

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΝΕΡΓΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΘΕΥΓΟΝΟΥ
ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ
ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ-ΠΟΛΥΞΕΝΗ ΠΑΠΑΔΑΚΗ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2000

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΝΕΡΓΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ
ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ**

Από

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ-ΠΟΛΥΞΕΝΗ ΠΑΠΑΔΑΚΗ

Πτυχ. Βιολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης, 1991

**Υποβλήθηκε ως μέρος των απαιτήσεων για τον τίτλο
του Διδάκτορα Βιολογικών Επιστημών,
με έμφαση τη Βιοχημεία και Μοριακή Φυσιολογία Φυτών,
στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Ν. Πανόπουλος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ε. Τσαγρή, Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Ε.-Ι. Κωνσταντινίδου, Καθηγήτρια Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου

Θεσσαλονίκης

Δ. Γανωτάκης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ν. Πανόπουλος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ε. Στρατάκης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Κ. Κοτζαμπάσης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ε. Τσαγρή, Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Στην Τίτκα

Στον Κωστή

Στο Γιώργη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών, του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 1994-2000. Το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας υποστήριξε οικονομικά την διατριβή μου για το χρονικό διάστημα 1994-1996. Το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, παρείχε την υλικοτεχνική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών .

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, γιατί με τίμησε με την εμπιστοσύνη της, προσφέροντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ με τη φυσιολογία και τη βιοχημεία φυτών στο εργαστήριό της. Την ευχαριστώ για την ηθική και επιστημονική καθοδήγηση και την οικονομική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και τη διάρκεια εκτέλεσης της διατριβής μου.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής μου, τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Ν. Πανόπουλος και την Επίκουρο Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Κρήτης, κα Ε. Τσαγρή, για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή τους σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια του Α.Π.Θ. Ε.-Ι. Κωνσταντινίδου, τους Καθηγητές του Πανεπιστημίου Κρήτης Δ. Γανωτάκη και Ε. Στρατάκη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης Κ. Κοτζαμπάση για την συμμετοχή τους στην Εξεταστική Επιτροπή της διατριβής μου, τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και την ενθαρρυντική κριτική τους.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα πρώην μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών, για την άψογη συνεργασία τους και το πάντα φιλικό περιβάλλον. Ιδιαίτερα ευχαριστώ το Δρ. Μπάμπη Συμινή (Λέκτορα του Γεωργικού Παν/μίου Αθηνών) που με καθοδήγησε στα πρώτα μου βήματα στο πεδίο της έρευνας και στάθηκε δίπλα μου σε όλα τα επιστημονικά προβλήματα που αντιμετώπισα, και την Δρ. Μ. Χρηστάκη-

Χάμσα και το Δρ. Κώστα Λουλακάκη (Καθηγητή ΣΤΕΓ/ΤΕΙ Ηρακλείου) για τις πολύτιμες συμβουλές και την υποστήριξη τους. Επίσης, ευχαριστώ τις κκ. Σοφία Τουφεξή, Ελένη Χατζηνικολάκη, Μαρία Δραμουντάνη και τον κ. Στέλιο Δαριβιανάκη, που ως τεχνικοί του εργαστηρίου δε μου αρνήθηκαν ποτέ τη βοήθειά τους και την φιλική στήριξη.

Θερμά ευχαριστώ τον κ. Στέλιο Μαυράκη για τη σημαντική και ουσιαστική βοήθεια που παρείχε στην έγκαιρη παροχή φυτικού υλικού.

Ιδιαίτερες και θερμότερες ευχαριστίες στους φίλους και συναδέλφους Δρ. Νικόλα Πριμηκύριο και Κώστα Πασχαλίδη, για τη συνεχή παρουσία και συμπαράστασή τους στις δύσκολες, αλλά και τις ευχάριστες στιγμές κατά την εκπόνηση της διατριβής μου, καθώς και για την άψογη συνεργασία μας. Ακόμα την τεχνικό Χαρά Σταματάκη και τον συνάδελφο Δημήτρη Αλεξάνδρου, τα νεώτερα μέλη του εργαστηρίου, για την βοήθεια τους. Επίσης την Δρ. Θεοδώρα Αγαλιώτη και Δρ. Αναστασία Ταμπακάκη για την επιστημονική τους βοήθεια και ενθάρρυνση, αλλά κυρίως, για την ανεκτίμητη φιλική μας σχέση.

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 και μου δίνουν, σαν ελάχιστη αναγνώριση των θυσιών και των παραχωρήσεών τους στη διάρκεια μιας επίπονης αλλά εξαιρετικά διδακτικής προσπάθειας.

Η παρουσία όλων υπήρξε ανεκτίμητη.

Μάιος 2000

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

ADC	<u>A</u> rginine <u>D</u> ecarboxylase
APO	<u>A</u> scorbate <u>P</u> eroxidase
ASA	Reduced ascorbate
BAP	6- <u>b</u> enzyl <u>a</u> minopurine
BSA	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
CAT	<u>C</u> atalase
DAO	<u>D</u> iamine <u>O</u> xidase
DDC	N, N- <u>D</u> iethyl <u>d</u> ithio <u>c</u> arbamate
DHA	Oxidized ascorbate
DHAR	<u>D</u> ehydro <u>a</u> scorbate <u>R</u> eductase
DPI	<u>D</u> iphenylene <u>i</u> odonium
EDTA	<u>E</u> thylene- <u>d</u> iamine- <u>t</u> etraacetic <u>a</u> cid
EMO	<u>Ε</u> νεργές <u>Μ</u> ορφές <u>Ο</u> ξυγόνου
GR	<u>G</u> lutathione <u>R</u> eductase
GS-	Glutathione Peroxidase
POX	
GSH	Reduced glutathione
GSSG	Oxidized glutathione
HK	<u>Η</u> μέρες <u>Κ</u> αλλιέργειας
H ₂ O ₂	Περοξείδιο του υδρογόνου
<i>in vitro</i>	Στο σωλήνα, εκτός οργανισμού
<i>in vivo</i>	Εν ζωή, εντός οργανισμού
KCN	Potassium cyanide
Lucigen	N, N-dimethyl-9,9'-biacridium dinitrate
ine	
Luminol	5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione
MES	2-(N- <u>M</u> orpholino) <u>e</u> thanesulfonic acid
MHAR	<u>M</u> ono <u>h</u> ydro <u>a</u> scorbate <u>R</u> eductase
NAA	a- <u>N</u> aphthalene <u>a</u> cetic <u>a</u> cid
NADH	a-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form

NADPH	α -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
NaN ₃	Sodium azide
NBT	<u>N</u> itro <u>b</u> lue <u>t</u> etrazolium
O ₂ ⁻	Υπεροξειδική ρίζα
ΠΑ	Πολυαμίνες
ΠΣ	Πουτρεσίνη
ΣΔ	Σπερμιδίνη
ΣΜ	Σπερμίνη
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crilamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffer <u>s</u> aline solution
pCMB	p- <u>c</u> hloro <u>m</u> ercuri <u>b</u> enzoate
PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulphonyl <u>f</u> luoride
POX	<u>P</u> eroxi <u>d</u> ase
PVPP	<u>P</u> oly <u>v</u> inyl <u>p</u> olypyrrolidone
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate
SE	<u>S</u> tandard <u>e</u> rror
SOD	Superoxide Dismutase
TCA	<u>T</u> richloro <u>a</u> ctic acid
TEMED	N, N, N', N' - <u>T</u> etra <u>m</u> ethylethylenediamine
Tris	Tris (Hydroxymethyl)methyl glycine
Triton -	Polyoxyethelene ether
100	
Tween-	Polyoxyethelene sorbitan, monolaurate
20	
UV	<u>U</u> ltra <u>v</u> iolet

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου κατά την απομόνωση πρωτοπλαστών μεσοφύλλου καπνού και αμπελιού. Επίπεδα και συστήματα παραγωγής.

3

1.1. Περίληψη

1.2. Εισαγωγή

1.3. Υλικά και μέθοδοι

1.4. Αποτελέσματα

1.5. Συζήτηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Απόσβεση των ενεργών μορφών οξυγόνου κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπελιού, με την μεσολάβηση φυσικών αντιοξειδωτικών, αντιοξειδωτικών ενζύμων και πολυαμινών

5

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.1: Συσσώρευση των ΕΜΟ κατά την απομόνωση και την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών καπνού και αμπελιού. Επίδραση στην βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών

9

2.1.1. Περίληψη

2.1.2. Εισαγωγή

2.1.3. Υλικά και μέθοδοι

2.1.4. Αποτελέσματα

2.1.5. Συζήτηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.2: Ενδογενή επίπεδα των φυσικών αντιοξειδωτικών, ασκορβικού οξέος και γλουταθειόνης, κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών καπνού και αμπελιού

07

2.2.1. Περίληψη

- 2.2.2. Εισαγωγή
- 2.2.3. Υλικά και μέθοδοι
- 2.2.4. Αποτελέσματα
- 2.2.5. Συζήτηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.3: Εκφραση και ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών καπνού και αμπελιού	25
---	----

- 2.3.1. Περίληψη
- 2.3.2. Εισαγωγή
- 2.3.3. Υλικά και μέθοδοι
- 2.3.4. Αποτελέσματα
- 2.3.5. Συζήτηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.4: Ενδογενή επίπεδα και επίδραση εξωγενών πολυαμινών κατά την απομόνωση και την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών καπνού και αμπελιού	53
--	----

- 2.4.1. Περίληψη
- 2.4.2. Εισαγωγή
- 2.4.3. Υλικά και μέθοδοι
- 2.4.4. Αποτελέσματα
- 2.4.5. Συζήτηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Συμπεριφορά των πρωτοπλαστών από γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού που υποεκφράζουν την ασκορβική περοξειδάση	81
---	----

- 3.1. Περίληψη
- 3.2. Εισαγωγή
- 3.3. Υλικά και μέθοδοι
- 3.4. Αποτελέσματα
- 3.5. Συζήτηση

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	97
--	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

A. K. Παπαδάκη (2000) Ο ρόλος των ενεργών μορφών οξυγόνου στην αναγεννητική ικανότητα των πρωτοπλαστών.

Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέπων: Καθηγήτρια Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη

Προηγούμενα αποτελέσματα του Εργαστηρίου έδειξαν ότι η οξειδωτική καταπόνηση εμπλέκεται στην μείωση του αναγεννητικού δυναμικού των πρωτοπλαστών, όμως μόνο οι πρωτοπλάστες που είναι ικανοί να παράγουν εξωκυτταρικό H_2O_2 μπορούν να διαιρεθούν (Siminis *et al.*, 1993, 1994, de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996a, 1996b, 1999). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου (EMO), του O_2^- και του H_2O_2 , κατά την απομόνωση αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού (*Nicotiana tabacum* L.) και μη αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου (*Vitis vinifera* L.), καθώς και τα συστήματα παραγωγής τους. Η χρησιμοποίηση κυτταρινάσης Onozuka προκάλεσε ραγδαία συσσώρευση του O_2^- και του H_2O_2 στο μέσο επώασης των φύλλων καπνού, ενώ η αντίστοιχη παραγωγή ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην άμπελο. Ο τραυματισμός των φύλλων ή η χρησιμοποίηση καθαρής κυτταρινάσης Worthington δεν οδήγησε σε αύξηση των EMO. Η προσθήκη κυτταρινάσης Onozuka σε πρωτοπλάστες, που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Worthington, προκάλεσε οξειδωτική έκρηξη στο μέσο καλλιέργειας, όπου η συσσώρευση των EMO χαρακτηρίστηκε από σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των δύο φυτών. Στους πρωτοπλάστες και σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες καπνού, ανιχνεύτηκαν δυο διαφορετικές ενεργότητες σύνθεσης EMO: μία, που παρουσίασε εξειδίκευση στο NADPH και ευαισθησία στο DPI, ήταν υπεύθυνη για την παραγωγή του O_2^- και αντιστοιχεί μάλλον σε ένα ένζυμο παρόμοιο με

την NADPH οξειδάση των θηλαστικών, και μία δεύτερη NAD(P)H οξειδάση-υπεροξειδάση, ευαίσθητη στο KCN και το NaN₃, που συμβάλλει στην παραγωγή και των δύο EMO. Στην άμπελο, μόνο το δεύτερο ενζυμικό σύστημα ανιχνεύτηκε. Οι πρωτοπλάστες που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Opozuka, παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα EMO, κυρίως σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, και χαμηλότερη βιωσιμότητα και διαιρετική ικανότητα, σε σχέση με εκείνους που προέκυψαν από κυτταρινάση Worthington. Η συγκέντρωση των EMO μειώθηκε προοδευτικά κατά την καλλιέργεια, όμως στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες, οι ενδοκυτταρικές EMO αυξήθηκαν την 8η ημέρα καλλιέργειας. Οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού και εντονότερα οι πρωτοπλάστες αμπέλου, χαρακτηρίστηκαν από χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού και της γλουταθειόνης, με τις οξειδωμένες μορφές να κυριαρχούν κατά την καλλιέργεια. Η ενεργότητα των ενζύμων που αποσβένουν τις EMO, της SOD, της APO της MDHAR, της DHAR, της GR και της GS-PER ήταν σημαντικά υψηλότερη στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού σε σχέση με τους μη αναγεννώμενους και με τους πρωτοπλάστες αμπέλου, όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή κατά την καλλιέργεια. Η αύξηση στην ενεργότητα της SOD και της APO στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού οφειλόταν στην επαγωγή του κυτοπλασμικού ισοενζύμου. Πρωτοπλάστες από γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού με αντιπληροφοριακό RNA για την APO, δεν παρουσίασαν διαφορές με τον μάρτυρα, όσον αφορά τη βιωσιμότητα και την αντιοξειδωτική μηχανή. Όμως, η αναστολή της ενεργότητας της APO, με την χρησιμοποίηση του παρεμποδιστή pCMB, πάνω από 45% οδήγησε σε κυτταρικό θάνατο των πρωτοπλαστών. Οι αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού παρουσίασαν σταδιακή αύξηση των πολυαμινών κατά την καλλιέργεια, και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, με επικράτηση των διαλυτών συζευγμένων πολυαμινών, ενώ οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, με αυτή τη σειρά, παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η καταστολή της έκφρασης του ολοδυναμικού, που παρατηρείται στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες, μπορεί να σχετιστεί με την κατάρρευση του

αμυντικού μηχανισμού κατά της οξειδωτικής καταπόνησης.

ABSTRACT

A. K. Papadakis (2000) The role of active oxygen species in plant protoplast recalcitrance

Doctorate dissertation, Department of Biology, University of Crete

Supervisor: K. A. Roubelakis - Angelakis

Our previous results have shown that oxidative stress may reduce the regeneration potential of protoplasts but also, only protoplasts that are able to supply extracellularly H_2O_2 can actually divide (Siminis *et al.*, 1993, 1994, de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996a, 1996b, 1999). In this work we have attempted to break down the oxidative burst response into individual active oxygen species (AOS), O_2^- and H_2O_2 , and generating systems during isolation of regenerating tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and nonregenerating grapevine (*Vitis vinifera* L.) mesophyll protoplasts. Wounding of leaf tissue or use of purified cellulase did not elicit AOS production. Use of non-purified cellulase Onozuka during maceration induced a burst of O_2^- and H_2O_2 accumulation in tobacco leaf, while in grapevine significantly lower levels of both AOS were accumulated. When protoplasts isolated with purified cellulase were treated with non-purified cellulase, AOS were also generated with significant quantitative differences between the two species. In tobacco protoplasts and plasma membrane vesicles, two different AOS synthase activities were revealed; one that showed specificity to NADPH and sensitivity to DPI and was responsible for O_2^- production, and a second NAD(P)H activity, sensitive to KCN and NaN_3 , contributing to the production of both AOS. The first activity probably refers to a mammalian-like NADPH oxidase and the second to a NAD(P)H oxidase-peroxidase. In grapevine only one AOS generating activity was detected and was responsible for the generation of both AOS. Tobacco protoplasts resulted from non-purified cellulase showed greater O_2^- and H_2O_2 , mostly intracellularly, and lower viability and plating efficiency

(nonregenerating, NR-), compared to protoplasts isolated with purified cellulase (regenerating, R-). Grapevine protoplasts failed to divide at all treatments (recalcitrant, nonregenerating, NR-). In NR- grapevine protoplasts, AOS accumulation was significantly lower. During a culture period of 8 days, R- and NR- tobacco protoplasts and grapevine protoplasts exhibited lower AOS levels both intra- and extracellularly, compared to freshly isolated protoplasts; higher O_2^- and H_2O_2 the day 8 in NR-ones, was the main difference between R- and NR- tobacco protoplasts. In R-tobacco protoplasts, ASA and GSH predominated, whereas in the NR-ones and grapevine protoplasts, DHA and GSSG did. Furthermore, SOD, APO, MDAR, DHAR, GR and GS-POX activities were significantly greater in R-tobacco than in NR-tobacco and grapevine protoplasts. The increase in SOD and APO was due to the expression of cytoplasmic isoenzymes. Cultured protoplasts from transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytoplasmic APO, showed the same level of viability and plating efficiency and of enzymic and nonenzymic antioxidants, as the control protoplasts. Protoplast death was induced when APO activity was inhibited up to 45%, with the addition of pCMB in protoplast culture medium. Significant higher endogenous polyamine levels and predominated conjugated forms were found in R-tobacco protoplasts compared to NR- tobacco and especially, grapevine protoplasts. These results suggest that a collapse of defense mechanism against oxidative stress occurred in NR-tobacco and grapevine protoplasts, suggesting that suppressed expression of totipotency in protoplasts is correlated with reduced antioxidant machinery.

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΑ

Τα ανωτέρα φυτά είναι πολυκύτταροι οργανισμοί που αποτελούνται από ιστούς και όργανα ειδικευμένα σε συγκεκριμένες λειτουργίες. Σε κάθε κυτταρικό τύπο εκφράζονται ειδικές ομάδες γονιδίων με ποσοτικές, ποιοτικές, χρονικές και τοπικές διαφοροποιήσεις, κατά την ανάπτυξη (Osborne, 1993). Παρόλα αυτά και κάτω από ειδικές συνθήκες, η παραπάνω διαφοροποίηση είναι δυνατόν να τροποποιηθεί (Meyer *et al.*, 1993): τα διαφοροποιημένα κύτταρα επανέρχονται στον κυτταρικό κύκλο περνώντας το περιοριστικό σημείο από την G₀ στη S φάση κατά τη διαδικασία της αποδιαφοροποίησης (dedifferentiation) (Takahashi *et al.*, 1989). Το ολοδυναμικό (totipotency), μοναδική ιδιότητα των φυτικών κυττάρων, χαρακτηρίζει την ικανότητα των διαφοροποιημένων, μη διαιρούμενων σωματικών κυττάρων, όταν καλλιεργούνται κατάλληλα, να ξαναρχίζουν διαιρέσεις και να παράγουν κάλλους (μάζα από αδιαφοροποίητα κύτταρα), οι οποίοι, τελικά, μπορούν να αναγεννήσουν ολόκληρο φυτό, με άμεση οργανογένεση ή μέσω σωματικής εμβρυογένεσης. Με άλλα λόγια, πρόκειται για την ιδιότητα που επιτρέπει στα φυτικά κύτταρα να αλλάζουν την κανονική γονιδιακή τους έκφραση, η οποία σχετίζεται με τον ιστό στον οποίο ανήκουν, και να γίνονται ικανά να εκφράζουν γονίδια ρύθμισης της μιτωτικής ενεργότητας (Roubelakis-Angelakis, 1993). Η ενδογενής αυτή ιδιότητα περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1902 (Haberlandt, 1902) και έχει αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη των *in vitro* τεχνικών καλλιέργειας φυτικών κυττάρων και ιστών, τις μη-μοριακές βιοτεχνολογικές εφαρμογές στα φυτά, που επίσης αποτελούν τα συστήματα, εκτός άλλων, για την δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών.

Ως πρωτοπλάστες χαρακτηρίζονται τα φυτικά κύτταρα χωρίς τα κυτταρικά τους τοιχώματα. Πρόκειται δηλαδή, για απομονωμένα και "γυμνά" φυτικά κύτταρα, τα οποία έχουν θεωρητικά την δυνατότητα να αναγεννήσουν το κυτταρικό τους τοίχωμα, να αποδιαφοροποιηθούν, να διαιρεθούν μιτωτικά, να σχηματίσουν κυτταρικούς κλώνους και να διαφοροποιηθούν σε ριζικά και βλαστικά μεριστώματα ή έμβρυα, και τελικά να αναγεννήσουν ολόκληρο φυτό, όμοιο με αυτό, από το οποίο προέρχονται (Εικ. 1) (Potrykus and Shillito,

1986). Απομονώθηκαν για πρώτη φορά με μηχανικές μεθόδους, όμως ο όγκος της βιβλιογραφικής πληροφορίας στην τεχνολογία των πρωτοπλαστών συνδέεται με την χρησιμοποίηση ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος (Cocking, 1961). Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των πρωτοπλαστών και των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας έδωσαν χρήσιμα εργαλεία στην Βιοτεχνολογία των Φυτών, η οποία στοχεύει στη βελτίωση των φυτικών ειδών, δημιουργώντας φυτά με τροποποιημένους ή πρόσθετους επιθυμητούς χαρακτήρες. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι: 1) η σωματική υβριδοποίηση μέσω σωματικής συνένωσης πρωτοπλαστών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή υβριδίων, από ποικιλίες ή είδη που δεν μπορούν να υβριδιστούν παραδοσιακά, για την παραγωγή υβριδίων μεταξύ φυλετικά ασύμβατων ειδών ή εξελικτικά απομακρυσμένων και τέλος, για την παραγωγή κυτοπλασμικών υβριδίων (cybrids). ii) Μεταλλαξιγένεση πρωτοπλαστών με χρήση διαφόρων μεταλλαξιγόνων οπότε επιτυγχάνεται παραγωγή συγκεκριμένων φαινοτύπων. iii) Μεταφορά οργανιδίων, και iv) Μεταφορά γονιδίων (μέσω πλασμιδίων, DNA-ιών, "γυμνού" DNA) (Power *et al.*, 1986). Το καταλληλότερο σύστημα για βιοτεχνολογικές εφαρμογές θεωρούνται οι πρωτοπλάστες μεσοφύλλου, οι οποίοι συνιστούν ένα ομοιογενή πληθυσμό, που προέρχεται από τον ίδιο ιστό και ακολουθούν την ίδια πορεία ανάπτυξης σε καλλιέργεια (Meyer *et al.*, 1993). Μέχρι σήμερα έχει επιτευχθεί τροποποίηση σε είδη που κυρίως χρησιμοποιούνται ως συστήματα-μοντέλα, πχ. πετούνια και καπνός αλλά σε ελάχιστα καλλιεργούμενα είδη, όπως σιτηρά, δημητριακά κ.τ.λ. (Puite, 1992), τα οποία αποτελούν τον κύριο στόχο της Βιοτεχνολογίας.

1. ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ

Οι πρωτοπλάστες από τα σημαντικότερα για τον άνθρωπο, φυτικά είδη δείχνουν ανικανότητα να αποδιαφοροποιηθούν και να εισέλθουν σε κυτταρικό κύκλο. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται δυσκολία αναγέννησης (recalcitrance) και είναι σημαντικό πεδίο έρευνας, αφού μόνο όταν ξεπεραστεί, θα υπάρχει δυνατότητα για εφαρμογή βιοτεχνολογικών βελτιωτικών προγραμμάτων σε

πρακτικό επίπεδο. Στα δύσκολα αναγεννώμενα είδη ανήκουν τα σιτηρά, αρκετά λαχανικά και σχεδόν όλα τα ξυλώδη πολυετή είδη, με μεγάλη οικονομική αξία. Κανένα σιτηρό μέχρι σήμερα δεν έχει αναγεννηθεί από πρωτοπλάστες μεσοφύλλου, παρά μόνο με τη χρησιμοποίηση πρωτοπλαστών από εμβρυογενή καλλιεργούμενα κύτταρα (Vasil and Vasil, 1992). Αναγέννηση φυτού από πρωτοπλάστες μεσοφύλλου στα ξυλώδη πολυετή φυτά έχει επιτευχθεί μόνο σε είδη των γενών *Broussonetia* (Oka and Ohyama, 1985), *Malus* (Wallin and Johansson, 1989), *Pyrus* (Ochatt and Power, 1988a) και *Prunus* (Ochatt and Power, 1988b).

Η άμπελος (*Vitis vinifera* L.) είναι από τα σημαντικότερα και ευρέως διαδεδομένα φυτικά είδη και μπορεί να καταναλωθεί ως φρέσκο φρούτο, κρασί, οινοπνευματώδες ποτό και σταφίδα. Η παγκόσμια παραγωγή ξεπερνάει τους 65 εκατομμύρια τον τον χρόνο. Απειλείται όμως από ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών, γεγονός που απαιτεί διαρκή χημική μεταχείριση με κατανάλωση χρόνου και χρήματος και οικολογικά προβλήματα. Η δημιουργία νέων ποικιλιών με συμβατικές μεθόδους βελτίωσης είναι πολύπλοκη και χρονοβόρα διαδικασία λαμβάνοντας υπόψη ότι η άμπελος είναι υψηλά ετερόζυγο και πολλοί επιθυμητοί χαρακτήρες είναι πολυγονιδιακά ελεγχόμενοι, οπότε η πιθανότητα συνδυασμού τους σε ένα υβρίδιο είναι μικρή, ενώ ακόμα η περίοδος νεανικότητας είναι 2-6 χρόνια και η εκτίμηση του αποτελέσματος, χρονοβόρα. Η Βιοτεχνολογία σήμερα, με τις μεθόδους της Ιστοκαλλιέργειας και της Μοριακής Βιολογίας, αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την συμπλήρωση ή και την αντικατάσταση των συμβατικών μεθόδων βελτίωσης. Όμως όλα τα είδη του *Vitis* διακρίνονται από δυσκολία απόκρισης στους *in vitro* γενετικούς χειρισμούς, ιδιαίτερα σε επίπεδο πρωτοπλαστών.

Η *in vitro* αναγέννηση φυτού στην άμπελο εξαρτάται ισχυρά από τον γενότυπο, τον μητρικό ιστό-δότη και τις συνθήκες καλλιέργειας. Έχει επιτευχθεί αναγέννηση γενετικά μετασχηματισμένων φυτών από σωματικά έμβρυα που έχουν προκύψει από ανθήρες, ωοθήκες και φύλλο (Mullins *et al.*, 1990, Martinelli and Mandolino, 1994, Krastanova *et al.*, 1995, Mauro *et al.*, 1995, Perl *et al.*, 1995, Le Gall *et al.*, 1996, Hoshino *et al.*, 1998, Mozsar *et al.*,

1998) ή από κυτταροκαλλιέργειες (Kikkert and Reisch, 1996, Reustle and Matt, 1998). Σε καμία ποικιλία του είδους *vinifera*, εκτός της Cabernet Sauvignon (Lee *et al.*, 1989a) δεν έχουν επιτευχθεί συνεχείς διαιρέσεις πρωτοπλαστών μεσοφύλλου, ενώ έχει αναφερθεί αναγέννηση φυτού από πρωτοπλάστες μεσοφύλλου στο *Vitis rotundifolia* (Lee *et al.*, 1989a), είδος που έχει σημαντική γενετική διαφορά από το *vinifera* και σχηματισμός κάλλου από πρωτοπλάστες καλλιεργούμενων κυττάρων, στα είδη *Vitis labruscana* και *Vitis thunbergii* (Mii *et al.*, 1991), βλαστού, στο είδος *Vitis vinifera* (Reustle and Alleweldt, 1989) και σωματικών εμβρύων, στο είδος *Vitis vinifera* (Reustle and Matt, 1998).

2. ΠΙΘΑΝΑ ΑΙΤΙΑ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ

Η επιτυχής αναπτυξιακή αλληλουχία από τον πρωτοπλάστη στο φυτό, εξαρτάται από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες, που περιλαμβάνουν την προσωπική ιστορία του φυτού-δότη και την διαδικασία της απομόνωσης και ακόμα, σε μοριακό επίπεδο την ενεργοποίηση ή όχι συγκεκριμένων γονιδίων και μηχανισμών. Ξεκινώντας από το φυτό-δότη πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν είδη (ή ακόμα γένη και οικογένειες) όπως *Nicotiana tabacum* (*Nicotiana*, Solanaceae) τα οποία εύκολα μπορούν να αναγεννηθούν από πρωτοπλάστες (Binding, 1975), ενώ αντίθετα υπάρχουν οικογένειες όπως τα Gramineae, που οι πρωτοπλάστες τους παραμένουν σταθερά ανίκανοι για αναγέννηση (Loudon *et al.*, 1989, Ochatt, 1991, Jung *et al.*, 1993). Εκτός όμως από αυτές τις δύο ακραίες καταστάσεις, έχει παρατηρηθεί διαφορετική ανταπόκριση μεταξύ γενότυπων του ίδιου είδους, όμως γενετικά στοιχεία για το φαινόμενο δεν υπάρχουν.

Οι συνθήκες απομόνωσης που επηρεάζουν την ποιότητα των πρωτοπλαστών είναι το είδος και η συγκέντρωση των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, η διάρκεια της ενζυμικής πέψης, η σύσταση του θρεπτικού μέσου, το ωσμωτικό, το pH, η θερμοκρασία και/ή ο φωτισμός (Roubelakis-Angelakis, 1993). Επίσης, η απομόνωση των πρωτοπλαστών

ενδεχομένως προκαλεί ορμονική ανισορροπία, όπως για παράδειγμα επαγωγή της σύνθεσης αιθυλενίου, της ορμόνης γήρανσης, εις βάρος των πολυαμινών, αφού μοιράζονται ένα κοινό πρόδρομο κατά την βιοσύνθεσή τους. Πολλά στοιχεία τα τελευταία χρόνια, υποστηρίζουν τον ρόλο των πολυαμινών κατά την ρύθμιση της διαφοροποίησης (Bagni *et al.*, 1982, Galston and Kaur-Sawhney, 1990).

Οι απόψεις, όσον αφορά την αναγεννητική ικανότητα των πρωτοπλάστων είναι η θεώρηση ότι δεν είναι όλα τα φυτικά κύτταρα σε θέση να αναγεννηθούν, αλλά υπάρχουν "ικανά" κύτταρα, τα οποία διαθέτουν αυτορρυθμιζόμενο προγραμματισμό για αποδιαφοροποίηση, μιτωτική διαίρεση και διαφοροποίηση (Potrykus and Shillito, 1986) και κύτταρα, τα οποία έχουν ειδικευτεί τόσο πολύ κατά την εξέλιξη, ώστε οι διαφοροποιημένες λειτουργίες τους εμποδίζουν την έκφραση του ολοδυναμικού τους (Potrykus and Shillito, 1986). Το έναυσμα για την έναρξη του προγράμματος των "ικανών" κυττάρων δίνεται από τον τραυματισμό κατά την απομόνωση και ενισχύεται από τις ορμονικές μεταχειρίσεις (Meyer and Chartier, 1981, Potrykus and Shillito, 1986, Meyer *et al.*, 1993). Εναλλακτικά, υποστηρίζεται ότι όλα τα ζωντανά κύτταρα είναι δυνητικά ικανά να σχηματίσουν ένα ολοκληρωμένο οργανισμό ή με άλλα λόγια δεν υπάρχει κληρονομική ανικανότητα για αποδιαφοροποίηση και επανείσοδο στον κυτταρικό κύκλο (Hahne *et al.*, 1989), δεν υπάρχουν όμως, δεδομένα για τον τρόπο με τον οποίο επιτρέπεται η αυτοέκφραση αυτής της ιδιότητας. Στην πραγματικότητα, η ανικανότητα αναγέννησης των πρωτοπλαστών είναι μάλλον αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης όλων των προηγούμενων παραγόντων.

Ένα από τα βασικότερα σημεία της αναγεννητικής ικανότητας είναι όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αποδιαφοροποίηση των κυττάρων, η μετάβαση δηλαδή από την G₀ στην S φάση (διπλασιασμός χρωμοσωμάτων). Έχει δειχθεί ότι ο βασικός μηχανισμός ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου είναι πανοργανισμικά συντηρημένος (Inze *et al.*, 1993, Jacobs, 1993). Όπως και οι άλλοι οργανισμοί, τα φυτά φέρουν γονίδια *cdc2* (Ferreira *et al.*, 1991), κυκλινών (Hemerly *et al.*, 1992), φωσφατασών (Nitschke *et al.*, 1992), *cdc25*, αλλά η αναπτυσσιακή τους

ρύθμιση είναι ελάχιστα γνωστή. Μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπιστεί κανένα γονίδιο σχετικό με μίτωση, που να εκφράζεται στους πρωτοπλάστες. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι γονίδια, που ελέγχουν την μίτωση ή κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες απαραίτητες για μίτωση (πολυμεράσες, ιστόνες κ.τ.λ.), πρέπει να εκφράζονται στους πρωτοπλάστες κατά τον κυτταρικό κύκλο. Επειδή όμως ο χρόνος της πρώτης διαίρεσης, που σχετίζεται με την αποδιαφοροποίηση, διαρκεί πολύ χρόνο (για πρωτοπλάστες από μεσόφυλλο *Nicotiana tabacum*, η πρώτη διαίρεση των περισσότερων λαμβάνει χώρα την 4η-5η μέρα καλλιέργειας) σε σχέση με την 20-24 h διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των μεριστωματικών ή καλλιεργούμενων κυττάρων, φαίνεται ότι ένας μικρός αριθμός mRNAs που κωδικοποιούν μιτωτικές πρωτεΐνες, είναι ικανοποιητικός αλλά όχι ανιχνεύσιμος (Meyer *et al.*, 1993). Ακόμα ούτε το *pagA*-εξαρτούμενο από αυξίνη γονιδιακό προϊόν, φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με μίτωση (Takahashi and Nagata, 1992a, 1992b), αφού η επαγωγή του συνδέεται μεν χρονικά με την επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης (αρχή καλλιέργειας), όμως η μέχρι τώρα έρευνα για την λειτουργία του, δεν έχει προσφέρει πληροφορίες για την άμεση συσχέτισή του με τη μιτωτική δραστηριότητα (Meyer *et al.*, 1993).

Η αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση, η οποία είναι αίτιο/προϊόν της αποδιαφοροποίησης των πρωτοπλαστών, αφορά ένα πλήθος γονιδίων. Για παράδειγμα, τα πυρηνικά γονίδια που συνδέονται με την φωτοσύνθεση, υφίστανται οξεία καταστολή, ενώ τα χλωροπλαστικά mRNAs συνεχίζουν να εκφράζονται σε υψηλό ποσοστό, τουλάχιστον τις δύο πρώτες μέρες της καλλιέργειας (Lett *et al.*, 1980, Criqui *et al.*, 1992). Έχει παρατηρηθεί επαγωγή των mRNAς πρωτεϊνών σχετικών με παθογένεση, όπως της γλυκανάσης, της χιτινάσης και της ωσμωτίνης (Grosset *et al.*, 1990a, 1990b), εξτενσινών (Criqui *et al.*, 1992), της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (Criqui *et al.*, 1991), ανιονικών περοξειδασών (Criqui *et al.*, 1993), των ιστονών H3 και H4 (Takahashi *et al.*, 1989), θειοαναγωγασών (Meyer *et al.*, 1993), των ριβοσωμικών πρωτεϊνών RL2 (Marty and Meyer, 1992) και S4 (Meyer *et al.*, 1993) και του μεταφραστικού παράγοντα 1a (Meyer *et al.*, 1993). Επαγωγή

γονιδίων, σχετικών με αποδιαφοροποίηση, δεν είναι γνωστή. Με τις σημερινές πληροφορίες για την γονιδιακή έκφραση στους πρωτοπλάστες μεσοφύλλου, μπορεί να ειπωθεί ότι γονίδια σχετικά με την άμυνα και την κυτταροδιαίρεση εκφράζονται νωρίς και συνεχίζουν να εκφράζονται στους *in vitro* κάλλους, τουλάχιστον για τους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες, στους οποίους έχει βρεθεί ενεργή σύνθεση DNA, RNA και πρωτεϊνών (Grosset *et al.*, 1990a). Στους μη ικανούς για αναγέννηση πρωτοπλάστες υπάρχει σύνθεση DNA αλλά αυτοί είναι ανίκανοι να προχωρήσουν σε μίτωση (Μ φάση) (Wang *et al.*, 1989, Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1991). Έχει προταθεί ότι αυτή η ανικανότητα συνδέεται με αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση, η οποία ρυθμίζεται από ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές στο DNA. Μία τέτοια ποιοτική αλλαγή, η οποία μπορεί να εμπλέκεται στην ρύθμιση της μεταγραφής και της διαφοροποίησης, είναι η μεθυλίωση του DNA (Herburn *et al.*, 1987), αλλά συγκριτικά στοιχεία για ένα τέτοιο φαινόμενο μεταξύ αναγεννώμενων και μη πρωτοπλαστών δεν υπάρχουν.

Η ανικανότητα προς διαίρεση μπορεί να οφείλεται σε απλούστερα προβλήματα, όπως πχ. η λειτουργικότητα της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία είναι δυνατόν να χάσει την ακεραιότητα και την λειτουργικότητά της κατά την διαδικασία της απομόνωσης ή ακόμα και από την παρουσία ελεύθερων ριζών (Ishii, 1988). Συγκριτικές μελέτες σε αναγεννώμενους (*Nicotiana tabacum*) και μη (*Vitis vinifera*) πρωτοπλάστες, ως προς τα χαρακτηριστικά πρόσληψης σακχάρων και αμινοξέων έδειξαν ότι η λειτουργικότητα της μεμβράνης δεν επηρεάζεται από την απομόνωση και δεν μπορεί να συσχετιστεί με την αδυναμία αναγέννησης των πρωτοπλαστών (Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis, 1989, 1990), ούτε με την ανασύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και την λειτουργικότητα του κυτταροσκελετού αφού ανάλογες μελέτες δεν εμφάνισαν διαφορές στους δύο πληθυσμούς των πρωτοπλαστών (Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1992b).

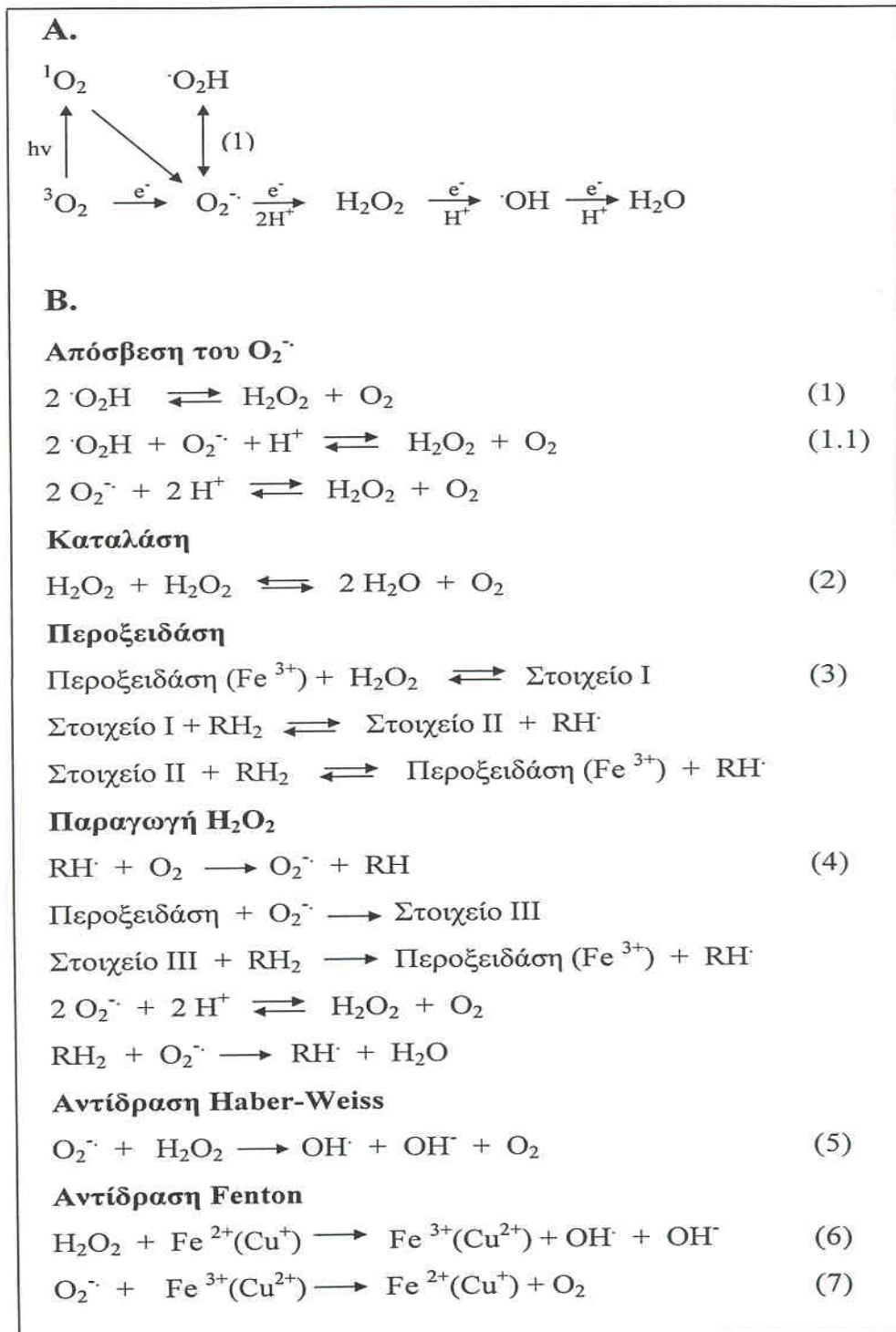
Ένας παράγοντας, που ίσως εμπλέκεται στην έλλειψη αναγεννητικής ικανότητας των πρωτοπλαστών, είναι η οξειδωτική καταπόνηση. Κατά την διάρκεια της απομόνωσης, οι πρωτοπλάστες υφίστανται διάφορες

καταπονήσεις όπως τραυματισμό, οσμωτική καταπόνηση και ενζυμική αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος, συνθήκες που επιτρέπουν την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (Ishii, 1988, Cutler *et al.*, 1991, Roubelakis-Angelakis, 1993). Η παρούσα εργασία διερευνά την πιθανότητα η έλλειψη αναγεννητικής ικανότητας των πρωτοπλαστών να σχετίζεται με την οξειδωτική καταπόνηση.

3. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ

3.1. Χημεία των ΕΜΟ

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ΕΜΟ) αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα διαδοχικών αναγωγών του οξυγόνου με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου. Στην βασική του κατάσταση (ground state), το οξυγόνο (O_2) είναι ένα μόριο τριπλής κατάστασης και σχετικά ανενεργό. Όταν, όμως, δεχθεί ένα ηλεκτρόνιο από μια ποικιλία αναγωγικών παραγόντων, παράγεται η υπεροξειδική ρίζα ($O_2^{\cdot-}$) σε μία αντίδραση που απαιτεί ενεργειακό κόστος. Στα ζωντανά κύτταρα, το $O_2^{\cdot-}$ βρίσκεται σε ισορροπία με την πρωτονιωμένη του μορφή, την υπερυδροξυλική ρίζα ($\cdot O_2H$), η οποία σχηματίζεται σε χαμηλό pH (Εικ. 1Α, αντίδραση 1) και είναι περισσότερο υδρόφιλη από το $O_2^{\cdot-}$ και μπορεί επομένως να διασχίζει πιο εύκολα το λιπιδιακό στρώμα των μεμβρανών. Σε φυσιολογικό pH, το $O_2^{\cdot-}$ δεν είναι πολύ ενεργό κατά των μακρομορίων του κυττάρου, όμως η ρίζα, πρωτονιωμένη ή όχι, όταν βρεθεί σε υδατικό, βασικό ή ελαφρώς όξινο περιβάλλον, μετατρέπεται σε H_2O_2 και O_2 , αυθόρμητα ή μέσω της καταλυτικής μεσολάβησης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) (Εικ. 1Β, αντίδραση 1). Η παραγωγή H_2O_2 μέσω της SOD πραγματοποιείται με 10-φορές ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με την αυθόρμητη μετατροπή. Η αντίδραση 1.1 στην Εικ. 1Β αντιπροσωπεύει την κύρια οδό απόσβεσης του $O_2^{\cdot-}$ στο κύτταρο (Lamb and Dixon, 1997).



Εικόνα 1. Α. Σχέση μεταξύ μοριακού οξυγόνου και των ΕΜΟ. Β. Χημικές αντιδράσεις κατά τις οποίες οι ΕΜΟ αποσβένονται ή αλληλομετατρέπονται (Wojtaszek, 1997). O_2 : μοριακό οξυγόνο, ${}^1\text{O}_2$: ενεργό οξυγόνο (singlet oxygen), $\text{O}_2^{\cdot-}$: υπεροξειδική ρίζα (superoxide), H_2O_2 : υπεροξείδιο του υδρογόνου (hydrogen peroxide), OH^{\cdot} : υδροξυλική ρίζα (hydroxyl radical), H_2O : νερό

Το H_2O_2 είναι σχετικά σταθερό μόριο και όντας ενδιάμεσα ενεργό και ηλεκτρικά ουδέτερο μπορεί εύκολα να περνά τις κυτταρικές μεμβράνες και να φτάνει μακριά από την θέση παραγωγής του. Στα φυτικά κύτταρα, το νεοσυνθεμένο H_2O_2 μπορεί 1) να σχηματίσει νερό και μοριακό οξυγόνο αυθόρμητα ή μέσω της καταλυτικής μεσολάβησης της καταλάσης (Εικ. 1B, αντίδραση 2), 2) να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα διαφόρων περοξειδασών, όπως γενικές περοξειδάσες, ασκορβική περοξειδάση ή περοξειδάση της γλουταθειόνης, και να οδηγήσει για παράδειγμα, στην παραγωγή φαινοξυλικών ριζών κατά την σύνθεση της λιγνίνης (Εικ. 1B, αντίδραση 3) ή 3) να αποσβεστεί κατά τον κύκλο Halliwell-Asada (Εικ. 1). Σε κατάλληλες συνθήκες και παρουσία αναγωγικών, το H_2O_2 μπορεί να παραχθεί από περοξειδάσες σε μια σειρά αντιδράσεων, που εμπλέκουν τον σχηματισμό του Στοιχείου III (Εικ. 1B, αντίδραση 4) (Gross *et al.*, 1977, Halliwell, 1978a).

Η υδροξυλική ρίζα είναι από τις πλέον ενεργές EMO και μπορεί να σχηματιστεί κατά την άμεση αντίδραση μεταξύ $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 (Αντίδραση Haber-Weiss, Εικ. 1B, αντίδραση 5). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η αντίδραση αυτή εξελίσσεται με πολύ αργό ρυθμό και είναι ανεπαρκής για την συσσώρευση σημαντικών ποσοτήτων OH^{\cdot} . Αντίθετα, σημαντικά επίπεδα μπορούν να σχηματιστούν μέσω κυκλικών αντιδράσεων που εμπλέκουν οξείδωση μετάλλων όπως Fe^{2+} και Cu^+ (Αντίδραση Fenton, Εικ. 1B, αντίδραση 6) και επακόλουθη αναγέννηση των οξειδωμένων ιόντων στην αναγμένη τους μορφή μέσω της αντίδρασης με το $O_2^{\cdot-}$ (Εικ. 1B, αντίδραση 7). Καθώς τα μεταβατικά μέταλλα δρουν ως καταλύτες, η τοπολογία και η ευκολία ή όχι προσέγγισής τους είναι πιθανώς οι σημαντικότεροι παράγοντες, που ελέγχουν την θέση παραγωγής του OH^{\cdot} (Wojtaszek, 1997). Η υδροξυλική ρίζα, με την ικανότητά της να ξεκινά αλυσίδα αντιδράσεων παραγωγής EMO, θεωρείται η κυρίως υπεύθυνη EMO για τις μη αντιστρεπτές και καταστροφικές τροποποιήσεις των κυτταρικών μακρομορίων και οργανιδίων. Καθώς ο χρόνος ημιζωής της είναι 10^{-9} s, δεν έχει επιτευχθεί η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός του ρόλου της στις καταπονήσεις ή τις σχέσεις φυτών-παθογόνων (Sutherland, 1991).

Τα προηγούμενα παράγωγα επίσης σχηματίζονται φυσιολογικά στο κύτταρο. Γενικά, το O_2^- παράγεται κατά την μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, κατά την φωτοσύνθεση στους χλωροπλάστες και ως παραπροϊόν δράσης ενζύμων (xanthine oxidase, aldehyde oxidase, flavin dehydrogenases) (Eltner, 1982, Fridovitch, 1986). Το H_2O_2 μπορεί να παραχθεί κατά την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων στα μικροσώματα και την φωτοαναπνοή στα υπεροξεισώματα (Eltner, 1982, Asada, 1994), ή από την δράση της οξειδάσης της διαμίνης (DAO) και των πολυαμινών (PAO) στον αποπλάστη, όπου η παροχή H_2O_2 εξασφαλίζει την ικανοποιητική λιγνιτοποίηση του κυτταρικού τοιχώματος (Smith, 1985a, Angelini and Federico, 1989, Angelini *et al.*, 1990). Όμως, η συσσώρευση των EMO αυξάνεται από τις βιοτικές ή αβιοτικές καταπονήσεις, όπως κατά την έκθεση του φυτού σε UV-φως, ζιζανιοκτόνα (paraquat, diquat), παθογόνα, ατμοσφαιρικές μολύνσεις (όζον), ακραίες θερμοκρασίες και υδατική καταπόνηση (Sutherland, 1991, Bowler *et al.*, 1992).

3.2. Συστήματα παραγωγής EMO

Η μελέτη του/των μηχανισμού/μηχανισμών σύνθεσης των EMO αποτελεί θέμα αιχμής στην διεθνή έρευνα (Sutherland, 1991, Low and Merida, 1996, Wojtaszek, 1997). Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα με πλέον ισχύοντα το σύστημα της NADPH οξειδάσης, ανάλογο με των ουδετερόφιλων κυττάρων των θηλαστικών και το μοντέλο των εξωκυτταρικών περοξειδασών.

Η NAD(P)H οξειδάση στα θηλαστικά αποτελείται από πρωτεΐνες συνδεδεμένες στην μεμβράνη και κυτοπλασματικές πρωτεΐνες. Στο κέντρο της NADPH-οξειδάσης υπάρχει το ετεροδιμερές φλαβοκυτόχρωμα b_{558} , στο οποίο δεσμεύεται το NADPH και το οποίο αποτελείται από την γλυκοσυλιωμένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη $gp91^{phox}$ και την μη γλυκοσυλιωμένη υπομονάδα $p22^{phox}$. Το φλαβοκυτόχρωμα φέρει ολόκληρη την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADPH στο οξυγόνο. Κατά την ενεργοποίηση του ενζύμου, ένα μόριο-διεγέρτης αναγνωρίζεται από τον κατάλληλο μεμβρανικό υποδοχέα, οπότε ξεκινάει ένας καταρράκτης σηματοδοτήσεων, όπου οι

κυτοπλασμικές πρωτεΐνες p47^{phox} και p67^{phox} φωσφορυλιώνονται και μετατοπίζονται, μαζί με το p40^{phox} και το p21^{rac}, στην μεμβράνη, για να σχηματίσουν τελικά το ενεργό σύμπλοκο της NADPH οξειδάσης (Segal and Abo, 1993).

Το σύμπλοκο της NAD(P)H οξειδάσης δεν έχει απομονωθεί ακόμα από φυτικά κύτταρα, η παρουσία του όμως υποστηρίζεται από φαρμακολογικά και ανοσολογικά πειράματα και στοιχεία ανασύστασης (Doke, 1983, Doke and Ohashi, 1988, Auh and Murphy, 1995, Doke and Miura, 1995, Desikan *et al.*, 1996). Η ενεργότητα της φυτικής NAD(P)H οξειδάσης αναστέλλεται από το διφαινυλικό ιοδόνιο (diphenylene iodonium, DPI), γνωστό αναστολέα της θηλαστικής μεμβρανικής οξειδάσης (Levine *et al.*, 1994, Auh and Murphy, 1995, Jabs *et al.*, 1997). Ειδικότερα, τα αντισώματα εναντίον συστατικών της NADPH οξειδάσης των θηλαστικών αλληλεπιδρούν με πολυπεπίδια παρόμοιας μοριακής μάζας στα φυτά (Xing *et al.*, 1997, Desikan *et al.*, 1996). Επιπλέον, έχουν χαρακτηριστεί κλώνοι από το ρύζι (Groom *et al.*, 1996) και την *Arabidopsis* (Keller *et al.*, 1998), οι οποίοι παρουσιάζουν ομολογία με δομικά στοιχεία της θηλαστικής NADPH οξειδάσης.

Η παραγωγή H₂O₂ από περοξειδάσες είχε αρχικά αναφερθεί κατά την λιγνιτοποίηση (Gross *et al.*, 1977, Elstner and Heupel, 1978, Halliwell, 1978a). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το O₂⁻ σχηματίζεται σε ένα πολύπλοκο κύκλο, που εμπλέκει εξωκυτταρικά ένζυμα, την μαλική αφυδρογονάση και την περοξειδάση, και η παροχή αναγωγικών στοιχείων γίνεται από τον κύκλο μαλικού-οξαλοξικού της κυτταρικής μεμβράνης. Το μοντέλο αυτό φαίνεται να ισχύει για την παραγωγή H₂O₂ από καλλιέργεια κυττάρων τριανταφυλλιάς κατά την επίδραση ακτινοβολίας UV-C (Murphy and Huerta, 1990). Ένα εναλλακτικό μοντέλο προτάθηκε για την γένεση του αποπλαστικού H₂O₂ από μια κυτταροτοιχωματική περοξειδάση (Bolwell *et al.*, 1995). Αντίθετα με το μοντέλο της NADPH οξειδάσης, το οποίο εξαίρει την σημασία των γεγονότων σηματοδότησης για την ενεργοποίηση του ενζύμου, το μοντέλο αυτό δίνει έμφαση σε προϋπάρχοντα εξωκυτταρικά στοιχεία. Σύμφωνα με το μοντέλο, ένας διεγέρτης φτάνοντας στην επιφάνεια του κυττάρου αναγνωρίζεται από τον

κατάλληλο υποδοχέα, γεγονός που ενεργοποιεί τα κανάλια ιόντων, οπότε η μετακίνηση ιόντων (Ca^{2+} , K^+ , H^+) αλκαλοποιεί παροδικά τον αποπλάστη και ενεργοποιεί έτσι την εξαρτώμενη από το pH-περοξειδάση. Η αλλαγή στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, οδηγεί στον σχηματισμό του Στοιχείου III ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O-O}$) και ακολούθως στην γένεση O_2^- , το οποίο μπορεί αρχικά να αναχθεί κατά την οξειδωση της κυστεΐνης, που βρίσκεται στην αίμη, ενώ με την παροχή αναγωγικού, η παραγωγή H_2O_2 μπορεί να διατηρηθεί για αρκετό χρόνο (Bolwell *et al.*, 1995). Το μοντέλο προτάθηκε για την παραγωγή H_2O_2 από αιωρούμενα κύτταρα φασολιού κατά την επίδραση τμημάτων κυτταρικού τοιχώματος του *Colletotrichum lindemuthianum*, και η ισχύς του έχει υποστηριχθεί από *in vitro* αλληλεπιδράσεις (Wojtaszek, 1997).

Ένα ενδιάμεσο μοντέλο εμπλέκει τον συνδυασμό των προηγούμενων δύο: κατά την αναγνώριση ενός διεγέρτη από τον κατάλληλο υποδοχέα, επάγεται το μονοπάτι σηματοδότησης και ενεργοποιείται τελικά η NADPH οξειδάση. Τα κανάλια των ιόντων ενεργοποιούνται επίσης και ο αποπλάστης αλκαλοποιείται, ενώ το O_2^- πρωτονιώνεται καταναλώνοντας πρωτόνια από το χυμοτόπιο. Στα φυτά αυτή η διαδικασία θα μπορούσε να συμβάλει στην αλκαλοποίηση του αποπλάστη ανεβάζοντας το pH στο 7-8 και ενεργοποιώντας τελικά, με συντονισμένη δράση των καναλιών ιόντων και της NADPH οξειδάσης, την εξαρτώμενη από pH-περοξειδάση και την παραγωγή του H_2O_2 με την συμμετοχή αταυτοποίητων ακόμα, αναγωγικών στοιχείων (Wojtaszek, 1997). Η παραγωγή EMO κατά την οξειδωτική καταπόνηση τερματίζει ως εξής: η μεταφορά ηλεκτρονίων και η επακόλουθη παραγωγή O_2^- από την NADPH οξειδάση συνοδεύεται από έξοδο πρωτονίων μέσω καναλιών H^+ , το άνοιγμα των οποίων πραγματοποιείται πριν την ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης. Τα κανάλια αυτά παρέχουν H^+ για την πρωτονίωση του O_2^- και τελικά οξειδοποιούν τον αποπλάστη τερματίζοντας την ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης και της περοξειδάσης. Η ύπαρξη μεμβρανικών H^+ -ΑΤΡασών, επαγόμενων από διεγέρτες έχει περιγραφεί σε φυτά (Xing *et al.*, 1997).

Το σύστημα της οξαλικής οξειδάσης, που είναι μια εξωκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη, γνωστή και ως γερμίνη (germin), και ελευθερώνει H₂O₂ και CO₂ από το οξαλικό οξύ, δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένο, όσον αφορά την πρωτεΐνη και το υπόστρωμα, αποτελεί όμως το πρώτο παράδειγμα ενεργοποίησης ενός συστήματος παραγωγής H₂O₂ κατά την γενική απόκριση σε παθογόνα, χωρίς πιθανώς να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα (Wojtaszek, 1997). Η λιποξυγενάση, έχει προταθεί ως άλλη πηγή EMO κατά την οξειδωτική καταπόνηση, όμως πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η παραγωγή EMO προηγείται της ενεργοποίησης του ενζύμου (Baker and Orlandi, 1995).

Από τα παραπάνω ενισχύεται ότι είναι πιθανό διάφορα συστήματα να παράγουν EMO με διαφορετικούς μηχανισμούς, έχουν διαφορετική τοπολογία, χρησιμοποιούν διαφορετικά υποστρώματα και έχουν διαφορετική ευαισθησία στους αναστολείς (Murphy *et al.*, 1998). Στα επιδερμικά κύτταρα καπνού, έχουν περιγραφεί δύο διαφορετικές πηγές EMO, ένα σύστημα οξειδάσης και μία ενεργότητα περοξειδάσης (Allan and Fluhr, 1997). Στα κύτταρα τριανταφυλλιάς, το H₂O₂ παράγεται από μια κυτοπλασματική NAD(P)H οξειδάση, ενώ στο φασόλι, το H₂O₂ προέρχεται κατευθείαν από την δράση κυτταροτοξωματικών περοξειδασών (Bolwell *et al.*, 1998). Έτσι πιθανές πηγές EMO είναι ποικίλα ενζυμικά συστήματα, οπότε η ταυτοποίηση του μηχανισμού παραγωγής EMO παραμένει πραγματική πρόκληση (Murphy *et al.*, 1998).

3.3. Λειτουργίες των EMO

Παρά την αναγκαιότητα του οξυγόνου για την υποστήριξη της ίδιας της ζωής, η τοξικότητα του είναι γεγονός για την αερόβια ζωή και μπορεί να προκαλεί θανατηφόρες καταστροφές (Eltner, 1982). Όλες οι EMO είναι τοξικές για όλους τους οργανισμούς, αφού μπορούν να αντιδράσουν με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και να προκαλέσουν περοξειδωση βασικών μεμβρανικών λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης ή ενδοκυτταρικών οργανιδίων. Οι περοξειδωτικές καταστροφές στην κυτταρική μεμβράνη οδηγούν σε διαρροή των κυτταρικών συστατικών και τελικά σε κυτταρικό

θάνατο, ενώ αντίστοιχες καταστροφές σε μεμβράνες υποκυτταρικών οργανιδίων μπορούν να επηρεάσουν την αναπνευστική ενεργότητα στα μιτοχόνδρια, να προκαλέσουν βλάβες στις χρωστικές και απώλεια της μεταβολικής ενεργότητας των χλωροπλαστών (Scandalios, 1993). Ακόμα, πολλά ένζυμα του κύκλου Calvin στους χλωροπλάστες είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στο H_2O_2 και υψηλά επίπεδα H_2O_2 αναστέλλουν άμεσα την αφομοίωση του CO_2 (Kaiser, 1976), ενώ, σε συνδυασμό με κάποιες οξειδάσες, «σημαίνουν» ένζυμα για πρωτεόλυση (Scandalios, 1993). Η εξαιρετικά ενεργή υδροξυλική ρίζα αντιδρά με όλα τα μακρομόρια του κυττάρου, προκαλώντας σοβαρές βλάβες στα κυτταρικά συστατικά, ελλείψεις και μεταλλαγές στο DNA και τελικά μη αντιστρεπτές μεταβολικές δυσλειτουργίες και κυτταρικό θάνατο (Scandalios, 1993).

Οι πρώτοι ερευνητές, που μελέτησαν την σύνθεση του H_2O_2 κατά την απόκριση των φυτών σε παθογόνα ή σε διεγέρτες παθογόνων, υπέθεσαν ότι το H_2O_2 χρησιμοποιείται στην άμυνα του φυτού, καθώς μπορεί να σκοτώσει το παθογόνο ή να περιορίσει την διάδοσή του, σκοτώνοντας τα φυτικά κύτταρα στην περιοχή της μόλυνσης (Baker and Orlandi, 1995). Υπάρχουν ανοικτά ερωτήματα για το αν η συγκέντρωση του H_2O_2 , που παράγεται κατά την οξειδωτική καταπόνηση (10-100 μM) στο μέσο καλλιέργειας φυτικών κυττάρων, είναι ικανή να σκοτώσει το παθογόνο ή το φυτικό κύτταρο. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου η μόλυνση με παθογόνο συνοδεύεται από παραγωγή EMO, όχι όμως και από τον θάνατο του φυτικού κυττάρου (Glazener *et al.*, 1996). Άλλοι ερευνητές παρουσίασαν μεγαλύτερη συσσώρευση H_2O_2 (πάνω από 1,2 mM) (Legengre *et al.*, 1993), όμως ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (5-20 μM) το H_2O_2 αναστέλλει βλάστηση των σπορίων των παθογόνων μυκήτων και ακόμα χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,05-0,1 μM) αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων (Murphy *et al.*, 1998). Επίσης, τόσο το H_2O_2 , όσο και το O_2^- εκτός του ότι δρουν άμεσα ως αντιμικροβιακοί παράγοντες, ίσως διαδραματίζουν ρόλο σήματος κατά την επαγωγή μηχανισμών άμυνας (Levine *et al.*, 1994, Jabs *et al.*, 1997).

Το H_2O_2 μπορεί να έχει θετικό ρόλο στην αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών και ακόμα να συμμετέχει στην άμυνα των φυτών κατά των παθογόνων, μέσω της συμμετοχής του σε αντιδράσεις, που σχηματίζουν ή ενισχύουν το κυτταρικό τοίχωμα, όπως σε αντιδράσεις που καταλύονται από αποπλαστικές περοξειδάσες και παράγουν EMO για την αλληλοσύνδεση κυτταροτοιχωματικών πρωτεϊνών, πολυφαινολικών και κουτίνης (Tenhaken *et al.*, 1995). Το H_2O_2 συμμετέχει στην επαγωγή των γονιδίων άμυνας, όπως της περοξειδάσης και της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, στην διέγερση της παραγωγής φυτοαλεξινών, στην εξέλιξη της αντίδρασης υπερευαισθησίας και πιθανώς στην διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα (systemic acquired resistance), υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι «ορχηστρώνει» την απόκριση των φυτών στα παθογόνα (Law *et al.*, 1983). Η περοξειδίωση των μεμβρανικών λιπιδίων που οδηγεί σε δυσλειτουργία των μεμβρανών, έχει σχετιστεί με την συμμετοχή των EMO στην αντίδραση υπερευαισθησίας (Keppler and Baker, 1989), αλλά και με την παραγωγή ζασμονικού οξέος που μπορεί να ελέγχει την έκφραση γονιδίων σχετικών με την άμυνα του φυτού (Mehdy, 1994).

Έχει αναφερθεί ότι οι EMO αποτελούν γενικό έναυσμα για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, που συμβαίνει κατά την ανάπτυξη των φυτών ή/και κατά την απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Κατά την αντίδραση υπερευαισθησίας, έχει παρατηρηθεί άμεση και μαζική παραγωγή EMO, καθώς και ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης (Mehdy, 1994, Xing *et al.*, 1997). Η παραγωγή των EMO και/ή άλλων μορίων, όπως το αιθυλένιο, ρυθμίζεται σε υποκυτταρικό επίπεδο σε συνδυασμό πιθανώς με την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, οπότε με τον τρόπο αυτό ελέγχεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Pennel and Lamb, 1997).

3.4 Αντιοξειδωτική άμυνα των φυτών

Οι στόχοι των ενεργών ελεύθερων ριζών του οξυγόνου και κυρίως της υδροξυλικής ρίζας, είναι τα λιπίδια (περοξειδίωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων των μεμβρανών), οι πρωτεΐνες (αποδόμηση ενζύμων), οι υδατάνθρακες (διάσπαση πολυσακχαριτών), τα νουκλειικά οξέα (αποχωρισμός των ελίκων,

σπασίματα σε χρωματίδες, μεταλλαγές), με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (Fridovitch, 1986). Για την αντιμετώπιση των καταστροφικών αυτών αποτελεσμάτων τα αερόβια κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα ευρύ φάσμα στρατηγικών, οι οποίες βασίζονται σε άμεση απόσβεση των ελεύθερων ριζών από φυσικά μόρια, όπως το ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη, η κυστεΐνη, οι υδροξυκινόνες, η μανιτόλη, η τοκοφερόλη, τα φλαβονοειδή, κάποια αλκαλοειδή και το β καροτένιο (Larson, 1988, Noctor and Foyer, 1998a) ή/και με ενζυμικές αντιδράσεις (Scandalios, 1993, Foyer *et al.*, 1994).

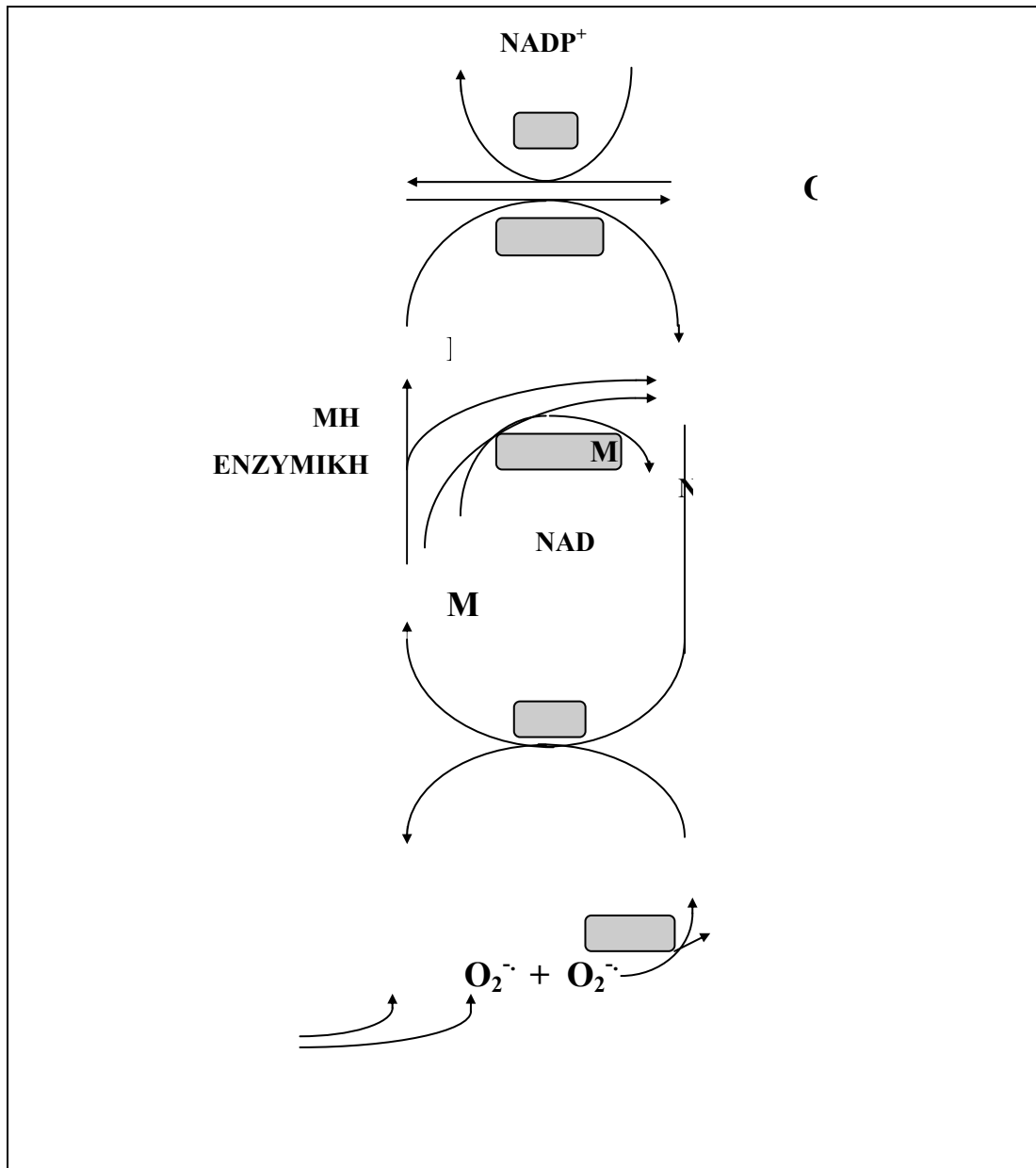
Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα φαίνονται στον Πίνακα 1. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι οποίες βασίζονται σε παροχή ηλεκτρονίων από αναγωγικούς παράγοντες χαμηλού μοριακού βάρους. Η υπεροξειδική δισμουτάση ($O_2^{\cdot-}:O_2^{\cdot-}$ δισμουτάση) είναι ο πρώτος κρίκος στην αλυσίδα των ενζυμικών συστημάτων

Πίνακας 2.1. Κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα.

Ένζυμο	Συντόμηση
Υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, EC 1.15.1.1)	SOD
Ασκορβική περοξειδάση (ascorbate peroxidase, EC 1.11.1.11)	APO
Αναγωγή του μονοδιυδροασκορβικού (monodehydroascorbate reductase, EC 1.6.5.4)	MDHAR
Αναγωγή του διυδροασκορβικού (dihydroascorbate reductase, EC 1.8.5.1)	DHAR
Αναγωγή της γλουταθειόνης (glutathione reductase, EC 1.6.4.2)	GR
Κατάλυση (catalase, EC 1.11.1.6)	CAT
Περοξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, EC 1.11.1.9)	GS-POX
Περοξειδάση (peroxidase, EC 1.11.1.7)	POX

των κυττάρων στη διαδικασία αποτοξίνωσης και μετατρέπει το O_2^- σε H_2O_2 (Scandalios, 1993). Το H_2O_2 στην συνέχεια ανάγεται σε H_2O από καταλάσες ή από την ασκορβική περοξειδάση (APO), όμως η καταλάση έχει μικρή συγγένεια για το υπόστρωμα σε αντίθεση με την APO (Foyer and Halliwell, 1976, Asada, 1992a, Alscher *et al.*, 1997, Noctor and Foyer, 1998a). Η APO χρησιμοποιεί δύο μόρια ασκορβικού (ASA) και ανάγει το H_2O_2 σε νερό, με επακόλουθη γένεση δύο μορίων μονοδιυδροασκορβικού (MDHA). Το MDHA είναι μια ρίζα με μικρή ημιζωή, οπότε αν δεν αναχθεί αμέσως, μετατρέπεται σε ασκορβικό και διυδροασκορβικό (DHA). Μέσα στο κύτταρο, το MDHA μπορεί να αναχθεί κατευθείαν σε ασκορβικό και ως δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγή αυτή μπορεί να είναι b-τύπου κυτόχρωμα, αναγμένη φερεδοξίνη ή NAD(P)H (Noctor and Foyer, 1998a). Η τελευταία αντίδραση καταλύεται από αναγωγάσες του μονοδιυδροασκορβικού (MDHAR), οι οποίες υπάρχουν σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα. Το DHA ανάγεται σε ασκορβικό από την αναγωγή του διυδροασκορβικού (dehydroascorbate reductase, DHAR), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα αναγμένη γλουταθειόνη (GSH) (Foyer and Halliwell, 1976). Η αντίδραση αυτή παράγει οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), η οποία με την σειρά της ανάγεται από το NADPH σε μια αντίδραση που καταλύεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).

Η απομάκρυνση του H_2O_2 μέσω της προηγούμενης σειράς αντιδράσεων είναι γνωστή ως κύκλος ασκορβικού-γλουταθειόνης ή Halliwell-Asada (Εικ. 2). Η συμμετοχή του MDHA προτάθηκε από τον Asada (Asada, 1994), σύμφωνα με τον οποίο η άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων στο MDHA, μαζί με την NADPH-εξαρτώμενη αναγωγή, που καταλύεται από την MDHAR, είναι η κύρια οδός αναγέννησης του ASA στους χλωροπλάστες και η αναγέννηση μέσω της GSH είναι λιγότερο σημαντική. Η ομάδα Foyer *et al.* (Foyer and Halliwell, 1976, Foyer *et al.*, 1991, 1994, 1997) υποστηρίζει ότι ο κύκλος ασκορβικού-γλουταθειόνης έχει σημαντικότερη συμμετοχή στο μέγεθος και την οξειδοαναγωγική κατάσταση του ασκορβικού.



Εικόνα 2. Το μονοπάτι Halliwell-Asada.

