauchli, 1990; Knight *et al.*, 1997). Το σήμα αυτό κωδικοποιεί τα γονίδια *sos* (salt overly sensitive), που οδηγούν στην ενεργοποίηση αντιμεταφορέων, προκειμένου να επανακτήσει το κύτταρο την ιοντική του ομοιόσταση.

3.1. Ενεργές Μορφές Οξυγόνου

Ένας χαρακτηριστικός δείκτης του βαθμού καταπόνησης ενός οργανισμού είναι οι ενεργές μορφές οξυγόνου (EMO). Πρόκειται για ανηγμένες μορφές του μοριακού οξυγόνου, οι οποίες έχουν ισχυρά οξειδωτικό χαρακτήρα. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι πολύ τοξικές για το κύτταρο και προκαλείται οξειδωτική καταπόνηση. Η οξειδωτική καταπόνηση έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση πρωτεϊνών, του DNA και του RNA. Σηματοδοτεί την αρχή της γήρανσης και τελικά οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο (Elstner, 1982; Scandalios, 1993; Ye *et al.*, 2000; Mittler, 2002). Οι κύριες μορφές των EMO είναι τα σουπεροξειδία ($\text{O}_2^{\cdot-}$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), η υδροξυλική ρίζα (OH^{\cdot}) και το ενεργό οξυγόνο $^1\text{O}_2$ (Asada *et al.*, 1986; Asada *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2000).

3.2. Παραγωγή Ενεργών μορφών οξυγόνου

Ποικίλα συστήματα, ενζυμικά και μη είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην παραγωγή των EMO (Murphy *et al.*, 1998). Οι EMO παράγονται κατά τον φυσιολογικό μεταβολισμό με πολλούς τρόπους:

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), παράγεται κατά τη φωτοαναπνοή στα περοξεισώματα με τη δράση της οξειδάσης του γλυκολικού οξέος, τη β-οξείδωση των λιπιδίων στα περοξεισώματα, από περοξειδάσες που εντοπίζονται στο κυτταρικό τοίχωμα, από τη δράση οξειδασών των αμινών και του οξαλικού οξέος στον αποπλάστη.

Το σουπεροξειδικό ιόν ($\text{O}_2^{\cdot-}$), παράγεται μέσω της φωτοσύνθεσης στους χλωροπλάστες και κατά την αναπνοή, και επίσης κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Επίσης είναι δυνατόν να παραχθεί από

ενζυμικές πηγές όπως οι NADPH οξειδάσες, εντοπισμένες στην πλασματική μεμβράνη και με τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης στα περοξεισώματα.

Η υδροξυλική ρίζα (OH[•]), είναι από τα πλέον δραστικά μόρια στα βιολογικά συστήματα, και μπορεί να σχηματιστεί κατά την άμεση αντίδραση μεταξύ O₂⁻ και H₂O₂. Η αντίδραση αυτή εξελίσσεται με πολύ αργό ρυθμό και είναι ανεπαρκής για την συσσώρευση σημαντικών ποσοτήτων OH[•]. Αντίθετα, σημαντικά επίπεδα μπορούν να σχηματιστούν μέσω αντιδράσεων που εμπλέκουν οξείδωση μετάλλων, όπως Fe²⁺ και Cu⁺, με την αντίδραση Fentonm η οποία είναι αυθόρμητη μη ενζυμική αντίδραση (Wojtaszek, 1997; Mittler, 2002; Neill *et al.*, 2002).

Για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου απαιτούνται χαμηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις των EMO. Υπάρχουν όμως βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις που αλλάζουν την ομοιόσταση του κυττάρου και οδηγούν στην υπερπαραγωγή των EMO. Τέτοιες είναι η ξηρασία, η υψηλή αλατότητα, οι ακραίες θερμοκρασίες, τα βαρέα μέταλλα, οι ατμοσφαιρικοί ρυπαντές όπως το όζον, η υπεριώδης ακτινοβολία, τα ζιζανιοκτόνα, η μηχανική πίεση και ο τραυματισμός, η υψηλή ηλιακή ακτινοβολία και η προσβολή από παθογόνα. Οι EMO μπορεί να λειτουργήσουν ως κυτταρικοί δείκτες καταπόνησης, αλλά και ως δευτερεύοντα μηνύματα στο μονοπάτι μεταφοράς σήματος ως αντίδραση στις καταπονήσεις (Sutherland, 1991; Bowler, 1992; Langebartes *et al.*, 2002; Mittler 2002).

3.3. Αντιοξειδωτικός μηχανισμός

Σε περιπτώσεις υπερπαραγωγής των EMO, η αποτοξίνωση του φυτικού κυττάρου, με τη βοήθεια του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, δεν είναι δυνατή. Έτσι προκαλείται οξειδωτική καταπόνηση (oxidative burst), που οδηγεί στην οξείδωση των βιομορίων (Richter and Schweitzer, 1997) ή ακόμη και σε κυτταρικό θάνατο (Buckner, 2000; Jones, 2000). Μέχρι πρόσφατα οι EMO θεωρούνταν αποκλειστικά ως τοξικοί μεταβολίτες. Είναι πλέον φανερό ότι πέραν της τοξικότητάς τους αποτελούν μόρια-σηματοδότησης, που

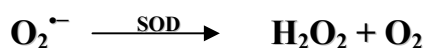
συμμετέχουν σε αποκρίσεις από βιοτικά και αβιοτικά ερεθίσματα, τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα (Finkel, 2000; Rhee *et al.*, 2000; Neill *et al.*, 2002)

Στις βιοτικές καταπονήσεις, οι ΕΜΟ (κυρίως το H_2O_2) εμπλέκεται άμεσα στον μηχανισμό αντοχής του φυτού σε προσβολές από παθογόνα και στην αντίδραση υπερευαισθησίας, που οδηγεί σε προγραμματισμένο θάνατο κυττάρων του ξενιστή. Με τον τρόπο αυτό το παθογόνο εγκλωβίζεται και η μόλυνση δεν επεκτείνεται σε ολόκληρο το φυτό. Επίσης εμπλέκονται έμμεσα και στη συστηματική επίκτητη αντοχή. Το H_2O_2 συμμετέχει και στην ισχυροποίηση του κυτταρικού τοιχώματος (λιγνιτοποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων), με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αντοχής τους κατά τη προσπάθεια διείσδυσης των παθογόνων. Παράλληλα συμμετέχουν σε αλυσίδες μεταφοράς σήματος για την επαγωγή γονιδίων αντοχής.

Στις αβιοτικές καταπονήσεις η παραγωγή των ΕΜΟ επάγει την ενεργοποίηση γονιδίων άμυνας και ενεργοποιητές του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Όταν όμως κατά την καταπόνηση η παραγωγή των ΕΜΟ υπερβαίνει την απόσβεση από τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό, τότε προκαλείται οξειδωτική καταπόνηση που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (Ye *et al.*, 2000; Mittler, 2002; Langenbartels *et al.*, 2002).

Για την αντιμετώπιση της οξειδωτικής καταπόνησης τα φυτικά κύτταρα έχουν αναπτύξει αμυντικό μηχανισμό, ο οποίος αποτελείται από αντιοξειδωτικά συστήματα, ενζυμικά και μη, τα οποία στοχεύουν στην απόσβεση των ΕΜΟ μέσα στο κύτταρο. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD, EC 1.15.1.1), η καταλάση (CAT, E.C.1.11.1.6), η περοξειδάση (POX, EC 1.11.1.7) και τα ένζυμα του κύκλου Halliwell-Asada (ασκορβική περοξειδάση (APO, EC 1.11.1.11), αναγωγή της γλουταθειόνης (GR, EC 1.6.4.2), αναγωγή του μονοδιϋδροασκορβικού (MDHAR, EC 1.6.5.4) και αναγωγή του διϋδροασκορβικού (DHAR, EC 1.8.5.1) (Halliwell, 1978).

Η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD) αποσβένει το $O_2^{\cdot-}$ που παράγεται από διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, αποτρέποντας έτσι την οξείδωση των βιομορίων από το ίδιο ή τα παράγωγά του (Karpinska *et al.*, 2001, Εικ. 5).



Εικόνα 5. Μετατροπή του $\text{O}_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 και O_2 από την SOD.

Ανήκει στις μεταλλοπρωτεΐνες. Στα ανώτερα φυτά έχουν περιγραφεί τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τους μεταλλικούς συμπράγοντες που φέρουν στο ενεργό τους κέντρο: Mn-SOD, Fe-SOD και Cu/Zn-SOD (Eltner, 1982). Στα φυτά έχουν εντοπιστεί διάφοροι τύποι ισοενζύμων της SOD σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα. Τυπικά η Mn-SOD είναι μιτοχονδριακή, η Fe-SOD χλωροπλαστική και οι Cu/Zn-SOD ισομορφές εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και τον χλωροπλάστη, αν και έχουν αναφερθεί και στα περοξεισώματα (Platnik *et al.*, 2002).

Η καταλάση (CAT) διασπά το H_2O_2 στα περοξεισώματα. Παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια με το υπόστρωμα και η αντίδραση απαιτεί ταυτόχρονη πρόσβαση σε δύο μόρια H_2O_2 (Εικ.6).

Είναι μια τετραμερής αιμο-πρωτεΐνη που αποτελείται από τρία ισοένζυμα: η CAT-3 είναι ένα μιτοχονδριακό ένζυμο, ενώ οι CAT-1 και CAT-2 είναι κυτταροπλασματικές ή περοξεισωματικές/γλυοξυσωμικές (Horvath *et al.*, 2002).



Εικόνα 6. Μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O και O_2 από τη CAT.

Οι περοξειδάσες (POX) κυρίως εντοπίζονται στα κυτταρικά τοιχώματα, στα χυμοτόπια και στο κυτταρόπλασμα. Κύρια λειτουργία τους είναι η απόσβεση του H_2O_2 , που παράγεται σε αυτές τις περιοχές του κυττάρου.

Τα ενζυμικά συστήματα του κύκλου Halliwell-Asada, αποσβένουν το H_2O_2 . Τα ένζυμα που συμμετέχουν στον κύκλο αυτό είναι η APO, GR, MDHAR και η DHAR (Halliwell, 1978). Η APX αποτελείται από τέσσερις ισομορφές, που έχουν εντοπιστεί σε αρκετά φυτικά είδη. Εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, στα περοξεισώματα και στους χλωροπλαστικές και αποσβένει το H_2O_2 που

παράγεται στα οργανίδια αυτά (Mittler and Zulinskas, 1992; Asada, 1992a; Yamaguchi *et al.*, 1995).

Στα φυτικά κύτταρα εντοπίζονται και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια, όπως η γλουταθειόνη και το ασκορβικό οξύ, που είναι μόρια του κύκλου Halliwell-Asada και βοηθούν στην αποτοξίνωση του κυττάρου από το H_2O_2 . Οι πολυαμίνες, η α-τοκοφερόλη, τα φλαβονοειδή, τα καροτενοειδή, τα αλκαλοειδή και άλλα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού είναι επίσης σημαντικά αντιοξειδωτικά βιομόρια. Η α-τοκοφερόλη και τα καροτενοειδή αποσβένουν το 1O_2 (Iannelli *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2002; Nemeth *et al.*, 2002).

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες που έχουν εκπονηθεί στο Εργαστήριο μας, έχουν οδηγήσει στη διατύπωση της πρότασης ότι η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH) ίσως σχετίζεται με καταστάσεις καταπόνησης (Syntichaki *et al*, 1996; Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1992; Primikiriou and Roubelakis-Angelakis, 1999, 2001). Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια περαιτέρω τεκμηρίωσης της πρότασης αυτής. Αρχικά, χρησιμοποιώντας ως παράγοντα καταπόνησης την αλατότητα, μελετήθηκε η επίδρασή της στην παραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου (EMO). Στη συνέχεια ακολούθησε συσχέτιση της ενεργότητας της GDH κατά την αλατότητα. Για τη μελέτη της παραπάνω πρότασης, τα συστήματα που επιλέχθηκαν για να χρησιμοποιηθούν ήταν: φυλλικοί δίσκοι αμπέλου (*Vitis vinifera* cv Sultanina; *Vitis berlandieri*×*Vitis rupestris* cv 1103 Paulsen) και καπνού (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi) καθώς επίσης κάλλοι και αιωρούμενη καλλιέργεια κυττάρων αμπέλου (*Vitis vinifera* cv Sultanina). Τα παραπάνω συστήματα υποβλήθηκαν σε μεταχειρίσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (NaCl) για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Η πειραματική προσέγγιση περιλάμβανε:

- (1) Μελέτη του προτύπου έκφρασης της GDH
 - (α) μέτρηση της ειδικής ενεργότητας της GDH,
 - (β) μελέτη του ισοενζυμικού προτύπου με φυσική ηλεκτροφόρηση,
 - (γ) ανοσοεντοπισμός των δύο υπομονάδων,
 - (δ) μελέτη της έκφρασης του *Vvgdha*.
- (2) Μέτρηση των ενεργών μορφών οξυγόνου.
- (3) Μέτρηση της ειδικής ενεργότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, CAT και APO.
- (4) Μέτρηση συγκέντρωσης των χλωροφυλλών.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

1.1. Φυλλικοί δίσκοι καπνού και αμπέλου

Οι μεταχειρίσεις πραγματοποιήθηκαν σε φυλλικούς δίσκους αμπέλου από *Vitis vinifera* cv Sultanina και 1103 Paulsen (*Vitis berlandieri*×*Vitis rupestris*). Το 1103Paulsen είναι ένα υποκείμενο αμπέλιου που έχει καταγραφεί στην βιβλιογραφία ως ανθεκτικό στην αλατότητα. Τα φύλλα που χρησιμοποιήθηκαν για την κοπή των φυλλικών δισκίων είχαν ομοιόμορφη ανάπτυξη και ήταν νεαρά φύλλα ετήσιου βλαστού φυτών θερμοκηπίου. Μεταχειρίσεις πραγματοποιήθηκαν επίσης σε αιωρούμενη καλλιέργεια κύτταρων αμπέλου και κάλλους *Vitis vinifera* cv Sultanina και σε φυλλικούς δίσκους από φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi).

1.2. Κάλλοι αμπέλου

Οι κάλλοι αναπτύχθηκαν από φύλλα αμπέλου, που προήλθαν τόσο από το θερμοκήπιο όσο και από *in vitro* φυτά. Τα φύλλα υποβλήθηκαν σε επιφανειακή απολύμανση με διάλυμα υποχλωριώδους οξέος (εμπορικό σκεύασμα) 10% (v/v) όπου και παρέμειναν για 10 min. Στην συνέχεια πλύθηκαν με απιονισμένο νερό τρεις φορές επί 10 min και τοποθετήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας Murashige and Skoog (1962), τροποποιημένο ώστε να περιέχει μόνο 20 mM KNO₃ ως μοναδική πηγή αζώτου, καθώς επίσης και 5 μM NAA (α-naphthaleneacetic acid) και 2 μM 6-BAP (N⁶-benzylaminopurine). Τα φύλλα παρέμειναν σε συνθήκες σκότους για 20-30 ημέρες και σε θερμοκρασία 25 °C, μέχρι τη δημιουργία των πρώτων κάλλων. Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν για 2 γενεές και το σύστημα ήταν έτοιμο για την πραγματοποίηση της επαγωγής με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl.

1.3. Αιωρούμενη καλλιέργεια κυττάρων αμπέλου

Το σύστημα κυτταροκαλλιιεργειών Αμπέλου αναπτύχθηκε αρχικά από *in vitro* αναπτυγμένους κάλλους. Οι κάλλοι αναπτύχθηκαν για 2 συνεχόμενες γενεές σε συνθήκες σκότους στους 25°C, μέσα σε θρεπτικό μέσο Murashige and Skoog (1962), τροποποιημένο ώστε να περιέχει μόνο 20 mM KNO₃ ως μοναδική πηγή αζώτου, καθώς επίσης και 5 μM NAA (α-naphthaleneacetic acid) και 2 μM 6-BAP (N⁶-benzylaminopurine). Στην συνέχεια, μεταφέρθηκε ποσότητα κυττάρων από τους κάλλους σε θρεπτικό μέσο LS, το οποίο αποτελείται από την ίδια σύνθεση με το θρεπτικό μέσο MS, με μοναδική διαφορά την αντικατάσταση της ορμόνης κυτοκινίνης 6-BAP με την αυξίνη 2,4-D. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες σκότους για περίπου 7-8 μέρες στους 25°C σε συνθήκες σκότους, σε θρεπτικό μέσο LS (Linsmaier and Skoog, 1965). Αφού παρασκευάστηκαν δεύτερης γενιάς κυτταροκαλλιέργειες, το σύστημα ήταν έτοιμο για την πραγματοποίηση της επαγωγής κυτταροκαλλιιεργειών με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl.

2. ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ NaCl

Οι φυλλικοί δίσκοι κόπηκαν με τη χρήση φελλοτρυπητήρα. Η κοπή έγινε σε δοχείο με απεσταγμένο νερό, έτσι ώστε να διατηρούν την υγρασία τους μέχρι να ξεκινήσουν οι μεταχειρίσεις. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν 30 mL διάλυμα NaCl σε συγκεντρώσεις 0 mM, 50 mM, 100 mM και 200 mM. Κάθε τρυβλίο περιείχε από 1 φυλλικό δίσκο/mL διαλύματος. Εκεί επώαστηκαν για 72h, σε θερμοκρασία 27,5±0,5° και σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού (100μmole·photons·m⁻²sec⁻¹) εξασφαλίζοντας πλήρη φωτοσυνθετική δραστηριότητα έτσι ώστε οι φυλλικοί δίσκοι να προσλάβουν το NaCl. Μετά το πέρας των 72h τα δισκία ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και ζυγίστηκε το φρέσκο βάρος του ιστού (~ 0,5 g).