3.4.1. Φυσικά αντιοξειδωτικά

α. Ασκορβικό οξύ

Όλα τα φυτά και σχεδόν όλα τα ζώα συνθέτουν ασκορβικό. Στα φυτά, το ασκορβικό συσσωρεύεται σε mM συγκεντρώσεις σε φωτοσυνθετικούς και μη ιστούς (Foyer *et al.*, 1983). Τα φύλλα περιέχουν περισσότερο ασκορβικό από χλωροφύλλη, με το ασκορβικό να αντιπροσωπεύει το 10% των διαλυτών

υδατανθράκων. Το ασκορβικό συνθέτεται μάλλον στο κυτόπλασμα όπου η συγκέντρωσή του κυμαίνεται από 20 έως 50 mM και μεταφέρεται στους χλωροπλάστες με υποβοηθούμενη διάχυση (Anderson *et al.*, 1983). Αναγέννηση του ασκορβικού από το DHA, φαίνεται να συμβαίνει σε όλα σχεδόν τα κυτταρικά οργανίδια, ίσως ακόμα και στον αποπλάστη, όπου η γλουταθειόνη ή δεν υπάρχει ή η συγκέντρωσή της είναι πολύ χαμηλή (Noctor and Foyer, 1998a). Αν το DHA δεν αναχθεί αμέσως σε ASA, καταβολίζεται σε προϊόντα δύο- και τεσσάρων- ανθράκων όπως, το οξαλικό και το ταρταρικό, τα οποία συσσωρεύονται σε υψηλά επίπεδα (Loewus, 1988).

Έχουν περιγραφεί πολλές λειτουργίες για το ασκορβικό: Πρώτον, είναι το βασικό πρωτογενές αντιοξειδωτικό, το οποίο αντιδρά άμεσα με την ρίζα υδροξυλίου (OH), την υπεροξειδική ρίζα ($O_2^{\cdot-}$) και την φυσιολογικώς αναγμένη μορφή του οξυγόνου (1O_2) (Nijs and Kelley, 1991). Δεύτερον, έχει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ενεργότητας ενζύμων, που περιέχουν προσθετικά ιόντα μετάλλων, και τρίτον είναι ισχυρό δευτερογενές αντιοξειδωτικό, καθώς ανάγει την α -τοκοφερόλη (Radh, 1990).

Το ασκορβικό συμμετέχει ακόμη, ως αναγωγικό, κατά την βιοσύνθεση της εξτενσίνης (Liso *et al.*, 1985) και εμπλέκεται στην επιμήκυνση των ριζών και στην επέκταση του κυτταρικού τοιχώματος (Takahama, 1993, Arrigoni, 1994, Takahama and Oniki, 1994, Noctor and Foyer, 1998a). Κατά την λιγνιτοποίηση, ένα ευρύ φάσμα αρωματικών και φαινολικών στοιχείων οξειδώνονται από ενεργότητα λακάσης ή περοξειδάσης, χρησιμοποιώντας εξωκυτταρικό H_2O_2 , το ασκορβικό οξύ όμως, μπορεί να παρεμποδίσει ολοσχερώς τις οξειδώσεις αυτές, ακόμα και σε χαμηλή συγκέντρωση, αφού οι φαινοξυλικές ρίζες αντιδρούν πολύ γρηγορότερα με το ασκορβικό παρά μεταξύ τους (Takahashi *et al.*, 1989, Takahashi and Nagata, 1992a). Το αποπλαστικό ασκορβικό οξύ θεωρείται επίσης σημαντικά κρίσιμο για την απόσβεση των EMO, ιδιαίτερα εκείνων που παράγονται από έκθεση σε ατμοσφαιρικά ρυπογόνα (Luwe *et al.*, 1993, Walker and McKersie, 1993). Το ασκορβικό εμπλέκεται ακόμα στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Kerk and Feldman, 1995). Όταν το ασκορβικό των μεριστωμάτων ελαττώνεται, τα

κύτταρα παραμένουν στην G1 φάση. Η παραμονή αυτή παρατηρείται και κατά το οξειδωτικό στρες, γεγονός που εμποδίζει την αντιγραφή του κατεστραμμένου DNA και σχετίζεται με μειωμένη αναλογία ASA προς DHA. Έτσι, το ενδοκυτταρικό ασκορβικό μπορεί να επηρεάσει την αντιγραφή του DNA, ενώ το αποπλαστικό ασκορβικό μπορεί να ρυθμίσει την επέκταση του κυτταρικού τοιχώματος και την επιμήκυνση των κυττάρων.

Το οξειδοαναγωγικό σύστημα του ασκορβικού αποτελείται από L-ασκορβικό οξύ, MDHA και DHA. Οι οξειδωμένες μορφές είναι σχετικά ασταθείς σε υδατικό περιβάλλον. Παρά το ότι το DHA ανάγεται χημικά από την GSH σε ASA, ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση αυτή, όπως η DHAR, έχουν απομονωθεί από ρύζι, σπανάκι και πατάτα (Foyer and Halliwell, 1976, Hossain and Asada, 1984, Diprieno and Borroncino, 1991, Kato *et al.*, 1997). Στοιχεία, που υποστηρίζουν τον σημαντικό ρόλο της DHAR, της GSH και της GR στη διατήρηση του ασκορβικού, έχουν προκύψει από μετασηματισμένα φυτά, που υπερεκφράζουν την GR και παρουσιάζουν υψηλότερη ενδογενή συγκέντρωση ασκορβικού και βελτιωμένη ανθεκτικότητα στην οξειδωτική καταπόνηση (Foyer *et al.*, 1991, Aono *et al.*, 1993, Foyer *et al.*, 1995). Αντίστροφα, μειωμένη ενεργότητα της GR οδηγεί σε μεγαλύτερη ευαισθησία στη καταπόνηση (Aono *et al.*, 1995). Σε καταστάσεις έντονης οξειδωτικής καταπόνησης, και κυρίως φωτοοξειδώσεων, το απόθεμα του ασκορβικού μπορεί να καταστραφεί, όταν το σύστημα αναγέννησης δεν είναι ικανοποιητικά λειτουργικό ή ξεπεράσει τις δυνατότητες του (Smirnoff and Pallanca, 1996). Σε φυλλικούς δίσκους από *Cucumis sativus*, ένα ευαίσθητο σε ψύξη φυτικό είδος, παρατηρήθηκε απώλεια του ασκορβικού κατά την έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία (Wise and Naylor, 1987), ενώ αντίθετα, στο ανθεκτικό στην ψύξη *Pisum sativum*, το απόθεμα του ασκορβικού δεν επηρεάστηκε (Wise and Naylor, 1987). Η χρήση παρακουάτ προκάλεσε άμεση εξαφάνιση του ASA, χωρίς αντίστοιχη αύξηση του DHA, υποδεικνύοντας ότι το DHA καταστρέφεται και χάνεται από το ολικό απόθεμα του ασκορβικού (Law *et al.*, 1983).

β. Γλουταθειόνη

Τα φυτικά κύτταρα περιέχουν σημαντικές ποσότητες μη πρωτεϊνικών θειολών, οι οποίες εμπλέκονται σε πολλές μοριακές, μεταβολικές και φυσιολογικές λειτουργίες μέσω αντιδράσεων ανταλλαγής θειολών/δισουλφιδίων (Kunert and Foyer, 1993). Οι θειόλες είναι σημαντικά αντιοξειδωτικά και εμπλέκονται στην σύνθεση DNA και πρωτεϊνών, όπως και στην ενεργοποίηση και απενεργοποίηση ενζύμων. Η γλουταθειόνη (L-γ - glutamyl- L-cysteinyl-glycine; GSH), είναι το σημαντικότερο μικρού μοριακού βάρους, θειολικό στοιχείο στα φυτά (Alscher, 1989, Kunert and Foyer, 1993). Η φυσιολογική σημασία της γλουταθειόνης μπορεί να συνοψιστεί σε δύο κατευθύνσεις: τον μεταβολισμό του θείου και την άμυνα. Η αναγμένη γλουταθειόνη (GSH) ρυθμίζει την πρόσληψη του θείου σε ριζικό επίπεδο (Herschbach and Rennenberg, 1994). Χρησιμοποιείται από την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) στην αποτοξίνωση ξενοβιοτικών παραγόντων (Marrs, 1996) και ως πρόδρομο μόριο της σύνθεσης φυτοχηλατινών, μόρια τα οποία έχουν κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων (Chen and Goldborough, 1994).

Βιβλιογραφικά στοιχεία υποστηρίζουν τον βασικό ρόλο της γλουταθειόνης στην άμυνα των φυτών ως άμεσου αντιοξειδωτικού και αναγωγικού για το DHA και ως οξειδοαναγωγικού ρυθμιστικού (Alscher, 1989, Kunert and Foyer, 1993). Λειτουργεί ως επαγωγέας των γονιδίων άμυνας (Wingate *et al.*, 1988) και εμπλέκεται στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης (May *et al.*, 1998).

Σε κανονικές συνθήκες, η γλουταθειόνη βρίσκεται κυρίως στην αναγμένη της μορφή, η οποία αντιστοιχεί στο 90-95% της ολικής ποσότητας της γλουταθειόνης. Σε κάποιους ιστούς και σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης, η συγκέντρωση της γλουταθειόνης μπορεί να είναι πολύ χαμηλή, όμως τα φύλλα περιέχουν πάνω από 10 mM γλουταθειόνης στους χλωροπλάστες και στο κυτόπλασμα (Foyer *et al.*, 1994, Noctor *et al.*, 1998b). Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της δισουλφιδικής γλουταθειόνης (GSSG) μπορεί να αυξηθεί σε έντονες καταπονήσεις (Strid, 1993). Η ολική γλουταθειόνη μειώθηκε δραστικά κατά την έκθεση σε UV ακτινοβολία και αυξήθηκε η GSSG, σε βάρος της

GSH (Strid *et al.*, 1994).

Έχει προταθεί ότι η απενεργοποίηση ενζύμων από την GSSG είναι ζωτικής σημασίας για την επαναρύθμιση της μεταβολικής ροής σε καταστάσεις έντονης οξειδωτικής καταπόνησης (Del Corso *et al.*, 1994). Η απενεργοποίηση ενζύμων από την GSSG μπορεί να αποφευχθεί από την υψηλή αναλογία GSH/GSSG. Αν η προηγούμενη αναλογία μειωθεί, ως αποτέλεσμα καταπόνησης, ο μεταβολισμός των φύλλων και ειδικά η φωτοσυνθετική αφομοίωση του CO₂, εξασθενίζει σοβαρά. Υπάρχουν όμως και ένζυμα, που ενεργοποιούνται από την GSSG. Ο σχηματισμός της GSSG είναι ένα ερέθισμα για την διακλάδωση της μονοφωσφορικής εξόζης και αποτελεί ένδειξη της παρουσίας οξειδωτικής καταπόνησης (Foyer *et al.*, 1997). Η *in vitro* πρωτεϊνοσύνθεση αναστέλλεται από την GSSG, μάλλον μέσω της ενεργοποίησης ενός μεταφραστικού αναστολέα, ο οποίος διατηρείται κανονικά σε ανενεργή μορφή από ένα σύστημα οξειδοαναγωγικών θείου (Jackson *et al.*, 1983).

Η GSH και οι διαδικασίες οι οποίες εξαρτώνται από αυτήν, έχουν ρόλο-κλειδί στις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων. Η GSH επάγει επιλεκτικά την ενεργοποίηση των γονιδίων άμυνας (Wingate *et al.*, 1988), όταν η συσσώρευση φυτοαλεξινών στην σόγια και το τριφύλλι, μετά από επίδραση υδροθεικών παραγόντων, εξαρτάται από το κυτταρικό δυναμικό οξειδοαναγωγής. Στοιχεία, που ανταποκρίνονται στην GSH, έχουν ταυτοποιηθεί στους υποκινητές των γονιδίων που εμπλέκονται στην σύνθεση των φυτοαλεξινών (Dron *et al.*, 1988). Καθαρή αύξηση στο επίπεδο της GSH έχει μετρηθεί σε κυτταροκαλλιέργειες από μπιζέλι και τριφύλλι, μετά από επίδραση μυκητιακών επαγωγέων (Edwards *et al.*, 1994).

Οι GSTs και η GS-POX επάγονται κατά την ανταπόκριση σε οξειδωτική καταπόνηση (Levine *et al.*, 1994). Η αύξηση στην ενεργότητα ειδικών ισοενζύμων επιτρέπει την άμεση αποτοξίνωση των προϊόντων της περοξειδωσης των λιπιδίων, από υψηλή παραγωγή EMO (Vera-Estrella *et al.*, 1992). Οι GSTs είναι ένζυμα που καταλύουν την προσθήκη της GSH σε ένα ευρύ φάσμα ηλεκτροφιλικών παραγόντων (Marrs, 1996). Μέσω της σύνδεσης

αυτής, τα φυτά προστατεύονται από περιβαλλοντικές προκλήσεις καθώς απομακρύνονται βαρέα μέταλλα, ζιζανιοκτόνα και άλλα. Ακόμα, οι GSTs έχουν σημαντικότατο ρόλο και στην εξάλειψη ενδογενών μορίων, όπως ενδογενών μεταβολιτών, π.χ. ανθοκυανινών. Η συνδεμένη μορφή της GSH είναι η μορφή εκείνη που απλά μεταφέρει τα διάφορα στοιχεία στο χυμοτόπιο. Για να είναι όμως αυτή η διαδικασία αποτελεσματική, η GSH πρέπει να βρίσκεται σε επάρκεια, οπότε οποιαδήποτε αλλαγή στην συνολική ποσότητα της γλουταθειόνης ή στην αναλογία GSH/GSSG, δρα σε πολλαπλά επίπεδα και έχει προφανή επίδραση στην ικανότητα του κυττάρου να αποτοξινώνει βλαβερά παραπροϊόντα του μεταβολισμού. Σε τέτοιες καταστάσεις καταπονήσεων, αυξημένη βιοσύνθεση γλουταθειόνης αποτελεί απαίτηση για την επιβίωση και συντήρηση των συστημάτων (Foyer *et al.*, 1997).

Η γλουταθειόνη, όπως και το ασκορβικό οξύ, εμπλέκεται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, όπως και στον έλεγχο της αύξησης (Gonzalez-Reyes *et al.*, 1994). Το μεγαλύτερο ποσοστό από τις απώλειες των λειτουργιών που παρατηρούνται στα φυτά κατά την έκθεσή τους σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, είναι αποτέλεσμα οξειδωτικών καταστροφών στις μεμβράνες, στο DNA και τις πρωτεΐνες. Όταν τα φυτικά κύτταρα εκτεθούν σε οξειδωτική καταπόνηση, παραμένουν στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, η οποία σχετίζεται με μείωση των επιπέδων των αναγμένων αντιοξειδωτικών (Berglund *et al.*, 1993, Berglund and Ohlsson, 1994).

3.4.2. Αντιοξειδωτικά ένζυμα

α. Υπεροξειδική δισμουτάση

Οι SODs είναι στην πρώτη γραμμή άμυνας εναντίων της οξειδωτικής καταπόνησης και υπάρχουν σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, με ελάχιστες εξαιρέσεις. Πρόκειται για μεταλοπρωτεΐνες με μεγάλη ικανότητα στην αποβολή της υπεροξειδικής ρίζας. Στα φυτά υπάρχουν πολλαπλές ενζυμικές μορφές (ισοένζυμα) της SOD, η παρουσία των οποίων ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στο καλαμπόκι (Baum and Scandalios, 1982). Φαίνεται ότι οι μορφές αυτές αντιστοιχούν σε πολλαπλά, ασύνδετα πυρηνικά γονίδια έτσι

ώστε οι διάφορες ισομορφές της SOD να εξυπηρετούν, ανάλογα με την τοπολογία τους και τις αλλαγές τους κατά την ανάπτυξη ή κατά την απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, ποικίλους μεταβολικούς όρους (Baum and Scandalios, 1982). Στα ανώτερα φυτά έχουν περιγραφεί 3 κύριες κατηγορίες των SODs, ανάλογα με το μέταλλο που φέρουν στην προσθετική τους ομάδα: Mn, Fe και Cu/Zn (Elstner, 1982). Πειραματικά, μεταξύ τους διακρίνονται από την ευαισθησία/ανθεκτικότητα σε H_2O_2 και KCN: οι Cu/ZnSODs παρουσιάζουν ευαισθησία και στους δύο αναστολείς, οι MnSODs ανθεκτικότητα, ενώ οι FeSODs δείχνουν ευαισθησία στο H_2O_2 και ανθεκτικότητα στο KCN (Scandalios, 1987, 1993).

Φυλογενετικά, οι τρεις κλάσεις της SOD μάλλον προήλθαν από δύο εξελικτικές σειρές. Οι MnSODs και οι FeSODs, οι οποίες ανιχνεύονται σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομολογίας μεταξύ τους, όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία και είναι, μάλλον, άσχετες δομικά με τις Cu/ZnSODs, οι οποίες υπάρχουν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Bowler *et al.*, 1994). Η φυλογενετική κατανομή τοποθετεί τις MnSODs και FeSODs ως αρχαιότερες. Υπάρχει πιθανότητα η εξέλιξη τους να είχε πραγματοποιηθεί πριν το διαχωρισμό προκαρυωτικών/ευκαρυωτικών οργανισμών, ενώ οι Cu/Zn SODs εξελίχθηκαν ανεξάρτητα, κοντά στην έναρξη της ευκαρυωτικής γενεαλογίας. Με άλλα λόγια, το ίδιο ένζυμο εξελίχτηκε δύο φορές ως απόκριση στην ίδια περιβαλλοντική πίεση (Bowler *et al.*, 1992, Scandalios, 1993).

Οι Cu/ZnSODs έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από πολλά φυτικά είδη και βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία από τις τρεις μεταλοπρωτεΐνες (Karpinski *et al.*, 1992, Bowler *et al.*, 1994, Scandalios, 1994, Van Camp *et al.*, 1994). Το ενεργό ένζυμο είναι διμερές και περιέχει ένα άτομο Cu και ένα άτομο Zn σε κάθε υπομονάδα. Όσον αφορά την υποκυτταρική τοπολογία τους, η οποία έχει μελετηθεί σε πολλά φυτικά είδη, έχει βρεθεί ότι οι Cu/ZnSODs βρίσκονται στο κυτόπλασμα, στους χλωροπλάστες και στα περοξεισώματα (Asada, 1994, Bueno *et al.*, 1995, Ogawa *et al.*, 1995). Σε όλα τα φυτικά είδη που έχουν μελετηθεί, οι MnSODs εδράζουν στο μιτοχονδριακό στρώμα (Baum

and Scandalios, 1981). Οι MnSODs φέρουν ένα άτομο μετάλλου σε κάθε υπομονάδα και είναι τετραμερείς. Οι FeSODs, όπου υπάρχουν, είναι χλωροπλαστικές και φέρουν επίσης ένα άτομο μετάλλου σε κάθε υπομονάδα. Έχουν απομονωθεί από το *Glycine max*, τον *Nicotiana plumbaginifolia* και την *Arabidopsis* (Van Camp *et al.*, 1991, Bowler *et al.*, 1994). Βιοχημικές μελέτες αποκάλυψαν την παρουσία των FeSODs σε μερικά, ταξινομικά απομακρυσμένα, φυτικά είδη. Η προφανής τυχαία αυτή κατανομή, όμως, μπορεί να οφείλεται σε πρόβλημα της βιοδοκιμής ή της κινητικότητας της πρωτεΐνης, αφού, για παράδειγμα, πρόσφατα στοιχεία στο μπιζέλι, όπου η παρουσία FeSOD είχε παραβλεφθεί, δείχνουν ότι η FeSOD μετακινείται μαζί με την Cu/ZnSODs σε πηκτώματα φυσικής ηλεκτροφόρησης (Donahue *et al.*, 1997). Εναλλακτικά, η έκφραση της FeSOD μπορεί να βρίσκεται κάτω από μη ταυτοποιημένο περιβαλλοντικό ή/και αναπτυξιακό έλεγχο, όπως έχει προταθεί από τους Bowler *et al.* (1994).

Ο αμυντικός ρόλος της SOD έχει ταυτοποιηθεί σε διάφορες περιπτώσεις περιβαλλοντικών πιέσεων και μάλιστα με επαγωγή διαφορετικών ισοενζύμων (Alscher *et al.*, 1997). Έτσι, αυξημένη ενεργότητα της χλωροπλαστικής και της κυτοπλασμικής Cu/ZnSOD παρατηρήθηκε μετά από επίδραση του ζιζανιοκτόνου παρακουάτ στο καλαμπόκι (Matters and Scandalios, 1986b). Η έκθεση των φυτών καλαμποκιού σε υψηλό οξυγόνο οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας μόνο της κυτοπλασμικής Cu/ZnSOD και όχι της χλωροπλαστικής ή της μιτοχονδριακής SOD (Matters and Scandalios, 1987). Αύξηση της κυτοπλασμικής Cu/ZnSOD παρατηρήθηκε στην τομάτα μετά από έκθεση στο παρακουάτ (Perl-Treves and Galun, 1991), ενώ γενετικά τροποποιημένα φυτά πατάτας, που υπερεκφράζουν την κυτοπλασμική ή την πλαστιδιακή Cu/ZnSOD, παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο παρακουάτ (Perl *et al.*, 1993). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η κυτοπλασμική Cu/ZnSOD συμβάλλει άμεσα στην αντιοξειδωτική άμυνα μαζί με την προστασία του χλωροπλάστη, με έναν μηχανισμό που δεν έχει αποσαφηνισθεί ακόμα.

Η υποκυτταρική και μάλιστα η ενδοοργανιδιακή τοπολογία των ισοενζύμων της SOD έχει σημαντικό και κρίσιμο ρόλο στην αντιμετώπιση της

οξειδωτικής καταπόνησης. Έτσι, η μιτοχονδριακή MnSOD προσέφερε προστασία στο όζον και την υδατική καταπόνηση κατά την εισαγωγή της στους χλωροπλάστες καπνού και τριφυλλίου (Van Camp *et al.*, 1994, McKersie *et al.*, 1996) και η FeSOD ήταν περισσότερο ικανή να προσφέρει προστασία εναντίον του παρακουάτ, στον καπνό (Tsang *et al.*, 1991). Γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού με υπερέκφραση της FeSOD ήταν περισσότερο ανθεκτικά στην οξειδωτική καταπόνηση από τα φυτά άγριου τύπου ή από μετασχηματισμένα φυτά τα οποία υπερέκφραζαν την MnSOD στους χλωροπλάστες (Van Camp *et al.*, 1996), δηλώνοντας ότι η δραστική προστασία στο παρακουάτ από το ισοένζυμο της FeSOD οφείλεται σε ενδογενή ικανότητα ή στην ειδική θέση του στις θυλακοειδείς μεμβράνες (Van Camp *et al.*, 1996). Το όζον, το οποίο δρα εξωκυτταρικά, παράγοντας EMO, οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας της κυτοπλασμικής CuZnSOD (Pitcher *et al.*, 1992). Αντίθετα, το παρακουάτ το οποίο παράγει EMO στον ενεργό χλωροπλάστη, προκαλεί αύξηση στα κυτοπλασμικά και τα πλαστιδιακά ισοένζυμα της SOD (Matters and Scandalios, 1986b).

β. Ασκορβική περοξειδάση

Η APO είναι μία αίμη-περοξειδάση και αναστέλλεται από κυανικό και αζίδια τα οποία συνδέονται στην αίμη. Ο κύκλος κατάλυσης της APO είναι όμοιος με των γενικών περοξειδασών και περιλαμβάνει το σχηματισμό του ενδιάμεσου Compound I, το οποίο οξειδώνει το ασκορβικό, παράγοντας δύο μόρια MDHA και στη συνέχεια επανέρχεται στην αρχική αναγμένη κατάσταση (Asada, 1999). Υπάρχουν 4 καλά χαρακτηρισμένες ισομορφές της APO στα φυτικά κύτταρα, μια κυτοπλασμική, μια περοξεισωματική και 2 χλωροπλαστικές, μία στο στρώμα και μία άλλη συνδεμένη στις θυλακοειδείς μεμβράνες (Mittler and Zilinskas, 1992, Asada, 1992a, Yamaguchi *et al.*, 1995). Ίσως υπάρχει και μια πέμπτη ισομορφή στα μιτοχόνδρια (Dalton *et al.*, 1993, Jimenez *et al.*, 1997). Οι ισομορφές, που βρίσκονται στα οργανίδια αποτοξινώνουν το H₂O₂ που παράγεται εκεί, ενώ η λειτουργία της κυτοπλασμικής ισομορφής είναι μάλλον η απομάκρυνση του H₂O₂, που

παράγεται στο κυτόπλασμα ή τον αποπλάστη και εκείνο που διαχέεται από τα οργανίδια (Mittler and Zilinskas, 1992, Asada, 1992a). Οι χλωροπλαστικές APO, στο στρώμα και την θυλακοειδή μεμβράνη, είναι μονομερή και μοιράζονται όμοιες ενζυμικές λειτουργίας (Miyake and Asada, 1992), ενώ η αμινοξική τους αλληλουχία διαφέρει σημαντικά από εκείνη του κυτοπλασμικού ισοενζύμου, το οποίο είναι ομοδιμερές με μικρότερη συγγένεια για το ASA (Asada, 1999). cDNA κλώνοι έχουν απομονωθεί από βαμβάκι, σπανάκι, γλυκοκολοκύθα, μπιζέλι και *Arabidopsis* (Mittler and Zilinskas, 1992, Yamaguchi *et al.*, 1995, Bunkelmann and Trelease, 1996, Zhang *et al.*, 1997, Ishikawa *et al.*, 1998).

Έχει διαπιστωθεί επαγόμενη έκφραση της APO σε καταστάσεις καταπονήσεων, όπως κατά τη ξηρασία, την καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας και παρουσία ABA (Mittler and Zilinskas, 1992). Γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού που υπερεκφράζουν την CuZnSOD στον χλωροπλάστη, εμφάνισαν αύξηση στην ενεργότητα της κυτοπλασμικής APO και συσσώρευση του μεταγράφου της (Sen Gupta *et al.*, 1993a) ενώ η χλωροπλαστική APO είχε μεγαλύτερη ενεργότητα σε γενετικά τροποποιημένα φυτά που υπερεκφράζουν την FeSOD σε σχέση με τα μη τροποποιημένα (Van Camp *et al.*, 1996). Η υπερέκφραση της κυτταρικής APO βελτίωσε την ανθεκτικότητα στο παρακουάτ (Pitcher, 1994) ενώ η καταστολή της έκφρασης της APO δημιούργησε φυτά περισσότερο ευαίσθητα στο όζον (Orvar and Ellis, 1997). Επίσης η υπερέκφραση της APO στο κυτόπλασμα ή τον χλωροπλάστη προκάλεσε βελτιωμένη ανθεκτικότητα στο παρακουάτ (Allen, 1997).

γ. Αναγωγή του μονοδιδροασκορβικού

Η MDHAR είναι ένα FAD-ένζυμο που χρησιμοποιεί NADH ή NADPH ως δότες ηλεκτρονίων και υπάρχει στους χλωροπλάστες (στη μεμβράνη των θυλακοειδών), στο κυτόπλασμα (κυτταρική μεμβράνη), τα μιτοχόνδρια και τα περοξεισώματα (De Leonardis *et al.*, 1995, Berczi and Moller, 1996, Jimenez *et al.*, 1997, Asada, 1999). Αύξηση της ενεργότητας της MDHAR έχει παρατηρηθεί κατά την απόκριση σε υψηλό φωτισμό φύλλων σιταριού (Mishra

et al., 1993), σε καταστάσεις ξηρασίας (Smirnoff and Colombe, 1988), κατά τη μεταχείριση με SO₂ και όζον (Mehlhorn *et al.*, 1996), σε υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου (Dalton *et al.*, 1991, Ushimaru *et al.*, 1992) και κατά τον τραυματισμό (Grantz *et al.*, 1995).

δ. Αναγωγή του διυδροασκορβικού

Όταν το MDHA αποτύχει να αναχθεί άμεσα σε ASA δημιουργείται αυθόρμητα το DHA, το οποίο ανάγεται σε ASA από την DHAR παρουσία GSH. Η DHAR έχει απομονωθεί από διάφορα φυτικά είδη (Hossain and Asada, 1984, Diprieno and Borroncino, 1991, Kato *et al.*, 1997) και έχει ιδιαίτερη σημασία για την αναγέννηση του ασκορβικού στην αναγμένη του μορφή. Μεταλλαγές στο τροπικό σύκο, όπου η ενεργότητα της DHAR απουσιάζει, καθιστούν το φυτό ευαίσθητο στο υψηλό φως (Noctor *et al.*, 1998b), ενώ *de novo* σύνθεση της DHAR παρατηρήθηκε κατά την υδατική καταπόνηση σε φυτά ρυζιού (Boo and Jung, 1999).

ε. Αναγωγή της γλουταθειόνης

Η GR είναι μια φλαβοπρωτεΐνη, που καταλύει την αναγωγή της οξειδωμένη μορφής της γλουταθειόνης (GSSG) στην αναγμένη μορφή (GSH) παρουσία NADPH (Foyer and Halliwell, 1976). Οι περισσότερες GRs είναι ομοδιμερείς με μοριακή μάζα 100-150 KDa, και φέρουν ένα μόριο FAD ανά μονομερές. Ανήκουν στην ομάδα των φλαβοενζύμων και περιέχουν μια δισουλφιδική ομάδα (Lascano *et al.*, 1999). Μελέτες σε ζωικά ερυθροκύτταρα έδειξαν ότι κάθε μονομερές αποτελείται από 4 περιοχές, την περιοχή σύνδεσης του FAD, την περιοχή σύνδεσης του NADPH, μια κεντρική και μια επιφανειακή περιοχή. Ο καταλυτικός μηχανισμός περιλαμβάνει δύο στάδια: πρώτα, το FAD ανάγεται από το NADPH, η φλαβίνη οξειδώνεται και η δισουλφιδική γέφυρα ανάγεται για να παραχθεί ένα θειολικό ανιόν και μια κυστεΐνη. Στο δεύτερο στάδιο, η GSSG ανάγεται μέσω θειολικών/δισουλφικών αντιδράσεων (Ghisla and Massey, 1989). Αν το αναγμένο ένζυμο δεν επανοξειδωθεί από την GSSG υφίσταται αντιστρεπτή απενεργοποίηση.

GR έχουν απομονωθεί από το καλαμπόκι (Mahan and Burke, 1987), το μπιζέλι (Edwards *et al.*, 1990), το σπανάκι (Halliwell and Foyer, 1978b), το πεύκο (Anderson *et al.*, 1990), το δαμάσκηνο (Hausladen and Alschler, 1994a), ενώ έχουν αναφερθεί στοιχεία για πολλαπλές ισομορφές της GR (Anderson *et al.*, 1990, Edwards *et al.*, 1990, Foyer *et al.*, 1991, Hausladen and Alschler, 1994b), οι οποίες προέρχονται από διαφορετικά γονίδια, από εναλλακτική συνένωση του RNA ή από πιθανές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση, γλυκοσυλίωση ή φωσφορυλίωση (Edwards *et al.*, 1990, Creissen *et al.*, 1999). Στο μπιζέλι, έχει κλωνοποιηθεί ένα cDNA που κωδικοποιεί για την GR, η οποία εδράζει στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια και ένα δεύτερο, που κωδικοποιεί για την κυτοπλασμική GR (Creissen *et al.*, 1992, Stevens *et al.*, 1997), ενώ δύο αλληλουχίες για την κυτοπλασμική GR έχουν αναφερθεί στη βάση δεδομένων, από την *Arabidopsis* (U37697) και το ρύζι (D78136).

Η GR είναι ένα σημαντικό ένζυμο για την προστασία ενάντια στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Αύξηση στην ενεργότητα της GR έχει βρεθεί κατά την επίδραση παρασιτοκτόνων, ρυπογόνων, χαμηλής θερμοκρασίας, υψηλού φωτισμού και υδατικής καταπόνησης (Rennenberg, 1982, Smith *et al.*, 1989, Noctor and Foyer, 1998a, Noctor *et al.*, 1998b), η οποία συνοδεύεται, στις περισσότερες περιπτώσεις καταπονήσεων, από σημαντικές αλλαγές στην κατανομή των ισοενζύμων με διαφορετική συγγένεια υποστρώματος (Foyer *et al.*, 1991, Aono *et al.*, 1993, Edwards *et al.*, 1994). Η σημασία της GR στη διατήρηση του ασκορβικού και της γλουταθειόνης φάνηκε από μελέτες σε γενετικά τροποποιημένα φυτά. Για παράδειγμα, γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού και λεύκης με υπερέκφραση της GR, είχαν μεγαλύτερη ικανότητα διατήρησης των ενδογενών επιπέδων του ASA και της GSH κατά την έκθεση σε παρακουάτ (Foyer *et al.*, 1991, 1995).

3.4.3. Πολυαμίνες

Η διαμίνη πουτρεσίνη (1,4-διαμινο-βουτάνιο) και οι πολυαμίνες (ΠΑ), σπερμιδίνη (N-(3-αμινοπροπυλ)-1,4-διαμινο-βουτάνιο) και σπερμίνη (N, N'-δι-

(3-αμινοπροπυλ)-1,4-διαμινο-βουτάνιο) είναι μικρές αλειφατικές αμίνες και υπάρχουν σε όλα τα φυτικά κύτταρα (Heby, 1981, Seiler and Dezeure, 1990).

Πουτρεσίνη:	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$
Σπερμιδίνη:	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
Σπερμίνη:	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$

Πολλά στοιχεία τα τελευταία χρόνια, υποστηρίζουν τον ρόλο των ΠΑ κατά την ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης (Smith, 1985b). Πρόκειται για βασικά μόρια με θετικό φορτίο σε φυσιολογικό pH, που δεσμεύονται ισχυρά *in vitro* στα αρνητικά φορτισμένα νουκλειικά οξέα, στα όξινα φωσφολιπίδια και σε πολλών ειδών πρωτείνες, όπως διάφορα ένζυμα, η ενεργότητα των οποίων ρυθμίζεται άμεσα από την πρόσδεση των ΠΑ, ενώ οι ιονικές αυτές αλληλεπιδράσεις είναι σημαντικές για την ρύθμιση της σύνθεσης, της δομής και της λειτουργίας των βιολογικών μακρομορίων (Bouchereau *et al.*, 1999). Στην φύση, οι ΠΑ βρίσκονται ελεύθερες-διαλυτές (Δ-) ή συνδεδεμένες με μικρά μόρια όπως φαινολικά οξέα (διαλυτές συζευγμένες πολυαμίνες, ΔΣ-ΠΑ) ή ακόμα συνδεδεμένες σε διάφορα μακρομόρια όπως πρωτείνες (αδιάλυτες συζευγμένες πολυαμίνες, ΑΣ-ΠΑ) (Martin-Tanguy, 1997).

Διάφορες καταστάσεις καταπονήσεων έχει βρεθεί να επάγουν την συσσώρευση ΠΑ, όπως η ωσμωτική (Flores and Galston, 1982, 1984, Borrell *et al.*, 1996), υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών (Lovatt, 1990, Lee, 1997), αλατότητας (Santa-Cruz *et al.*, 1997), όξινου περιβάλλοντος (Nam *et al.*, 1997), ανοξίας (Reggiani *et al.*, 1989) και η οξειδωτική καταπόνηση (Campos *et al.*, 1991, Ye *et al.*, 1997, Bouchereau *et al.*, 1999). Η προσθήκη εξωγενών ΠΑ σε φυτά τομάτας και καπνού προκάλεσε καταστολή της επαγόμενης από το όζον βλάβης (Ormrod and Beckerson, 1986). Στο μπιζέλι, η μεταχείριση με όζον προκάλεσε αύξηση στην ενεργότητα της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (ADC, Arginine Decarboxylase), του πρώτου ενζύμου του μονοπατιού βιοσύνθεσης των ΠΑ, και στο επίπεδο της σπερμιδίνης, ενώ όταν αναστάλθηκε

η ADC, η βλάβη ήταν έντονη (Rowland-Bamford *et al.*, 1989).

Εξωγενής παροχή πουτρεσίνης, σπερμιδίνης ή σπερμίνης σε φυτά καπνού συσχετίστηκε με αύξηση των επιπέδων της ΔΣ- και ΑΣ- πουτρεσίνης και της σπερμιδίνης, καθώς και με αποτελεσματική προστασία στο όζον (Langebartels *et al.*, 1991). Υψηλά επίπεδα ΠΑ σχετίστηκαν επίσης με την ανθεκτικότητα στο παρακουάτ (Szigeti *et al.*, 1996). Τα παραπάνω στοιχεία πρότειναν ένα σημαντικό ρόλο των ΠΑ κατά την απόσβεση EMO. Έχει βρεθεί ότι 1 mM σπερμιδίνης προστατεύει το μόριο του DNA από ρήξεις που προκαλούν οι EMO (Ha *et al.*, 1998), ενώ η σύνθεση του O_2^- μπορεί να ανασταλεί *in vitro* από πουτρεσίνη, σπερμιδίνη ή σπερμίνη, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 10-50 mM (Drolet *et al.*, 1986). Μόνο όμως οι ΔΣ- ΠΑ, και όχι οι Δ-ΠΑ, έδειξαν *in vitro* ικανότητα απόσβεσης των EMO, προτείνοντας ότι οι ΠΑ, μόνο αφού προσδεθούν, αποκτούν την ιδιότητα αυτή, αντίστοιχη μάλιστα γνωστών αντιοξειδωτικών, όπως το ασκορβικό οξύ (Langebartels *et al.*, 1991). Ο σχηματισμός των ΑΣ-ΠΑ ενισχύεται κατά τον τραυματισμό, ενώ ΠΑ συνδεδεμένες στους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος ή σε μεμβρανικά τμήματα υποδεικνύουν την συμμετοχή σε λειτουργικές συνδέσεις (Bouchereau *et al.*, 1999). Οι ΔΣ-ΠΑ σταθεροποιούν τις μεμβράνες, συμμετέχουν στην μετακίνηση μορίων και αποτελούν υπόστρωμα για τις οξειδάσες των αμινών και για αποπλαστικές περοξειδάσες κατά την απόσβεση του H_2O_2 (Negrel and Lherminier, 1987, Martin-Tanguy, 1997).

Διάφορες μελέτες έχουν προτείνει διαφορετικό ρόλο για την διαμίνη πουτρεσίνη και τις πολυαμίνες σπερμιδίνη και σπερμίνη στις περιπτώσεις καταπονήσεων, αφού σε πολλά συστήματα, η ανοχή στις καταπονήσεις έχει σχετιστεί με συσσώρευση σπερμιδίνης και σπερμίνης και όχι πουτρεσίνης. Η πουτρεσίνη προκαλεί αποπόλωση των μεμβρανών και διαρροή καλίου από το κύτταρο, ενώ η εξωγενής προσθήκη πουτρεσίνης σε διάφορα φυτικά είδη δημιούργησε συμπτώματα παρόμοια με την ακραία αλατότητα (Flores, 1990, Tiburcio *et al.*, 1990). Μπορεί όμως να συνδέεται με αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η SOD ή να προσδέεται με μικρά αντιοξειδωτικά μόρια, επιτρέποντάς τους έτσι, την μετακίνηση στο σημείο οξειδωτικής καταπόνησης του

κυττάρου: το ομοιοπολικό σύμπλοκο πουτρεσίνη-SOD είχε 20-φορές μεγαλύτερη δυνατότητα να διαπερνά τις μεμβράνες από την ελεύθερη SOD (Podulso and Gurran, 1996).

Το ενδογενές επίπεδο της πουτρεσίνης μπορεί να επηρεάσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, αφού το σύμπλοκο χαλκού-πουτρεσίνης-πυριδίνης που μπορεί να μιμηθεί την ενεργότητα της SOD, μπορεί να μετατρέψει το O_2^- πολύ αποτελεσματικά, να ενισχύσει την οξείδωση της γλουταθειόνης και να προστατέψει κατά των οξειδωτικών βλαβών από H_2O_2 (Nagele *et al.*, 1994). Η σπερμιδίνη και η σπερμίνη μπορούν να αναστείλουν την σύνθεση αιθυλενίου και την απώλεια χλωροφύλλης και αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες είτε αναστέλλοντας την διαστρωματική μετακίνηση φωσφολιπιδίων ή σταθεροποιώντας τα μοριακά σύμπλοκα στις θυλακοειδείς μεμβράνες (Bouchereau *et al.*, 1999). Επίσης, όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους δράση, έχει αναφερθεί ότι η αποτελεσματικότητα των πολυαμινών εξαρτάται από τον αριθμό των αμινομάδων, καθιστώντας την σπερμίνη (4 αμινομάδες) πιο ικανή στην απόσβεση EMO από την τριαμίνη σπερμιδίνη και έτσι για παράδειγμα, η επαγόμενη από τον γηρασμό παραγωγή O_2^- μπορεί να ανασταλεί από τις δύο ΠΑ, εντονότερα όμως, από την σπερμίνη (Bors *et al.*, 1989).

Υψηλή βιοσύνθεση σπερμιδίνης και σπερμίνης κατά την μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου είναι οικουμενικό φαινόμενο σε φυτά και ζώα (Fuller *et al.*, 1997). Η αναλογία σπερμιδίνη και σπερμίνη / πουτρεσίνη σχετίστηκε ανάλογα με την βιοσύνθεση μακρομορίων, ενώ η σπερμίνη επιτάχυνε την μιτωτική ενεργότητα απομονωμένων εμβρυονικών κορυφών (Bouchereau *et al.*, 1999). Τα στοιχεία ότι η αναστολή της βιοσύνθεσης της σπερμιδίνης και της σπερμίνης εμποδίζει την μετάβαση στην S φάση, σταθεροποιώντας τα κύτταρα στην G1 φάση και ότι άρση του φαινομένου επιτυγχάνεται με εξωγενή προσθήκη των δύο ΠΑ, υποστηρίζουν την άποψη ότι η βιοσύνθεση πολυαμινών απαιτείται για την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και την ολοκλήρωση του κύκλου της μίτωσης (Fowler *et al.*, 1996). Η άρση του ληθάργου του βολβού *Helianthus tuberosus* μπορεί να

επιτευχθεί με επίδραση αυξίνης, η οποία εντός 15 min επάγει την βιοσύνθεση πολυαμινών, τα επίπεδα των οποίων φτάνουν σε μέγιστο προς το τέλος της G1 φάσης και σε ένα δεύτερο κατά την μέση της M φάσης, ενώ παρόμοια πρότυπα ακολουθούν οι ενεργότητες των βιοσυνθετικών ενζύμων των πολυαμινών με μια μικρή καθυστέρηση (Bagni *et al.*, 1982, Serafini-Fracassini, 1991). Σε νεαρά φυτά *Acer sacharum* παρατηρήθηκε ταυτόχρονη συσσώρευση ΠΑ με τις κυτταρικές διαιρέσεις (Walker *et al.*, 1985), όταν η εξωγενής παροχή ΠΑ σε μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες βρώμης προκάλεσε μικρό αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων και σύνθεση DNA (Huhtinen *et al.*, 1982). Σε συγχρονισμένες κυτταροκαλλιέργειες καπνού, σε όλη τη διάρκεια της μεταχείρισης του συγχρονισμού με αφιδιχολίνη, που συγκεντρώνει τα κύτταρα στην G1 φάση, το επίπεδο της πουτρεσίνης αυξάνονταν για να μειωθεί μετά την απομάκρυνση του παρεμποδιστή και κατά την σύνθεση του DNA και να αυξηθεί ξανά, η Δ- μορφή της, στο τέλος της S φάσης και νωρίς κατά την G2 φάση και η ΔΣ- μορφή της στο τέλος της G2 και κατά την M φάση (Pfosser *et al.*, 1990).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η αναγεννητική ικανότητα των πρωτοπλαστών φαίνεται να εμπλέκει δύο τουλάχιστον αναπτυξιακά μονοπάτια: την αναστολή του κυτταρικού θανάτου και την επαγωγή του ολοδυναμικού των πρωτοπλαστών. Σε μια προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών που παρεμποδίζουν την διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών και να χαρακτηριστούν πιθανοί παράγοντες που συνεισφέρουν στην αδυναμία αναγέννησης, προσδιορίστηκαν οι άριστες συνθήκες απομόνωσης και καλλιέργειας των πρωτοπλαστών αμπέλου (Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis, 1990, Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1992a). Μελετήθηκαν σε αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού (*Nicotiana tabacum*) και μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες αμπέλου (*Vitis vinifera*), τα χαρακτηριστικά της βιοχημικής και λεπτής δομής των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά την ανασύστασή τους (Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1992b), το πρότυπο των de novo συντιθέμενων ολικών πρωτεϊνών, η ενεργότητα και το ισοενζυμικό πρότυπο ενζύμων που συμμετέχουν στην κυτταρική άμυνα εναντίον της οξειδωτικής καταπόνησης (Siminis *et al.*, 1993, de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996a, 1996b). Επιπλέον, τροποποιώντας τη διαδικασία απομόνωσης των πρωτοπλαστών, χαρακτηρίστηκαν δύο πληθυσμοί πρωτοπλαστών καπνού: ένας με ικανότητα αναγέννησης και ένας μη αναγεννώμενος πληθυσμός (Siminis *et al.*, 1994). Οι συγκριτικές αυτές μελέτες έδειξαν ότι οι αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού παρουσίασαν ταυτόχρονα υψηλή ενεργότητα απομάκρυνσης των ΕΜΟ αλλά και δυνατότητα συσσώρευσης H₂O₂ (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996b).

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν:

- i) Ο προσδιορισμός των παραγόντων, που οδηγούν σε οξειδωτική καταπόνηση κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών, ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενεργών μορφών οξυγόνου, η τοπολογία παραγωγής και η ταυτοποίηση των συστημάτων παραγωγής τους στον καπνό και την άμπελο, οι πρωτοπλάστες των οποίων διαφέρουν στην έκφραση του μορφογενετικού δυναμικού.
- ii) Η μελέτη της επίδρασης των ενεργών μορφών οξυγόνου στην συμπεριφορά

των πρωτοπλαστών κατά την καλλιέργεια, σε μια προσπάθεια σύνδεσης της αναγεννητικής ικανότητας με την επαγωγή της αντιοξειδωτικής άμυνας των πρωτοπλαστών.

Η προσέγγιση έγινε με σύγκριση των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού με τους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου και περιέλαβε την μελέτη:

α. Των ενδογενών επιπέδων των φυσικών αντιοξειδωτικών, του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, των αναγμένων και οξειδωμένων μορφών τους, και το οξειδοαναγωγικό επίπεδο των δύο αντιοξειδωτικών κατά την καλλιέργεια πρωτοπλάστων

β. Την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων, της SOD και των ενζύμων του κύκλου Halliwell-Asada: APO, MDHAR, DHAR και GR κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών

γ. Των ενδογενών επιπέδων των πολυαμινών στο διαλυτό, στο διαλυτό συζευγμένο και στο αδιάλυτο συζευγμένο κλάσμα, κατά την απομόνωση και την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση των πολυαμινών στην συσσώρευση των EMO κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών και η συμπεριφορά των καλλιεργούμενων πρωτοπλαστών κατά την προσθήκη εξωγενών πολυαμινών.

δ. Της σημασίας της ενεργότητας της APO στην αντιοξειδωτική μηχανή των πρωτοπλαστών και στην φυσιολογική τους λειτουργία, με την χρησιμοποίηση πρωτοπλαστών από γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού με αντι-πληροφοριακό RNA (antisense) για την APO.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΕΡΓΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ ΜΕΣΟΦΥΛΛΟΥ ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ. ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

1.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου έδειξαν ότι η οξειδωτική καταπόνηση εμπλέκεται στην μείωση του αναγεννητικού δυναμικού των πρωτοπλαστών, όμως μόνο οι πρωτοπλάστες που είναι ικανοί να παράγουν εξωκυτταρικό H_2O_2 μπορούν να διαιρεθούν (Physiol. Plant. 1993:87:263-270; Plant Physiol. 1994:1105:1375-1383; Plant Physiol. 1996:110:137-145; J. Plant Physiol. 1996:87:263-270; Plant Cell Rpts 1999:18:406-411). Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η παραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου (EMO), του O_2^- και του H_2O_2 , κατά την απομόνωση αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού (*Nicotiana tabacum* L.) και μη αναγεννώμενων πρωτοπλαστών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.), καθώς και τα συστήματα παραγωγής τους. Η χρησιμοποίηση κυτταρινάσης Onozuka, που περιέχει ενζυμικές προσμίξεις ικανές να προκαλέσουν παραγωγή EMO, προκάλεσε ραγδαία συσσώρευση του O_2^- και του H_2O_2 κατά την επώαση φύλλων καπνού, ενώ η αντίστοιχη παραγωγή ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο αμπέλι. Ο τραυματισμός των φύλλων ή η χρησιμοποίηση καθαρής κυτταρινάσης Worthington δεν οδήγησε σε επαγωγή των EMO. Η προσθήκη κυτταρινάσης Onozuka σε πρωτοπλάστες, που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Worthington, προκάλεσε οξειδωτική έκρηξη, όπου η συσσώρευση των EMO εντοπίστηκε στο μέσο καλλιέργειας (εξωκυτταρικό) και χαρακτηρίστηκε από σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των δύο φυτικών ειδών. Οι πρωτοπλάστες που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Onozuka, παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα EMO σε σχέση με εκείνους που προέκυψαν από κυτταρινάση Worthington, κυρίως σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, ενώ η παράταση του χρόνου δράσης της οδήγησε σε επιπλέον συσσώρευση EMO. Στους πρωτοπλάστες καπνού και σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες, ανιχνεύτηκαν δυο διαφορετικές ενεργότητες σύνθεσης EMO: μία, που παρουσίασε εξειδίκευση στο NADPH και ευαισθησία στο DPI και ήταν υπεύθυνη για την παραγωγή του O_2^- , και μία δεύτερη NAD(P)H ενεργότητα, ευαίσθητη στο KCN και το NaN_3 , που συμβάλλει στην παραγωγή και των δύο EMO. Η πρώτη ενεργότητα αντιστοιχεί μάλλον σε ένα ένζυμο παρόμοιο με την NADPH οξειδάση των ουδετερόφιλων

των θηλαστικών, και η δεύτερη σε μία NAD(P)H οξειδάση-περοξειδάση. Στην άμπελο, μόνο το δεύτερο ενζυμικό σύστημα ανιχνεύτηκε και θεωρείται υπεύθυνο για την παραγωγή και των δύο EMO.

1.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (EMO), η υπεροξειδική ρίζα (O_2^-), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot OH$), παράγονται στα ανώτερα φυτά στα πλαίσια των διαφόρων βιοχημικών αντιδράσεων (Scandalios, 1993). Η συσσώρευση των EMO ενισχύεται κατά την έκθεση των φυτών σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις, σε χημικά ή/και μικροβιακούς παράγοντες (Sutherland, 1991, Scandalios, 1993, Baker and Orlandi, 1995). Η υπερπαραγωγή των χημικά ενεργών μορφών οξυγόνου (EMO) οδηγεί σε οξειδωτική καταπόνηση (oxidative stress) και σοβαρές κυτταρικές βλάβες (Scandalios, 1993). Όμως, οι EMO έχουν επίσης θετικό ρόλο στην αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών. Έτσι, το H_2O_2 συμμετέχει στον πολυμερισμό της λιγνίνης, της σουβερίνης και άλλων συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, στην επαγωγή των γονιδίων άμυνας, στην διέγερση της παραγωγής φυτοαλεξινών και στην εξέλιξη της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Low and Merida, 1996, Lamb and Dixon, 1997). Επίσης, το O_2^- και το H_2O_2 δρουν άμεσα ως αντιμικροβιακοί παράγοντες και ίσως διαδραματίζουν ρόλο σήματος κατά την επαγωγή μηχανισμών άμυνας (Levine *et al.*, 1994, Jabs *et al.*, 1997).

Η μελέτη του/των μηχανισμού/μηχανισμών σύνθεσης των EMO αποτελεί θέμα αιχμής στην διεθνή έρευνα (Sutherland, 1991, Low and Merida, 1996, Wojtaszek, 1997). Αρχικά, προτάθηκε ότι η γένεση του αποπλαστικού H_2O_2 κατά την λιγνιτοποίηση των ριζών ραπανιού, προέρχεται από την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε υπεροξειδική ρίζα από φαινολικές ρίζες και NAD \cdot , τα οποία παράγονται από περοξειδάση, και στην συνέχεια, σχηματισμό του H_2O_2 από το O_2^- (Gross *et al.*, 1977, Elstner and Heupel, 1978, Halliwell, 1978a). Ένα δεύτερο μοντέλο προτάθηκε για την παραγωγή H_2O_2 από εναιώρημα κυττάρων φασολιού κατά την επίδραση τμημάτων κυτταρικού τοιχώματος του *Colletotrichum lindemuthianum*, και ενέπλεκε επίσης μια αποπλαστική

περοξειδάση: το σύμπλοκο O_2 και αίμης της περοξειδάσης ανάγεται σχηματίζοντας το σύμπλοκο III από μη ταυτοποιημένα αναγωγικά στοιχεία, που εξέρχονται από το κύτταρο. Κάτω από κανονικές συνθήκες, όπως αυξημένο pH, το σύμπλοκο III υδρολύεται και ελευθερώνεται το H_2O_2 (Bolwell *et al.*, 1995). Η τρίτη υπόθεση, η οποία μάλιστα κυριαρχεί στην μοντέρνα έρευνα, εμπλέκει μια διαμεμβρανική O_2^- -συνθάση [NAD(P)H οξειδάση], που μεταφέρει ηλεκτρόνια από το κυτοπλασμικό NAD(P)H στο μοριακό οξυγόνο για την σχηματισμό της υπεροξειδικής ρίζας, η οποία στη συνέχεια σχηματίζει H_2O_2 (Doke, 1985, Low and Merida, 1996, Murphy and Auh, 1996, Van Gestelen *et al.*, 1997). Σοβαρές ενδείξεις υποστηρίζουν την ομοιότητα της NAD(P)H οξειδάσης των φυτικών κυττάρων και της NADPH οξειδάσης των ουδετερόφιλων κυττάρων των θηλαστικών. Ειδικότερα, τα αντισώματα εναντίον συστατικών της θηλαστικής NADPH οξειδάσης αλληλεπιδρούν με πολυπεπίδια παρόμοιας μοριακής μάζας στα φυτά (Xing *et al.*, 1997, Desikan *et al.*, 1996). Η ενεργότητα της φυτικής NAD(P)H οξειδάσης αναστέλλεται από το διφαινυλικό ιοδόνιο (diphenylene iodonium, DPI), γνωστό αναστολέα της θηλαστικής μεμβρανικής οξειδάσης (Levine *et al.*, 1994, Auh and Murphy, 1995, Jabs *et al.*, 1997). Επιπλέον, χαρακτηρίστηκαν κλώνοι από το ρύζι (Groom *et al.*, 1996) και την *Arabidopsis* (Keller *et al.*, 1998), οι οποίοι παρουσιάζουν ομολογία με δομικά στοιχεία της θηλαστικής NADPH οξειδάσης.

Οι πρωτοπλάστες αποτελούν τα τελευταία χρόνια σημείο αναφοράς για βιοτεχνολογικές εφαρμογές γενετικής βελτίωσης των φυτών, επειδή είναι πολύ καλό σύστημα για την απευθείας μεταφορά γονιδίων (Potrykus, 1991), επιτρέπουν το σωματικό υβριδισμό με σύντηξη πρωτοπλαστών διαφορετικών ειδών (Puite, 1992), κ.α. Όμως, προϋπόθεση για τη χρησιμοποίησή τους αποτελεί η ικανότητα αναγέννησης φυτών από τους πρωτοπλάστες, η έκφραση δηλαδή του ολοδυναμικού (totipotency). Πολλά σημαντικά για την οικονομία, φυτικά είδη, όπως τα αγρωστώδη, τα ξυλώδη πολυετή και άλλα, παρουσιάζουν αδυναμία αναγέννησης από πρωτοπλάστες (recalcitrance). Διάφοροι παράγοντες έχουν προταθεί ότι ενδεχομένως συμβάλλουν στην έλλειψη

αναγεννητικής ικανότητας των πρωτοπλαστών και σε αυτούς περιλαμβάνεται η οξειδωτική καταπόνηση (Cutler *et al.*, 1989, Roubelakis-Angelakis, 1993).

Η διαδικασία ενζυμικής απομόνωσης των πρωτοπλαστών επάγει αλυσιδωτές οξειδώσεις, που αποδιοργανώνουν την κυτταρική μεμβράνη και οδηγούν στην οξειδωτική καταπόνηση των πρωτοπλαστών (Cross and Jones, 1991). Τα εμπορικά παρασκευάσματα κυτταρινάσης από *Trichoderma viride*, που χρησιμοποιούνται για την αποδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων, περιέχουν προσμίξεις ενζυμικών παραγόντων, όπως ξυλανάση (β -1,4-ενδοξυλανάση) και πεκτινικής λυάσης, τα οποία προκαλούν οξείδωση των μεμβρανικών λιπιδίων (Ishii, 1988, Cutler *et al.*, 1991, Sharon *et al.*, 1993). Κατά τη διάρκεια της απομόνωσης πρωτοπλαστών από σιτηρά, έχει διαπιστωθεί παρουσία αναγμένων μορφών οξυγόνου (Ishii, 1987, 1988).

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκαν οι παράγοντες που πιθανώς εμπλέκονται στην παραγωγή ΕΜΟ κατά την απομόνωση πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου, όπως επίσης η τοπολογία και οι μηχανισμοί της γένεσης των ΕΜΟ. Χρησιμοποιήθηκαν δύο μορφές κυτταρινάσης με διαφορετική καθαρότητα: κυτταρινάση R-10 Onozuka, που περιέχει ενεργότητα ξυλανάσης και πεκτινικής λυάσης (Fuchs *et al.*, 1989) και καθαρή κυτταρινάση Worthington χωρίς προσμίξεις. Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση του τραυματισμού των φύλλων, διαδικασία απαραίτητη για την απομόνωση των πρωτοπλαστών, και οι συνθήκες απομόνωσης, όπως η διάρκεια της ενζυμικής πέψης στην παραγωγή ΕΜΟ. Με χρήση αναστολέων σε πρωτοπλάστες και απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες, χαρακτηρίστηκαν τα ενζυμικά συστήματα παραγωγής των ΕΜΟ στα δύο φυτικά είδη.

1.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.3.1. Φυτικό υλικό

Για την απομόνωση πρωτοπλαστών αμπέλου (*Vitis vinifera* L. cv Σουλτανίνα) χρησιμοποιήθηκαν φύλλα από *in vitro* αναπτυγμένα φυτά, τα οποία προήλθαν από φυτά αναπτυγμένα σε θερμοκήπιο, απαλλαγμένα από ιώσεις. Τα τελευταία χρησιμοποιήθηκαν ως δότες εκφύτων βλαστών ενός κόμβου, οι οποίοι αφού απολυμάνθηκαν επιφανειακά (εμβάπτιση σε 70% (v/v)

αιθανόλη για 15 sec και ακολούθως σε διάλυμα υποχλωριώδους ασβεστίου, 3% σε ενεργό συστατικό, για 20 min), τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία αυξητικών παραγόντων (Roubelakis-Angelakis and Zivanovits, 1991). Η ανάπτυξη των φυτών έγινε στους $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ με 16/8 h φωτοπερίοδο και ένταση φωτός $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών Conviron (Controlled Environments Ltd, Winnipeg, Manitoba, Canada) εφοδιασμένο με λαμπτήρες φθορισμού (φως ημέρας) Sylvania VHO (Sylvania, Danvers, MA, USA). Μετά την έκπτυξη των οφθαλμών και την επαγωγή ριζογένεσης, τα φύλλα από τα *in vitro* αναπτυχθέντα φυτά χρησιμοποιήθηκαν ως δότες για την απομόνωση των πρωτοπλαστών.

Σπορόφυτα καπνού (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi) αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο, σε γλάστρες μικρού μεγέθους με τυπικό οργανικό υπόστρωμα (Triohum) και με προσθήκη θρεπτικού διαλύματος Complesal, μέχρι την απόκτηση 12 ± 2 φύλλων. Για την εκτέλεση όλων των δοκιμών και πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν φύλλα τάξεως 4-7 στον άξονα του φυτού, ξεκινώντας την αρίθμηση από την κορυφή.

1.3.2. Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτοπλαστών μεσοφύλλου

α. Απομόνωση πρωτοπλαστών. Τα φύλλα από τα φυτά καπνού, που αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο, απολυμάνθηκαν πριν την απομόνωση των πρωτοπλαστών. Η αποστείρωση αυτή έγινε με εμβάπτιση των φύλλων σε 70% (v/v) αιθανόλη για 15 sec και ακολούθως σε διάλυμα υποχλωριώδους ασβεστίου (3% σε ενεργό συστατικό) για 12 min, και στη συνέχεια πλύθηκαν 3 φορές με αποστειρωμένο νερό προκειμένου να απομακρυνθεί το υποχλωριώδες ασβεστίο.

Για την απομόνωση των πρωτοπλαστών μεσοφύλλου και από τα δύο φυτικά είδη, λωρίδες 1 mm περίπου, από τις μεσονεύριες περιοχές του ελάσματος του φύλλου, τοποθετήθηκαν σε ενζυμικό διάλυμα σε πλαστικά αποστειρωμένα τρυβλία (Falcon 100x15 mm). Τα διαλύματα απομόνωσης των πρωτοπλαστών ήταν αυτά, που έχουν αναφερθεί για την άμπελο (Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis, 1990) και για τον καπνό (Koop and Schweiger, 1985) με μερικές τροποποιήσεις (Πίν. 1.1). Το διάλυμα

επάσης, εκτός των άλλων συστατικών που ήταν κοινά για τα δύο φυτικά είδη, περιείχε σακχαρόζη σε συγκεντρώσεις 0,4 M και 0,7 M, αντίστοιχα για τον καπνό και την αμπέλο. Για την αποδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα

Πίνακας 1.1. Διαλύματα απομόνωσης και καλλιέργειας πρωτοπλαστών μεσοφύλλου καπνού και αμπέλου. Η σύσταση των διαλυμάτων είναι κοινή για τα δύο είδη, εκτός των διαφορών που αναφέρονται.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΔΙΑΛΥΜΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ
B5-Μακροστοιχεία	B5-Μακροστοιχεία
25 mM KNO ₃	25 mM KNO ₃
1 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O
1 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O
1 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	1 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
1,1 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1,1 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O
2 mM CaCl ₂	2 mM CaCl ₂
Βιταμίνες	Βιταμίνες
2 mg/L ινοσιτόλη	2 mg/L ινοσιτόλη
0,02 mg/L βιοτίνη	0,02 mg/L βιοτίνη
0,2 mg/L πανθοτενικό οξύ	0,2 mg/L πανθοτενικό οξύ
0,2 mg/L νικοτινικό οξύ	0,2 mg/L νικοτινικό οξύ
0,1 mg/L θιαμίνη	0,1 mg/L θιαμίνη
0,2 mg/L πυριδοξίνη	0,2 mg/L πυριδοξίνη
MS-Μικροστοιχεία	MS-Μικροστοιχεία
6,2 mg/L H ₃ BO ₃ ·6H ₂ O	6,2 mg/L H ₃ BO ₃ ·6H ₂ O
22,3 mg/L MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3 mg/L MnSO ₄ ·4H ₂ O
8,6 mg/L ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6 mg/L ZnSO ₄ ·7H ₂ O
0,25 mg/L Na ₂ MoO ₄	0,25 mg/L Na ₂ MoO ₄
0,025 mg/L CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025 mg/L CuSO ₄ ·5H ₂ O
0,025 mg/L CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025 mg/L CoCl ₂ ·6H ₂ O
25mM MES	25mM MES
43 mg/L EDFS	43 mg/L EDFS
0,4 M σακχαρόζη (καπνός, 600 mOsmol L⁻¹)	0,4 M γλυκόζη (καπνός, 550 mOsmol L⁻¹)
ή	ή
0,7 M σακχαρόζη (αμπέλι, 1050 mOsmol L⁻¹)	0,7 M γλυκόζη (αμπέλι, 900 mOsmol L⁻¹)
pH 5,7±1	pH 5,7±1

1mg/L 6-BAP, 0,1mg/L NAA (καπνός)

ή

0,5 mg/L 6-BAP, 3 mg/L NAA (αμπέλι)

ενζυμικά παρασκευάσματα της κυτταρινάσης (cellulase) R-10 Onozuka από *Trichoderma viride* (Yakult Honsha Co. Ltd. Tokyo, Japan) ή κυτταρινάσης Worthington (Worthington Biochemical Corporation) και μακεροζύμης (macerozyme) R-10 Onozuka από *Rhizopus* sp (Yakult Honsha Co. Ltd. Tokyo, Japan), σε συγκεντρώσεις 1% ή 0,25% και 0,5% (w/v) αντίστοιχα. Ο χρόνος επώασης ήταν 4 ή 16 h στο σκοτάδι και στους 27° C.

Η διαδικασία της απομόνωσης συνοπτικά ήταν η εξής: Με το τέλος του χρόνου επώασης το ενζυμικό διάλυμα αντικαταστάθηκε με το ίδιο διάλυμα χωρίς ένζυμα και ακολούθησε η ελευθέρωση των πρωτοπλαστών με ανάδευση σε 100 rpm. Το αιώρημα πρωτοπλαστών τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες και επάνω από αυτό 1-2 mL διαλύματος καλλιέργειας πρωτοπλαστών για τη δημιουργία διαβάθμισης δύο φάσεων (γλυκόζη-σακχαρόζη). Οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν σε κεφαλή φυγοκέντρου με κινητές θέσεις για 15 min σε 150 g (Sorvall, DuPont, κεφαλή HB4). Η σχηματιζόμενη μεσόφαση από τους ακέραιους πρωτοπλάστες επαναιωρήθηκε σε διάλυμα καλλιέργειας για την πλήρη απομάκρυνση του ενζυμικού παρασκευάσματος. Οι πρωτοπλάστες, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν και ο αριθμός τους υπολογίστηκε με αιματοκυτταρόμετρο, χρησιμοποιώντας την χρωστική Evan's blue.

β. Καλλιέργεια πρωτοπλαστών. Η καλλιέργεια των πρωτοπλαστών έγινε στα διαλύματα καλλιέργειας, που περιγράφονται στον Πίνακα 1.1. Η πυκνότητα καλλιέργειας των πρωτοπλαστών ήταν 10^5 πρωτοπλάστες/mL διαλύματος καλλιέργειας. Το αιώρημα των πρωτοπλαστών τοποθετήθηκε σε πλαστικά τρυβλία (Falcon, 100x15 mm) στο σκοτάδι, στους 27° C.

1.3.3. Διέγερση της παραγωγής ΕΜΟ σε φύλλα και πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου

Λωρίδες φύλλου, έντονα τραυματισμένες, τοποθετήθηκαν σε μέσο

καλλιέργειας (Πίν. 1.1.) και προστέθηκε 1% (w/v) κυτταρινάση R-10 Onozuka ή 0,25% (w/v) κυτταρινάση Worthington. Τα δυο παρασκευάσματα κυτταρινάσης είχαν την ίδια ενζυμική ενεργότητα. Έντονα τραυματισμένα φύλλα, τοποθετημένα στο ίδιο μέσο, χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης του τραυματισμού στην παραγωγή EMO. Η συσσώρευση των EMO στο μέσο καλλιέργειας παρακολούθηθηκε για 16 h.

Επίσης, πρωτοπλάστες που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Worthington και καλλιεργήθηκαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω (1.3.2.α,β), χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της παραγωγής EMO. Στους πρωτοπλάστες αυτούς προστέθηκε 1% (w/v) κυτταρινάση R-10 Onozuka τον χρόνο 0. Η παραγωγή των EMO στο μέσο καλλιέργειας και τους πρωτοπλάστες μελετήθηκε για 4 h.

Για την μελέτη της επίδρασης του πλυσίματος στην συσσώρευση των EMO, πρωτοπλάστες καπνού απομονώθηκαν μετά από 4 h επίδραση με κυτταρινάση Worthington. Αμέσως προστέθηκε 1% κυτταρινάση Onozuka στους πρωτοπλάστες (10^5 mL^{-1}). Μετά από 30 min, η συσσώρευση των EMO μετρήθηκε στο μέσο καλλιέργειας και τους πρωτοπλάστες (μάρτυρας), αφού προηγήθηκε φυγοκέντρηση στις 100 g για 15 sec. Για το πρώτο πλύσιμο, το αρχικό ίζημα των πρωτοπλαστών επαναδιαλύθηκε στο μέσο καλλιέργειας, και ακολούθησε η ίδια διαδικασία διαχωρισμού και μέτρησης, η οποία επαναλήφθηκε ακόμα μία φορά (2^ο πλύσιμο). Το μέσο καλλιέργειας, που προέκυψε από τα διαδοχικά πλυσίματα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της εξωκυτταρικής συσσώρευσης των EMO, ενώ οι αντίστοιχοι πρωτοπλάστες, επαναδιαλύθηκαν σε μέσο καλλιέργειας, χωρίς ωσμωτικό (ώστε να διαρρηχθούν), και χρησιμοποιήθηκαν για τον ενδοκυτταρικό προσδιορισμό των EMO.

Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* καλλιεργήθηκε σε Luria Broth θρεπτικό μέσο, παρουσία του αντιβιοτικού rifamycin, στους 30^ο C για 12-16 h, έως ότου η απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm να γίνει ίση με την μονάδα (10^8 cfu/ mL). Σε 0,5 g τραυματισμένου φύλλου (10 ml) προστέθηκαν την στιγμή 0, $2 \cdot 10^8$ βακτήρια, αριθμός ικανός να επάγει

αντίδραση υπερευαισθησίας. Η συσσώρευση των ΕΜΟ στο μέσο καλλιέργειας παρακολουθήθηκε για 8 h.

1.3.4. Απομόνωση και έλεγχος καθαρότητας των κυτταρικών μεμβρανών

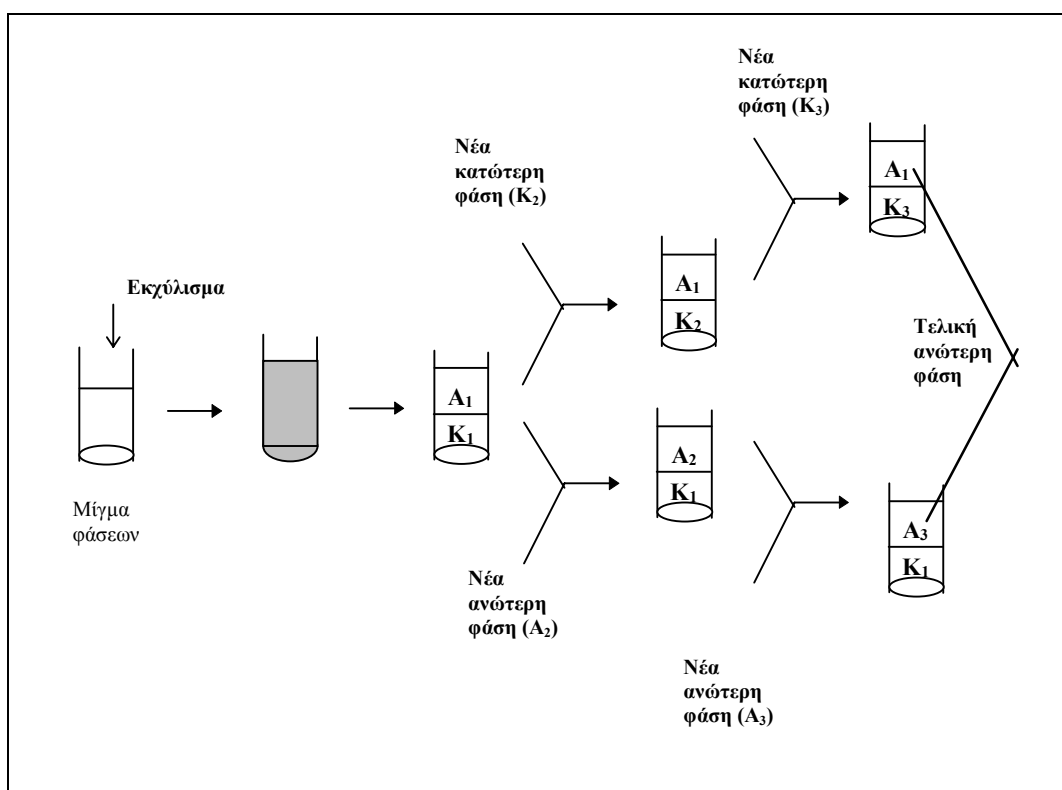
1.3.4.α. Απομόνωση κυτταρικών μεμβρανών από πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου

Οι πρωτοπλάστες που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση κυτταρικών μεμβρανών, απομονώθηκαν με κυτταρινάση Worthington. Πραγματοποιήθηκαν δύο απομονώσεις: από πρωτοπλάστες πάνω στους οποίους είχε επιδράσει 1% (w/v) κυτταρινάση R-10 Onozuka για 30 min και από πρωτοπλάστες οι οποίοι δεν είχαν υποστεί καμιά μεταχείριση (μάρτυρας). Η διαδικασία απομόνωσης κυτταρικών μεμβρανών έχει ήδη περιγραφεί (de Marco *et al.*, 1994). Περιληπτικά, 4 όγκοι διαλύματος εκχύλισης (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20% (w/v) σορβιτόλη, 1 mM ασκορβικό οξύ, 1 mM EDTA, 10 mM DDT, 10 μM leupeptin, 0,3% (v/v) Triton X100) προστέθηκαν στο ίζημα των πρωτοπλαστών, οι οποίοι αμέσως μετά την απομόνωση και/ή την μεταχείριση με την κυτταρινάση φυγοκεντρήθηκαν (10 min, 100 g) και απομακρύνθηκε το μέσο καλλιέργειας. Μετά από έντονη ανακίνηση (vortexing), το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε για 20 min στις 10000 g (Sorvall, DuPont, κεφαλή SS34). Το υπερκείμενο που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε για 50 min στις 85000 rpm (Beckman, κεφαλή Ti 70) για να διαχωριστεί το μικροσωμικό κλάσμα, το οποίο επαναιωρήθηκε σε 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 250 mM σακχαρόζη, 0,5 M KCl και 10% (v/v) γλυκερόλη και επαναφυγοκεντρήθηκε δυο φορές προκειμένου να απομακρυνθούν τα μη-ειδικά δεσμευμένα ένζυμα. Το ίζημα των μικροσωμάτων επαναδιαλύθηκε σε 1,5 mL από 5 mM Tris-HCl, pH 7,8, 250 mM σακχαρόζη, 10% (v/v) γλυκερόλη.

Οι κυτταρικές μεμβράνες απομονώθηκαν στη συνέχεια, με το σύστημα διαχωρισμού δύο φάσεων, σύμφωνα με το οποίο τα μεμβρανικά σωματίδια διαχωρίζονται ανάλογα με τις ιδιότητες της επιφάνειάς τους (Larson, 1983). Το σύστημα φάσεων αποτελείται από 6,2 % (w/w) δεξτράνη T500 (Pharmacia,

Freiburg, Germany), 6,2 % (w/w) πολυαιθυλική γλυκόλη 4000 (Sigma, Munchen, Germany), 250 mM σακχαρόζη και 5 mM Tris-HCl, pH 7,8, συνολικού βάρους 8 g. Το διάλυμα των μικροσωμάτων (1,5 mL) τοποθετήθηκε αρχικά, σε 7 g συστήματος δύο φάσεων, το οποίο κατ' εξαίρεση, παρασκευάζεται χωρίς 250 mM σακχαρόζη και 5 mM Tris-HCl, η απουσία των οποίων εξισορροπείται με την προσθήκη του μικροσωμικού δείγματος. Το σύστημα ανακινήθηκε καλά (40-50 φορές) και φυγοκεντρήθηκε σε κεφαλή φυγοκέντρου με κινητές θέσεις για 5 min σε 1200 g (Sorvall, DuPont, κεφαλή HB4). Περίπου το 90% της ανώτερης φάσης επανακλασματώθηκε σε νέα κατώτερη φάση και αντίστοιχα, η πρώτη κατώτερη φάση εμπλουτίστηκε με νέα ανώτερη φάση (Εικ. 1.1). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές. Η τελική ανώτερη φάση συλλέχθηκε και αραιώθηκε με διάλυμα αποτελούμενο από 2 mM Tris-HCl, pH 7,0, 250 mM σακχαρόζη και 10% (v/v) glycerol και επαναφυγοκεντρήθηκε για 50 min στις 85000 g (Beckman, κεφαλή Ti 70). Το τελικό ίζημα επαναδιαλύθηκε στο ίδιο διάλυμα και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Οι πρωτεΐνες ποσοτικοποιήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο Lowry (Lowry *et al.*, 1951) αφού προηγήθηκε διαλυτοποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με 1% (v/v) SDS σε 0,1 N NaOH. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με χρησιμοποίηση BSA.



Εικόνα 1.1. Γραφική απεικόνιση του συστήματος δύο φάσεων.

1.3.4.β. Έλεγχος καθαρότητας των κυτταρικών μεμβρανών

Ο έλεγχος της καθαρότητας του τελικού προϊόντος του συστήματος διαχωρισμού δύο φάσεων έγινε με την χρησιμοποίηση ενζυμικών δεικτών, η ενεργότητα των οποίων επιτρέπει τον χαρακτηρισμό των κυτταρικών μεμβρανών και τον βαθμό μόλυνσης του παρασκευάσματος από μεμβράνες άλλων κυτταρικών οργανιδίων.

- **ΑΤΡ-άσες**

ΑΤΡ-άσες υπάρχουν σε διάφορες ενδοκυτταρικές μεμβράνες και στην κυτταρική μεμβράνη. Ο διαχωρισμός τους είναι δυνατός λόγω της διαφορετικής ευαισθησίας που παρουσιάζουν σε επιλεκτικούς αναστολείς, καθώς και στο άριστο pH δράσης τους, με αποτέλεσμα να μπορούν να διαχωριστούν οι ΑΤΡ-άσες των κυτταρικών μεμβρανών, του τονοπλάστη και των μιτοχονδρίων. Δείκτης των κυτταρικών μεμβρανών είναι η Mg^{2+} -ΑΤΡ-άση, η οποία ενεργοποιείται με ιόντα K^+ , αναστέλλεται από βαναδικό και το

άριστο pH της είναι 6,5, ενώ δείκτης του τονοπλάστη και των μιτοχονδρίων είναι η ATP-άση με pH 8,0, η οποία αναστέλλεται, αντίστοιχα από νιτρικό και αζίδιο.

Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη του μεμβρανικού παρασκευάσματος (5-10 μg πρωτεΐνη) σε 150 μL διαλύματος αντίδρασης το οποίο περιείχε 50 mM Tris-HCl, pH 6,5 ή 8,0, 0,005% (v/v) Triton X100, 5 mM ATP (Tris-salted), 5 mM MgSO₄, 50 mM KCl, 0,1 mM Na₂MoO₄ (αναστολέας όξινων φωσφατασών) (Gallagher and Leonard, 1982) και αναστολείς στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 0,1 mM Sodium orthovanadate, 50 mM Sodium nitrate ή 50 mM Sodium azide. Το δείγμα επωάζεται στους 37° C για 45 min, οπότε η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 500 μL 10% SDS και ακολουθεί η μέτρηση του ανόργανου φωσφόρου, που ελευθερώθηκε κατά την αντίδραση. Για την μέτρηση αυτή, χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη δοκιμασία 670 της Sigma: σε κάθε δείγμα προστέθηκε 400 μL διάλυμα molybdate solution και 100 μL διάλυμα Fiskie-Subarow solution, ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και μέτρηση της απορρόφησης στα 660 nm. Η ποσότητα του φωσφόρου υπολογίστηκε από πρότυπη καμπύλη.

• UDP-άση

Η λανθάνουσα (latent) ενεργότητα της UDP-άσης είναι χαρακτηριστική του συστήματος Golgi (Nagasashi and Kane, 1982) και η διαδικασία της μέτρησής ήταν ανάλογη με εκείνη των ATP-ασών που περιγράφηκε προηγουμένως. Στην περίπτωση αυτή, το διάλυμα αντίδρασης περιείχε 50 mM Tris-HCl, pH 6,5, 50 mM KCl, 3 mM MgSO₄, 3 mM UDP, 0,04 mM Na₂MoO₄, παρουσία ή απουσία 0,005% (v/v) Triton X100.

• Οξειδάση του κυτόχρωματος c

Το ένζυμο οξειδάση του κυτόχρωματος c είναι δείκτης της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Η μέτρηση της ενεργότητάς του απαιτεί αναγμένη μορφή του κυτόχρωματος c, η οποία επιτυγχάνεται με την προσθήκη dithionate στο οξειδωμένο κυτόχρωμα έως ο λόγος A_{550nm}/A_{596nm} να γίνει ίσος με 9-10, οπότε το 90% του κυτόχρωματος είναι σε αναγμένη μορφή.

Η διαδικασία μέτρησης της ενεργότητας έχει ήδη περιγραφεί (Hodges

and Leonard, 1974). Συνοπτικά, 10 μg πρωτεΐνης από το μεμβρανικό παρασκεύασμα προστίθενται στο διάλυμα αντίδρασης (50 mM Tris-HCl, pH 7,5 και 0,5 mg/mL κυτόχρωμα c) και παρακολουθείται η οξείδωση του κυτοχρώματος με την μείωση της απορρόφησης στα 550 nm, στους 25° C.

• **Αναγωγή του κυτόχρωματος c, εξαρτώμενη από NADPH**

Το ένζυμο αυτό είναι ενδεικτικό του ενδοπλασματικού δικτύου. Χρησιμοποιεί το NADPH για την αναγωγή του κυτοχρώματος c, ενώ αναστέλλεται εκλεκτικά από αντιμυκίνη A (Lord *et al.*, 1973). Η διαδικασία μέτρησης της ενεργότητας περιλαμβάνει την προσθήκη 10 μg πρωτεΐνης από το μεμβρανικό παρασκεύασμα στο διάλυμα αντίδρασης, που περιέχει 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,25 mg/mL κυτόχρωμα c και 1 μM αντιμυκίνη A. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 0,25 mM NADPH (σε 1 mM Tris-HCl, pH 8,0). Παρακολουθείται η αύξηση της απορρόφησης στα 550 nm, στους 25° C.

• **Αλκοολική αφυδρογονάση**

Η παρουσία ενεργότητας της αλκοολικής αφυδρογονάσης στο μεμβρανικό παρασκεύασμα είναι ένδειξη κυτοπλασμικής μόλυνσης. Η μέθοδος της μέτρησής της έχει ήδη περιγραφεί (Suzuki and Kyuwa, 1972). Συνοπτικά, 10 μg πρωτεΐνης από το μεμβρανικό παρασκεύασμα προστίθεται στο διάλυμα αντίδρασης (30 μmol ethanol, 0,55 μmol NAD^+ , 100 μmol pyrophosphate/HCl, pH 8,5) και παρακολουθείται η αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm, στους 30° C.

Ο Πίνακας 1.2 είναι ενδεικτικός μιας διαδικασίας απομόνωσης κυτταρικών μεμβρανών και δείχνει τον βαθμό εμπλουτισμού και καθαρότητας του παρασκευάσματος, μετά τον διαχωρισμό δύο φάσεων.

Πίνακας 1.2. Ενζυμικοί δείκτες σε αντιπροσωπευτικό μεμβρανικό παρασκεύασμα από πρωτοπλάστες καπνού. Η παύλα (-) δηλώνει ότι η ενεργότητα του ενζύμου δεν ανιχνεύτηκε.

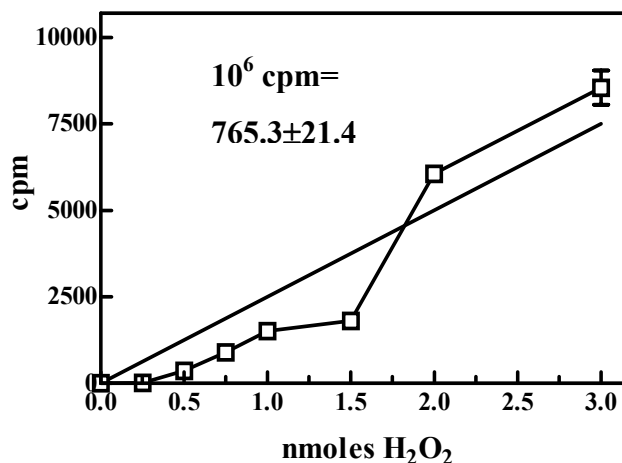
Ενζυμικός δείκτης	Πρωτογενές εκχύλισμα	Τελικό παρασκεύασμα
ATP-άση, vanadate-sensitive (nmol Pi · min ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	780,6±36,3	511,3±2 6,9
ATP- άση, nitrate-sensitive (nmol Pi · min ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	234,0±7,4	-
ATP- άση, azide-sensitive (nmol Pi · min ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	190±9,1	-
UDP- άση (nmol Pi · min ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	220,2±16,2	8,6±2,6
Οξειδάση του κυτόχρωματος c (nmol · min ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	3,3±0,6	0,16±0,0 6
Αναγωγή του κυτόχρωματος c (nmol · min ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	24,5±3,3	0,14±0,0 7
Αλκοολική αφυδρογονάση (nmol NAD ⁺ · min ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	2920,6±56, 7	-

1.3.5. Βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, για τον προσδιορισμό του H₂O₂

Η παραγωγή του H₂O₂ από τα κύτταρα φύλλου και τους πρωτοπλάστες μελετήθηκε με την βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης (luminol, Sigma, Munchen, Germany), όπως έχει ήδη περιγραφτεί (Murphy and Huerta, 1990). Λωρίδες φύλλου (50 mg x mL⁻¹) τοποθετήθηκαν στο μέσο καλλιέργειας όπως αναφέρθηκε παραπάνω (1.3.3) και το μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για την βιοδοκιμή του H₂O₂. Η παραγωγή του H₂O₂ από πρωτοπλάστες, που αντιστοιχούν στο ίδιο φρέσκο βάρος φύλλου, μετρήθηκε στο μέσο καλλιέργειας μετά από φυγοκέντρηση στις 100 g για 15 sec. Όταν χρειάστηκε, το ίζημα (πρωτοπλάστες) επαναδιαλύθηκε σε μέσο καλλιέργειας

χωρίς ωσμωτικό ώστε οι πρωτοπλάστες να λυθούν και να προσδιοριστεί το ενδοκυτταρικό κλάσμα των ΕΜΟ. Η βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 2 mL τοποθετώντας σε

Εικόνα 1.2. Πρότυπη καμπύλη συσχέτισης των τιμών της χημειοφωταύγειας (cpm) με την συγκέντρωση του H₂O₂.



δοκιμαστικό σωλήνα σπινθηρισμού τα ακόλουθα: 0,8 mL διαλύματος αντίδρασης (που περιείχε 10 mM Tris-MES pH 7,0, 1 mM CaCl₂ και 0,1 mM KCl), 0,2 mL από 1 mM φρέσκου διαλύματος λουμινόλης, 0,1 μονάδα περοξειδάσης σε 20 mM φωσφορικού καλίου (pH 7,4) και 1 mL από το μέσο καλλιέργειας (Auh and Murphy, 1995). 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 H₂O₂ (Εικ. 1.2) και επίσης χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι μάρτυρες (controls) για κάθε περίπτωση.

1.3.6. Βιοδοκιμή χημειοφωταύγειας της λουσιγενίνης για τον

προσδιορισμό του O_2^-

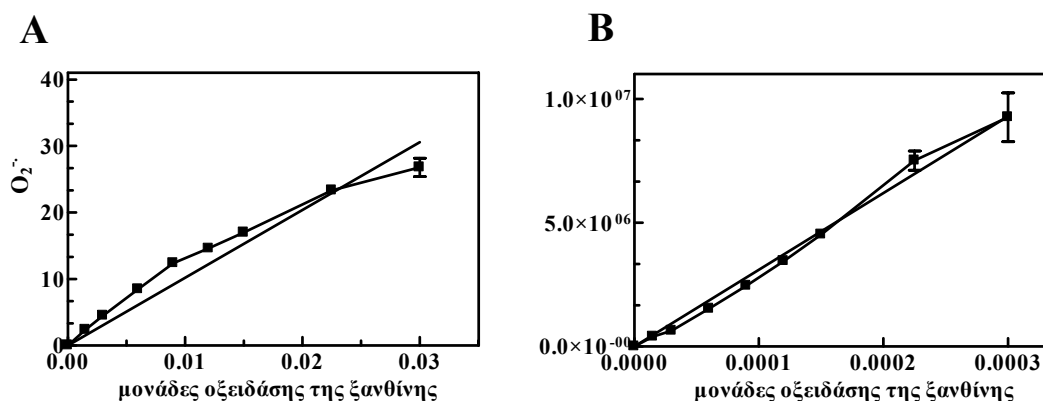
Η παραγωγή του O_2^- από τα κύτταρα φύλλου και τους πρωτοπλάστες μελετήθηκε με την βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας της λουσιγενίνης (lucigenin, Sigma, Munchen, Germany), η οποία είναι ειδική για την ανίχνευση του O_2^- (Corbisier *et al.*, 1987). Παρά το γεγονός ότι η εγκυρότητα της λουσιγενίνης ως ιχνηλάτη χημειοφωταύγειας του O_2^- έχει αμφισβητηθεί (Liochev and Fridovich, 1997), πρόσφατα παρουσιάστηκε μία λεπτομερής και εμπειριστατωμένη μελέτη (Li *et al.*, 1998), που αποκαθιστά την αξία της λουσιγενίνης για την ανίχνευση O_2^- σε ενζυμικά ή κυτταρικά συστήματα.

Η βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 2 mL τοποθετώντας σε δοκιμαστικό σωλήνα σπινθηρισμού τα ακόλουθα: 0,8 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 1 mL από το μέσο καλλιέργειας (Auh and Murphy, 1995). Όλες οι άλλες συνθήκες, που περιγράφηκαν για την βιοδοκιμή του H_2O_2 , ακολουθήθηκαν και στην περίπτωση του O_2^- . Οι κρούσεις μετρήθηκαν κάθε 6 sec για 0,5 min και οι δύο τελευταίες τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής.

Το σύστημα ξανθίνης/οξειδάση της ξανθίνης (Murphy and Auh, 1996) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συσχετισθούν οι τιμές της χημειοφωταύγειας (cpm) με την συγκέντρωση του O_2^- (Εικ. 1.3). Περιληπτικά, δείγμα οξειδάσης της ξανθίνης (grade I, Sigma) δοκιμάστηκε στην οξείδωση της ξανθίνης: 0-0,03 μονάδες οξειδάση της ξανθίνης και 0,05 mM ξανθίνης, προστέθηκαν σε διάλυμα αντίδρασης (0,1 M Gly-NaOH, pH 9,0 και 1 mM EDTA) και παρακολούθηθηκε η οξείδωση της ξανθίνης σε ουρικό οξύ στο φωτόμετρο (Perkin-Elmer) από τον ρυθμό αύξησης της απορρόφησης στα 290 nm (A_{290}). Ο ρυθμός της αντίδρασης ($\text{mol } O_2^- \text{ min}^{-1}$) υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας τον ρυθμό αύξησης της απορρόφησης στα 290 nm ($A_{290} \text{ min}^{-1}$) με τον όγκο της αντίδρασης (1 mL) και διαιρώντας με την σταθερά απορρόφησης του ουρικού οξέος (συντελεστής απόσβεσης στα 290 nm = $1,22 \times 10^7 \text{ mL mol } O_2^{-1} \text{ cm}^{-1}$) και το μήκος της κυψελίδας (1 cm) και, τέλος πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα επί 2, λαμβάνοντας υπόψη ότι για 1

mol ξανθίνης που οξειδώνεται παράγονται 2 mol υπεροξειδικής ρίζας (Εικ. 1.3.A) (Corbisier *et al.*, 1987)

Αντίστοιχο δείγμα της οξειδάσης της ξανθίνης αραιώθηκε 1:100 και αφού προστέθηκαν 0,05 mM ξανθίνη και 0,1 mM λουσιγενίνη μετρήθηκε η χημειοφωταύγεια (Εικ. 1.3.B). Ο ρυθμός οξειδωσης της ξανθίνης και η χημειοφωταύγεια παρουσίασαν αύξηση ανάλογη της ποσότητας του ενζύμου. Θεωρώντας ότι τηρείται η αναλογικότητα στις συγκρίσεις μεταξύ των δύο βιοδοκιμών, υπολογίστηκε για συγκεκριμένο επίπεδο χημειοφωταύγειας ο ρυθμός της αντίδρασης. Έτσι, ένα εκατομμύριο κρούσεις (10^6 crpm, στην βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας) αντιστοιχεί σε $38,34 \pm 4,1$ pmol O_2^- , όπως έχει προκύψει από 3 διαφορετικά πειράματα. Η Εικόνα 1.3 παρουσιάζει ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα. Η παραπάνω τιμή χρησιμοποιήθηκε για την μετατροπή των crpm σε pmol O_2^- .



Εικόνα. 1.3. Συσχέτιση των βιοδοκιμών της ενζυμικής παραγωγής O_2^- (A) και της χημειοφωταύγειας (B). Από το συγκεκριμένο πείραμα προκύπτει ότι 10^6 crpm στην βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας αντιστοιχεί σε $33,14 \pm 2,1$ pmol O_2^- .

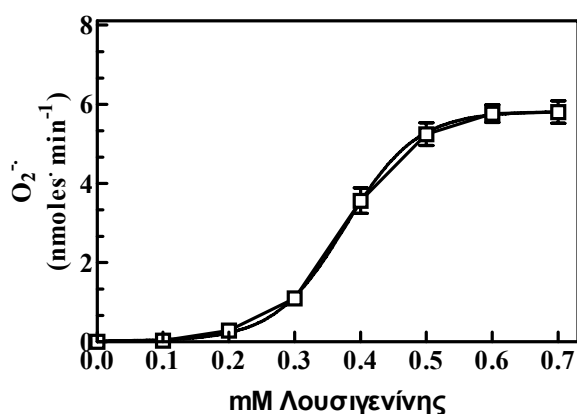
1.3.7. Βιοδοκιμή της συνθάσης του O_2^-

Η βιοδοκιμή αυτή στηρίχθηκε στην χημειοφωταύγεια της λουσιγενίνης σύμφωνα με τους Murphy and Auh (1996). Ελέγχθηκαν τα ακόλουθα:

- Επίδραση της συγκέντρωσης της λουσιγενίνης

Η επίδραση της συγκέντρωσης της λουσιγενίνης στην χημειοφωταύγεια παρουσιάζεται στην Εικ.1.4. Εμφανίζεται μία σιγμοειδής συσχέτιση, εξαρτώμενη από την δόση, από όπου εκτιμάται η $0,40 \pm 0,02$ mM ως άριστη

συγκέντρωση λουσιγενίνης για την βιοδοκιμή της συνθάσης του O_2^- . Η συγκέντρωση αυτή χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις βιοδοκιμές, που ακολουθούν.



Εικόνα 1.4. Επίδραση της συγκέντρωσης της λουσιγενίνης στην ενεργότητα της συνθάσης του O_2^- σε κυτταρικές μεμβράνες καπνού. Η βιοδοκιμή έγινε σε 100 mM Glycine-NaOH, pH 9,0, 1 mM EDTA, 200 μ M NADH, 0,02% (v/v) Triton X100 και 5 μ g

μεμβρανικής πρωτεΐνης.

•Επίδραση της συγκέντρωσης του Triton X100

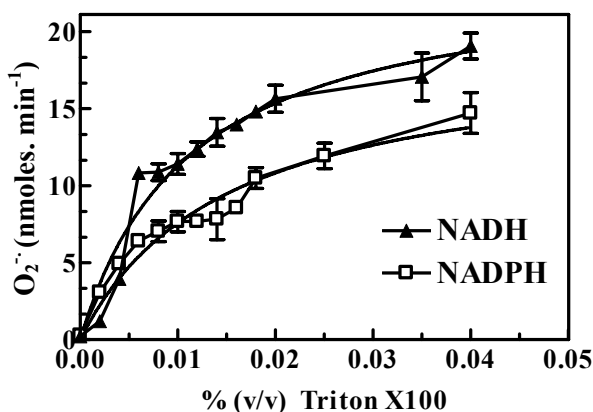
Στην Εικ.1.5 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του Triton X100 στην ενεργότητα της υπεροξειδικής συνθάσης από κυτταρικές μεμβράνες καπνού. Παρατηρείται έντονη επίδραση της συγκέντρωσης του απορρυπαντικού στην παραγωγή O_2^- . Ως άριστη συγκέντρωση για την βιοδοκιμή της συνθάσης του O_2^- θεωρείται το 0,02% (v/v) και αυτή η συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις βιοδοκιμές, που ακολουθούν.

•Επίδραση της ποσότητας της μεμβρανικής πρωτεΐνης

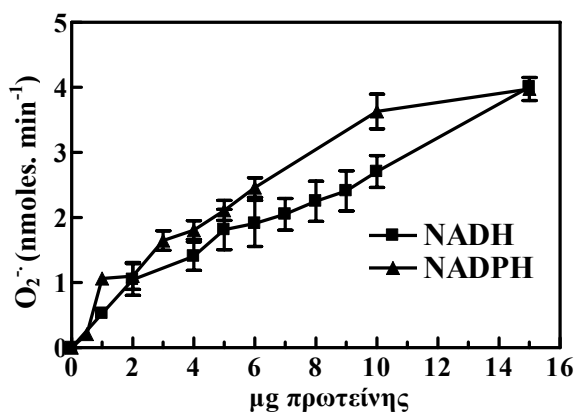
Ο ρυθμός της παραγωγής O_2^- αυξάνει αναλογικά με την αύξηση της ποσότητας της μεμβρανικής πρωτεΐνης (Εικ. 1.6), αποδεικνύοντας την πιστότητα της βιοδοκιμής.

παρέμειναν βιώσιμοι μετά από 8 ημέρες σε καλλιέργεια για τον καπνό και την άμπελο, αντίστοιχα (Εικ. 2.4). Η παράταση της επώασης με

κυτταρινάση Onozuka στις 16 h είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας σε ποσοστά 40,5% και 28% για τους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου αντίστοιχα. Αντίθετα, με την κυτταρινάση Worthington, η βιωσιμότητα μειώθηκε στο 71,5% και 68% για τους δύο πληθυσμούς πρωτοπλαστών, αντίστοιχα (Εικ. 2.4).



Εικόνα 1.5. Επίδραση της συγκέντρωσης του Triton X100 στην ενεργότητα της συνθάσης του $O_2^{\cdot-}$ σε κυτταρικές μεμβράνες καπνού. Η βιοδοκιμή έγινε σε 100 mM Glycine-NaOH, pH 9,0, 1 mM EDTA, 200 μ M NADH ή 100 μ M NADPH, 0,4 mM λουσιγενίνη και 5 μ g μεμβρανικής πρωτεΐνης.



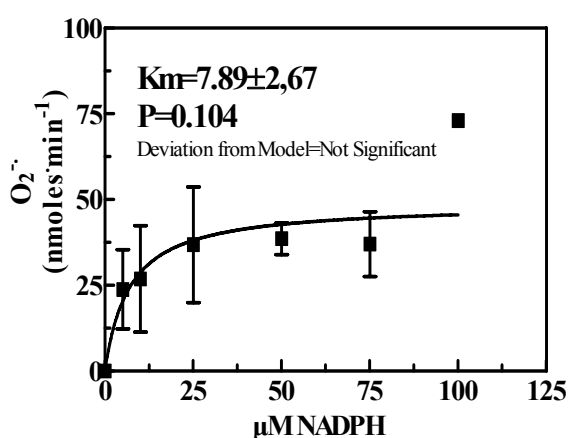
Εικόνα 1.6. Επίδραση της ποσότητας της μεμβρανικής πρωτεΐνης στην ενεργότητα της συνθάσης του $O_2^{\cdot-}$ σε κυτταρικές μεμβράνες καπνού. Η βιοδοκιμή έγινε σε 100 mM Glycine-NaOH, pH 9,0, 1 mM EDTA, 0,02% (v/v) Triton X100, 200 μ M NADH ή 100 μ M NADPH και 0,4 mM λουσιγενίνη.

•Προσδιορισμός του K_m για το NADPH και το NADH της συνθάσης του $O_2^{\cdot-}$ σε μεμβρανικά παρασκευάσματα καπνού και αμπέλου

Η εξάρτηση της συνθάσης του $O_2^{\cdot-}$ από την συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν διαφορετική για το NADPH και το NADH, αν και στις

δύο περιπτώσεις η κινητική ακολουθούσε το μοντέλο Michaelis-Menten. Οι τιμές των K_m παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται η καμπύλη συσχέτισης της συγκέντρωσης του NADPH με την ενεργότητα της συνθάσης του O_2^- σε μεμβρανικά παρασκευάσματα καπνού (Εικ. 1.7).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η βιοδοκιμή της συνθάσης του O_2^- έγινε σε 1 mL διάλυμα αντίδρασης που περιείχε 100 mM Glycine-NaOH, pH 9,0, 1 mM EDTA, 200 μ M NADH ή 100 μ M NADPH, 0,02% (v/v) Triton X100 και 0,4 mM λουσιγενίνη, με ή χωρίς αναστολείς. Μετά από 60 min στο σκοτάδι, μετρήθηκε η χημειοφωταύγεια του διαλύματος σε μετρητή σπινθηρισμού. Η τιμή αυτή (-5 min) χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Αμέσως μετά, την στιγμή 0, 5 μ g μεμβρανικής πρωτεΐνης προστέθηκαν στο διάλυμα και το μίγμα μετρήθηκε για 1 min. Η χημειοφωταύγεια του δείγματος συγκρίνονταν πάντα με μάρτυρα (διάλυμα χωρίς πρωτεΐνη). Στα πειράματα με αναστολείς υπήρχαν μάρτυρες με ίδια συγκέντρωση αναστολέα.



Εικόνα 1.7. Εξάρτηση της ενεργότητας της συνθάσης του O_2^- από την συγκέντρωση του NADPH σε μεμβρανικά παρασκευάσματα καπνού. Η βιοδοκιμή έγινε σε 100 mM Glycine-NaOH, pH 9,0, 1 mM EDTA, 0,02% (v/v) Triton X100, 0,4 mM λουσιγενίνη και 5 μ g μεμβρανικής πρωτεΐνης. Η καμπύλη αντιπροσωπεύει την προσαρμογή ελάχιστων τετραγώνων από τρία ανεξάρτητα πειράματα, στην εξίσωση Michaelis-Menten, με διαδικασία μη γραμμικής συσχέτισης.

1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

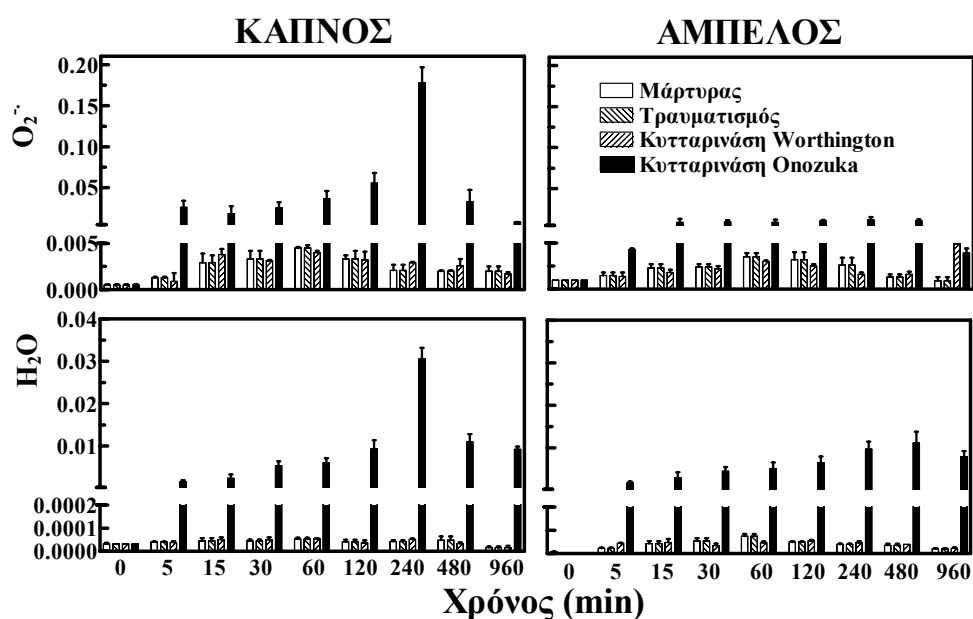
1.3.1. Παραγωγή ΕΜΟ κατά την επίδραση επαγωγέων σε φύλλα και

πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου

Οι παράγοντες, που ερευνήθηκαν ως πιθανά αίτια οξειδωτικής καταπόνησης κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών, είναι: (α) τα ενζυμικά παρασκευάσματα αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, (β) ο τραυματισμός των φύλλων και/ή (γ) η ίδια η διαδικασία της απομόνωσης. Επιπλέον, μελετήθηκε η παραγωγή ΕΜΟ από φύλλα καπνού και αμπέλου κατά την επίδραση του μη παθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. Phaseolicola, προκειμένου να συγκριθεί η αντίδραση των δύο φυτικών ειδών κατά την αντίδραση υπερευαισθησίας, η οποία συνοδεύεται με γένεση ΕΜΟ (Tenhaken *et al.*, 1995).

1.3.1.1. Επίδραση των παρασκευασμάτων κυτταρινάσης και του τραυματισμού.

Η συσσώρευση O_2^- και H_2O_2 κατά την επίδραση επαγωγέων σε φύλλα καπνού και αμπέλου παρακολουθήθηκε για 16 h στο μέσο καλλιέργειας των φύλλων, χρησιμοποιώντας τις βιοδοκιμές χημειοφωταύγειας της λουσιγενίνης και της λουμινόλης, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην Εικ. 1.8, στο μέσο καλλιέργειας του μάρτυρα (ολόκληρο, μη τραυματισμένο φύλλο), υπάρχει χαμηλή συσσώρευση O_2^- και καθόλου συσσώρευση H_2O_2 και στα δύο φυτικά είδη (Εικ. 1.8). Η προσθήκη καθαρής κυτταρινάσης Worthington δεν επηρέασε την συσσώρευση των ΕΜΟ σε αντίθεση με την κυτταρινάση Onozuka, η



Εικόνα 1.8. Επίδραση των παρασκευασμάτων της κυτταρινάσης και του τραυματισμού στην παραγωγή του O_2^- και του H_2O_2 από φύλλο καπνού και αμπέλου. Σε λωρίδες φύλλου (10x5 mm) προστέθηκε 1% κυτταρινάση Onozuka ή 0,25% κυτταρινάση Worthington, την στιγμή 0. Η παραγωγή του O_2^- και του H_2O_2 μελετήθηκε επίσης σε έντονα τραυματισμένα φύλλα. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 7 ανεξάρτητα πειράματα.

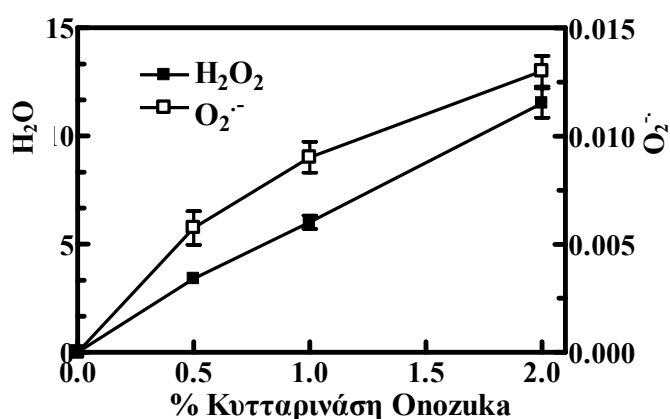
προσθήκη της οποίας προκάλεσε σημαντική αύξηση στην συσσώρευση και των δύο EMO στο μέσο καλλιέργειας του καπνού, αλλά μόνο του H_2O_2 στα φύλλα αμπέλου (Εικ. 1.8). Στον καπνό, και οι δύο EMO άρχισαν να συσσωρεύονται αμέσως μετά την προσθήκη της κυτταρινάσης Onozuka, 4 h μετά έφτασαν στην μέγιστη τιμή τους και στην συνέχεια μειώθηκαν. Στην άμπελο, η συσσώρευση O_2^- ήταν πολύ χαμηλή, ενώ το H_2O_2 , όπως και στον καπνό, άρχισε να αυξάνει ραγδαία μετά την προσθήκη της κυτταρινάσης Onozuka, παρουσίασε μέγιστη τιμή μετά από 8 h και η αντίστοιχη μέγιστη τιμή του ήταν 3 φορές χαμηλότερη από εκείνη του καπνού (Εικ 1.8).

Στον καπνό οι μέγιστες τιμές συσσώρευσης O_2^- και H_2O_2 στο μέσο καλλιέργειας, οι οποίες αντιστοιχούν σε 1 mg φρέσκου ιστού, ήταν $0,180 \pm 0,013$ nM and $0,03 \pm 0,008$ μ M, ενώ στην άμπελο οι αντίστοιχες τιμές ήταν $0,012 \pm 0,002$ nM and $0,011 \pm 0,003$ μ M. Οι δύο EMO, που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν επαγωγή της παραγωγής τους από έντονο τραυματισμό των φύλλων, σε κανένα από τα δύο φυτικά είδη (Εικ. 1.8). Η συσσώρευση O_2^- και H_2O_2 παρουσίασε εξάρτηση από την ποσότητα της κυτταρινάσης Onozuka, και στα δύο φυτά. Η ανταπόκριση δόσης (dose-response) της παραγωγής EMO που παρουσίασαν τα φύλλα καπνού μετά από προσθήκη κυτταρινάσης Onozuka, φαίνεται στην Εικόνα 1.9.

Σε πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, οι οποίοι απομονώθηκαν με

κυτταρινάση Worthington, αμέσως μετά την απομόνωσή τους, προστέθηκε κυτταρινάση Onozuka και για χρονικό διάστημα 4 h παρακολούθηθηκε η συσσώρευση των EMO (Εικ. 1.10 και 1.11). Οι πρωτοπλάστες καπνού, την στιγμή της απομόνωσης, περιείχαν συνολικά (εξωκυτταρικά+ενδοκυτταρικά) 2,5 nM O_2^- και 40,5 nM H_2O_2 ανά 10^5 πρωτοπλάστες. Οι αντίστοιχες τιμές των πρωτοπλαστών αμπέλου ήταν 0,8 και 6,1 nM. Οι πρωτοπλάστες αυτοί καλλιεργήθηκαν με πυκνότητα 10^5 πρωτοπλάστες ανά mL καλλιέργειας. Το μέσο καλλιέργειας των πρωτοπλαστών καπνού περιείχε 0,3 και 6,6 nM O_2^- και H_2O_2 , αντίστοιχα, ενώ στο μέσο καλλιέργειας των πρωτοπλαστών αμπέλου βρέθηκε 0,1 και 2,5 nM O_2^- και H_2O_2 , αντίστοιχα (Εικ. 1.10).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.10, αμέσως μετά την προσθήκη της



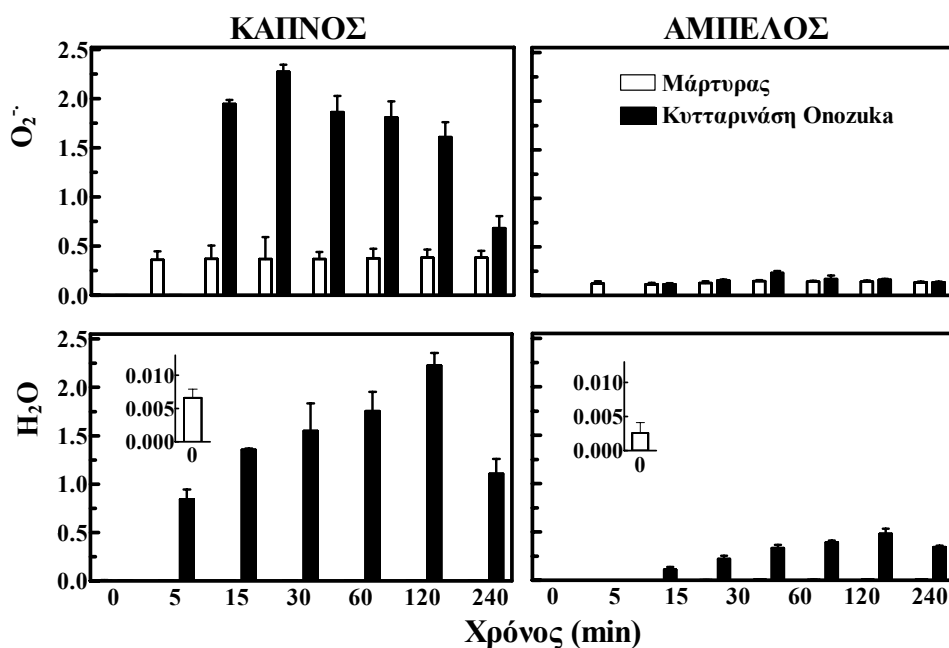
Εικόνα 1.9. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτταρινάσης Onozuka στην παραγωγή του O_2^- και του H_2O_2 από φύλλα καπνού. Οι μετρήσεις έγιναν 60 min μετά την προσθήκη της

κυτταρινάσης. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

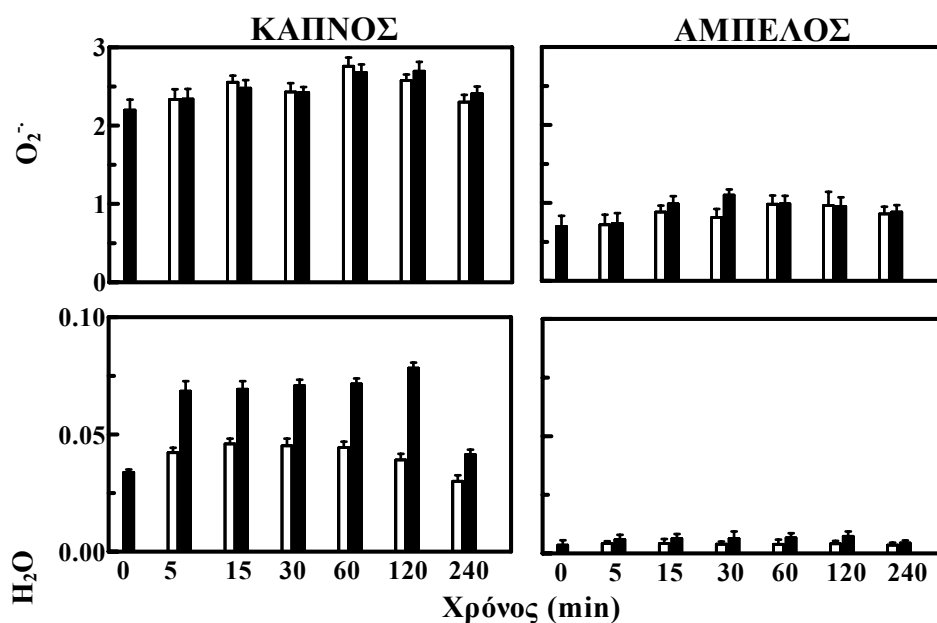
κυτταρινάσης Onozuka ακολούθησε ραγδαία συσσώρευση EMO στο μέσο καλλιέργειας των πρωτοπλαστών καπνού. Η παραγωγή του O_2^- παρουσίασε αύξηση κατά 6 φορές, έφτασε στην μέγιστη τιμή μετά από 15 min και στην συνέχεια μειώθηκε. Το H_2O_2 , το οποίο ήταν πολύ χαμηλό αμέσως μετά την απομόνωση, αυξήθηκε δραματικά (330 φορές) και έφτασε την μέγιστη τιμή του 2 h μετά την μεταχείριση. Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, η

προσθήκη της κυτταρινάσης Opozuka είχε ως αποτέλεσμα το διπλασιασμό της παραγωγής του O_2^- και την αύξηση της συσσώρευσης του H_2O_2 κατά 185 φορές, ενώ οι μέγιστες τιμές παρουσιάστηκαν 2 h μετά την μεταχείριση (Εικ. 1.10). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο μέσο καλλιέργειας των πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου ήταν 2,3 και 0,23 nM για το O_2^- , και 2,22 και 0,48 μM για το H_2O_2 , αντίστοιχα.

Η ενδοκυτταρική συσσώρευση EMO, κατά την επίδραση κυτταρινάσης Opozuka σε πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.11. Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του O_2^- στους πρωτοπλάστες δεν μεταβλήθηκε παρουσία κυτταρινάσης κατά την διάρκεια της μεταχείρισης και παρέμεινε στα επίπεδα του μάρτυρα. Αντίθετα, ανιχνεύτηκε ενδοκυτταρική συσσώρευση H_2O_2 , αμέσως μετά την μεταχείριση (5min), όπου η συγκέντρωση του H_2O_2 αυξήθηκε κατά 50% και 40%, αντίστοιχα, στους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου. Κατά την διάρκεια της μεταχείρισης, παρατηρήθηκε βραδεία και σταδιακή αύξηση της συσσώρευσης του H_2O_2 στους πρωτοπλάστες και των δυο ειδών, η οποία κορυφώθηκε μετά από 2 h, έχοντας φτάσει 2- και 1,8- φορές σε υψηλότερο επίπεδο από τον μάρτυρα, για τους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, αντίστοιχα. Την ίδια χρονική στιγμή παρατηρήθηκε και η



Εικόνα 1.10. Εξωκυτταρική συσσώρευση EMO στους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου μετά από προσθήκη κυτταρινάσης Opozuka. Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν μετά από 4h επίδραση με 0,25% Κυτταρινάση Worthington και 0,5% Macerozyme Opozuka. Η κυτταρινάση Opozuka προστέθηκε στους πρωτοπλάστες (10^5 mL^{-1}) την στιγμή 0 και το μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για τις βιοδοκιμές του O_2^- και του H_2O_2 . Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 5 ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 1.11. Ενδοκυτταρική συσσώρευση EMO από πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου μετά από προσθήκη κυτταρινάσης Opozuka. Η μεταχείριση

περιγράφεται στην Εικ. 1.10. Οι πρωτοπλάστες που προέκυψαν μετά από ήπια φυγοκέντρηση, επαναδιαλύθηκαν στο μέσο καλλιέργειας, χωρίς ωσμωτικό και χρησιμοποιήθηκαν για τις βιοδοκιμές του O_2^- και του H_2O_2 . Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 5 ανεξάρτητα πειράματα.

μέγιστη εξωκυτταρική συσσώρευση του H_2O_2 (Εικ. 1.10). Στην συνέχεια μειώθηκε η εξωκυτταρική και η ενδοκυτταρική συγκέντρωση (Εικ. 1.10, 1.11).

Η εξωκυτταρική τοπολογία της παραγωγής ΕΜΟ κατά την επίδραση κυτταρινάσης Onozuka στους πρωτοπλάστες, ενισχύθηκε από τα αποτελέσματα, που προέκυψαν με την διαδικασία πλυσίματος των πρωτοπλαστών καπνού, όπου μειώθηκε έντονα η εξωκυτταρική συσσώρευση του O_2^- και του H_2O_2 φτάνοντας στο 40% και 0,35% των αντίστοιχων αρχικών τιμών (Πίν.1.3). Το ενδοκυτταρικό επίπεδο του O_2^- δεν μεταβλήθηκε με τα πλυσίματα, αλλά ούτε τροποποιήθηκε από την παρουσία της κυτταρινάσης (Εικ. 1.11). Αντίθετα, το ενδοκυτταρικό επίπεδο του H_2O_2 μειώθηκε κατά 36,5% από το πρώτο πλύσιμο, χωρίς να επηρεασθεί περισσότερο. Το γεγονός ότι ακόμα και μετά το δεύτερο πλύσιμο, εντοπίστηκαν ΕΜΟ στο μέσο καλλιέργειας και τους πρωτοπλάστες, δεν φαίνεται να οφείλεται στην κυτταρινάση, αλλά μάλλον σχετίζεται με την ίδια την διαδικασία, η οποία μπορεί να παράγει ΕΜΟ (Qian *et al.*, 1993).

Πίνακας 1.3. Επίδραση της διαδικασίας του πλυσίματος στην συσσώρευση ΕΜΟ σε πρωτοπλάστες καπνού, μετά από 30 min επίδρασης κυτταρινάσης Onozuka. Η μεταχείριση και η διαδικασία περιγράφονται στο Υποκεφάλαιο 1.3.3. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

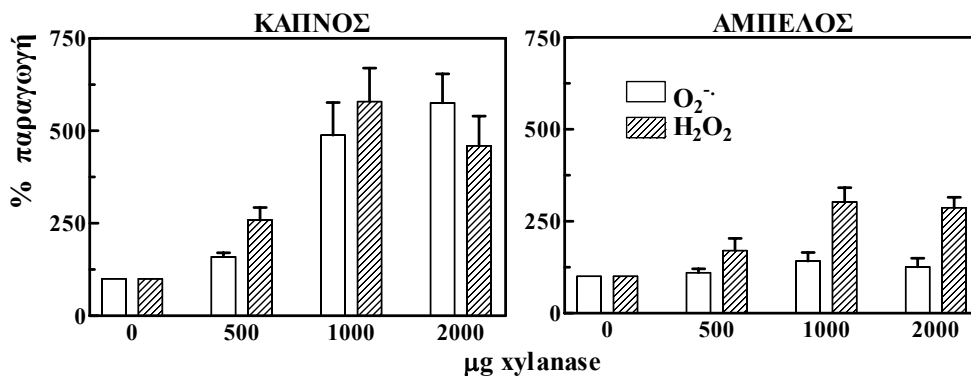
	ΕΜΟ (nM)	
	Εξωκυτταρικά	
	O_2^-	H_2O_2
μέσο καλλιέργειας	1,9 \pm 0,2	1550,5 \pm 23,2
1 ^ο πλύσιμο	1,2 \pm 0,1	41,8 \pm 3,1
2 ^ο πλύσιμο	0,7 \pm 0,1	5,7 \pm 1,2

	Ενδοκυτταρικά	
	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
πρωτοπλάστες	2,4±0,4	71,3±5,3
1 ^ο πλύσιμο	1,9±0,2	25,9±2,3
2 ^ο πλύσιμο	2,0±0,2	26,8±3,4

1.3.1.2. Επίδραση καθαρής ξυλανάσης στην παραγωγή EMO

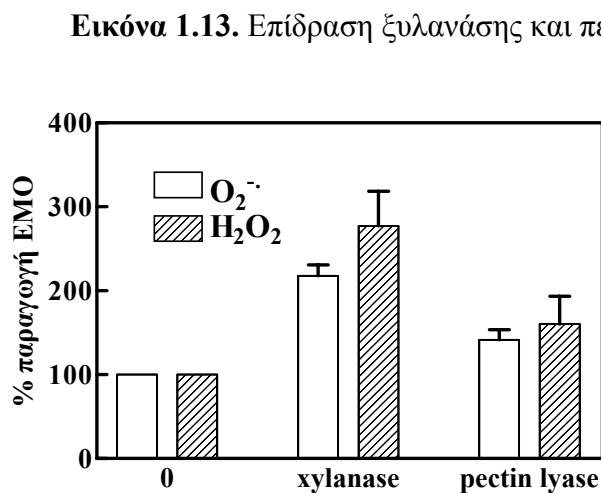
Η μυκητιακή πρωτεΐνη β-1,4-ενδοξυλανάση απομονώθηκε από *Trichoderma viride* (Fuchs *et al.*, 1989) και χαρακτηρίστηκε ως ξυλανάση ικανή να επάγει την βιοσύνθεση του αιθυλενίου (ethylene induced xylanase, EIX). Η EIX ήταν εξαιρετικά ενεργή στην επαγωγή των σχετικών με παθογένεια, πρωτεϊνών και των φυτοαλεξινών, και προκαλούσε διαρροή ηλεκτρολυτών και αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού και τομάτας (Bailey *et al.*, 1992, Avni *et al.*, 1994). Υποστηρίζεται ότι η EIX λειτουργεί ως επαγωγέας της αμυντικής απόκρισης των φυτών, ιδιότητα η οποία είναι μάλλον ανεξάρτητη από τη βιοχημική ενεργότητα του ενζύμου (Sharon *et al.*, 1993), και ίσως συνδέεται με την παραγωγή EMO, η οποία έχει ανιχνευτεί σε κύτταρα ρυζιού (Ishii, 1988).

Η ξυλανάση, μαζί με την πεκτινική λυάση, αποτελούν προσμίξεις των εμπορικών ενζυμικών παρασκευασμάτων που χρησιμοποιούνται για την αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος. Ο Ishii (1988) ανέφερε ότι η λυάση της πηκτίνης, η οποία απαντάται στα ενζυμικά παρασκευάσματα για την αποδόμηση των πηκτινών (macerozyme) έχει παρόμοιες επιδράσεις με αυτές της ξυλανάσης αν και πιο ήπιες. Προσθήκη ξυλανάσης σε φύλλα καπνού και αμπέλου προκάλεσε αύξηση της παραγωγής του O₂⁻ και του H₂O₂ (Εικ.1.12). 1000 μg ξυλανάσης οδήγησαν στην μέγιστη συσσώρευση O₂⁻ και H₂O₂ και στα φυτικά είδη, όμως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε κορεσμός (Εικ.1.12). Τα επίπεδα των EMO ήταν υψηλότερα στον καπνό σε σύγκριση με την άμπελο σε όλες τις συγκεντρώσεις της ξυλανάσης, ενώ η μέγιστη αύξηση που παρουσίασε το O₂⁻ και το H₂O₂ στον καπνό και την άμπελο ήταν, αντίστοιχα 4,9- και 1,4-φορές και 5,8- και 3-φορές υψηλότερη από τον μάρτυρα (Εικ.1.12).



Εικόνα 1.12. Επίδραση ξυλανάσης στην παραγωγή O₂⁻ και H₂O₂ από φύλλα καπνού και αμπέλου. Οι μετρήσεις έγιναν στο μέσο επώασης των φύλλων 4 h μετά την προσθήκη της ξυλανάσης. Οι τιμές δίδονται σε σχέση με τον μάρτυρα (100) και είναι οι μέσοι όροι ± SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Η ξυλανάση και η πεκτινική λύαση προκαλούν συσσώρευση EMO στους πρωτοπλάστες καπνού, όμως η επίδραση της ξυλανάσης ήταν εντονότερη, καθώς το O₂⁻ και το H₂O₂ αυξήθηκαν αντίστοιχα 2,2- και 2,8-φορές. Οι αντίστοιχες τιμές παρουσία πεκτινικής λύασης ήταν 1,4- και 1,6-φορές (Εικ. 1.13).

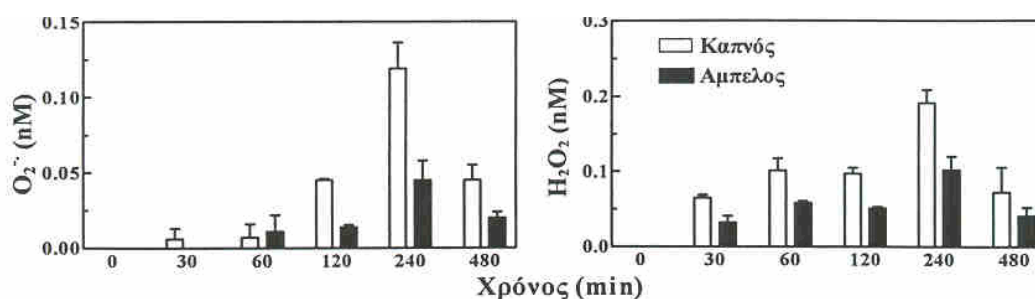


Εικόνα 1.13. Επίδραση ξυλανάσης και πεκτινικής λύασης στην παραγωγή O₂⁻ και H₂O₂ από πρωτοπλάστες καπνού. Οι μετρήσεις έγιναν στο μέσο καλλιέργειας των πρωτοπλαστών 2 h μετά την προσθήκη των ενζύμων. Οι τιμές δίδονται σε σχέση με το μάρτυρα (100). Η συγκέντρωση των ενζύμων ήταν 1000 ng ξυλανάσης και 750 ng πεκτινικής λύασης για 10⁵ πρωτοπλάστες. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

1.3.1.3. Επίδραση του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* στην παραγωγή EMO

Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* προκαλεί

αντίδραση υπερευαισθησίας στα φυτά που δεν είναι ξενιστές του, όπως ο καπνός και η τομάτα. Η αντίδραση υπερευαισθησίας είναι ένας γρήγορος κυτταρικός θάνατος περιορισμένης έκτασης, κοινός σε όλα τα φυτά που εκδηλώνουν ανθεκτικότητα σε παθογόνα (Levine *et al.*, 1994) και εκτός άλλων, συνοδεύεται από παραγωγή EMO (Tenhaken *et al.*, 1995). Η προσθήκη του βακτηρίου σε φύλλα καπνού και αμπέλου προκάλεσε συσσώρευση του O_2^- και του H_2O_2 και στα δύο φυτά, με μέγιστα επίπεδα μετά από 4 h, όμως η μέγιστη παραγωγή του O_2^- και του H_2O_2 ήταν 2,6- και 1,9-φορές, αντίστοιχα, χαμηλότερη στην άμπελο (Εικ. 1.14).



Εικ.1.14. Επίδραση του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* στην παραγωγή EMO από φύλλο καπνού και αμπέλου. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 4 ανεξάρτητα πειράματα.

1.3.2. Ενζυμικά συστήματα παραγωγής EMO

1.3.2.1. Μελέτη των συστημάτων παραγωγής EMO σε πρωτοπλάστες

Προκειμένου να εξεταστεί ο ρόλος της SOD στην παραγωγή H_2O_2 , που περιγράφηκε στο Υποκεφάλαιο 1.3.3.1, προστέθηκε ο αναστολέας της Cu/ZnSOD, το DDC (N,N-diethyldithiocarbamate) (Heikkila *et al.*, 1976), μαζί με την κυτταρινάση Onozuka, σε πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου. Αν η αναστολή της SOD προκαλούσε συσσώρευση του O_2^- και αναστολή της συσσώρευσης H_2O_2 , τότε το H_2O_2 θα προερχόταν άμεσα από το O_2^- με την μεσολάβηση της SOD. Τέτοιο αποτέλεσμα δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα δύο φυτικά είδη (Εικ. 1.15). Αντίθετα, η προσθήκη εξωγενούς SOD στους πρωτοπλάστες μείωσε δραστικά την επαγόμενη από την κυτταρινάση

Onozuka-παραγωγή του $O_2^{\cdot-}$ και προκάλεσε αύξηση της συσσώρευσης του H_2O_2 στους πρωτοπλάστες και των δύο φυτικών ειδών (Εικ. 1.15). Ακόμα, η προσθήκη καταλάσης (catalase) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συσσώρευσης του H_2O_2 , υποστηρίζοντας την εξειδίκευση της μεθόδου (Εικ. 1.15).

Για να ελεγχθεί εάν η παραγωγή των EMO από τους πρωτοπλάστες σχετίζεται με την ενεργότητα των ενζύμων που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή, δηλαδή της NADPH-οξειδάσης των θηλαστικών ή της περοξειδάσης, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ειδικοί αναστολείς:

- Για την NADPH-οξειδάση των θηλαστικών χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών αναστολείς:

- ⇒ DPI και quinacrine, οι οποίοι δεσμεύονται στην φλαβοπρωτεΐνη του συμπλόκου της οξειδάσης (Cross and Jones, 1986, Cross and Jones, 1991), και

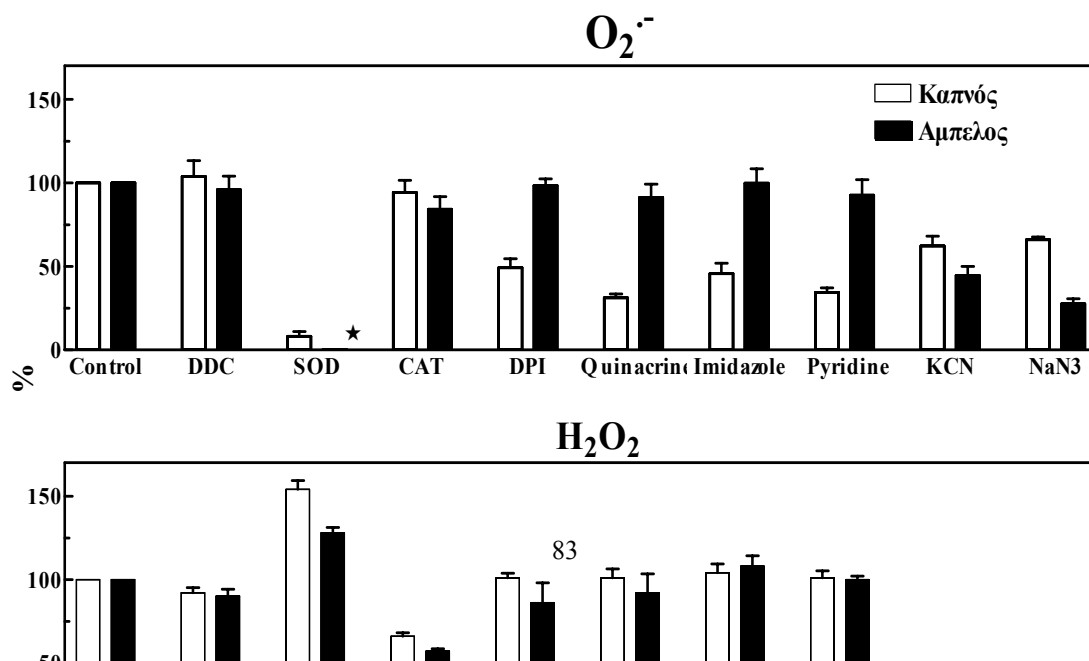
- ⇒ imidazole και pyridine, που δεσμεύονται στο b τύπου κυτόχρωμα του συμπλόκου της οξειδάσης (Iizuka *et al.*, 1985).

- Για την περοξειδάση χρησιμοποιήθηκε το

- ⇒ KCN και το

- ⇒ NaN_3 .

Στους πρωτοπλάστες καπνού, 25 μ M DPI και 0,5 mM quinacrine ανάστειλαν την επαγόμενη από κυτταρινάση Onozuka παραγωγή του $O_2^{\cdot-}$ κατά 50% και 69%, αντίστοιχα (Εικ. 1.15), ενώ 10mM imidazole και 20 mM pyridine



Εικόνα 1.15. Επίδραση των αναστολέων, της εξωγενούς SOD και της καταλάσης στην παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 από πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου κατά την προσθήκη κυτταρινάσης Onozuka. Οι αναστολείς προστέθηκαν στους πρωτοπλάστες 10 min πριν την προσθήκη της κυτταρινάσης. Οι μετρήσεις έγιναν στο μέσο καλλιέργειας 30 min μετά την προσθήκη της κυτταρινάσης. Οι τιμές δίδονται σε σχέση με τον μάρτυρα (100%). Η ενεργότητα παρουσία αναστολέα, χωρίς πρωτοπλάστες, έχει αφαιρεθεί. Η συγκέντρωση των αναστολέων ήταν 10 μ M DDC, 25 u/ml SOD, 100 u/mL CAT, 25 μ M DPI, 0,5 mM Quinacrine, 10 mM Imidazole, 20 mM Pyridine, 50 μ M KCN και 5 mM NaN_3 . Ο αστερίσκος (★) δηλώνει αρνητική τιμή, χαμηλότερη του μάρτυρα. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 5 ανεξάρτητα πειράματα.

προκάλεσαν μείωση της παραγωγής του $O_2^{\cdot-}$ κατά περίπου 55% και 65%, αντίστοιχα (Εικ. 1.15). Ουδείς από αυτούς τους αναστολείς επηρέασε την παραγωγή του H_2O_2 . Η προσθήκη των αναστολέων της περοξειδάσης στους πρωτοπλάστες καπνού, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συσσώρευσης και των δύο EMO: όταν χρησιμοποιήθηκε 50 μ M KCN ή 5 mM NaN_3 , η συσσώρευση του $O_2^{\cdot-}$ μειώθηκε κατά περίπου 40% και 35%, αντίστοιχα, ενώ και οι δύο αναστολείς προκάλεσαν 100% αναστολή της παραγωγής του H_2O_2 (Εικ. 1.15). Η παραγωγή EMO στους πρωτοπλάστες αμπέλου δεν επηρεάστηκε από τους αναστολείς της NADPH-οξειδάσης, παρουσίασε όμως έντονη μείωση όταν χρησιμοποιήθηκαν KCN και NaN_3 (Εικ. 1.15): η παραγωγή του υπεροξειδίου μειώθηκε κατά 55% και 70%, κατά την προσθήκη KCN and NaN_3 , αντίστοιχα, και η παραγωγή του H_2O_2 αναστάλθηκε κατά 100% (Εικ. 1.15).

Τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι είναι πιθανό να συμμετέχουν διαφορετικά ενζυμικά συστήματα στην επαγόμενη από την κυτταρινάση, γένεση των EMO στα δυο φυτικά είδη: στον καπνό φαίνεται να υπάρχει ένα ένζυμο παρόμοιο με την NADPH-οξειδάση των θηλαστικών, αφού οι ειδικοί

αναστολείς του προκάλεσαν μείωση της συσσώρευσης του O_2^- και δεν επέδρασαν καθόλου στην παραγωγή του H_2O_2 . Ένα άλλο ένζυμο, με ιδιότητες περοξειδάσης, φαίνεται να συμβάλει στην δημιουργία του H_2O_2 , ενώ συγχρόνως έχει κάποιο ρόλο στην παραγωγή του O_2^- . Τα δύο αυτά ένζυμα ίσως λειτουργούν σε συνδυασμό ή έχουν διαφορετική κινητική. Στην περίπτωση των πρωτοπλαστών της αμπέλου, τα στοιχεία τείνουν στην παρουσία μόνο του αντίστοιχου με περοξειδάση ενζύμου, το οποίο φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την παραγωγή και των δύο EMO (Εικ. 1.15).

1.3.4.2. Ενεργότητα της συνθάσης του O_2^- σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου

Σε μια προσπάθεια να χαρακτηριστεί περισσότερο το σύστημα παραγωγής O_2^- στον καπνό και την άμπελο, απομονώθηκαν κυτταρικές μεμβράνες από πρωτοπλάστες και ελέγχθησαν για ενεργότητα NAD(P)H-εξαρτώμενης συνθάσης του O_2^- (Πίν. 1.4). Οι κυτταρικές μεμβράνες απομονώθηκαν από πρωτοπλάστες-μάρτυρα και από πρωτοπλάστες στους οποίους είχε προστεθεί 1% κυτταρινάση Onozuka για 30 min, διάρκεια κατά την οποία η συσσώρευση του O_2^- και του H_2O_2 είχε ήδη αρχίσει (Εικ. 1.10). Η ενεργότητα της συνθάσης του O_2^- παρουσίασε ισχυρή εξάρτηση από την παρουσία απορρυπαντικού (Triton X100), ανεξάρτητα από το υπόστρωμα (NADPH ή NADH) που χρησιμοποιήθηκε. Η λανθάνουσα ενεργότητα [1-(ενεργότητα χωρίς Triton)/(μέγιστη ενεργότητα με Triton)] ήταν $1,0 \pm 0,02$, και η τιμή αυτή αποτελεί τον μέσο όρο από 6 διαφορετικές παρασκευές κυτταρικής μεμβράνης. Η ισχυρή διεγερτική επίδραση του απορρυπαντικού στην σύνθεση O_2^- από κυστίδια κυτταρικής μεμβράνης, συνηγορεί στην θεωρία ότι οι θέσεις οξείδωσης της συνθάσης του O_2^- είναι στην κυτοπλασμική πλευρά των κυστιδίων, απροσπέλαστη για το NADPH ή το NADH κατά την απουσία του απορρυπαντικού (Murphy and Auh, 1996).

Πίνακας 1.4. Ειδική ενεργότητα της συνθάσης του O_2^- σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Οι μεμβράνες απομονώθηκαν από πρωτοπλάστες, μετά από επίδραση ή όχι (μάρτυρας) κυτταρινάσης Onozuka. Η βιοδοκιμή περιγράφεται στα Υποκεφάλαιο 2.7.

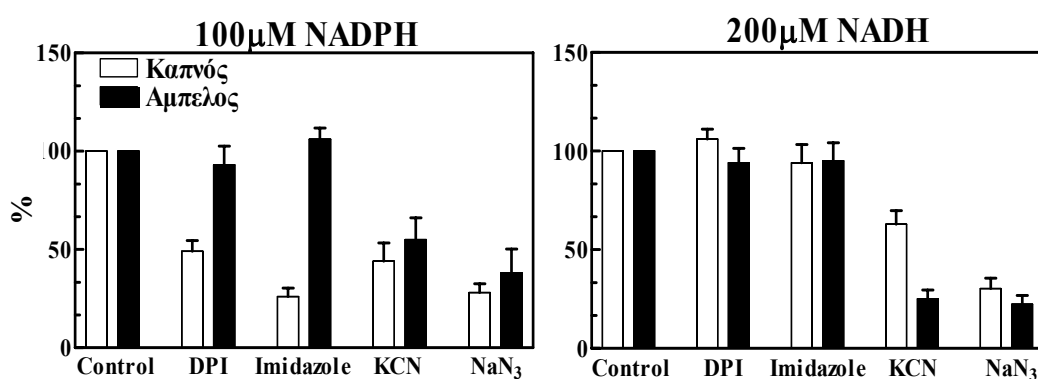
nmol O₂⁻ · mg prot⁻¹ · min⁻¹		
μεταχείριση/φυτικό	NADPH	NADH
καπνός		
μάρτυρας	163,5± 4,9	110,2± 2,6
Κυτταρινάση Onozuka	150,0±11,8	97,1±15,4
άμπελος		
μάρτυρας	44,2± 4,6	65,3± 8,4
Κυτταρινάση Onozuka	38,0± 6,9	55,8±10,5
Km (μM)		
υπόστρωμα	NADPH	NADH
καπνός	7,9± 2,7	102,5±6,1
αμπέλι	32,6± 7,8	43,1±8,3

Σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες καπνού, η ενεργότητα της συνθάσης του O₂⁻ ήταν υψηλότερη σε σχέση με την άμπελο, ανεξάρτητα από το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε (Πίν. 1.4). Η παραγωγή του O₂⁻ από τις κυτταρικές μεμβράνες καπνού, είχε διαφορετική συγγένεια για το υπόστρωμα (NADPH ή NADH), αν και τα δύο ακολουθούν την κινητική Michaelis-Menten. Το Km ήταν 7,9±2,7 μM για το NADPH και 102,5±6,1 μM για το NADH. Στην άμπελο, οι αντίστοιχες τιμές για το Km ήταν 32,6±7,8 και 43,16±8,3 μM (Πίν. 1.4). Οι κυτταρικές μεμβράνες, που απομονώθηκαν από πρωτοπλάστες στους οποίους είχε προστεθεί 1% κυτταρινάση Onozuka παρουσίασαν την ίδια ειδική ενεργότητα, όπως ο μάρτυρας (Πίν. 1.4). Η προσθήκη κυτταρινάσης Onozuka σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες καπνού και αμπέλου δεν προκάλεσε επιπλέον αύξηση της ενεργότητας, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.5, όπου παρουσιάζεται η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων της κυτταρινάσης Onozuka στην ειδική ενεργότητα της συνθάσης του O₂⁻ σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες καπνού.

Πίνακας 1.5. Ειδική ενεργότητα της συνθάσης του O_2^- σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες καπνού, κατά την επίδραση κυτταρινάσης Onozuka. Η βιοδοκιμή περιγράφεται στα Υποκεφάλαιο 1.3.7.

κυτταρινάση	nmol O_2^- · mg prot ⁻¹ ·	
	NADPH	NADH
0	163,5±4,	110,2±
0,001	160,2±3,	107,2±
0,01	161,1±4,	108,2±
0,1	158,9±3,	112,2±

Ελέγχθησαν διάφοροι αναστολείς προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή σχέση των συνθάσης του O_2^- του καπνού και της αμπέλου με άλλες χαρακτηρισμένες οξειδάσες. Τα κυστίδια των κυτταρικών μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη των αναστολέων, απομονώθηκαν από πρωτοπλάστες στους οποίους είχε προστεθεί 1% κυτταρινάση Onozuka. Παρουσία 100 μ M NADPH, 25 μ M DPI μείωσε την ενεργότητα της συνθάσης του O_2^- κατά 50% στον καπνό, αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην άμπελο (Εικ. 1.16). Δέκα mM ιμιδαζολίου είχαν ως αποτέλεσμα αναστολή κατά 75% της παραγωγής του O_2^- στις κυτταρικές μεμβράνες του καπνού (Εικ. 1.16). Με 200 μ M NADH, ούτε το DPI ούτε το ιμιδαζόλιο επηρέασε την παραγωγή του O_2^- σε κανένα από τα δύο φυτικά είδη. Στον καπνό, η παραγωγή του O_2^- μειώθηκε κατά 55% και 70% από 50 μ M KCN και 5 mM NaN_3 , αντίστοιχα, όταν



Εικόνα 1.16. Επίδραση των αναστολέων στην ενεργότητα της συνθάσης του

O_2^- μεμβρανικών παρασκευασμάτων καπνού και αμπέλου. Η βιοδοκιμή περιγράφεται στα Υποκεφάλαιο 1.3.7. Οι τιμές δίδονται σε σχέση με τον μάρτυρα (100%). Η ενεργότητα με αναστολέα, χωρίς ένζυμο έχει αφαιρεθεί. Η συγκέντρωση των αναστολέων ήταν 25 μ M DPI, 10 mM Imidazole, 50 μ M KCN και 5 mM NaN_3 . Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 5 ανεξάρτητα πειράματα.

χρησιμοποιήθηκε NADPH και 40% και 70% όταν χρησιμοποιήθηκε NADH ως υπόστρωμα. Στην άμπελο, 40% αναστολή προκλήθηκε από το KCN και το NaN_3 , στην περίπτωση του NADPH, και 75% και 80% αναστολή αντίστοιχα, όταν χρησιμοποιήθηκε NADH ως υπόστρωμα (Εικ. 1.16).

Συνοψίζοντας, στις κυτταρικές μεμβράνες του καπνού ανιχνεύθηκαν δύο διαφορετικές ενεργότητες συνθάσης O_2^- : μία που παρουσίασε εξειδίκευση στο NADPH και ευαισθησία στο DPI και το ιμιδαζόλιο, και μία δεύτερη NAD(P)H ενεργότητα, ευαίσθητη στο KCN και το NaN_3 (Πίν. 1.4., Εικ. 1.15). Τα στοιχεία αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρώτη ενεργότητα αντιστοιχεί μάλλον σε μια παρόμοια με την θηλαστική NADPH οξειδάση (Doke and Miura, 1995, Murphy and Auh, 1996, Van Gestelen *et al.*, 1997) και η δεύτερη σε μια ενεργότητα NAD(P)H οξειδάσης-περοξειδάσης (Askerlund *et al.*, 1987, Vera-Estrella *et al.*, 1992, Bolwell *et al.*, 1995, Bestwick *et al.*, 1997). Στις κυτταρικές μεμβράνες της αμπέλου εντοπίστηκε μόνο η δεύτερη ενεργότητα συνθάσης O_2^- , η οποία μάλλον αντιστοιχεί στο μοντέλο της NAD(P)H οξειδάσης-περοξειδάσης.

1.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αναγεννητική ικανότητα των πρωτοπλαστών φαίνεται να εμπλέκει δύο τουλάχιστον αναπτυξιακά μονοπάτια: την αναστολή του κυτταρικού θανάτου και την επαγωγή του ολοδυναμικού των πρωτοπλαστών. Αποτελέσματα προηγούμενων μελετών έδειξαν ότι το υπεροξειδίο του υδρογόνου συμμετέχει στην εξαρτώμενη από περοξειδάση, ενδομοριακή αλληλοσύνδεση (cross-linking) της ισοτυροσίνης στα ανασυσταμένα κυτταρικά τοιχώματα (Hahne and Hoffmann, 1984, Gaspar *et al.*, 1989, Iiyama *et al.*, 1994, de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996a, 1996b, 1997). Η συγκριτική μελέτη

αναγεννώμενων πρωτοπλάστων καπνού και μη αναγεννώμενων πρωτοπλάστων αμπέλου, όσον αφορά στην ολική ενεργότητα της περοξειδάσης (peroxidase, POX), η οποία θεωρείται ενδεικτική του ρυθμού πολυμερισμού του κυτταρικού τοιχώματος (Gaspar *et al.*, 1989), φανέρωσε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα POX κατά την καλλιέργεια των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών σε σχέση με τους μη αναγεννώμενους και συνοδευόταν από την έκφραση ειδικών ισοενζύμων (Siminis *et al.*, 1993, de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996b). Ακόμα, η ενεργότητα της NADH-περοξειδάσης (NADH-POX), η οποία παράγει H₂O₂ (Gross *et al.*, 1977, Elstner and Heupel, 1978), δεν ανιχνεύτηκε καθόλου στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού. Όταν η ενεργότητα της περοξειδάσης αναστάλθηκε, οι πρωτοπλάστες μπορούσαν να επιβιώσουν, όχι όμως και να διαιρεθούν, υποδεικνύοντας ότι η ικανότητα για διαίρεση εξαρτιόταν από την μεταβολή της πλαστικότητας του κυτταρικού τοιχώματος (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996a, 1996b).