Οι μεταχειρίσεις στις κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου άρχισαν τρεις ημέρες μετά την υποκαλλιέργειά τους. Σε περίπου 100 mL καλλιέργειας τοποθετήθηκε

κατάλληλη ποσότητα NaCl, γνωστής συγκέντρωσης, έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση NaCl σε κάθε καλλιέργεια (0 mM, 50 mM, 100 mM NaCl). Στη συνέχεια επώστηκαν στους 25°C σε συνθήκες σκότους. Δειγματοληψία πραγματοποιούνταν κάθε 24h σε αποστειρωμένες συνθήκες για να αποφευχθούν πιθανές μολύνσεις. Οι μεταχειρίσεις της κυτταροκαλλιέργειας διήρκεσαν 96h και οι συγκεντρώσεις NaCl που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0 mM, 50 mM και 100mM. Μετά το τέλος κάθε δειγματοληψίας γινόταν μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με κατάλληλη χρωστική, evans blue, με την οποία χρωματίζονται μπλε τα κύτταρα που είναι νεκρά, σε αιματοκυτταρόμετρο με τη βοήθεια μικροσκοπίου.

Οι κάλλοι αφού, αναπτύχθηκαν, μεταφέρθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν στερεό υπόστρωμα MS και διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl. Οι μεταχειρίσεις στην περίπτωση αυτή διήρκεσαν 72h και οι συγκεντρώσεις NaCl που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0 mM, 50 mM, 100 mM και 200 mM. Δειγματοληψίες και στην περίπτωση αυτή πραγματοποιήθηκαν κάθε 24h.

3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η πρωτεϊνική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε από φυλλικούς δίσκους καπνού και αμπέλου καθώς και κυτταροκαλλιέργειες Αμπέλου, που είχαν υποστεί τις μεταχειρίσεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Οι φυλλικοί δίσκοι αναμίχθηκαν με 4 όγκους (v/w) κρύου διαλύματος εκχύλισης που περιείχε 20% γλυκερόλη, 200 mM Tris-Cl, pH 8,5 mM DTT (dithiothreitol) ή εναλλακτικά 14 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 μM leupeptin, 0,5 mM PMSF, 0,25% (v/v) Triton X-100 και 10% PVPP ανά gr φρέσκου βάρους ιστού για τον καπνό, ενώ για το αμπέλι χρησιμοποιήθηκε 20% PVPP ανά gr φρέσκου βάρους ιστού. Η λειοτρίβηση έγινε με υγρό άζωτο. Ακολούθησε ομογενοποίηση σε Omnimixer homogenizer 4 φορές, για 40 sec το καθένα. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 12000 rpm για 20 min και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Η διαδικασία εκχύλισης έλαβε χώρα στους 4°C. Στη περίπτωση των κυττάρων και των κάλλων η ανάμιξη έγινε σε 3 όγκους (v/w) κρύου διαλύματος εκχύλισης, το

οποίο περιείχε 200 mM Tris-Cl, pH 8,0, 5 mM DTT (dithiothreitol) ή εναλλακτικά 14 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 μM leupeptin, 0.5 mM PMSF, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 0.5% (v/v) Triton X-100 και 0.2 gr PVPP ανά gr κυττάρων. Ακολούθησε ομογενοποίηση σε Omnimixer homogenizer 3 φορές και για 30 sec το καθεμία.

4. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΕΜΟ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΦΥΛΛΙΚΟΥΣ ΔΙΣΚΟΥΣ ΑΜΠΕΛΟΥ

Για εκχύλιση ΕΜΟ από φυλλικούς δίσκους Αμπέλου, οι φυλλικοί δίσκοι συλλέχθηκαν και αφού αφαιρέθηκε η περίσσεια υγρού επώασης, ζυγίστηκαν. Στην συνέχεια λειοτριβήθηκαν μέσα σε υγρό άζωτο. Στον λειοτριβημένο ιστό προστέθηκε διάλυμα εκχύλισης σε αναλογία 1:3 (w/v). Η σύσταση του διαλύματος εκχύλισης ήταν 100 mM K₃PO₄, pH 6,8. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε με Ultra Turrax σε 20,000 rpm στους 4 °C. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στις 12,000 rpm στους 4 °C για 20 min. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Σε όλην τη διάρκεια της εκχύλισης τα δείγματα παρέμειναν στους 0°C. Για τον έλεγχο του πρωτοκόλλου προστέθηκε στο διάλυμα εκχύλισης H₂O₂ γνωστής συγκέντρωσης.

Για την εκχύλιση ΕΜΟ από την κυτταροκαλλιέργεια αμπέλου χρησιμοποιήθηκαν 5mL καλλιέργειας από κάθε μεταχείριση τα οποία στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 3,000 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των εξωκυτταρικών ΕΜΟ και η πελλέτα εκχυλίστηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω με τη μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε 1mL διαλύματος εκχύλισης.

5. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ LOWRY

Για την ποσοτικοποίηση των ολικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν 20 μl από το κάθε πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Κάθε εκχύλισμα αναμίχθηκε με 20 μl TCA

20% και τα δείγματα επώστηκαν στους 4°C για 30 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14,000 rpm για 10 min και αφαιρέθηκε πολύ καλά η υπερκείμενη φάση. Στην πελλέτα προστέθηκαν 100 μl διαλύματος Lowry A (2g NaOH, 10g Na₂CO₃ ή 11,78g Na₂CO₃×H₂O και 0,1g Na-Ktartate ή 0,139g Na-Ktartate×4 H₂O στα 500 ml νερού). Έπειτα από ζωρή ανάδευση ακολούθησε προσθήκη 1 ml διαλύματος Γ (10 ml A + 0,2 ml B) και το μίγμα επώστηκε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, ακολούθησε προσθήκη 100 μl διαλύματος Δ (1 ml distilled water + 1 ml Faulin). Έπειτα από επώαση για 30 min μετρήθηκε η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 625 nm.

6. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΧΡΩΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (SDS)

Για μεγαλύτερη ακρίβεια και αξιοπιστία μετά τη ποσοτικοποίηση με τη βοήθεια της μεθόδου Lowry, τα δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν και με τη βοήθεια χρώσης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με χρώση των ολικών πρωτεϊνών. Ο ηλεκτροφορετικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε στη συσκευή Mini Protean II της BioRad. Προετοιμάστηκε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (acrylamide:bis, 30: 0,2) η συγκέντρωση της οποίας ήταν στο πήκτωμα ανάλυσης (resolving ή running) 7,5% (w/v) και στο πήκτωμα συμπύκνωσης (stacking gel) 4% (w/v). Τα δείγματα επώστηκαν πριν την ηλεκτροφόρηση στους 95 °C (πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών) για 5min παρουσία 1x sample buffer (0,125M Tris-Cl, pH 6,8, 20% glycerol, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol) στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 4°C (να διατηρηθούν οι πρωτεΐνες στην αποδιαταγμένη τους μορφή). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 100 V μέχρι το μέτωπο να φτάσει στο πήκτωμα της ανάλυσης και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης στα 120V για περίπου 90 min. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιείχε 25mM Tris-192mM γλυκίνη ρυθμισμένο με HCl σε pH 8,1 και 10% SDS. Στη συνέχεια, αφού πρώτα αφαιρέθηκε το πήκτωμα συμπύκνωσης, μεταφέρθηκε το πήκτωμα για χρώση σε 0,1% Coomassie brilliant blue R-250 για 2h. Το πήκτωμα αποχρωματίζεται σε 50%

(v/v) μεθανόλη – 10% (v/v) οξικό οξύ και 15% (v/v) μεθανόλη – 7% (v/v) οξικό οξύ και 15% κατά τη διάρκεια της νύχτας.

7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ENZYΜΙΚΩΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΩΝ

7.1. Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH)

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας, μετρήθηκε η κατανάλωση του NADH στα 340 nm (Loulakakis *et al.*, 1990a). Το διάλυμα προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας περιείχε 100 mM Tris-Cl, pH 8,0, 20 mM α-κετογλουταρικό, 200 mM NH₄Cl και 1 mM CaCl₂. Σε 925 μl από το διάλυμα αυτό το οποίο είχε προθερμανθεί προηγουμένως στους 27°C, προστέθηκαν 50 μl NADH σε τελική συγκέντρωση 0,22 mM, καθώς και 25 μl από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 1 ml. Η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκε στα 340 nm. Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης για το NADH είναι $a_m=6,22 \cdot 10^{-3}$. Υπολογίστηκε ο συντελεστής μετατροπής της διαφοράς της απορρόφησης με βάση τον νόμο Lambert-Beer ($A=a_mCl$) και βρέθηκε ότι είναι ίσος με 0,16. Με βάση αυτόν τον συντελεστή εκφράστηκαν οι ενζυμικές ενεργότητες σε Units (1Unit=1μmole/min NADH). Από κάθε πρωτεϊνικό εκχύλισμα πραγματοποιήθηκαν 3 μετρήσεις συνολικά και υπολογίστηκε ο μέσος όρος από αυτές για το κάθε δείγμα

7.2. Σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η ενζυμική ενεργότητα της SOD προσδιορίστηκε με την χρησιμοποίηση της φωτοχημικής μεθόδου των Mishra *et al.* (1993). Το διάλυμα προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας περιείχε 10 mM K₃PO₄, pH 7,5, 0,222 mM *o*-dianisidine, 0,014 mM riboflavin, σε αυτό προστέθηκαν 20 μg ολικής πρωτεΐνης και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 1 mL. Η οξείδωση του *o*-dianisidine μετρήθηκε στα 460 nm στους 25°C, ανά 5 min και για συνολικό χρόνο 15 min, στο μεσοδιάστημα των οποίων τα

δείγματα ήταν τοποθετημένα σε έντονο φως (cool white). Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της SOD χρησιμοποιήθηκε το γραμμικό τμήμα της καμπύλης. Η μονάδα ενεργότητας της SOD στα πρωτεϊνικά δείγματα ορίστηκε συγκριτικά με την χρησιμοποίηση μίας μονάδας ενεργότητας καθαρής SOD (Horseradish SOD, Sigma). Οι τιμές ανάχθηκαν ανά 1 mg πρωτεΐνης (ειδική ενεργότητα).

7.3. Καταλάση (CAT)

Η ενζυμική ενεργότητα της CAT προσδιορίστηκε με βάση την αποδόμηση του H_2O_2 . Το διάλυμα προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας περιείχε 50 mM K_3PO_4 , pH 8,0, και 15 μM H_2O_2 . Σε αυτό προστέθηκαν 10 μg ολικής πρωτεΐνης και ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 1 mL. Η αποδόμηση του H_2O_2 μετρήθηκε στα 240 nm και σε θερμοκρασία 25°C. Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της CAT χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης, $\epsilon = 0.036 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Οι τιμές ανάχθηκαν στο 1 mg πρωτεΐνης (ειδική ενεργότητα).

7.4. Ασκορβική Περοξειδάση (APO)

Η ενζυμική ενεργότητα της APO προσδιορίστηκε με την χρησιμοποίηση της φωτοχημικής μεθόδου των Nakano και Asada (1981). Το διάλυμα προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας περιείχε 100 mM K_3PO_4 , pH 7,0, 0,5 mM ascorbate, 0,1mM H_2O_2 , σε αυτό προστέθηκαν 10 μg ολικής πρωτεΐνης, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 1 mL. Η κατανάλωση του ασκορβικού οξέος μετρήθηκε στα 290 nm και σε θερμοκρασία 25°C, για 1 min. Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της APO χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης, $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Οι τιμές ανάχθηκαν στο 1 mg πρωτεΐνης (ειδική ενεργότητα).

8. ΦΥΣΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΕΣΗ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ

Για την ανάλυση των ισοενζύμων της GDH, τα πρωτεϊνικά δείγματα διαχωρίστηκαν με φυσική ηλεκτροφόρηση (native-PAGE) στους 4°C. Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 1,5 mm πάχους επίπεδα πηκτώματα και η συσκευή mini Protean II της BioRad. Η πηκτική διαχωρισμού (resolving gel) περιείχε 5% πολυακρυλαμίδη (αναλογία ακρυλαμίδη:bis-ακρυλαμίδη, 30:0,2) ενώ η πηκτική συσσώρευσης (stacking gel) αποτελούνταν από 4% πολυακρυλαμίδη σε όλες τις περιπτώσεις. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν 15 mA για την πηκτική συσσώρευσης και 20 mA για την πηκτική διαχωρισμού. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιείχε 25mM Tris-192mM γλυκίνη ρυθμισμένο με HCl σε pH 8,1.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι ζώνες της GDH που είχαν ενεργότητα εντοπίστηκαν με χρώση τετραζολίου. Το διάλυμα χρώσης περιείχε 100ml Tris-HCl 0,1M pH 9,0, 0,2mL CaCl₂ 10mM, 800 mg glutamic acid, 30 mg NAD⁺, 20 mg mL⁻¹ 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT) και 4mg phenazine methosulfate (PMS). Το πήκτωμα επώαστηκε για 30 min στο σκοτάδι, ξεπλύθηκε και μονιμοποιήθηκε σε 20% (v/v) μεθανόλη – 7% (v/v) οξικό οξύ.

9. ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ

Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έγινε ανοσοανίχνευση της GDH με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος GDH της αμπέλου (Loulakakis *et al.*, 1990a). Ο ηλεκτροφορετικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε στη συσκευή Mini Protean II της BioRad. Η περιεκτικότητα της πηκτικής διαχωρισμού σε πολυακρυλαμίδη ήταν 7,5% και το πάχος της 1,5 mm. Η μετουσίωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε στους 95°C (πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών) για 5min παρουσία 1x sample buffer (0,125M Tris-Cl pH 6,8, 20% glycerol, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol). Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 4 °C,

για να διατηρηθούν οι πρωτεΐνες στην αποδιαταγμένη τους μορφή. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν 80V για την πηκτή συσσώρευσης και 120V για την πηκτή διαχωρισμού.

Για την τεχνική του western blot χρησιμοποιήθηκε συσκευή μεταφοράς Mini Trans Blot της BioRad και μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,2 mm. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 25 mM Tris- γλυκίνης, pH 8,3, σε σταθερή τάση 80 V και συνεχίστηκε, μέχρις ότου η τιμή της έντασης του ρεύματος έφθασε τα 400 mA (45 min). Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πλύθηκε σε διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) [0,8% (w/v) NaCl, 0,02% (w/v) KCl, 0,115% (w/v) Na₂HPO₄, 0,02% (w/v) KH₂PO₄] για 10 min, το οποίο εξισορροπεί τη μεμβράνη και δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-αντισώματος. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε διάλυμα PBS - 2% (w/v) BSA (Bovine Serum Albumin) όπου και παρέμεινε, υπό ελαφρά ανάδευση, για 1-1,5h. Με τη διαδικασία αυτή μπλοκάρονται οι αδέσμευτες θέσεις στην επιφάνεια της μεμβράνης. Ακολούθησαν διαδοχικά πλυσίματα (5 φορές για 5 min) της μεμβράνης με διάλυμα PBS / 0.05% (v/v) Tween-20. Η μεμβράνη επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2h με το αντίσωμα [1:5000 (v/v)].

Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη παρασκευάστηκε και απομονώθηκε από κουνέλι, εναντίον του πιο ανοδικού ισοενζύμου της GDH. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει και προσδένεται σε όλες τις ισομορφές της GDH (Loulakakis *et al.*, 1990a). Η αραίωση του αρχικού ορού έγινε σε διάλυμα PBS, 0.05% (v/v) Tween-20 και 1% (w/v) BSA. Κατόπιν, η μεμβράνη ξεπλύθηκε σε διάλυμα PBS 0,05% (v/v) Tween-20 (5 φορές για 5 min), για να ακολουθήσει η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα (anti-Rabbit IgG; Sigma), αναγνωρίζει τη σταθερή περιοχή, Fc, των ανοσοσφαιρινών τάξεως IgG του κουνελιού και φέρει προσαρτημένο το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης. Η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα πραγματοποιήθηκε επίσης σε θερμοκρασία δωματίου, για 2h και με συνεχή ανάδευση. Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, η

μεμβράνη ξεπλύθηκε αρχικά με διάλυμα PBS 0.05% (v/v) Tween-20 (2 φορές για 5 min) και στη συνέχεια με διάλυμα 0,1 M διαιθανολαμίνης (DEA), pH 9,6 (2 φορές για 5 min). Η χρώση της μεμβράνης από τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης στηρίζεται στον οξειδωτικό πολυμερισμό του άλατος του τετραζολίου NBT (μπλε του νιτροτετραζολίου), προς κεραμέρυθρη φορμαζάνη. Το απαιτούμενο οξειδοαναγωγικό δυναμικό προκύπτει από τη μετατροπή του υποστρώματος 5-βρωμο-4-χλώρο-3-φωσφορικού οξέος (BCIP). Το διάλυμα αντίδρασης περιείχε 0.1 M DEA, pH 9,6, 0.01% (w/v) NBT και 1%(w/v) BCIP. Η αντίδραση τερματίστηκε με εμβάπτιση της μεμβράνης σε απιονισμένο νερό.

10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ H_2O_2

Η μέτρηση της συγκέντρωσης H_2O_2 τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά έγινε με την βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης (luminl, Sigma, Munchen, Germany), όπως έχει ήδη περιγραφεί (Murphy and Huerta, 1990).

10.1. Προσδιορισμός ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης H_2O_2

Ο προσδιορισμός της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης H_2O_2 πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 1 mL, τοποθετώντας σε δοκιμαστικό σωλήνα σπινθηρισμού τα ακόλουθα: 0,69 mL διαλύματος αντίδρασης (που περιείχε 10 mM Tris pH, 7,0, 1 mM $CaCl_2$ και 0,1 mM KCl), 0,2 mL από 1 mM φρέσκου διαλύματος λουμινόλης, 0,1 μονάδα περοξειδάσης σε 20 mM K_3PO_4 (pH 7,4) και 0,1 mL εκχύλισμα ΕΜΟ. Ο δοκιμαστικός σωλήνας σπινθηρισμού τοποθετήθηκε αμέσως σε μετρητή σπινθηρισμού (LS 8000, Beckman) και μετρήθηκε η χημειοφωταύγεια. Οι κρούσεις μετρήθηκαν κάθε 15 sec για 1 min και οι δύο τελευταίες τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής. Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη προκειμένου να συσχετιστούν οι τιμές της χημειοφωταύγειας (cpm) με την

συγκέντρωση του H_2O_2 και επίσης χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι μάρτυρες για κάθε περίπτωση.