Από την άλλη πλευρά, το οξειδωτικό στρες μπορεί να επάγει τον κυτταρικό θάνατο. Η ενεργότητα της καταλάσης στην απόσβεση του H₂O₂ ήταν υψηλότερη στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού σε σχέση με τους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες αμπέλου, δείχνοντας διαφορές στην έκφραση ειδικών υπομονάδων (Siminis *et al.*, 1994, de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996b). Η ενεργότητα και τα μετάγραφα της περοξειδάσης του ασκορβικού (ascorbate peroxidase. APO) υπήρχαν μόνο στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες, ενώ όταν η ενεργότητα της APO αναστάλθηκε, οι αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού έχασαν την ικανότητα επιβίωσης (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996a). Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η οξειδωτική καταπόνηση ίσως μειώνει το αναγεννητικό δυναμικό των πρωτοπλάστων, όμως μόνο εκείνοι οι πρωτοπλάστες οι οποίοι είναι ικανοί να παρέχουν εξωκυτταρικό H₂O₂ μπορούν πραγματικά να διαιρεθούν (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996a, 1996b).

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν ο προσδιορισμός των παραγόντων, που οδηγούν σε οξειδωτική καταπόνηση κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών,

ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενεργών μορφών οξυγόνου, η τοπολογία παραγωγής και η ταυτοποίηση των συστημάτων παραγωγής τους στον καπνό και την άμπελο, οι πρωτοπλάστες των οποίων διαφέρουν στην έκφραση του μορφογενετικού δυναμικού.

Η χρησιμοποίηση των βιοδοκιμών της χημειοφωταύγειας, της λουσιγενίνης και της λουμινόλης (Corbisier *et al.*, 1987, Murphy and Huerta, 1990), επέτρεψαν την μελέτη της παραγωγής των EMO κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών και της συσσώρευσης τους εξωκυτταρικά, στο μέσο καλλιέργειας. Πολύ μικρή συσσώρευση O_2^- παρατηρήθηκε στο μέσο καλλιέργειας του φύλλου (μάρτυρας) και των δύο φυτικών ειδών, όπως επίσης και στην περίπτωση των έντονα τραυματισμένων φύλλων ή όταν προστέθηκε καθαρή κυτταρινάση Worthington στο μέσο καλλιέργειας (Εικ. 1.8). Στον καπνό, κατά την προσθήκη στο μέσο επώασης κυτταρινάσης Onozuka, η οποία περιέχει προσμίξεις ξυλανάσης και άλλων ενζύμων (Fuchs *et al.*, 1989), βρέθηκε σημαντική αύξηση και των δύο EMO, ενώ στην άμπελο μόνο το H_2O_2 αυξήθηκε σημαντικά, η δε αύξηση στον καπνό ήταν σημαντικά ανώτερη από εκείνη της αμπέλου (Εικ. 1.8).

Η απουσία παραγωγής EMO κατά την επίδραση κυτταρινάσης Worthington στα φύλλα (Εικ. 1.8) και η εξάρτηση της παραγωγής EMO από την ποσότητα της κυτταρινάσης Onozuka (Εικ. 1.9), είναι και τα δύο στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η γένεση των EMO προκλήθηκε από την συγκεκριμένη κυτταρινάση (Onozuka) και προτείνουν ότι η επαγωγή δεν οφείλεται στην ίδια την ενεργότητα της κυτταρινάσης, αλλά μάλλον στις πιθανές μολύνσεις του παρασκευάσματος της κυτταρινάσης Onozuka με άλλες ενζυμικές ενεργότητες. Το τελευταίο ενισχύεται από την συσσώρευση των EMO, σε φύλλα και πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου (Εικ. 1.12 και 1.13) που παρατηρείται κατά την επίδραση καθαρής ξυλανάσης και πεκτινικής λυάσης, γνωστών για την δράση τους αυτή, που βρίσκονται ως προσμίξεις στα παρασκευάσματα της κυτταρινάσης Onozuka (Ishii, 1988). Η επίδραση της β-1,4-ενδοξυλανάσης σε κύτταρα κάλλου ρυζιού δημιούργησε O_2^- με ταυτόχρονη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων (Ishii, 1988), ενώ σε καλλιέργεια κυττάρων

καπνού προκάλεσε την δυσλειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης (Bailey *et al.*, 1992). Η ξυλανάση αύξησε την βιοσύνθεση φυτοαλεξινών με ταυτόχρονη αύξηση της γλυκοσυλίωσης και ακυλίωσης των στερολών κατά την προσθήκη της σε κύτταρα κάλλου *Nicotiana tabacum* cv KY 14 (Moreau *et al.*, 1994). Τα στερολικά λιπίδια είναι ίσως η κλάση λιπιδίων με την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην κυτταρική μεμβράνη (Moreau and Preising, 1993) και οι προαναφερθείσες αλλαγές πιθανόν να έχουν σημαντικές επιδράσεις στην διαπερατότητα και τις φυσικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης. Καλλιεργούμενα κύτταρα αμπέλου παρουσίασαν νέκρωση, παρόμοια με αντίδραση υπερευαισθησίας, μετά από προσθήκη κυτταρινάσης Onozuka (Calderon *et al.*, 1994). Τέλος, καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων κυττάρων καπνού, ο οποίος εκφράζει ένα ξένο γονίδιο καλμοδουλίνης, παρουσίασε αύξηση της παραγωγής EMO μετά από επίδραση κυτταρινάσης (Harding *et al.*, 1997).

Έχει αναφερθεί ότι κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών ελευθερώνονται φυτοτοξικοί παράγοντες από το κυτταρικό τοίχωμα (Hahne and Lorz, 1988). Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, δεν αποκλείουν την πιθανότητα ότι συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος προκαλούν παραγωγή EMO κατά την αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος, όμως ο ρυθμός μιας τέτοιας παραγωγής στο σύστημα που μελετήθηκε, είναι χαμηλός για τρεις λόγους. Πρώτον, παρατηρήθηκε συσσώρευση EMO κατά την προσθήκη κυτταρινάσης Onozuka σε πρωτοπλάστες, που μόλις είχαν απομονωθεί και δεν είχαν κυτταρικό τοίχωμα. Δεύτερον, οι EMO που συσσωρεύτηκαν στο μέσο επώασης των φύλλων είχαν σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση από τις EMO που παράχθηκαν από τους πρωτοπλάστες (Εικ. 1.8 και 1.10). Τρίτον, δεν παρατηρήθηκε παραγωγή EMO από φύλλα, στα οποία είχε επιδράσει καθαρή κυτταρινάση (Εικ. 1.8) και τέταρτον, η καθαρή ξυλανάση και η πεκτινική λύση επάγουν την παραγωγή EMO (Εικ. 1.12 και 1.13).

Η προσθήκη κυτταρινάσης Onozuka στους πρωτοπλάστες προκάλεσε ραγδαία συσσώρευση των EMO στο μέσο καλλιέργειας. Στους πρωτοπλάστες καπνού, η εξωκυτταρική συγκέντρωση του O_2^- και του H_2O_2 αυξήθηκε κατά 6-

και 330-φορές, αντίστοιχα και στους πρωτοπλάστες αμπέλου 2- και 185-φορές, αντίστοιχα (Εικ.1.10), ενώ οι πρωτοπλάστες καπνού εμφάνιζαν πάντα, ανεξάρτητα της μεταχείρισης, υψηλότερα επίπεδα ΕΜΟ, σε σχέση με τους πρωτοπλάστες αμπέλου (Πίν. 1.4). Το γεγονός αυτό παρατηρήθηκε και κατά την επίδραση του μη παθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* σε φύλλα καπνού και αμπέλου (Εικ. 1.14). Φαίνεται ότι και τα δύο συστήματα βασικά παράγουν H_2O_2 ως απόκριση στην κυτταρινάση Onozuka, αλλά ο ενδιάμεσος σχηματισμός του $O_2^{\cdot-}$ δεν ήταν τόσο σημαντικός στην άμπελο, όσο στον καπνό. Σε διάφορες μελέτες, το H_2O_2 έχει χαρακτηριστεί ως η δομική δύναμη της οξειδωτικής καταπόνησης (Bolwell *et al.*, 1995, Desikan *et al.*, 1996), αν και ο Doke (1983) και οι Auh και Murphy (1995) έχουν χαρακτηρίσει το $O_2^{\cdot-}$ ως κύριο ΕΜΟ. Σε άλλα συστήματα και οι δύο ΕΜΟ έχουν ανιχνευτεί μετά από κατάλληλη διέγερση (Vera-Estrella *et al.*, 1992).

Οι ρίζες υπεροξειδίου μπορούν να παραχθούν από μια μεμβρανική, παρόμοια με των θηλαστικών, NAD(P)H οξειδάση (Askerlund *et al.*, 1987, Vera-Estrella *et al.*, 1992, Bolwell *et al.*, 1995). Το ένζυμο αυτό στα θηλαστικά συνθέτεται από πρωτεΐνες συνδεμένες στην μεμβράνη, καθώς και κυτταροπλασμικές πρωτεΐνες. Στο κέντρο της NADPH-οξειδάσης υπάρχει το ετεροδιμερές φλαβοκυτόχρωμα b_{558} , στο οποίο δεσμεύεται το NADPH και το οποίο αποτελείται από την γλυκοσυλιωμένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη $gp91^{phox}$ και την μη γλυκοσυλιωμένη υπομονάδα $p22^{phox}$. Το φλαβοκυτόχρωμα φέρει ολόκληρη την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADPH στο οξυγόνο. Κατά την ενεργοποίηση του ενζύμου, οι κυτταροπλασμικές πρωτεΐνες $p47^{phox}$ και $p67^{phox}$ φωσφορυλιώνονται και μετατοπίζονται, μαζί με το $p40^{phox}$ και το $p21^{rac}$, στην μεμβράνη, για να σχηματίσουν το ενεργό σύμπλοκο της NADPH οξειδάσης (Segal and Abo, 1993). Το υπεροξείδιο, που παράγεται, μπορεί με την σειρά του να σχηματίσει H_2O_2 αυθόρμητα ή με την μεσολάβηση της SOD (Doke, 1983, Levine *et al.*, 1994, Auh and Murphy, 1995, Doke and Miura, 1995, Murphy and Auh, 1996) ή/και από την δράση εξωκυτταρικών

περοξειδασών (Askerlund *et al.*, 1987, Vera-Estrella *et al.*, 1992, Bolwell *et al.*, 1995, Bestwick *et al.*, 1997).

Η επαγόμενη από κυτταρινάση Onozuka παραγωγή O_2^- στους πρωτοπλάστες καπνού παρουσίασε ευαισθησία στους τέσσερις αναστολείς της NADPH-οξειδάσης των θηλαστικών ουδετερόφιλων (Εικ.1.15), κανένας όμως από τους τέσσερις δεν προκάλεσε αναστολή στην αντίστοιχη παραγωγή O_2^- στους πρωτοπλάστες αμπέλου (Εικ.1.15). Αντίθετα, το KCN και το NaN_3 , οι αναστολείς των φυτικών περοξειδασών, επηρέασαν και οι δυο ισχυρά την παραγωγή O_2^- και ανέστειλαν πλήρως την παραγωγή του H_2O_2 , και στα δύο φυτικά είδη (Εικ. 1.15). Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την ύπαρξη δύο διαφορετικών ενζυμικών ενεργοτήτων, υπεύθυνων για την παραγωγή O_2^- στα δύο φυτικά είδη: και οι δύο είναι ενεργές στους πρωτοπλάστες καπνού, αλλά μόνο η δεύτερη υπάρχει στους πρωτοπλάστες αμπέλου.

Η απομόνωση κυστιδίων κυτταρικών μεμβρανών από πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, επέτρεψε μια βαθύτερη ανάλυση των συστημάτων παραγωγής του O_2^- . Στις κυτταρικές μεμβράνες του καπνού ανιχνεύτηκαν δύο διαφορετικές ενεργότητες συνθάσης O_2^- : μία που παρουσίασε εξειδίκευση στο NADPH ($K_m = 7,89 \pm 2,67 \mu M$) και ευαισθησία στο DPI και το ιμιδαζόλιο, και μία δεύτερη NAD(P)H ενεργότητα, ευαίσθητη στο KCN και το NaN_3 (Πίν. 1.4, Εικ. 1.16). Τα στοιχεία αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρώτη ενεργότητα αντιστοιχεί μάλλον σε μια παρόμοια με την θηλαστική NADPH οξειδάση (Doke, 1983, Auh and Murphy, 1995, Doke and Miura, 1995, Murphy and Auh, 1996) και η δεύτερη σε μια ενεργότητα NAD(P)H οξειδάσης-περοξειδάσης (Askerlund *et al.*, 1987, Vera-Estrella *et al.*, 1992, Bolwell *et al.*, 1995). Στις κυτταρικές μεμβράνες της αμπέλου εντοπίστηκε μόνο μία ενεργότητα συνθάσης O_2^- , η οποία ταιριάζει στην NAD(P)H οξειδάση-περοξειδάση. Δύο διαφορετικές πηγές EMO έχουν επίσης περιγραφεί στα επιδερμικά κύτταρα καπνού, ένα σύστημα οξειδάσης και μία, παρόμοια με κυτταροτοξωματική, ενεργότητα περοξειδάσης (Allan and Fluhr, 1997). Στα κύτταρα τριανταφυλλιάς, το H_2O_2 παράγεται από μια κυτοπλασμική NAD(P)H οξειδάση, ενώ στο φασόλι, το H_2O_2 προέρχεται κατευθείαν από την

δράση κυτταροτοξωματικών περοξειδασών (Bolwell *et al.*, 1998).

Οι κυτταρικές μεμβράνες, που απομονώθηκαν από πρωτοπλάστες στους οποίους είχε προστεθεί κυτταρινάση Onozuka, δεν παρουσίασαν υψηλότερη ενεργότητα σε σχέση με τον μάρτυρα, σε κανένα από τα δύο φυτικά είδη (Πίν. 1.4). Η λύση των πρωτοπλαστών και η διαδικασία απομόνωσης των κυτταρικών μεμβρανών ίσως επηρέασε την χωροδιάταξη, το φορτίο ή την σταθερότητα κάποιων συστατικών της/των NAD(P)H-εξαρτώμενης συνθάσης/ων του O_2^- . Ακόμα, προσθήκη κυτταρινάσης Onozuka σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες από πρωτοπλάστες, δεν κατάφερε να προκαλέσει επιπλέον αύξηση της παραγωγής του O_2^- (Πίν. 1.5), πράγμα το οποίο υποδηλώνει ότι κυτοπλασμικά ή άλλα κυτταρικά συστατικά εμπλέκονται στην παραγωγή του O_2^- . Έχει αναφερθεί (Murphy and Auh, 1996) ότι κυτταρικές μεμβράνες, απομονωμένες από κύτταρα τριανταφυλλιάς μετά από επίδραση *Phytophthora*, παρουσίασαν την ίδια περίπου ενεργότητα NAD(P)H συνθάσης όπως το ένζυμο από τα κύτταρα-μάρτυρες. Επίσης, σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες από πατάτα, η σύνθεση του O_2^- μπορούσε να επαχθεί *in vitro* από *Phytophthora*, μόνο κατά την παρουσία κυτοπλασμικών στοιχείων (Doke and Miura, 1995). Ακόμα, ανοσολογικά και μοριακά στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι οι διαλυτές κυτταροπλασμικές πρωτείνες p47, p67 και Rac1, οι οποίες αποτελούν συστατικά της ουδετερόφιλης NADPH οξειδάσης, υπάρχουν επίσης και στα φυτικά κύτταρα και η παρουσία τους είναι προαπαιτούμενη προκειμένου να ενεργοποιηθεί και να συγκροτηθεί στην μεμβράνη το σύμπλοκο της οξειδάσης (Tenhaken *et al.*, 1995, Dwyer *et al.*, 1996, Groom *et al.*, 1996, Kieffer *et al.*, 1997, Keller *et al.*, 1998).

Η υπεροξειδική ρίζα δεν μπορεί να διαπερνά ελεύθερα τις μεμβράνες αφού φέρει φορτίο και είναι ανίκανη να διεισδύσει στο υδροφοβικό εσωτερικό των μεμβρανών (Sutherland, 1991), σε αντίθεση με το H_2O_2 , το οποίο είναι σταθερό και μπορεί να διαχυθεί ελεύθερα στο κύτταρο (Baker and Orlandi, 1995). Στο σύστημα που περιγράφηκε, και οι δύο EMO ελευθερώνονται στον εξωκυτταρικό χώρο, αφού μπορούσαν να ανιχνευτούν στο μέσο καλλιέργειας (Εικ. 1.8 και 1.10), πράγμα που είναι σύμφωνο με αποτελέσματα από

πρωτοπλάστες πατάτας (Doke, 1983) και κύτταρα τριανταφυλλιάς (Auh and Murphy, 1995). Ενδοκυτταρική αύξηση των επιπέδων του O_2^- δεν εντοπίστηκε στους πρωτοπλάστες κατά την επίδραση της κυτταρινάσης, παρουσιάστηκε όμως αύξηση του H_2O_2 , η οποία μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητα μετακίνησης του μορίου, ιδιότητα την οποία υπολείπεται η υπεροξειδική ρίζα (Εικ. 1.11). Η παρατήρηση ότι η σύνθεση του O_2^- από κυστίδια κυτταρικών μεμβρανών μπορούσε να διεγερθεί έντονα κατά την παρουσία απορρυπαντικού (Triton X100), υποδηλώνει ότι η γένεση των EMO εμπλέκει και κάποια κυτοπλασμική θέση (Murphy and Auh, 1996).

Άλλες μελέτες (Allan and Fluhr, 1997) θεωρούν ότι ο σχηματισμός των EMO συμβαίνει μέσα στο κύτταρο ή στον αποπλάστη, ανάλογα με τον διεγέρτη που χρησιμοποιείται. Πρόσφατα, αναφέρθηκε στο *Arabidopsis* (Keller *et al.*, 1998), ένα γονίδιο ομόλογο με την υπομονάδα *gr91phox* της θηλαστικής NADPH οξειδάσης, που κωδικοποιεί για μια εσωτερική πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης, προτείνοντας ότι τα αρχικά προϊόντα της αντίδρασης της NADPH οξειδάσης συσσωρεύονται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, γεγονός που είναι σύμφωνο με τις λειτουργίες των EMO στην αλληλοσύνδεση (cross-linking) του κυτταρικού τοιχώματος και στην διακυτταρική σηματοδότηση (Lamb and Dixon, 1997).

Στις περισσότερες μελέτες, το H_2O_2 φαίνεται να παράγεται από την υπεροξειδική ρίζα, αυθόρμητα ή με μεσολάβηση της SOD (Doke, 1983, Levine *et al.*, 1994, Auh and Murphy, 1995, Doke and Miura, 1995, Murphy and Auh, 1996), ή από την δράση εξωκυτταρικών περοξειδασών (Askerlund *et al.*, 1987, Vera-Estrella *et al.*, 1992, Bolwell *et al.*, 1995, Bestwick *et al.*, 1997, Bolwell *et al.*, 1998). Η συσσώρευση O_2^- και H_2O_2 στο μέσο καλλιέργειας των πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου, μετά από προσθήκη κυτταρινάσης Onozuka, δεν επηρεάζεται από το DDC (Εικ. 1.15), που είναι χειλικός παράγοντας των ιόντων Cu και αναστολέας της κυτοπλασμικής Cu/Zn SOD (Heikkila *et al.*, 1976), δείχνοντας έτσι ότι δεν υπάρχει εξωκυτταρική ενεργότητα SOD που θα μπορούσε να καλύψει την ανίχνευση του O_2^- ή/και να εμπλακεί στην ενζυμική παραγωγή H_2O_2 από το O_2^- . Όμως, η έλλειψη της

αναστολής της παραγωγής του H_2O_2 από το DDC, δεν σημαίνει απαραίτητα απουσία ενεργότητας υπεροξειδικής δισμουτάσης, αφού πρόσφατα αναφέρθηκε ότι το DDC μπορεί να αντιδρά κατευθείαν με το H_2O_2 , απομακρύνοντάς το έτσι από το διάλυμα (Bolwell *et al.*, 1998). Συνεπώς ο ρόλος του DDC στην διέγερση της χημειοφωταύγειας της λουσιγενίνης και στην αναστολή της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης πρέπει να επανεξεταστεί.

Η ισχυρή επίδραση των αναστολέων της περοξειδάσης στην παραγωγή του H_2O_2 από τους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου (Εικ. 1.15), δηλώνει την μεσολάβηση μιας περοξειδάσης κατά τον σχηματισμό του H_2O_2 και στα δύο φυτικά είδη. Η ενεργότητα της NAD(P)H οξειδάσης-περοξειδάσης, που περιγράφηκε στις κυτταρικές μεμβράνες, ταιριάζει στο μοντέλο. Στις απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες καπνού και αμπέλου, δεν ανιχνεύτηκε ενεργότητα POX και τα επίπεδά της στους πρωτοπλάστες αμέσως μετά την απομόνωση, ήταν πολύ χαμηλά. Αντίθετα, αποπλαστική ενεργότητα NADH-POX έχει εντοπιστεί στους πρωτοπλάστες καπνού (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996a). Στα κύτταρα φασολιού έχει αναφερθεί μια αποπλαστική ενεργότητα περοξειδάσης, υπεύθυνη για την επαγόμενη από διεγέρτη, παραγωγή του H_2O_2 , η οποία ήταν ανθεκτική στο DPI και ευαίσθητη στο KCN (Bolwell *et al.*, 1995). Μια ευαίσθητη στο KCN περοξειδάση έχει επίσης περιγραφεί σε φύλλα μαρουλιού (Bestwick *et al.*, 1997).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από την παρούσα συγκριτική μελέτη των ενεργών μορφών οξυγόνου που παράγονται από φύλλα και πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, έχουν δείξει ότι: (1) Ο τραυματισμός, αυτός καθαυτός, δεν προκαλεί παραγωγή EMO κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών. (2) Η προσθήκη στο μέσο επώασης των φύλλων, κυτταρινάσης Onozuka, η οποία μεταξύ άλλων περιέχει ξυλανάση, επάγει την εξωκυτταρική συσσώρευση και των δύο EMO, και στα δύο φυτικά είδη. Στον καπνό, τα επίπεδα των παραγόμενων EMO είναι 9 φορές υψηλότερα για τις υπεροξειδικές ρίζες και 3 φορές υψηλότερα για το υπεροξείδιο του υδρογόνου, σε σχέση με την παραγωγή στην άμπελο. (3) Η προσθήκη κυτταρινάσης Onozuka σε

πρωτοπλάστες απομονωμένους με καθαρή κυτταρινάση, είχε ως αποτέλεσμα μια σημαντική αύξηση και των δύο ΕΜΟ στον καπνό, όταν στην άμπελο, η ίδια μεταχείριση προκάλεσε σημαντική επαγωγή μόνο του H_2O_2 . Η ολική παραγωγή ΕΜΟ από τους πρωτοπλάστες αμπέλου ήταν σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη των πρωτοπλαστών καπνού. (4) Το O_2^- και το H_2O_2 δημιουργούνται από διαφορετικά ενζυμικά συστήματα στα δυο φυτικά είδη που μελετήθηκαν: στον καπνό δύο συστήματα σχηματισμού ΕΜΟ φαίνεται να λειτουργούν, προσθετικά ή εναλλακτικά, μια NADPH οξειδάση που παράγει O_2^- και μία NAD(P)H οξειδάση-περοξειδάση που παράγει O_2^- και H_2O_2 . Στην άμπελο μόνο η NAD(P)H οξειδάση-περοξειδάση λειτουργεί για την παραγωγή και των δύο ΕΜΟ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΗ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΟΥΣ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΕΣ ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρωτοπλάστες, τα φυτικά κύτταρα χωρίς το κυτταρικό τοίχωμα, αντιπροσωπεύουν ένα αποτελεσματικό πειραματικό μοντέλο και είναι πολύτιμα εργαλεία για βιοτεχνολογικές εφαρμογές, με την προϋπόθεση βέβαια ότι έχουν δυνατότητα αναγέννησης. Οι πρωτοπλάστες από φυτικά είδη υψηλής γεωργικής, και κατ' επέκταση οικονομικής, σημασίας, όπως τα αγρωστώδη, τα ξυλώδη πολυετή και την άμπελο, παρουσιάζουν αδυναμία αναγέννησης από πρωτοπλάστες (recalcitrance). Οι λόγοι που εμποδίζουν τους πρωτοπλάστες αυτούς να εκφράσουν το ολοδυναμικό τους και να αναγεννηθούν, δεν είναι γνωστοί ακόμα. Θα μπορούσαν να είναι απλοί όπως για παράδειγμα η απαίτηση σε ικανό για επαγωγή ολοδυναμικού, θρεπτικό υπόστρωμα, ή περισσότερο σύνθετοι, όπως η μεταγωγή και η αντίληψη ειδικών σημάτων και η έκφραση γονιδίων, τα οποία εμποδίζονται στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες.

Η οξειδωτική καταπόνηση η οποία δημιουργείται από την ανισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή EMO και την αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων, έχει προταθεί ως πιθανή αιτία έλλειψης της αναγεννητικής ικανότητας των πρωτοπλαστών (Cutler *et al.*, 1991, Roubelakis-Angelakis, 1993). Η κυρίως τοξικότητα του O_2^- και του H_2O_2 εντοπίζεται στην ικανότητά τους να ξεκινούν ένα καταρράκτη αντιδράσεων, που καταλήγει στην παραγωγή καταστροφικών μορφών όπως η ρίζα υδροξυλίου και τα υπεροξειδία λιπιδίων, και τελικά σε κυτταρική δυσλειτουργία και θάνατο (Bowler *et al.*, 1992, Scandalios, 1993, Alschér *et al.*, 1997). Όμως, παράλληλα, οι EMO μπορούν να έχουν και θετικό ρόλο κατά την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών. Έτσι, το H_2O_2 συμμετέχει στην ανασύσταση του κυτταρικού τοιχώματος (Iiyama *et al.*, 1994) και το O_2^- και το H_2O_2 ίσως λειτουργούν ως σήματα, διέγερσης των μηχανισμών άμυνας (Levine *et al.*, 1994, Low and Merida, 1996, Jabs *et al.*, 1997, Lamb and Dixon, 1997). Ο διττός ρόλος του H_2O_2 στην αναγέννηση των πρωτοπλαστών έχει επίσης αναφερθεί (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996a, 1996b).

Οι οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων και των φυτών, έχουν αναπτύξει

ένα ευρύ φάσμα στρατηγικών ενάντια στην οξειδωτική καταπόνηση, όπως η άμεση απόσβεση των ελεύθερων ριζών από φυσικά μόρια, όπως το ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη και οι πολυαμίνες (Larson, 1988, Noctor and Foyer, 1998a) ή/και σε αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) που μετατρέπει το O_2^- σε H_2O_2 , το οποίο στην συνέχεια ανάγεται σε H_2O από καταλάσες και/ή από την ασκορβική περοξειδάση (APO) σε ένα μονοπάτι που περιλαμβάνει ένζυμα και φυσικά αντιοξειδωτικά και είναι γνωστό ως κύκλος Halliwell-Asada (Εικ. 2, Γενική Εισαγωγή) (Foyer and Halliwell, 1976, Scandalios, 1993, Asada, 1994, Foyer *et al.*, 1994).

Στο προηγούμενο Κεφάλαιο, περιγράφηκαν οι πιθανοί παράγοντες που οδηγούν στην συσσώρευση EMO κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών. Σε αυτούς συγκαταλέγεται η ξυλανάση, συστατικό της κυτταρινάσης Onozuka (ένζυμο αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος) και η διαδικασία απομόνωσης, ενώ αποκλείστηκε ο τραυματισμός των φύλλων, τμήματα του κυτταρικού τοιχώματος και η ίδια η ενεργότητα της κυτταρινάσης. Στο Κεφάλαιο αυτό γίνεται μία προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων συσσώρευσης EMO κατά την καλλιέργεια των αναγεννώμενων και μη πρωτοπλαστών καπνού και των μη αναγεννώμενων πρωτοπλαστών αμπέλου, με τα ενδογενή επίπεδα των φυσικών αντιοξειδωτικών, του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και των ενζύμων του κύκλου Halliwell-Asada, καθώς και με τα ενδογενή επίπεδα των πολυαμινών. Επιχειρείται η σύνδεση της αναγεννητικής ικανότητας με την αντιοξειδωτική άμυνα των πρωτοπλαστών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.1

**ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΜΟ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ
ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ
ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ.**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΝ
ΔΙΑΙΡΕΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ**

2.1.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ποιότητα και ο χρόνος δράσης των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος επηρέασαν σημαντικά την παραγωγή ΕΜΟ και την βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Οι πρωτοπλάστες, που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Onozuka, παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ΕΜΟ, κυρίως σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, σε σχέση με εκείνους που προέκυψαν από κυτταρινάση Worthington, ενώ η παράταση του χρόνου δράσης της οδήγησε σε επιπλέον συσσώρευση ΕΜΟ. Η χρησιμοποίηση κυτταρινάσης Worthington παρήγαγε πρωτοπλάστες καπνού με το υψηλότερο ποσοστό βιωσιμότητας και διαιρετικής ικανότητας κατά την καλλιέργεια. Οι πρωτοπλάστες, που απομονώθηκαν μετά από 4 h με κυτταρινάση Onozuka, παρουσίασαν μικρότερο ποσοστό βιωσιμότητας και διαιρετικής ικανότητας, ενώ η παράταση του χρόνου επώασης είχε ως αποτέλεσμα δραστική μείωση και των δύο. Οι παραπάνω μεταχειρίσεις μείωσαν επίσης σημαντικά τη βιωσιμότητα των πρωτοπλαστών αμπέλου τους, η οποία μειώθηκε με την χρησιμοποίηση κυτταρινάση Onozuka και την αύξηση της διάρκειας της ενζυμικής δράσης. Η εξωγενής προσθήκη σε αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού αλκαλικού DMSO, το οποίο παράγει O_2^- , ή αναγμένου ασκορβικού οξέος σε μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού προκάλεσαν αντίστοιχα ελάττωση και βελτίωση της βιωσιμότητας και της διαιρετικής ικανότητας των πρωτοπλαστών. Η ενδοκυτταρική και η εξωκυτταρική συγκέντρωση των ΕΜΟ μειώθηκε προοδευτικά κατά την καλλιέργεια στους αναγεννώμενους και μη πρωτοπλάστες καπνού, στους τελευταίους όμως οι ενδοκυτταρικές ΕΜΟ αυξήθηκαν την 8η ημέρα καλλιέργειας. Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, οι ΕΜΟ μειώθηκαν σταδιακά κατά την καλλιέργεια, ενώ το ενδοκυτταρικό H_2O_2 εμφάνισε αύξηση την 8η ημέρα.

2.1.2.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνολογία των πρωτοπλαστών, η οποία διακρίνεται από εξαιρετικές δυνατότητες γενετικής βελτίωσης των φυτών, εμφανίζει ένα αγεφύρωτο χάσμα

μεταξύ προσδοκιών και εφαρμογής. Ο πρωταρχικός περιορισμός στην εφαρμογή της, είναι η ανικανότητα αναγέννησης των φυτών από πρωτοπλάστες, αφού είδη, τα οποία συμπεριφέρονται τυπικά κατά την καλλιέργεια, παρουσιάζουν αδυναμία αναγέννησης στο σύστημα των πρωτοπλαστών. Με τον τρόπο αυτό είδη μεγάλης γεωργικής σημασίας, όπως τα σιτηρά και την άμπελο, «δυστροπούν» ως προς την αναγέννηση από πρωτοπλάστες.

Διάφοροι παράγοντες, όπως τα ένζυμα αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, οι συνθήκες απομόνωσης και καλλιέργειας, η σύσταση του μέσου καλλιέργειας και το μητρικό φυτά, έχουν προταθεί ως πιθανά να επηρεάζουν την βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών. Την τελευταία δεκαετία, η επίδραση της ενζυμικής απομόνωσης, η οποία παράγει μεγάλη ποσότητα πρωτοπλαστών σε σύντομο χρονικό διάστημα, προσδιορίστηκε ως οξειδωτική καταπόνηση (Cutler *et al.*, 1991, Roubelakis-Angelakis, 1993). Η χρήση των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος οδηγεί σε αποδιοργάνωση της μεμβράνης και επακόλουθο ανεπαρκή σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος και του κυτταροσκελετού (Cutler *et al.*, 1991) και σε οξείδωση λιπιδίων (Cutler *et al.*, 1989). Η μεταχείριση κυττάρων ρυζιού με τα ενζυμικά παρασκευάσματα απομόνωσης των πρωτοπλαστών δημιούργησε EMO (Ishii, 1987, 1988).

Στο προηγούμενο Κεφάλαιο (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 1999), εξετάστηκαν οι παράγοντες που πιθανώς οδηγούν στην συσσώρευση EMO κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών. Σκοπός του κεφαλαίου αυτού είναι να εξεταστεί η επίδραση των ενζυμικών παρασκευασμάτων στην συμπεριφορά των πρωτοπλαστών κατά την καλλιέργεια. Μελετήθηκε έτσι η βιωσιμότητα και η διαιρετική ικανότητα, καθώς και η συσσώρευση EMO κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου.

2.1.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.3.1. Ανάπτυξη φυτών και απομόνωση πρωτοπλαστών

Η ανάπτυξη των φυτών και η απομόνωση των πρωτοπλαστών έγινε όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1 (1.3.1 και 1.3.2). Η διάρκεια επώασης των φύλλων με τα ένζυμα απομόνωσης των πρωτοπλαστών ήταν 4 ή 16 h, με 1% κυτταρινάση Onozuka και 0,5% μακεροζύμη Onozuka ή 4 h με 0,25% κυτταρινάση Worthington και 0,5% μακεροζύμη Onozuka.

Η βιωσιμότητα των πρωτοπλαστών προσδιορίστηκε με την χρησιμοποίηση Evans blue (Graff and Okong-Ogola, 1971). Οι πρωτοπλάστες επώασθηκαν με 0,01% Evans blue σε διάλυμα καλλιέργειας για 10 min. Η ακεραιότητα της μεμβράνης δεν επιτρέπει την είσοδο της χρωστικής στους πρωτοπλάστες έτσι οι ζωντανοί πρωτοπλάστες δεν βάφονται, ενώ οι νεκροί ή κατεστραμμένοι αποκτούν μπλε χρώμα. Η διαιρετική ικανότητα μετρήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο.

Η επίδραση του αλκαλικού DMSO και του ασκορβικού οξέος στην βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα, μελετήθηκε κατά την προσθήκη των παραπάνω στο μέσο επώασης των πρωτοπλαστών καπνού μαζί με τα ένζυμα αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία ήταν αντίστοιχα, κυτταρινάση Worthington (για 4 h) και κυτταρινάση Onozuka (για 16 h).

2.1.3.2. Μεταβολική ενεργότητα πρωτοπλαστών καπνού

Η μεταβολική ενεργότητα των πρωτοπλαστών καπνού, οι οποίοι απομονώθηκαν μετά από 4, 8, 12 και 16 h με κυτταρινάση Onozuka, προσδιορίστηκε με την τυποποιημένη δοκιμασία Promega CellTiter 96™. Η μέθοδος είναι αποτελεσματική και επαναλήψιμη και στηρίζεται στην κυτταρική μετατροπή του MMT [3-(4,5-dimethylthiaral-2y)-2,5-dipheny tetrazolium bromide)] σε φορμαζάνη (έγχρωμο, κρυσταλλικό προϊόν). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: πρωτοπλάστες καπνού, αμέσως μετά την απομόνωση, τοποθετούνται σε πλάκα τιτλοδότησης 96 πηγαδιών (50.000 πρωτοπλάστες/50 μL διαλύματος καλλιέργειας). Η πλάκα επώαστηκε για 4 h στους 37° C, αφού πρώτα προστέθηκαν 15 μL Dye Solution σε κάθε δείγμα. Η αντίδραση τερματίστηκε με 100 μL Solubilization/Stop Solution.

Μετά από 12h επώαση στους 37° C, προσδιορίστηκε η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων στα 550 nm, σε ELISA plate reader.

2.1.3.3. Προσδιορισμός της συσσώρευσης ΕΜΟ κατά την απομόνωση και την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου

Η παραγωγή των ΕΜΟ κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών μελετήθηκε για χρονικό διάστημα 8 ημερών. Το μέσο καλλιέργειας, που προέκυψε από φυγοκέντρηση στις 100 g για 15 sec, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της εξωκυτταρικής συσσώρευσης των ΕΜΟ, ενώ οι αντίστοιχοι πρωτοπλάστες, αφού επαναδιαλύθηκαν σε μέσο καλλιέργειας, χωρίς ωσμωτικό (ώστε να διαρραγούν), χρησιμοποιήθηκαν για τον ενδοκυτταρικό προσδιορισμό των ΕΜΟ. Οι βιοδοκιμές της λουμινόλης και της λουσιγενίνης περιγράφονται στα Υποκεφάλαια 1.3.5 και 1.3.6, αντίστοιχα.

2.1.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1.4.1. Επίδραση των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος στην παραγωγή ΕΜΟ κατά την απομόνωση πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου

Στους πρωτοπλάστες, την στιγμή της απομόνωσής τους, το μεγαλύτερο ποσοστό των ΕΜΟ ήταν ενδοκυτταρικό. Οι πρωτοπλάστες καπνού, που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Worthington, μετά από 4 h επώαση, περιείχαν ενδοκυτταρικά 2,2 και 33,9 nM O_2^- και H_2O_2 , αντίστοιχα και εξωκυτταρικά 0,3 και 6,6 nM, αντίστοιχα (Πίν. 2.1) Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, οι αντίστοιχες τιμές ήταν 0,7 και 3,6 nM ενδοκυτταρικά και 0,1 και 2,5 nM εξωκυτταρικά, για το O_2^- και H_2O_2 . Στους πρωτοπλάστες, που προήλθαν μετά από 4 h επώαση με κυτταρινάση Onozuka, τα επίπεδα ήταν 3,9 και 47,3 nM στον καπνό και 0,8 και 13,3 nM για το O_2^- και το H_2O_2 , αντίστοιχα. Η αύξηση του χρόνου δράσης της κυτταρινάσης Onozuka στις 16 h είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτοπλαστών με υψηλότερη ενδοκυτταρική συγκέντρωση, 4,2 και 70,8 nM και 1,6 και 13,4 nM για το O_2^- και το H_2O_2 , αντίστοιχα, στον καπνό και την άμπελο

Πίνακας 2.1. Συσσώρευση ΕΜΟ κατά την απομόνωση πρωτοπλαστών

καπνού και αμπέλου. Η συγκέντρωση των EMO μετρήθηκε στους πρωτοπλάστες (ενδοκυτταρικά) και στο μέσο καλλιέργειας (εξωκυτταρικά). Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν μετά από 4 ή 16 h επώαση με κυτταρινάση Worthington (4-) ή με κυτταρινάση Onozuka (4+, 16+). Οι τιμές αντιστοιχούν στους μέσους όρους \pm SE.

Συσσωρευση των EMO (nM)				
Καπνός				
Αμπέλι				
Πρωτοπλάστες				
Μεταχείριση	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	H ₂ O
				2
4-	2,2 \pm	33,9 \pm	0,7 \pm 0,	
	0,2	1,2	4	3,6 \pm 0,7
4+	3,9 \pm	47,3 \pm	0,8 \pm 0,	13,3
	0,3	2,0	1	\pm 2,1
16+	4,2 \pm	70,8 \pm	1,6 \pm 0,	13,4
	0,2	3,3	1	\pm 1,1
Μέσο καλλιέργειας				
Μεταχείριση	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	H ₂ O
				2
4-	0,3 \pm		0,1 \pm 0,	2,5 \pm
	0,0	6,6 \pm 0,7	0	0,3
4+	0,6 \pm	11,3 \pm	0,4 \pm 0,	3,4 \pm
	0,1	1,2	1	1,0
16+	2,1 \pm	41,5 \pm	0,4 \pm 0,	7,8 \pm
	0,1	3,9	1	1,1

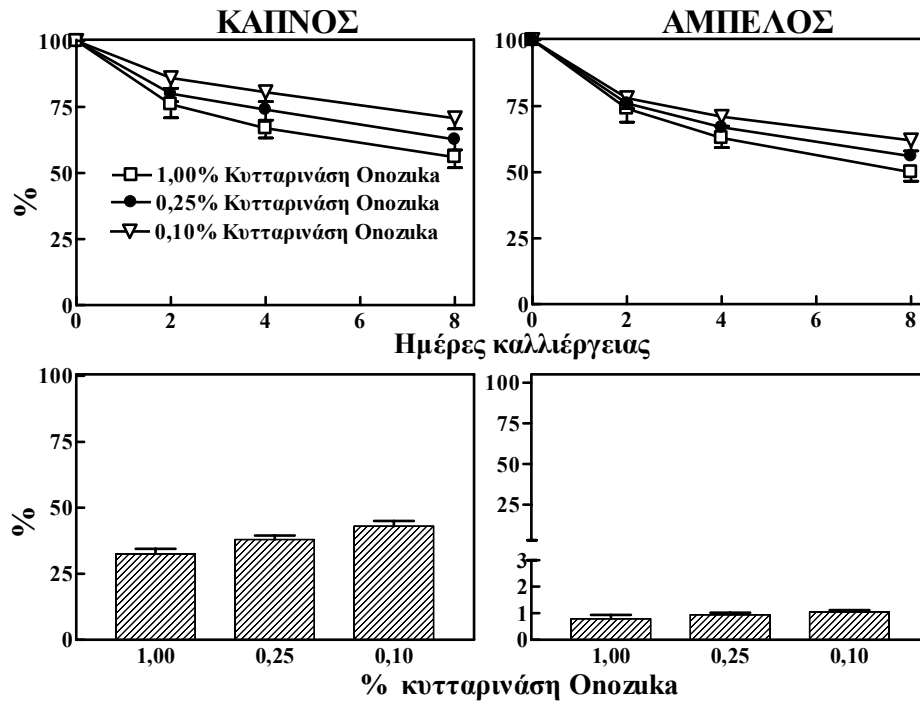
(Πίν. 2.1). Οι EMO στο μέσο καλλιέργειας των πρωτοπλαστών καπνού, μετά από 4 h απομόνωση, ήταν 0,6 και 11,3 και μετά από 16 h απομόνωσης, 2,1 και 41,5 nM για το O₂⁻ και το H₂O₂, αντίστοιχα. Στην άμπελο, οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν 0,4 και 3,4 μετά από 4 h απομόνωσης, και μετά από 16 h, τα επίπεδα ήταν 0,4 και 7,8 nM, για το O₂⁻ και το H₂O₂, αντίστοιχα.

2.1.4.2. Επίδραση των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού

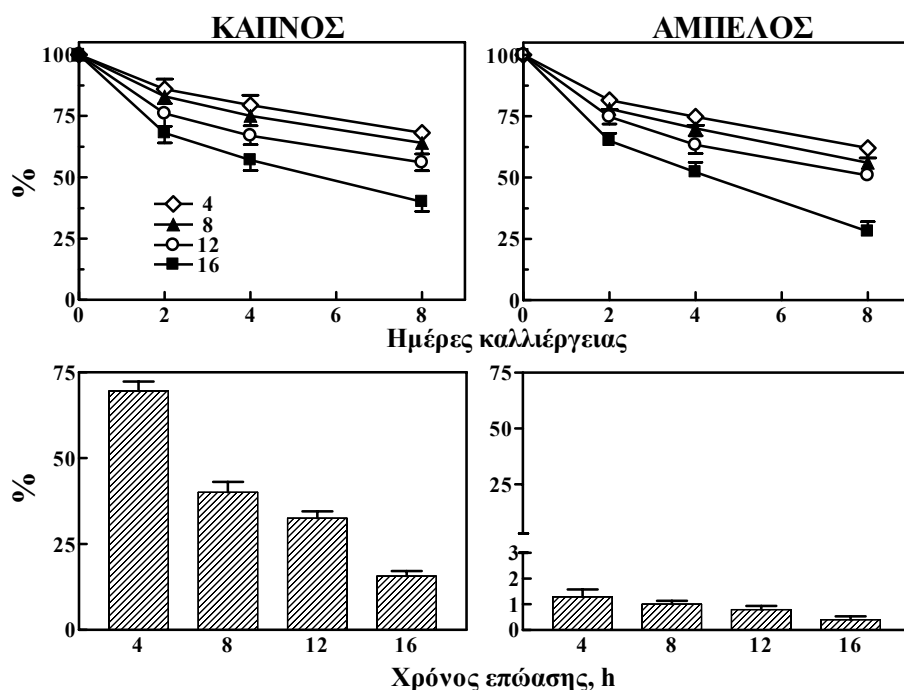
τοιχώματος στην βιωσιμότητα και διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών

Η ποιότητα και ο χρόνος δράσης των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος επηρέασαν σημαντικά την βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Τα ποσοστά βιωσιμότητας και διαιρετικής ικανότητας των πρωτοπλαστών σχετίστηκαν αντιστρόφως ανάλογα με την ποσότητα της κυτταρινάσης Onozuka κατά την απομόνωση. Έτσι, ενώ οι πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, που απομονώθηκαν μετά από 12 h επώαση με 1% κυτταρινάση Onozuka, παρουσίασαν αντίστοιχα 56% και 50% ποσοστό βιωσιμότητας, την 8η ΗΚ, όταν χρησιμοποιήθηκε 0,25% ή 0,1% κυτταρινάση Onozuka, το ποσοστό αυξήθηκε στο 62,5% και 71% αντίστοιχα, για τους πρωτοπλάστες καπνού και στο 56% και 62% για τους πρωτοπλάστες αμπέλου, αντίστοιχα (Εικ. 2.1). Η διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού παρουσίασε ανάλογη αύξηση, κατά 25% και 37% αντίστοιχα με την χρησιμοποίηση 0,25% και 0,1% κυτταρινάσης, ενώ στους πρωτοπλάστες αμπέλου δεν διαπιστώθηκε αξιοσημείωτη μεταβολή στη μεταχείριση αυτή (Εικ. 2.1).

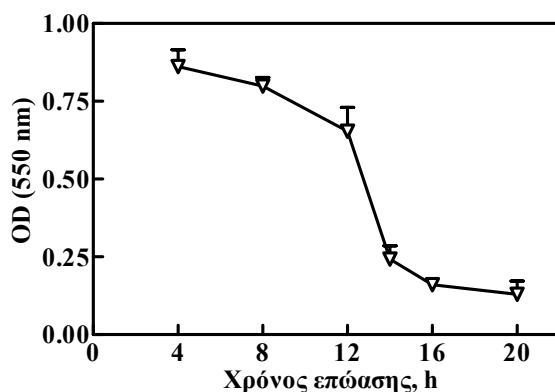
Η βιωσιμότητα και η διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου επηρεάστηκαν σημαντικά από την διάρκεια του χρόνου επώασης με την κυτταρινάση Onozuka. Έτσι, η αύξηση του χρόνου δράσης της κυτταρινάσης οδήγησε σε μείωση της βιωσιμότητας και της διαιρετικής ικανότητας των πρωτοπλαστών (Εικ. 2.2). Αντίστοιχη μείωση παρουσίασε και η μεταβολική ενεργότητα των πρωτοπλαστών καπνού (Εικ. 2.2), όπως αυτή εκφράζεται από την βιοδοκιμή του MMT (υποκεφάλαιο 2.1.3.2). Φαίνεται ότι η διάρκεια επώασης που δρα καταλυτικά στην πορεία των πρωτοπλαστών στις συνθήκες



Εικόνα 2.1. Βιωσιμότητα και διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου που απομονώθηκαν μετά από 12 h επώαση με 1, 0,25 ή 0,1% κυτταρινάση Οοζουκα. Η βιωσιμότητα εκφράζεται ως % του αρχικού αριθμού των πρωτοπλαστών και η διαιρετική ικανότητα εκφράζεται ως % των ζωντανών πρωτοπλαστών, που είχαν διαιρευθεί την 8η ΗΚ. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 10 ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 2.2. Επίδραση του χρόνου δράσης της κυτταρινάσης Opozuka στην βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν μετά από 4, 8, 12 και 16 h με κυτταρινάση Opozuka. Η βιωσιμότητα και η διαιρετική ικανότητα εκφράζονται όπως αναφέρθηκε στην Εικόνα 2.1. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

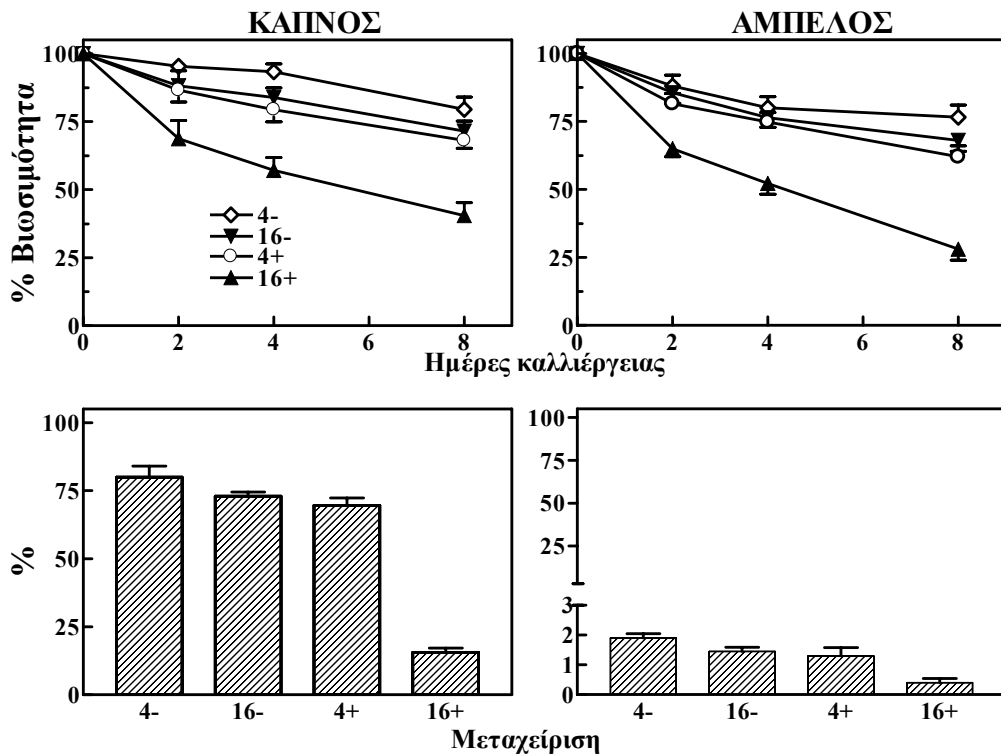


Εικόνα 2.3. Επίδραση του χρόνου επώασης με κυτταρινάση Opozuka στη μεταβολική ενεργότητα των πρωτοπλαστών καπνού. Η μέθοδος αναφέρεται στο

Υποκεφάλαιο 2.1.3.2. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

καλλιέργειας, είναι ο χρόνος που υπερβαίνει τις 12 h (Εικ. 2.2 και 2.3).

Η χρησιμοποίηση κυτταρινάσης Worthington για 4 h, παρήγαγε πρωτοπλάστες οι οποίοι εμφάνισαν το υψηλότερο ποσοστό βιωσιμότητας κατά την καλλιέργεια (80% και 76%, αντίστοιχα, την 8η ΗΚ, για τους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, Εικ. 2.4). Αντίθετα, οι πρωτοπλάστες, που απομονώθηκαν μετά από 4 h δράσης της κυτταρινάσης Opozuka, παρουσίασαν μικρότερο ποσοστό βιωσιμότητας: 68% και 62% του αρχικού αριθμού των πρωτοπλαστών



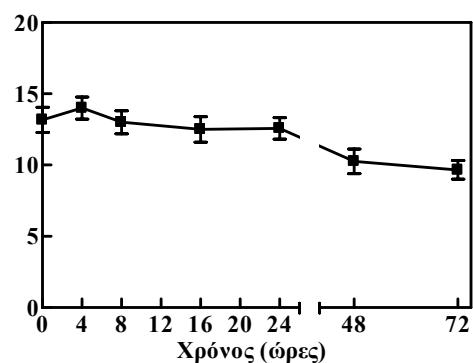
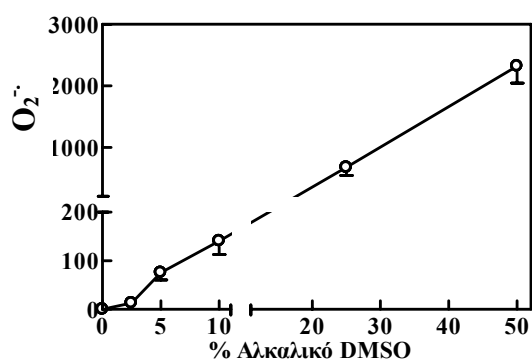
Εικόνα 2.4. Βιωσιμότητα και διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου κατά την καλλιέργεια. Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν μετά από 4 και 16 h με κυτταρινάση Worthington (4-, 16-) ή κυτταρινάση Onozuka (4+, 16+). Η βιωσιμότητα εκφράζεται όπως αναφέρθηκε στην Εικόνα 2.1. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 10 ανεξάρτητα πειράματα.

παρέμειναν βιώσιμοι μετά από 8 ημέρες σε καλλιέργεια για τον καπνό και την άμπελο, αντίστοιχα (Εικ. 2.4). Η παράταση της επώασης με κυτταρινάση Onozuka στις 16 h είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας σε ποσοστά 40,5% και 28% για τους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου αντίστοιχα. Αντίθετα, με την κυτταρινάση Worthington, η βιωσιμότητα μειώθηκε στο 71,5% και 68% για τους δύο πληθυσμούς πρωτοπλαστών, αντίστοιχα (Εικ. 2.4).

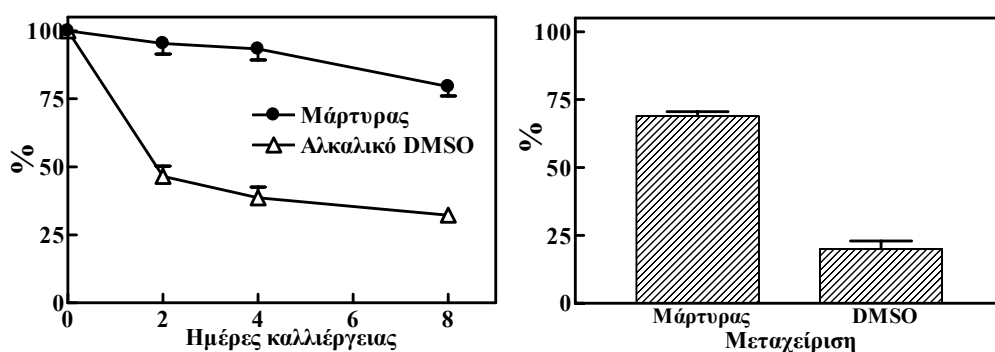
Η διαιρετική ικανότητα, το ποσοστό των ζωντανών πρωτοπλαστών οι οποίοι είχαν διαιρεθεί μετά από 8 ΗΚ, ήταν 80% στους πρωτοπλάστες καπνού, που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Worthington και 69% στους πρωτοπλάστες καπνού, που προέκυψαν από μικρής διάρκειας επώαση με κυτταρινάση Onozuka (Εικ. 2.4). Απομόνωση με κυτταρινάση Onozuka για 16

h, παρήγαγε πρωτοπλάστες καπνού που εμφάνισαν το χαμηλότερο δυναμικό διαιρετικής ικανότητας (15,6%, Εικ. 2.4). Ο τελευταίος πληθυσμός χαρακτηρίζεται ως «μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού», ενώ ως «αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού» χαρακτηρίζονται οι πρωτοπλάστες που προήλθαν από κυτταρινάση Οποζυκα μετά από 4 h επώαση. Οι πρωτοπλάστες αμπέλου απέτυχαν να διαιρεθούν σε όλες τις περιπτώσεις.

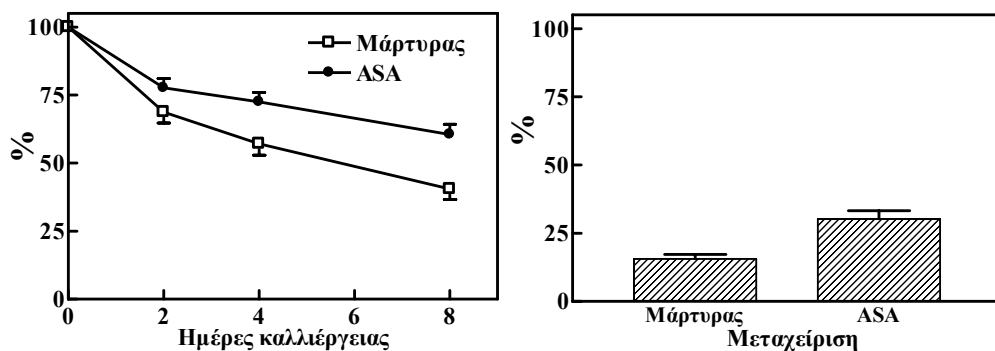
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επίδραση των ΕΜΟ στο αναγεννητικό δυναμικό των πρωτοπλαστών, χρησιμοποιήθηκε DMSO, κορεσμένο σε αέρα και συμπληρωμένο με 5mM NaOH, το οποίο παράγει O_2^- (Hyland *et al.*, 1983). Η παραγωγή των O_2^- ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης του αλκαλικού DMSO και ήταν σταθερή για τουλάχιστον 24 h (Εικ. 2.5). Αλκαλικό DMSO 50% παρήγαγε $237 \pm 15 \mu M O_2^-$ στην βιοδοκιμή της λουσιγενίνης (Εικ. 2.5) και με EPR η παραγωγή εκτιμήθηκε σε $250 \mu M O_2^-$ (Hyland *et al.*, 1983), σύγκριση που επιβεβαιώνει την εγκυρότητα της βιοδοκιμής της λουσιγενίνης. Η επίδραση της συγκέντρωσης του αλκαλικού DMSO στην παραγωγή O_2^- είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτοπλαστών καπνού, με χαμηλό ποσοστό βιωσιμότητας και διαιρετικής ικανότητας (Εικ. 2.6). Η παρουσία DMSO, σε ίδιες συγκεντρώσεις με το αλκαλικό DMSO, δεν τροποποιεί τα παραπάνω χαρακτηριστικά της καλλιέργειας. Αντίθετα, όταν το αντιοξειδωτικό ασκορβικό οξύ, προστέθηκε στο μέσο επώασης των φύλλων καπνού μαζί με την κυτταρινάση Οποζυκα, οι πρωτοπλάστες που προέκυψαν, μετά από 16 h, χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερο ποσοστό βιωσιμότητας και διαιρετικής ικανότητας, σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικ. 2.7).



Εικόνα 2.5. Επίδραση της συγκέντρωσης του αλκαλικού DMSO (5 mM NaOH) στην παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ (αριστερά). Η σταθερότητα της παραγωγής $O_2^{\cdot -}$ στον χρόνο παρουσιάζεται στο δεξιό τμήμα της εικόνας, όπου χρησιμοποιήθηκε 2,5% αλκαλικό DMSO. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.



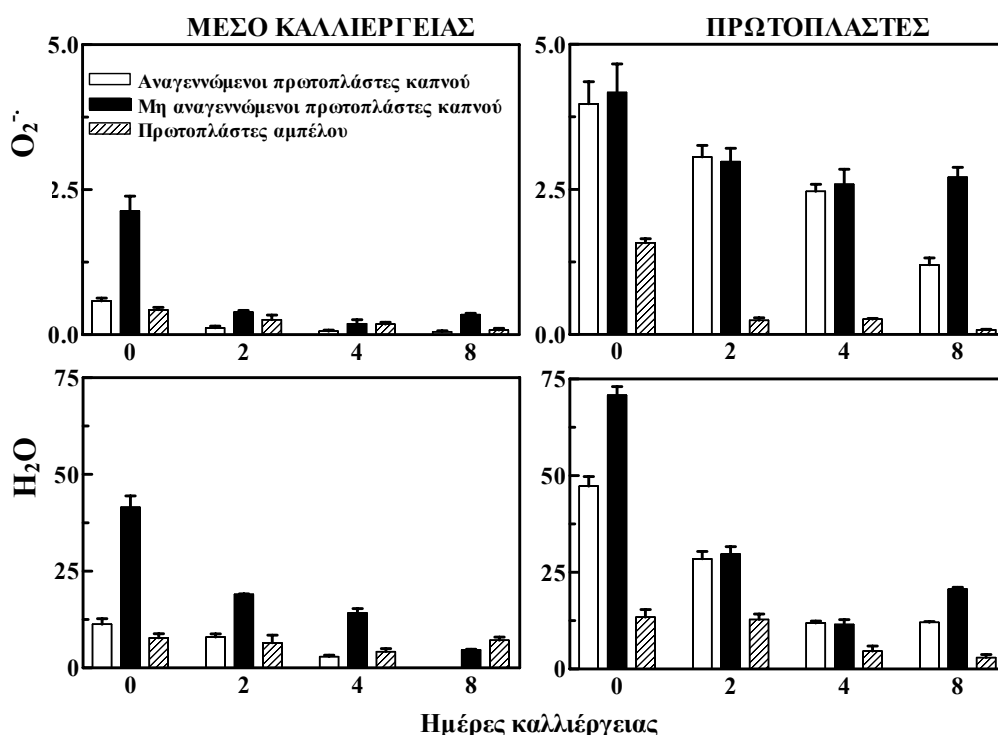
Εικόνα 2.6. Βιωσιμότητα και διαιρητική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού, οι οποίοι απομονώθηκαν μετά από 4 h με κυτταρινάση Worthington παρουσία 2,5% αλκαλικού DMSO ή DMSO (μάρτυρας). Η βιωσιμότητα και η διαιρητική ικανότητα εκφράζονται όπως αναφέρθηκε στην Εικόνα 2.1. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 2.7. Βιωσιμότητα και διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού, οι οποίοι απομονώθηκαν μετά από 16 h με κυτταρινάση Opozuka παρουσία 0,5 mM ασκορβικού οξέος (ASA) ή απουσία ASA (μάρτυρας). Η βιωσιμότητα και η διαιρετική ικανότητα εκφράζονται όπως αναφέρθηκε στην Εικόνα 2.1. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

2.1.4.3. Συσσώρευση ΕΜΟ κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών

Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση των δύο ΕΜΟ μειώθηκε προοδευτικά κατά την καλλιέργεια στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, όπου μειώθηκαν επίσης οι εξωκυτταρικές ΕΜΟ μέχρι εξαφάνισης την 8η ημέρα καλλιέργειας (HK) (Εικ. 2.8). Στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού η συσώρευση των ενδοκυτταρικών ΕΜΟ μειώθηκε την 2η HK στο επίπεδο των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών, παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο μέχρι την 4η HK και αυξήθηκε την 8η HK (Εικ. 2.8). Εξωκυτταρικά, και οι δύο ΕΜΟ μειώθηκαν κατά την καλλιέργεια, η συγκέντρωσή τους παρέμεινε όμως υψηλότερη από εκείνη που ανιχνεύτηκε στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού. Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, το ενδοκυτταρικό O_2^- μειώθηκε σταδιακά κατά την καλλιέργεια, το H_2O_2 παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο, όπως την στιγμή της απομόνωσης, μέχρι την 2η HK και μειώθηκε στην συνέχεια. Και οι δύο εξωκυτταρικές ΕΜΟ μειώθηκαν κατά την καλλιέργεια, όμως το H_2O_2 εμφάνισε αύξηση την 8η HK (Εικ. 2.8).



Εικόνα. 2.8. Συσσώρευση EMO κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Η συγκέντρωση των EMO μετρήθηκε στους πρωτοπλάστες, ενδοκυτταρικά, και στο μέσο καλλιέργειας, εξωκυτταρικά. Οι τιμές αντιστοιχούν στους μέσους όρους \pm SE και αναφέρονται σε 10^5 πρωτοπλάστες.

2.1.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πρωτοπλάστες, που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Worthington, συσσώρευσαν EMO εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά (Πίν. 2.1). Ειδικότερα, στους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, που προέκυψαν μετά από 4 h επώαση, το 88% και το 89% του O_2^- και το 84% και το 59% του H_2O_2 αντίστοιχα, ήταν ενδοκυτταρικά (Πίν. 2.1). Το ενδοκυτταρικό ποσοστό των EMO στους πρωτοπλάστες καπνού, που απομονώθηκαν μετά από 4 h με κυτταρινάση Onozuka, η οποία παράγει EEO (Ishii, 1987, προηγούμενο κεφάλαιο), ήταν 87% και 81% για το O_2^- και το H_2O_2 , αντίστοιχα, και στους πρωτοπλάστες που προέκυψαν μετά από 16 h επώαση, ήταν 66% και 63%, αντίστοιχα (Πίν. 2.1). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, οι αντίστοιχες τιμές

ήταν 66% και 80% για τους πρωτοπλάστες των 4 h και 80% και 63% για τις 16 h (Πίν. 2.1). Σε όλες τις περιπτώσεις, η ενδοκυτταρική συσσώρευση και των δύο EMO κυριαρχούσε ως προς την εξωκυτταρική, καθώς αντιστοιχούσε στο 66 με 88% του συνολικού (ενδο- συν εξωκυτταρικό) O_2^- , και στο 59% με 85% του συνολικού H_2O_2 (Πίν. 2.1).

Η χρησιμοποίηση της κυτταρινάσης Onozuka προκάλεσε αύξηση στην εξω- και ενδοκυτταρική συγκέντρωση των EMO και στα δύο φυτικά είδη. Οι εξωκυτταρικές EMO αυξήθηκαν 100% και 71% στον καπνό και 300% και 36% στην άμπελο, για το O_2^- και το H_2O_2 , αντίστοιχα. Οι ενδοκυτταρικές EMO αυξήθηκαν επίσης στους πρωτοπλάστες καπνού κατά 77% και 39,5% και στους πρωτοπλάστες αμπέλου κατά 12,5% και 269% για το O_2^- και το H_2O_2 , αντίστοιχα (Πίν. 2.1). Παράταση της επώασης με την κυτταρινάση Onozuka, είχε ως αποτέλεσμα ακόμα μεγαλύτερη αύξηση στην συσσώρευση EMO, αύξηση η οποία ήταν εντονότερη στο εξωκυτταρικό O_2^- και H_2O_2 των πρωτοπλαστών καπνού, τα οποία αυξήθηκαν κατά 3,5-φορές. Στην άμπελο, αντίστοιχα, παρατηρήθηκε διπλασιασμός στο ενδοκυτταρικό O_2^- και στο εξωκυτταρικό H_2O_2 . Οι πρωτοπλάστες, οι οποίοι απομονώθηκαν με κυτταρινάση Worthington, την στιγμή της απομόνωσης, περιείχαν σχετικά υψηλά επίπεδα και των δύο EMO (Πίν. 2.1), πράγμα που μάλλον οφείλεται στην διαδικασία της απομόνωσης, αφού, όπως έχει ήδη αναφερθεί, το ενζυμικό παρασκεύασμα δεν έχει τέτοια ιδιότητα. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η φυσική πίεση (Yahraus *et al.*, 1995) και η διαδικασία πλυσίματος (Qian *et al.*, 1993), επάγουν την παραγωγή EMO.

Το αφόρτιστο μόριο του H_2O_2 μπορεί να διασχίζει τις βιολογικές μεμβράνες εύκολα, ενώ το O_2^- μπορεί να πρωτονιωθεί σχηματίζοντας την ρίζα υδροπεροξειδίου HO_2^- , η οποία ίσως μπορεί να διασχίσει την κυτταρική μεμβράνη, όμως το pK_a της ρίζας αυτής είναι 4,8 γεγονός που υποδεικνύει ότι λιγότερο από το 1% του υπεροξειδίου πρωτονιώνεται στο κυτόπλασμα και έτσι, το φορτισμένο O_2^- δεν μπορεί να εισχωρήσει στην κυτταρική μεμβράνη παρά μόνο μέσω καναλιών ιόντων (Dunford, 1993). Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν για την ενδο- και εξωκυτταρική συσσώρευση των EMO,

μπορούν να υποθέσουν δύο τουλάχιστον διαφορετικές πηγές των ΕΜΟ, μία εκτός και μία εντός της κυτταρικής μεμβράνης. Η εξωκυτταρική παραγωγή ΕΜΟ φαίνεται να εμπλέκει την NADPH οξειδάση και την NAD(P)H οξειδάση-περοξειδάση στον καπνό και μόνο την δεύτερη στην άμπελο (Κεφ. 1). Η εξωκυτταρική συσσώρευση του H_2O_2 στους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, δεν επηρεάστηκε από το DDC, που είναι αναστολέας της κυτοπλασμικής Cu/Zn SOD (Heikkila *et al*, 1976), δείχνοντας έτσι ότι δεν υπάρχει εξωκυτταρική ενεργότητα SOD που θα μπορούσε να συνεισφέρει στην ενζυμική παραγωγή H_2O_2 από το O_2^- (Κεφ. 1) (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 1999).

Η κυτταρινάση Worthington παρήγαγε πρωτοπλάστες καπνού με την χαμηλότερη συγκέντρωση ΕΜΟ και το υψηλότερο ποσοστό βιωσιμότητας και διαιρετικής ικανότητας (Πίν. 2.1, Εικ. 2.4, 4-). Η χρησιμοποίηση της κυτταρινάσης Onozuka για ίδιο χρόνο, μείωσε το ποσοστό βιωσιμότητας και διαιρετικής ικανότητας των πρωτοπλαστών, ενώ συγχρόνως προκάλεσε αύξηση στην συσσώρευση των ΕΜΟ (Πίν. 2.1, Εικ. 2.4, 4+). Η παράταση της επώασης των φύλλων με τα ενζυμικά παρασκευάσματα κυτταρινάσης Onozuka μείωσε ακόμα περισσότερο την βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού καθώς και την μεταβολική τους ενεργότητα, ενώ αύξησε την συγκέντρωση των ΕΜΟ (Πίν. 2.1, Εικ. 2.3, 2.4).

Οι πρωτοπλάστες αμπέλου εμφάνισαν βελτιωμένη βιωσιμότητα με κυτταρινάση Worthington και με μικρής διάρκειας επώαση με κυτταρινάση Onozuka (Εικ. 2.4). Στο *rotundifolia*, το μοναδικό είδος *Vitis* στο οποίο έχει αναφερθεί διαίρεση πρωτοπλαστών μεσοφύλλου, η βιωσιμότητα και η διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών μειώνονται με την αύξηση του χρόνου επώασης (Lee *et al.*, 1989b). Η διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών αμπέλου δεν βελτιώθηκε, ανεξάρτητα της μεταχείρισης (Εικ. 2.4). Η συσσώρευση ΕΜΟ ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τους πρωτοπλάστες καπνού, φαίνεται όμως ότι άλλοι λόγοι, όπως η απόσβεση των ΕΜΟ, ρυθμίζουν την τύχη των πρωτοπλαστών αυτών. Οι λόγοι αυτοί ερευνούνται στα επόμενα κεφάλαια.

Η μείωση της βιωσιμότητας και της διαιρετικής ικανότητας στους πρωτοπλάστες με την χρησιμοποίηση της κυτταρινάσης Onozuka και ακόμα περισσότερο, με την αύξηση του χρόνου δράσης της (Εικ. 2.1-2.3, 2.4), οφείλεται στην παραγωγή ΕΜΟ (Πιν. 2.1) κατά την διάρκεια της ενζυμικής αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος (Εικ. 1.8). Έχει αναφερθεί συγκέντρωση ενεργών μορφών οξυγόνου κατά τη διάρκεια της απομόνωσης πρωτοπλαστών από κύτταρα κάλλου *Oryza sativa* L. (Ishii, 1987), ενώ κύτταρα κάλλου αμπέλου έδειξαν αντίδραση υπερευαισθησίας με ταυτόχρονη παραγωγή φυτοαλεξινών κατά την επίδραση κυτταρινάσης Onozuka από *Trichoderma viride* (Calderon *et al.*, 1994).

Οι παραπάνω επιδράσεις της κυτταρινάσης Onozuka οφείλονται στον ενζυμικό παράγοντα του παρασκευάσματος, β-1,4-ενδοξυλανάση, η οποία υπάρχει σε σημαντικές ποσότητες στην κυτταρινάση Onozuka (Fuchs *et al.*, 1989). Στο προηγούμενο κεφάλαιο διαπιστώθηκε παραγωγή ΕΜΟ κατά την προσθήκη καθαρής ενδοξυλανάσης σε φύλλα και πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου (Εικ. 1.12 και 1.13). Η επίδραση της β-1,4-ενδοξυλανάσης σε κύτταρα κάλλου ρυζιού δημιούργησε O_2^- με ταυτόχρονη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων (Ishii, 1988), ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε για 4 h σε πρωτοπλάστες μεσόφυλλου *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi δεν επηρέασε την βιωσιμότητα των πρωτοπλαστών, ενώ μετά από 16 h δράσης, η βιωσιμότητα ήταν ελάχιστη (Sharon *et al.*, 1993). Η μείωση της βιωσιμότητας των πρωτοπλαστών με την επίδραση της ξυλανάσης οφείλεται πιθανόν σε ζημιές της κυτταρικής μεμβράνης (Bailey *et al.*, 1992), γεγονός που είναι συμβατό με την παραγωγή ΕΜΟ (Πιν. 2.1).

Η συσχέτιση της παραγωγής ΕΜΟ, με την έκφραση του ολοδυναμικού των πρωτοπλαστών καπνού, ενισχύθηκε όταν προστέθηκε αλκαλικό DMSO στο μέσο επώασης των πρωτοπλαστών με κυτταρινάση Worthington. Οι πρωτοπλάστες που προέκυψαν μετά από 4 h παρουσίασαν χαμηλότερο ποσοστό βιωσιμότητας και διαιρετικής ικανότητας σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικ. 2.6). Επιπλέον, η προσθήκη ασκορβικού οξέος, στο μέσο επώασης των φύλλων για την παραγωγή μη αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού (16h,

κυτταρινάση Ohozuka), βελτίωσε σημαντικά την βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών (Εικ. 2.7). Έτσι φαίνεται ότι οι ΕΜΟ που παράγονται στα πρώιμα στάδια της απομόνωσης των πρωτοπλαστών ανάλογα με την ποιότητα και τον χρόνο δράσης των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση στους πρωτοπλάστες: εκείνοι που είναι ικανοί να αποσβέσουν τις ΕΜΟ επιβιώνουν και διαιρούνται, εκείνοι που δεν είναι σε θέση, οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο. Η συσσώρευση των ΕΜΟ κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου παρουσιάζεται στην Εικ. 2.8, ενώ η μελέτη της απόσβεσης ή όχι των ΕΜΟ ακολουθεί στα επόμενα Υποκεφάλαια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.2

**ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ, ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ
ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ,
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ
ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ**

2.2.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μέτρηση των φυσικών αντιοξειδωτικών ασκορβικού οξέος και γλουταθειόνης, και ιδιαίτερα η μορφή τους (αναγμένη ή οξειδωμένη) αποτελεί ένδειξη της οξειδωτικής κατάστασης των κυττάρων. Το ολικό ασκορβικό, η αναγμένη μορφή (ASA) και η οξειδωμένη (DHA) ήταν σημαντικά υψηλότερη στο φύλλο αμπέλου, σε σύγκριση με το φύλλο καπνού. Κατά την διάρκεια της καλλιέργειας των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού, το επίπεδο του ολικού ασκορβικού παρέμεινε σταθερό, ενώ παρουσίασε αύξηση στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου. Στους πρώτους, ως κυρίαρχη μορφή προσδιορίστηκε το ASA και στους τελευταίους, το DHA. Η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) ήταν σε χαμηλή συγκέντρωση στο φύλλο των δύο φυτικών ειδών, ενώ το επίπεδο της αναγμένης μορφής (GSH) ήταν διπλάσιο στο φύλλο καπνού σε σχέση με το φύλλο του αμπέλου. Στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, το επίπεδο της GSH ήταν σημαντικά υψηλότερο από εκείνο της GSSG κατά την καλλιέργεια, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες. Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, η GSSG κυριάρχησε κατά την καλλιέργεια. Οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού και εντονότερα οι πρωτοπλάστες αμπέλου χαρακτηρίστηκαν από χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό των δύο αντιοξειδωτικών. Αντίθετα, κατά την καλλογένεση, το οξειδοαναγωγικό επίπεδο διατηρήθηκε υψηλό στα δύο φυτικά είδη.