10.2. Προσδιορισμός εξωκυτταρικής συγκέντρωσης H_2O_2

Ο προσδιορισμός της εξωκυτταρικής συγκέντρωσης H_2O_2 πραγματοποιήθηκε κατά τα ίδια πρότυπα με τη μόνη διαφορά ότι ο συνολικός όγκος αυξήθηκε στα 2 mL, και χρησιμοποιήθηκε 1 mL διαλύματος επώασης φυλλικών δίσκων ή μέσου καλλιέργειας κυττάρων, αντί των 0,1 mL εκχυλίσματος.

11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ $O_2^{\bullet-}$

Η παραγωγή του $O_2^{\bullet-}$ ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά μελετήθηκε με την βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας της λουσιγενίνης (lucigenin, Sigma, Munchen, Germany), η οποία είναι ειδική για την ανίχνευση του $O_2^{\bullet-}$ (Corbisier *et al.*, 1987).

11.1. Προσδιορισμός ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης $O_2^{\bullet-}$

Η μέτρηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης $O_2^{\bullet-}$ πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 1 mL, τοποθετώντας σε δοκιμαστικό σωλήνα σπινθηρισμού τα ακόλουθα: 0,7 mL διαλύματος αντίδρασης (που περιείχε 0,1 M Glycine NaOH, pH 9,0 και 1 mM EDTA), 0,2 mL από 1 mM διαλύματος λουσιγενίνης και 0,1 mL εκχυλίσματος ΕΜΟ. Όλες οι άλλες συνθήκες, που περιγράφηκαν για την βιοδοκιμή του H_2O_2 ακολουθήθηκαν και στην περίπτωση του $O_2^{\bullet-}$. Οι κρούσεις μετρήθηκαν κάθε 6 sec για 0,5 min και οι δύο τελευταίες τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής.

11.2. Προσδιορισμός εξωκυτταρικής συγκέντρωσης $O_2^{\bullet-}$

Όπως και στην περίπτωση του H_2O_2 ο προσδιορισμός της εξωκυτταρικής

συγκέντρωσης $O_2^{\bullet-}$ πραγματοποιήθηκε όπως για την ενδοκυτταρική συγκέντρωση με μόνη διαφορά ότι ο συνολικός όγκος αυξήθηκε στα 2 mL, και χρησιμοποιήθηκε 1 mL διαλύματος επώασης φυλλικών δίσκων ή μέσου καλλιέργειας κυττάρων αντί των 0,1 mL εκχυλίσματος.

12. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ α - ΚΑΙ β - ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των α - και β - χλωροφυλλών έγινε φασματοφωτομετρικά. Μετά το τέλος της μεταχείρισης αλατότητας, φυλλικοί δίσκοι τοποθετήθηκαν σε απορροφητικό χαρτί, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια διαλύματος επώασης, και ζυγίστηκαν. Στην συνέχεια λειοτριβήθηκαν με υγρό άζωτο και προστέθηκε διάλυμα εκχύλισης το οποίο αποτελούνταν από 0,5 mL απόλυτης μεθανόλης και 50mM $MgCl_2$. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε και φυγοκεντρήθηκε για 5 min σε 13,000 rpm. Το υπερκείμενο φωτομετρήθηκε στα 650 και 665 nm.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των χλωροφυλλών βασίστηκε στις παρακάτω εξισώσεις:

$$Chl a = (16.5 \times E_{665}) - (8.3 \times E_{650})$$

$$Chl b = (33.8 \times E_{650}) - (12.5 \times E_{665}) .$$

Οι τελικές τιμές εκφράστηκαν σε $\mu g/mL$.

13. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ NORTHERN

Το ολικό RNA από τους φυλλικούς δίσκους αμπέλου cv Sultanina εκχυλίστηκε με μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί (Huges and Galau, 1983). Συνοπτικά, διάλυμα εκχύλισης (200 mM Tris-HCl, pH 8,5, 300 mM LiCl, 10 mM Na_3EDTA 1,5% δωδεκυλ-θειικό λίθιο, 1% (w/v) δεοξυχολικό νάτριο, 1% (v/v) NP-40, 5 mM θειουρία, 1 mM aurintricarboxylic acid, 10 mM διθειοθρεϊτόλη), προστέθηκε στα δείγματα των φυλλικών δίσκων σε αναλογία 1:4 (βάρος φυλλικών δίσκων:όγκος διαλύματος). Το ομογενοποίημα, αφού

κρατήθηκε για 30 min στους -80°C , φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 rpm για 15 min στους 4°C (Sorvall, DuPont, S34). Ακολούθησε κατακρήμνιση με 5 M οξικού καλίου, pH 6,5, στον πάγο, και το RNA του υπερκειμένου κατακρημνίστηκε ξανά με 1/8 του όγκου 3 M οξικού νατρίου, pH 6,1 και ίσο όγκο ισοπροπανόλης. Στην συνέχεια, έγινε επιπλέον καθαρισμός με LiCl σε τελικό όγκο 2 M.

Τα δείγματα του RNA ποσοτικοποιήθηκαν φωτομετρικά και βάση το ριβοσωμικό RNA σε μη-αποδιατακτική πηκτή αγαρόζης, μετά από χρώση με βρωμιούχο εθίδιο. Το ολικό RNA (15 μg) αναλύθηκε σε πηκτή 1,2% αγαρόζης που περιείχε 6% (v/v) φορμαλδεΰδη (Sambrook *et al.*, 1989) και μεταφέρθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ο προϋβριδισμός, ο υβριδισμός και τα πλυσίματα της μεμβράνης έγιναν με καθιερωμένες μεθόδους (Sambrook *et al.*, 1989). Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε στους 60°C με ραδιοσημασμένο ιχνηλάτη που αντιστοιχούσε στον πλήρους μήκους cDNA κλώνο της GDH-α υπομονάδας (Syntichaki *et al.* 1996)

13.1. Παρασκευή ραδιενεργών μορίων ανιχνευτή

Τα ραδιοσημασμένα μόρια ιχνηθέτη, που χρησιμοποιήθηκαν για την υβριδοποίηση με τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, παρασκευάστηκαν με την τεχνική του random priming. Στην τεχνική αυτή, χρησιμοποιείται η πολυμεριστική δράση της πολυμεράσης Klenow (Stratagene), η οποία αποτελεί την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης I, έπειτα από επεξεργασία της με σαμπτισιλίνη και διαχωρισμό της σε στήλη υδροξυαπατίτη.

Ως μήτρα για την σύνθεση του ραδιοσημασμένου μορίου ιχνηθέτη, χρησιμοποιήθηκε πλήρους μήκους cDNA κλώνος της GDH-α υπομονάδας (Syntichaki *et al.* 1996). Ο πλήρους μήκους cDNA κλώνος έχει μέγεθος 1562 bp. Η απομόνωσή του από το πλασμίδιο pBluescript που τον περιείχε, έγινε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *XhoI* και *HindIII*. Ο διαχωρισμός της ζώνης πραγματοποιήθηκε έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε 1% πήκτωμα TAE.

Ακολούθησε έκλουση και καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο.

Στην αντίδραση σύνθεσης ραδιοσημασμένων μορίων συμμετείχαν 100 ng αρχικών μορίων-μήτρας από τον cDNA GDH-α κλώνο, επαναδιαλυμένα σε 7,5 μL H_2O . Αφού βράστηκε για περίπου 5 min ώστε να αποδιαταχθεί και να εισέλθει στην μονόκλωνη κατάσταση, διατηρήθηκε μέσα σε πάγο ώστε να εμποδιστεί η εκ νέου υβριδοποίηση. Η ραδιοσήμανση έγινε με ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια κυτοσίνης [γ - ^{32}P] CTP και αδενίνης [γ - ^{32}P] ATP, ενώ για την σύνθεση των ραδιοσημασμένων αλυσίδων, χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα από τυχαίους εξανουκλεοτιδικούς εκκινητές. Ο τελικός όγκος αντίδρασης έγινε στα 25 μL . Στα 7,5 μL μονόκλωνου DNA μήτρας, προστέθηκαν 11,5 μL μίγματος 2X LS εκκινητών, 1 μL BSA (10 mg/ml), 1 μL πολυμεράσης Klenow (5 U/ μL) και 2 μL από τα σημασμένα νουκλεοτίδια [γ - ^{32}P]dCTP και [γ - ^{32}P]dATP (10 mCi/mL).

Η σύσταση του μίγματος των LS εκκινητών είναι Hepes 1 M pH 6.6 : DTM : OL (25:25:7). Τα συστατικά του διαλύματος DTM (0.1 mM dGTP και 0.1 mM dTTP) είναι διαλυμένα σε διάλυμα TM (250 mM Tris HCl pH 8.0, 25 mM MgCl_2 και 50 mM β -μερκαπτοαιθανόλη). Επιπλέον, το διάλυμα των τυχαίων ολιγονουκλεοτιδίων OL έχει σύσταση 1 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5 και 90 units / ml oligos (random primers).

Στην συνέχεια, ο διαχωρισμός των ραδιοσημασμένων μορίων ιχνηθέτη από τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια πραγματοποιήθηκε με διαχωρισμό τους σε στήλη ρητίνης Sephadex G-50 (Pharmacia). Το πακετάρισμα της στήλης ρητίνης πραγματοποιήθηκε με την εξής διαδικασία. Αρχικά, τοποθετήθηκε η ρητίνη G-50 στην στήλη μιας σύριγγας ινσουλίνης και έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 2.700 rpm. Στην κολώνα κάθε φορά τοποθετήθηκαν 200 μL TE. Το πακετάρισμα ήταν επιτυχές, όταν μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης συλλέχθηκε τόση ποσότητα TE όση με αυτήν, που τοποθετήθηκε αρχικά.

Μετά το πακετάρισμα της κολώνας, προστέθηκαν στα 25 μL της αντίδρασης του random priming άλλα 75 μL νερό, ώστε ο τελικός όγκος να γίνει 100 μL . Έπειτα το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 2.700 rpm και

συλλέχθηκε ο ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης του οποίου οι κρούσεις μετρήθηκαν σε μετρητή σπινθηρισμού.

13.2. Πλυσίματα μεμβρανών και έκθεση

Η διαδικασία του πλυσίματος των μεμβρανών αποσκοπεί στην απομάκρυνση του ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη, ο οποίος δεν προσδέθηκε με την αλληλουχία-στόχο πάνω στο φίλτρο της νιτροκυτταρίνης. Αυτό αποσκοπεί στη μείωση κατά στο ελάχιστο δυνατό, της μη ειδικής πρόσδεσης του ιχνηθέτη.

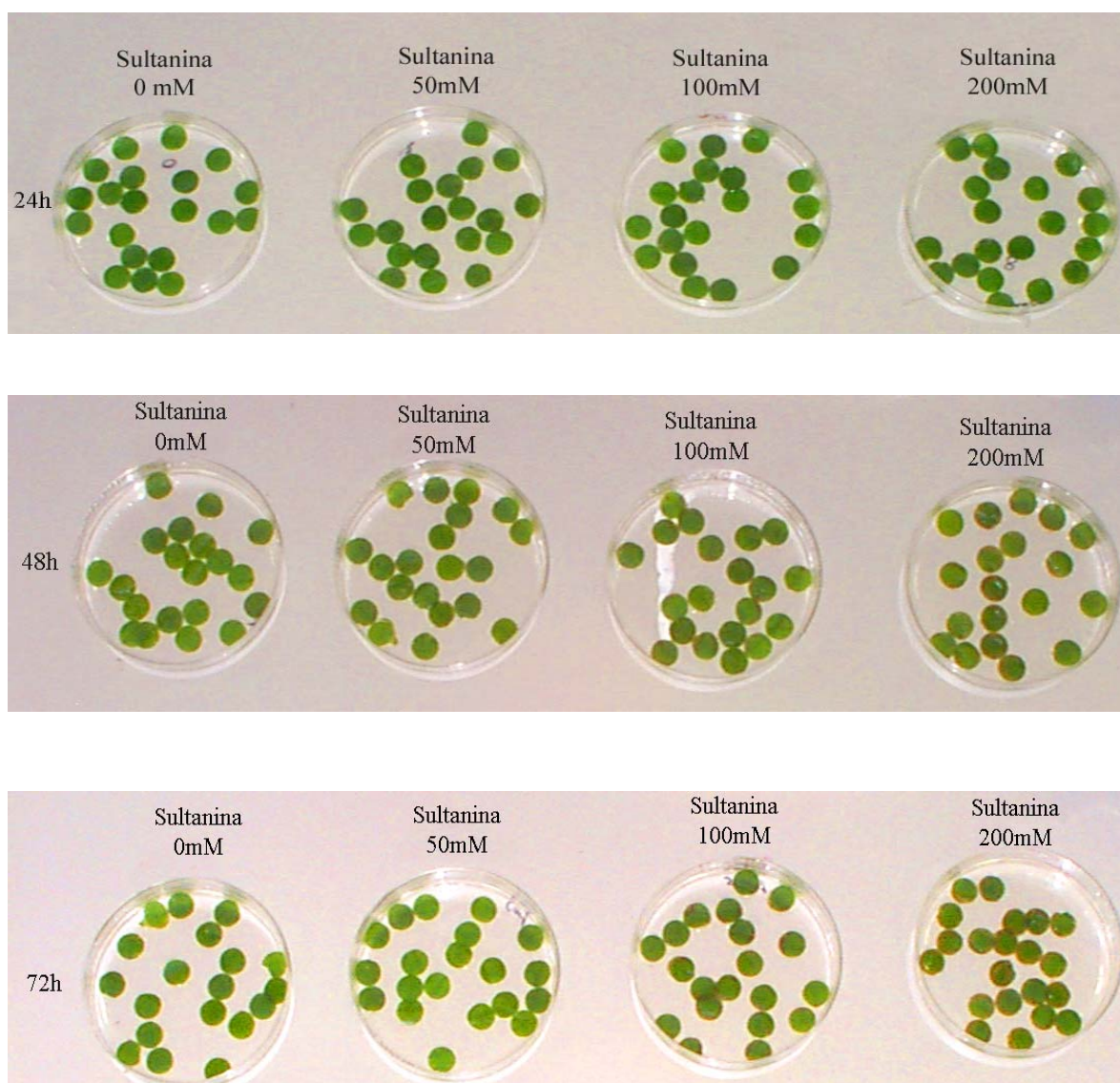
Τα πλυσίματα πραγματοποιήθηκαν με διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων SDS και SSC. Το πρώτο διάλυμα είχε σύσταση 0,1% SDS και 2X SSC και πραγματοποιήθηκαν 2 διαδοχικά πλυσίματα για 30 min στους 62°C. Έπειτα, ακολούθησε το δεύτερο διάλυμα με σύσταση 0.5% SDS και 1X SSC όπου και πάλι πραγματοποιήθηκαν 2 πλυσίματα για 30 min στους 62°C. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν 2 διαδοχικά διαλύματα με 1% SDS και 0,5% SSC για 10 min στους 62°C.

Οι μεμβράνες αφού στέγνωσαν, τοποθετήθηκαν μαζί με φιλμ αυτοραδιογραφίας (Kodak Scientific Imaging Film: X-OMAT/AR 35x40 cm) μέσα σε μεταλλικές κασέτες. Αφέθηκαν για περίπου 15 h στους -80°C. Μετά από αυτόν τον χρόνο έκθεσης, ακολούθησε η εμφάνιση του film σε αυτοματοποιημένο σύστημα Curex 60 της Agfa.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΦΥΛΛΙΚΟΙ ΔΙΣΚΟΙ *VITIS VINIFERA* cv SULTANINA

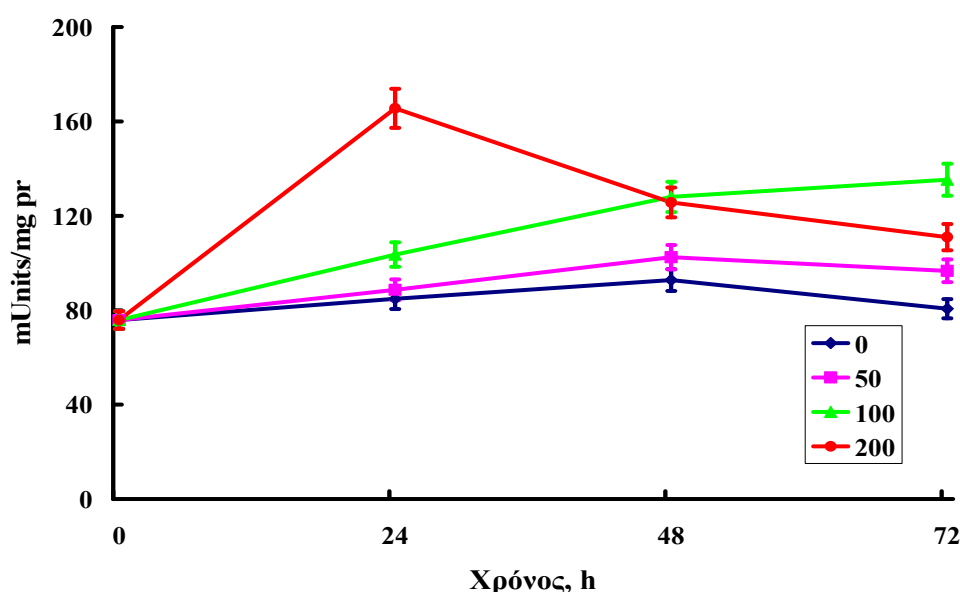
Φυλλικοί δίσκοι αμπέλου *Vitis vinifera* cv Sultanina που προήλθαν από νεαρά φύλλα θερμοκηπίου υποβλήθηκαν σε μεταχείριση με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0, 50, 100 και 200 mM) για 24, 48 και 72h (Εικ. 6).



Εικόνα 6. Φυλλικοί δίσκοι Sultanina σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0, 50, 100 και 200 mM) μετά από μεταχείριση 24, 48 και 72h.

1.1. Ειδική ενεργότητα Γλουταμικής Αφυδρογονάσης

Στην Εικόνα 7 φαίνεται η μεταβολή της ειδικής ενεργότητας συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης του NaCl σε φυλλικούς δίσκους εν Sultanina. Είναι φανερό ότι το NaCl οδήγησε σε αύξηση της ειδικής ενεργότητας της GDH. Ειδικότερα στο χρονικό διάστημα των 24h η μεγαλύτερη τιμή στην ενεργότητα παρατηρήθηκε στην μεταχείριση των 200 mM NaCl (165 mUnits/mg pr), αυξημένη κατά 118% σε σχέση με το μάρτυρα. Στις 48h η μεγαλύτερη τιμή της ενεργότητας παρουσιάστηκε στη μεταχείριση των 100 mM (128 mUnits/mg pr), αυξήθηκε κατά 38% σε σχέση με το μάρτυρα. Στις 72h οι τιμές της ειδικής ενεργότητας τόσο των 100 mM όσο και των 200 mM είναι κοντινές και αυξημένες από το μάρτυρα κατά 72%.

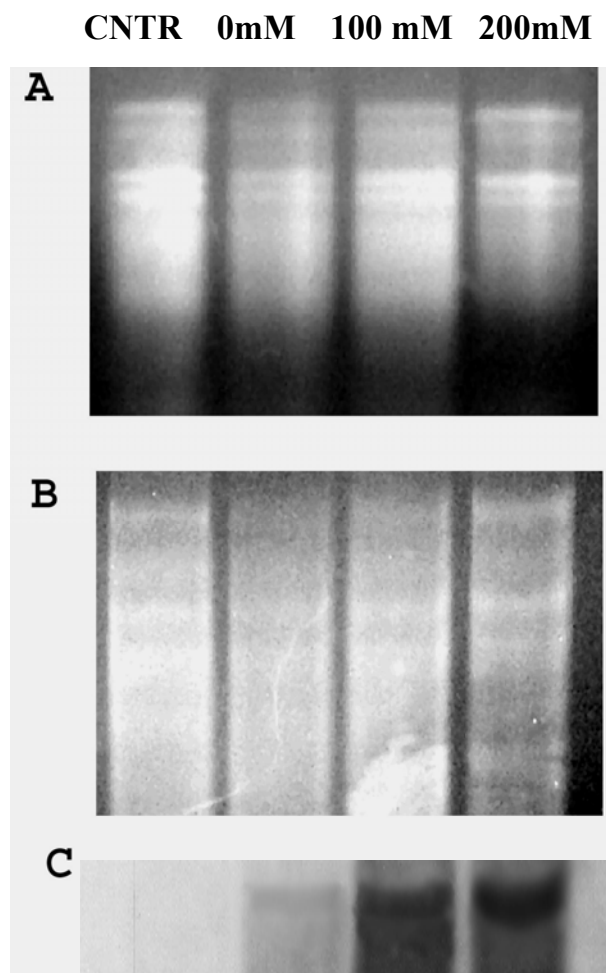


Εικόνα 7. Μεταβολή της ειδικής ενεργότητας της GDH συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl, σε φυλλικούς δίσκους Sultanina.

1.2. Northern ανάλυση

Από ανάλυση Northern που πραγματοποιήθηκε σε φυλλικούς δίσκους Sultanina, μετά από μεταχείριση με 0, 100 και 200mM NaCl για 24h, παρατηρήθηκε ότι το μετάγραφο της GDH αυξάνεται με την αύξηση της έντασης της καταπόνησης (Εικ. 8C). Τα δείγματα του RNA ποσοτικοποιήθηκαν με βάση το ριβοσωμικό RNA σε μη-αποδιατακτική πηκτή

αγαρόζης, μετά από χρώση με βρωμιούχο εθίδιο (Εικ. 8Α). Το ολικό RNA (15 μg) αναλύθηκε σε πηκτή 1,2% αγαρόζης που περιείχε 6% (v/v) φορμαλδεΐδη (Εικ. 8B).

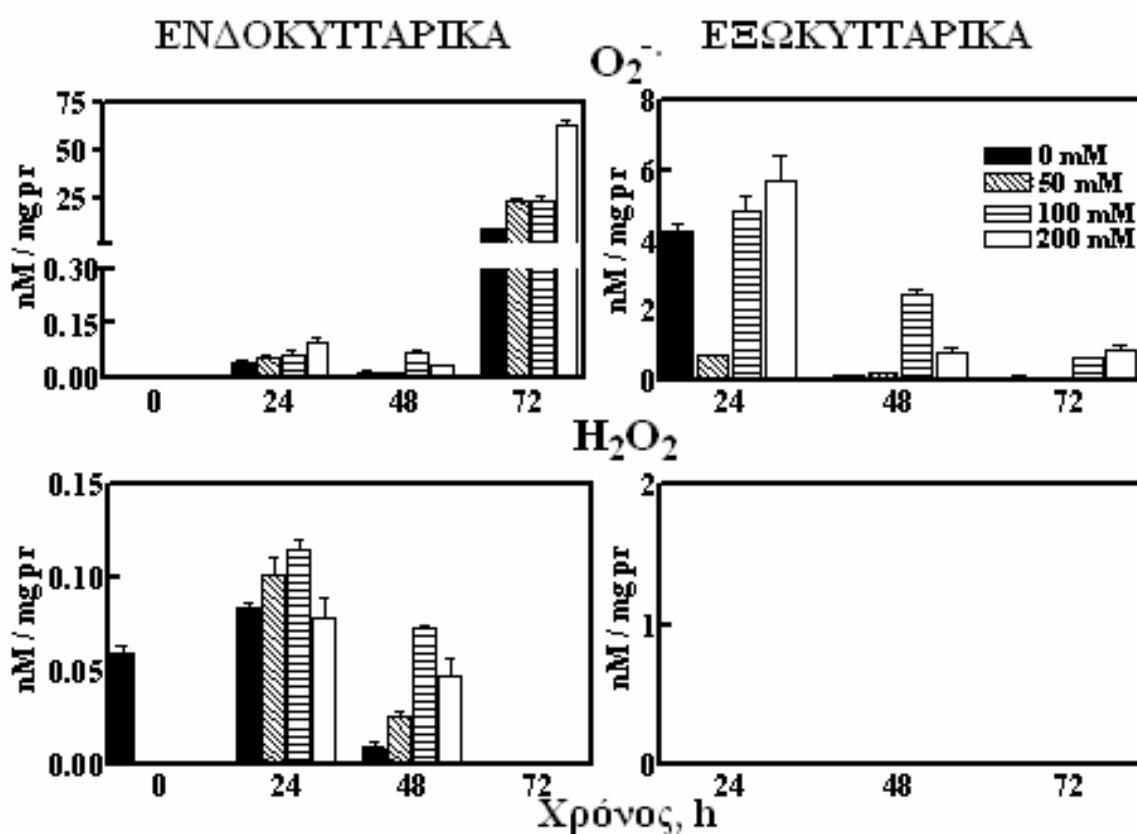


Εικόνα 8. Ποσοτικοποίηση του ολικού RNA από φυλλικούς δίσκους Sultanina σε μη-αποδιατακτική πηκτή αγαρόζης (A) ανάλυση του ολικού RNA σε πηκτή 1,2% αγαρόζης με 6% (v/v) φορμαλδεΐδη (B) και ανάλυση κατά Northern (C).

1.3. Παραγωγή EMO

Την χρονική στιγμή μηδέν η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του $O_2^{\bullet-}$ ήταν μη ανιχνεύσιμη στο φύλλο αμπέλου, όμως το H_2O_2 ήταν 0,06μM/mg pr. Στις 24h, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του $O_2^{\bullet-}$ παρουσίασε αύξηση, αναλογική με την αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl. Συγκεκριμένα, τα 50 mM NaCl οδήγησαν σε αύξηση 46%, τα 100mM σε αύξηση 63% και τα 200 mM σε αύξηση 143% σε σχέση με τη συγκέντρωση του $O_2^{\bullet-}$ στον μάρτυρα. Στις 48h,

η συγκέντρωση του $O_2^{\cdot-}$ στη μεταχείριση των 50 mM κυμάνθηκε στα επίπεδα του μάρτυρα, ενώ η μεγαλύτερη αύξηση παρουσιάστηκε στα 100 mM NaCl (303%). Τα 200 mM NaCl οδήγησαν σε αύξηση κατά 119%. Αντίστοιχα, στις 72 ώρες παρατηρήθηκε μια αύξηση της τάξεως του 197% στα 50 και στα 100mM NaCl ενώ στα 200 mM, υπήρξε 684% αύξηση σε σχέση με την τιμή του μάρτυρα (Εικ. 9).



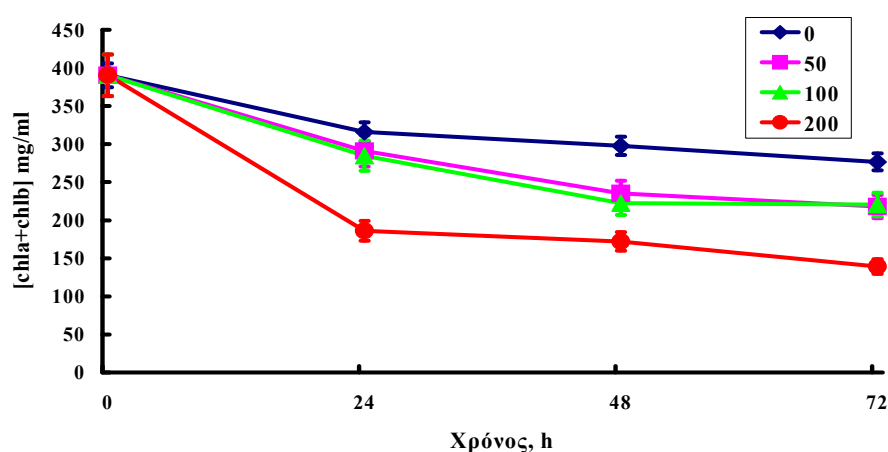
Εικόνα 9. Μεταβολή της ενδοκυτταρικής και εξωκυτταρικής συγκέντρωσης $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 , σε φυλλικούς δίσκους *Sultanina* συναρτήσεως του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl.

Εξωκυτταρικά οι συγκεντρώσεις του $O_2^{\cdot-}$ διαφοροποιούνται. Στις 24h στα 50 mM NaCl παρουσίασαν μια έντονη πτώση σε σχέση με το μάρτυρα (κατά 470%), ενώ στα 100 και τα 200 mM παρατηρήθηκε αύξηση στην συγκέντρωση του $O_2^{\cdot-}$ κατά 13% και 33% αντίστοιχα. Στις 48h υπήρξε αύξηση κατά 110, 1860 και 525%, αντίστοιχα στις μεταχειρίσεις των 50, 100 και 200 mM, ενώ στις μεταχειρίσεις των 72h, οι αντίστοιχες αυξήσεις ήταν 0, 495 και 690% (Εικ. 9).

Όσο αφορά το H_2O_2 , η ενδοκυτταρική του συγκέντρωση τη χρονική στιγμή των 24h ήταν αυξημένη κατά 21% και 36%, αντίστοιχα στα 50 και 100 mM σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ στα 200 mM το επίπεδο του H_2O_2 ήταν στα επίπεδα του μάρτυρα. Στις 48h, η μεταχείριση των 50mM έδειξε αύξηση κατά 344%, η μεταχείριση των 100 mM κατά 710% και η μεταχείριση των 200 mM κατά 428%, σε σχέση με το μάρτυρα. Η τελευταία συγκέντρωση ήταν μειωμένη κατά 282% σε σχέση με αυτή που παρουσιάστηκε στα 100 mM. Στη μεταχείριση των 72h το H_2O_2 δεν ανιχνεύτηκε. Εξωκυτταρικά δεν ανιχνεύτηκε H_2O_2 (Εικ.9).

1.4. Συγκέντρωση της α - και β - χλωροφύλλης

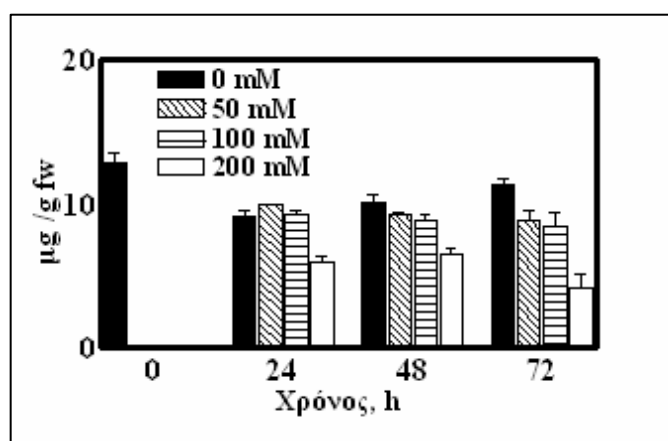
Η μεταχείριση από αλατότητα σε φυλλικούς δίσκους αμπέλου *Vitis vinifera* cv Sultanina προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στη μεταχείριση των 50 και 100 mM μείωση της τάξεως του 25% σε σχέση με το μάρτυρα η οποία διατηρήθηκε σταθερή σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης των α - και β - χλωροφυλλών μετρήθηκε στη μεταχείριση των 200 mM όπου υπήρξε μείωση κατά 55% σε σχέση με το μάρτυρα και η οποία διατηρήθηκε έως το τέλος του πειράματος (Εικ. 10).



Εικόνα 10. Μεταβολή της συγκέντρωσης των α - και β - χλωροφυλλών συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης $NaCl$, σε φυλλικούς δίσκους Sultanina.

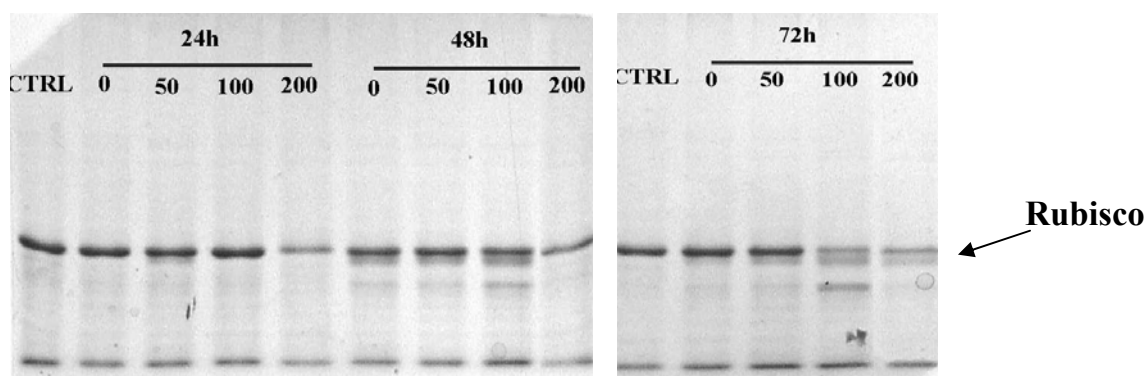
1.5. Συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών

Στην Εικόνα 11 είναι φανερό ότι σε όλες τις χρονικές στιγμές η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης ανά g φρέσκου βάρους, μειωνόταν ανάλογα με την ένταση της καταπόνησης. Η μεγαλύτερη μείωση παρουσιάστηκε στη μεταχείριση των 72h όπου τα 200 mM NaCl οδήγησαν σε μείωση κατά 46%.



Εικόνα 11. Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών σε φυλλικούς δίσκους Sultanina συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl.

Στην Εικόνα 12 φαίνεται η αποδόμηση της Rubisco σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (200 mM). Σε παρατεταμένη καταπόνηση (72h) παρατηρήθηκε αποδόμηση και στη συγκέντρωση των 100 mM.



Εικόνα 12. SDS ηλεκτροφόρηση ολικών πρωτεϊνών, από φυλλικούς δίσκους Sultanina, μετά από επίδραση αλατότητας.

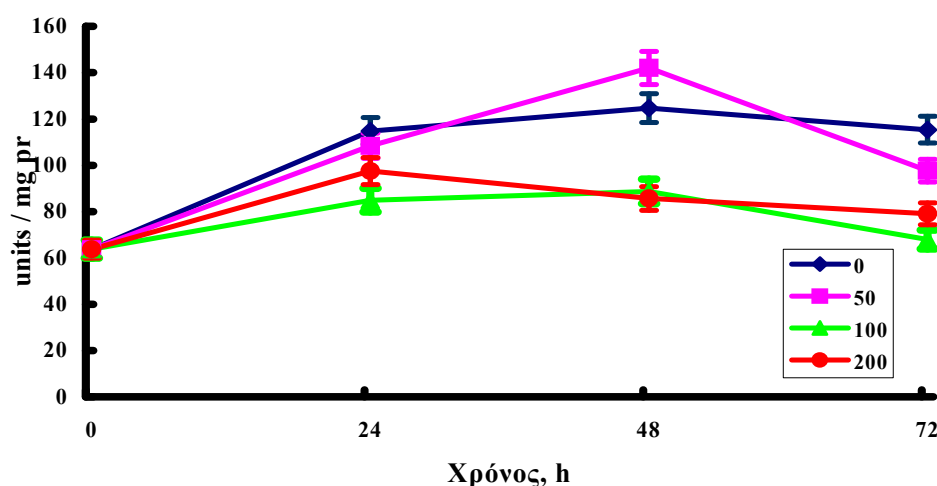
1.6. Ειδική ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων

1.6.1. Σουπεροξειδική δισμουτάση

Η ειδική ενεργότητα της SOD στο πείραμα αυτό δεν ανιχνεύτηκε. Όλες οι τιμές που μετρήθηκαν ήταν κάτω από τα επίπεδα του μάρτυρα, για όλες τις μεταχειρίσεις και σε όλες της χρονικές στιγμές, για το λόγο αυτό δεν παρατίθεται διάγραμμα.