2.2.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ζωή με το οξυγόνο έχει οδηγήσει στην εξέλιξη βιοχημικών προσαρμογών που εκμεταλλεύονται την δραστικότητα των EMO. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σημαντικότερη τοξική δράση των O_2^- και του H_2O_2 προέρχεται από την ικανότητά τους να ξεκινούν ένα καταρράκτη αντιδράσεων, που οδηγεί στην παραγωγή καταστροφικών μορφών, όπως η ρίζα υδροξυλίου και τα υπεροξειδία λιπιδίων. Αυτή η επικίνδυνη εξέλιξη εμποδίζεται από την αποτελεσματική λειτουργία του κυτταρικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού.

Ο όρος αντιοξειδωτικό μπορεί να θεωρηθεί ότι περιγράφει κάθε στοιχείο

ικανό να αποσβένει EMO χωρίς το ίδιο να υφίσταται μετατροπή σε καταστροφική ρίζα (Noctor and Foyer, 1998a). Αντιοξειδωτικά ένζυμα θεωρούνται εκείνα, που ή καταλύουν τέτοιες αντιδράσεις ή εμπλέκονται στην άμεση επεξεργασία των EMO. Έτσι, οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα λειτουργούν για να διακόψουν τον καταρράκτη των μη ελεγχόμενων οξειδώσεων. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, πολλές από τις οποίες βασίζονται σε παροχή ηλεκτρονίων από αναγωγικούς παράγοντες, χαμηλού μοριακού βάρους. Μεταξύ αυτών των παραγόντων, εξαιρετικής σημασίας είναι το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη, που επιτελούν πολλαπλούς ρόλους στις αντιδράσεις άμυνας (Foyer and Halliwell, 1976, Rennenberg, 1982).

Στα φυτά, το σημαντικότερο αναγωγικό υπόστρωμα για το H_2O_2 είναι το ασκορβικό οξύ (Nakano and Asada, 1987). Η ασκορβική υπεροξειδάση (APO) χρησιμοποιεί δύο μόρια ασκορβικού (ASA) για να ανάγει το H_2O_2 σε νερό, με επακόλουθη γένεση δύο μορίων μονοδιυδροασκορβικού (MDHA). Το MDHA είναι μια ρίζα με μικρή ημιζωή, οπότε αν δεν αναχθεί αμέσως, μετατρέπεται σε ασκορβικό και διυδροασκορβικό (DHA) (Noctor and Foyer, 1998a). Παρά την πιθανότητα ενζυμικής και μη ενζυμικής αναγέννησης του ASA κατευθείαν από MDHA, η άμεση και ταχεία μετατροπή του MDHA σε ασκορβικό και DHA, σημαίνει ότι DHA παράγεται πάντα, όταν το ασκορβικό οξειδώνεται στους ιστούς. Το DHA ανάγεται σε ασκορβικό από την DHAR, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα GSH (Foyer and Halliwell, 1976). Η αντίδραση αυτή παράγει οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), η οποία με την σειρά της ανάγεται από το NADPH σε μια αντίδραση που καταλύεται από την GR. Η απομάκρυνση του H_2O_2 μέσω της προηγούμενης σειράς αντιδράσεων είναι γνωστή ως κύκλος Halliwell-Asada. Το ασκορβικό και η γλουταθειόνη δεν καταναλώνονται στο μονοπάτι αυτό αλλά συμμετέχουν σε μια κυκλική μεταφορά αναγομένων ισοδυνάμων, που εμπλέκει 4 ένζυμα και επιτρέπει την αναγωγή του H_2O_2 σε H_2O (Foyer *et al.*, 1997).

Στο Κεφάλαιο αυτό μελετήθηκαν τα επίπεδα του ολικού ασκορβικού και της ολικής γλουταθειόνης, καθώς των αναγμένων και οξειδωμένων μορφών

τους, και το οξειδοαναγωγικό επίπεδο των δύο αντιοξειδωτικών κατά την καλλιέργεια των αναγεννώμενων και μη πρωτοπλάστων καπνού και των πρωτοπλαστών αμπέλου, καθώς και κατά την καλλογένεση των δύο φυτικών ειδών.

2.2.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.3.1. Ανάπτυξη φυτών και απομόνωση πρωτοπλαστών

Η ανάπτυξη των φυτών και η απομόνωση των πρωτοπλαστών έγινε όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1 (1.2.1 και 1.2.2). Η διάρκεια επώασης των φύλλων με τα ένζυμα απομόνωσης των πρωτοπλαστών ήταν 4 ή 16 h, με 1% κυτταρινάση Onozuka και 0,5% μακεροζύμη Onozuka για τους αναγεννώμενους και μη πρωτοπλάστες καπνού, αντίστοιχα και 16 h για τους πρωτοπλάστες αμπέλου.

2.2.3.2. Επαγωγή καλλογένεσης σε μεσόφυλλο

Μικρά τεμάχια φύλλου αμπέλου και καπνού καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό όπως έχει αναφερθεί (Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1991). Η καλλιέργεια έγινε στους 27° C, στο σκοτάδι.

2.2.3.3. Μέτρηση του ασκορβικού οξέος

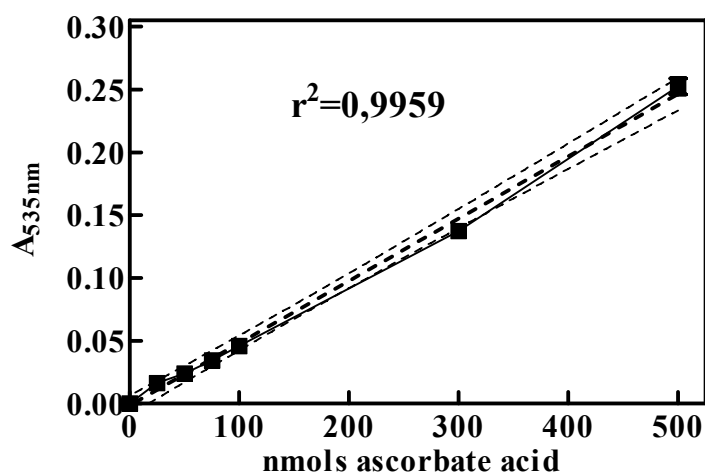
Ο προσδιορισμός του επιπέδου του ασκορβικού οξέος (ASA) έγινε μέσω της αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή από την αναγμένη μορφή του ασκορβικού, σε όξινο μέσο, με επακόλουθο σχηματισμό έγχρωμου χηλικού συμπλόκου ανάμεσα στο δισθενή σίδηρο και το 4,7-diphenyl-1,10,-phenanthroline (bathophentrolin) (Wang *et al.*, 1991). Το επίπεδο του ολικού ασκορβικού (ASA+DHA) προσδιορίστηκε μετά από αναγωγή του DHA σε ASA, παρουσία διθειοθρεϊτόλης (DTT), ενώ η συγκέντρωση του DHA υπολογίστηκε από την διαφορά του επιπέδου του ASA από το ολικό ασκορβικό.

Ο ιστός (πρωτοπλάστες, φύλλο ή κάλλος) εκχυλίστηκε με κρύο 5% (w/v) TCA σε αναλογία 1:5 (w/v, ιστός/TCA). Το ομογενοποίημα κρατήθηκε για 20 min σε πάγο (4° C) με περιοδική ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10 min, στους 4°C (Sorvall, DuPont, S34). Το υπερκείμενο που προέκυψε, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του

ASA και του ολικού ασκορβικού, ενώ το ίζημα χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των ολικών πρωτεϊνών (Lowry *et al.*, 1951).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ASA, 50-100 μL από το υπερκείμενο προστέθηκαν στο διάλυμα αντίδρασης, που περιείχε 500 μL απόλυτη αιθανόλη, 0,6 M TCA, 1 mM bathophentroline, 8 mM H_3PO_4 και 0,17 mM FeCl_3 . Τα δείγματα επώαστηκαν για 90 min στους 30°C , για την ανάπτυξη του χρώματος. Η απορρόφηση των δειγμάτων προσδιορίστηκε στα 534 nm και η συγκέντρωση του ASA υπολογίστηκε από πρότυπη καμπύλη (Εικ.2.9).

Για την αναγωγή του DHA, 50-100 μL από το υπερκείμενο επώαστηκαν με 150 μL 3,89 mM DTT και 350 μL απόλυτης αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Η περίσσεια της DTT απομακρύνθηκε με την προσθήκη 150 μL 0,24% (w/v) N-ethylmaleimide-ethanol και 150 μL 20% (w/v) TCA. Ακολούθως, προστέθηκαν 150 μL 0,4% (v/v) H_3PO_4 -ethanol, 300 μL 0,5% (w/v) bathophentroline-ethanol και 150 μL 0,03% (w/v) FeCl_3 -ethanol. Η ανάπτυξη του χρώματος και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ολικού ασκορβικού έγινε όπως αναφέρθηκε παραπάνω για το ASA.

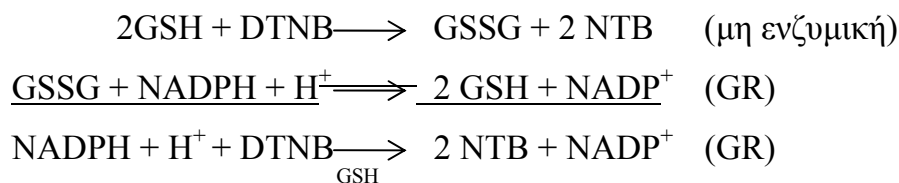


Εικ. 2.9. Η πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος.

2.2.3.4. Μέτρηση της γλουταθειόνης

Η συγκέντρωση της ολικής γλουταθειόνης προσδιορίστηκε με την βιοδοκιμή της ενζυμικής ανακύκλωσής της κατά την οποία η GSH οξειδώνεται από το 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) σε GSSG και στην συνέχεια

ανάγεται από το NADPH παρουσία της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) (Akerboom and Sies, 1981). Παρακολουθείται ο ρυθμός παραγωγής του 2-nitro-5-thiobenzoic acid (NTB) στα 412 nm στην παρακάτω αντίδραση:

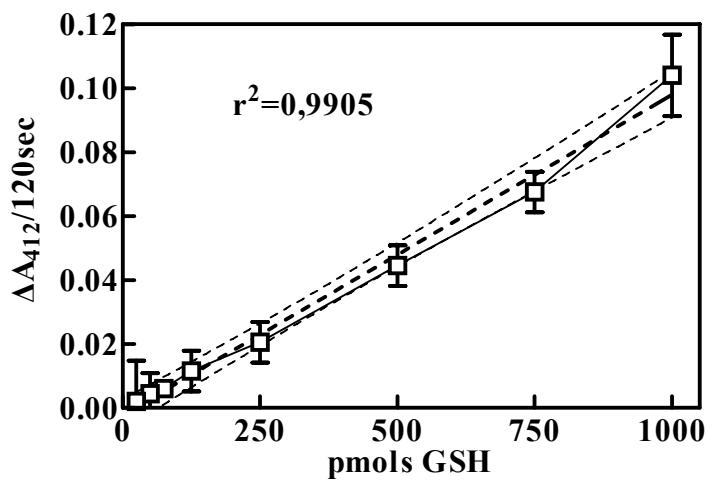


Ο ιστός (πρωτοπλάστες, φύλλο ή κάλλος) εκχυλίστηκε με 1M HClO₄, 2 mM EDTA σε αναλογία 1:4 (w/v, ιστός/TCATo ομογενοποίηση κρατήθηκε για 20 min σε πάγο (4° C) με περιοδική ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10 min, στους 4°C (Sorvall, DuPont, S34). Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης, όμως η βιοδοκιμή απαιτεί ουδέτερο pH οπότε τα όξινα δείγματα (pH≅1,2±0,3) εξουδετερώθηκαν με 0,5 M φωσφορικό κάλιο, pH 7,5, σε αναλογία 1:1,5 (v/v, δείγμα/buffer). Η εξουδετέρωση πραγματοποιήθηκε λίγο πριν την βιοδοκιμή για να αποφευχθεί η αυτοοξειδωση της GSH στο υψηλό pH (≥7). Το ίζημα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών (Lowry *et al.*, 1951).

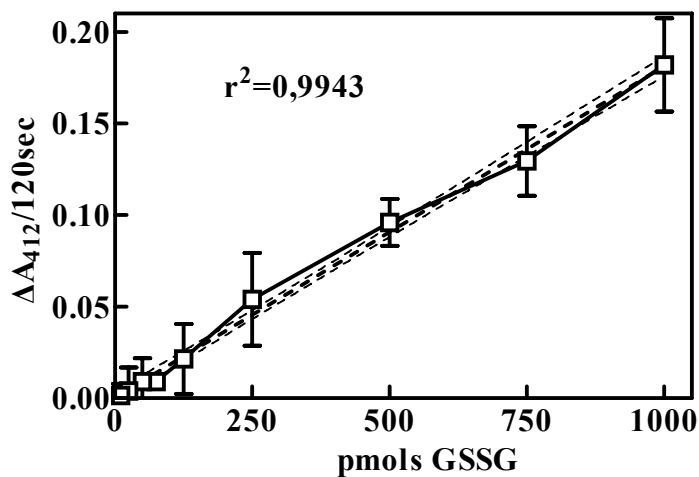
Η βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 20 μL εξουδετερωμένου δείγματος σε διάλυμα αντίδρασης το οποίο περιείχε 0,1 M KPO₄, pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,25 mM NADPH, 13,15 mM DTNB και 0,12 μονάδες ενεργότητας εμπορικής GR (Sigma). Η συγκέντρωση της ολικής γλουταθειόνης προσδιορίστηκε από πρότυπη καμπύλη (Εικ. 2.10).

Προκειμένου να προσδιορισθεί η συγκέντρωση της GSSG έγινε «απόκρυψη» της GSH με την χρησιμοποίηση 4-vinyl pyridine σε αναλογία 1:12,5, δείγμα:4-vinyl pyridine, οπότε η «απόκρυψη» της GSH φτάνει σε επίπεδο 96% (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται). Η μεταχείριση με το 4-vinyl pyridine έγινε ταυτόχρονα με την εξουδετέρωση του δείγματος. Μετά από ισχυρή ανάδευση και επώαση στους 25°C για 90 min, ακολούθησε η βιοδοκιμή που περιγράφηκε παραπάνω. Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του επιπέδου της GSSG φαίνεται στην Εικόνα 2.11. Η συγκέντρωση της GSH προσδιορίστηκε από την διαφορά της συγκέντρωσης

της GSSG από την ολική γλουταθειόνη.



Εικ.
2.10. Η
πρότυπη
καμπύλη της
αναγμένης
γλουταθειόνης
(GSH).



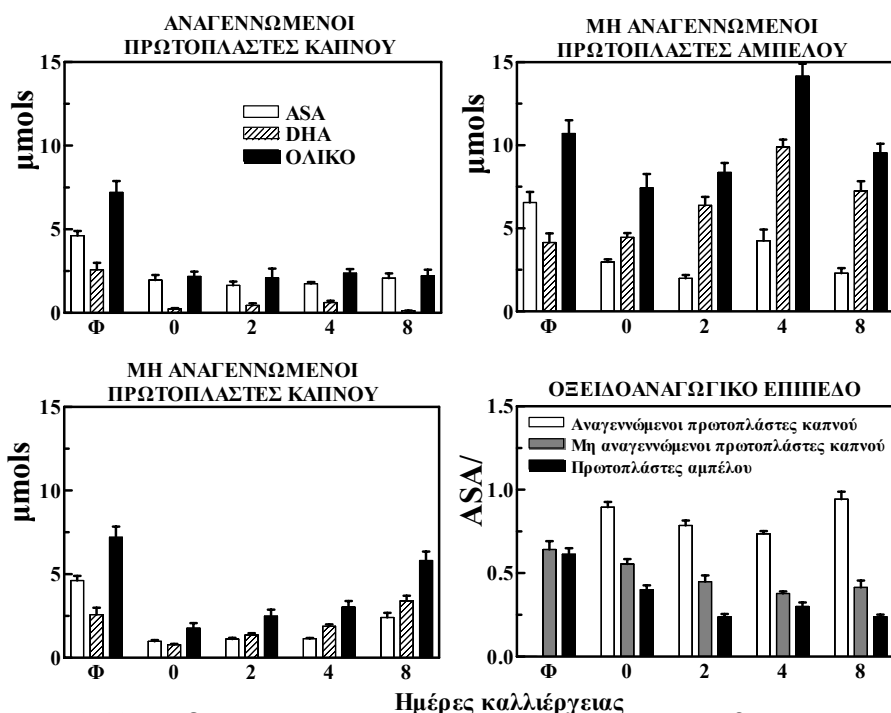
Εικόνα.
2.11. Η πρότυπη
καμπύλη της
οξειδωμένης
γλουταθειόνης
(GSSG).

2.2.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2.4.1. Ενδογενής συγκέντρωση και οξειδοαναγωγικό επίπεδο του ασκορβικού οξέος κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών καπνού και

αμπέλου

Το ολικό ασκορβικό οξύ ήταν 50% υψηλότερο στα φύλλα αμπέλου σε σύγκριση με τα φύλλα καπνού (Εικ. 2.12). Η συγκέντρωση της αναγμένης μορφής του ασκορβικού (ASA) ήταν 1,5- φορά μεγαλύτερη από εκείνη της οξειδωμένης μορφής (DHA). Στους πρωτοπλάστες, αμέσως μετά την



Εικ. 2.12. Ενδογενής συγκέντρωση του ολικού ασκορβικού, της αναγμένης (ASA) και της οξειδωμένης (DHA) μορφής του, και οξειδοαναγωγικό επίπεδο του ασκορβικού κατά την καλλιέργεια αναγεννώμενων και μη πρωτοπλαστών καπνού και πρωτοπλαστών αμπέλου. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

απομόνωση, το επίπεδο του ολικού ασκορβικού ήταν 3- και 4-φορές χαμηλότερο στους αναγεννώμενους και τους μη αναγεννώμενους καπνού, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το φύλλο. Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, η αντίστοιχη συγκέντρωση ήταν 1,5-φορά χαμηλότερη (Εικ. 2.12). Η μείωση που παρατηρήθηκε στο επίπεδο του ολικού ασκορβικού, περιλάμβανε και τις δύο μορφές του ασκορβικού στους πρωτοπλάστες καπνού, αλλά μόνο την αναγμένη μορφή στους πρωτοπλάστες αμπέλου, όπου το DHA παρέμεινε στο

ίδιο επίπεδο με εκείνο που ανιχνεύτηκε στο φύλλο (Εικ. 2.12).

Στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού εμφανίστηκε σχεδόν σταθερό επίπεδο ASA και DHA κατά την οκταήμερη καλλιέργεια, εκτός την 8η ημέρα, όπου το ASA αυξήθηκε κατά 20% και το DHA μειώθηκε ανάλογα (Εικ. 2.12). Στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, το ολικό ασκορβικό αυξήθηκε κατά την καλλιέργεια, φτάνοντας την 8η ΗΚ σε επίπεδο 3,3-φορές υψηλότερο από εκείνο που ανιχνεύτηκε αμέσως μετά την απομόνωσή τους (Εικ. 2.12). Αντίστοιχη αύξηση παρατηρήθηκε και στο ASA και το DHA. Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, το ASA και το DHA έφτασαν στις μέγιστες τιμές τους την 4η ΗΚ και στην συνέχεια μειώθηκαν (Εικ. 2.12). Γενικότερα, οι πρωτοπλάστες αμπέλου περιείχαν 2- με 3-φορές υψηλότερο επίπεδο ASA και DHA από τους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού (Εικ. 2.12).

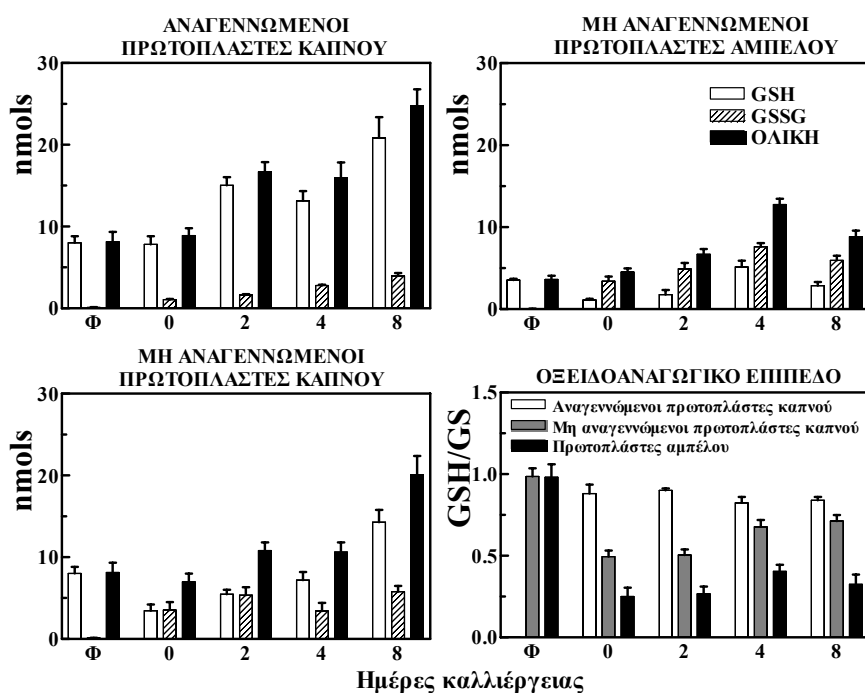
Το επίπεδο οξειδοαναγωγής του ασκορβικού, εκφρασμένο με τον λόγο ASA/ASA+DHA, ήταν υψηλότερο στους δύο πληθυσμούς των πρωτοπλαστών καπνού σε σχέση με τους πρωτοπλάστες αμπέλου και παρέμεινε έτσι κατά την καλλιέργεια. Υψηλότερη αναλογία πάντως βρέθηκε στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού σε όλη την διάρκεια της καλλιέργειας (Εικ. 2.12). Στους δύο πληθυσμούς των πρωτοπλαστών καπνού το επίπεδο οξειδοαναγωγής μειώθηκε ελαφρώς στις 4 πρώτες ΗΚ και αυξήθηκε την 8η ΗΚ, ενώ στους πρωτοπλάστες αμπέλου, μειώθηκε με την 2η ΗΚ και παρέμεινε στο ίδιο περίπου επίπεδο κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.12).

2.2.4.2. Ενδογενής συγκέντρωση και οξειδοαναγωγικό επίπεδο της γλουταθειόνης κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου

Η ολική συγκέντρωση και το επίπεδο της αναγμένης και οξειδωμένης μορφής της γλουταθειόνης, μελετήθηκε κατά την απομόνωση και την καλλιέργεια των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού και μη αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου (Εικ. 2.13). Το φύλλο αμπέλου περιείχε 2,3-φορές χαμηλότερη συγκέντρωση γλουταθειόνης από το φύλλο καπνού, όμως και στα δύο φυτά, το μεγαλύτερο ποσοστό αντιστοιχούσε

στην αναγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH) (Εικ. 2.13). Οι πρωτοπλάστες την στιγμή της απομόνωσης τους παρουσίασαν σχεδόν την ίδια συγκέντρωση ολικής γλουταθειόνης όπως ο ιστός φύλλου-δότη, όμως η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) ήταν σημαντικά υψηλότερη σε όλους τους πληθυσμούς των πρωτοπλαστών: σε σύγκριση με το φύλλο, η GSSG είχε αυξηθεί κατά 9-, 31- και 48-φορές στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, στους μη αναγεννώμενους και στους πρωτοπλάστες αμπέλου, αντίστοιχα (Εικ. 2.13).

Κατά την καλλιέργεια, το επίπεδο της ολικής γλουταθειόνης αυξήθηκε



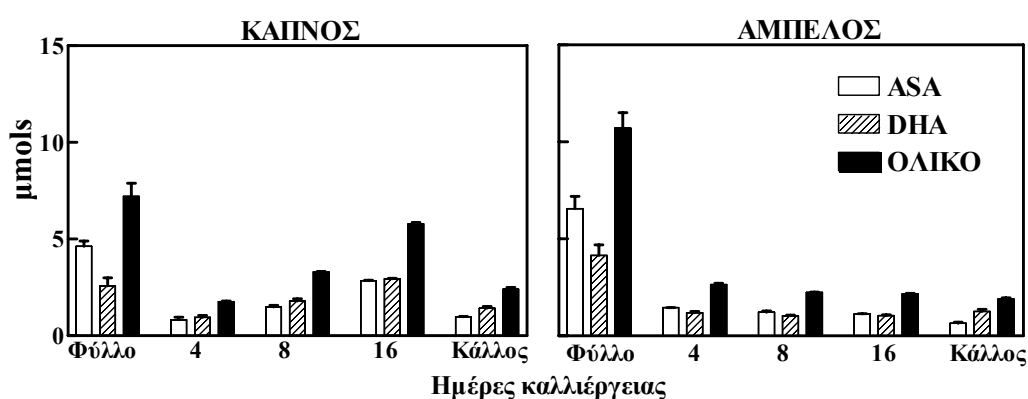
Εικ. 2.13. Ενδογενής συγκέντρωση της ολικής γλουταθειόνης, της αναγμένης (GSH) και της οξειδωμένης (GSSG) μορφής της, και οξειδοαναγωγικό επίπεδο της γλουταθειόνης κατά την καλλιέργεια αναγεννώμενων και μη πρωτοπλαστών καπνού και πρωτοπλαστών αμπέλου. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

στους πρωτοπλάστες καπνού, με εντονότερη αύξηση στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες (Εικ. 2.13). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, η

ολική γλουταθειόνη αυξήθηκε επίσης τις πρώτες 4 ΗΚ και μειώθηκε στην συνέχεια. Οι δύο μορφές της γλουταθειόνης ακολούθησαν το πρότυπο της ολικής (Εικ. 2.13). Η GSH ήταν πάντοτε υψηλότερη στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, σε όλη την διάρκεια καλλιέργειας, χαμηλότερη στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και ακόμα χαμηλότερη στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες αμπέλου, και ακριβώς έτσι διαμορφώθηκε το επίπεδο οξειδοαναγωγής της γλουταθειόνης, εκφρασμένο από τον λόγο GSH/GSH+GSSG (Εικ. 2.13).

2.2.4.3. Ενδογενής συγκέντρωση και οξειδοαναγωγικό επίπεδο του ασκορβικού και της γλουταθειόνης κατά την καλλογένεση καπνού και αμπέλου

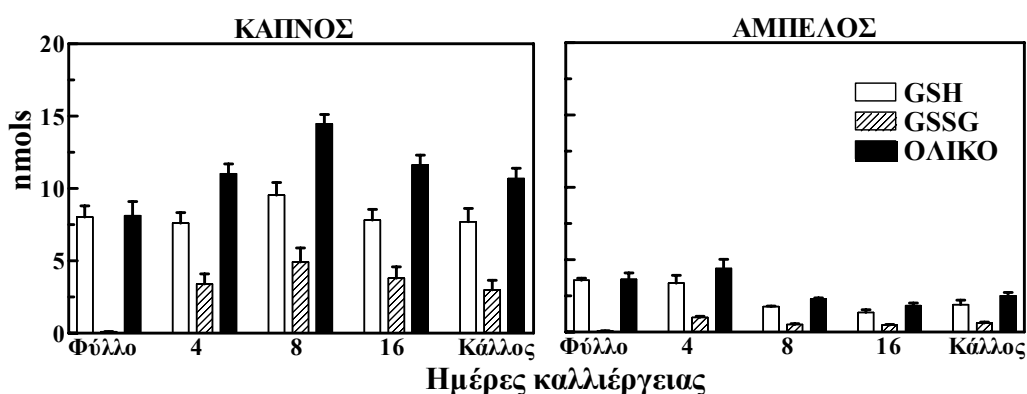
Η συγκέντρωση του ασκορβικού και της γλουταθειόνης μελετήθηκαν κατά την επαγωγή καλλογένεσης σε έκφυτα φύλλου καπνού και αμπέλου. Σε αντίθεση



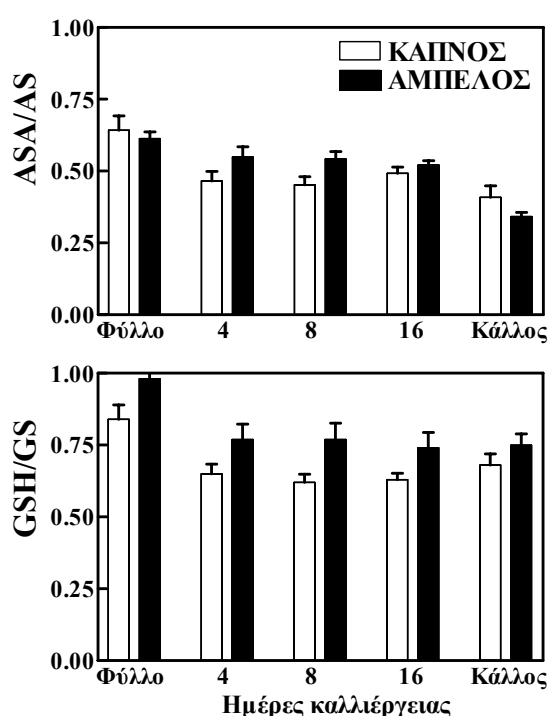
Εικ. 2.14. Ενδογενής συγκέντρωση του ολικού ασκορβικού, της αναγμένης (ASA) και της οξειδωμένης (DHA) μορφής του κατά την καλλογένεση εκφύτων φύλλου καπνού και αμπέλου. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

με τους πρωτοπλάστες, τα κύτταρα μεσοφύλλου του αμπέλου έχουν την ικανότητα για αποδιαφοροποίηση και διαίρεση, όπως διαπιστώθηκε από την πορεία των εκφύτων φύλλου σε *in vitro* καλλιέργεια (Συμινής Χ.Ι., Διδακτορική Διατριβή): οι πρώτες διαιρέσεις των κυττάρων άρχισαν περιμετρικά την 4η ημέρα καλλιέργειας, ενώ οι συνεχείς διαιρέσεις, μετά από 8 ΗΚ, οδήγησαν σε καλλογένεση. Έκφυτα φύλλου καπνού παρουσίασαν όμοιο πρότυπο με τα έκφυτα αμπέλου.

Κατά την καλλογένεση, το ολικό ασκορβικό μειώθηκε τις πρώτες ΗΚ και στα δύο φυτά, στην πορεία όμως αυξήθηκε στον καπνό και διατηρήθηκε σε σταθερό επίπεδο στην άμπελο (Εικ. 2.14). Ανάλογο πρότυπο παρατηρήθηκε για τις δύο μορφές του ασκορβικού, το ASA και το DHA (Εικ. 2.14). Στο στάδιο του κάλλου, το επίπεδο του ολικού ασκορβικού μειώθηκε στον καπνό, ενώ δεν διαφοροποιήθηκε στην άμπελο (Εικ. 2.14). Η συγκέντρωση της ολικής γλουταθειόνης αυξήθηκε τις πρώτες ΗΚ των εκφύτων στον καπνό και την άμπελο, στην συνέχεια μειώθηκε και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα μέχρι και το στάδιο του κάλλου (Εικ. 2.15). Και στα δύο φυτικά είδη η συγκέντρωση της GSSG αυξήθηκε κατά την επαγωγή κάλλου σε σχέση με τον ιστό-δότη (Εικ. 2.15). Το επίπεδο οξειδοαναγωγής του ασκορβικού και της γλουταθειόνης μειώθηκε κατά την καλλογένεση των εκφύτων φύλλου και από τα δύο φυτικά είδη, σε σύγκριση με το φύλλο, διατηρήθηκε όμως σε υψηλό επίπεδο κατά την καλλιέργεια, με εξαίρεση το οξειδοαναγωγικό επίπεδο του ασκορβικού, το οποίο μειώθηκε στο στάδιο του κάλλου και στα δύο φυτά (Εικ. 2.16).



Εικ. 2.15. Ενδογενής συγκέντρωση της ολικής γλουταθειόνης, της αναγμένης (GSH) και της οξειδωμένης (GSSG) μορφής της, κατά την καλλογένεση εκφύτων φύλλου καπνού και αμπέλου. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.



Εικ. 2.16. Οξειδοαναγωγικό επίπεδο του ασκορβικού και της γλουταθειόνης κατά την καλλογένεση εκφύτων φύλλου καπνού και αμπέλου. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

2.2.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ασκορβικό και η γλουταθειόνη μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά κατά την απόσβεση των EMO στα αερόβια κύτταρα. Έχουν επίσης κεντρικό και αλληλοσχετιζόμενο ρόλο, καθώς μπορούν να δράσουν τόσο χημικά, αντιδρώντας άμεσα με ελεύθερες ρίζες, όσο και ως υποστρώματα των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις απόσβεσης (Alscher, 1989,

Alscher *et al.*, 1997, Foyer *et al.*, 1997, Noctor and Foyer, 1998a). Κατά την καλλιέργεια των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα GSH (Εικ. 2.13) και σημαντικά υψηλά επίπεδα ASA (Εικ. 2.12). Συχνά η διέγερση της βιοσύνθεσης της GSH έχει σχετιστεί με καταστάσεις καταπονήσεων (Noctor and Foyer, 1998a). Σε καλλιέργεια κυττάρων *Arabidopsis*, η αυξημένη συγκέντρωση GSH σχετίστηκε ισχυρά με την προστασία ενάντια στην οξειδωτική καταπόνηση (May and Leaver, 1993), ενώ έχει παρατηρηθεί σταθερή συσχέτιση ανάμεσα στην αύξηση των επιπέδων του ASA και της GSH με την μείωση της ευαισθησίας των φυτών καπνού στο παρακουάτ (Slooten *et al.*, 1995). Επίσης αυξημένα επίπεδα GSH συνδέονται με περιβαλλοντικές καταπονήσεις, όπως ξηρασία (Sgherri *et al.*, 1994) και υδατική καταπόνηση (Alscher, 1989). Οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού και ιδιαίτερα οι πρωτοπλάστες αμπέλου παρουσίασαν υψηλό επίπεδο GSSG, μορφή που θεωρείται βλαβερή για τα κύτταρα, καθώς μπορεί να αναστείλει την πρωτεϊνοσύνθεση και την ενεργότητα πολλών ενζύμων (Alscher *et al.*, 1997).

Η ολική συγκέντρωση του ασκορβικού ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους καλλιεργούμενους πρωτοπλάστες σε σχέση με το φύλλο, και στα δύο φυτικά είδη (Εικ. 2.12). Το επίπεδο του ολικού ασκορβικού ήταν σχεδόν σταθερό κατά την καλλιέργεια των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού, ενώ αυξήθηκε στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου (Εικ. 2.12). Στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού το κυρίαρχο κλάσμα του ολικού ασκορβικού ήταν η αναγμένη μορφή, ενώ στους μη αναγεννώμενους και στους πρωτοπλάστες αμπέλου κυριαρχούσε η οξειδωμένη μορφή (Εικ. 2.12). Έχει προταθεί ότι το υψηλό επίπεδο του DHA είναι αναστολέας της κυτταρικής διαίρεσης (Gonzalez-Reyes *et al.*, 1994, Cordoba-Pedregosa *et al.*, 1996), εκείνο όμως που φαίνεται να έχει καθοριστική σημασία δεν είναι οι απόλυτες τιμές των δύο μορφών αλλά η αναλογία τους (Noctor and Foyer, 1998a). Κατά την καλλογένεση, που είναι ένα διαιρούμενο σύστημα κυττάρων με κυτταρικό τοίχωμα και που τόσο ο καπνός όσο και η άμπελος ανταποκρίνονται επιτυχώς, το επίπεδο του ολικού ασκορβικού και της

γλουταθειόνης δεν άλλαξε δραματικά (Εικ. 2.14 και 2.15), όμως το οξειδοαναγωγικό επίπεδο των δύο αντιοξειδωτικών διατηρήθηκε υψηλό, επιτρέποντας ίσως την επαγωγή των κυτταρικών διαιρέσεων (Εικ. 2.16). Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι οι αλλαγές στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων είναι μεταξύ των γεγονότων εκείνων, που εκκινούν την θετική ρύθμιση του μηχανισμού άμυνας, συγχρόνως με την αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Αύξηση των επιπέδων του ASA και/ή της GSH ίσως είναι απαραίτητη για την μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (May *et al.*, 1998).

Κάθε κατάσταση, η οποία διακόπτει την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση του κυττάρου μπορεί να χαρακτηριστεί ως οξειδωτική καταπόνηση και μπορεί να οδηγήσει τον κυτταρικό μηχανισμό προς την παραγωγή προοξειδωτικών, δηλαδή EMO (Alscher *et al.*, 1997). Η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών του κυττάρου μπορεί να δημιουργήσει οξειδωτική καταπόνηση (Salin, 1987). Κατά την απομόνωση και την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών, το οξειδοαναγωγικό επίπεδο του ασκορβικού και της γλουταθειόνης ήταν υψηλότερο στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, χαμηλότερο στους μη αναγεννώμενους και ακόμα χαμηλότερο στους πρωτοπλάστες αμπέλου (Εικ. 2.12, 2.13), στοιχείο που υποδεικνύει αλλαγή στην ομοιόσταση των δύο αντιοξειδωτικών στους πρωτοπλάστες. Η αλλαγή αυτή μπορεί να συσχετιστεί με την παραγωγή EMO: οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού εμφάνισαν έντονη συσσώρευση EMO κατά την απομόνωση, η οποία μάλιστα διατηρήθηκε και κατά την καλλιέργεια, σε σχέση με τους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες και οι πρωτοπλάστες αμπέλου παρουσίασαν σημαντική συγκέντρωση EMO (Εικ. 2.8). Σε φύλλα από σπανάκι και τομάτα, η αναλογία αναγμένης/οξειδωμένη μορφή ασκορβικού και γλουταθειόνης μειώθηκαν κατά την έκθεση στο όζον και την καταπόνηση ψύξης, αντίστοιχα (Luwe *et al.*, 1993, Walker and McKersie, 1993). Γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού με ενισχυμένη δυνατότητα παραγωγής GSH, παρουσίασαν ευαισθησία στην οξειδωτική καταπόνηση, όπου η ένταση των συμπτωμάτων (χλωρωτικοί/νεκρωτικοί

φαινότυποι) σχετίζονταν με χαμηλό οξειδοαναγωγικό επίπεδο γλουταθειόνης (Creissen *et al.*, 1999).

Έχει προταθεί ότι η GSH, εκτός από την συμμετοχή της στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, εμπλέκεται στην σηματοδότηση για την ανταπόκριση του κυττάρου στις καταπονήσεις (Wingate *et al.*, 1988, Herouart *et al.*, 1994, Wingsle and Karpinski, 1996). Οι Wingate *et al.* (1988) έδειξαν ότι η υψηλή συγκέντρωση της GSH, αλλά όχι της GSSG, ενισχύει την έκφραση των γονιδίων, που κωδικοποιούν για τα ένζυμα της βιοσύνθεσης των φυτοαλεξινών και της λιγνίνης και πρότειναν ένα γενικό ρόλο της GSH στο σύστημα σηματοδότησης των βιολογικών καταπονήσεων. Επίσης, η GSH και άλλες θειόλες, προκάλεσαν αύξηση του μεταγραφικού επιπέδου ενός γονιδίου αναφοράς που ήταν συνδεδεμένο με τον υποκινητή της κυτοπλασμικής Cu/ZnSOD σε γενετικά τροποποιημένους πρωτοπλάστες καπνού. Τέλος, οι Wingsle και Karpinski (1996) πρότειναν ότι το οξειδοαναγωγικό επίπεδο της γλουταθειόνης έχει ρυθμιστικό ρόλο στην γονιδιακή έκφραση των κυτοπλασμικών και χλωροπλαστικών ισοενζύμων της Cu/ZnSOD.

Το H₂O₂ και η γλουταθειόνη εμφανίζουν πολλές λειτουργίες και αλληλεπιδράσεις κατά τα πρώιμα στάδια της απόκρισης των φυτών σε καταπονήσεις. Το H₂O₂ είναι ισχυρό οξειδωτικό και μπορεί να ξεκινήσει τοπική οξειδωτική βλάβη στα σημεία που συσσωρεύεται. Μπορεί επίσης να διαχυθεί σε σχετικά μεγάλη απόσταση, προκαλώντας αλλαγές στην αναγωγική κατάσταση των γειτονικών κυττάρων, όπου η σχετικά χαμηλή συγκέντρωσή του μπορεί να προκαλέσει έναρξη της αντιοξειδωτικής απόκρισης. Η συσσώρευση δηλαδή του H₂O₂ μπορεί να θεωρηθεί ως σήμα της οξειδωτικής καταπόνησης στο σημείο γένεσής του. Αυτή η οξειδωτική λειτουργία είναι στενά συνδεδεμένη με την οξειδοαναγωγική ισορροπία των φυτικών κυττάρων και την σχέση θειολών/δισουλφιδίων. Μεταβολή της αναλογίας GSH/GSSG κατά την παραγωγή οξειδωτικών, μπορεί να οδηγήσει σε περισσότερο ειδικές αλλαγές από εκείνες που προκαλεί το ίδιο το H₂O₂. Ένας διττός μηχανισμός σηματοδότησης μπορεί να αποδοθεί στην GSH: σαν ενδοκυτταρικό σήμα έναρξης του διπλασιασμού του DNA και ως φορέας σήματος εξωκυτταρικά,

καθώς εμπλέκεται στην αποβολή μεταβολιτών (Foyer *et al.*, 1997)

Η GSH ανάγει άμεσα τις περισσότερες EMO, αλλά αντιδρά μάλλον αργά με το H₂O₂, έτσι η εξαρτώμενη από GSH, αναγωγή του H₂O₂ δεν είναι η κύρια οδός απόσβεσης του H₂O₂ στα φυτά, όπου το σημαντικότερο υπόστρωμα για αυτήν την αναγωγική διαδικασία είναι το ασκορβικό. Η γλουταθειόνη δρα στην επαναγωγή του ασκορβικού στον κύκλο ασκορβικού/γλουταθειόνης (Noctor and Foyer, 1998a). Η σημασία της αναγέννησης του ασκορβικού και της γλουταθειόνης για την ανθεκτικότητα στην οξειδωτική καταπόνηση έχειδειχθεί (Alscher, 1989, Alscher *et al.*, 1997, Noctor and Foyer, 1998a, Noctor *et al.*, 1998b). Στο Κεφάλαιο που ακολουθεί, περιγράφεται μεταξύ άλλων, η ενεργότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στην αναγέννηση του ασκορβικού και της γλουταθειόνης κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.3

ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ

2.3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ενεργότητα της SOD ήταν σημαντικά υψηλότερη στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού τις πρώτες ΗΚ, ενώ στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες αυξήθηκε μετά την 4η ημέρα καλλιέργειας. Υπεύθυνο ισοένζυμο για τις παραπάνω αυξήσεις ήταν το κυτοπλασμικό (Cu/ZnSOD), όπως ανιχνεύτηκε με την χρώση ενεργότητας πηκτωμάτων φυσικής ηλεκτροφόρησης, με ανοσοεντοπισμό με αντίσωμα κατά της κυτοπλασμικής Cu/ZnSOD και ανάλυση Northern. Επιπλέον, οι πρωτοπλάστες καπνού που εκτέθηκαν σε συνεχή παραγωγή O_2^- (αλκαλικό DMSO), παρουσίασαν αυξημένη ενεργότητα SOD. Η ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων APO και GR παρουσίασε αύξηση στους πρωτοπλάστες καπνού κατά την καλλιέργεια, όμως στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες η αύξηση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τους μη αναγεννώμενους. Ανάλυση Northern με ιχνηλάτη που αντιστοιχούσε στην κυτοπλασμική APO, έδειξε σημαντική επαγωγή του μεταγράφου της στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού. Οι πρωτοπλάστες αμπέλου δεν εμφάνισαν αλλαγές στην έκφραση της SOD, της APO ή της GR κατά την καλλιέργεια. Επίσης, η ενεργότητα της MDHAR αυξήθηκε μόνο στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού κατά την καλλιέργεια, ενώ η ενεργότητα της DHAR μειώθηκε σε όλους τους πληθυσμούς των πρωτοπλαστών, ήταν όμως αρκετές φορές υψηλότερη στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού σε σχέση με τους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου. Η ενεργότητα της GS-PER αυξήθηκε επίσης στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, ενώ στους μη αναγεννώμενους ήταν χαμηλότερη κατά μία τάξη μεγέθους και στους πρωτοπλάστες αμπέλου δεν ανιχνεύτηκε.

2.3.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων και των φυτών, έχουν αναπτύξει ένα ευρύ φάσμα στρατηγικών ενάντια στις οξειδωτικές καταστροφές, οι οποίες βασίζονται σε άμεση απόσβεση των ελεύθερων ριζών από φυσικά μόρια, όπως

το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη που περιγράφηκαν στο προηγούμενο Κεφάλαιο (2.2) (Larson, 1988, Noctor and Foyer, 1998a) ή/και σε ενζυμικές αντιδράσεις (Scandalios, 1993, Foyer *et al.*, 1994). Η υπεροξειδική δισμουτάση (EC 1.15.1.1, SOD) είναι ο πρώτος κρίκος στην αλυσίδα των ενζυμικών συστημάτων των κυττάρων στην διαδικασία αποτοξίνωσης (Scandalios, 1993) και μετατρέπει το O_2^- σε H_2O_2 . Το H_2O_2 στην συνέχεια ανάγεται σε H_2O από καταλάσες στα περοξεισώματα και από την ασκορβική περοξειδάση (APO) στους χλωροπλάστες και το κυτόπλασμα (Foyer and Halliwell, 1976, Asada, 1992a, Alscher *et al.*, 1997). Το ασκορβικό οξύ, που οξειδώνεται από την APO, ανάγεται από την αναγωγή του μονοδιυδροασκορβικού (EC 1.6.5.4, MHAR) και την αναγωγή του διυδροασκορβικού (EC 1.8.5.1, DHAR), σε αντιδράσεις που χρησιμοποιούν NADPH και γλουταθειόνη. Η αναγωγή της γλουταθειόνης (EC 1.6.4.2, GR) ολοκληρώνει τον κύκλο διατηρώντας έτσι υψηλή αναλογία ανάμεσα στην αναγμένη (GSH) και την οξειδωμένη μορφή (GSSG) της γλουταθειόνης (Alscher, 1989, Asada, 1994, Alscher *et al.*, 1997). Ακόμα, η αναγμένη γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί υπόστρωμα για την περοξειδάση της γλουταθειόνης (EC 1.11.1.9, GS-POX), η οποία εμπλέκεται στην απόσβεση του H_2O_2 , με προτίμηση στα οργανικά υδροπεροξειδία, τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα (Eshdat *et al.*, 1997).

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στα Κεφάλαια 1 και το 2.1, υποστηρίζουν την παραγωγή EMO κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών, η οποία οφείλεται στην χρησιμοποίηση της κυτταρινάσης Onozuka για την αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος και μάλιστα με ένα τρόπο αναλογικό, όπου η συσσώρευση EMO εξαρτάται από την ποσότητα του ενζύμου. Είναι γνωστό ότι πολλές καταστάσεις καταπονήσεων επάγουν την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων προκειμένου να αποκατασταθεί η κυτταρική ισορροπία, που διαταράσσεται από την αυξημένη παραγωγή EMO (Scandalios, 1990, Bowler *et al.*, 1992, Foyer *et al.*, 1997, Noctor and Foyer, 1998a), οπότε θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η ενεργότητα των SOD, APO, MDHAR, DHAR, GR και GS-POX κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών.

2.3.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.3.1. Ανάπτυξη φυτών και απομόνωση πρωτοπλαστών

Η ανάπτυξη των φυτών και η απομόνωση των πρωτοπλαστών έγινε όπως αναφέρθηκε στο Υποκεφάλαιο 2.2.3.1 ενώ κάθε άλλη μεταχείριση αναγράφεται στο κείμενο.

2.3.3.2. Επαγωγή καλλογένεσης σε μεσόφυλλο

Η επαγωγή της καλλογένεσης σε φύλλα καπνού και αμπέλου έγινε όπως αναφέρθηκε στο Υποκεφάλαιο 2.2.3.2.

2.3.3.3. Εκχύλιση πρωτεϊνών

Ο ιστός φύλλου ή κάλλου λειοτριβήθηκε με γουδί σε υγρό άζωτο, πριν την εκχύλιση των πρωτεϊνών. Οι ολικές πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν με 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 10 μM leupeptin, 10% (v/v) γλυκερόλη, 0,2% (v/v) Triton X-100, παρουσία 10 ή 20% (w/g φρέσκου βάρους ιστού ή πρωτοπλαστών) PVPP για τον καπνό και την άμπελο, αντίστοιχα. Για την μέτρηση της ενεργότητας της APO, 1 mM ASA συμπεριλήφθηκε στο διάλυμα εκχύλισης. Η αναλογία δείγματος: διάλυμα εκχύλισης ήταν 1:4. Τα δείγματα φύλλου και κάλλου ομογενοποιήθηκαν με Ultra Turrax σε 20.000 rpm, στους 4° C. Το ομογενοποίημα, αφού κρατήθηκε για 20 min σε πάγο (4° C) με περιοδική ανάδευση, φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 rpm για 20 min στους 4° C (Sorvall, DuPont, S34). Το υπερκείμενο μοιράσθηκε και κρατήθηκε στους -80° C. Οι πρωτεΐνες ποσοτικοποιήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο των Lowry *et al.* (1951).

Τα πρωτεϊνικά δείγματα, που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της SOD κατακρημνίστηκαν με 9 όγκους κρύας ακετόνης (-20°C) και επαναδιαλύθηκαν στο διάλυμα εκχύλισης των πρωτεϊνών, για να απαλλαγούν από τις χρωστικές.

2.3.3.4. Προσδιορισμός ενζυμικών ενεργοτήτων

Η συνολική ενεργότητα της SOD προσδιορίστηκε με την χρησιμοποίηση της φωτοχημικής μεθόδου των Misra and Fridovich (1977). Στο διάλυμα αντίδρασης (10 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7,5, 0,222 mM o-dianisidine, 0,014 mM riboflavin) προστέθηκαν 20 μg ολικής πρωτεΐνης, σε συνολικό όγκο 1 mL.

Η οξείδωση του o-dianisidine μετρήθηκε στα 460 nm στους 25°C, ανά 5 min και για συνολικό χρόνο 30 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). Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των ενζύμων APO, GR MHAR, DHAR και GS-POX χρησιμοποιήθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και οι συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2. Συνθήκες προσδιορισμού της ενεργότητας των ενζύμων APO, GR MDHAR, DHAR και GS-POX.

Ένζυμο	Διάλυμα Αντίδρασης	°C	m	$\epsilon(\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$	Αναφορά
APO	50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7,0 0,5 mM ασκορβικό 0,2 mM H ₂ O ₂	5	90	2,8	Nakano and Asada, 1981
MHAR	50 mM Tris-HCl, pH 7,6 1 mM ασκορβικό 1 Μον. Ενεργ. Ασκορβικής οξειδάσης 0,2 mM NADH	5	40	6,22	Serrano <i>et al.</i> , 1994
DHAR	50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 6,5 0,1 mM EDTA 5 mM GSH 0,5 mM dehydroascorbate	5	65	14	Asada, 1984
GR	100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM GSSG	5	40	6,22	Foyer and Haliwell, 1976

	0,05 mM NADPH				
GS-POX	50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7,0 1 mM H ₂ O ₂ 15 mM NADPH 0,3 Μον. Ενεργ. GR	5	40	6,22	Klapheck <i>et al.</i> , 1990

2.3.3.5. Φυσική ηλεκτροφόρηση και χρώση ενεργότητας σε πηκτή ακρυλαμίδης:

α. της SOD

Για την ανάλυση των ισοενζύμων της SOD, της APO και της GR, τα πρωτεϊνικά δείγματα διαχωρίστηκαν με φυσική ηλεκτροφόρηση (native-PAGE) στους 4°C με το σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων του Davis (Davis, 1964). Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 1,5 mm πάχους επίπεδα πηκτώματα και η συσκευή mini Protean II της BioRad. Η πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) περιείχε 7,5% πολυακρυλαμίδη (αναλογία ακρυλαμίδη:bis-ακρυλαμίδη, 30:0,2) για την SOD και τη GR και 10% πολυακρυλαμίδη για την APO, ενώ η πηκτή συσσώρευσης (stacking gel) αποτελούνταν από 4% πολυακρυλαμίδη σε όλες τις περιπτώσεις. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν 15 mA για την πηκτή συσσώρευσης και 20 mA για την πηκτή διαχωρισμού

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι ζώνες με ενεργότητα SOD, εντοπίστηκαν με την μέθοδο των Beauchamp and Fridovitch (1971). Συγκεκριμένα, η πηκτή επώαστηκε με 2 mg mL⁻¹ 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT) σε διάλυμα 50 mM φωσφορικού καλίου, pH 7,4, για 30 min στο σκοτάδι. Στη συνέχεια οι πηκτές μεταφέρθηκαν στο διάλυμα χρώσης, το οποίο περιείχε 0,1 mg mL⁻¹ ριβοβλαβίνη και 0,25% (v/v) TEMED σε 50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7,4, για 20 min στο σκοτάδι. Τέλος, παρουσία φωτός, εμφανίστηκαν οι ζώνες των ισοενζύμων.

β. της APO και της GR

Για την ανίχνευση των ισοενζύμων της APO, στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης συμπεριλήφθηκε 10 mM ασκορβικού οξέος και τα

πηκτώματα προηλεκτροφορήθηκαν για 30 min στα 20 mA (Rao *et al.*, 1995). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης τα πηκτώματα επώαστηκαν σε 50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7,0 και 2 mM ασκορβικού για 30 min στο σκοτάδι. Ακολούθησε επώαση σε 50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7,0, 4 mM ασκορβικού και 2 mM H₂O₂ για 30 min, μετά το τέλος των οποίων τα πηκτώματα πλύθηκαν με απιονισμένο νερό και η εμφάνιση των ζωνών της APO έγινε στο φως σε διάλυμα χρώσης (50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7,8, 14 mM TEMED και 1,2 mM NBT).

Οι ζώνες ενεργότητας της GR εντοπίστηκαν 5-10 min μετά την επώαση των πηκτωμάτων στο διάλυμα αντίδρασης, το οποίο περιείχε 250 mM Tris-HCl, pH 8,4, 4 mM GSSG, 1,5 mM NADPH και 2 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (Foyer *et al.*, 1991).

2.3.3.6. Ανοσοεντοπισμός της κυτοπλασμικής SOD

Τα εκχυλίσματα ολικών πρωτεϊνών διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE, σύμφωνα με το σύστημα Laemmli (Laemmli, 1970), χρησιμοποιώντας πηκτώματα 1,5 mm πάχους και το μοντέλο Protean II της Bio-Rad. Η συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης στην πηκτική διαχωρισμού ήταν 10%. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών έγινε κατά επώαση των δειγμάτων στους 100°C για 5 min, μετά την προσθήκη συμπυκνωμένου SDS-αποδιατακτικού σε τελική συγκέντρωση 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v) γλυκερόλη, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη (Mattoo *et al.*, 1981). Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν 15 mA για την πηκτική συσσώρευσης και 20 mA για την πηκτική διαχωρισμού.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν ηλεκτροφορητικά (western blot) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,2 μm, Schleicher και Schuell), όπως έχει ήδη περιγραφεί (Towbin *et al.*, 1979). Το διάλυμα μεταφοράς περιείχε 25 mM Tris-192 mM γλυκίνης, pH 8,3. Η μεταφορά έγινε σε συσκευή Mini-Protean II (BioRad), στα 80V για 1,5 h. Μετά το τέλος της μεταφοράς των πρωτεϊνών, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πλύθηκε σε PBS [0,8% (w/v) NaCl, 0,02% (w/v) KCl, 0,115% (w/v) Na₂HPO₄, 0,02% (w/v) KH₂PO₄] για 10 min και τοποθετήθηκε σε PBS με 2% (w/v) BSA

για 2 h, υπό ελαφρά ανάδευση, για κορεσμό των ελεύθερων θέσεων και μείωση της μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων. Στη συνέχεια, η μεμβράνη πλύθηκε 3 φορές για 5 min, με διάλυμα πλυσίματος [PBS συμπληρωμένο με 0,05% (v/v) Tween-20] και ακολούθως, επώασθη με το anti-SOD στο διάλυμα επώασης [PBS με 1% (w/v) BSA και 0,05% (v/v) Tween-20] υπό ελαφρά ανάδευση για 4 h. Το αντίσωμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν εναντίον της κυτοπλασμικής SOD (2,4 SOD) από καλαμπόκι, το οποίο ευγενώς προσφέρθηκε από τον καθηγητή J.G. Scandalios (Baum and Scandalios, 1981). Τα anti-SOD χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:1000 της αρχικής συγκέντρωσης του αντιορού. Μετά το τέλος της επώασης με το αντίσωμα, η μεμβράνη πλύθηκε 5 φορές για 5 min με διάλυμα πλυσίματος και επώαστηκε 1 h με το δεύτερο αντίσωμα (alkaline phosphatase προσδεμένη σε anti-rabbit IgG), με αραιώση 1:2000. Ακολούθησαν 3 πλυσίματα των 5 min με το διάλυμα πλυσίματος και 2 πλυσίματα των 5 min με 0,1 M DEA (Diethanolamine), pH 9,6. Η ανάπτυξη της χρώσης της αλκαλικής φωσφοτάσης έγινε στο διάλυμα αντίδρασης [0,01% (w/v) NBT, 0,005% (w/v) BCIP (5-dromo-4-chloro-3-indolyolphosphate), 0,1 M DEA, pH 9,6].

2.3.3.7. Απομόνωση ολικού RNA και ανάλυση Northern

Το ολικό RNA από τους πρωτοπλάστες εκχυλιστηκε 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 Na₃EDTA 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 πρωτοπλαστών σε αναλογία 1:4 (βάρους πρωτοπλαστών: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 των

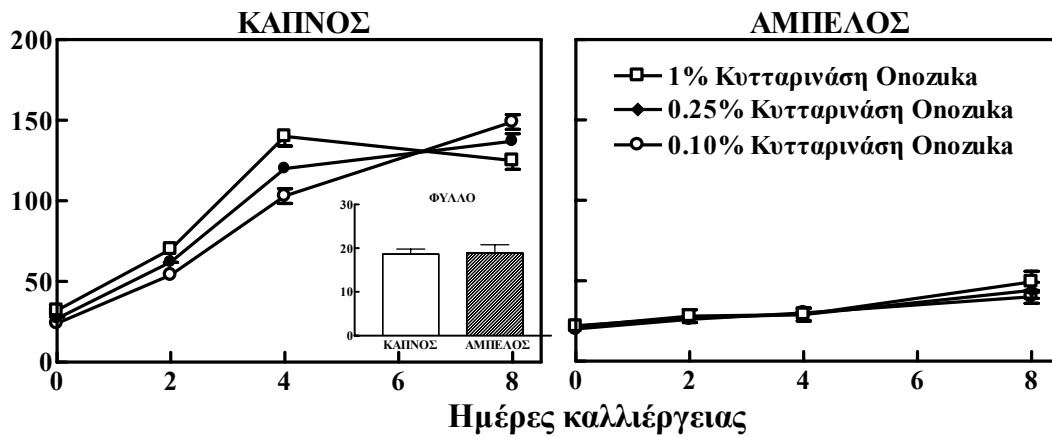
ριβοσωμικών RNA σε μη-αποδιατακτική πηκτική αγαρόζη, μετά από χρώση με βρωμιούχο εθίδιο. Το ολικό RNA (15 μg) αναλύθηκε σε πηκτική 1,2% αγαρόζη που περιείχε 6% (v/v) φορμαλδεύδη (Sambrook *et al.*, 1989) και μεταφέρθηκε σε μεμβράνη GeneScreen. Ο προϋβριδισμός, ο υβριδισμός και τα πλυσίματα της μεμβράνης έγιναν με καθιερωμένες μεθόδους (Sambrook *et al.*, 1989). Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε στους 60°C με ραδιοσημασμένο ιχνηλάτη που αντιστοιχούσε στην κυτοπλασμική SOD (Tsang *et al.*, 1991) ή την κυτοπλασμική APO (Chatfield and Dalton, 1993).

2.3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

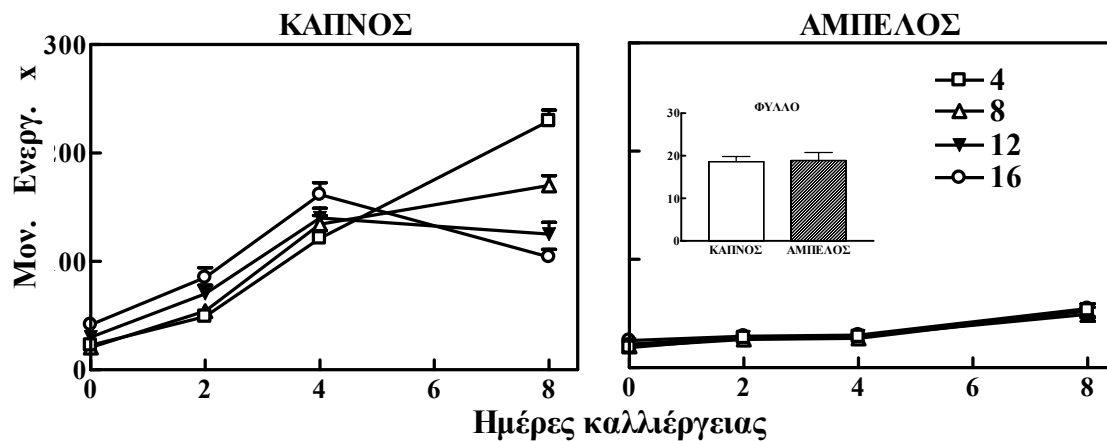
2.3.4.1. Ενεργότητα της SOD κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου

Η χρησιμοποίηση 1% κυτταρινάσης Onozuka για 12h παρήγαγε πρωτοπλάστες καπνού, οι οποίοι, αμέσως μετά την απομόνωση, είχαν 1,7-φορές μεγαλύτερη ενεργότητα ολικής SOD σε σχέση με τον ιστό φύλλου (Εικ. 2.17). Με το 0,25% της ποσότητας της κυτταρινάσης, η ενεργότητα αυξήθηκε κατά 1,4-φορές, με το 0,1% της ποσότητας η ενεργότητα αυξήθηκε κατά 1,2-φορές, σε σχέση με τον ιστό φύλλου (Εικ. 2.17). Κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών, η ενεργότητα της SOD αυξήθηκε σταδιακά σε όλους τους πληθυσμούς των πρωτοπλαστών καπνού, όμως οι πρωτοπλάστες που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Onozuka παρουσίασαν εντονότερη αύξηση τις πρώτες 4 ΗΚ και στην συνέχεια η ενεργότητα μειώθηκε σημαντικά (Εικ. 2.17).

Η αύξηση της διάρκειας της επώασης με την κυτταρινάση Onozuka οδήγησε σε πρωτοπλάστες καπνού με μειωμένη βιωσιμότητα και διαιρετική ικανότητα (Εικ 2.2). Στην Εικόνα 2.18 εμφανίζεται η ολική ενεργότητα της SOD κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού απομονωμένων μετά από 4, 8, 12 και 16 h επώασης με κυτταρινάση Onozuka. Η αύξηση του χρόνου επώασης των φύλλων για την παραγωγή των πρωτοπλαστών προκάλεσε αύξηση στην ολική



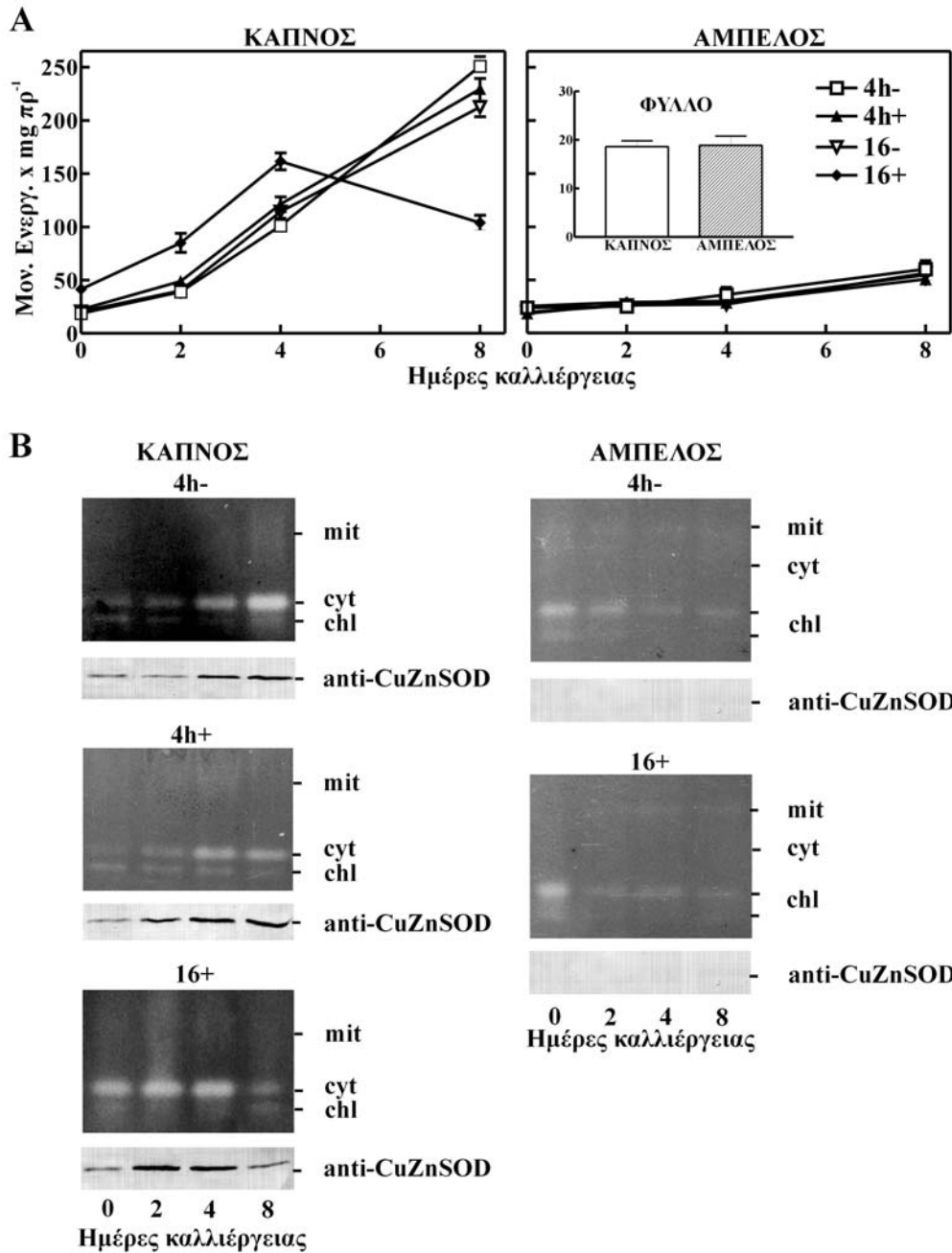
Εικόνα 2.17. Ειδική ενεργότητα της SOD κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου, οι οποίοι απομονώθηκαν μετά από 12 h επώαση με 1, 0,25 ή 0,1% κυτταρινάση Ονοζυκα ή με 0,25% κυτταρινάση Worthington. Οι τιμές εκφράζονται ως μονάδες ενεργότητας x mg πρωτεΐνης⁻¹ ± SE.



Εικόνα 2.18. Ειδική ενεργότητα της SOD κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου που απομονώθηκαν μετά από 4, 8, 12 και 16 h επώαση με κυτταρινάση Ονοζυκα. Οι τιμές εκφράζονται ως μονάδες ενεργότητας x mg πρωτεΐνης⁻¹ ± SE.

ενεργότητα της SOD, την στιγμή της απομόνωσης των πρωτοπλαστών: οι πρωτοπλάστες καπνού που προέκυψαν μετά από 16 h επώασης παρουσίασαν διπλασιασμό στην ενεργότητα της SOD σε σχέση με το φύλλο, ενώ 4 ή 8 h επώασης δεν προκάλεσαν σημαντική αλλαγή στην ενεργότητα (Εικ. 2.18).

Οι πρωτοπλάστες καπνού, που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Worthington μετά από 4 h επώαση, την στιγμή της απομόνωσής τους παρουσίασαν την ίδια ενεργότητα SOD με τον ιστό φύλλου, όμως σημαντική αύξηση παρουσιάστηκε στην ενεργότητα την 4η και την 8η ΗΚ (Εικ. 2.19Α). Οι πρωτοπλάστες καπνού που προήλθαν μετά από 4 h επώαση με κυτταρινάση Onozuka ή 16 h επώαση με κυτταρινάση Worthington, παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο (Εικ. 2.19Α). Ο πληθυσμός πρωτοπλαστών καπνού, που διαφοροποιήθηκε όσον αφορά στην ενεργότητα της SOD ήταν οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού (16 h επώαση με κυτταρινάση Onozuka), όπου την στιγμή της απομόνωσής η ενεργότητα της SOD διπλασιάστηκε σε σχέση με το φύλλο, συνέχισε να αυξάνει μέχρι την 4η ΗΚ (όπου διπλασιάστηκε ξανά) και στην συνέχεια μειώθηκε την 8η ΗΚ (Εικ. 2.19Α). Οι πρωτοπλάστες αμπέλου, ανεξάρτητα από την μεταχείριση ή την διάρκεια της επώασης, παρουσίασαν μικρή αύξηση της SOD κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.17, 2.18, 2.19Α).



Εικόνα 2.19. Ειδική ενεργότητα της SOD (A) και ισοενζυμική ανάλυση και ανοσοεντοπισθείσα πρωτεΐνη της κυτοπλασμικής CuZnSOD (B) κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν μετά από 4 ή 16 h επώαση κυτταρινάση Worthington (4-, 16-) ή με κυτταρινάση Onozuka (4+, 16+). A. Η ειδική ενεργότητα της SOD εκφράστηκε ως μονάδες ενεργότητας x mg πρωτεΐνης⁻¹ ± SE. B. Ισοενζυμική ανάλυση της SOD με χρώση ενεργότητας μετά από φυσική ηλεκτροφόρηση (7,5% ακρυλαμίδα) ολικών πρωτεϊνών (150 μg πρωτεΐνης/δείγμα) και ανοσοεντοπισθείσα πρωτεΐνη της κυτοπλασμικής CuZnSOD (anti-CuZnSOD), μετά από SDS-PAGE και western blot ολικών

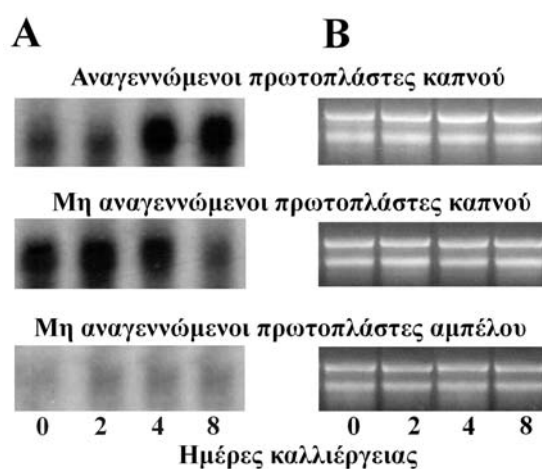
πρωτεϊνών (100 μg πρωτεΐνης/δείγμα). Τα βέλη στα πηκτώματα ενεργότητας δείχνουν τις ζώνες των SOD: cyt: κυτοπλασμική, mit: μιτοχονδριακή, chl: χλωροπλαστική.

Η συμμετοχή των ισοενζύμων της SOD ως προς την ολική ενεργότητα του ενζύμου, μελετήθηκε στον καπνό και την άμπελο. Οι βιοδοκιμές της SOD εκτελέστηκαν απευθείας πάνω σε πηκτώματα φυσικής ηλεκτροφόρησης και αποκάλυψαν τρεις και τέσσερις ζώνες-ισοένζυμα στα πρωτεϊνικά δείγματα που προήλθαν από ιστούς καπνού και αμπέλου, αντίστοιχα. Σε προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου μας (Συμινής, 1996, Διδακτορική διατριβή), οι ζώνες αυτές χαρακτηρίστηκαν και αντιστοιχήθηκαν ως εξής: η ανώτερη ζώνη και στα δύο φυτικά είδη, ήταν μια MnSOD, εντοπισμένη στα μιτοχόνδρια και η αμέσως χαμηλότερη ήταν η κυτοπλασμική Cu/ZnSOD και στα δύο φυτά. Η ζώνη με την μεγαλύτερη κινητικότητα στον καπνό αντιστοιχήθηκε με την χλωροπλαστική FeSOD, ενώ στην άμπελο, οι δύο χαμηλότερες ζώνες ήταν χλωροπλαστικά Cu/ZnSOD ισοένζυμα.