1.6.2. Καταλάση

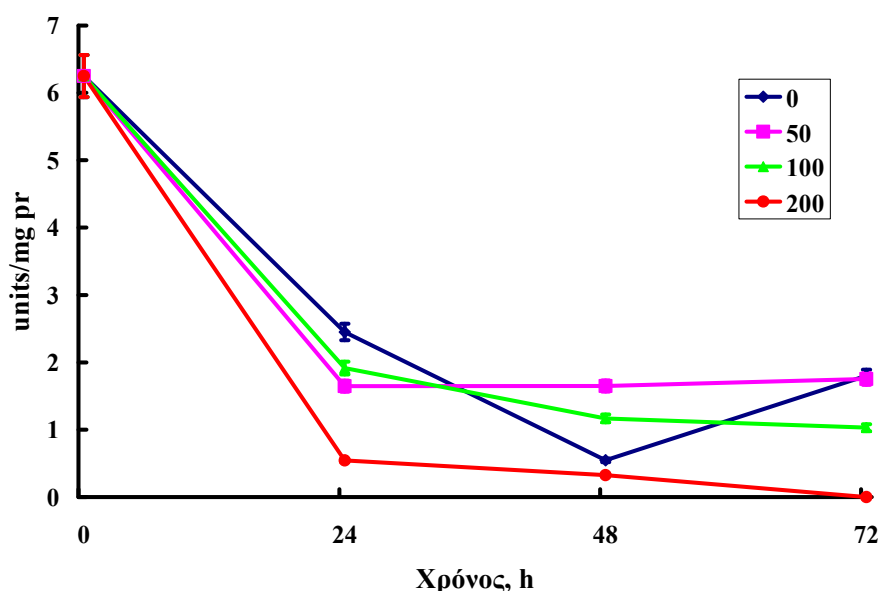
Στην Εικόνα 13 παρουσιάζεται η μεταβολή της ειδικής ενεργότητας της CAT συναρτήσει χρόνου και συγκέντρωσης NaCl. Από το διάγραμμα είναι φανερό ότι η ειδική ενεργότητα της CAT είναι κάτω από τα επίπεδα του μάρτυρα σε όλες τις μεταχειρίσεις και σε όλες τις χρονικές στιγμές, με εξαίρεση τη μεταχείριση των 50 mM στις 48h, όπου παρουσίασε αύξηση κατά 14% σε σχέση με το μάρτυρα.



Εικόνα 13. Μεταβολή της ειδικής ενεργότητας CAT συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl, σε φυλλικούς δίσκους Sultanina.

1.6.3. Ασκορβική Περοξειδάση

Οι μεταβολές της ειδικής ενεργότητας της ΑΡΟ παρουσιάζονται στην Εικόνα 14. Στις 24h παρατηρήθηκε δραστική μείωση της ειδικής ενεργότητας της ΑΡΟ στον μάρτυρα και ακόμη περισσότερο στις μεταχειρίσεις. Στη χρονική στιγμή των 48h παρατηρήθηκε αύξηση της ειδικής ενεργότητας της ΑΡΟ σε σχέση με το μάρτυρα (0 mM, 48h) στις συγκεντρώσεις 50 και 100 mM NaCl, κατά 3 φορές και 2 φορές αντίστοιχα σε σχέση με το μάρτυρα. Στις 24 και στις 72h, η ενεργότητα της ΑΡΟ στις διάφορες μεταχειρίσεις ήταν κάτω από εκείνη του μάρτυρα.

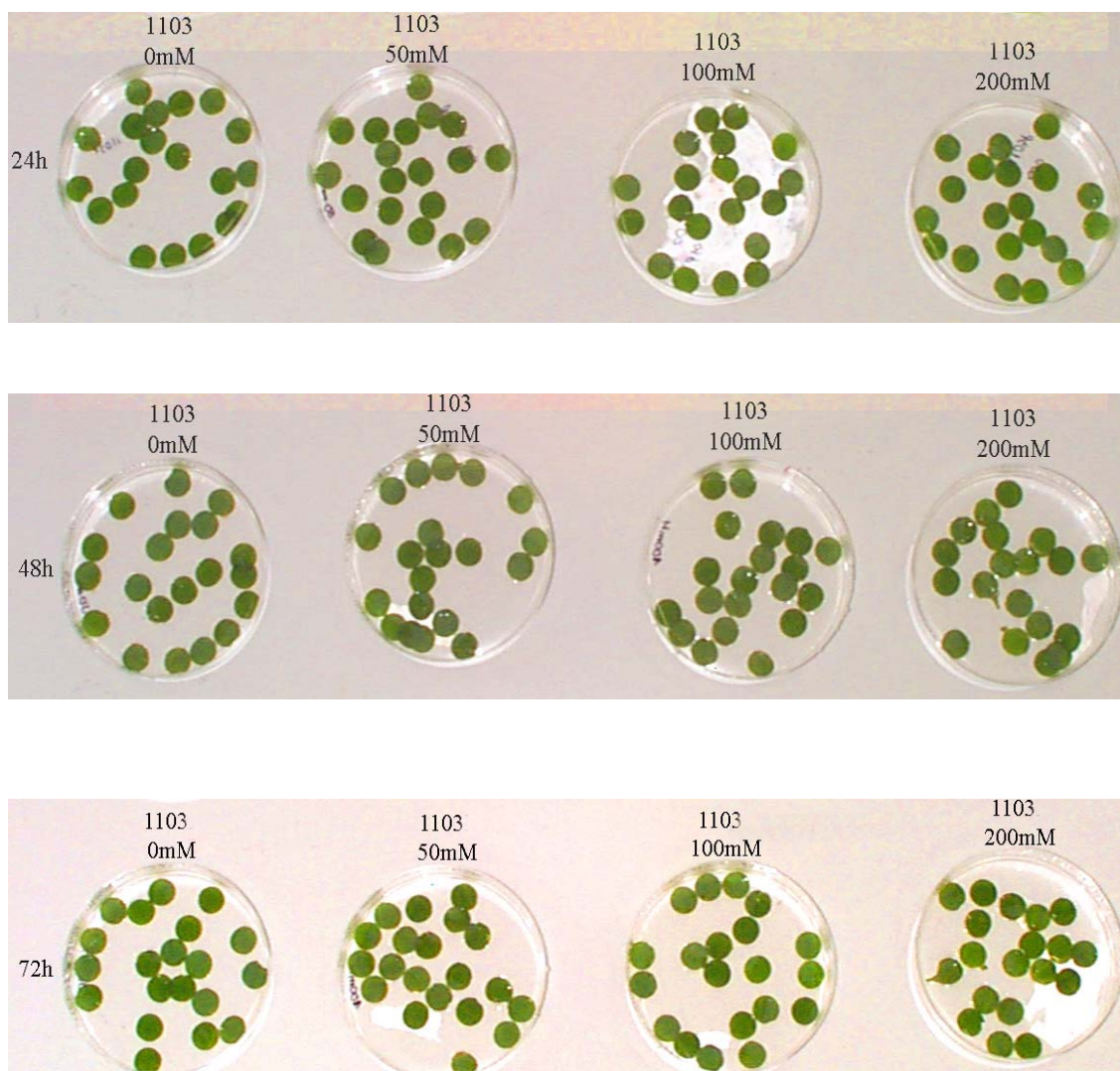


Εικόνα 14. Μεταβολή της ειδικής ενεργότητας της ΑΡΟ συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl, σε φυλλικούς δίσκους Sultanina.

2. ΦΥΛΛΙΚΟΙ ΔΙΣΚΟΙ 1103 PAULSEN

Επίδραση αλατότητας πραγματοποιήθηκε και σε φυλλικούς δίσκους από το υποκείμενο αμπέλου 1103 Paulsen, που έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία ως ανθεκτικό στη αλατότητα. Οι μεταχειρίσεις που πραγματοποιήθηκαν στους φυλλικούς δίσκους ήταν ακριβώς ίδιες με τις μεταχειρίσεις που υποβλήθηκαν και στους φυλλικούς δίσκους της Sultanina (μεταχειρίσεις τριών ημερών (δειγματοληψία κάθε 24h) σε συγκεντρώσεις NaCl, 0, 50, 100 και 200 mM (Εικ 15). Στο πείραμα αυτό μετρήθηκαν: η ειδική ενεργότητα της GDH, οι

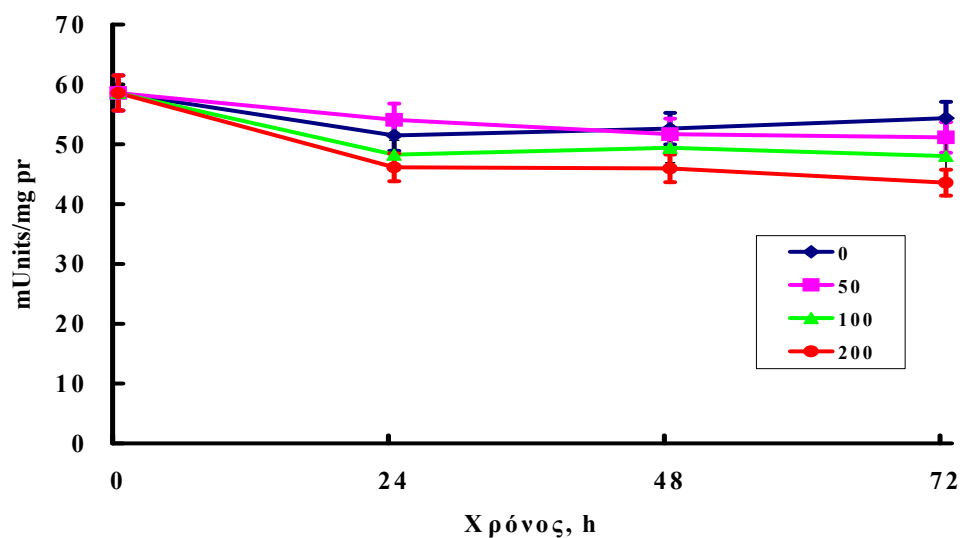
ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές ενεργές μορφές οξυγόνου, και η ειδική ενεργότητα της CAT.



Εικόνα 15. Φυλλικοί δίσκοι 1103P σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0, 50, 100 και 200 mM) μετά από μεταχείριση 24, 48 και 72h.

2.1. Ειδική ενεργότητα της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 16 οι ειδικές ενεργότητες της GDH σε όλη τη διάρκεια του πειράματος καθώς και σε όλες τις μεταχειρίσεις παραμένουν σταθερές. Μια πτώση της τάξεως του 15% παρατηρείται σε όλες τις συγκεντρώσεις NaCl σε σχέση με το μάρτυρα, τη χρονική στιγμή των 24h η οποία διατηρείται σε όλες τις χρονικές στιγμές.

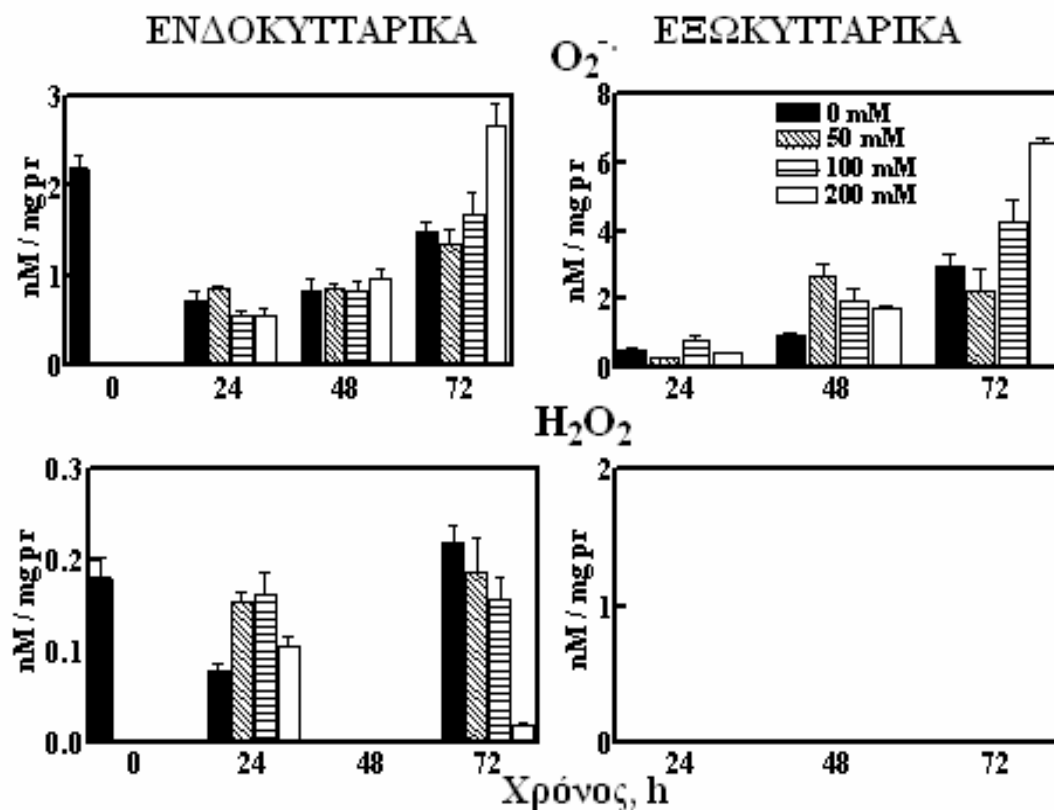


Εικόνα 16. Μεταβολή της ειδικής ενεργότητας της GDH συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl, σε φυλλικούς δίσκους 1103P.

2.2. Παραγωγή EMO

Στο πείραμα αυτό οι ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις του $O_2^{\bullet-}$ ήταν μειωμένες σε σχέση με τη συγκέντρωση του $O_2^{\bullet-}$ τη χρονική στιγμή 0 (Εικ.17). Τη χρονική στιγμή των 24h εμφανίστηκε μείωση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού $O_2^{\bullet-}$ με την αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl. Στις 48h, η συγκέντρωση του $O_2^{\bullet-}$ διατηρήθηκε σε σταθερά επίπεδα σε σχέση με το μάρτυρα στα 50 και 100mM NaCl, και μικρή αύξηση, κατά 16%, παρατηρήθηκε στα 200 mM. Τέλος, στις 72h το επίπεδο του ενδοκυτταρικού $O_2^{\bullet-}$ ήταν παρόμοιο με το επίπεδο του μάρτυρα στα 50 mM, ενώ υπήρξε αύξηση κατά 12% και 77% στα 100 και τα 200 mM, αντίστοιχα (Εικ.17).

Εξωκυτταρικά το πρότυπο της μεταβολής στη συγκέντρωση του $O_2^{\bullet-}$ ήταν διαφορετικό. Στις 24h, παρουσίασε αρχικά μία μείωση κατά 40% στη μεταχείριση των 50 mM, για να ακολουθηθεί από μία αύξηση κατά 65% στα 100 mM NaCl και μείωση στα επίπεδα του μάρτυρα στα 200 mM. Στις 48h, τα 50, 100 και 200 mM προκάλεσαν αύξηση κατά 192, 111 και 91% σε σχέση με το μάρτυρα. Στις 72h, τα 50 mM κυμάνθηκαν στα επίπεδα του μάρτυρα ενώ το 100 και τα 200 mM οδήγησαν σε αύξηση 45% και 123%, αντίστοιχα (Εικ.17).

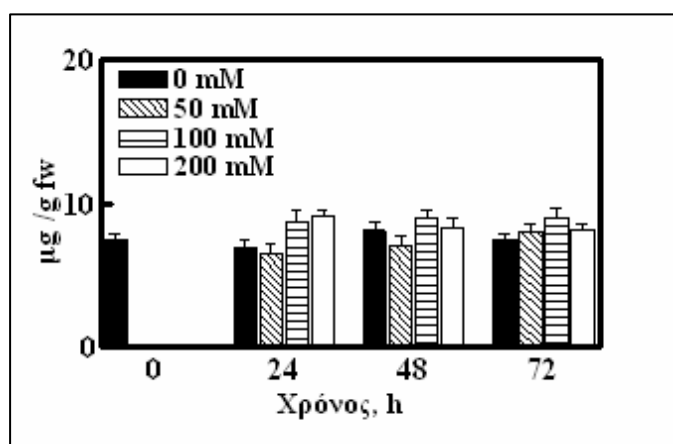


Εικόνα 17. Μεταβολή της ενδοκυτταρικής και εξωκυτταρικής συγκέντρωσης O_2^- και H_2O_2 , σε φυλλικούς δίσκους 1103P συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl (οι τιμές αναφέρονται σε mg πρωτεΐνης).

Ενδοκυτταρικά η συγκέντρωση του H_2O_2 στις 24h έδειξε αύξηση κατά 95%, 104% και 32%, αντίστοιχα για 50, 100, 200 mM NaCl. Στις 48h, δεν ανιχνεύτηκε H_2O_2 . Οι συγκεντρώσεις του H_2O_2 στην μεταχείριση των 72h παρουσίασαν σταδιακή μείωση κατά 13%, 27% και 87%, αντίστοιχα στα 50, 100, 200 mM. Εξωκυτταρικά συγκέντρωση H_2O_2 δεν ανιχνεύτηκε (Εικ.17).