Τα φύλλα και στα δύο είδη, περιείχαν ίδια περίπου ενεργότητα κυτοπλασμικής, χλωροπλαστικής και μιτοχονδριακής SOD. Στους πρωτοπλάστες καπνού, το κυτοπλασμικό ισοένζυμο της SOD αυξήθηκε κατά την καλλιέργεια, ενώ παρέμεινε αμετάβλητο στους πρωτοπλάστες αμπέλου (Εικ. 2.19B). Απότομη και ραγδαία αύξηση της κυτοπλασμικής SOD παρατηρήθηκε στους πρωτοπλάστες καπνού, που απομονώθηκαν μετά από 16 h επώαση με κυτταρινάση Onozuka, την στιγμή της απομόνωσης και τις πρώτες HK, ενώ στους πρωτοπλάστες που απομονώθηκαν μετά από μικρής διάρκειας επώαση με κυτταρινάση Onozuka ή Worthington, η αύξηση της κυτοπλασμικής SOD ήταν σημαντικά χαμηλότερη (Εικ. 2.19B). Αργότερα κατά την καλλιέργεια, η κυτοπλασμική SOD αυξήθηκε στους τελευταίους και μειώθηκε σταδιακά στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού. Οι αλλαγές στην ενεργότητα της κυτοπλασμικής Cu/ZnSOD στους πρωτοπλάστες καπνού είναι αποτέλεσμα αλλαγών στην ποσότητα της πρωτεΐνης της, όπως

ανιχνεύθηκε μετά από ανοσοεντοπισμό με anti-Cu/ZnSOD από καλαμπόκι (Εικ. 2.19Γ), ενώ αντίστοιχες αλλαγές εντοπίστηκαν και στο mRNA της (Εικ. 2.20).

Στους πρωτοπλάστες αμπέλου δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην ενεργότητα της κυτοπλασμικής Cu/ZnSOD (Εικ. 2.19Α,Β), ούτε στην ανοσοαντιδρώσα πρωτεΐνη (Εικ. 2.19Γ) ή το μετάγραφο (Εικ. 2.20). Η ολική όμως ενεργότητα της

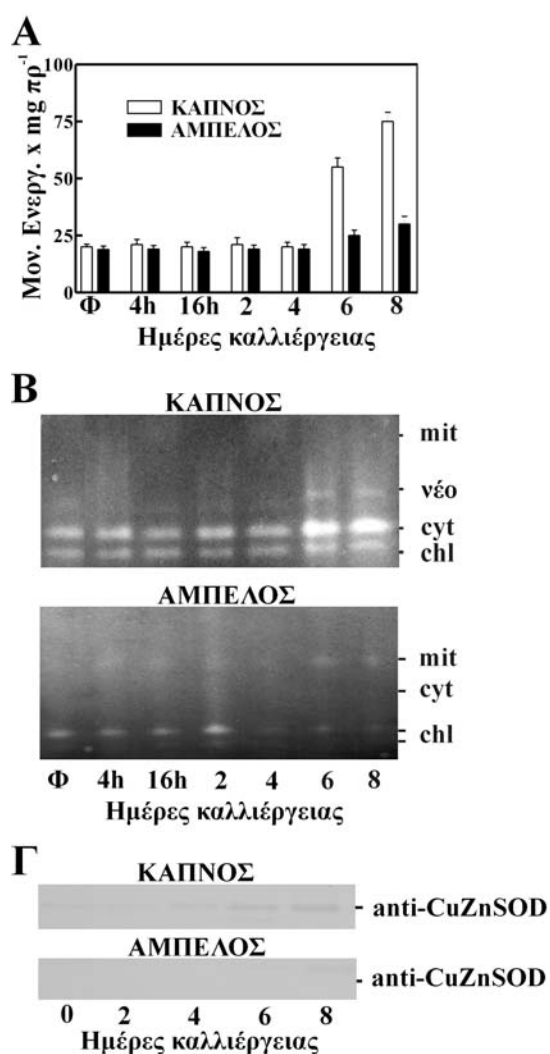


Εικόνα 2.20. Ανάλυση Northern (A) και RNA (B) κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Α. Ολικό RNA (15 μ g) απομονώθηκε από πρωτοπλάστες σε διάφορες χρονικές στιγμές της καλλιέργειας και υβριδοποιήθηκε με ραδιοσημασμένο ιχνηλάτη που αντιστοιχούσε στην κυτοπλασμική CuZnSOD. Β. Ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο εθίδιο, αντίστοιχων ποσοτήτων ολικού RNA, για να πιστοποιηθεί, με βάση τα rRNAs, η ισότητα των ποσοτήτων.

SOD παρουσίασε αύξηση κατά την 8η ΗΚ, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση του μιτοχονδριακού ισοενζύμου (Εικ. 2.19Β). Η μιτοχονδριακή SOD αυξήθηκε κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών και στα δύο φυτικά είδη, γεγονός που ήταν ανεξάρτητο από τις μεταχειρίσεις της επώασης (Εικ. 2.19Β). Αντίθετα, τα χλωροπλαστικά ισοένζυμα της SOD μειώθηκαν κατά την καλλιέργεια και στα δύο φυτικά είδη, ως αποτέλεσμα του εκφυλισμού των πρωτοπλαστών (Εικ. 2.19Β).

Ο τραυματισμός των φύλλων καπνού και αμπέλου, που αναπόφευκτα

πραγματοποιείται κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών, δεν επηρέασε την ενεργότητα της SOD στα δύο φυτά, τουλάχιστον για τα χρονικά διαστήματα των 4 και 16 ωρών που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση (Εικ. 2.21A). Αργότερα, την 6η και 8η ΗΚ, εμφανίστηκε αύξηση στην ολική ενεργότητα της SOD στον καπνό (Bowler *et al.*, 1991) (Εικ. 2.21A), η οποία, όπως έδειξε η ισοενζυμική ανάλυση, οφειλόταν στην επαγωγή του κυτοπλασμικού και του μιτοχονδριακού ισοενζύμου και συνοδεύτηκε από την εμφάνιση ενός νέου ισοενζύμου, μικρότερης κινητικότητας από την κυτοπλασμική Cu/ZnSOD, το οποίο μάλλον επάγεται ως αποτέλεσμα γηρασμού (Εικ. 2.21B). Η αύξηση στην

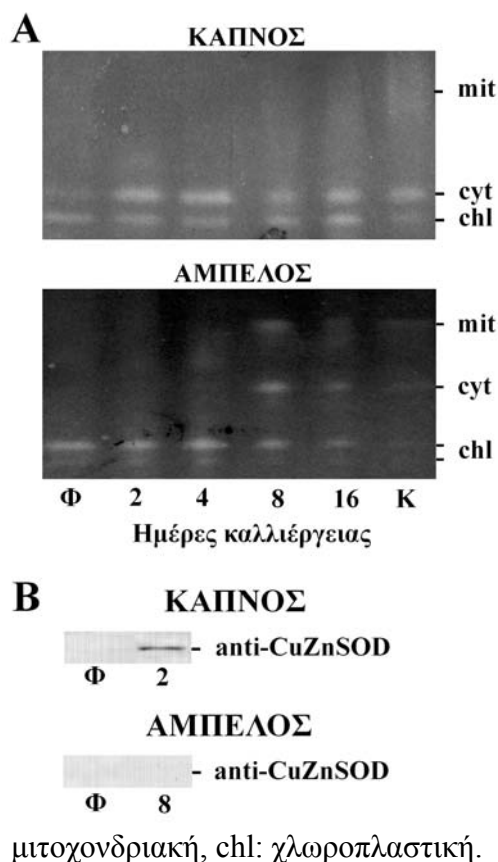


Εικόνα 2.21. Ειδική ενεργότητα της SOD (A), ισοενζυμική ανάλυση (B) και ανοσοεντοπισθείσα πρωτεΐνη της κυτοπλασμικής CuZnSOD (B) κατά τον τραυματισμό φύλλων καπνού και αμπέλου. Τα φύλλα, αφού τραυματίστηκαν έντονα τοποθετήθηκαν σε απιονισμένο νερό για 8 ημέρες. A. Η ειδική ενεργότητα της SOD εκφράστηκε ως μονάδες ενεργότητας/ mg πρωτεΐνης \pm SE. B. Ισοενζυμική ανάλυση της SOD με χρώση ενεργότητας μετά από φυσική ηλεκτροφόρηση ολικών πρωτεϊνών, σε συνθήκες που αναφέρθηκαν στην Εικ. 2.19. Γ. Ανοσοεντοπισθείσα πρωτεΐνη

της κυτοπλασμικής CuZnSOD (anti-CuZnSOD). Τα βέλη στα πηκτώματα ενεργότητας δείχνουν τις ζώνες των SOD: cyt: κυτοπλασμική, mit: μιτοχονδριακή, chl: χλωροπλαστική.

ενεργότητα της κυτοπλασματικής SOD στον καπνό αποδόθηκε στην αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης της (Εικ. 2.21Γ). Στην άμπελο δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην κυτοπλασματική Cu/ZnSOD και η μικρή αύξηση που χαρακτήρισε την ολική ενεργότητα αποδόθηκε στην ενεργότητα του μιτοχονδριακού ισοενζύμου (Εικ. 2.21B). Και στα δύο είδη η ενεργότητα των χλωροπλαστικών ισοένζυμων μειώθηκε κατά την καλλιέργεια αφού η μεταχείριση πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι (Εικ. 2.21B).

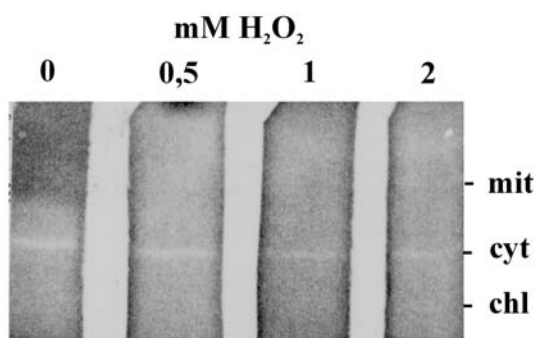
Η άμπελος δεν πάσχει από ενδογενή ανικανότητα επαγωγής της κυτοπλασματικής Cu/ZnSOD, όπως διαπιστώθηκε κατά την καλλογένεση εκφύτων από φύλλο αμπέλου (Εικ. 2.22A). Την 8η ΗΚ υπήρξε σαφής επαγωγή ισοενζύμου, γεγονός που παρατηρήθηκε πολύ νωρίτερα στον καπνό, μόλις την 2η ΗΚ (Εικ. 2.22A). Η αύξηση της κυτοπλασματικής SOD στην καλλογένεση από



Εικόνα 2.22. Ισοενζυμική ανάλυση της SOD (A) και ανοσοεντοπισθείσα πρωτεΐνη της κυτοπλασματικής CuZnSOD (B) κατά την καλλογένεση εκφύτων φύλλου καπνού και αμπέλου. A. Ισοενζυμική ανάλυση της SOD με χρώση ενεργότητας μετά από φυσική ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες που αναφέρθηκαν στην Εικ. 2.19. B. Ανοσοεντοπισθείσα πρωτεΐνη της κυτοπλασματικής CuZnSOD (anti-CuZnSOD). Τα βέλη στα πηκτώματα ενεργότητας δείχνουν τις ζώνες των SOD: cyt: κυτοπλασματική, mit:

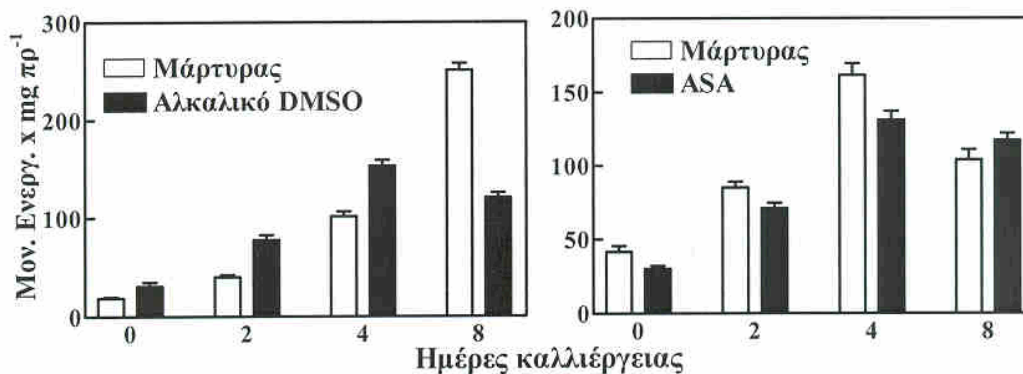
μεσόφυλλο καπνού οφείλεται στη συσσώρευση της πρωτεΐνης, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοεντοπισμό (Εικ. 2.22B). Η κυτοπλασμική Cu/Zn SOD στην άμπελο δεν ανιχνεύθηκε με ανοσοεντοπισμό ίσως λόγω μειωμένης αντίδρασης με το αντίσωμα από το καλαμπόκι (Εικ. 2.22B). Η συσσώρευση H₂O₂ στους πρωτοπλάστες αμπέλου μπορεί να προκαλεί αναστολή της ενεργότητας του ισοενζύμου της κυτοπλασμικής Cu/Zn SOD, αφού οι Cu/ZnSODs παρουσιάζουν ευαισθησία στο H₂O₂ (Scandalios, 1987). Η κυτοπλασμική Cu/Zn SOD της αμπέλου παρεμποδίστηκε από συγκέντρωση H₂O₂ μεγαλύτερη από 2 mM (Εικ. 2.23).

Η συσχέτιση της ενεργότητας της SOD με την παραγωγή O₂^{·-} φάνηκε κατά την προσθήκη αλκαλικού DMSO, το οποίο παράγει O₂^{·-} όπως έχει ήδη αναφερθεί (Κεφ. 2.1), στο μέσο επώασης για την απομόνωση πρωτοπλάστων καπνού με κυτταρινάση Worthington. Η ενεργότητα της SOD στους πρωτοπλάστες αυτούς ακολούθησε το ίδιο πρότυπο, με εκείνο που περιγράφηκε για τους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, δηλαδή αυξήθηκε έντονα τις πρώτες HK και μειώθηκε μετά (Εικ. 2.24). Αντίθετα, η προσθήκη ασκορβικού οξέος κατά την απομόνωση μη αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού (16h, κυτταρινάση Onozuka), οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας της SOD αμέσως μετά την απομόνωση και σε γενικά χαμηλότερη ενεργότητα κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.24). Τέλος, η χρησιμοποίηση παρακουάτ, το οποίο προκαλεί παραγωγή O₂^{·-} στους χλωροπλάστες, οδήγησε σε αύξηση του χλωροπλαστικού και του κυτοπλασμικού ισοενζύμου στα δύο φυτά (Εικ. 2.25).

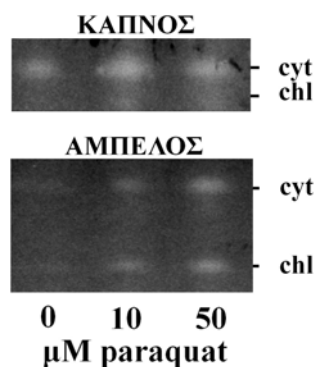


Εικόνα 2.23. Επίδραση του H₂O₂ στην ενεργότητα της κυτοπλασμικής CuZnSOD της αμπέλου. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα

από κάλλο αμπέλου αναλύθηκε σε φυσική ηλεκτρο-φόρηση και επώαστηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις H₂O₂ κατά την χρώση ενεργότητας. Τα βέλη στα πηκτώματα ενεργότητας δείχνουν τις ζώνες των SOD: cyt: κυτοπλασμική, mit: μιτοχονδριακή, chl: χλωροπλαστική.



Εικόνα 2.24. Ειδική ενεργότητα της SOD κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού οι οποίοι απομονώθηκαν μετά από 4 h με κυτταρινάση Worthington παρουσία 2,5% αλκαλικού DMSO ή μετά από 16 h με κυτταρινάση Onozuka παρουσία 0,5 mM ασκορβικού οξέος (ASA). Οι τιμές εκφράζονται ως μονάδες ενεργότητας/mg πρωτεΐνης ± SE.

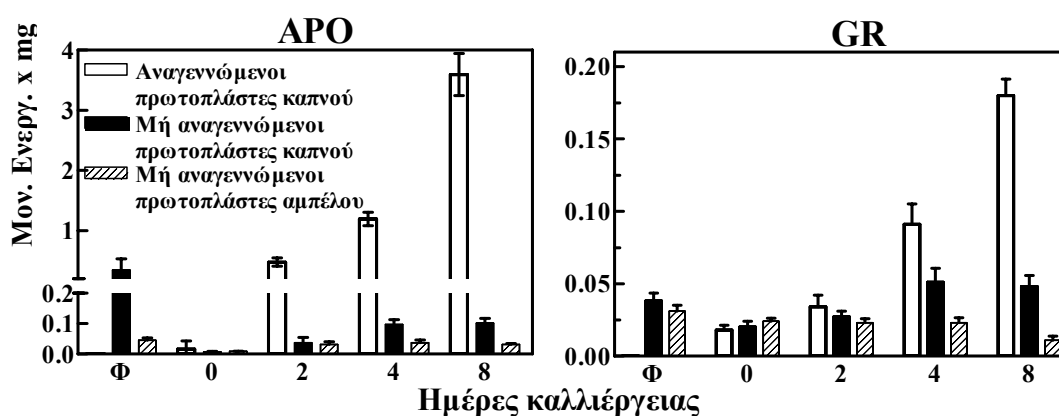


Εικόνα 2.25. Επίδραση του παρακουάτ στην ενεργότητα της κυτοπλασμικής και της χλωροπλαστικής CuZnSOD πρωτοπλαστών καπνού και της αμπέλου. Οι πρωτοπλάστες επώαστηκαν για 12 h με διάφορες συγκεντρώσεις παρακουάτ, στο φως, και τα πρωτεϊνικά τους εκχυλίσματα αναλύθηκαν σε φυσική ηλεκτροφόρηση και υποβλήθηκαν σε χρώση ενεργότητας. Τα βέλη στα πηκτώματα ενεργότητας δείχνουν τις ζώνες των SOD: cyt: κυτοπλασμική, chl: χλωροπλαστική.

2.3.4.2. Ενεργότητα των ενζύμων APO, MDHAR, DHAR, GR και GS-POX κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου

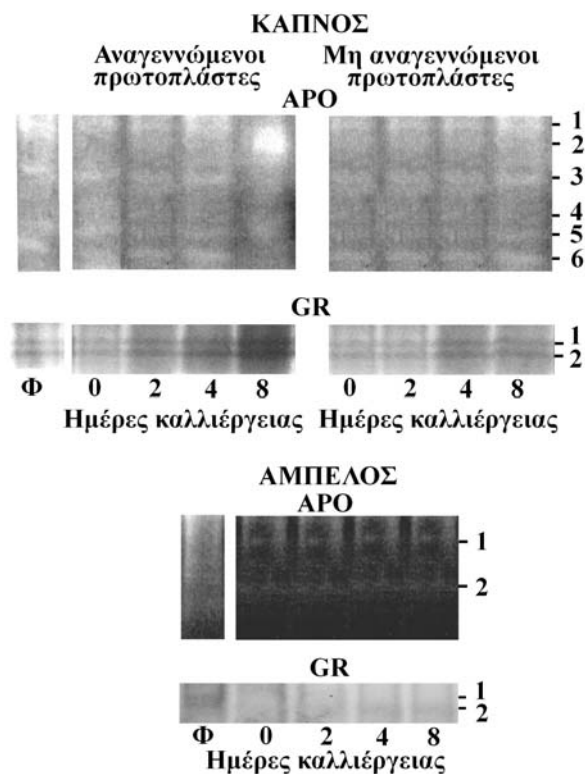
Η ειδική ενεργότητα της APO στο φύλλο καπνού ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη στο φύλλο αμπέλου, ενώ η ενεργότητα της GR ήταν

στο ίδιο περίπου επίπεδο (Εικ. 2.26). Στους πρωτοπλάστες, αμέσως μετά την απομόνωση, η ενεργότητα της APO και της GR εμφανίστηκε μειωμένη σε σχέση με το φύλλο, όμως κατά την καλλιέργεια αυξήθηκε στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, φτάνοντας την 8η ΗΚ να είναι 225- και 10- φορές υψηλότερη για την APO και την GR αντίστοιχα, από εκείνη την στιγμή της απομόνωσης (Εικ. 2.26). Οι αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού εμφάνισαν γενικά υψηλότερη ενεργότητα της APO και της GR κατά την καλλιέργεια, σε σχέση με τους μη αναγεννώμενους, στους οποίους υπήρξε κάποια, σημαντικά χαμηλότερη όμως, αύξηση (Εικ. 2.26). Η ισοενζυμική ανάλυση της APO στο φύλλο καπνού εμφάνισε 4 ζώνες ενεργότητας (1,3,5,6 στην Εικ. 2.27), στις οποίες προστέθηκαν άλλες δύο κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών (2,4 στην Εικ. 2.27). Η ζώνη 2 εμφάνισε έντονη ενεργότητα την 8η ΗΚ στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, ενώ ανάλυση Northern έδειξε επαγωγή του μεταγράφου της κυτοπλασμικής APO (Εικ. 2.28). Στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού εμφανίστηκαν επίσης τα δύο νέα ισοένζυμα, όμως η ενεργότητά τους δεν μεταβλήθηκε κατά την καλλιέργεια, ούτε υπήρξε αλλαγή



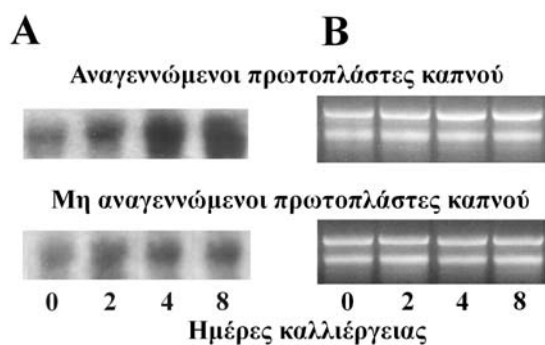
Εικόνα 2.26. Ειδική ενεργότητα της APO και της GR κατά την καλλιέργεια αναγεννώμενων και μη πρωτοπλαστών καπνού και πρωτοπλαστών αμπέλου. Οι τιμές

εκφράζονται ως μονάδες ενεργότητας x mg πρωτεΐνης⁻¹ ± SE.



Εικόνα 2.27. Ισοενζυμική ανάλυση της APO και της GR κατά την καλλιέργεια αναγεννώμενων και μη πρωτοπλαστών καπνού και πρωτοπλαστών αμπέλου. Τα βέλη στα πηκτώματα ενεργότητας δείχνουν τις ζώνες των APO και GR.

Εικόνα 2.28. Ανάλυση Northern (A) και RNA (B) κατά την καλλιέργεια



πρωτοπλαστών καπνού. A. Ολικό RNA (15 μg) απομονώθηκε από πρωτοπλάστες σε διάφορες χρονικές στιγμές της καλλιέργειας και υβριδοποιήθηκε με ραδιοσημασμένο ιχνηλάτη που αντιστοιχούσε στην κυτοπλασμική APO. B. Ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με

βρωμιούχο εθίδιο, αντίστοιχων ποσοτήτων ολικού RNA, για να πιστοποιηθεί, με βάση τα rRNAs, η ισότητα των ποσοτήτων.

στην συσσώρευση του μεταγράφου της κυτοπλασμικής APO (Εικ.

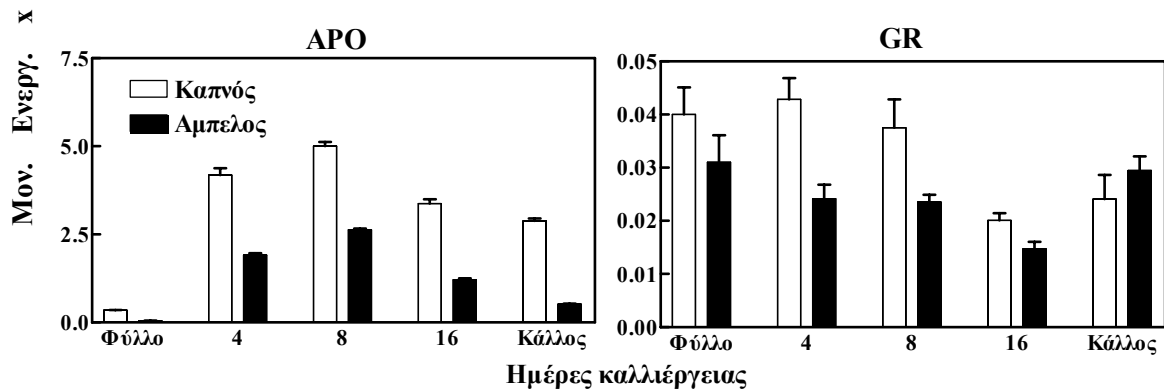
2.27,28). Η ισοενζυμική ανάλυση της GR πρωτοπλαστών καπνού εμφάνισε δύο ζώνες ενεργότητας σε πηκτώμα φυσικής ηλεκτροφόρησης, η ενεργότητα των οποίων μειώνεται σε σχέση με του φύλλου αμέσως μετά την απομόνωση, κατά την καλλιέργεια όμως αυξάνει σημαντικά στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού (Εικ. 2.27).

Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, αμέσως μετά την απομόνωση, η ενεργότητα της APO και της GR εμφανίστηκε μειωμένη σε σχέση με το φύλλο (Εικ. 2.26). Η ενεργότητα της APO παρουσίασε μικρή αύξηση την 2η ΗΚ και παρέμεινε στην συνέχεια στο ίδιο επίπεδο, ενώ η ενεργότητα της GR δεν άλλαξε καθόλου μέχρι την 4η ΗΚ αλλά μειώθηκε την 8η (Εικ. 2.26). Η ισοενζυμική ανάλυση της APO και της GR εμφάνισε δύο ζώνες ενεργότητας στο φύλλο αμπέλου, η ένταση των οποίων μειώθηκε κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών (Εικ. 2.27). Ανάλυση Northern δεν έδειξε επαγωγή του μεταγράφου της κυτοπλασμικής APO κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται). Κατά την επαγωγή της καλλογένεσης σε φύλλο καπνού και αμπέλου, η ενεργότητα της APO αυξήθηκε και στα δύο φυτικά είδη τις πρώτες 8 ΗΚ και στην συνέχεια μειώθηκε, όταν η ενεργότητα της GR μειώθηκε κατά την καλλιέργεια και αυξήθηκε στο επίπεδο του κάλλου (Εικ. 2.29).

Η ενεργότητα της MDHAR και της DHAR μειώθηκε κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών σε σχέση με το φύλλο και στα δύο φυτικά είδη (Εικ. 2.30). Κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών, η ενεργότητα της MDHAR αυξήθηκε μόνο στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, ενώ η ενεργότητα της DHAR μειώθηκε σε όλους τους πληθυσμούς των πρωτοπλαστών, ήταν όμως αρκετές φορές υψηλότερη στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού σε σχέση με τους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου (Εικ. 2.30).

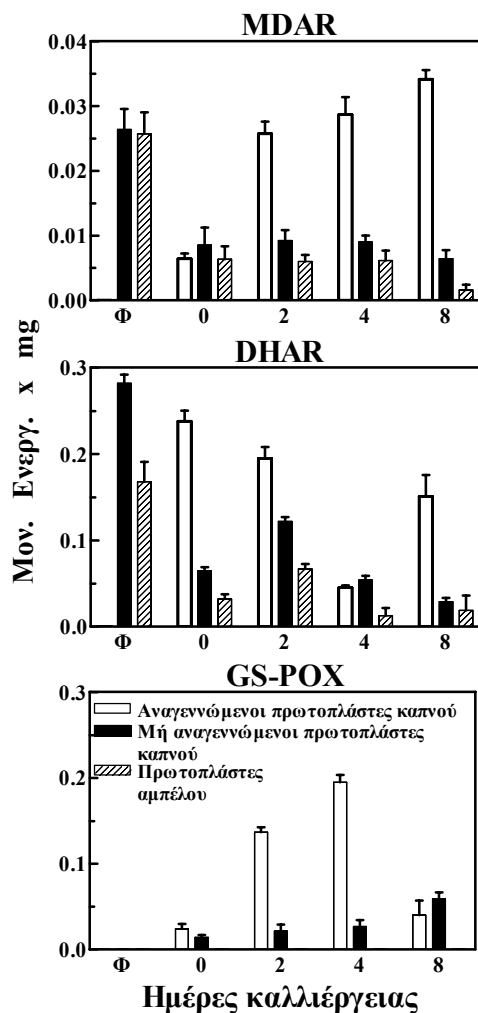
Στο φύλλο καπνού και αμπέλου, η ενεργότητα της GS-POX ήταν χαμηλότερη από το όριο ανίχνευσης (Εικ. 2.30). Κατά την καλλιέργεια η ενεργότητα της GS-PER αυξήθηκε τις πρώτες τέσσερις ΗΚ και μειώθηκε την 8η ΗΚ στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, ενώ στους μη

αναγεννώμενους πρωτοπλάστες η ενεργότητα ήταν σημαντικά χαμηλότερη, κατά



Εικόνα 2.29. Ειδική ενεργότητα της APO και της GR κατά την καλλογένεση εκφύτων φύλλου καπνού και αμπέλου. Οι τιμές εκφράζονται ως μονάδες ενεργότητας x mg πρωτεΐνης⁻¹ ± SE.

μία τάξη μεγέθους, και αυξήθηκε την 8η ΗΚ (Εικ. 2.30). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, η ενεργότητα της GS-POX δεν ανιχνεύτηκε καθόλου κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.30).



Εικόνα 2.30. Ειδική ενεργότητα της MDHAR, της DHAR και της GS-POX κατά την καλλιέργεια αναγεννώμενων και μη πρωτοπλαστών καπνού και πρωτοπλαστών αμπέλου. Οι τιμές εκφράζονται ως μονάδες ενεργότητας x mg πρωτεΐνης⁻¹ ± SE.

2.3.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αποτελεσματική απόσβεση των ΕΜΟ αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εξασφάλιση της φυσιολογικής δραστηριότητας του κυττάρου. Το O_2^- αποσβένεται με την δράση της SOD. Αμέσως μετά την απομόνωση και κατά τις πρώτες ΗΚ των πρωτοπλαστών καπνού, η ενεργότητα της SOD παρουσίασε μεγαλύτερη αύξηση όσο μεγάλωνε η ποσότητα της κυτταρινάσης Onozuka (Εικ. 2.17) και η διάρκεια της επώασης (Εικ. 2.18), δηλαδή όσο εντονότερη ήταν η παρουσία της κυτταρινάσης Onozuka, η οποία, όπως έχει ήδη περιγραφεί, παράγει O_2^- (Εικ. 1.8, 1.9, 2.8). Η χρησιμοποίηση κυτταρινάσης Worthington κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών δεν προκάλεσε αλλαγή της ειδικής ενεργότητας της SOD κατά τα πρώτα στάδια της καλλιέργειας, σε σχέση με το φύλλο (Εικ. 2.19Α), αλλά ούτε και συσσώρευση ΕΜΟ (Εικ. 1.8). Υπεύθυνο ισοένζυμο για τις παραπάνω αυξήσεις της ολικής ενεργότητας της SOD, ήταν η κυτοπλασμική Cu/ZnSOD, όπως φάνηκε κατά την χρώση ενεργότητας (Εικ. 2.19Β), από την ποσότητα της ανοσοαντιδρώσας πρωτεΐνης (Εικ. 2.19Β) και το επίπεδο συσσώρευσης του μεταγράφου της (Εικ. 2.20). Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι ο ρυθμός συσσώρευσης O_2^- κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών ρυθμίζει την έκφραση της SOD. Ο τραυματισμός των φύλλων, ο οποίος δεν προκάλεσε παραγωγή ΕΜΟ στο σύστημα των πρωτοπλαστών (Εικ. 1.8), δεν επηρέασε την ενεργότητα ή την ισοενζυμική κατανομή της SOD ή ακόμα την ποσότητα της ανοσοαντιδρώσας πρωτεΐνης της κυτοπλασμικής Cu/ZnSOD, τουλάχιστον κατά την διάρκεια της απομόνωσης των πρωτοπλαστών και στα δύο φυτικά

είδη (Εικ. 2.21). Αντίθετα, η χρησιμοποίηση μιας πηγής σταθερής παραγωγής O_2^- (αλκαλικό DMSO, Κεφ. 2.1) στο μέσο επώασης για την απομόνωση πρωτοπλάστων καπνού με κυτταρινάση Worthington, προκάλεσε 64% αύξηση στην ειδική ενεργότητα της SOD την στιγμή της απομόνωσης σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικ. 2.24). Επίσης, η προσθήκη ασκορβικού οξέος κατά την απομόνωση μη αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού (16h, κυτταρινάση Onozuka), οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας της SOD κατά 30% (Εικ. 2.24) και η χρησιμοποίηση παρακουάτ, το οποίο προκαλεί παραγωγή O_2^- στους χλωροπλάστες, οδήγησε σε αύξηση του χλωροπλαστικού και του κυτοπλασματικού ισοενζύμου στα δύο φυτά (Εικ. 2.25).

Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, η ενεργότητα της SOD δεν επηρεάστηκε από την ποιότητα ή τη διάρκεια επώασης με τα ένζυμα απόδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος και δεν έδειξε σημαντική μεταβολή, τουλάχιστον τις πρώτες HK (Εικ. 2.17, 18, 19A). Επίσης δεν διαπιστώθηκε αλλαγή στην συσσώρευση του μεταγράφου της κυτοπλασματικής Cu/ZnSOD (Εικ. 2.20). Έχει αναφερθεί ότι οι CuZnSODs αναστέλλονται από το H_2O_2 (Hodgson and Fridovich, 1975), όμως η κυτοπλασματική Cu/ZnSOD της αμπέλου παρεμποδίστηκε από συγκέντρωση H_2O_2 μεγαλύτερη από 2 mM (Εικ. 2.23), ενώ η μέγιστη συγκέντρωση που βρέθηκε κατά την απομόνωση ή την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών ήταν 0,011 μ M (Εικ. 1.8) και 0,021 μ M (Πίν. 2.1), αντίστοιχα. Η άμπελος δεν πάσχει από ενδογενή ανικανότητα επαγωγής της κυτοπλασματικής Cu/ZnSOD όπως διαπιστώθηκε κατά την καλλογένεση εκφύτων από φύλλο αμπέλου όπου υπήρξε σαφής επαγωγή του ισοενζύμου (Εικ. 2.22A). Οι Foyer *et al.* (1994) ανέφεραν ότι ενώ η ενεργότητα της SOD αυξάνει σε καταστάσεις ήπιας καταπόνησης, πάνω από ένα συγκεκριμένο επίπεδο καταπόνησης, η SOD απενεργοποιείται και υποβιβάζεται. Όταν ανασταλεί η πρωτεϊνσύνθεση με κυκλοεξαμίδιο, η έκθεση στο παρακουάτ προκαλεί σταδιακή μείωση της ενεργότητας της SOD και των επιπέδων της πρωτεΐνης της σε φύλλα σιταριού (Foyer *et al.*, 1994). Στην περίπτωση των πρωτοπλαστών αμπέλου δεν διαπιστώθηκε εντονότερη συσσώρευση EMO σε σχέση με τους πρωτοπλάστες καπνού (Πίν. 2.1, Εικ. 2.8), όμως υπήρξε

μειωμένη ικανότητα του αμυντικού συστήματος απόσβεσης του O_2^- και του H_2O_2 , αφού η ενεργότητα της SOD και των APO, GR, MDHAR, DHAR και GS-POX δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.19, 2.26, 2.30). Έτσι δεν μπορεί να αποκλειστεί η παραγωγή του OH^\cdot , το οποίο επίσης μπορεί να αναστείλει την ενεργότητα της SOD (Casano *et al.*, 1997).

Η CuZnSOD και η APO αύξησαν τα επίπεδα του mRNAs τους κατά την επίδραση όζοντος σε καπνό, μόνο μετά την εμφάνιση ορατής καταστροφής και για το λόγο αυτό θεωρούνται ένζυμα της ύστερης απόκρισης του φυτού στις καταπονήσεις (Willekens *et al.*, 1994b). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου υπήρξε μικρή αύξηση στην ολική ενεργότητα της SOD την 8η ΗΚ, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην αλλαγή μεταβολισμού των κυττάρων ή στην ύστερη απόκριση του φυτού. Υπάρχουν στοιχεία που προτείνουν ότι η ενεργότητα της SOD δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την επιβίωση των κυττάρων σε καταστάσεις καταπονήσεων. Για παράδειγμα η υπερέκφραση της Cu/ZnSOD στους χλωροπλάστες φυτών δεν τους πρόσφερε προστασία στο παρακουάτ (Terperman and Dunsmuir, 1990). Όμως, φαίνεται ότι κρίσιμη είναι η αναλογία O_2^- και H_2O_2 στο κύτταρο αφού, αποτελώντας το ένα το υπόστρωμα και το άλλο το προϊόν της SOD, είναι και τα δύο υποστρώματα της αντίδρασης Haber-Weiss κατά την οποία παράγεται το OH^\cdot (Bowler *et al.*, 1991).

Στο Κεφάλαιο 1 δέχθηκε ότι στους πρωτοπλάστες καπνού υπάρχουν δυο διαφορετικές ενεργότητες σύνθεσης EMO: μία NADPH-οξειδάση που ήταν υπεύθυνη για την παραγωγή του O_2^- , και μία δεύτερη NAD(P)H-οξειδάση-περοξειδάση που σχετίστηκε με την παραγωγή και των δύο EMO, ενώ στην άμπελο ανιχνεύτηκε μόνο το δεύτερο ενζυμικό σύστημα. Η χαμηλή συσσώρευση O_2^- , που παρατηρήθηκε στους πρωτοπλάστες αμπέλου σε σύγκριση με τους πρωτοπλάστες καπνού (Πίν. 2.1), πιθανώς λόγω της απουσίας της NADPH-οξειδάσης, ίσως δεν ήταν ικανή να προκαλέσει την επαγωγή της SOD. Τέλος, στους πρωτοπλάστες αμπέλου το οξειδοαναγωγικό επίπεδο της γλουταθειόνης και του ασκορβικού ήταν πολύ χαμηλό (Εικ. 2.12, 2.13). Οι αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση της γλουταθειόνης έχουν ρυθμιστική επίδραση στην γονιδιακή έκφραση του κυτοπλασματικού ισοενζύμου

της Cu/ZnSOD (Wingsle and Karpinski, 1996), ενώ η αναγμένη μορφή του ασκορβικού μειώνει ισχυρά την απενεργοποίηση της SOD σε καταστάσεις έντονης οξειδωτικής καταπόνησης (Casano *et al.*, 1997).

Στους πρωτοπλάστες καπνού, αλλά όχι στους πρωτοπλάστες αμπέλου, παρατηρήθηκε άμεση και ραγδαία επαγωγή της κυτοπλασμικής Cu/ZnSOD αμέσως μετά την απομόνωση και κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.19B). Στους πρωτοπλάστες και των δύο φυτικών ειδών διαπιστώθηκε μείωση της συγκέντρωσης του O_2^- (Εικ. 2.8) και αύξηση της ενεργότητας της μιτοχονδριακής MnSOD, όχι όμως στα επίπεδα, που χαρακτήρισαν το κυτοπλασμικό ισοένζυμο στο καπνό (Εικ. 2.19). Είναι πιθανό ότι στους πρωτοπλάστες καπνού το O_2^- συσσωρεύεται κυρίως στο κυτόπλασμα και μερικώς στα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα η Cu/ZnSOD και η MnSOD να συμμετέχουν στην απομάκρυνσή του, όταν στους πρωτοπλάστες αμπέλου το O_2^- εντοπίζεται μάλλον στα μιτοχόνδρια, οπότε μόνο η MnSOD συμβάλλει στην αυξημένη ενεργότητα της ολικής SOD κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.19A), υποστηρίζοντας έτσι διαφορετική διαμερισματοποίηση των EMO κατά την καταπόνηση στα δύο φυτικά είδη. Ακόμα, στους πρωτοπλάστες καπνού, που απομονώθηκαν μετά από 16 h επώαση με κυτταρινάση Onozuka (μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες), η ενεργότητα της Cu/ZnSOD μειώθηκε την 8η ΗΚ (Εικ. 2.19B) και η μείωση αυτή συνοδεύτηκε από αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του O_2^- (Εικ. 2.8). Αντίθετα, στους πρωτοπλάστες καπνού, που απομονώθηκαν μετά από 4 h επώαση με κυτταρινάση Worthington ή Onozuka (αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες), η ενεργότητα της Cu/ZnSOD συνέχισε να αυξάνει εξασφαλίζοντας την αντίστοιχη μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του O_2^- (Εικ. 2.8, 2.19B). Στο καλαμπόκι, το παρακουάτ και η έκθεση σε υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας της κυτοπλασμικής Cu/ZnSOD (Matters and Scandalios, 1986b, 1987), ενώ αυξήσεις στα επίπεδα του μεταγράφου της κυτοπλασμικής Cu/ZnSOD καταγράφηκαν σε φύλλα καπνού μετά από έκθεση σε όζον (Van Camp *et al.*, 1994, Willekens *et al.*, 1994b). Επαγωγή της συσσώρευσης του μεταγράφου της Cu/ZnSOD βρέθηκε επίσης

αμέσως μετά την απομόνωση και κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών καπνού (Εικ. 2.20).

Ο κυτταρικός μηχανισμός απόσβεσης του H_2O_2 είναι πολύπλοκος. Το H_2O_2 απομακρύνεται μέσω της δράσης της καταλάσης στα μικροσώματα και τα μιτοχόνδρια (Scandalios *et al.*, 1980) και από διάφορες ισομορφές της APO στους χλωροπλάστες, το κυτόπλασμα (Chen and Asada, 1989, Mittler and Zilinskas, 1991), τις μεμβράνες των υπεροξεισωμάτων (Yamaguchi *et al.*, 1995), και τα μιτοχόνδρια (De Leonardis *et al.*, 1995). Η επώαση των φύλλων καπνού με την κυτταρινάση Onozuka με σκοπό την απομόνωση πρωτοπλαστών, είχε ως αποτέλεσμα μία γρήγορη αύξηση της ενεργότητας της καταλάσης στους πρωτοπλάστες και κυρίως σε αυτούς που απομονώθηκαν μετά από 16 h επώαση, ενώ αντίθετα δεν παρατηρήθηκε αύξηση στους πρωτοπλάστες αμπέλου κατά τη διάρκεια της επώασης ή νωρίς κατά την καλλιέργεια (Siminis *et al.*, 1994). Η παραγωγή H_2O_2 αρχίζει με την εφαρμογή των ενζύμων και συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της επώασης (Εικ 1.8), οπότε η πρόωρη αύξηση της καταλάσης στους πρωτοπλάστες καπνού είναι αποτέλεσμα της παρουσίας του H_2O_2 . Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του H_2O_2 μειώθηκε κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών (Εικ. 2.8), όταν η ειδική ενεργότητα της καταλάσης αυξήθηκε μόνο στους πρωτοπλάστες αμπέλου (Siminis *et al.*, 1994). Όμως στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου επικράτησε η α υπομονάδα και τα πλέον καταλατικά κατιονικά ισοένζυμα κατά την καλλιέργεια, ενώ *de novo* σύνθεση της β υπομονάδας, η οποία δομεί τα λιγότερο καταλατικά ανιονικά ισοένζυμα, παρατηρήθηκε στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού (Siminis *et al.*, 1994).

Η ενεργότητα της APO είναι επίσης εξαιρετικά σημαντική για τον φυσιολογικό μεταβολισμό του κυττάρου, αφού η καταλάση, η οποία έχει υψηλό K_m για το H_2O_2 και δεν είναι παρούσα στο κυτόπλασμα ή τους χλωροπλάστες (Foyer *et al.*, 1994), δεν μπορεί να εμποδίσει την εξαρτώμενη από το H_2O_2 αναστολή διαφόρων κυτοπλασμικών και χλωροπλαστικών ενζύμων (Kaiser, 1976, Verniquet *et al.*, 1991). Η ενεργότητα της APO αυξήθηκε έντονα κατά την καλλιέργεια των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών

καπνού (Εικ. 2.26) και συνοδεύτηκε από εμφάνιση δύο νέων ισοενζύμων (Εικ. 2.27) και συσώρευση του μεταγράφου του κυτοπλασμικού ισοενζύμου (Εικ. 2.28). Στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, η ενεργότητα της APO παρουσίασε το ενδοκυτταρικό H_2O_2 αυξήθηκε την 8η ΗΚ (Εικ. 2.8). Ακόμα, στους πρωτοπλάστες αμπέλου, η APO παρουσίασε χαμηλή ενεργότητα (Εικ. 2.26) και το ενδοκυτταρικό H_2O_2 μειώθηκε (Εικ. 2.8). Τα στοιχεία αυτά σε συνδυασμό με την διαφορική έκφραση της καταλάσης (Siminis *et al.*, 1994) υποστηρίζουν την ύπαρξη διαφορετικών στρατηγικών αντιμετώπισης των EMO στους αναγεννώμενους και μη πρωτοπλάστες.

Το χαμηλό αναγωγικό επίπεδο του ασκορβικού στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες αμπέλου υποδεικνύει την παρουσία υψηλής ενεργότητας οξειδωσης του ασκορβικού, η οποία πραγματοποιείται από περοξειδάσες (POX) και την APO. Η σχετική συμμετοχή των ενζύμων αυτών έχει μελετηθεί (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1999) με την χρησιμοποίηση του pCMB, ειδικού αναστολέα της και KCN, που αναστέλλει την ενεργότητα της POX, καθώς και την ευαισθησία της APO στο H_2O_2 κάτω από αερόβιες συνθήκες (Amako *et al.*, 1994). Η οξειδωση του ασκορβικού από POX-ήταν πολύ χαμηλή στα φύλλα και τους πρωτόπλαστες (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1999). Στον καπνό, η χλωροπλαστική ισομορφή της APO (η πλήρως εξαρτώμενη από ασκορβικό) ήταν πολύ υψηλή στα φύλλα, ενώ η ενεργότητα της κυτοπλασμικής APO (η οποία δίνεται από την διαφορά μεταξύ της ενεργότητας που αναστέλλεται από pCMB, δηλαδή της ολικής ενεργότητας, και της ενεργότητας που εξαρτάται από το ασκορβικό, δηλαδή της χλωροπλαστικής) αυξήθηκε σημαντικά στους πρωτοπλάστες κατά την καλλιέργεια (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1999). Στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, η ενεργότητα της APO την 8η ΗΚ αυξήθηκε 225-φορές και στους μη αναγεννώμενους 14-φορές, ενώ στους πρωτοπλάστες αμπέλου αντίθετα, δεν ανιχνεύτηκε αύξηση της APO (Εικ. 2.26). Η φυσιολογική σημασία της ενεργότητας της APO στην αναγέννηση των πρωτοπλαστών δείχθηκε όταν αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού δεν επιβίωσαν σε καλλιέργεια παρουσία pCMB (de Marco and Roubelakis-

Angelakis, 1996b).

Η ενεργότητα της APO εξαρτάται από την διαθεσιμότητα του αναγμένου ασκορβικού, η οποία εξασφαλίζεται από τον κύκλο των Halliwell-Asada (Foyer and Halliwell, 1976). Η ενεργότητα της MDHAR, η οποία συμμετέχει στην αναγέννηση του ASA, αυξήθηκε σημαντικά μόνο στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, παράλληλα με την ενεργότητα της APO, ενώ η ενεργότητα της DHAR μειώθηκε κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.30). Το χαμηλό οξειδοαναγωγικό επίπεδο του ασκορβικού στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου (Εικ. 2.12) μπορεί να συσχετιστεί με την χαμηλή ενεργότητα της DHAR (Εικ. 2.30). Η ενεργότητα της GR αυξήθηκε έντονα στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού φτάνοντας σε 8-φορές υψηλότερο επίπεδο την 8η ΗΚ σε σχέση με την στιγμή της απομόνωσης (Εικ. 2.28). Στην αύξηση αυτή μπορεί να αποδοθεί η υψηλή συγκέντρωση αναγμένης γλουταθειόνης που ανιχνεύτηκε στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες (Εικ. 2.13). Οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου παρουσίασαν χαμηλότερη ενεργότητα της GR, η οποία εύκολα ανακλάται στο υψηλό οξειδοαναγωγικό επίπεδο της γλουταθειόνης που χαρακτήρισε την καλλιέργεια αυτών των πληθυσμών (Εικ. 2.13).

Η DHAR ήταν το μόνο ένζυμο του κύκλου Halliwell-Asada, η ενεργότητα του οποίου μειωνόταν μέχρι την 4η ΗΚ και αυξήθηκε στην συνέχεια τόσο στους αναγεννώμενους όσο και στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού (Εικ. 2.30). Αντίθετα, η ενεργότητα της MDHAR αυξήθηκε σταθερά κατά την καλλιέργεια των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού (Εικ. 2.30), γεγονός που πιθανολογεί «προτίμηση» της MDHAR για την αναγωγή του ασκορβικού (Asada, 1984). Η ενεργότητα της GS-POX ήταν υψηλότερη στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αυξήθηκε κατά τις πρώτες 4 ημέρες στην καλλιέργεια, όταν στους πρωτοπλάστες αμπέλου δεν ανιχνεύτηκε καθόλου. Η ενεργότητα αυτή φαίνεται ότι είναι χαρακτηριστική των πρωτοπλαστών αφού δεν ανιχνεύτηκε στο φύλλο και συνήθως είναι αμελητέα στους ιστούς των ανώτερων φυτών (Asada, 1992a). Η σχετική συμμετοχή της GS-POX στην απόσβεση του H_2O_2 μειώθηκε κατά την

καλλιέργεια καθώς αντιστοιχούσε στο 30% της ενεργότητας της APO τις πρώτες ΗΚ και μόλις στο 1% την 8η ΗΚ, ποσοστό το οποίο βρέθηκε σε καλλιεργούμενα κύτταρα πολλών ειδών (Drotar *et al.*, 1985). Το όζον και η υπεριώδης ακτινοβολία προκάλεσαν συσσώρευση mRNA της GS-POX προκειμένου να αποκατασταθεί η περοξειδωσις των λιπιδίων (Willekens *et al.*, 1994b). Πρόκειται για ένα ένζυμο με δυναμική ικανή να του προσφέρει παροδικό αλλά ίσως κρίσιμο ρόλο στις καταπονήσεις (Levine *et al.*, 1994). Η αυξημένη ενεργότητα της GR στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού εξασφαλίζει μάλλον υπόστρωμα για την ενεργότητα της GS-POX παρά για την DHAR, η ενεργότητα της οποίας μειώθηκε κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.30).

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμπληρώνουν ακόμα περισσότερο την εικόνα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού στους πρωτοπλάστες. Το χαμηλότερο επίπεδο οξειδοαναγωγής της γλουταθειόνης και του ασκορβικού, που παρατηρήθηκε στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου και η ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, APO, MDHAR, DHAR, GR και GS-POX που ήταν σε χαμηλά επίπεδα και μειώθηκε κατά την καλλιέργεια, επιβεβαιώνουν την κατάρρευση του αμυντικού μηχανισμού των μη αναγεννώμενων πρωτοπλάστων κατά την οξειδωτική καταπόνηση, που μοιραία οδηγεί σε μειωμένη βιωσιμότητα και ικανότητα διαίρεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.4

**ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΞΩΓΕΝΩΝ
ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ
ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ
ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΙΟΥ**

2.4.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα επίπεδα των πολυαμινών και η κατανομή τους παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο κατά την καλλιέργεια των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού και των μη αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πουτρεσίνης από τους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες, την στιγμή της απομόνωσης σε σχέση με το φύλλο, ενώ στους πρωτοπλάστες αμπέλου δεν διαπιστώθηκε σημαντική μεταβολή. Οι αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού παρουσίασαν σταδιακή αύξηση των πολυαμινών κατά την διάρκεια της καλλιέργειας και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, με επικράτηση των διαλυτών συζευγμένων πολυαμινών, ενώ οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, με αυτή τη σειρά, παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα πολυαμινών. Η επίδραση της οσμωτικής καταπόνησης σε συνδυασμό με ένζυμα αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος οδήγησαν σε συσσώρευση διαλυτής πουτρεσίνης και μείωση των επιπέδων της σπερμιδίνης και της σπερμίνης. Οι πολυαμίνες μείωσαν την επαγόμενη από κυτταρινάση Onozuka συσσώρευση O_2^- και ενίσχυσαν παροδικά την παραγωγή H_2O_2 , μάλλον λόγω της οξειδωσής τους, ενώ η εξωγενής προσθήκη πουτρεσίνης ή σπερμίνης βελτίωσε την βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου, μειώνοντας την συσσώρευση του O_2^- , όταν η σπερμιδίνη έδειξε αντίθετα αποτελέσματα, μάλλον λόγω αύξησης της ενδογενούς συγκέντρωσης του H_2O_2 .

2.4.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πολυαμίνες (ΠΑ) βρίσκονται σε mM συγκεντρώσεις στα κύτταρα και θεωρούνται σημαντικές για την αντιγραφή του DNA, την διαφοροποίηση του κυττάρου και την ρύθμιση της αύξησης και της μορφογένεσης (Bagni *et al.*, 1982, Galston and Kaur-Sawhney, 1990). Η βιοσύνθεση πολυαμινών απαιτείται για την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και την ολοκλήρωση του κύκλου της μίτωσης (Fowler *et al.*, 1996). Σε νεαρά φυτά *Acer sacharum* παρατηρήθηκε ταυτόχρονη συσσώρευση ΠΑ με τις κυτταρικές διαιρέσεις

(Walker *et al.*, 1985), ενώ η εξωγενής παροχή ΠΑ σε μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες βρώμης προκάλεσε μικρό αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων και σύνθεση DNA (Huhtinen *et al.*, 1982).

Διάφορες καταστάσεις καταπονήσεων έχει βρεθεί να επάγουν την συσσώρευση ΠΑ, όπως η ωσμωτική (Flores and Galston, 1982, Flores and Galston, 1984, Borrell *et al.*, 1996), υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες (Lovatt, 1990, Lee, 1997), αλατότητα (Santa-Cruz *et al.*, 1997), όξινο περιβάλλον (Nam *et al.*, 1997), ανοξία (Reggiani *et al.*, 1989) και η οξειδωτική καταπόνηση (Campos *et al.*, 1991, Ye *et al.*, 1997, Bouchereau *et al.*, 1999).

Οι ΠΑ μπορούν να δρουν άμεσα κατά την απόσβεση των ΕΜΟ ή έμμεσα κατά την αλληλεπίδρασή τους με διάφορα μόρια, όπως το φερουλικό και το καφεϊκό οξύ (Bors *et al.*, 1989). Η προσθήκη εξωγενών ΠΑ σε φυτά τομάτας και καπνού προκάλεσε καταστολή της επαγόμενης από το όζον βλάβης (Ormrod and Beckerson, 1986). Υψηλά επίπεδα ΠΑ σχετίστηκαν με την ανθεκτικότητα στο παρακουάτ (Sziget *et al.*, 1996), ενώ υψηλά ενδογενή επίπεδα ΠΑ, υψηλότερα επίπεδα των βιοσυνθετικών ενζύμων της πουτρεσίνης και των αντιοξειδωτικών ενζύμων βρέθηκαν στον ανθεκτικό εναντίον της οξειδωτικής καταπόνησης, τύπο του *Conyza canadensis* (Ye *et al.*, 1997). Ακόμα, η παροχή σπερμιδίνης εμποδίζει την επαγόμενη από UV βλάβη στην *Arabidopsis* (Campos *et al.*, 1991).

Στο Κεφάλαιο αυτό μελετήθηκαν τα ενδογενή επίπεδα των πολυαμινών στο διαλυτό (Δ-), στο διαλυτό συζευγμένο (ΔΣ-) και στο αδιάλυτο συζευγμένο (ΑΣ-) κλάσμα, κατά την απομόνωση και την καλλιέργεια των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού και των μη αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση των ΠΑ στην επαγόμενη από κυτταρινάση Onozuka συσσώρευση των ΕΜΟ κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών και η συμπεριφορά των καλλιεργούμενων πρωτοπλαστών κατά την προσθήκη εξωγενών πολυαμινών στο μέσο καλλιέργειας.

2.4.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.4.4.1. Ανάπτυξη φυτών και απομόνωση πρωτοπλαστών

Η ανάπτυξη των φυτών και η απομόνωση των πρωτοπλαστών έγινε όπως αναφέρθηκε στο Υποκεφάλαιο 2.2.3.1 ενώ κάθε άλλη μεταχείριση αναγράφεται στο κείμενο.

2.4.3.2. Προσδιορισμός της συσσώρευσης ΕΜΟ

Η παραγωγή των ΕΜΟ κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών προσδιορίστηκε όπως περιγράφηκε στο Υποκεφάλαιο 2.1.3.3.

2.4.3.3. Εκχύλιση και προσδιορισμός των ενδογενών πολυαμινών

Η εκχύλιση και ο προσδιορισμός των πολυαμινών έγινε σύμφωνα με τους (Kotzabasis *et al.*, 1993). Περιληπτικά, ο ιστός φύλλου λειοτριβήθηκε αρχικά με γουδί σε υγρό άζωτο πριν την εκχύλιση. Ακολούθησε ομογενοποίηση με 5% (v/v) TCA και η σχέση δείγματος (φύλλο ή πρωτοπλάστες) : TCA ήταν 1:4. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στα 10.000 rpm, στους 4°C και οι διαλυτές στο υπερκείμενο πολυαμίνες, όπως και οι διαλυτές συζευγμένες και οι αδιάλυτες συζευγμένες πολυαμίνες αφού απελευθερώθηκαν, μετά από 16 h υδρόλυση με πυκνό HCl στους 110°C, βενζυλιώθηκαν, ενώ επίσης προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών στο ίζημα (Lowry *et al.*, 1951). Οι βενζυλιωμένες πολυαμίνες εκχυλίστηκαν με διεθύλ-αιθέρα, η φάση του αιθέρα συλλέχθηκε και εξατμίστηκε και το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μ L 63% (v/v) μεθανόλης. Ακολούθως, οι βενζυλιωμένες πολυαμίνες κλασματώθηκαν μέσω μιας C18 στήλης ανάστροφης φάσης, σε σύστημα HPLC, Hewlett-Packard 1090 (Hewlett-Packard, Wadbronn, Germany), εφοδιασμένο με ανιχνευτή DAD. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πολυαμινών έγινε χρησιμοποιώντας πρότυπες καμπύλες για την πουτρεσίνη, σπερμιδίνη και σπερμίνη.

2.4.3.4. Εκχύλιση πρωτεϊνών και προσδιορισμός ενζυμικών ενεργοτήτων

Η εκχύλιση πρωτεϊνών έγινε όπως περιγράφηκε στο Υποκεφάλαιο 2.3.3.3 και ο προσδιορισμός της SOD και της APO στο Υποκεφάλαιο 2.3.4.3. Η ενεργότητα της καταλάσης προσδιορίστηκε μετρώντας τον ρυθμό αποδόμησης του H₂O₂ στα 240 nm. Το διάλυμα αντίδρασης περιείχε 1 mL 30% (v/v) H₂O₂ σε 400 mL 50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7,0 (Havir and McHale, 1987). Ο

όγκος αντίδρασης ήταν 1 mL και η αντίδραση έγινε στους 27° C. Μία μονάδα ενεργότητας καθορίστηκε σαν η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει την αποδόμηση 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$.

Η ενεργότητα της υπεροξειδάσης προσδιορίστηκε μετρώντας την οξείδωση του o-dianisidine στα 460 nm (Church and Galston, 1988). Το διάλυμα αντίδρασης ήταν 50 mM οξικό Na, pH 5,2, 2,5 mM CaCl_2 , 5 mM H_2O_2 και 1 mM o-dianisidine. Ο όγκος αντίδρασης ήταν 1 mL και η ενεργότητα μετρήθηκε στους 25° C. Μια μονάδα ενεργότητας καθορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που αυξάνει την απορρόφηση κατά 0,01 μονάδες απορρόφησης min^{-1} .

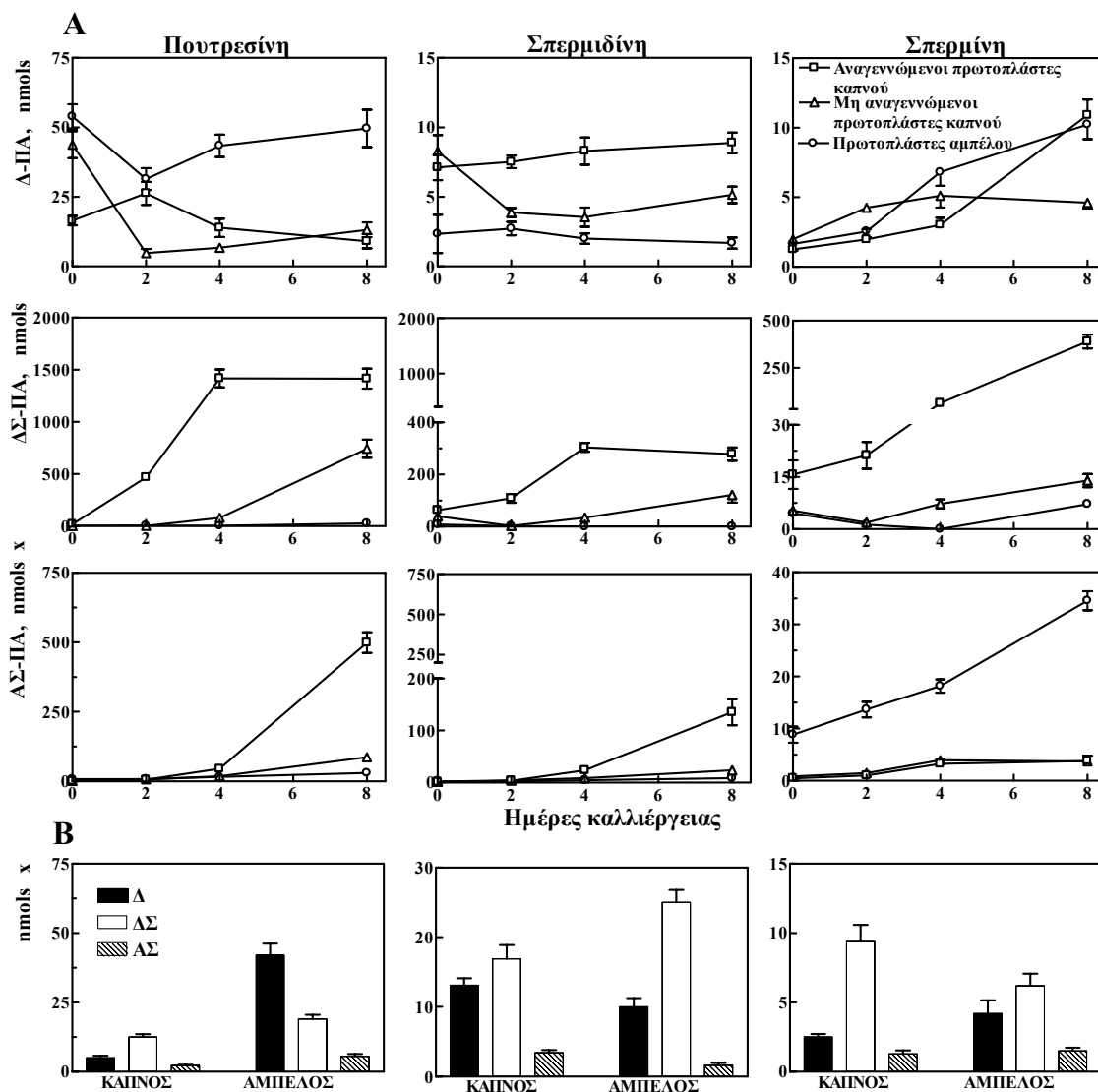
Για την μέτρηση της ενεργότητας της οξειδάσης των διαμινών, πρωτεϊνικό εκχύλισμα προστέθηκε στο διάλυμα αντίδρασης (100 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7,0 και 10 mM πουτρεσίνης), σε συνολικό όγκο 1 mL και επώαστηκε στους 37 °C για 60 min (Holmstead *et al.*, 1961). Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 10% TCA και ακολούθως προστέθηκαν 12,5 μg o-aminobenzaldehyde. Μετά από 30 min στον πάγο, προσδιορίστηκε η απορρόφηση στα 430 nm. Μια μονάδα ενεργότητας καθορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που οδηγεί στον σχηματισμό 1 $\mu\text{mol } \Delta^1\text{-pyridine min}^{-1}$.

2.4.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.4.4.1. Ενδογενή επίπεδα των πολυαμινών κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου

Στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, το διαλυτό κλάσμα (Δ) της πουτρεσίνης (ΠΣ) παρουσίασε 3,3-φορές αύξηση σε σχέση με το φύλλο αμέσως μετά την απομόνωση, συνέχισε να αυξάνει μέχρι την 2η ΗΚ και ακολούθως μειώθηκε (Εικ. 2.31). Το επίπεδο της Δ -σπερμιδίνης ($\Sigma\Delta$) και της σπερμίνης (ΣM) παρουσίασαν αύξηση κατά την καλλιέργεια, η οποία ήταν εντονότερη στην ΣM όπου η συγκέντρωση αυξήθηκε κατά 10-φορές, την 8η ΗΚ (Εικ. 2.31). Το επίπεδο της ΠΣ αυξήθηκε εντονότερα στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, αμέσως μετά την απομόνωση (8,8-φορές), μειώθηκε την 2η ΗΚ και αυξήθηκε ξανά την 8η ΗΚ. Στον πληθυσμό

αυτό, το επίπεδο της Δ- ΣΜ αυξήθηκε την 2η ΗΚ και στην συνέχεια δεν παρουσίασε σημαντική αλλαγή, ενώ η Δ-ΣΔ παρουσίασε μείωση κατά την καλλιέργεια, συνοδευόμενη από αύξηση



Εικόνα 2.31. Ενδογενή επίπεδα των πολυαμινών στο διαλυτό (Δ-), στο διαλυτό συζευγμένο (ΔΣ-) και στο αδιάλυτο συζευγμένο (ΑΣ-) κλάσμα, κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου (A) και στο φύλλο καπνού και αμπέλου (B). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα

την 8η ΗΚ (Εικ. 2.31). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, η Δ-ΠΣ δεν εμφάνισε σημαντική μεταβολή σε σχέση με τον ιστό του φύλλου, αμέσως μετά την απομόνωση, μειώθηκε την 2η ΗΚ και αυξήθηκε ξανά στην συνέχεια (Εικ. 2.31). Το επίπεδο της Δ-ΣΔ δεν έδειξε αξιοσημείωτη μεταβολή κατά την

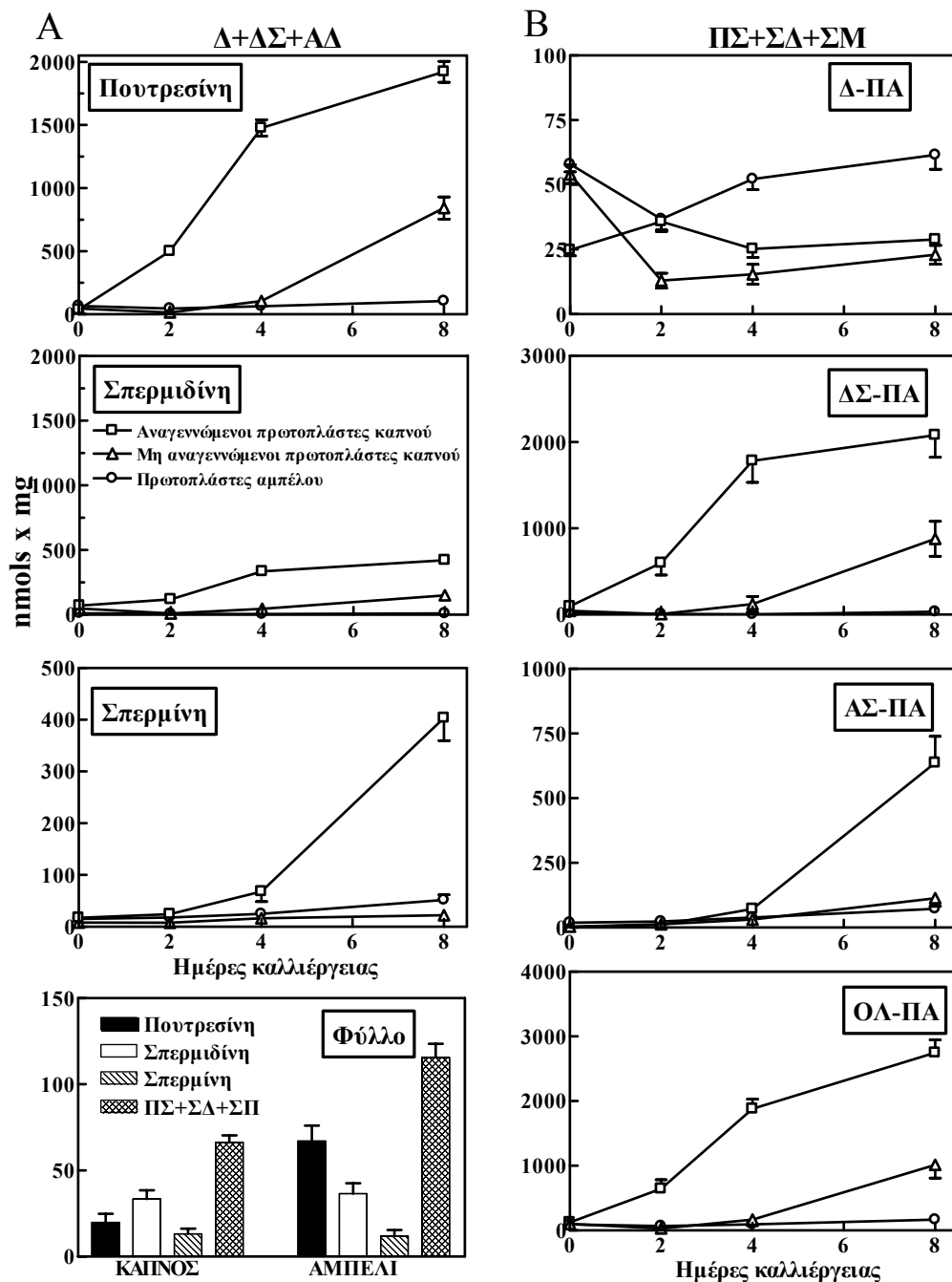
καλλιέργεια, ενώ η Δ-ΣΜ, μετά από σταδιακή αύξηση, έφτασε την 8η ΗΚ, σε επίπεδο 6,2-φορές υψηλότερο από εκείνο που ανιχνεύτηκε την στιγμή της απομόνωσης των πρωτοπλαστών (Εικ. 2.31).

Οι διαλυτές συζευγμένες πολυαμίνες (ΔΣ-ΠΑ) εμφάνισαν γενικά υψηλότερα επίπεδα από τις διαλυτές ή τις αδιάλυτες συζευγμένες πολυαμίνες στους πρωτοπλάστες καπνού (Εικ. 2.32). Σε όλους τους πληθυσμούς των πρωτοπλαστών καπνού η ΔΣ-πουτρεσίνη παρουσίασε αύξηση κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.31). Τα υψηλότερα επίπεδα εντοπίστηκαν στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, ακολούθησαν οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού με χαμηλότερα επίπεδα, και τέλος, οι πρωτοπλάστες αμπέλου παρουσίασαν τα πιο χαμηλά επίπεδα κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.31Α). Στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού η ΔΣ-ΣΔ παρουσίασε μέγιστη συσσώρευση την 4η ΗΚ και στη συνέχεια μειώθηκε ελαφρώς, όταν στους μη αναγεννώμενους παρουσίασε μείωση την 2η ΗΚ και αυξήθηκε στην συνέχεια (Εικ. 2.31Α). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση στο επίπεδο της ΔΣ-ΣΔ, τέτοια ώστε από την 4η ΗΚ και μετά τα επίπεδα της ΣΔ δεν ήταν πλέον ανιχνεύσιμα (Εικ. 2.31Α). Η ΔΣ-ΣΜ εμφάνισε χαμηλότερα επίπεδα από την ΠΣ και την ΣΔ κατά την καλλιέργεια. Στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, το επίπεδο της ΔΣ-ΣΜ αυξήθηκε έντονα κατά την καλλιέργεια, στους μη αναγεννώμενους, υπήρξε μείωση την 2η ΗΚ και αύξηση στην συνέχεια και στους πρωτοπλάστες αμπέλου η ΔΣ-ΣΜ διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας (Εικ. 2.31Α).

Οι αδιάλυτες συζευγμένες πολυαμίνες (ΑΣ-ΠΑ) παρουσίασαν αύξηση κατά την καλλιέργεια όλων των πληθυσμών των πρωτοπλαστών (Εικ. 2.31Α). Η ΑΣ-ΠΣ και ΣΔ εμφάνισαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού σε σχέση με τους μη αναγεννώμενους καπνού και αμπέλου, οι οποίοι, με αυτή τη σειρά, παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα (Εικ. 2.31). Αντίθετα, η ΑΣ-ΣΜ παρουσίασε τα ίδια περίπου επίπεδα στους δυο πληθυσμούς των πρωτοπλαστών καπνού, το επίπεδο όμως ήταν χαμηλότερο από εκείνο που εντοπίστηκε στους πρωτοπλάστες αμπέλου (Εικ.

2.31A).

Στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, το ολικό επίπεδο ($\Delta+\Delta\Sigma+A\Delta$) της ΠΣ, της ΣΔ και της ΣΜ παρουσίασε την μεγαλύτερη συσσώρευση σε σχέση με τους άλλους πληθυσμούς και χαρακτηρίστηκε από αυξητική τάση κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.32A). Στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου όλες οι ΠΑ παρουσίασαν μείωση την 2η ΗΚ



Εικόνα 2.32. (Α) Ενδογενή επίπεδα της ολικής πουτρεσίνης (ΠΣ),

σπερμιδίνης (ΣΔ) και σπερμίνης (ΣΜ) μετά από άθροιση του διαλυτού (Δ), του διαλυτού συζευγμένου (ΔΣ) και του αδιάλυτου συζευγμένου (ΑΣ) κλάσματος και (Β) επίπεδα των ολικών κλασμάτων των πολυαμινών (ΠΣ+ΣΔ+ΣΜ) κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

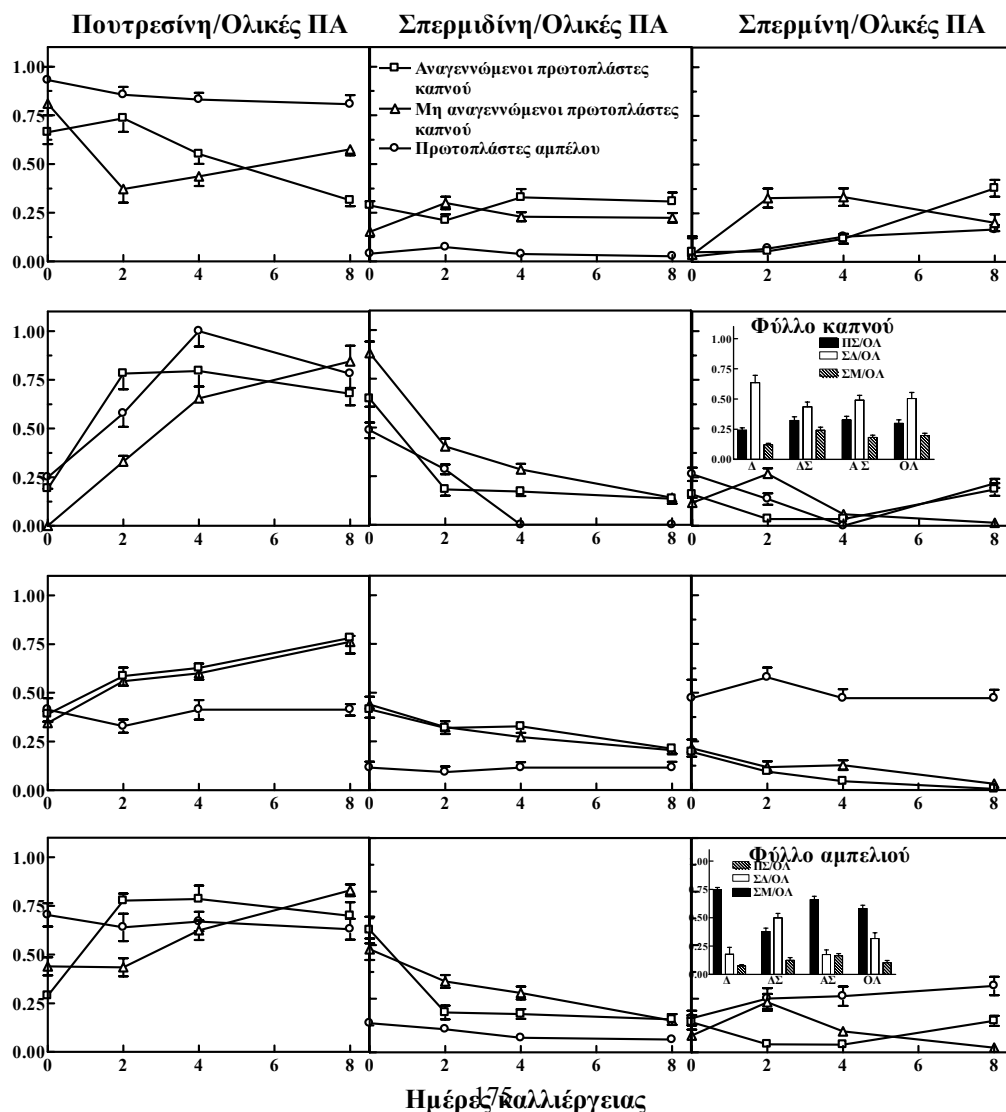
και ακολούθως αυξήθηκαν, με εξαίρεση την ΣΜ στους πρωτοπλάστες αμπέλου, η οποία ακολούθησε σταδιακή αύξηση κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.31Α).

Οι ολικές ΔΣ-ΠΑ (πουτρεσίνη+σπερμιδίνη+σπερμίνη) επικράτησαν αριθμητικά κατά την καλλιέργεια των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού, ακολούθησαν οι ΑΣ-ΠΑ και τέλος τις χαμηλότερες τιμές παρουσίασαν οι Δ-ΠΑ (Εικ. 2.32Β). Οι ΔΣ- και οι ΑΣ-ΠΑ παρουσίασαν αυξητική τάση κατά την καλλιέργεια, ενώ οι ΔΣ- ΠΑ έτειναν προς μείωση. Η ίδια περίπου εικόνα ακολουθήθηκε και από τους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, όμως το επίπεδο των ΠΑ ήταν χαμηλότερο σε σύγκριση με τους αναγεννώμενους: την 8η ΗΚ, Οι συγκεντρώσεις των ΔΣ- και των ΑΣ- ΠΑ εμφανίστηκαν χαμηλότερες κατά 58% και 82%, αντίστοιχα ενώ οι Δ-ΠΑ ήταν στο ίδιο επίπεδο (Εικ. 2.32Β). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, οι συγκεντρώσεις των ΔΣ- και οι ΑΣ-ΠΑ ήταν οι χαμηλότερες, που εντοπίστηκαν συγκρίνοντας τους τρεις πληθυσμούς πρωτοπλαστών, όμως οι Δ-ΠΑ παρουσίασαν το υψηλότερο επίπεδο. Τα κλάσματα των Δ- και των ΑΣ-ΠΑ εμφανίστηκαν ως τα επικρατέστερα, με μικρή διαφορά όμως από το ΔΣ- κλάσμα. Την 8η ΗΚ, το επίπεδο των Δ- ΠΑ ήταν κατά 2-φορές υψηλότερο από το αντίστοιχο των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών και το επίπεδο των ΔΣ-και οι ΑΣ-ΠΑ ήταν κατά 63- και 87-φορές χαμηλότερο (Εικ. 2.32Β). Οι ολικές ΠΑ (Δ+ΔΣ+ΑΔ) εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες, όπου το επίπεδο ήταν 2,7- και 16,4- υψηλότερο από τους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, αντίστοιχα, την 8η ΗΚ (Εικ. 2.32Β).

Στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, η σχέση Δ-ΠΣ/Δ-ΟΛ ΠΑ

(πουτρεσίνη+σπερμιδίνη+σπερμίνη) μειώθηκε κατά την καλλιέργεια, όμως η σχέση Δ-ΣΔ/Δ-ΟΛ και Δ-ΣΜ/Δ-ΟΛ αυξήθηκε (Εικ. 2.33). Τα αντίθετα αποτελέσματα χαρακτήρισαν τους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, με εξαίρεση την 2η ΗΚ, όπου οι λόγοι παρουσίασαν αντιστροφή από το γενικό πρότυπο (Εικ. 2.33). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, η σχέση Δ-ΠΣ/Δ-ΟΛ παρουσίασε μικρή μείωση κατά την καλλιέργεια, η αντίστοιχη σχέση για την ΣΔ δεν μεταβλήθηκε σημαντικά και η σχέση Δ-ΣΜ/Δ-ΟΛ αυξήθηκε (Εικ. 2.33).

Ο λόγος της ΔΣ-ΠΣ/ΔΣ-ΟΛ παρουσίασε έντονη αύξηση στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού την 2η ΗΚ, όπου η αντίστοιχη σχέση για την ΔΣ- ΣΔ και ΣΜ μειώθηκε εξίσου έντονα. Τις επόμενες ημέρες, οι λόγοι ΔΣ-ΠΣ και ΔΣ-ΣΔ/ΔΣ-ΟΛ αυξήθηκαν και ο λόγος ΔΣ-ΣΜ/ΔΣ-ΟΛ μειώθηκε (Εικ. 2.33). Στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, η σχέση



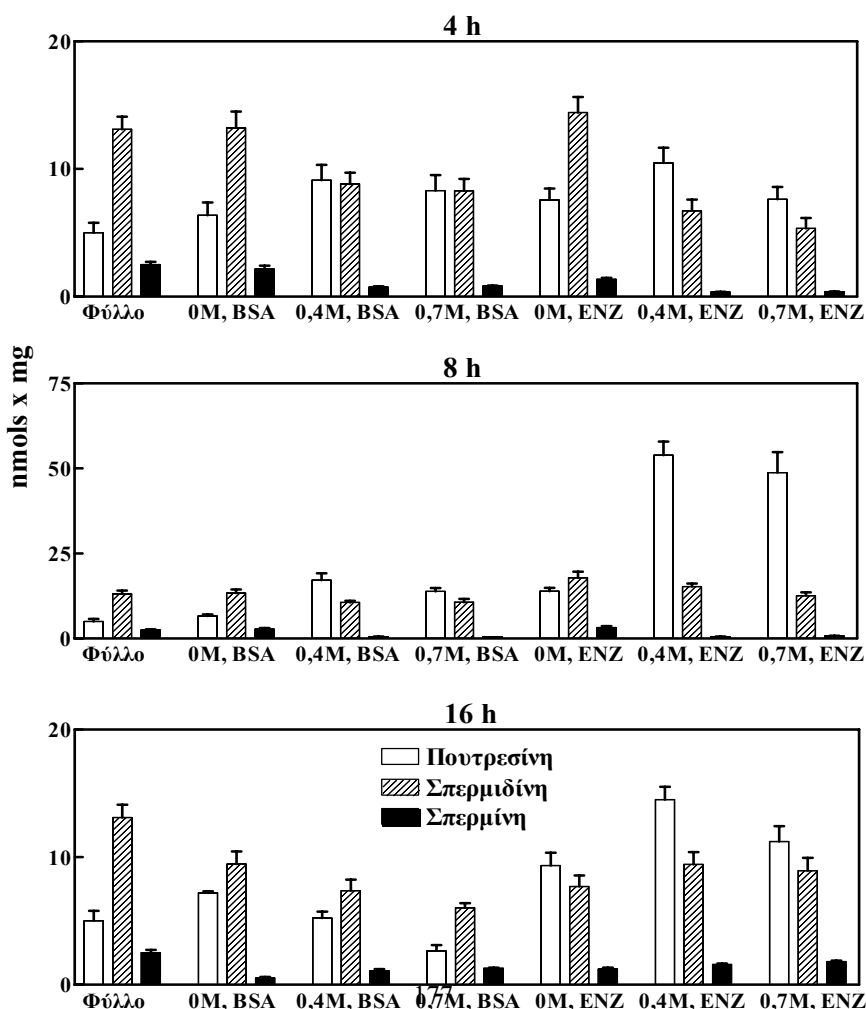
Εικόνα 2.33. Σχέση της πουτρεσίνης (ΠΣ), της σπερμιδίνης (ΣΔ) και της σπερμίνης προς τις ολικές πολυαμίνες (ΠΣ+ΣΔ+ΣΜ) στο διαλυτό (Δ), το διαλυτό συζευγμένο (ΔΣ) και το αδιάλυτο συζευγμένο (ΑΣ) κλάσμα κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα

ΔΣ-ΠΣ/ΔΣ-ΟΛ αυξήθηκε και οι αναλογίες ΔΣ- ΣΔ και ΣΜ/ΔΣ-ΟΛ μειώθηκαν, όταν στους πρωτοπλάστες αμπέλου, τα αντίθετα παρατηρήθηκαν την 8η ΗΚ για την πουτρεσίνη και την σπερμίνη (Εικ. 2.33). Στους δύο πληθυσμούς πρωτοπλαστών καπνού, η σχέση ΑΣ-ΠΣ/ΑΣ-ΟΛ αυξήθηκε και οι αναλογίες ΑΣ-ΠΣ και ΑΣ- ΣΔ/ΑΣ-ΟΛ μειώθηκαν κατά την καλλιέργεια, ενώ στους πρωτοπλάστες αμπέλου, οι αντίστοιχες αναλογίες δεν τροποποιήθηκαν σημαντικά (Εικ. 2.33). Τέλος, στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, η σχέση της ολικής ΠΣ (Δ+ΔΣ+ΑΔ) (ΟΛ-ΠΣ)/ΟΛ-ΠΑ παρουσίασε αύξηση την 2η ΗΚ και ακολούθως μειώθηκε, η σχέση της ΟΛ-ΣΔ/ΟΛ-ΠΑ μειώθηκε και η σχέση ΟΛ-ΣΜ/ΟΛ-ΠΑ, αφού μειώθηκε την 2η ΗΚ, ακολούθως αυξήθηκε κατά την καλλιέργεια. Στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, η σχέση της ΠΣ αυξήθηκε και οι αναλογίες της ΟΛ-ΣΔ και ΟΛ-ΣΜ μειώθηκαν, ενώ στους πρωτοπλάστες αμπέλου καμιά σημαντική μεταβολή δεν παρατηρήθηκε (Εικ. 2.33).

2.4.4.2. Επίδραση του ωσμωτικού μέσου και των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος στην συσσώρευση πολυαμινών κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών καπνού

Σε μια προσπάθεια διερεύνησης των παραγόντων, που οδηγούν στην συσσώρευση ΠΑ κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών, εξετάστηκε, μεμονωμένα και σε συνδυασμό, η επίδραση του ωσμωτικού μέσου και των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος. Έντονα τραυματισμένα φύλλα καπνού τοποθετήθηκαν σε απιονισμένο νερό ή σε 0,4 Μ σακχαρόζης (κατάλληλο ωσμωτικό για τους πρωτοπλάστες καπνού) ή σε 0,7 Μ σακχαρόζης, παρουσία BSA ή των συνήθων ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος (1% κυτταρινάση Onozuka και 0,1% μακεροζύμη

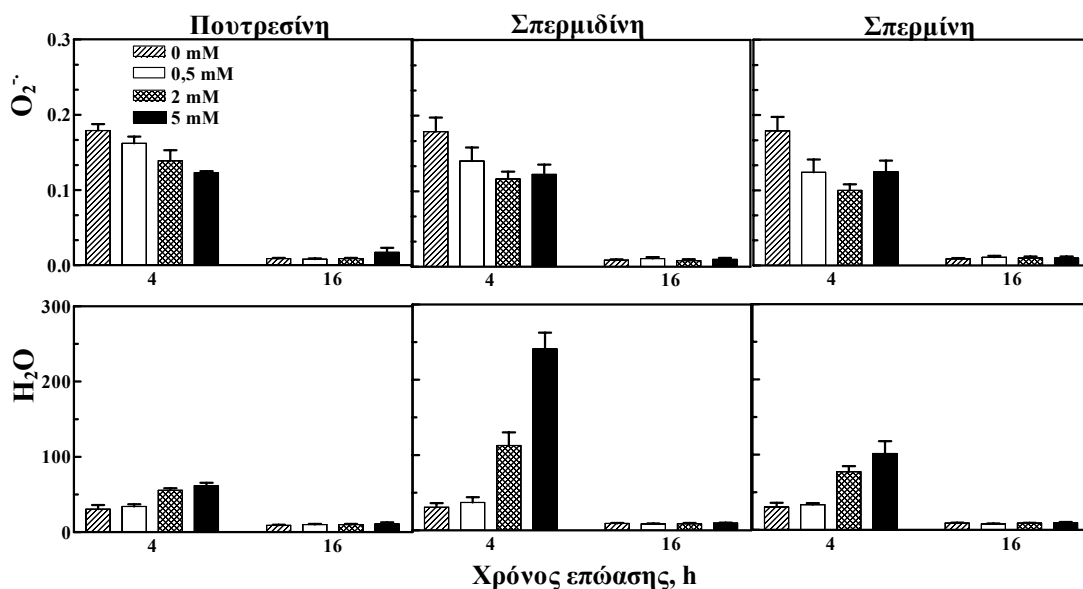
Οποζυκα) και τα επίπεδα των πολυαμινών αναλύθηκαν μετά από 4, 8 ή 16h (Εικ. 2.34). Μετά από 4 h, η Δ- ΠΣ αυξήθηκε κατά 27%, 82% και 66% σε σχέση με το φύλλο παρουσία 0, 0,4 και 0,7 M σακχαρόζης, αντίστοιχα (Εικ. 2.34). Μετά από 8 h, παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες αυξήσεις κατά 32%, 243% και 176%, αντίστοιχα, ενώ μετά από 16 h, εμφανίστηκε αύξηση κατά 43% και 4,6% σε 0 και σε 0,4 M σακχαρόζης αντίστοιχα, και μείωση κατά 48% σε 0,7 M σακχαρόζης (Εικ. 2.34). Ο συνδυασμός του ωσμωτικού μέσου και των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος ενίσχυσε ακόμα περισσότερο την συσσώρευση της Δ- ΠΣ: στις 4 h, το επίπεδο παρουσίασε αύξηση κατά 51%, 109% και 52%, στις 8 h κατά 178%, 978% και 875% και στις 16 h κατά 87%, 90% και 124%, αντίστοιχα σε 0, 0,4 και 0,7 M σακχαρόζης (Εικ. 2.34). Τα επίπεδα της Δ- ΣΔ και της Δ- ΣΜ μειώθηκαν σε σχέση με το φύλλο κατά την επίδραση του ωσμωτικού ή του συνδυασμού του ωσμωτικού και των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος. Εντονότερη μείωση παρουσίασε η ΣΜ μετά από 4 h (Εικ. 2.34).



Εικόνα 2.34. Ενδογενή επίπεδα των διαλυτών πολυαμινών κατά την επίδραση οσμωτικού και ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος σε έντονα τραυματισμένα φύλλα καπνού. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

2.4.4.3. Επίδραση εξωγενών πολυαμινών στην συσσώρευση ΕΜΟ κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών καπνού και από πρωτοπλάστες καπνού

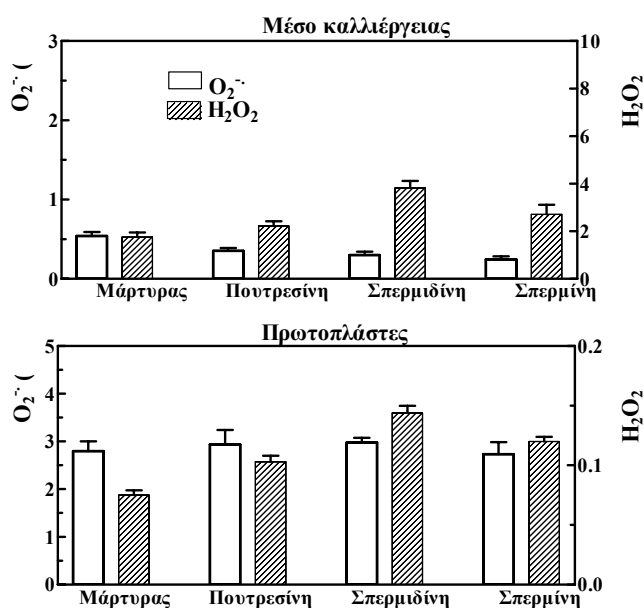
Η προσθήκη εξωγενούς ΠΣ, ΣΔ ή ΣΜ κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών καπνού (στο μέσο επώασης των φύλλων με κυτταρινάση Οποζυκα) προκάλεσε, μετά από 4 h, μείωση στην συσσώρευση του O_2^- κατά 9,5%, 22% και 31% αντίστοιχα, σε συγκέντρωση 0,5 mM, 22%, 35% και 44% σε συγκέντρωση 2 mM, ενώ σε συγκέντρωση 5 mM και οι τρεις οδήγησαν σε 31% μείωση (Εικ. 2.35). Κατά την παράταση του χρόνου επώασης στις 16 h, όλες οι μεταχειρίσεις ήταν στα ίδια επίπεδα με τον μάρτυρα (Εικ. 2.35).



Εικόνα 2.35. Επίδραση εξωγενών πολυαμινών στην συσσώρευση ΕΜΟ από φύλλα καπνού, παρουσία κυτταρινάσης Οποζυκα. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 6 ανεξάρτητα πειράματα.

Η συσσώρευση του H_2O_2 αυξήθηκε κατά 50% και 100% στην μεταχείριση με 2 και 5 mM ΠΣ αντίστοιχα, μετά από 4 h επώαση (Εικ. 2.35). Η ΣΔ αύξησε εντυπωσιακά το επίπεδο του H_2O_2 και μάλιστα κατά τρόπο ανάλογο της συγκέντρωσής της: 23,3%, 274% και 703% αύξηση παρατηρήθηκε αντίστοιχα σε συγκεντρώσεις 0,5, 2 και 5 mM ΣΔ, μετά από 4 h επώαση. Η ΣΜ προκάλεσε επίσης συσσώρευση H_2O_2 , σε ηπιότερα όμως επίπεδα: 157% και 236% αύξηση εντοπίστηκε παρουσία 2 και 5 mM ΣΜ, μετά από 4 h επώαση, ενώ 0,5 mM δεν είχε καμία επίδραση. Μετά από 16 h επώαση, ουδεμία επίδραση διαπιστώθηκε στις παραπάνω μεταχειρίσεις (Εικ. 2.35).

Η επίδραση των πολυαμινών στην συσσώρευση των ΕΜΟ μελετήθηκε και κατά την επίδραση κυτταρινάσης Ονοζουκα σε πρωτοπλάστες καπνού, απομονωμένους με κυτταρινάση Worthington. Η πουτρεσίνη, η σπερμιδίνη και η σπερμίνη προκάλεσαν μείωση στην εξωκυτταρική συσσώρευση του O_2^- κατά 34%, 44% και 55%, αντίστοιχα, μετά από 1 h, ενώ το εξωκυτταρικό επίπεδο του H_2O_2 αυξήθηκε κατά 26%, 57% και 118%, αντίστοιχα (Εικ. 2.36).. Η μεταχείριση με τις πολυαμίνες δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στην ενδοκυτταρική συσσώρευση του O_2^- , το H_2O_2 όμως αυξήθηκε (Εικ. 2.36).



Εικόνα 2.36. Επίδραση εξωγενών πολυαμινών στην συσσώρευση ΕΜΟ από πρωτοπλάστες καπνού, παρουσία κυτταρινάσης Ονοζουκα. Η συγκέντρωση των πολυαμινών ήταν 2 mM. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

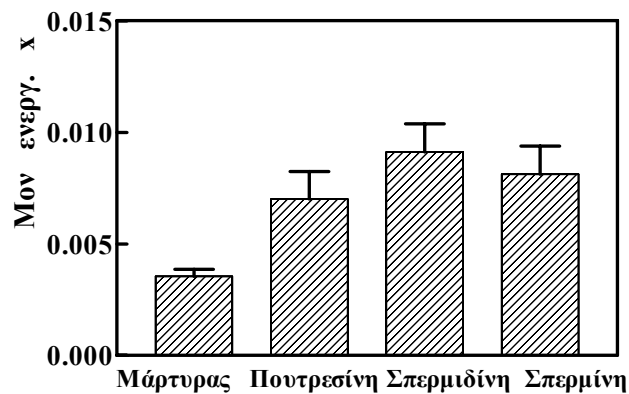
2.4.4.4. Διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των εξωγενών πολυαμινών στην συσσώρευση ΕΜΟ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι πολυαμίνες μείωσαν την επαγόμενη από κυτταρινάση Onozuka, συσσώρευση του O_2^- στα φύλλα καπνού. Η επίδραση του DPI, αναστολέα της NADPH-οξειδάσης, και του KCN, αναστολέα της οξειδάσης-περοξειδάσης, εξετάστηκε ως προς την συσσώρευση O_2^- , χωρίς να διαπιστωθεί επιπλέον μείωση από εκείνη που ανιχνεύτηκε παρουσία πολυαμινών, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η δράση των πολυαμινών στην απόσβεση του O_2^- είναι άμεση και δεν μεσολαβεί αναστολή των παραπάνω ενζύμων της σύνθεσης του O_2^- (Πίν. 2.3).

Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν για την συσσώρευση του H_2O_2 (Πίν. 2.3). Η χρησιμοποίηση του KCN δεν επηρέασε την συγκέντρωση του H_2O_2 , γεγονός που αποκλείει την μεσολάβηση της οξειδάσης-περοξειδάσης στην ενίσχυση της παραγωγής του H_2O_2 από τις πολυαμίνες. Αντίθετα, παρουσία του aminoguanidine (AG), αναστολέα της οξειδάσης των διαμινών (DAO), το επίπεδο του H_2O_2 μειώνεται κατά την μεταχείριση και με τις τρεις πολυαμίνες (Πίν. 2.3). Η ειδική ενεργότητα της DAO παρουσίασε αύξηση κατά την μεταχείριση με τις πολυαμίνες, γεγονός που μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνο για την παραγωγή του H_2O_2 (Εικ. 2.37).

Πίνακας 2.3. Επίδραση αναστολέων στην σχετική συσσώρευση O_2^- και H_2O_2 από φύλλα καπνού, παρουσία κυτταρινάσης Onozuka και εξωγενών πολυαμινών. Η συγκέντρωση των αναστολέων ήταν 25 μ M DPI, 50 μ M KCN και 250 μ M AG και η συγκέντρωση των πολυαμινών ήταν 2 mM. Η τιμή 1 δηλώνει απουσία επίδρασης. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

		Σχετική παραγωγή O_2^-	
		DPI	KCN
σίνη	Πουτρε	1,1±0,1	1,0±0,1
	Σπερμιδ	1,0±0,1	1,1±0,1
	Σπερμίν	1,1±0,1	1,2±0,2
		Σχετική παραγωγή H_2O_2	
		KCN	AG
ίνη	Πουτρε	1,1±0,1	0,6±0,1
	Σπερμιδ	1,2±0,2	0,7±0,1
	Σπερμίν	1,1±0,2	0,7±0,1



Εικόνα 2.37. Ειδική ενεργότητα της DAO κατά την επίδραση 2 mM εξωγενών πολυαμινών σε φύλλα καπνού. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

2.4.4.5. Επίδραση εξωγενών πολυαμινών στην βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα και την συσσώρευση EMO κατά την καλλιέργεια

πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου

Η εξωγενής προσθήκη πολυαμινών κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου σε συγκεντρώσεις 2 και 5 mM οδήγησε σε 100% θνησιμότητα μετά την 2η ΗΚ. Όταν χρησιμοποιήθηκε 0,5 mM ΠΣ ή ΣΜ η βιωσιμότητα και η διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού αυξήθηκε κατά 25% και 9% και 44% και 19,5%, αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα, την

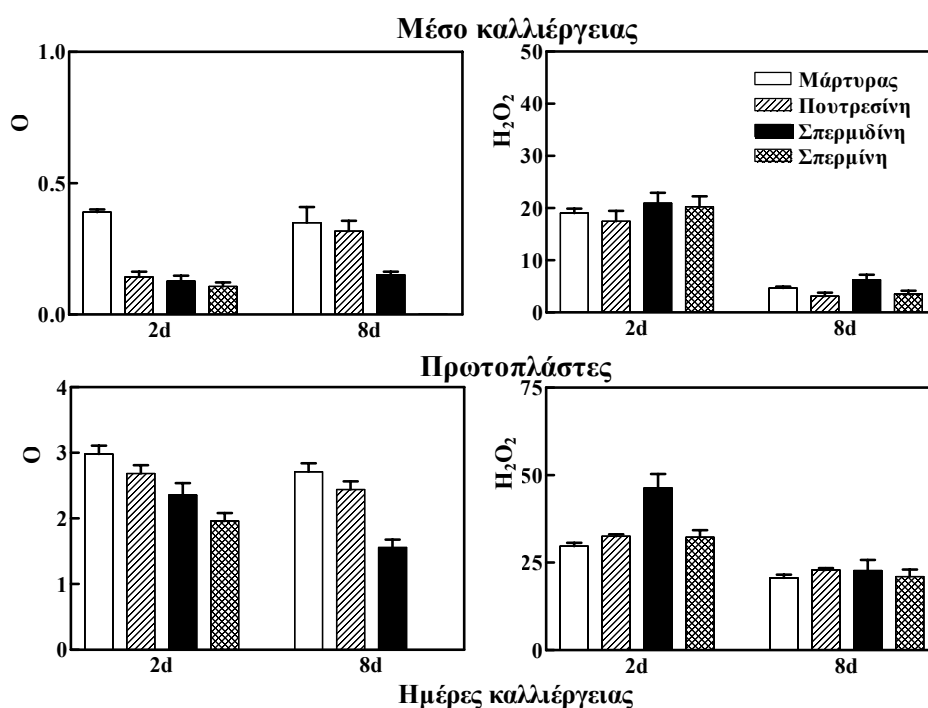
Πίνακας 2.4. Επίδραση εξωγενών πολυαμινών στην βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου. Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν μετά από 16 ώρες με κυτταρινάση Onozuka. Οι πολυαμίνες, σε συγκέντρωση 0,5 mM, προστέθηκαν στους πρωτοπλάστες αμέσως μετά των απομόνωση. Η βιωσιμότητα εκφράζεται ως % του αρχικού αριθμού των πρωτοπλαστών και η διαιρετική ικανότητα εκφράζεται ως % των ζωντανών πρωτοπλαστών που είχαν διαιρεθεί την 8η ημέρα καλλιέργειας. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

	Μεταχείριση			
	Μάρτυρας	Πουτρεσίνη	Σπερμιδίνη	Σπερμίνη
	Βιωσιμότητα (%)			
Κα πνός	41,2 \pm 1,2	51,7 \pm 2,2	35,1 \pm 1,7	59,7 \pm 1,4
Αμ πέλι	28,5 \pm 1,2	32,2 \pm 1,7	20,0 \pm 1,1	29,0 \pm 0,9
Διαιρετική ικανότητα (%)				
Κα πνός	15,6 \pm 0,5	17,6 \pm 0,2	5,1 \pm 0,2	18,5 \pm 0,4
Αμ πέλι	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1

8η ΗΚ, ενώ με 0,5 mM ΣΔ η βιωσιμότητα μειώθηκε κατά 15% και η διαιρετική ικανότητα κατά 64% (Πίν. 2.4). Οι πρωτοπλάστες αμπέλου δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την παρουσία ΠΣ ή ΣΜ, όμως η βιωσιμότητα

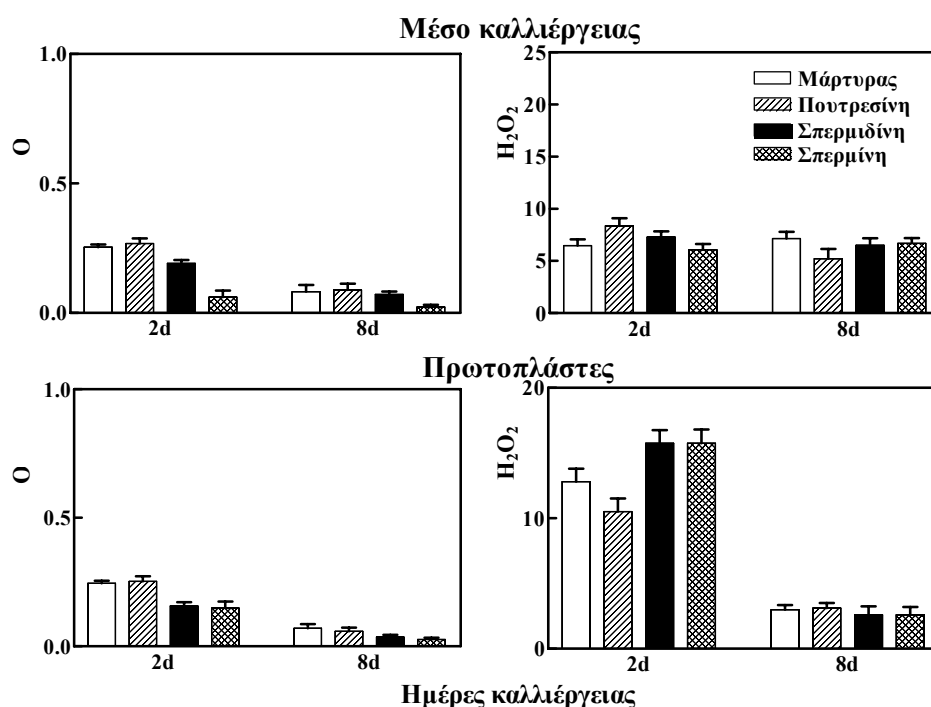
μειώθηκε κατά 28,5% από την ΣΔ (Πίν. 2.4).

Οι εξωγενείς πολυαμίνες επηρέασαν και την συσσώρευση των ΕΜΟ κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών. Η εξωκυτταρική και η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του O_2^- μειώθηκε σημαντικά στους πρωτοπλάστες καπνού με την παρουσία και των τριών πολυαμινών (Εικ. 2.38). Εντονότερη μείωση όμως παρουσιάστηκε παρουσία της ΣΜ, όπου το O_2^- δεν ήταν πλέον ανιχνεύσιμο μετά από 8 ΗΚ (Εικ. 2.38). Το εξωκυτταρικό επίπεδο του H_2O_2 δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τις πολυαμίνες, όμως, η ΣΔ αύξησε σημαντικά το ενδοκυτταρικό επίπεδο του H_2O_2 την 2η ΗΚ (Εικ. 2.38). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου η εξωκυτταρική και η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του O_2^- μειώθηκε μόνο κατά την παρουσία ΣΔ ή ΣΜ, οι οποίες όμως την 2η ΗΚ αύξησαν σημαντικά την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του H_2O_2 (Εικ. 2.39). Την 8η ΗΚ, τα επίπεδα των δύο ΕΜΟ ήταν παρόμοια σε όλες τις μεταχειρίσεις (Εικ. 2.39).



Εικόνα. 2.38. Συσσώρευση ΕΜΟ κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού, παρουσία εξωγενών πολυαμινών. Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν μετά από 16 ώρες με κυτταρινάση Onozuka. Οι πολυαμίνες, σε συγκέντρωση 0,5 mM, προστέθηκαν στους πρωτοπλάστες αμέσως μετά των απομόνωση. Η συγκέντρωση των ΕΜΟ μετρήθηκε εξωκυτταρικά, στο μέσο καλλιέργειας και ενδοκυτταρικά,

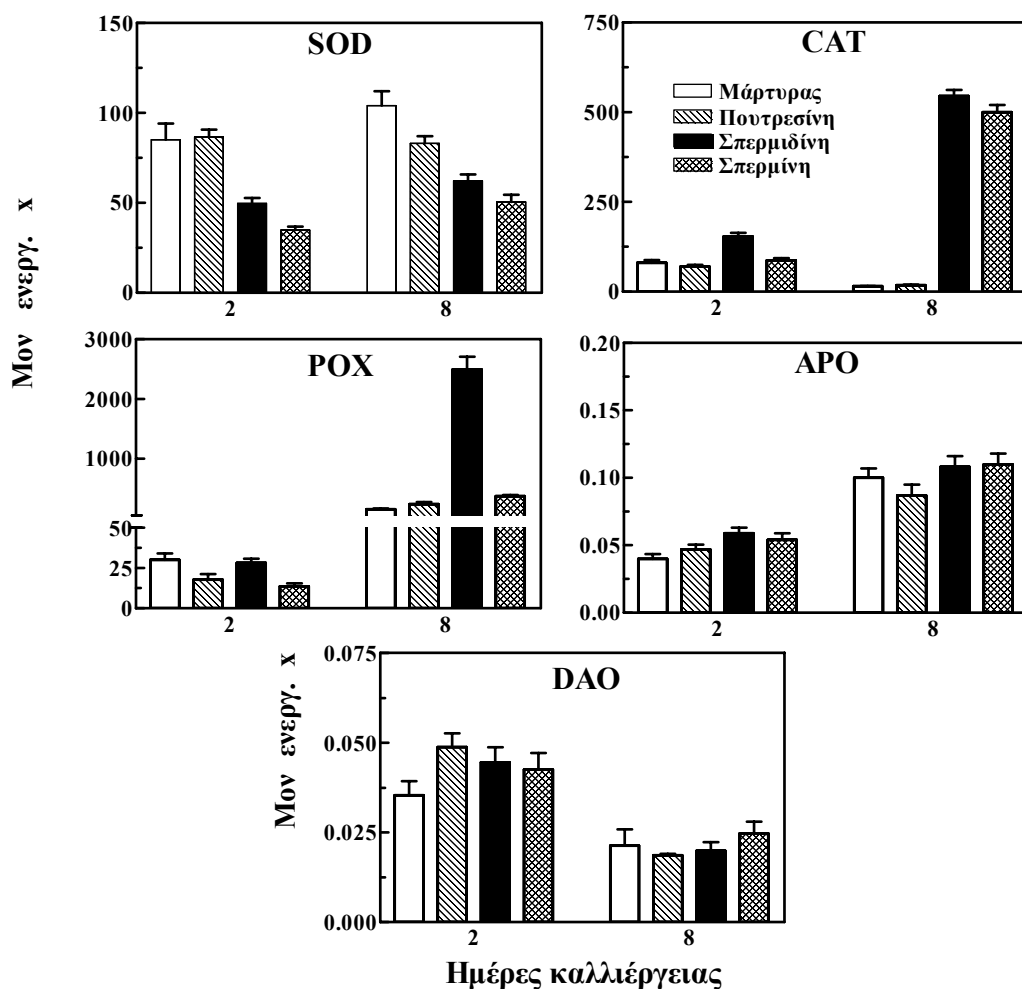
στους πρωτοπλάστες. Οι τιμές αντιστοιχούν στους μέσους όρους \pm SE και αναφέρονται σε 10^5 πρωτοπλάστες.



Εικόνα. 2.39. Συσσωρευση EMO κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών αμπέλου, παρουσία εξωγενών πολυαμινών. Η μεταχείριση περιγράφεται στην Εικ.2.38.

2.4.4.5. Επίδραση εξωγενών πολυαμινών στην ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου

Κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού, η ενεργότητα της SOD διατηρήθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα κατά την μεταχείριση με πολυαμίνες (Εικ. 2.40). Αντίθετα, η ενεργότητα των ενζύμων που αποσβένουν το H_2O_2 αυξήθηκε παρουσία των πολυαμινών. Παρουσία ΣΔ, η ειδική ενεργότητα της καταλάσης (CAT) αυξήθηκε κατά 36-φορές, την 8η ΗΚ και η ενεργότητα της περοξειδάσης (POX) κατά 16-φορές (Εικ. 2.40). Η ενεργότητα των παραπάνω ενζύμων αυξήθηκε στην μεταχείριση με ΣΜ κατά 33- και 1,4-φορές αντίστοιχα, ενώ επηρεάστηκε ελάχιστα από την παρουσία ΠΣ (Εικ. 2.40). Η ενεργότητα της APO



Εικόνα 2.40. Ειδική ενεργότητα της SOD, CAT, POX, APO, GR και DAO κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού, παρουσία εξωγενών πολυαμινών. Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν μετά από 16 ώρες με κυτταρινάση Onozuka. Οι πολυαμίνες, σε συγκέντρωση 0,5 mM, προστέθηκαν στους πρωτοπλάστες αμέσως μετά των απομόνωση. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

δεν μεταβλήθηκε σημαντικά στις παραπάνω μεταχειρίσεις (Εικ. 2.40). Η ενεργότητα της DAO αυξήθηκε την 2η ΗΚ παρουσία πολυαμινών στους πρωτοπλάστες καπνού, όμως την 8η ΗΚ, η ενεργότητα ήταν παρόμοια σε όλες τις επεμβάσεις (Εικ. 2.40).

Στους πρωτοπλάστες αμπέλου δεν εντοπίστηκε ιδιαίτερη διαφοροποίηση στην ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων παρουσία πολυαμινών. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ενεργότητες των ενζύμων παρουσία ΣΔ, την 8η ΗΚ (Πίν. 2.5).

Πίνακας 2.5. Ειδική ενεργότητα της SOD, CAT, POX, APO, GR και DAO κατά την 8η ΗΚ των πρωτοπλαστών αμπέλου, κατά την παρουσία εξωγενούς σπερμιδίνης. Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν μετά από 16 ώρες με κυτταρινάση Onozuka. Η

Ενζύμο	Μονάδες Ενεργότητας x mg πρ ⁻¹	
	Μάρτυρας	Σπερμιδίνη
SOD	54,6±4,2	50,6±5,0
CAT	274,5±22,2	324,5±19,2
POX	7,6±0,4	8,6±0,7
APO	0,031±0,004	0,029±0,005
GR	0,011±0,003	0,013±0,004
DAO	0,007±0,002	0,005±0,001

σπερμιδίνη, σε συγκέντρωση 0,5 mM, προστέθηκε στους πρωτοπλάστες αμέσως μετά των απομόνωση. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ±SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

2.4.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στον ιστό του φύλλου αμπέλου η ολική ΠΣ ήταν 1,8-φορές υψηλότερη σε σχέση με το φύλλο καπνού, ενώ η συγκέντρωση της Δ-ΠΣ ήταν 3,4-φορές υψηλότερη (Εικ.2.31B). Αποτελέσματα του Εργαστηρίου μας που αφορούν την τοπολογική και χρονολογική κατανομή των επιπέδων των πολυαμινών στα φύλλα αμπέλου και καπνού, έδειξαν ότι το επίπεδο της ολικής και της Δ-ΠΣ ήταν αντίστοιχα υψηλότερο κατά 2- και 5-φορές στο φύλλο αμπέλου (Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, αδημοσίευτα αποτελέσματα), όμως τα επίπεδα των πολυαμινών εκφράστηκαν ως nmols x g φρέσκου βάρους και όχι σε nmols x mg πρωτεΐνης⁻¹ όπως στην παρούσα εργασία, οπότε η φαινομενική αντίθεση εξισορροπείται λαμβάνοντας υπόψη ότι το φύλλο καπνού και αμπέλου περιέχουν αντίστοιχα 8±1 και 5±1 mg πρωτεΐνης x g φρέσκου βάρους⁻¹. Η ολική ΣΔ και ΣΜ στο φύλλο δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φυτών, ενώ αντίθετα τα επιμέρους κλάσματα εμφάνισαν διαφοροποιήσεις (Εικ.2.31B). Αμέσως μετά την απομόνωση των πρωτοπλαστών, η ολική ΠΣ αυξήθηκε κατά 80% σε σχέση με το φύλλο στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, κατά 125% στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και στους πρωτοπλάστες αμπέλου παρέμεινε στο επίπεδο του φύλλου. Η αύξηση αυτή στους πρωτοπλάστες καπνού οφειλόταν

στην αύξηση του Δ-κλάσματος, αφού τα κλάσματα της διαλυτής-συνδεμένης (ΔΣ-) και της αδιάλυτης-συνδεμένης (ΑΔ-) ΠΣ μειώθηκαν πιθανό λόγω απομάκρυνσης των κυτταρικών τοιχωμάτων (Εικ.2.31). Η ολική ΣΔ και η ολική ΣΜ αυξήθηκαν κατά 115% και 32% αντίστοιχα στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και στους μη αναγεννώμενους, η ΣΔ αυξήθηκε κατά 48% ενώ η ΣΜ μειώθηκε, αλλαγές που οφειλόταν κυρίως στο ΔΣ- κλάσμα (Εικ.2.31). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου τα επίπεδα της ΣΔ και της ΣΜ μειώθηκαν αμέσως μετά την απομόνωση σε σχέση με το φύλλο, μείωση που χαρακτήρισε και τα τρία κλάσματα των πολυαμινών, με μόνη εξαίρεση την ΑΣ-ΣΜ, η συγκέντρωση της οποίας αυξήθηκε κατά 5,6-φορές (Εικ.2.31). Η χρησιμοποίηση της κυτταρινάσης Onozuka κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών προκάλεσε συσσώρευση ΕΜΟ και στα δύο φυτικά είδη, η οποία ήταν εντονότερη στους πρωτοπλάστες καπνού (Εικ. 2.8), οπότε θεωρείται πιθανό η αύξηση των ενδογενών επιπέδων των πολυαμινών να σχετίζεται με την παραγωγή ΕΜΟ. Υψηλά επίπεδα ΠΑ έχουν συσχετιστεί με απόκριση σε διάφορες καταπονήσεις στα φυτά, όπως με την ανθεκτικότητα στο παρακουάτ (Szigeti *et al.*, 1996) και την UV καταπόνηση (Kramer *et al.*, 1991), ενώ υψηλά ενδογενή επίπεδα ΠΑ και μεγάλη ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων βρέθηκαν στον ανθεκτικό εναντίον της οξειδωτικής καταπόνησης, τύπο του *Conyza canadensis* (Ye *et al.*, 1997). Έχει προταθεί ότι 1 mM ΣΔ προστατεύει το μόριο του DNA από ρήξεις που προκαλούν οι ΕΜΟ (Ha *et al.*, 1998), ενώ η σύνθεση του O_2^- μπορεί να ανασταλεί *in vitro* από ΠΣ, ΣΔ ή ΣΜ (Drolet *et al.*, 1986).

Κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών, οι ολικές (Δ+ΔΣ+ΑΣ) ΠΑ αυξήθηκαν στους πρωτοπλάστες καπνού, αύξηση που οφειλόταν στην αύξηση των ΔΣ-μορφών (Εικ.2.32Α). Η ΠΣ επικράτησε της ΣΔ και της ΣΜ (Εικ.2.33), έτσι ώστε την 8η ΗΚ, στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες, το επίπεδο της ΟΛ-ΠΣ, της ΣΔ και της ΣΜ ήταν 1922, 422 και 402 nmols x mg πρωτεΐνης⁻¹ και στους μη αναγεννώμενους 822, 150 και 223 nmols x mg πρωτεΐνης⁻¹, αντίστοιχα (Εικ.2.32Α). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου, το ολικό επίπεδο των ΠΑ παρουσίασε μικρή τάση αύξησης και τα επιμέρους επίπεδα παρέμειναν

χαμηλά κατά την καλλιέργεια: την 8η ΗΚ, το επίπεδο της ΟΛ-ΠΣ, της ΣΔ και της ΣΜ ήταν 106, 10,2 και 52 nmols x mg πρωτεΐνης⁻¹, αντίστοιχα (Εικ.2.32Α). Το ενδογενές επίπεδο της ΠΣ μπορεί να επηρεάσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, αφού το σύμπλοκο χαλκού-ΠΣ-πυριδίνης που μπορεί να μιμηθεί την ενεργότητα της SOD, μπορεί να μετατρέψει το O₂⁻ πολύ αποτελεσματικά, να ενισχύσει την οξείδωση της γλουταθειόνης και να προστατέψει από τις οξειδωτικές βλάβες από H₂O₂ (Nagele *et al.*, 1994). Η πουτρεσίνη ακόμα μπορεί να συνδέεται με αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η SOD ή να προσδένεται με μικρά αντιοξειδωτικά μόρια, επιτρέποντάς τους έτσι την μετακίνηση στο σημείο οξειδωτικής καταπόνησης (Podulso and Gurrin, 1996). Η απόσβεση των ΕΜΟ ήταν περισσότερο αποτελεσματική στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού από τους άλλους πληθυσμούς πρωτοπλαστών (Υποκεφάλαια 2.2 και 2.3), όπου αντίστοιχα διαπιστώθηκε μεγάλη συσσώρευση ΠΣ (Εικ. 2.31). Η σχέση ΠΣ/ολικές ΠΑ αυξήθηκε έντονα στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού την 2η ΗΚ (Εικ. 2.33), όταν αρχίζουν οι κυτταρικές διαιρέσεις, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι η εξωγενής παροχή ΠΣ προκάλεσε επαγωγή της μιτωτικής ενεργότητας σε λανθάνοντες βολβούς *Helianthus* (Bagni *et al.*, 1982, Serafini-Fracassini, 1991) και σε πρωτοπλάστες αμυγδαλιάς (Wu and Kuniyuki, 1985). Οι αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες παρουσίασαν επίσης το υψηλότερο επίπεδο ΣΔ και ΣΜ (Εικ.2.32), υψηλή βιοσύνθεση οπιοίων έχει διαπιστωθεί κατά την μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου σε φυτά και ζώα (Fuller *et al.*, 1997). Η σχέση ΣΔ+ΣΜ/ΠΣ ήταν 0,55, 0,37 και 0,18 αντίστοιχα, την 8η ΗΚ, στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, και ο λόγος αυτός έχει συσχετιστεί θετικά με την βιοσύνθεση μακρομορίων (Bouchereau *et al.*, 1999), ενώ τα χαμηλά επίπεδα ΣΔ και ΣΜ έχουν συσχετιστεί με τον γηρασμό (Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, αδημοσίευτα αποτελέσματα), καθώς οι ανώτερες πολυαμίνες και το αιθυλένιο, η φυτομόνη γήρανσης, δρουν ανταγωνιστικά στο γηρασμό αφού μοιράζονται ένα κοινό πρόδρομο, την S-adenosylmethionone, για την βιοσύνθεσή τους (Smith, 1985b).

Υψηλή ενεργότητα της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (ADC), βιοσυνθετικού ενζύμου της ΠΣ, έχει διαπιστωθεί σε διάφορες καταστάσεις καταπονήσεων και μάλιστα στην ADC έχει αποδοθεί ρόλος γενικού ενζύμου καταστάσεων καταπόνησης (Flores and Galston, 1982, Flores and Galston, 1984, Primikiriios and Roubelakis-Angelakis, 1999). Η ενεργότητα της ADC ήταν υψηλότερη στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, αμέσως μετά την απομόνωση σε σχέση με τους μη αναγεννώμενους, όμως η υψηλή συγκέντρωση ΠΣ στους τελευταίους (Εικ. 2.31) πιθανόν προκαλεί αναδραστική αναστολή στην ενεργότητα της ADC (Primikiriios, NI, Papadakis, AK and KA Roubelakis-Angelakis, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Κατά την καλλιέργεια η ενεργότητα ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο με τις διακυμάνσεις της ΠΣ. Σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου, η προσθήκη 5 mM ΠΣ προκάλεσε 50% μείωση στην ειδική ενεργότητα της ADC και αύξηση κατά 2-φορές στην ΣΔ και την ΣΜ, ενώ η προσθήκη NH^+ προκάλεσε αύξηση στην ειδική ενεργότητα της ADC και των επιπέδων της Δ-ΠΣ, της ΣΔ και της ΣΜ, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι οι ΠΑ δρουν ως μεταβολικές «ρυθμιστικές ουσίες» και σταθεροποιούν το κυτταρικό pH σε συνθήκες όπου η αφομοίωση των αμμωνιακών προκαλεί περίσσεια πρωτονίων (Altman and Levin, 1993, Primikiriios and Roubelakis-Angelakis, 1999). Στα φυτά η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης κατά την οξειδωτική καταπόνηση, συνοδεύεται από έξοδο πρωτονίων μέσω καναλιών H^+ για την πρωτονίωση του O_2^- (Wojtaszek, 1997), οπότε η συσσώρευση ΠΑ κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών καπνού ίσως μπορεί να συσχετιστεί με την ενεργοποίηση του ενζύμου (Κεφ 1).

Η σχέση Δ/ΔΣ/ΑΣ της ΠΣ ήταν 1/1,12/0,06, 1/0/0,03 και 1/0,08/0,15 αντίστοιχα, την στιγμή της απομόνωσης, στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου. Αντίστοιχα για την ΣΔ οι τιμές ήταν 1/8,8/0,15, 1/4,8/0,21 και 1/3,5/0,9 και για την ΣΜ 1/12,7/0,4, 1/2,7/0,4 και 1/2,7/5,4. Έτσι, στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού το ΔΣ-κλάσμα επικρατούσε και στις τρεις πολυαμίνες, στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, το ίδιο κλάσμα κυριαρχούσε στα επίπεδα της ΣΔ και της ΣΜ, ενώ στην ΠΣ κυρίαρχο

ήταν το Δ-κλάσμα και στους πρωτοπλάστες αμπέλου επικρατούσαν αντίστοιχα, το Δ-, το ΔΣ- και το ΑΣ-κλάσμα στην ΠΣ, την ΣΔ και την ΣΜ (Εικ.2.32). Κατά την καλλιέργεια, το ΔΣ-κλάσμα επικρατούσε στους πρωτοπλάστες καπνού, με αριθμητικά υψηλότερα επίπεδα στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες, όπου για παράδειγμα την 8η ΗΚ, το επίπεδο της ΔΣ-ΠΣ, ΣΔ και ΣΜ ήταν αντίστοιχα 2-, 2,2 και 27,8-φορές υψηλότερο σε σχέση με τους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες (Εικ.2.32). Κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών αμπέλου επικράτησαν η Δ- ΠΣ, η ΑΣ-ΣΔ και η ΑΣ-ΣΜ (Εικ.2.32). Όσο αφορά το συνολικό επίπεδο των πολυαμινών, το ΔΣ-κλάσμα επικρατούσε στους πρωτοπλάστες καπνού, με σημαντικά υψηλότερο επίπεδο στους αναγεννώμενους, ενώ στους πρωτοπλάστες αμπέλου, κυρίαρχο ήταν το ΑΣ- κλάσμα, με μικρή διαφορά από το Δ-, αλλά σχεδόν διπλάσιο από το ΔΣ-κλάσμα (Εικ. 3.33). Έχει αναφερθεί ότι μόνο οι ΔΣ- ΠΑ, και όχι οι Δ- ΠΑ, έχουν *in vitro* ικανότητα απόσβεσης των ΕΜΟ, αντίστοιχη μάλιστα γνωστών αντιοξειδωτικών, όπως το ασκορβικό οξύ (Langebartels *et al.*, 1991). Οι ΔΣ-ΠΑ σταθεροποιούν τις μεμβράνες, συμμετέχουν στην μετακίνηση μορίων και αποτελούν προτιμώμενο υπόστρωμα για τις οξειδάσες των αμινών και για αποπλαστικές περοξειδάσες κατά την απόσβεση του H₂O₂ (Negrel and Lherminier, 1987, Martin-Tanguy, 1997). Έχει αναφερθεί ότι στην άμπελο, η ΠΣ είναι συνδεδεμένη στο κυτταρικό τοίχωμα (Geny *et al.*, 1997, Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, αδημοσίευτα αποτελέσματα), οπότε η επικράτηση των ΑΣ- πολυαμινών στους πρωτοπλάστες αμπέλου μπορεί να οφείλεται στην ΠΣ αυτή, η οποία ήταν και η επικρατέστερη πολυαμίνη κατά την καλλιέργεια (Εικ. 2.33).

Εκτός της οξειδωτικής καταπόνησης, η διαδικασία απομόνωσης επιβάλλει στους πρωτοπλάστες και σε ωσμωτική καταπόνηση. Η επίδραση του ωσμωτικού προκάλεσε αύξηση της Δ-ΠΣ, η οποία ενισχύθηκε ακόμα περισσότερο από το συνδυασμό ωσμωτικής και οξειδωτικής καταπόνησης (Εικ. 2.34). Αντίθετα, τα επίπεδα της Δ-ΣΔ και ΣΜ μειώθηκαν κατά την μεταχείριση, όπως μειώθηκαν και κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών (Εικ. 2.31). Σε κύτταρα μεσοφύλλου βρώμης, ενός δύσκολα αναγεννώμενου

είδους, διαπιστώθηκε γρήγορη και μεγάλη αύξηση της ΠΣ με βαθμιαία μείωση της ΣΔ και της ΣΜ, όταν εκτίθενται στο ωσμωτικό, που χρησιμοποιείται για την απομόνωση των πρωτοπλαστών, απόκριση που παρατηρήθηκε και σε άλλα αγρωστώδη (Flores and Galston, 1984). Η ωσμωτικά επαγόμενη συσσώρευση ΠΣ οφειλόταν στην ενεργοποίηση της ADC ταυτόχρονα με την αναστολή της συνθάσης της σπερμιδίνης, που καταλύει την μετατροπή της ΠΣ σε ΣΔ (Flores and Galston, 1984). Η ειδική ενεργότητα της ADC αυξήθηκε κατά 5-φορές από την ωσμωτική καταπόνηση και ακόμα περισσότερο από το συνδυασμό ωσμωτικής και οξειδωτικής καταπόνησης (Primikiriou, NI, Papadakis, AK and KA Roubelakis-Angelakis, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Προμεταχείριση φύλλων βρώμης με DFMA, αναστολέα της ADC, οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα ΣΔ και ΣΜ μετά από ωσμωτική μεταχείριση (Tiburcio *et al.*, 1986), ενώ αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας και συσσώρευση του μεταγράφου της ADC προκλήθηκε επίσης από ωσμωτική καταπόνηση κομμένων φύλλων βρώμης (Borrell *et al.*, 1996).

Η επαγόμενη από κυτταρινάση Onozuka συσσώρευση του O_2^- μειώθηκε από την παρουσία εξωγενών πολυαμινών στο μέσο επώασης και μάλιστα όσο περισσότερες αμινομάδες υπάρχουν τόσο αποτελεσματικότερη η μείωση (ΣΜ>ΣΔ>ΠΣ) (Εικ. 2.35). Η δράση τους είναι ανεξάρτητη από την ενεργότητα της NADPH-οξειδάσης και/ή της οξειδάσης-περοξειδάσης (Πίν. 2.3). Έχει αναφερθεί ότι η αποτελεσματικότητα των πολυαμινών εξαρτάται από τον αριθμό των αμινομάδων, καθιστώντας την σπερμίνη (4 αμινομάδες) πιο ικανή στην απόσβεση EMO από την τριαμίνη σπερμιδίνη και έτσι για παράδειγμα, η επαγόμενη από τον γηρασμό παραγωγή O_2^- μπορεί να ανασταλθεί από τις δύο ΠΑ, εντονότερα όμως από την ΣΜ (Bors *et al.*, 1989). Η παροδική συσσώρευση H_2O_2 από τις ΠΑ ήταν γεγονός ανεξάρτητο από την δράση της οξειδάσης-περοξειδάσης, μειώθηκε όμως από την προσθήκη του αναστολέα της DAO (Πίν. 2.3), ενώ η ενεργότητα της DAO ήταν αυξημένη παρουσία πολυαμινών στα φύλλα καπνού (Εικ. 2.37), στοιχεία που επιτρέπουν την πιθανότητα παραγωγής του H_2O_2 από την διαδικασία οξειδώσεων των ΠΑ (Di Tomaso *et al.*, 1989). Η DAO είναι ένζυμο που οξειδώνει επιλεκτικά την ΠΣ

παράγοντας H_2O_2 , μπορεί όμως να χρησιμοποιήσει ως υπόστρωμα ανώτερες πολυαμίνες, ενώ η αλληλομετατροπή της ΣΜ σε ΣΔ και της ΣΔ σε ΠΣ, κατά το εναλλακτικό μονοπάτι αντιδράσεων, μέσω ακετυλιώσεων και οξειδώσεων (Tiburcio *et al.*, 1997), προσφέρει πιθανώς το προτιμώμενο υπόστρωμα για τη DAO.

Η προσθήκη εξωγενών ΠΑ σε φυτά τομάτας και καπνού προκάλεσε καταστολή της επαγόμενης από το όζον βλάβης (Ormrod and Beckerson, 1986), ενώ η εξωγενής παροχή ΠΣ, ΣΔ ή ΣΜ σε φυτά καπνού συσχετίστηκε με αποτελεσματική προστασία στο όζον (Langebartels *et al.*, 1991) και η παροχή ΣΔ εμπόδισε την επαγόμενη από UV βλάβη στην *Arabidopsis* (Campos *et al.*, 1991). Η εξωγενής παροχή ΠΣ και ΣΜ κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών καπνού και αμπέλου βελτίωσε την βιωσιμότητα των πρωτοπλαστών, πιθανότατα μειώνοντας την ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική συσσώρευση O_2^- (Πίν. 2.4, Εικ. 2.38, 2.39), ενώ αντίθετα η ΣΔ μείωσε την βιωσιμότητα και στα δύο είδη, διατηρώντας σε υψηλό επίπεδο το ενδοκυτταρικό H_2O_2 (Πίν. 2.4, Εικ. 2.38, 2.39). Στους πρωτοπλάστες καπνού, η ενεργότητα της SOD διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα κατά την καλλιέργεια σε όλες τις μεταχειρίσεις, αφού το O_2^- ήταν σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τον μάρτυρα, όμως η ενεργότητα της καταλάσης και της POX, που καταναλώνουν H_2O_2 ήταν μεγαλύτερη παρουσία ΣΔ (Εικ. 2.40). Στους πρωτοπλάστες αμπέλου δεν διαπιστώθηκε επαγωγή των ενζύμων Πίν 2.5). Τα χαρακτηριστικά πρόσληψης ραδιενεργά σημασμένης ΠΣ και ΣΔ από πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου έδειξαν ότι τα μόρια μεταφέρονται ενεργά μέσω ενός συστήματος που χρησιμοποιεί ενέργεια από την σύνθεση ATP μέσω γλυκόλυσης και φθάνουν σε κορεσμό εντός 3-5 min (Χρηστάκη-Χάμσα, 1995, Διδακτορική διατριβή). Η μελέτη της μεταβολικής τύχης της ραδιενεργά σημασμένης ΠΣ έδειξε ότι μετατρέπεται σε άλλες πολυαμίνες στους πρωτοπλάστες, με μεγαλύτερο ποσοστό μετατροπής στους πρωτοπλάστες αμπέλου, ενώ η ενσωμάτωση διέφερε κυρίως στο ΑΔ-κλάσμα των πολυαμινών, παρουσιάζοντας αύξηση στον καπνό και σταθερή μείωση στην άμπελο (Χρηστάκη-Χάμσα, 1995, Διδακτορική διατριβή).

Συνοπτικά, οι αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού χαρακτηρίστηκαν από υψηλά επίπεδα πολυαμινών και επικράτηση των διαλυτών συζευγμένων μορφών τους κατά την καλλιέργεια, ενώ οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου εμφάνισαν, με αυτή τη σειρά, χαμηλότερη συγκέντρωση πολυαμινών και διαφορετική κατανομή, στοιχεία που πιθανόν επιτρέπουν την σύνδεση της συσσώρευσης πολυαμινών με την ικανότητα απόσβεσης των ΕΜΟ, αφού οι πολυαμίνες μπορούν να συμμετέχουν στην απόσβεση του O_2^- .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ ΑΠΟ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ ΚΑΠΝΟΥ ΠΟΥ ΥΠΟΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΣΚΟΡΒΙΚΗ ΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ

3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρωτοπλάστες από γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού με αντιπληροφοριακό RNA (antisense) για την ασκορβική περοξειδάση (APO) (Orvar and Ellis, 1997) δεν παρουσίασαν διαφορές με τον μάρτυρα, όσον αφορά τη βιωσιμότητα και τη διαιρετική ικανότητα, τα επίπεδα των φυσικών αντιοξειδωτικών ή την ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Το «κατώφλι» της ενεργότητας της APO, ώστε το ένζυμο να επηρεάζει την αντιοξειδωτική μηχανή των πρωτοπλαστών, μελετήθηκε με την χρησιμοποίηση του παρεμποδιστή pCMB, ο οποίος προστέθηκε εξωγενώς στην καλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων πρωτοπλαστών. Παρατηρήθηκε ότι αναστολή της ενεργότητας πάνω από 45% οδήγησε σε κυτταρικό θάνατο (100% θνησιμότητα), ενώ η αναστολή μέχρι το επίπεδο αυτό επιτρέπει φυσιολογική εξέλιξη των πρωτοπλαστών.

3.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Υπάρχουν 4 καλά χαρακτηρισμένες ενζυμικές ισομορφές της ασκορβικής περοξειδάσης (APO) στα φυτικά κύτταρα, μια κυτοπλασμική, μια περοξεισωματική και 2 χλωροπλαστικές, μία στο στρώμα και μία άλλη συνδεδεμένη στις θυλακοειδείς μεμβράνες (Mittler and Zilinskas, 1992, Asada, 1992a, Yamaguchi *et al.*, 1995). Ίσως υπάρχει και μια πέμπτη ισομορφή στα μιτοχόνδρια (Dalton *et al.*, 1993, Jimenez *et al.*, 1997). Οι ισομορφές που βρίσκονται στα οργανίδια αποτοξινώνουν το H₂O₂ που παράγεται εκεί, ενώ η λειτουργία της κυτοπλασμικής ισομορφής είναι μάλλον η απομάκρυνση του H₂O₂ που παράγεται στο κυτόπλασμα ή τον αποπλάστη και εκείνο που διαχέεται από τα οργανίδια (Mittler and Zilinskas, 1992, Asada, 1992a). Έχει διαπιστωθεί επαγόμενη έκφραση της APO σε καταστάσεις καταπόνησεων, όπως κατά τη ξηρασία, την καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας και παρουσία ABA (Mittler and Zilinskas, 1992). Η υπερέκφραση της κυτταρικής APO βελτίωσε την ανθεκτικότητα στο παρακουάτ (Pitcher, 1994) ενώ η καταστολή της έκφρασης της APO δημιούργησε φυτά περισσότερο ευαίσθητα στο όζον (Orvar and Ellis, 1997). Επίσης η υπερέκφραση της APO στο κυτόπλασμα ή

τον χλωροπλάστη προκάλεσε βελτιωμένη ανθεκτικότητα στο παρακουάτ (Allen *et al.*, 1997).

Στο προηγούμενο Κεφάλαιο διαπιστώθηκε ότι αποτελεσματική επαγωγή του αμυντικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού συνδέεται με την έκφραση του ολοδυναμικού των πρωτοπλαστών. Στους αναγεννώμενους και στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού, η ενεργότητα της APO αυξήθηκε κατά 225- και 14-φορές, αντίστοιχα, την 8η ΗΚ, ενώ στους πρωτοπλάστες αμπέλου δεν ανιχνεύτηκε καμία μεταβολή (Εικ. 2.26). Στον καπνό, η χλωροπλαστική ισομορφή της APO παρουσίασε υψηλή ενεργότητα στα φύλλα, ενώ η ενεργότητα της κυτοπλασμικής APO αυξήθηκε σημαντικά στους πρωτοπλάστες κατά την καλλιέργεια (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1999, Εικ. 2.26). Η συσσώρευση του μεταγράφου των κυτοπλασμικών ισοενζύμων της SOD και της APO στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού (Εικ. 2.19, 2.28), σε συνδυασμό με την ενεργότητα των ενζυμικών συστημάτων παραγωγής των EMO, που εδράζουν στην κυτταρική μεμβράνη ή/και τον αποπλάστη (Κεφ. 1), υποστηρίζουν ότι το κυτταρικό διαμέρισμα, που αρχικά καταπονείται από τις EMO κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών, είναι το κυτόπλασμα, και για το λόγο αυτό αυξάνεται η αντιοξειδωτική ικανότητα στην περιοχή αυτή. Η αναγκαιότητα για ενεργότητα της APO στην αναγέννηση των πρωτοπλαστών, τεκμηριώθηκε παραπέρα αφού οι αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού δεν επιβίωσαν παρουσία του αναστολέα της APO, pCMB (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996b).

Στο Κεφάλαιο αυτό έγινε προσπάθεια για επιπλέον επιβεβαίωση της παραπάνω παρατήρησης με την χρησιμοποίηση πρωτοπλαστών από γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού με αντιπληροφοριακό RNA για την APO. Μελετήθηκε η βιωσιμότητα και η διαιρετική ικανότητα, η συσσώρευση EMO, τα επίπεδα των φυσικών αντιοξειδωτικών και η ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων κατά την καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων και μη πρωτοπλαστών καπνού. Επιπλέον, ερευνήθηκε το «κατώφλι» της ενεργότητας της APO ώστε το ένζυμο να επηρεάζει την αντιοξειδωτική μηχανή των πρωτοπλαστών.

3.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Ανάπτυξη φυτών και απομόνωση πρωτοπλαστών

Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Bel-W3), που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή, προσφέρθηκαν ευγενώς από τους (Orvar and Ellis, 1997). Για την δημιουργία των γενετικά τροποποιημένων φυτών, ένα τμήμα 338 βάσεων του γονιδίου του κυτοπλασμικού ισοενζύμου της APO του καπνού, κλωνοποιήθηκε σε δυαδικό φορέα (pBI121), σε αντίθετη κατεύθυνση σε σχέση με τον υποκινητή (antisense orientation) (pAP338). Ακολούθως, τα φυτά μετασχηματίστηκαν με *Agrobacterium* που έφεραν τον φορέα pAP338 ή τον pBI121 (φυτά-μάρτυρες) (Orvar and Ellis, 1997).

Η ανάπτυξη των γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού, που προήλθαν από αυτοεπικονίαση των αρχικών *in vitro* φυτών, έγινε στο θερμοκήπιο, όπως αναφέρθηκε στο Υποκεφάλαιο 1.3.1. Η απομόνωση των πρωτοπλαστών έγινε, όπως αναφέρθηκε στο Υποκεφάλαιο 1.3.2, αφού πρώτα ελέγχθηκαν τα φυτά για την ενεργότητα της APO, και η διάρκεια επώασης των φύλλων με τα ένζυμα απομόνωσης των πρωτοπλαστών ήταν 4h με 1% κυτταρινάση Onozuka και 0,5% μακεροζύμη Onozuka. Ως κατάλληλο ωσμωτικό για τους πρωτοπλάστες προσδιορίστηκε το 0,4 M σακχαρόζης ή γλυκόζης (Πίν. 3.1).

3.2. Μέτρηση του ασκορβικού και της γλουταθειόνης και προσδιορισμός ενζυμικών ενεργοτήτων

Η μέτρηση του ασκορβικού και της γλουταθειόνης έγινε όπως αναφέρθηκε στο Υποκεφάλαιο 2.2.3.3 και 2.2.3.4. Ο προσδιορισμός ενζυμικών ενεργοτήτων έγινε όπως αναφέρθηκε στο Υποκεφάλαιο 2.3.3.3 και 2.3.3.4 και 2.4.3.4.

Πίνακας 3.1. Προσδιορισμός του κατάλληλου ωσμωτικού για τους πρωτοπλάστες μεσοφύλλου καπνού *Nicotiana tabacum* cv. Bel-W3

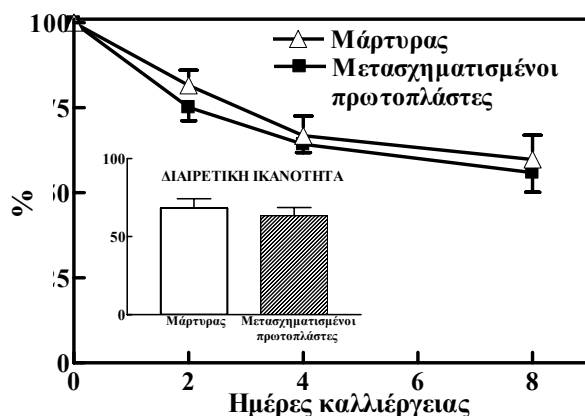
Ωσμωτικό	Μεσόφωση	Τζημα
----------	----------	-------

0,4 M	Ζωντανοί πρωτοπλάστες, Ικανοποιητικός αριθμός	Υπολείμματα κυττάρων, ελάχιστοι πρωτοπλάστες
0,5 M	Ζωντανοί πρωτοπλάστες, πολύ μικρός αριθμός	Υπολείμματα κυττάρων, νεκροί και ζωντανοί πρωτοπλάστες
0,6 M	Νεκροί πρωτοπλάστες, «φαντάσματα» πρωτοπλαστών πολύ μικρός αριθμός	Υπολείμματα κυττάρων, νεκροί πρωτοπλάστες

2.5.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.4.4.1. Χαρακτηριστικά της καλλιέργειας και συσσώρευση των ΕΜΟ κατά την καλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων πρωτοπλαστών καπνού

Το ποσοστό της βιωσιμότητας και της διαιρετικής ικανότητας των πρωτοπλαστών από τα γενετικά τροποποιημένα φυτά και τα φυτά μάρτυρες ήταν στο ίδιο επίπεδο κατά την καλλιέργεια (Εικ. 3.1). Επίσης διαπιστώθηκε παρόμοιο πρότυπο συσσώρευσης των ΕΜΟ κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών (Εικ. 3.2), χωρίς ιδιαίτερες διαφορές από τους πρωτοπλάστες από *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi (Εικ 2.8, αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού).



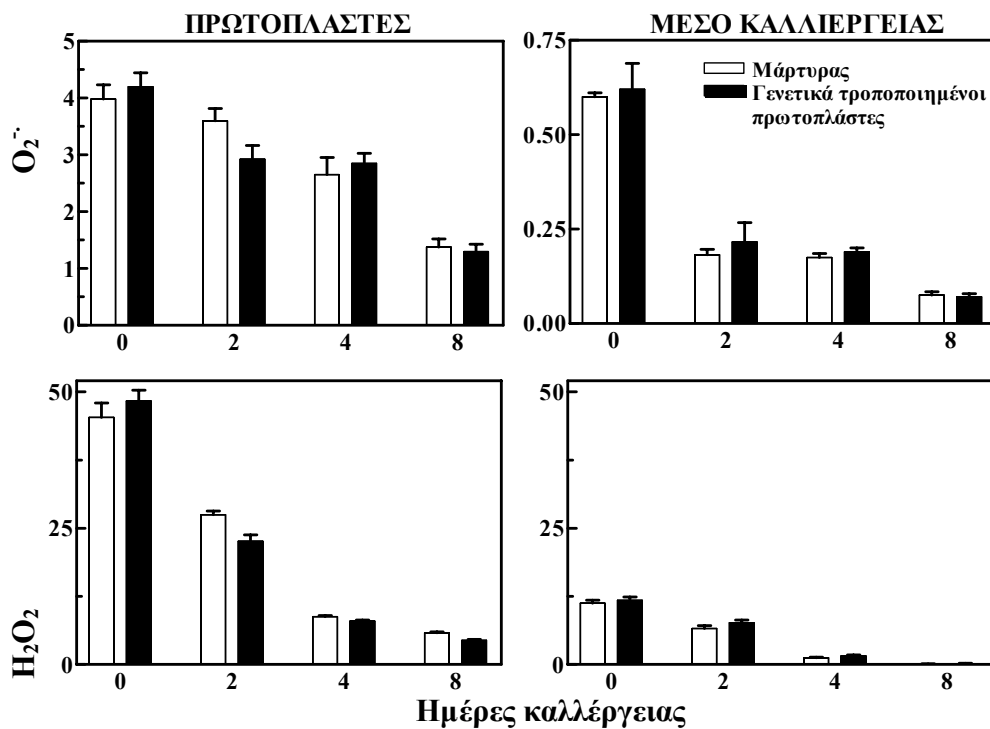
Εικόνα 3.1.

Βιωσιμότητα και διαιρετική ικανότητα των γενετικά τροποποιημένων και μη πρωτοπλαστών καπνού. Η βιωσιμότητα εκφράζεται ως % του αρχικού αριθμού των πρωτοπλαστών και η διαιρετική ικανότητα

εκφράζεται ως % των ζωντανών πρωτοπλαστών που είχαν διαιρεθεί την 8η ημέρα καλλιέργειας. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 5 ανεξάρτητα πειράματα.