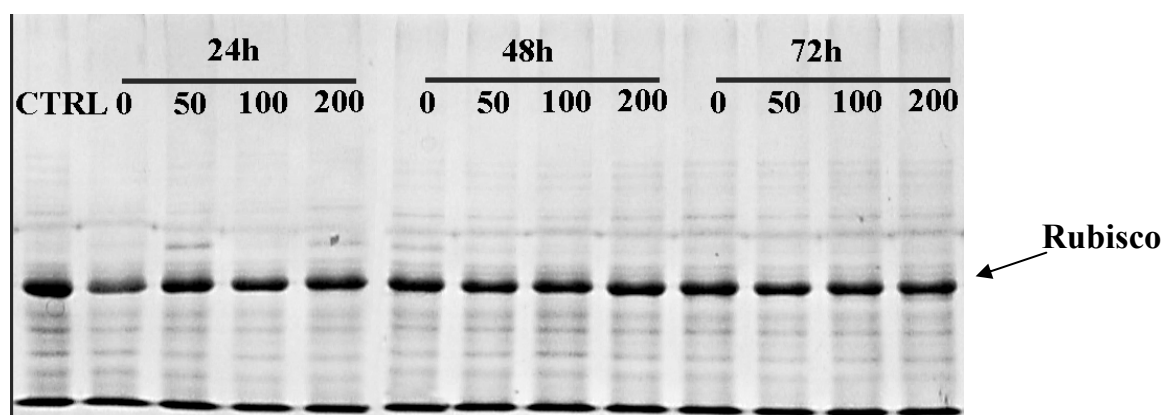
2.3. Συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών

Στην Εικόνα 18 είναι φανερό ότι σε όλες τις χρονικές στιγμές η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης ανά g φρέσκου βάρους, παραμένουν σταθερές ανεξάρτητα από την ένταση της καταπόνησης.



Εικόνα 18. Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών σε φυλλικούς δίσκους 1103P συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl.

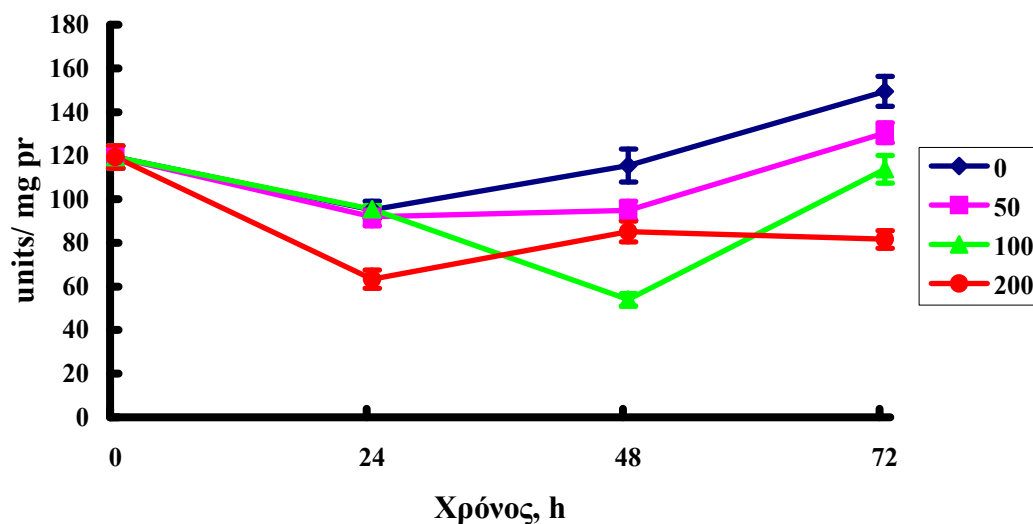
Στην Εικόνα 19 φαίνεται ότι η Rubisco παραμένει σταθερή τόσο σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (200 mM), όσο και σε παρατεταμένη καταπόνηση (72h).



Εικόνα 19. SDS ηλεκτροφόρηση ολικών πρωτεϊνών, από φυλλικούς δίσκους 1103P, μετά από επίδραση αλατότητας.

2.4. Ειδική ενεργότητα της καταλάσης

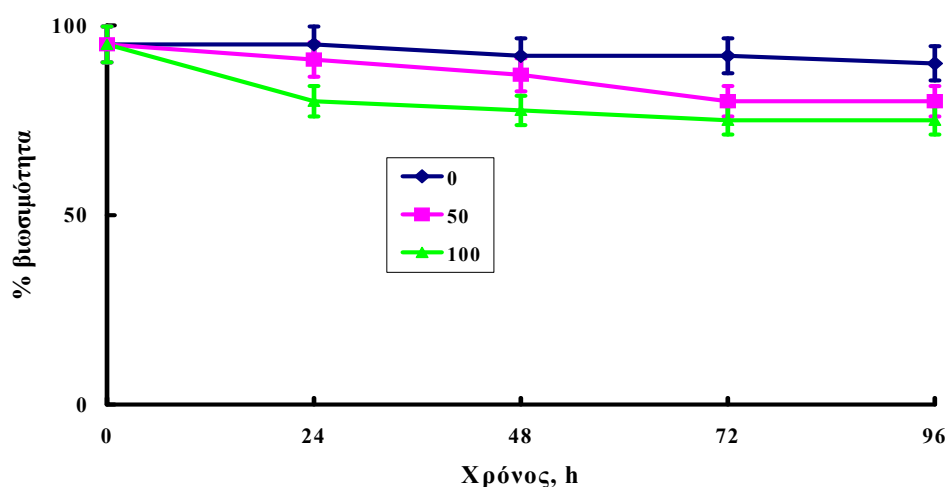
Στο πείραμα αυτό μετρήθηκε και η ειδική ενεργότητα της CAT. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 20 όλες οι τιμές της ειδικής ενεργότητας της CAT εμφάνισαν τιμές κάτω από τα επίπεδα του μάρτυρα. Το πρότυπο αυτό παρατηρήθηκε σε όλες τις χρονικές στιγμές και σε όλες τις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl, που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 20. Μεταβολή της ειδικής ενεργότητας της CAT, συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl, σε φυλλικούς δίσκους 1103P.

3. ΑΙΩΡΟΥΜΕΝΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ *VITIS VINIFERA* cv SULTANINA

Για να μελετηθεί η καταπόνηση από αλατότητα χρησιμοποιήθηκε και το σύστημα αιωρούμενων κυττάρων αμπέλου. Στο συγκεκριμένο σύστημα οι μεταχειρίσεις είχαν διάρκεια τεσσάρων ημερών και οι συγκεντρώσεις NaCl στις οποίες υποβλήθηκαν τα κύτταρα ήταν 0 και 100 mM. Τα 200 mM αποτελούσαν ακραία συγκέντρωση για τα κύτταρα και για αυτό τα λόγο δεν χρησιμοποιήθηκαν.



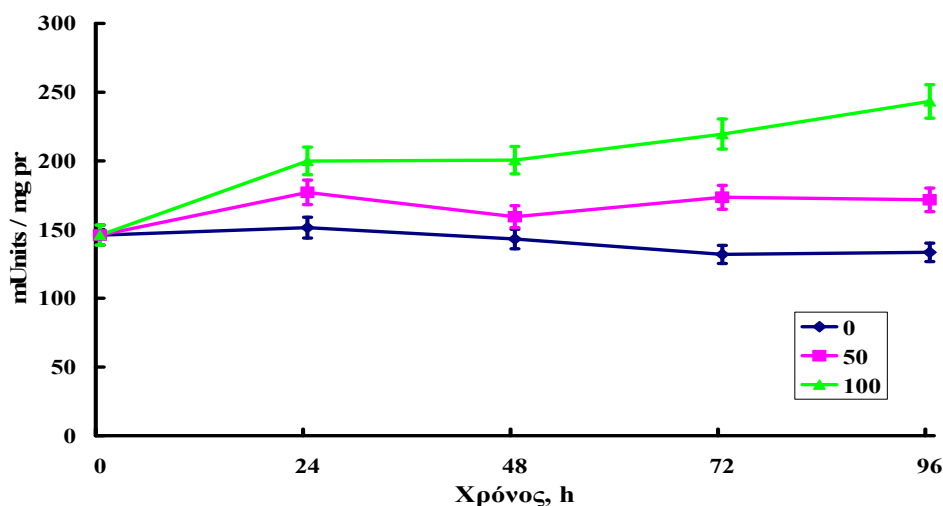
Εικόνα 21. Βιωσιμότητα αιωρούμενων κυττάρων Sultanina, συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl.

Στην Εικόνα 21 φαίνεται η βιωσιμότητα των κυττάρων στις διαφορετικές χρονικές στιγμές και στις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl. Η μέτρηση της βιωσιμότητας έγινε με χρώση των κύτταρων με χρωστική evans blue. Όπως παρατηρούμε, η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι ανάλογη με τον βαθμό καταπόνησης. Η μεγαλύτερη θνησιμότητα παρουσιάστηκε στη μεταχείριση των 100mM και ήταν της τάξεως του 20-25%.

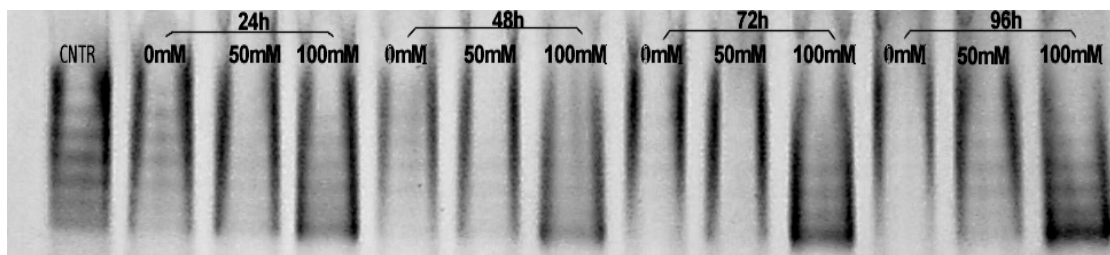
3.1. Ειδική ενεργότητα Γλουταμικής Αφυδρογονάσης

Από το διάγραμμα της Εικόνα 22 είναι φανερό ότι η ειδική ενεργότητα της GDH αυξάνει ανάλογα με το χρόνο και την συγκέντρωση NaCl. Η ειδική ενεργότητα της GDH στην μεταχείριση των 100 mM αυξάνεται ανάλογα με τις ώρες της καταπόνησης. Η μεγαλύτερη τιμή της ειδικής ενεργότητας παρουσιάζεται στα 100 mM NaCl μετά από 96h (243 mUnit/mg pr), αυξημένη κατά 66,6% σε σχέση με το μάρτυρα. Στις μεταχειρίσεις των 50 mM παρατηρείται μια γενικότερη αύξηση σε σχέση με το μάρτυρα, η οποία κυμαίνεται από 17-20%.

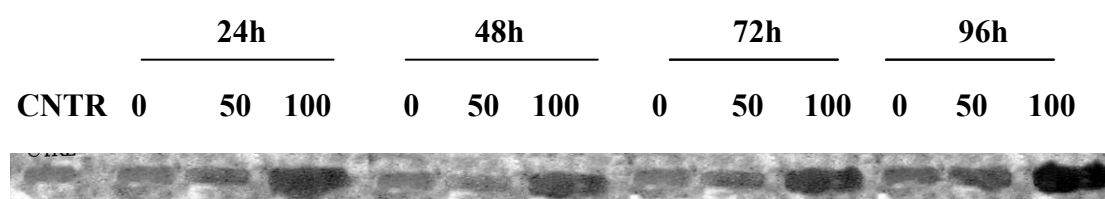
Στα δείγματα αυτά έγινε φυσική ηλεκτοφόρηση για χρώση ειδικής ενεργότητας. Παρατηρήθηκε ότι εντονότερη ήταν η ενεργότητα στα 100 mM NaCl στις 96h. Τόσο στο δείγμα αυτό, όσο και στα υπόλοιπα δείγματα της μεταχείρισης των 100 mM, υπήρξε έντονη χρώση ενεργότητας των πιο ανοδικών ισοενζύμων (Εικ. 23). Η μεταβολής της ειδικής ενεργότητας, που παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα του συγκεκριμένου πειράματος, συνέπεσε και με τις μεταβολές της ολικής πρωτεΐνης για την GDH όπως προέκυψε μετά από τον ανοσοεντοπισμό της (Εικ 24).



Εικόνα 22. Μεταβολή της ειδικής ενεργότητας της GDH συναρτήσει του χρόνου και συγκέντρωσης NaCl, σε αιωρούμενη καλλιέργεια κυττάρων αμπέλου cv Sultanina.



Εικόνα 23. Ισοενζυμική ανάλυση της GDH σε δείγματα αιωρούμενης καλλιέργειας κυττάρων αμπέλου, cv Sultanina, που έχουν υποβληθεί σε μεταχειρίσεις με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις NaCl.



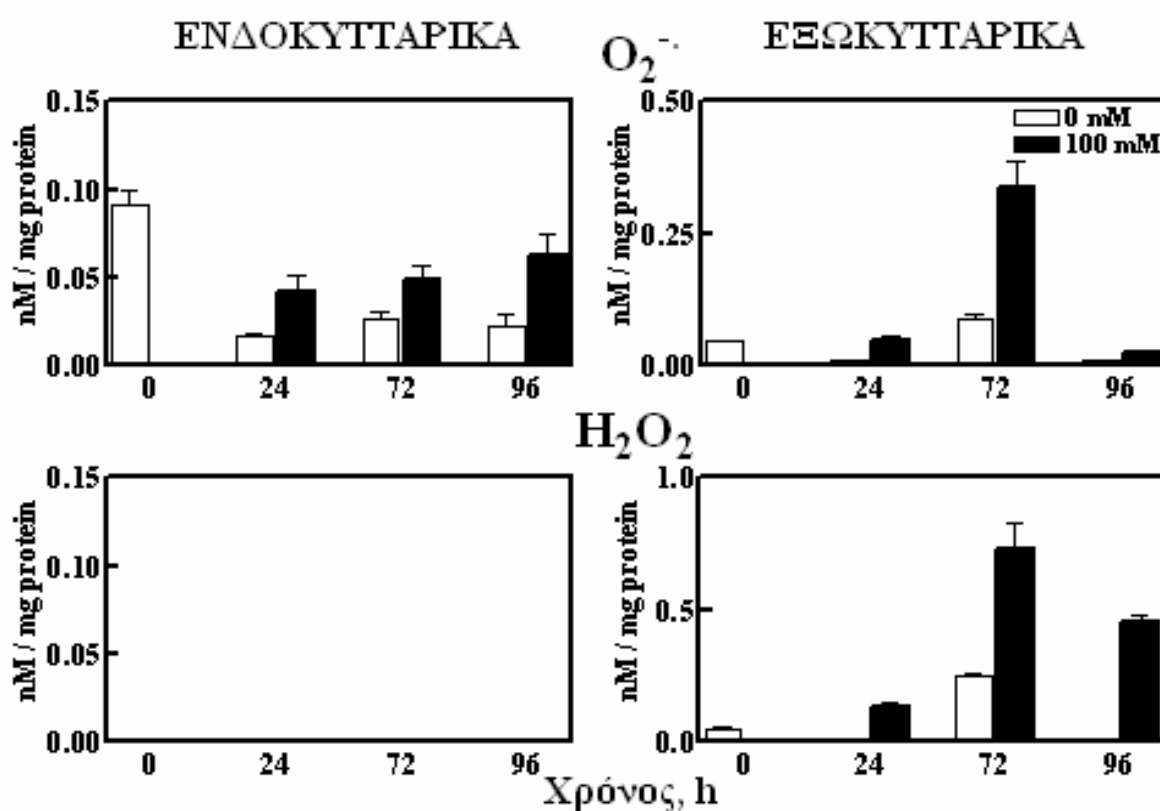
Εικόνα 24. Ανοσοεντοπισμός του ολοενζύμου της GDH σε δείγματα αιωρούμενης καλλιέργειας κυττάρων αμπέλου, cv Sultanina, που έχουν υποβληθεί σε μεταχειρίσεις με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις NaCl.

3.2 Παραγωγή EMO

Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του $O_2^{\cdot-}$ στις μεταχειρίσεις με αλατότητα ήταν σε όλες τις χρονικές στιγμές χαμηλότερη σε σχέση με την αρχική καλλιέργεια την χρονική στιγμή 0 (Εικ. 25). Κατά τις χρονικές

στιγμές των 24h, 72h και 92h, η μεταχείριση των 100 mM οδήγησε σε αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης $O_2^{\cdot-}$ κατά 170%, 74% και 125% αντίστοιχα, σε σχέση με τη συγκέντρωση του μάρτυρα.

Η εξωκυτταρική συγκέντρωση του $O_2^{\cdot-}$ παρουσίασε γενικά αυξητικό πρότυπο. Κατά τις χρονικές στιγμές των 24h, 72h και 96h, η μεταχείριση των 100 mM οδήγησε σε αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης $O_2^{\cdot-}$ κατά 390%, 280% και 146%, αντίστοιχα, σε σχέση με τη συγκέντρωση του μάρτυρα (Εικ. 25).



Εικόνα 25. Μεταβολή της ενδοκυτταρικής και εξωκυτταρικής συγκέντρωσης $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 , σε αιωρούμενη καλλιέργεια κυττάρων, συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl (οι τιμές αναφέρονται σε mg πρωτεΐνης).

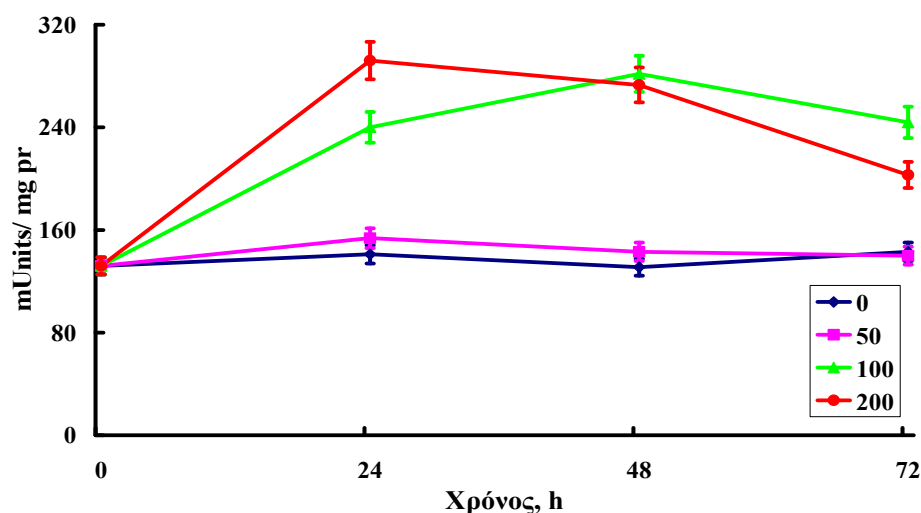
Η εξωκυτταρική συγκέντρωση του H_2O_2 στην μεταχείριση των 100mM οδήγησε σε αύξηση κατά 1200%, 192% και 4400% σε σχέση με τη συγκέντρωση του μάρτυρα, τις χρονικές στιγμές των 24, 72 και 96h αντίστοιχα (Εικ. 25). Στο πείραμα αυτό εξωκυτταρική συγκέντρωση H_2O_2 δεν ανιχνεύτηκε (Εικ. 25).

4. ΚΑΛΛΟΙ ΑΜΠΕΛΟΥ *VITIS VINIFERA* cv SULTANINA

Για να μελετηθεί η καταπόνηση από αλατότητα χρησιμοποιήθηκε και το σύστημα των κάλλων cv Sultaninas. Στο σύστημα αυτό οι μεταχειρίσεις είχαν διάρκεια τριών ημερών και οι συγκεντρώσεις NaCl στις οποίες υποβλήθηκαν οι κάλλοι ήταν 0, 50, 100 και 200 mM.

4.1. Ειδική ενεργότητα της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης

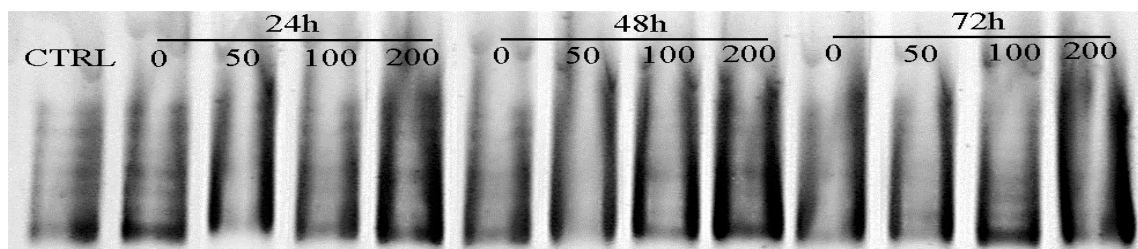
Οι κάλλοι τοποθετήθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο MS (όπως περιγράφηκε στα Υλικά και Μέθοδοι) που περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις NaCl (0, 50, 100, 200), για 24, 48 και 72h. Από την Εικόνα 26 είναι φανερό ότι στη διάρκεια των 24h η ειδική ενεργότητα της GDH αυξήθηκε κατά 10%, 71% και 110% κατά τις μεταχειρίσεις των 50, 100, και 200 mM σε σχέση με το μάρτυρα. Στις 48h οι μεταχειρίσεις των 50, 100, 200 mM οδήγησαν σε επαγωγή του ενζύμου κατά 10%, 115% και 108%, αντίστοιχα, σε σχέση με το μάρτυρα. Τέλος στις 72 h, η ειδική ενεργότητα των 50 mM κυμάνθηκε στα επίπεδα του μάρτυρα ενώ τα 100 και τα 200 mM αυξήθηκε κατά 70% και 42%.



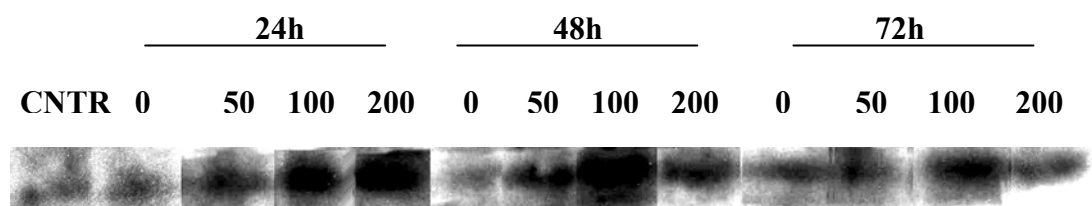
Εικόνα 26. Μεταβολή της ειδικής ενεργότητας της GDH συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl, σε κάλλους, cv Sultanina.

Κατά την φυσική ηλεκτροφόρηση για χρώση ενεργότητας, που πραγματοποιήθηκε στα δείγματα του ίδιου πειράματος, παρουσιάστηκε έντονη

χρώση, άρα και υψηλότερη ενεργότητα, στα δείγματα με τις μεγαλύτερες τιμές ειδικής ενεργότητας. Όπως φαίνεται εντονότερη είναι η ενεργότητα των ανοδικών ισοενζύμων (Εικ. 27).



Εικόνα 27 Ισοενζυμική ανάλυση της GDH σε δείγματα κάλλων αμπέλου, Sultania, που έχουν υποβληθεί σε μεταχειρίσεις με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις NaCl.



Εικόνα 28. Ανοσοεντοπισμός του ολοενζύμου της GDH σε δείγματα κάλλων αμπέλου, cv Sultania, που έχουν υποβληθεί σε μεταχειρίσεις με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις NaCl.

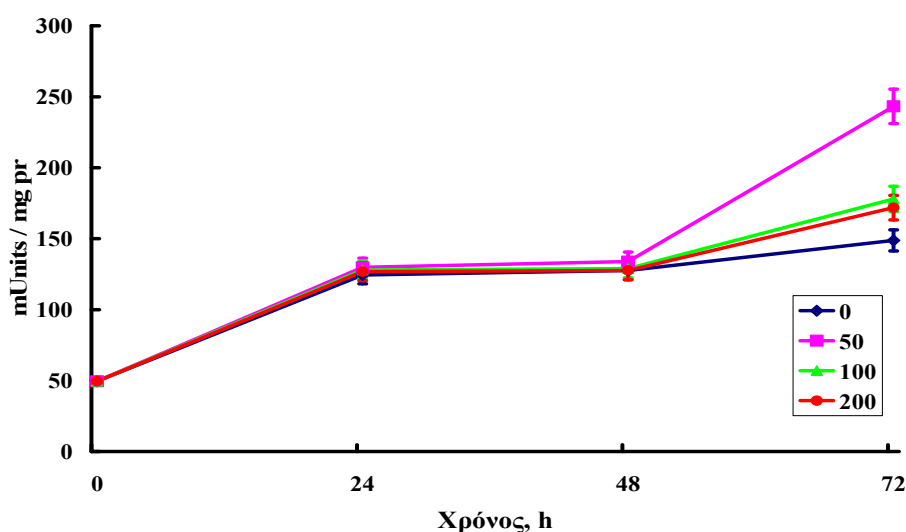
Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε και ανοσοεντοπισμός του ολοενζύμου της GDH όπως φαίνεται στην Εικόνα 28. Κατά τον ανοσοεντοπισμό διαπιστώθηκε ότι η μεταβολές της ειδικής ενεργότητας συμφωνούν με τις μεταβολές του ολοενζύμου της GDH.

5. ΚΑΠΝΟΣ *NICOTIANA TABACUM* cv XANTHI

Για να επιβεβαιώσουμε την θετική συσχέτιση της GDH στην καταπόνηση από αλατότητα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα και σε φυλλικούς δίσκους καπνού *Nicotiana tabacum* cv Xanthi. Οι φυλλικοί δίσκοι υποβλήθηκαν σε ίδιες μεταχειρίσεις με αυτές των φυλλικών δισκίων αμπέλου. Οι μεταχειρίσεις

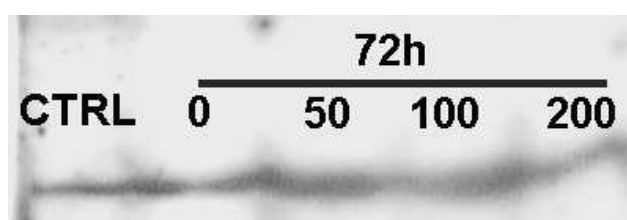
διήρκεσαν τρεις ημέρες (διαδοχικές δειγματοληψίες γινόταν κάθε 24h) και οι συγκεντρώσεις του NaCl που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0, 50, 100 και 200 mM.

Όπως είναι φανερό την Εικόνας 29, η μεγαλύτερη τιμή της ειδικής ενεργότητας της GDH παρουσιάστηκε μετά από 72h και στη συγκέντρωση NaCl 50mM. Η αύξηση ήταν της τάξεως του 63,5% σε σχέση με το μάρτυρα. Τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές (0, 24 και 48h) οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.



Εικόνα 29. Μεταβολή της ειδικής ενεργότητας της GDH συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης NaCl, σε φυλλικούς δίσκους καπνού.

Στα δείγματα της μεταχείρισης των 72h πραγματοποιήθηκε ανοσοεντοπισμός του ολοενζύμου της GDH, όπως φαίνεται στην Εικόνα 30. Κατά τον ανοσοεντοπισμό διαπιστώθηκε ότι οι μεταβολές της ειδικής ενεργότητας συμφωνούν με τις μεταβολές του ολοενζύμου της GDH. Είναι εμφανής η αύξηση του ολοενζύμου της GDH στη συγκέντρωση των 50mM NaCl στις 72h (Εικ. 30).



Εικόνα 30. Ανοσοεντοπισμός του ολοενζύμου της GDH σε φυλλικούς δίσκους καπνού, cv Xanthi, που έχουν υποβληθεί σε μεταχειρίσεις με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις NaCl.

Α. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η GDH είναι ένα ένζυμο, του οποίου ο φυσιολογικός ρόλος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Αρχικά επικρατούσε η θεωρία ότι αποτελεί το κύριο ένζυμο που λαμβάνει μέρος στην αφομοίωση της ενδοκυτταρικής αμμωνίας για το σχηματισμό του γλουταμικού οξέος. Μετά όμως από μελέτες, που απέδειξαν ότι το ενζυμικό σύστημα GS/GOGAT είναι αυτό που παίζει τον κυρίαρχο ρόλο στην αφομοίωση της αμμωνίας (Lea and Mifflin, 1974), η θεωρία τροποποιήθηκε και απέδωσε τη λειτουργία της GDH ως ένα εναλλακτικό μονοπάτι για την αφομοίωση της αμμωνίας σε συνθήκες κατά τις οποίες το ενζυμικό σύστημα GS/GOGAT δεν δύναται να λειτουργήσει (Lea and Mifflin, 1980; Yamaya *et al.*, 1984; Srivastava and Singh, 1987; Rhodes *et al.*, 1989).

Ωστόσο, σε πειράματα που έγιναν σε φυτά χρησιμοποιώντας σημασμένο ^{14}N , αποδείχτηκε ότι η GDH λειτουργεί περισσότερο προς την κατεύθυνση απαμίνωσης του γλουταμικού οξέος, παρά προς την κατεύθυνση αφομοίωσης της αμμωνίας. Από αυτό μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ένας ακόμη πιθανός φυσιολογικός ρόλος της GDH είναι η συμμετοχή της στην ανακύκλιση ανθρακικών σκελετών, τους οποίους προμηθεύει σε ιστούς που παρουσιάζουν έλλειψη σκελετών άνθρακα για περαιτέρω μεταβολικές διεργασίες (Wallsgrave *et al.*, 1983, 1987; Robinson *et al.*, 1990, 1992; Fox *et al.*, 1995).

Σε πολλά καλλιεργούμενα είδη έχει παρατηρηθεί ότι όταν αναπτύσσονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης, η ειδική ενεργότητα της GDH είναι αυξημένη (Mattioni *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2000; Sforza *et al.*, 2002). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην διατύπωση μιας διαφορετικής θεωρίας σχετικά με το φυσιολογικό ρόλο του ενζύμου αυτού, όπου υποστηρίζεται ότι η GDH έχει ρόλο αντι-καταπόνησης (antistress enzyme). Η θεωρία αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η GDH συμμετέχει στην αποτοξίνωση του κυττάρου από αμμωνία, όταν τα επίπεδα της είναι υψηλά και επομένως τοξικά για το φυτό (Givan, 1979, Sarivastava and Singh, 1987; Benachenhou-Lahfa, 1994; Ranamjuley *et al.*, 1994, Primikirios and Roubelakis-Angelakis 1999,

2001). Με την παρούσα μελέτη έγινε επιπλέον προσπάθεια τεκμηρίωσης της θεωρίας αυτής, δηλαδή της άποψης ότι η επαγωγή της GDH είναι αποτέλεσμα αντίδρασης του φυτού σε καταστάσεις καταπονήσεων, όπως η αλατότητα.

Η αυξημένη αλατότητα στο εδαφικό διάλυμα αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τη αύξηση και ανάπτυξη των φυτών (Zhu, 2001). Η καταπόνηση από αλατότητα οφείλεται κυρίως στη ωσμωτική και ιοντική καταπόνηση που προκαλείται, με αποτέλεσμα την διαταραχή των φυσιολογικών και βιοχημικών λειτουργιών του κυττάρου (Xiong *et al.*, 2002). Η αλατότητα, όπως και άλλες αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις, διαταράσσουν την κυτταρική ομοιόσταση και αυξάνουν την παραγωγή των EMO (Polle, 2000; Hernandez *et al.*, 2001; Keles and Oncel, 2002; Boscolo *et al.*, 2003). Η επίδραση της αλατότητας σε φυλλικούς δίσκους αμπέλου, προκάλεσε συσσώρευση $O_2^{\cdot-}$. Μετά από 72h επίδρασης 200mM NaCl το ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό επίπεδο του $O_2^{\cdot-}$ ήταν 8 φορές υψηλότερο από εκείνο του μάρτυρα (Εικ. 9). Το επίπεδο του H_2O_2 την ίδια χρονική στιγμή ήταν μη ανιχνεύσιμο τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά, ενώ στις 24 και τις 48 ώρες επίδρασης υπήρξαν σημαντικά επίπεδα H_2O_2 , μόνο όμως ενδοκυτταρικά (Εικ. 9). Στο ανθεκτικό στην αλατότητα υβρίδιο αμπέλου 1103P, εντοπίστηκαν επίσης EMO. Στις 72h επίδρασης 200mM NaCl, το ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό επίπεδο του $O_2^{\cdot-}$ ήταν 1,8 και 2,2 φορές υψηλότερο από εκείνο του μάρτυρα, χαμηλότερο όμως από την ευαίσθητη ποικιλία (Εικ. 17 και Εικ. 9). Ακόμα, αιωρούμενη καλλιέργεια κυττάρων Sultanina μετά από 72 h μεταχείριση με 100 mM NaCl συσσώρευσε 1,7 και 3,7 φορές υψηλότερα, επίπεδα ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού $O_2^{\cdot-}$, σε σύγκριση με την καλλιέργεια-μάρτυρα (Εικ. 25).

Η αυξημένη συγκέντρωση ιόντων Na^+ στον χλωροπλάστη που έχουν ανιχνευτεί σε καταστάσεις καταπόνησης από αλατότητα έχει ως αποτέλεσμα την απόσπαση εξωγενών πρωτεϊνών (κυτόχρωμα C_{550}) από το φωτοσύστημα II και την μερική απενεργοποίηση του μηχανισμού διαχείρισης οξυγόνου, που προκαλεί διαρροή ηλεκτρονίων προς το O_2 και δημιουργία $O_2^{\cdot-}$ (Allakhverdiev *et al.*, 2000). Επίσης η αποδόμηση των χλωροφυλλών είναι ένα από τα

αποτελέσματα της επίδρασης αλατότητας στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Η συγκέντρωση των α- και β- χλωροφυλλών σε φυλλικούς δίσκους Sultanina παρουσίασε μείωση ανάλογη με την ένταση της καταπόνησης και του χρόνου της επίδρασης της (Εικ. 10).

Το κύτταρο αντιδρά στη συσσώρευση των ΕΜΟ ενεργοποιώντας τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Η SOD είναι υπεύθυνη για την απόσβεση του $O_2^{\cdot-}$ και επάγεται σε καταστάσεις καταπονήσεων από παράγοντες, όπως βαρέα μέταλλα, αλατότητα και ακραίες θερμοκρασίες (Hernandez *et al.*, 2001; Keles and Oncel, 2002; Boscolo *et al.*, 2003). Κατά την επίδραση της αλατότητας σε φυλλικούς δίσκους Sultanina δεν ανιχνεύθηκε ειδική ενεργότητα της SOD. Στο εργαστήριό μας έχει αποδειχθεί η ενεργή συμμετοχή της SOD στην απόσβεση του $O_2^{\cdot-}$ σε καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού όχι όμως κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών αμπέλου, όπου μια γενική κατάρρευση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού σχετίστηκε με την έλλειψη αναγεννητικής ικανότητας των πρωτοπλαστών (Papadakis *et al.*, 2000).

Η CAT αποτελεί τον κύριο ενζυμικό αποσβέστη του H_2O_2 στο κύτταρο, αλλά έχει χαμηλή συγγένεια με το υπόστρωμα (Perez *et al.*, 2002). Αντιθέτως η APO έχει μεγάλη συγγένεια με το υπόστρωμα και έτσι δρα ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 (Mittler, 2002). Κατά την επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων NaCl (50 mM) σε φυλλικούς δίσκους Sultanina η παραγωγή H_2O_2 είναι χαμηλή (Εικ. 9) και παρατηρήθηκε η μέγιστη ενεργότητα της APO (3 φορές υψηλότερη σε σχέση με το μάρτυρα), ενώ η ενεργότητα της CAT παρουσίασε μικρή αύξηση (Εικ.13,14). Γενικότερα δεν παρατηρήθηκε σημαντική επαγωγή του αντιοξειδωτικού μηχανισμού σε φυλλικούς δίσκους της Sultanina καθώς και του 1103P (Εικ.13,14, 20).

Η ενζυμική ενεργότητα της GDH παρουσίασε αύξηση κατά την επίδραση αλατότητας σε φυλλικούς δίσκους, αιωρούμενη καλλιέργεια κυττάρων και κάλλους Sultanina, καθώς και σε φυλλικούς δίσκους καπνού Xanthi (Εικ. 7, 16, 22, 26, 29). Η ειδική ενεργότητα της GDH ήταν 2,2 φορές υψηλότερη σε φυλλικούς δίσκους Sultanina σε σχέση με το μάρτυρα μετά από 24 h επίδρασης 200mM NaCl και υπήρξε ανταπόκριση της ενεργότητας ανάλογα με

την δόση της αλατότητας, ενώ αντίστοιχη ήταν και η έκφραση του μεταγράφου (Εικ. 7, 8). Αυξανόμενου του χρόνου επίδρασης σε 48 h και 72 h η συγκέντρωση των 100mM προκάλεσε μεγαλύτερη αύξηση δεδομένου ότι υπό την επίδραση των 200mM NaCl οι φυλλικοί δίσκοι Sultanina εμφάνισαν φαινότυπο υψηλής καταπόνησης (Εικ. 6). Ανάλογο πρότυπο διαπιστώθηκε και σε κάλλους Sultanina (Εικ. 26). Σε αιωρούμενη καλλιέργεια κυττάρων Sultanina, η ενεργότητα της GDH αυξάνονταν ανάλογα με τη δόση της αλατότητας και το χρόνο επίδρασης της (Εικ. 22). Διαφοροποίηση στην ενεργότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε σε φυλλικούς δίσκους υποκειμένου αμπέλου 1103 Paulsen (Εικ. 16). Στην περίπτωση αυτή η ειδική ενεργότητα του ενζύμου παρέμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της μεταχείρισης και σε όλες τις συγκεντρώσεις NaCl. Αύξηση στην ενεργότητα του ενζύμου έχει καταγραφεί σε πολλές καταστάσεις αβιοτικής και βιοτικής καταπόνησης των φυτών (Sarivastava and Singh, 1987; Osuji and Madu, 1996; Mattioni *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2000).

Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η επαγωγή της GDH στην καταπόνηση από αλατότητα, στοχεύει στην αποτοξίνωση του κυττάρου από υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας. Έχει καταγραφεί αυξημένη πρωτεόλυση λόγω επαγωγής της ενεργότητας των πρωτεασών και αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοξέων σε καταπονήσεις, ενώ παράλληλα έχει παρατηρηθεί επαγωγή πρωτεόλυσης και υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικής αμμωνίας σε καταπόνηση αλατότητας (Ranamjuluey *et al.*, 1994). Κατά την επίδραση αλατότητας σε φυλλικούς δίσκους αμπέλου Sultanina παρατηρήθηκε μείωση των ολικών πρωτεϊνών ανάλογα με την ένταση της αλατότητας (Εικ. 11, 12) ενώ στους φυλλικούς δίσκους του 1103P (ανθεκτικό στην αλατότητα) δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στις ολικές πρωτεΐνες (Εικ.18,19). Η παρούσα θεωρία μπορεί να ενισχυθεί και από άλλα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας. Αποδείχτηκε ότι σε κάλλους Sultanina, που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε αμμωνιακά άλατα, επάχθηκε σημαντικά η αμινωτική δράση της GDH. Η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας της GDH συνοδεύτηκε από *de novo* σύνθεση της α-υπομονάδας, ενώ δεν

παρατηρήθηκε αύξηση της β-υπομονάδας (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1992). Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας της GDH, σε όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν, συνοδεύτηκε από αύξηση του ολοενζύμου της GDH (Εικ. 24, 28, 30). Από την μελέτη της μεταβολής του προτύπου των ισοενζύμων βρέθηκε ότι η αμμωνία προκάλεσε συσσώρευση των ανοδικών ισοενζύμων, που αποτελούνται κυρίως από την α-υπομονάδα (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1992). Το ίδιο ισοενζυμικό πρότυπο εμφανίστηκε και κατά τη μεταχείριση κάλλων και των κυττάρων, με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (Εικ.23, 27).

Συνοψίζοντας, μπορεί να αναφερθεί ότι ενδεχομένως η καταπόνηση αλατότητας συνοδεύεται από παραγωγή και συσσώρευση EMO, καθώς και έκφραση του γονιδίου *Vngdha*, σύνθεση της α-υπομονάδας, αύξηση της πρωτεΐνης, των ανοδικών ισοενζύμων και της ενζυμικής ενεργότητας της GDH, υποδηλώνοντας συσχέτιση των EMO με την επαγωγή της GDH. Όμως αυτή η υπόθεση δεν τεκμηριώνεται από τα αντίστοιχα αποτελέσματα με τον ανθεκτικό στην αλατότητα γενότυπο 1103P. Είναι πιθανόν ότι αυτή η συσχέτιση ισχύει μόνο για τους ευαίσθητους γενότυπους όπου η αλατότητα προκαλεί εκτεταμένη πρωτεόλυση και παραγωγή αμμωνίας. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι πιθανόν ότι ο φυσιολογικός ρόλος της GDH σχετίζεται με την αποτοξίνωση του κύτταρου από περίσσεια αμμωνίας, χωρίς να αποκλείεται οι EMO να διαδραματίζουν κάποιο έμμεσο ρόλο για την επαγωγή της GDH, όπως να συμμετέχουν στο δίκτυο σηματοδότησης.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Inaba M, Murata N** (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* **123**: 1047-1056
2. **Asada K** (1984) Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol.* **105**: 422-42
3. **Asada K** (1992a) Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* **85**: 235-241
4. **Asada K** (1999) **The water-water cycle on chloroplasts: Scavenging on active oxygens and dissipation of excess photons.** *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **50**: 601-63
5. **Beevers L and Hageman RH** (1980) Nitrate and nitrite reduction. *In*: B.J. Miflin (ed), *The Biochemistry of Plants. Amino Acids and Derivatives.* Academic Press, New York, pp. 856-858. *Current Genetics* **34**:50-9
6. **Benachenhou-Lanhfa N, Labedan B, Forterre P** (1994) PCR-mediated cloning and sequencing of the gene encoding glutamate dehydrogenase from the archeon *Sulfolobus shibatae*: identification of putative amino-acid signatures for extremophilic adaptation. *Gene.* **140**:17-24
7. **Blumwald E** (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Cur. Opin. Cell Biol.* **12**: 431-434
8. **Boscolo PRS, Menossi M, Jorge RA** (2003) Alluminum induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* **62**: 181-189
9. **Bowler C, Van Montagu M, Inze D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.l* **43**: 83-116
10. **Buckner B, Johal GS, Janick-Buckner D** (2000) Cell death in maize. *Physiol. Plant* **108**: 231-239
11. **Cammaerts DM and Jacobs M** (1985) A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* **163**: 517-526
12. **Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK** (2002) Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* **163**: 1161-1168

13. **Corbisier P, Houbion A, Remacle A** (1987) A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. *Ann. Biochem.* **164**: 240-247
14. **Dasgan HY, Aktas H, Abak K, Cakmak I** (2002) Determination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotype responses. *Plant Sci.* **163**: 695-703
15. **Dat J, Vandenameele S, Vranova E, Van-Montagu M, Inze D, Breusegem FV** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* **57**: 779-795
16. **Dubois F, Terce-Laforgue T, Gonzalez-Moro M-B, Etavillo J-M, Sanwgan R, Gallais A and Hirel B** (2003) Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiol. Biochem.* **41**: 565-576
17. **Elstner EF** (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 73-96
18. **Finkel T** (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Letters* **476**: 52-54
19. **Ficarelli A, Tassi F, Restivo FM** (1999) Isolation and characterization of two cDNA clones encoding for glutamate dehydrogenase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell Physiol.* **40**: 339-342
20. **Fox GG, Ratcliffe RG, Robinson SA, Stewart GR** (1995) Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: commentary, *Can. J. Bot.* **73**: 1112-1115
21. **Givan CV** (1979) Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry* **18**: 375-382
22. **Halliwell B** (1978a) Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* **40**: 81-88
23. **Halliwell B, Foyer CH** (1978b) Properties and physiological function of glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* **139**: 9-17
24. **Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Mol. Plant Physiol.* **51**:463-499

25. **Haynes RJ** (1986) Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. In R.J. Haynes (ed), Mineral Nitrogen in the Plant-Soil System. Academic Press, London, pp. 303-378
26. **Hernandez JA, Ferrer MA, Jimenez A, Barcelo AR, Sevilla F** (2001) Antioxidant systems and O_2^-/H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its reaction with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* **127**: 817-831
27. **Horvath E, Janda T, Szalai G, Paldi E** (2002) In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Sci.* **163**: 1129-1135
28. **Huges DW, Galau G** (1983) Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. *Plant Mol. Biol. Reporter* **6**: 253-257
29. **Iannelli MA, Pietrini F, Fiore L, Petrilli L, Massacci A** (2002) Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 977-982
30. **Jones A** (2000) Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci.* **5**: 273-278
31. **Karpinska B, Karlsson M, Schinkel H, Streller S, Suss K-H, Melzer M, Wingsle G** (2001) A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. Expression, regulation, and protein localization. *Plant Physiol.* **126**: 1668-1677
32. **Keles Y, Oncel I** (2002) Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Sci.* **163**: 783-790
33. **Knight H, Trewavas AJ, Knight MR** (1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* **12**: 1067-1078
34. **Kumar RG, Shah K, Dubey RS** (2000) Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. *Plant Sci.* **156**:23-34
35. **Langebartels C, Wohlgenuth H, Kschieschan S, Grun S, Sandermann K** (2002) Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 567-575
36. **Lauchli A** (1990). Calcium, salinity and the plasma membrane. Calcium in

- plant growth and development, The American Society of Plant Physiologists The American society of plant physiologists, Rockville, MD, 26-35
37. **Lea PJ and Miflin BJ** (1974) An alternative route for nitrogen assimilation in plants. *Nature* **251**: 680-685
 38. **Lea PJ** (1999) Nitrogen metabolism. *In*: Plant Biochemistry and Molecular Biology, Lea PJ and Leegood RC (Eds). Wiley, New York, pp.163-188
 39. **Lea PJ and Miflin BJ** (2003) Glutamate synthase end synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiol. Biochem* **41**: 555-564
 40. **Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA** (1990) Immunocharacterization of NADH-glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera* L. *Plant Physiology* **94**: 109-113
 41. **Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA** (1990) Intracellular localization and properties of NADH-glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera* L.: Purification and characterization of the major leaf isoenzyme. *J. Exp. Bot.* **41**: 231:1223-1230
 42. **Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA** (1991) Plant NAD(H)-glutamate dehydrogenase consists of two subunit polypeptides and their participation in the seven isoenzymes occurs in an ordered ratio. *Plant Physiology* **97**: 104-111
 43. **Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA** (1992) Ammonium-induced increase in NADH-glutamate dehydrogenase activity is caused by *de novo* synthesis of α -subunit. *Planta* **187**: 322-327
 44. **Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA** (1996) The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities. *Physiol. Plant.* **96**: 29-35
 45. **Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA** (1997) Molecular cloning and characterization of cDNAs coding for ferredoxin-dependent glutamate synthase from *Vitis vinifera*. *Physiol. Plant.* **101**: 220-228
 46. **Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA** (2001a) Nitrogen assimilation in grapevine. *In* KA Roubelakis-Angelakis, ed, Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 59-85
 47. **Loulakakis KA, Primikirios NI, Nikolantonakis NA, Roubelakis-Angelakis KA** (2002) Immunocharacterization of *Vitis vinifera* L.

- ferredoxin dependent glutamate synthase and its spatial and temporal changes during leaf development. *Planta* **215**: 630-638
48. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent 1. *J Biol Chem* **193**: 265-275
49. **Mansour MMF, Salama KHA, Al-Mutawa MM** (2003) Transport proteins and salt tolerance in plants. *Plant Sci* **164**:981-900
50. **Mattioni C, Gabbrielli R, Vongronsveld J, Clijsters H** (1997) Nickel and cadmium toxicity and enzymatic activity in Ni tolerant and non-tolerant populations of *Silen italica* pers, *J. Plant Physiol.* **150**: 173-177
51. **Melo-Oliveira R, Oliveira IC, Coruzzi GM** (1996) *Arabidopsis* mutant analysis end Gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**: 4718-4723
52. **Mishra HP, Mishra RK, Singhal G** (1993) Changes in the activity of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol.* **181**: 308-312
53. **Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**: 405-410
54. **Mittler R, Zulinskas BA** (1992) Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J. Biol. Chem.* **267**: 21802-21807
55. **Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497
56. **Murphy TM, Asard H, Cross AR** (1998) Possible sources of reactive oxygen during the oxidative stress in plants. In H Asard, A Berczi, RJ Caubergs, eds, *Plasma membrane redox systems and their role in biological stress and disease*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands pp. 215-247
57. **Neill S, Desikan R, Hancock J** (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Cur Opin Cell Biol.* **5**: 388-395
58. **Nemeth M, Janda T, Horvath E, Paldi E, Szalai G** (2002) Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Sci.* **162**: 569-574
59. **Osuji GO, Madu WC** (1996) Ammonium ion salvage by glutamate

- dehydrogenase during defence response in maize. *Phytochemistry* **42**: 1491-1498
60. **Paczek V, Dubois F, Sangwan R, Morot-Gaudry JF, Roubelakis-Angelakis KA, Hirel B** (2002) Cellular and subcellular localisation of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in grapes gives new insightson the regulation of C and N metabolism. *Planta* **216**: 245-254
61. **Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (2000) The generation of active oxygen species differs in *Nicotiana* and *vitis* plant protoplasts. *Plant Physiol.* **121**: 197-205
62. **Perez FJ, Villegas D, Mejia N** (2002) Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifying system of H₂O₂ in grapevine leaves. *Phytochemistry* **60**: 573-580
63. **Platnik JF, Valle EM, Federico ML, Gomez LD, Melchiorre MN, Paleo AD, Carrillo N, Acevedo A** (2002) Status of antioxidant metabolites and enzymes in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci.* **162**: 363-371
64. **Polle A** (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modelling. *Plant Physiol.* **126**: 445-462
65. **Primikiriou NI and Roubelakis-Angelakis KA** (1999) Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. *Planta* **208**: 574-582
66. **Primikiriou NI, Loulakakis KA, Lefort F and Roubelakis-Angelakis KA** (2001) Nitrogen metabolism and recycling genes cloned from *Vitis vinifera* (L.). *Acta Hort.* **528**: 231-239
67. **Purnell MP, Stewart GR, Botella JR** (1997) Cloning and characterization of a glutamate dehydrogenase cDNA from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Gene* **186**: 249-254
68. **Ramanjulu S, Veeranjanyulu K, Sudhakar C** (1994) Short-term shifts in mulberry *Morus Alba* under salt shock. *Phytochemistry* **4**: 991-995
69. **Rhee SG, Bae YS, Lee S-R, Kwon J** (2000) Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Science's Signal Transduction Knowledge Environment*
70. **Rhodes D, Brunk DG and Magalhaes JR** (1989) Assimilation of ammonia by glutamate dehydrogenase? *In*: JE Poulton, JT Romeo, EE

- Conn, (Eds), Plant Nitrogen Metabolism. Plenum Press, New York, pp. 191-206.
71. **Richter C, Schweizer M** (1997) Oxidative stress in mitochondria. In: Scandalios JG (Ed.), Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses, Monograph Series, Vol. 34 Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, pp. 169-200
72. **Robinson SA, Slade AP, Fox GG, Phillips R, Ratcliffe G, Stewart GR** (1991) The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol.* **95**: 509-516
73. **Robinson SA, Stewart GR, Phillips R** (1992) Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation of carbon limitation and protein catabolism in carrot cell cultures. *Plant Physiol.* **98**: 1190-1195
74. **Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, ΚΑ** (2003) Μεταβολισμός αζώτου. *In* Φυσιολογία Φυτών. ΚΑ Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Εκδότης, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, ISBN, υπό εκτύπωση.
75. **Sakakibara H, Fujii K, Sugiyama T** (1995) Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize glutamate dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* **36**: 789-797.
76. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press
77. **Scandalios JG** (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* **101**: 7-12
78. **Sforza E, Saladino F, Marino V, Agrimonti C, Restivo FM** (2002) Regulation of *Nicotiana plumbaginifolia* NADH-gluyamate dehydrogenase by physiological and stress conditions: comparison of wild type and antisense suppressed transformants. 13th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology. Crete, Greece, 2-6 September, pp. 46
79. **Srivastava HS, Singh RP** (1987) Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochemistry* **26**: 597-610
80. **Sussman MR** (1994) Molecular analysis of protein in the plasma membrane. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 211-234
81. **Sutherland MW** (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **9**: 79-93

82. **Syntichaki KM, Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA** (1996) The amino-acid sequence similarity of plant glutamate dehydrogenase to the extremophilic archaeal enzyme conforms to its stress-related function. *Gene* **168**: 87-92
83. **Turano FI, Thakar SS, Fang T, Weimann** (1997) Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **113**: 1329-1341
84. **Wallsgrave RM, Keys AJ, Lea PJ and Miflin BJ** (1983) Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. *Plant Cell Environ.* **6**: 301-309
85. **Wallsgrave RM, Turner JC, Hall NP, Kendall AC and Bright SWJ** (1987) Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase. Biochemical and genetic analysis. *Plant Physiology.* **83**: 155-158
86. **Wojtaszek P** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* **322**: 681-692
87. **Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK** (2002) Cell Signaling during Cold, Drought and Salt Stress. *The Plant Cell* S165-S183
88. **Yamaguchi K, Mori H, Nishimura M** (1995) A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glycosomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol* **36**: 1157-1162
89. **Yamaya T, Oaks A, Matsumoto H** (1984) Characteristics of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. *Plant Physiol* **76**:1009-1013
90. **Ye Z, Rodriguez R, Tran A, Hoang H, Santos Ddl, Brown S, Vellanoweth RL** (2000) The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **158**: 115-127
91. **Zhu JK** (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**: 66-71