3.4.2. Ενδογενής συγκέντρωση και οξειδοαναγωγικό επίπεδο του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης κατά την καλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων και πρωτοπλάστων καπνού

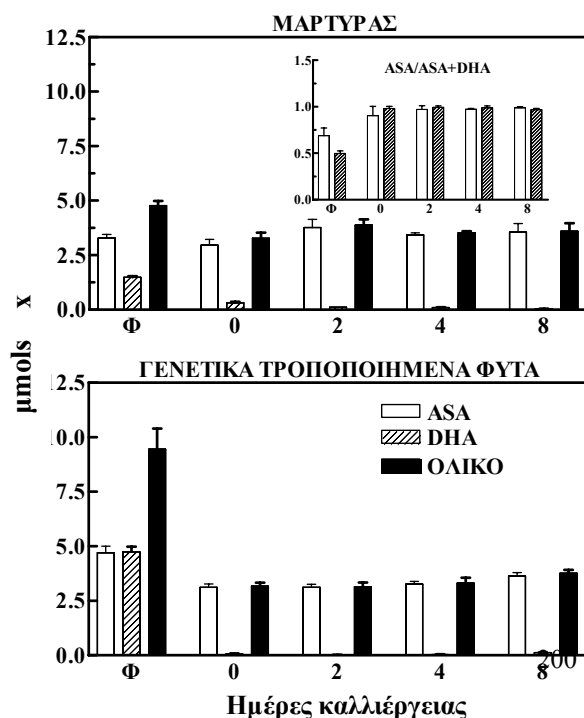
Το ολικό ασκορβικό οξύ ήταν 49% υψηλότερο στα φύλλα των γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού σε σύγκριση με τα φύλλα του μάρτυρα (Εικ. 3.3). Η συγκέντρωση της αναγμένης μορφής (ASA) και της οξειδωμένης μορφής (DHA) του ασκορβικού ήταν στο ίδιο επίπεδο στα γενετικά τροποποιημένα φυτά, ενώ στο μάρτυρα το επίπεδο του ASA ήταν 2,2-φορές υψηλότερο από το επίπεδο του DHA (Εικ. 3.3). Στους πρωτοπλάστες από τα γενετικά τροποποιημένα και μη φυτά, αμέσως μετά την απομόνωση, το επίπεδο του ολικού ασκορβικού ήταν χαμηλότερο κατά 1,5- και 3-φορές αντίστοιχα, σε σύγκριση με το φύλλο, και περιλάμβανε και τις δύο μορφές του ασκορβικού



Εικόνα. 3.2. Συσσώρευση ΕΜΟ κατά την καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων και μη πρωτοπλάστων καπνού. Η συγκέντρωση των ΕΜΟ μετρήθηκε στους πρωτοπλάστες, ενδοκυτταρικά, και στο μέσο καλλιέργειας, εξωκυτταρικά. Οι τιμές αντιστοιχούν στους μέσους όρους \pm SE και αναφέρονται σε 10^5 πρωτοπλάστες

(Εικ. 3.3). Κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλάστων, το επίπεδο του ολικού ασκορβικού διατηρήθηκε σε σταθερό περίπου επίπεδο, ενώ το επίπεδο του ASA αυξήθηκε και του DHA μειώθηκε ανάλογα (Εικ. 3.3). Το επίπεδο οξειδοαναγωγής του ασκορβικού, εκφρασμένο με τον λόγο ASA/ASA+DHA, ήταν υψηλότερο στα φύλλα του μάρτυρα σε σύγκριση με τα φύλλα των γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού (Εικ. 3.3). Στους δύο πληθυσμούς των πρωτοπλάστων καπνού, το επίπεδο οξειδοαναγωγής αυξήθηκε μετά την απομόνωση και διατηρήθηκε στο ίδιο υψηλό επίπεδο κατά την καλλιέργεια (Εικ. 3.3), όπως διαπιστώθηκε και για τους πρωτοπλάστες από *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi (Εικ 2.12, αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού).

Το φύλλο των γενετικά τροποποιημένων φυτών περιείχε 1,8-φορές υψηλότερη συγκέντρωση γλουταθειόνης από το φύλλο του μάρτυρα, όμως και στα δύο, το μεγαλύτερο ποσοστό αντιστοιχούσε στην αναγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH) (Εικ. 3.4). Οι πρωτοπλάστες, που προήλθαν από τα φυτά-



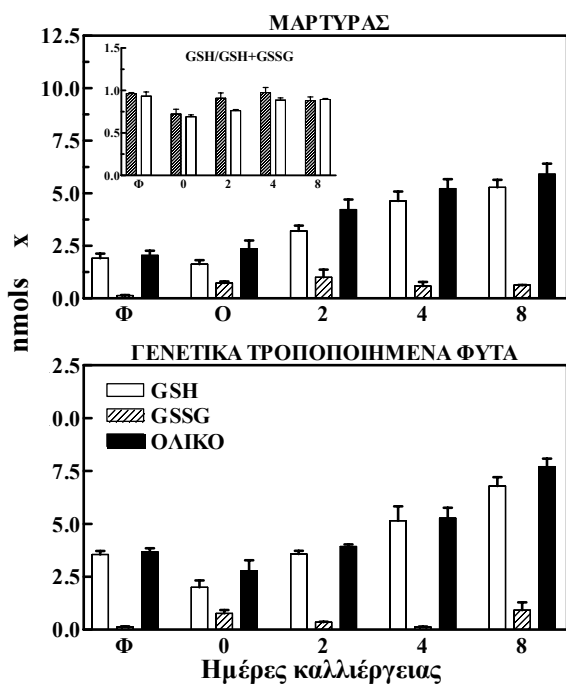
Εικόνα. 3.3. Ενδογενής συγκέντρωση του ολικού ασκορβικού, της αναγμένης (ASA) και της οξειδωμένης (DHA) μορφής του, και οξειδοαναγωγικό επίπεδο του

ασκορβικού (ένθετο) κατά την καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων και μη πρωτοπλάστων καπνού. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

μάρτυρες, την στιγμή της απομόνωσης τους, παρουσίασαν περίπου το ίδιο επίπεδο ολικής γλουταθειόνης, όπως ο ιστός φύλλου, όμως οι πρωτοπλάστες από τα γενετικά τροποποιημένα φυτά είχαν χαμηλότερο επίπεδο (Εικ. 3.4). Η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) ήταν σημαντικά υψηλότερη στους πρωτοπλάστες σε σύγκριση με το φύλλο: η GSSG είχε αυξηθεί κατά 5,9 και 5,2-φορές στους γενετικά τροποποιημένους και μη πρωτοπλάστες (Εικ. 2.13). Κατά την καλλιέργεια, το επίπεδο της GSSG παρουσίασε μικρές διακυμάνσεις, το επίπεδο της ολικής γλουταθειόνης και της GSH αυξήθηκε και το επίπεδο οξειδοαναγωγής της γλουταθειόνης, εκφρασμένο από τον λόγο GSH/GSH+GSSG, αφού μειώθηκε αμέσως μετά την απομόνωση, ακολούθως αυξήθηκε και διατηρήθηκε σε υψηλές τιμές κατά την καλλιέργεια (Εικ. 3.4),), όπως διαπιστώθηκε και για τους πρωτοπλάστες από *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi (Εικ 2.13, αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού).

3.4.3. Ενεργότητα της APO και των αντιοξειδωτικών ενζύμων κατά την καλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων και μη πρωτοπλάστων καπνού

Η ειδική ολική ενεργότητα της APO στο φύλλο των γενετικά τροποποιημένων φυτών ήταν χαμηλότερη κατά 55% από εκείνη στο φύλλο του



Εικόνα. 3.4. Ενδογενές επίπεδο της ολικής γλουταθειόνης, της αναγμένης (GSH) και της οξειδωμένης (GSSG) μορφής της, και οξειδοαναγωγικό επίπεδο της γλουταθειόνης (ένθετο) κατά την καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων και μη πρωτοπλαστών καπνού. Οι

τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

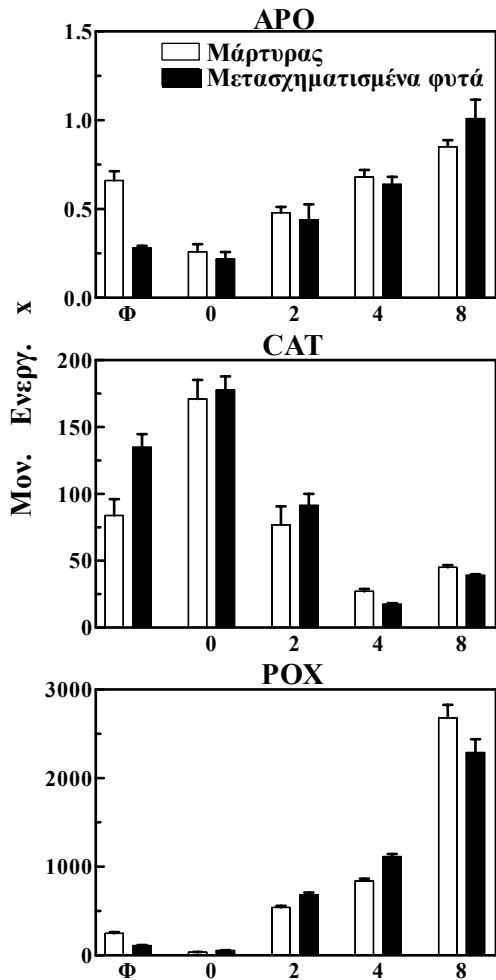
μάρτυρα (Πίν. 3.2, 1 mM ASA). Η σχετική συμμετοχή των ισοενζύμων της APO στην ολική ενεργότητα στο φύλλο μελετήθηκε με την χρησιμοποίηση του ειδικού αναστολέα pCMB: η χλωροπλαστική ισομορφή της APO είναι πλήρως εξαρτώμενη από το ασκορβικό, οπότε η απουσία ασκορβικού στο διάλυμα εκχύλισης δεν επιτρέπει την μέτρησή της (0 mM ASA, Πίν. 3.2), ενώ η ενεργότητα της κυτοπλασμικής APO δίνεται από την διαφορά μεταξύ της ολικής ενεργότητας και της ενεργότητας, που αναστέλλεται από pCMB (1 mM ASA,

Πίνακας 3.2. Ειδική ενεργότητα της APO στο φύλλο γενετικά τροποποιημένων και μη φυτών καπνού. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

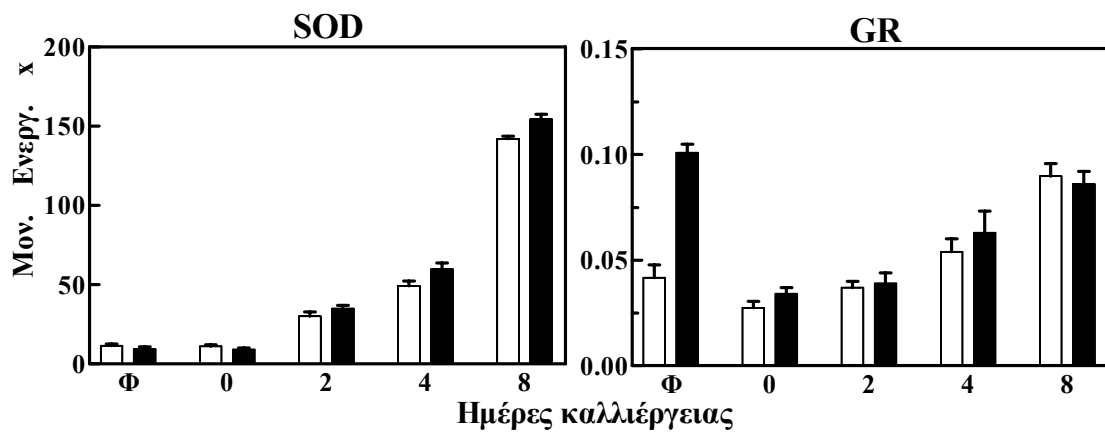
Μεταχείριση	Μονάδες Ενεργότητας · mg πρωτεΐνης ⁻¹	
	Μάρτυρας	Γενετικά τροποποιημένα φυτά
1 mM ASA	0,66±0,07	0,28±0,04
0 mM ASA	0,16±0,02	0,07±0,01
1 mM ASA, 0,5 mM pCMB	0,12±0,01	0,11±0,01
Κυτοπλασμική APO	0,38±0,03	0,10±0,03

0,5 mM pCMB, Πίν. 3.2) και που αντιστοιχεί σε μη καταλυτική οξείδωση του ασκορβικού ή/και μέσω περοξειδασών, και της ενεργότητας, που εξαρτάται από το ασκορβικό, δηλαδή της χλωροπλαστικής. Η συμμετοχή του χλωροπλαστικού ισοενζύμου στην ολική ενεργότητα της APO ήταν 25±2% τόσο στα γενετικά τροποποιημένα φυτά, όσο και στα φυτά μάρτυρες, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η τροποποίηση δεν τροποποίησε το χλωροπλαστικό ισοένζυμο (Πίν. 3.2) (Orvar and Ellis, 1997). Η καθαρή ενεργότητα της κυτοπλασμικής APO ήταν 0,38 και 0,10 μονάδες ενεργότητας x mg πρωτεΐνης⁻¹, αντίστοιχα, στο φύλλο του μάρτυρα και των γενετικά τροποποιημένων φυτών, παρουσιάζοντας χαμηλότερη ενεργότητα κατά 73% στα τροποποιημένα φυτά (Πίν. 3.2).

Στους πρωτοπλάστες, αμέσως μετά την απομόνωση, η ενεργότητα της APO εμφανίστηκε μειωμένη σε σχέση με το φύλλο, όμως κατά την καλλιέργεια αυξήθηκε στους πρωτοπλάστες από τα γενετικά τροποποιημένα φυτά και τα φυτά μάρτυρες, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών (Εικ. 2).



Εικόνα 3.5. Ειδική ενεργότητα της APO, της καταλάσης (CAT) και της περοξειδάσης (POX) κατά την καλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων και μη πρωτοπλαστών καπνού. Οι τιμές εκφράζονται ως μονάδες ενεργότητας $\times \text{mg πρωτεΐνης}^{-1} \pm \text{SE}$.



Εικόνα 3.6. Ειδική ενεργότητα της GR και της SOD κατά την καλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων και μη πρωτοπλαστών καπνού. Οι τιμές εκφράζονται ως μονάδες ενεργότητας $\times \text{mg πρωτεΐνης}^{-1} \pm \text{SE}$.

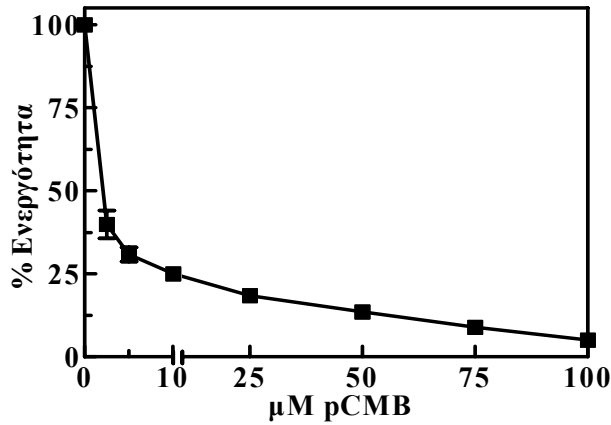
35). Η ενεργότητα της καταλάσης (CAT) ήταν 1,6-φορές υψηλότερη στο φύλλο των γενετικά τροποποιημένων φυτών, αυξήθηκε κατά την απομόνωση και ακολούθως μειώθηκε για να αυξηθεί ξανά την 8η ΗΚ και στους δύο πληθυσμούς πρωτοπλαστών (Εικ. 3.5). Η ενεργότητα της ολικής περοξειδάσης (POX) ήταν 2,2-φορές υψηλότερη στο φύλλο του μάρτυρα, μειώθηκε αμέσως μετά την απομόνωση και ακολούθησε αυξητική τάση κατά την καλλιέργεια στους πρωτοπλάστες των δύο πληθυσμών (Εικ. 3.5).

Η ενεργότητα της SOD ήταν στο ίδιο επίπεδο στο φύλλο των γενετικά τροποποιημένων και μη φυτών, ενώ το επίπεδο της GR ήταν 2,4-φορές υψηλότερο στα γενετικά τροποποιημένα φυτά (Εικ. 3.6). Η ενεργότητα της GR και της SOD αυξήθηκε κατά την καλλιέργεια και δεν παρουσίασε διαφοροποίηση στους μετασχηματισμένους και μη πρωτοπλάστες (Εικ. 3.6). Οι πρωτοπλάστες από τα γενετικά τροποποιημένα και μη φυτά παρουσίασαν την ίδια τάση αλλά χαμηλότερα επίπεδα όσον αφορά την ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων σε σύγκριση με τους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες από *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi (Κεφ 2.3).

3.4.4. Επίδραση της μείωσης της ενεργότητας της APO με την χρησιμοποίηση του pCMB στην συμπεριφορά των πρωτοπλαστών

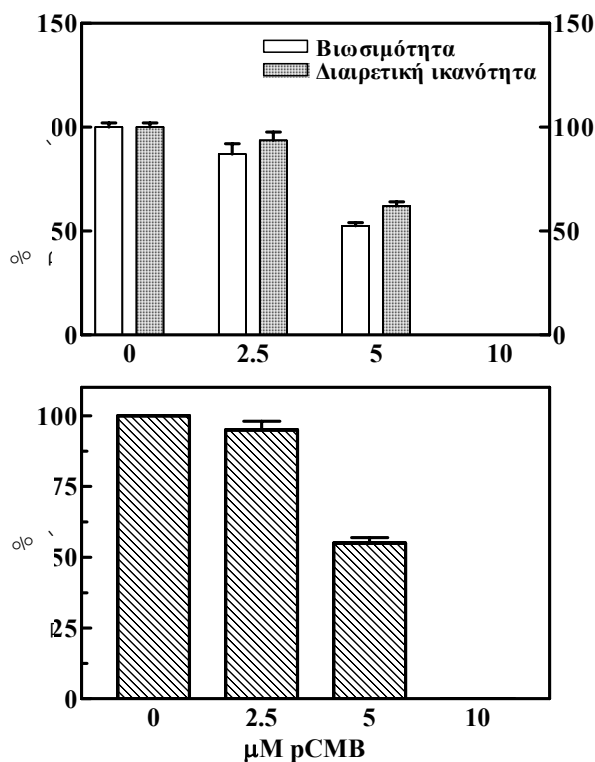
Το «κατώφλι» της ενεργότητας της APO, ώστε το ένζυμο να επηρεάζει την συμπεριφορά των πρωτοπλαστών σε καλλιέργεια, μελετήθηκε με την χρησιμοποίηση του παρεμποδιστή pCMB. Σε *in vitro* πειράματα με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από φύλλο γενετικά τροποποιημένων ή μη φυτών, 2,5, 5 και 10 μM pCMB προκάλεσαν αντίστοιχα 60%, 70% και 75% αναστολή της ενεργότητας της APO (Εικ. 3.7). Όταν όμως προστέθηκαν σε καλλιέργεια γενετικά

τροποποιημένων πρωτοπλαστών, παρατηρήθηκε αναστολή της ενεργότητας κατά 5%, 45% και 100%, αντίστοιχα, ενώ οι πρωτοπλάστες παρουσίασαν μειωμένη βιωσιμότητα και διαιρετική ικανότητα. Την 8η ΗΚ, η θνησιμότητα ήταν υψηλότερη κατά 10%, 50% και 100% και η διαιρετική ικανότητα ήταν μειωμένη κατά 5%, 40% και 100% σε σχέση με τον μάρτυρα, σε 2,5, 5 και 10 μM pCMB, αντίστοιχα (Εικ. 3.8).



SE από 3 ανεξάρτητα πειράματα

Εικόνα 3.7. *In vitro* επίδραση της συγκέντρωσης του pCMB στην ενεργότητα της ΑΡΟ από φύλλο γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού. Οι τιμές εκφράζονται % της ενεργότητας χωρίς pCMB, \pm



Εικόνα 3.8. Επίδραση της συγκέντρωσης του pCMB στην βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα, και στην ενεργότητα της ΑΡΟ, κατά την 8η ΗΚ των πρωτοπλαστών, από τα γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού. Οι τιμές εκφράζονται % του μάρτυρα (0 μM pCMB) \pm SE από 3

ανεξάρτητα πειράματα.

3.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ενεργότητα της APO είναι εξαιρετικά σημαντική για τον φυσιολογικό μεταβολισμό του κυττάρου, αφού η καταλάση έχει υψηλό K_m για το H_2O_2 και μάλλον δεν είναι παρούσα στο κυτόπλασμα ή τους χλωροπλάστες (Foyer *et al.*, 1994). Η ενεργότητα της APO αυξήθηκε έντονα κατά την καλλιέργεια των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού (Εικ. 2.26), ενώ στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα (Εικ. 2.26). Η σημασία της APO ως απαραίτητου στοιχείου του αμυντικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού, αλλά και του φυσιολογικού μεταβολισμού των πρωτοπλαστών, μελετήθηκε επιπλέον με την χρησιμοποίηση γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού με αντιπληροφοριακό (antisense) RNA για την APO (Orvar and Ellis, 1997).

Η ενεργότητα της APO ήταν κατά 55% χαμηλότερη και η ενεργότητα της καταλάσης ήταν κατά 60% υψηλότερη στο φύλλο των γενετικά τροποποιημένων φυτών σε σύγκριση με τον μάρτυρα στο φύλλο των γενετικά τροποποιημένων φυτών (Πίν. 3.2, Εικ. 3.5). Η συγκέντρωση του ολικού ασκορβικού και της γλουταθειόνης ήταν υψηλότερη κατά 98% και 85% αντίστοιχα στο φύλλο των γενετικά τροποποιημένων φυτών (Εικ. 3.3, 3.4). Το ασκορβικό και η γλουταθειόνη μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά αντιδρώντας άμεσα με ελεύθερες ρίζες και αυξημένη βιοσύνθεση τους έχει σχετιστεί με καταστάσεις καταπονήσεων (Smirnoff and Pallanca, 1996, Noctor and Foyer, 1998a). Η υψηλή συγκέντρωση της καταλάσης και των αντιοξειδωτικών, που παρατηρήθηκε στο φύλλο των γενετικά τροποποιημένων φυτών, ίσως «αντικαθιστά» την χαμηλή ενεργότητα της APO στην αντιοξειδωτική μηχανή του φύλλου. Επιπλέον, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού ήταν χαμηλότερο στα γενετικά τροποποιημένα φύλλα (Εικ.

3.3) και η συμμετοχή της οξειδωσης του ασκορβικού από άλλες πηγές, εκτός της APO, ήταν 40% και 18%, αντίστοιχα στα γενετικά τροποποιημένα και μη φύλλα (Πίν. 3.2), υποδεικνύοντας ότι κατά την απουσία της APO, η εξαρτώμενη από ασκορβικό απόσβεση των EMO γίνεται από άλλα μονοπάτια, όπως μέσω περοξειδάσης ή/και άμεσα. Όταν αναστάλθηκε η ενεργότητα της APO σε πρωτοπλάστες καπνού, η ολική ενεργότητα οξειδωσης του ασκορβικού μέσω περοξειδασών αυξήθηκε (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1999). Η ενεργότητα της GR ήταν 2,4-φορές υψηλότερη στα γενετικά τροποποιημένα φύλλα και το επίπεδο οξειδοαναγωγής της γλουταθειόνης ήταν υψηλό (Εικ. 3.6). Τα παραπάνω στοιχεία υποστηρίζουν την ικανότητα προσαρμογής των γενετικά τροποποιημένων φυτών στην χαμηλότερη ενεργότητα της APO.

Το ποσοστό της βιωσιμότητας και της διαιρετικής ικανότητας των πρωτοπλαστών από τα γενετικά τροποποιημένα φυτά και τα φυτά μάρτυρες ήταν στο ίδιο επίπεδο κατά την καλλιέργεια (Εικ. 3.1) και το πρότυπο και τα επίπεδα των EMO ήταν παρόμοια κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών (Εικ. 3.2). Επιπλέον, κατά την καλλιέργεια, η ενεργότητα της APO, της καταλάσης, της περοξειδάσης, της SOD και της GR δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών (Εικ. 3.5, 3.6) και το επίπεδο οξειδοαναγωγής του ασκορβικού και της γλουταθειόνης ήταν στο ίδιο επίπεδο (Εικ. 3.3, 3.5). Τα ίδια φυτά όταν εκτέθηκαν στο όζον, παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία από τον μάρτυρα (Orvar and Ellis, 1997). Φαίνεται όμως ότι το επιτρεπτό από την τροποποίηση επίπεδο έκφρασης της APO ήταν αρκετό, ώστε να μην επηρεάσει την συμπεριφορά των πρωτοπλαστών σε καλλιέργεια ή/και ενδεχομένως, η σιώπιση (silencing) της APO τροποποιήθηκε κατά την αποδιαφοροποίηση των πρωτοπλαστών ή/και ακόμα, η antisense καταστολή δεν μπορούσε να εκφραστεί λόγω απουσίας ισομοριακών ποσοτήτων του ενδογενούς και του antisense μεταγράφου της APO. Όταν η ενεργότητα της APO παρεμποδίστηκε με την χρησιμοποίηση του pCMB, παρατηρήθηκε ότι η αναστολή της ενεργότητας κατά 45% επέτρεψε την βιωσιμότητα των πρωτοπλαστών, ενώ πάνω από το επίπεδο αυτό οδήγησε σε

κυτταρικό θάνατο (Εικ. 3.8), επιβεβαιώνοντας την σημασία της APO για τον φυσιολογικό μεταβολισμό των κυττάρων.

Η ενεργότητα της APO είναι επίσης εξαιρετικά σημαντική για την αντιμετώπιση καταστάσεων οξειδωτικής καταπόνησης. Η συσσώρευση του μεταγράφου του κυτοπλασμικού ισοενζύμου της APO (Εικ. 2.28) αυξήθηκε έντονα κατά την καλλιέργεια των αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού και συγχρόνως, το επίπεδο του ενδοκυτταρικού H_2O_2 μειώθηκε (Εικ. 2.8). Η υπερέκφραση της APO στο κυτόπλασμα ή τον χλωροπλάστη προκάλεσε βελτιωμένη ανθεκτικότητα στο παρακουάτ (Allen *et al.*, 1997). Ακόμα, γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού, που υπερέκφραζαν την κυτοπλασμική CuZnSOD στον χλωροπλάστη, εμφάνισαν αύξηση της ενεργότητας της κυτοπλασμικής APO και συσσώρευση του μεταγράφου της (Sen Gupta *et al.*, 1993b), ενώ η χλωροπλαστική APO είχε μεγαλύτερη ενεργότητα σε γενετικά τροποποιημένα φυτά που υπερέκφραζαν την χλωροπλαστική FeSOD (Van Camp *et al.*, 1996). Υπερέκφραση της κυτοπλασμικής APO στους χλωροπλάστες καπνού δεν παρείχε προστασία στο όζον, πιθανώς γιατί το κυτοπλασμικό ένζυμο δεν είναι λειτουργικό στον χλωροπλάστη (Torsethaugen *et al.*, 1997), ενώ η έκφραση της περοξεισωματικής APO από *Arabidopsis* στον καπνό, παρείχε προστασία κατά τη μεταχείριση με aminotriazole, το οποίο αναστέλλει την ενεργότητα της καταλάσης, δεν παρείχε όμως προστασία στο παρακουάτ, το οποίο παράγει EMO στο χλωροπλάστη (Wang *et al.*, 1999). Τα στοιχεία αυτά δηλώνουν την ειδίκευση των ισοένζυμων της APO και της γονιδιακής της ρύθμισης ανάλογα με την καταπόνηση, αλλά και την σημασία του ενζύμου αυτού για την προστασία στις καταπονήσεις.

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει με σκοπό να βελτιώσουν ή να μελετήσουν την ανθεκτικότητα στις καταπονήσεις αυξάνοντας ή μειώνοντας αντίστοιχα τα *in vivo* επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων μέσω γενετικού μετασχηματισμού (Foyer *et al.*, 1994). Αποτελέσματα, που προκύπτουν από την υπερέκφραση της SOD είναι κάπως διφορούμενα: γενετικά τροποποιημένα φυτά με 30-50 φορές μεγαλύτερη ενεργότητα της SOD από το μάρτυρα, δεν εμφάνισαν καλύτερη ανθεκτικότητα στο paraquat (Tepperman and Dunsmuir,

1990) ή στο όζον (Pitcher and Zilinskas, 1996). Αντίθετα, γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού με υπερέκφραση του γονιδίου SOD από *Nicotiana plumbaginifolia* έδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο παρακουάτ και το όζον (Bowler *et al.*, 1991, Perl *et al.*, 1993, Van Camp *et al.*, 1994) και η υπερέκφραση της χλωροπλαστικής CuZnSOD σε φυτά καπνού μείωσε την ευαισθησία στην φωτοαναστολή (Bowler *et al.*, 1991, Perl *et al.*, 1993, Sen Gupta *et al.*, 1993a, Sen Gupta *et al.*, 1993b, Van Camp *et al.*, 1994). Η SOD μετατρέπει το O_2^- σε H_2O_2 , ρίζες που είναι πολύ τοξικές για τα φυτά, οπότε η αύξηση της ενεργότητας της SOD ίσως δεν καθιστά τα φυτά ικανά να καταπολεμήσουν την οξειδωτική καταπόνηση. Απαιτείται μάλλον αύξηση στην ικανότητα αποτοξίνωσης του H_2O_2 , συγχρόνως με την αύξηση της SOD, ώστε να απομακρύνεται η αυξημένη παραγωγή H_2O_2 από τη μεγαλύτερη ενεργότητα της SOD (Foyer *et al.*, 1994). Η υπερέκφραση της κυτταρικής APO βελτίωσε την ανθεκτικότητα στο παρακουάτ (Pitcher and Zilinskas, 1996), υποστηρίζοντας την υπόθεση των Sen Gupta *et al.* (1993b), όπου η μεγαλύτερη ενεργότητα της APO ήταν σημαντική για τον καθορισμό της ανθεκτικότητας στην καταπόνηση. Η συμπληρωματική ενεργότητα της APO σε συνθήκες καταπονήσεων μπορεί, με την σειρά της, να συνεπάγεται αυξημένη οξείδωση του ασκορβικού, οπότε η αποτελεσματική ανθεκτικότητα απαιτεί αυξημένη ικανότητα αναγέννησης του ασκορβικού. Το τελευταίο επιτυγχάνεται μέσω μιας διαδικασίας η οποία εξαρτάται μερικώς από τη γλουταθειόνη (Foyer and Halliwell, 1976). Έτσι, σε τελική ανάλυση, η σταθερή και αποτελεσματική βελτίωση της φυτικής άμυνας εξαρτάται από τον συντονισμένο χειρισμό των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Foyer *et al.*, 1995).

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ
ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**

Προηγούμενα αποτελέσματα του Εργαστηρίου έδειξαν ότι η οξειδωτική καταπόνηση σχετίζεται με την μείωση του αναγεννητικού δυναμικού των πρωτοπλαστών. Στην εργασία αυτή εξετάστηκαν η πιθανή συσχέτιση της συσσώρευσης ενεργών μορφών οξυγόνου (EMO) με την ενδογενή ικανότητα των πρωτοπλαστών να αντιδρούν επάγοντας τους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας, που διαθέτουν και οι οποίοι περιλαμβάνουν ενζυμικά συστήματα και φυσικούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Μελετήθηκε η άμπελος, που είναι ένα μη αναγεννώμενο από πρωτοπλάστες, φυτικό είδος και η συμπεριφορά του συγκρίθηκε με τον εύκολα αναγεννώμενο καπνό (*Nicotiana tabacum*). Η εργασία περιέλαβε τον προσδιορισμό των παραγόντων, που οδηγούν σε οξειδωτική καταπόνηση κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών, τον ποσοτικό προσδιορισμό των EMO, την τοπολογία παραγωγής και την ταυτοποίηση των συστημάτων παραγωγής, την μελέτη της επίδρασης των EMO στην συμπεριφορά των πρωτοπλαστών κατά την καλλιέργεια, όσον αφορά τα ενδογενή επίπεδα των φυσικών αντιοξειδωτικών, του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων, της SOD και των ενζύμων του κύκλου Halliwell-Asada: APO, MDHAR, DHAR και GR και τα επίπεδα και την κατανομή των ενδογενών πολυαμινών. Τα βασικότερα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα ακόλουθα:

i) Η χρησιμοποίηση κυτταρινάσης Onozuka, που περιέχει ενζυμικές προσμίξεις ικανές να επάγουν την παραγωγή EMO, προκάλεσε ραγδαία συσσώρευση του O_2^- και του H_2O_2 στο μέσο επώασης των φύλλων καπνού, ενώ η αντίστοιχη παραγωγή ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην άμπελο. Ο τραυματισμός των φύλλων ή η χρησιμοποίηση καθαρής κυτταρινάσης Worthington δεν οδήγησε σε επαγωγή των EMO. Στους πρωτοπλάστες καπνού και σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες, ανιχνεύτηκαν δυο διαφορετικές ενεργότητες σύνθεσης EMO: μία, που παρουσίασε εξειδίκευση στο NADPH και ευαισθησία στο DPI, ήταν υπεύθυνη για την παραγωγή του O_2^- και αντιστοιχεί μάλλον σε ένα ένζυμο παρόμοιο με την NADPH οξειδάση των θηλαστικών, και μία δεύτερη NAD(P)H οξειδάση-

- περοξειδάση, ευαίσθητη στο KCN και το NaN₃, που συμβάλλει στην παραγωγή και των δύο EMO. Στην άμπελο, μόνο το δεύτερο ενζυμικό σύστημα ανιχνεύτηκε.
- ii) Οι πρωτοπλάστες, που απομονώθηκαν με κυτταρινάση Onozuka, παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα EMO κυρίως σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, και χαμηλότερη βιωσιμότητα και διαιρετική ικανότητα πρωτοπλαστών, σε σχέση με εκείνους που προέκυψαν από κυτταρινάση Worthington.
 - iii) Οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού και εντονότερα οι πρωτοπλάστες αμπέλου χαρακτηρίστηκαν από χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ασκορβικού και της γλουταθειόνης, με τις οξειδωμένες μορφές να κυριαρχούν κατά την καλλιέργεια.
 - iv) Η ενεργότητα των ενζύμων, που αποσβένουν τις EMO, της SOD, της APO της MDHAR, της DHAR, της GR και της GS-PER ήταν σημαντικά υψηλότερη στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού σε σχέση με τους μη αναγεννώμενους και με τους πρωτοπλάστες αμπέλου, όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών. Η αύξηση στην ενεργότητα της SOD και της APO στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού οφειλόταν στην επαγωγή του κυτοπλασμικού ισοενζύμου.
 - v) Οι αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού παρουσίασαν σταδιακή αύξηση των πολυαμινών κατά την καλλιέργεια και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, με επικράτηση των διαλυτών συζευγμένων πολυαμινών, ενώ οι μη αναγεννώμενοι πρωτοπλάστες καπνού και αμπέλου, με αυτή τη σειρά, παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα.
 - vi) Πρωτοπλάστες από γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού με αντιπληροφοριακό RNA για την APO δεν παρουσίασαν διαφορές με τον μάρτυρα, όσον αφορά τη βιωσιμότητα και τη διαιρετική ικανότητα, τα επίπεδα των φυσικών αντιοξειδωτικών ή την ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Όμως, η αναστολή της ενεργότητας, με την χρησιμοποίηση του παρεμποδιστή της, pCMB, πάνω από 45% οδήγησε σε κυτταρικό θάνατο των πρωτοπλαστών.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι κατάρρευση του κυτταρικού αμυντικού μηχανισμού κατά της οξειδωτικής καταπόνησης, η οποία επάγεται κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών με τα ένζυμα αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, μπορεί να σχετιστεί με την καταστολή της έκφρασης του ολοδυναμικού, που παρατηρείται στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες του καπνού και ιδιαίτερα, της αμπέλου.

Προτείνεται:

- i)** Η μελέτη του συστήματος παραγωγής ΕΜΟ στα δύο φυτικά είδη όσον αφορά την τοπολογία και το επίπεδο σηματοδότησης και γονιδιακού προϊόντος, ώστε να υπάρξει η δυνατότητα ελέγχου της παραγωγής.
- ii)** Η μελέτη της ADC, βιοσυνθετικού ενζύμου και άλλων βιοσυνθετικών μηχανισμών των πολυαμινών κατά την απομόνωση και την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών αμπέλου, ώστε να αποκαλυφθεί ο φυσιολογικός ρόλος των πολυαμινών κατά την καταπόνηση.
- iii)** Η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών αμπελιού, σε μια ισορροπημένη έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, ώστε να είναι δυνατή η απόσβεση των ΕΜΟ και η επαναφορά της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μετά την απομόνωση και κατά την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akerboom T, Sies H** (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* **77**: 373-382
- Allan AC, Fluhr R** (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* **9**: 1559-1572
- Allen RD, Webb RP, Sheryl AS** (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Rad Biol Med* **23**: 473-479
- Alscher RG** (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol Plant* **77**: 457-464
- Alscher RG, Donahue J, Cramer CL** (1997) Reactive oxygen species and antioxidant: relationships in green cells. *Physiol Plant* **100**: 224-233
- Altman A, Levin N** (1993) Interactions of polyamines and nitrogen nutrition in plants. *Physiol Plant* **89**: 653-658
- Amako K, Chen G-X, Asada K** (1994) Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isoenzymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol* **35**: 497-504
- Anderson JV, Hess JL, Chevone B** (1990) Purification, characterization and immunological properties for two isoforms of glutathione reductase from eastern white pine. *Plant Physiol* **94**: 1402-1409
- Anderson JW, Foyer CH, Walker DA** (1983) Light-dependant reduction of dehydroascorbate and uptake of exogenous ascorbate by spinach protoplasts. *Planta* **158**: 442-450
- Angelini R, Federico R** (1989) Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *J Plant Physiol* **135**: 212-217
- Angelini R, Manes F, Federico R** (1990) Spatial and functional correlation between diamine oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta* **182**: 89-96
- Aono M, Kubo A, Saji H, Tanaka K, Kondo N** (1993) Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high

- chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant Cell Physiol* **34**: 129-135
- Aono M, Saji H, Fujiyama K, Sugita M, Kondo N, Tanaka K** (1995) Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol* **107**: 645-48
- Arrigoni O** (1994) Ascorbate system in plant development. *J Bioenerg Biomembr* **26**: 407-419
- Asada K** (1984) Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol* **105**: 422-429
- Asada K** (1992a) Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* **85**: 235-241
- Asada K** (1994) Production and action of oxygen species in photosynthetic tissues. *In* CH Foyer, PM Mullineaux, eds, Causes of photo-oxidative stress and amelioration of defense systems in plants, CRC Press, Boca Raton pp 77-104
- Asada K** (1999) The water-water cycle on chloroplasts: Scavenging on active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Mol Biol* **50**: 601-639
- Askerlund P, Larson C, Widell S, Moller I** (1987) NAD(P)H oxidase and peroxidase activities in purified plasma membranes from cauliflower inflorescences. *Physiol Plant* **71**: 9-19
- Auh CK, Murphy TM** (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂⁻ and H₂O₂ by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol* **107**: 1241-1247
- Avni A, Avidan N, Zamir D, Bailey BA, Stommel JR, Anderson JD** (1994) The response of *Lycopersicon esculentum* to a fungal xylanase is controlled by a single dominant gene. *Plant Physiol* **105(Suppl.)**: 158
- Bailey BA, Korcak RF, Anderson JD** (1992) Alterations in *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi cell membrane function following treatment with an ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase. *Plant Physiol* **100**: 749-755
- Baker CJ, Orlandi JD** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev*

- Phytopathol **33**: 299-321
- Baum JA, Scandalios JG** (1981) Isolation and characterization of the cytosolic and mitochondrial superoxide dismutases of maize. Arch Biochem Biophys **206**: 249-264
- Baum JA, Scandalios JG** (1982) Multiple genes controlling superoxide dismutase expression in maize. J Hered **73**: 95-100
- Beauchamp C, Fridovitch I** (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem **44**: 276-287
- Berczi A, Moller IM** (1996) NADH-monodehydroascorbate oxidoreductase is one of the redox enzymes in spinach leaf plasma membranes. Plant Physiol **116**: 1029-1036
- Berglund T, Ohlsson AB** (1994) Defensive and secondary metabolism in plant tissue cultures, with special reference to nicotinamide glutathione and oxidative stress. Plant Cell Tissue Organ Cult **43**: 187-195
- Berglund T, Ohlsson AB, Rydstorm J, Jordan B, Strid A** (1993) Effect of nicotinamide on gene expression and glutathione levels in tissue culture of *Pisum sativum*. J Plant Physiol **142**: 676-684
- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Mansfield JW** (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive response of lettuce cells to *Pseudomonas Syringae* pv phaseolicola. Plant Cell **9**: 209-221
- Binding H** (1975) Reproducibly high plating efficiencies of isolated mesophyll protoplasts from shoot cultures of tobacco. Physiol Plant **35**: 225-227
- Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A** (1995) The origin of the oxidative burst in plants. Free Rad Res **23**: 517-532
- Bolwell GP, Davies DR, Gerrish C, Auh CK, Murphy TM** (1998) Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean reveals two distinct mechanisms. Plant Physiol **116**: 1379-1385
- Boo YC, Jung J** (1999) Water deficit- induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. J Plant Physiol **155**: 255-261
- Borrell A, Besford RT, Altabella T, Masgrau C, Tiburcio AF** (1996)

- Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves. *Physiol Plant* **98**: 105-110
- Bors N, Langebartels C, Michel C, Sandermann H** (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone injury. *Phytochem* **28**: 1589-1595
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J** (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* **140**: 103-125
- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montagu M, Inze D** (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* **10**: 1723-1732
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inze D** (1994) Superoxide dismutases in plants. *Crit Rev Plant Sci* **13**: 199-218
- Bowler C, Van Montagu M, Inze D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 83-116
- Bueno P, Varela J, Gimenez-Gallego G, Rio LA** (1995) Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiol* **108**: 1151-1160
- Bunkelmann J, Trelease RN** (1996) Ascorbate peroxidase: a prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol* **110**: 589-598
- Calderon AA, Zapata JM, Barcelo AR** (1994) Peroxidase-mediated formation of resveratrol oxidation products during the hypersensitive-like reaction of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *Physiol Mol Plant Path* **44**: 289-299
- Campos JL, Figueras X, Boronat A, Pinol MT, Tiburcio AF** (1991) Changes in polyamine contents of *Arabidopsis thaliana* after UV-C irradiation. In AW Galston, AF Tiburcio, eds, Lecture course on Polyamines as regulators of plant development, Foundation Juan March, pp 78-80
- Casano LM, Gomez LD, Lascano HR, Gonzalez CA, Trippi VS** (1997) Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Cell Physiol* **38**:

433-440

- Chatfield M, Dalton DA** (1993) Ascorbate peroxidase from soybean root nodules. *Plant Physiol* **103**: 661-662
- Chen G-H, Asada K** (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and their differences in enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol* **30**: 987-998
- Chen J, Goldborough PB** (1994) Increased activity of α -glutamylcysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance. *Plant Physiol* **106**: 233-239
- Church DL, Galston AW** (1988) 4-Coumarate coenzyme A ligase and isoperoxidase expression in *Zinnia* mesophyll cells induced to differentiate into tracheary elements. *Plant Physiol* **88**: 679-684
- Cocking EC** (1961) Properties of isolated protoplasts. *Nature* **191**: 780-782
- Corbisier P, Houbion A, Remacle A** (1987) A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. *Anal Biochem* **164**: 240-247
- Cordoba-Pedregosa MC, Gonzalez-Reyes JA, Sanadillas MS, Navas P, Cordoba F** (1996) Role of apoplastic and cell-wall peroxidases on the stimulation of root elongation by ascorbate. *Plant Physiol* **112**: 1119-1125
- Creissen G, Edwards EA, Enard C, Wellburn AR, Mullineaux P** (1992) Molecular characterisation of glutathione reductase cDNAs from pea (*Pisum sativum*, L). *Plant J* **2**: 129-131
- Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Welburn F, Baker N, Welburn A, Mullineaux P** (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* **11**: 1277-1291
- Criqui MC, Durr A., Parmentier J, Marbach J, Fleck J, Jamet E** (1992) How are photosynthetic genes repressed in freshly-isolated mesophyll protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol. Biochem* **101**: 832-839
- Criqui MC, Jamet E, Parmentier Y, Marbach J, Durr A, Fleck J** (1991)

- Isolation and characterization of a plant cDNA showing homologies to animal glutathione peroxidases. *Plant Mol Biol* **18**: 623-627
- Criqui MC, Plesse B, Durr A, Marbach J, Parmentier Y, Fleck J** (1993) Characterization of genes expressed in mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris* before the re-initiation of the DNA replicational activity. *Mech Dev* **38**: 121-132
- Cross AR, Jones OTG** (1986) The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils: specific labeling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J* **237**: 111-116
- Cross AR, Jones OTG** (1991) Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochem Biophys Acta* **1057**: 281-298
- Cutler A, Saleem M, Wang H** (1991) Cereal protoplast recalcitrance. *In Vitro Cell Dev Biol* **27**: 104-111
- Cutler AJ, Saleem M, Coffey MA, Loewen MK** (1989) Role of oxidative stress in cereal protoplasts recalcitrance. *Plant Cell Tissue Org Cult* **18**: 113-127
- Dalton DA, Baird LM, Langeberg L, Taugher CY, Anyan WR, Vance C, Sarath G** (1993) Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* L. Merr.) root nodules. *Plant Physiol* **102**: 481-489
- Dalton DA, Post CJ, Langeberg L** (1991) Effects of ambient oxygen and of fixed nitrogen on concentrations of glutathione, ascorbate, and associated enzymes in soybean root nodules. *Plant Physiol* **96**: 812-818
- Davis BJ** (1964) Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. *Annals NY Acad Sci* **121**: 404-427
- De Leonardis S, De Lorenzo G, Borraccino G, Dipierro S** (1995) A specific ascorbate free radical reductase isoenzyme participates in the regeneration of ascorbate for scavenging toxic oxygen species in potato tuber mitochondria. *Plant Physiol* **109**: 847-851
- de Marco A, Jia C, Fisher-Schliebs E, Varanini Z, Luttge U** (1994) Evidence for two different nitrate-reducing activities at the plasma

- membrane in roots of *Zea mays* L. *Planta* **194**: 557-564
- de Marco A, Roubelakis-Angelakis KA** (1996a) The complexity of enzymic control of hydrogen peroxide concentration may affect the regeneration potential of plant protoplasts. *Plant Physiol* **110**: 137-145
- de Marco A, Roubelakis-Angelakis KA** (1996b) Hydrogen peroxide plays a bivalent role in the regeneration of protoplasts. *J Plant Physiol* **149**: 109-114
- de Marco A, Roubelakis-Angelakis KA** (1997) Laccase activity could contribute to cell-wall reconstitution in regenerated protoplasts. *Phytochemistry* **46**: 421-425
- de Marco A, Roubelakis-Angelakis KA** (1999) Specific features of the ascorbate/glutathione cycle in cultured protoplasts. *Plant Cell Rpts* **18**: 406-411
- Del Corso A, Cappiello M, Mura U** (1994) Thiol dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *Int J Biochem* **26**: 745-750
- Desikan R, Hancock JT, Coffey MJ, Neill SJ** (1996) Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH-oxidase-like enzyme. *FEBS Lett* **382**: 213-217
- Di Tomaso JM, Shaff JE, Kochian LV** (1989) Putrescine-induced wounding and its effects on membrane integrity and ion transport processes in roots of intact corn seedlings. *Plant Physiol* **90**: 988-995
- Diprieno S, Borroncino G** (1991) Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochem* **30**: 427-29
- Doke N** (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction with suppressors of hypersensitivity. *Physiol Plant Path* **23**: 359-367
- Doke N** (1985) NADPH-dependent O₂⁻ generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol Plant Pathol* **27**: 311-322
- Doke N, Miura Y** (1995) In vitro activation of NADPH-dependent superoxide generating system in a plasma membrane- rich fraction of potato tuber

- tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiol Mol Plant Pathol* **46**: 17-28
- Doke N, Ohashi Y** (1988) Involvement of an O₂⁻ generation system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with TMV. *Physiol Mol Plant Pathol* **32**: 163-175
- Donahue, JL, Moses Okpodu, C, Cramer, C L, Grabau, E A, Alscher R G** (1997) Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. Relationships to resistance. *Plant Physiol* **113**: 249-257
- Drolet G, Dumbroff EB, Legge RL, Thompson JE** (1986) Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochem* **25**: 367-371
- Dron M, Clouse SD, Dixon RA, Lawton MA, Lamb CJ** (1988) Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6738-42
- Drotar A, Phelps P, Fall R** (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci* **42**: 35-40
- Dunford HB** (1993) Kinetics of peroxidase reactions: horseradish, barley, *Coprinus cinereus*, lignin and manganese. In KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel, H Greppin, eds, *Plant peroxidases: Biochemistry and Physiology*, University of Geneva, pp 122-145
- Dwyer SC, Legendre L, Loe PS, Leto TL** (1996) Plant and human neutrophil oxidative burst contain immunological related proteins. *Biochim Biophys Acta* **1289**: 231-237
- Edwards E, Enard C, Creissen G, Mullineaux P** (1994) Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta* **192**: 137-143
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM** (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea. *Planta* **180**: 278-284
- Elstner EF** (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physiol* **33**: 73-96
- Elstner EF, Heupel A** (1978) Formation of H₂O₂ by isolated cell-walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia*). *Planta* **130**: 175-180

- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Hayyim G** (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant* **100**: 234-240
- Ferreira PCG, Hemerly AS, Villarreal R, Van Montagne M, Inze D** (1991) The Arabidopsis Functional homologue of the p34^{cdc2} protein kinase. *Plant Cell* **3**: 531-540
- Flores HE** (1990) Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. *In* R Slocum, HE Flores, eds, The biochemistry and physiology of polyamines in plants, CRC Press, Boca Raton, FL pp 214-225
- Flores HE, Galston AW** (1982) Polyamines and plant stress: activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. *Science* **217**: 1259-1261
- Flores HE, Galston AW** (1984) Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameters of the response. *Plant Physiol* **75**: 102-109
- Fowler MR, Kirby MJ, Scott NW, Slater A, Elliott MC** (1996) Polyamine metabolism and gene regulation during the transition of autonomous sugar beet cell in suspension culture from quiescence to division. *Physiol Plant* **98**: 439-446
- Foyer C, Lelandais M, Galap C, Kunert KJ** (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol* **97**: 863-872
- Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ** (1994) Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Envir* **17**: 507-523
- Foyer CH, Halliwell B** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JE, Scott IM** (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol Plant* **100**: 241-254
- Foyer CH, Rowell J, Walker D** (1983) Measurements of ascorbate content of

- spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* **157**: 239-244
- Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert KJ** (1995) Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol* **109**: 1047-57
- Fridovitch I** (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* **247**: 1-11
- Fuchs Y, Saxena YA, Gamble HR, Anderson JD** (1989) Ethylene biosynthesis-inducing protein from cellulysin is an endoxylanase. *Plant Physiol* **89**: 138-143
- Fuller DJM, Gerner EW, Russel DH** (1997) Polyamine biosynthesis and accumulation during the G1 to S phase transition. *Cell Physiol* **93**: 81-85
- Gallagher SR, Leonard RT** (1982) Effect of vanadate, molybdate, and azide on membrane-associated ATP-ase and soluble phosphatase activities of corn roots. *Plant Physiol* **70**: 1335-1340
- Galston AW, Kaur-Sawhney R** (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol* **94**: 406-410
- Gaspar T, Penel C, Hagege D, Greppin H** (1989) Peroxidase in plant growth, differentiation and developmental processes. *In* J Lobarzewski, H Greppin, C Penel, T Gaspar, eds, Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases, University M. Curie-Sklodowska, Lublin, Poland, University of Geneva, Switzerland pp 249-280
- Geny L, Broquedis M, Martin-Tanguet J, Bouard J** (1997) Free, conjugated and wall-bound polyamines in various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L cv Cabernet Sauvignon. *Am J Enol Vitic* **48**: 80-84
- Ghisla S, Massey V** (1989) Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Biochemistry* **181**: 1-17
- Glazener JA, Orlandi EW, Baker CJ** (1996) The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol* **110**: 759-763

- Gonzalez-Reyes JA, Alcain FJ, Caler JA, Serrano A, Cordoba F, Navas P** (1994) Relationship between apoplastic ascorbate regeneration and the stimulation of root growth in *Allium cepa* L. *Plant Sci* **100**: 23-29
- Graff DF, Okoong O-Ogola O** (1971) The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *J Exp Bot* **22**: 756-758
- Grantz AA, Brummell DA, Bennett AB** (1995) Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. *Plant Physiol* **108**: 411-418
- Groom QJ, Torres MA, Fordham-Skelton AP, Hammond-Kosack KE, Robinson NJ, Jones JDG** (1996) *rbohA*, a rice homologue to mammalian *gp91phox* respiratory burst oxidase gene. *Plant J* **10**: 515-522
- Gross GG, Janse C, Elstner EF** (1977) Involvement of malate, monophenols and the superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell wall from horseradish (*Armoracia lepathifolia* Gilib). *Planta* **136**: 271-276
- Grosset J, Marty I, Chartier Y, Meyer Y** (1990a) mRNAs newly synthesized by tobacco mesophyll protoplasts are wound- inducible. *Plant Mol Biol* **15**: 485-496
- Grosset J, Meyer Y, Chartier Y, Kauffmann S, Legrand M, Friting B** (1990b) Tobacco mesophyll protoplasts synthesize 1,3-glucanase, chitinases, and osmotins during in vitro culture. *Plant Physiol* **92**: 520-527
- Ha HC, Yager JD, Woster PA, Casero RA** (1998) Structural specificity of polyamines and polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Comm* **244**: 298-303
- Haberlandt G** (1902) Culturversuche mit isolierten pflanzenzellen. *Sitzungsberichte Akademie ver Wissenschaften Wien* **111**: 69-92
- Hahne E, Fleck J, G H** (1989) Colony formation from mesophyll protoplasts of a cereal, oat. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6157-6160
- Hahne G, Hoffmann F** (1984) Dimethyl sulfoxide can initiate cell divisions of arrested callus protoplasts by promoting cortical microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 5449-5453

- Hahne G, Lorz H** (1988) Release of phytotoxic factors from plant cell walls during protoplast isolation. *J Plant Physiol* **132**: 345-350
- Halliwell B** (1978a) Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* **140**: 81-88
- Halliwell B, Foyer CH** (1978b) Properties and physiological function of glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* **139**: 9-17
- Harding SA, Oh SH, Roberts D** (1997) Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *EMBO J* **16(6)**: 1137-1144
- Hausladen A, Alscher RG** (1994a) Purification and characterization of glutathione reductase isozymes specific for the state of cold hardiness of red spruce. *Plant Physiol* **105**: 205-213
- Hausladen A, Alscher RG** (1994b) Cold-hardiness specific glutathione reductase isozymes in red spruce. Thermal dependence of kinetic parameters and possible regulatory mechanisms. *Plant Physiol* **105**: 215-223
- Havir EA, McHale NA** (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* **84**: 450-455
- Heby O** (1981) Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* **19**: 1-20
- Heikkila RE, Cabbat FS, Cohen G** (1976) In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. *J Biol Chem* **251**: 2182-2185
- Hemerly A, Bergounioux C, Van Montagu M, Inze D, Ferreira P** (1992) Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 3295-3299
- Herburn AG, Belanger FC, Mattheis JR** (1987) DNA methylation in plants. *Dev Genet* **8**: 475-493
- Herouart D, Van Montagu M, Inze D** (1994) Developmental and environmental regulation of the *Nicotiana plumbaginifolia* cytosolic Cu/Zn-

- superoxide dismutase promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiol* **104**: 873-880
- Herschbach C, Rennenberg H** (1994) Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. *J Exp Bot* **45**: 1069-76
- Hodges TK, Leonard RT** (1974) Purification of plasma membrane adenosinephosphatase from plant roots. *Methods Enzymol* **32**: 392-406
- Hodgson EK, Fridovich I** (1975) The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of enzyme. *Biochemistry* **14**: 5294-5299
- Holmstead B, Larsson L, Tham R** (1961) Further studies on spectrophotometric method for the determination of amine oxidase activity. *Biochem. Biophys. Acta* **48**: 182-186
- Hossain MA, Asada K** (1984) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol* **25**: 85-92
- Huges DW, Galau G** (1983) Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. *Plant Mol Biol Reporter* **6**: 253-257
- Huhtinen O, Honkanen J, Simola LK** (1982) Ornithine- and putrescine-supported divisions and cell colony formation in leaf protoplasts of alders (*Alnus glutinosa* and *A. incana*). *Plant Sci Lett* **28**: 3-9
- Hyland K, Voisin E, Banoun H, Auclair C** (1983) Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion-generating system. *Anal Biochem* **135**: 280-287
- Iiyama K, Lam T B-T, Stone BA** (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol* **104**: 315-320
- Iizuka T, Kanegasaki S, Makino R, Tanaka T, Ishimura Y** (1985) Pyridine and imidazole reversibly inhibit the respiratory burst in porcine and human neutrophils: evidence for the involvement of cytochrome b₅₅₈ in the reaction. *Biochem Biophys Res Comm* **130**: 621-626
- Inze D, Ferreira P, Hemerly A, Segers G, De Veylder L, Engler J, Engler**

- G, Montagu MV** (1993) The molecular basis of cell cycle control in *Arabidopsis thaliana*. In KA Roubelakis-Angelakis, KTT Van, eds, Morphogenesis in Plants: Molecular Approaches, Plenum, New York pp 137-144
- Ishii S** (1987) Generation of active oxygen species during enzymic isolation of protoplasts from oat leaves. *In Vitro Cell Dev Biol* **23**: 653-658
- Ishii S** (1988) Factors influencing protoplast viability of suspension-cultured rice cells during isolation process. *Plant Physiol* **88**: 26-29
- Ishikawa T, Yoshimura K, Sakai K, Tamoi M, Takeda T, Shigeoka S** (1998) Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant Cell Physiol* **39**: 23-24
- Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and superoxide from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 800-805
- Jackson RJ, Campbell EA, Herdert P, Hunt T** (1983) The roles of sugar phosphates and thiol reducing systems in the control of reticulocyte protein synthesis. *Eur J Biochem* **131**: 313-324
- Jacobs T** (1993) Control of cell cycle. *Dev Biol* **153**: 1-15
- Jimenez A, Hernandez JA, del Reo LA, Sevilla F** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* **114**: 272-284
- Jung G, Hahne B, Wernicke W** (1993) Cell cycle in potentially dedifferentiating cereal mesophyll protoplasts cultured in vitro. II. Behavior of the cytoskeleton. *J Plant Physiol* **141**: 428-435
- Kaiser W** (1976) The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplasts. *Biochem Biophys Acta* **440**: 476-482
- Karpinski S, Wingle G, Olsson O, Hallgren JE** (1992) Characterization of cDNAs encoding CuZn-superoxide dismutases in Scots pine. *Plant Mol Biol* **18**: 545-555
- Kato Y, Urano J, Maki Y, Ushimaru T** (1997) Purification and

- characterization of dehydroascorbate reductase from rice. *Plant Cell Physiol* **38**: 173-78
- Katsirdakis KC, Roubelakis-Angelakis KA** (1991) Callogenic potentiality of leaf segments and shoot proliferation response of *Vitis* spp. genotypes. *J Wine Res* **2**: 83-95
- Katsirdakis KC, Roubelakis-Angelakis KA** (1992a) A modified culture medium and culture conditions increase viability and cell wall synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Sultanina) leaf protoplasts. *Plant Cell Tiss Org Cult* **28**: 255-260
- Katsirdakis KC, Roubelakis-Angelakis KA** (1992b) Ultrastructural and biochemical aspects of cell wall regeneration in recalcitrant and regenerating leaf protoplasts. *In Vitro Cell Dev Biol* **28**: 90-96
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon R, Lamb C** (1998) A plant homologue of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**: 225-236
- Keppler LD, Baker CJ** (1989) O₂⁻-initiated lipid peroxidation in a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco suspensions. *Phytopath* **79**: 555-562
- Kerk NM, Feldman LJ** (1995) A biochemical model for initiation and maintenance of the quiescent center: implication for organization of root meristems. *Plant Development* **121**: 2825-33
- Kieffer F, Simon-Plus F, Maume B, Blein J-P** (1997) Tobacco cells contain a protein immunologically related to the neutrophil small G protein Rac2 and involved in elicitor-induced oxidative burst. *FEBS Lett* **403**: 149-153
- Kikkert JR, Reisch B** (1996) Genetic engineering in grapevines for improve disease resistance. *Grape Research News* **7**: 4-9
- Koop HV, Schweiger HG** (1985) Regeneration of plants from individually cultivated protoplasts using an improved microculture system. *J Plant Physiol* **121**: 245-257
- Kotzabasis K, Christakis-Hampsas MD, Roubelakis-Angelakis KA** (1993)

- A Narrow-Bore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated and bound polyamines. *Anal Biochem* **214**: 484-489
- Kramer GF, Norman HA, Krizek DT, Mirecki RM** (1991) Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochem* **30**: 2101-2108
- Krastanova S, Perrin M, Barbier P, Demangeat P, Cornuet N, Bardonnat L, Otten L, Pink L, Walter B** (1995) Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Rpts* **14**: 550-554
- Kunert KJ, Foyer CH** (1993) Thiol/disulfide exchange in plants. *In* LJ De Kok, eds, Sulfur nutrition and assimilation in higher plants, SPB Academic Publishing, The Hague. The Netherlands pp 139-51
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamb C, Dixon R** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Langebartels C, Kernel KJ, Leonardi S, Schraudner M, Trost M, Heller W, Sandermann H** (1991) Biochemical plant response to ozone. I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* **91**: 882-887
- Larson C** (1983) Partition in aqueous polymer two-phase systems: a rapid method for separation of membrane particles according to their surface properties. *In* eds, Isolation of membranes, Academic press, London pp 277-309
- Larson RA** (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochem* **27**: 969-978
- Lascano HR, Gomez LD, Casano LM, Trippi VS** (1999) Wheat chloroplastic glutathione reductase activity is regulated by the combined effect of pH, NADPH and GSSG. *Plant Cell Physiol* **40**: 683-690
- Law MY, Charles SA, Halliwell B** (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacea oleracea*) chloroplasts. *Biochem J* **210**: 899-903
- Le Gall O, Torregrosa L, Danglot C, Candresse T, Bouquet A** (1996)

- Agrobacterium mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV). *Plant Science* **102**: 161-170
- Lee N, Wetzstein HY, Bornman CH** (1989) Cortical microtubule organization in *Vitis* protoplasts as affected by concentration of enzyme isolation medium and duration of incubation. *Physiol Plant* **77**: 27-32
- Lee T** (1997) Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured in vitro. *Plant Sci* **122**: 111-117
- Legengre L, Yueh YG, Crain R, Haddock N, Heinsteins PF, Low PS** (1993) Phospholipase-C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *J Biol Chem* **268**: 24559-24563
- Lett MC, Fleck J, Fritsch C, Durr A, Hirth L** (1980) Suitable conditions for characterization, identification and isolation of the mRNA of the small subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase from *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **148**: 211-216
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- Li Y, Zhu H, Kuppusamy P, Zweier JL, Trush MA** (1998) Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem* **273(4)**: 2015-2023
- Liochev SI, Fridovich I** (1997) Lucigenin (bis- N- methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys* **337**: 115-120
- Liso R, De Gara L, Tommasi F, Arrigoni O** (1985) Ascorbic acid requirement for increased peroxidase activity during potato tuber slice aging. *FEBS Lett* **187**: 141-145
- Loewus FA** (1988) Ascorbic acid and its metabolic products. In P J, eds, *The biochemistry of plants*, Academic Press, New York pp 85-107
- Lord JM, Kagawa T, Moore TS, Beevers H** (1973) Endoplasmic reticulum

- as the site of lecithin formation in castor bean endosperm. *J Cell Biol* **57**: 659-667
- Loudon PT, Nelson RS, Ingram DS** (1989) Studies of protoplast culture and plant regeneration from commercial and rapid-cycling *Brassica* species. *Plant Cell Tiss Org Cult* **19**: 213-224
- Lovatt CJ** (1990) Stress alters ammonia and arginine metabolism. In RA HE Flores, JC Shannon, eds, Polyamines and Ethylene. Biochemistry, Physiology, and Interactions, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD pp 157-165
- Low PS, Merida JR** (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol Plant* **96**: 533-542
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent 1. *J Biol Chem* **193**: 265-275
- Luwe MF, Takahama U, Heber U** (1993) Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol* **101**: 969-976
- Mahan JR, Burke JJ** (1987) Purification and characterization of glutathione reductase from corn mesophyll chloroplasts. *Physiol Plant* **71**: 352-358
- Marrs K** (1996) The functions and the regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 127-158
- Martinelli L, Mandolino G** (1994) Genetic transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine. *Theor Appl Genet* **88**: 621-628
- Martin-Tanguy J** (1997) Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol Plant* **100**: 675-688
- Marty I, Meyer Y** (1992) cDNA nucleotide sequence and expression of a tobacco cytoplasmic ribosomal protein L2 gene. *Nucleic Acid Res* **20**: 1517-1522
- Matters GL, Scandalios JG** (1986b) Effect of the free radical-generating herbicide paraquat on the expression of the superoxide dismutase (*Sod*) genes in maize. *Biochim Biophys Acta* **882**: 29-38

- Matters GL, Scandalios JG** (1987) Synthesis of isozymes of superoxide dismutase in maize leaves in response to O₃, SO₂ and elevated O₂. *J Exp Bot* **38**: 842-852
- Mattoo AK, Pick U, Hoffman-Falk H, Edelman M** (1981) The rapidly metabolized 32000 D polypeptide of the chloroplast is the proteinaceous shield regulating photosystem II electron transport and mediating diuron herbicide sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 1572-1576
- Mauro MC, Toutain S, Walter B, Pinck L, Otten L, Coustos-Thevenot P, Deloire A, Barbier P** (1995) High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with GFLP coat protein gene. *Plant Science* **112**: 97-106
- May J, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inze D** (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* **49**: 649-667
- May MJ, Leaver CJ** (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol* **103**: 621-627
- McKersie BD, Bowley SR, Harjanto E, Leprince O** (1996) Water- deficit tolerance and field performance alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol* **111**: 1177-1181
- Mehdy MC** (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol* **105**: 467-472
- Mehlhorn H, Lelandais M, Korth HG, Foyer CH** (1996) Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett* **378**: 203-206
- Meyer Y, Chartier Y** (1981) Hormonal control of mitotic development in tobacco protoplasts. *Plant Physiol* **68**: 1273-1278
- Meyer Y, Chartier Y, Grosset J, Marty I, Brugidou C, Marinho P, Rivera R** (1993) Gene expression in mesophyll protoplasts. *In* KA Roubelakis-Angelakis, KTT Van, eds, *Morphogenesis in Plants: Molecular Approaches*, Plenum, New York pp 221-236
- Mii M, Zou YM, Sugiyama T, Yanagihara S, Iizuka M** (1991) High-frequency callus formation from protoplasts of *Vitis labruscana* Bailey and *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc. by embedding in gellan gum. *Scientia Hort*

- 46: 253-260
- Mishra NP, Mishra RK, Singhal G** (1993) Changes in the activities 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* **102**: 903-910
- Misra HP, Fridovich I** (1977) Superoxide dismutase: a photochemical augmentation assay. *Arch Biochem Biophys* **181**: 308-312
- Mittler R, Zilinskas BA** (1991) Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol* **97**: 962-968
- Mittler R, Zilinskas BA** (1992) Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J Biol Chem* **267**: 21802-21807
- Miyake C, Asada K** (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary product monodehydro-ascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol* **33**: 541-553
- Moreau RA, Powell MJ, Whitaker BD, Bailey BA, Anderson JD** (1994) Xylanase treatment of plant cells induces glycosylation and fatty acylation of phytosterols. *Physiol Plant* **91**: 575-580
- Moreau RA, Preising CL** (1993) Lipid changes in tobacco cell suspensions following treatment with cellulase elicitor. *Physiol Plant* **87**: 7-13
- Mozsar J, Viczian O, Sule S** (1998) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of an interspecific grapevine. *Vitis* **37**: 127-130
- Mullins MG, Tang FCA, Fasciotti D** (1990) *Agrobacterium* mediated genetic transformation of grapevines: transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. *Bio/Technology* **8**: 1041-1045
- 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
- Murphy TM, Auh CM** (1996) The superoxide synthases of plasma membrane preparations from cultured rose cells. *Plant Physiol* **110**: 621-629

- Murphy TM, Huerta AJ** (1990) Hydrogen peroxide formation in cultured rose cells in response to UV-C radiation. *Physiol Plant* **78**: 247-253
- Nagasashi J, Kane AP** (1982) Triton-stimulated nucleoside diphosphatase activity: subcellular localization in corn root homogenates. *Protoplasma* **112**: 167-173
- Nagele A, Felix K, Lengfelder E** (1994) Induction of oxidative stress and protection against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity by the superoxide dismutase-mimetic complex copper-put-pyridine. *Biochem Pharmacol* **47**: 555-562
- Nakano Y, Asada K** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**: 867-880
- Nakano Y, Asada K** (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol* **28**: 131-140
- Nam KH, Lee SH, Lee J** (1997) Differential expression of ADC mRNA during development and upon acid stress in soybean (*Glycine max*) hypocotyls. *Plant Cell Physiol* **38**: 1156-1166
- Negrel J, Lherminier J** (1987) Peroxidase-mediated integration of tyramine into xylem cell walls of tobacco leaves. *Planta* **72**: 494-501
- Nijs D, Kelley PM** (1991) Vitamin C and E donate single hydrogen atoms in vivo. *FEBS Lett* **284**: 147-151
- Nitschke K, Fleig U, Schell J, Palme K** (1992) Complementation of the *cs* *dis2-11* cell cycle mutant of *S. pombe* by a protein phosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* **11**: 1327-1333
- Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH** (1998b) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot* **49**: 623-647
- Noctor G, Foyer CH** (1998a) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Mol Biol* **49**: 249-79
- Ochatt SJ** (1991) Strategies for plant regeneration from mesophyll protoplasts of recalcitrant fruit and farm woodland species *Prunus avium* L. (sweet/wild

- cherry), Rosaceae. *J Plant Physiol* **139**: 155-160
- Ochatt SJ, Power JB** (1988a) Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of Williams Bon Chretien pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Rep* **7**: 587-589
- Ochatt SJ, Power JB** (1988b) An alternative approach to plant regeneration from protoplasts of sour cherry (*Prunus cerasus*). *Plant Sci* **56**: 75-79
- Ogawa K, Kanematsu S, Takebe K, Asada K** (1995) Attachment of Cu, Zn SOD to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: Detection by immunogold labeling after rapid freezing. *Plant Cell Physiol* **36**: 565-573
- Oka S, Ohyama K** (1985) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Brussonetia Kazinoki* S. *J Plant Physiol* **119**: 455-460
- Ormrod DP, Beckerson DW** (1986) Polyamines as antioxidants for tomato. *HortScience* **21**: 1070-1071
- Orvar BL, Ellis BE** (1997) Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury. *Plant J* **11**: 1297-1305
- Osborne DJ** (1993) Morphogenic signals and markers *in vitro* and *in vivo*. In KA Roubelakis-Angelakis, KTT Van, eds, *Morphogenesis in Plants: Molecular Approaches*, Plenum, New York pp 1-17
- Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (1999) The generation of active oxygen species differs in *Nicotiana* and *Vitis* plant protoplasts. *Plant Physiol* **121**: 197-245
- Pennel RI, Lamb C** (1997) Programmed cell death. *Plant Cell* **9**: 1157-1168
- Perl A, Perl-Treves R, Galili S, Avin D, Shalgi E, Malkin S, Galun E** (1993) Enhanced oxidative stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutase. *Theor Appl Genet* **85**: 568-576
- Perl A, Saad S, Sahar N, Holland D** (1995) Establishment of long term embryogenic cultures of seedless *Vitis vinifera* cultivars – a synergistic effect of auxins and the role of abscisic acid. *Plant Science* **104**: 193-200
- Perl-Treves R, Galun E** (1991) The tomato Cu, Zn superoxide dismutase

- genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol Biol* **17**: 745-760
- Pfossier M, Konigshofer H, Kandeler R** (1990) Free, conjugated, and bound polyamines during the cell cycle of synchronized cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *J Plant Physiol* **136**: 574-579
- Pitcher LH, Zilinskas BA** (1996) Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plant Physiol* **110**: 583-588
- Podulso JF, Gurran GL** (1996) Increased permeability of superoxide dismutase at the blood-nerve and blood-brain barriers with retained enzymatic activity after covalent modification with naturally occurring putrescine. *J Neurochem* **67**: 734-741
- Potrykus I** (1991) Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 205-225
- Potrykus I, Shillito RD** (1986) Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration. *Methods Enzymol* **118**: 549-578
- Power JB, Drey MR, Freeman JR, Mulligan BJ, Cocking EC** (1986) Fusion and transformation of plant protoplasts. *Methods Enzymol* **118**: 578-649
- Primikiris NI, Roubelakis-Angelakis KA** (1999) Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. *Planta* **208**: 574-582
- Puite KJ** (1992) Progress in plant protoplast research. *Physiol Plant* **85**: 403-410
- Qian YC, Nguyen T, Murphy TM** (1993) Effects of washing on the plasma membrane and on stress reactions of cultured rose cells. *Plant Cell Tiss Org Cult* **35**: 245-252
- Radh H** (1990) Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol* **68**: 1166-1173
- Rao M, Hale BA, Ormrod DP** (1995) Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. *Plant Physiol* **109**: 421-432

- Reggiani R, Hochkoepler A, Bertani A** (1989) Polyamines in rice seedlings under oxygen-deficit stress. *Plant Physiol* **91**: 1197-1201
- Rennenberg H** (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* **21**: 2771-81
- Roubelakis-Angelakis KA** (1993) An assessment of possible factors contributing to recalcitrance of plant protoplasts. *In* KA Roubelakis-Angelakis, K Tran Thanh Van, eds, *Morphogenesis in Plants: Molecular Approaches*, Plenum, New York pp 201-220
- Roubelakis-Angelakis KA, Zivanovitch S** (1991) A new culture medium for in vitro rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp) genotypes. *HortScience* **26**: 1552-1555
- Rowland-Bamford AJ, Barland AM, Lea PJ, Mansfield TA** (1989) The role of arginine decarboxylase in modulating the sensitivity of barley to ozone. *Environ Pollut* **61**: 93-99
- Salin ML** (1987) Toxic oxygen species and protective system of the chloroplast. *Physiol Plant* **72**: 477-489
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Santa-Cruz A, Estan MT, Rus A, Bolarin MC, Acosta M** (1997) Effects of NaCl and mannitol iso-osmotic stresses on the free polyamine levels in leaf discs of tomato species differing in salt tolerance. *J Plant Physiol* **151**: 754-758
- Scandalios JG** (1987) The antioxidant enzyme genes *cat* and *sod* of maize: regulation, functional significance, and molecular biology. *In* MC Ratazzi, JG Scandalios, CS Whitt, eds, *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research, Molecular and Cellular Biology*, A R Liss, New York pp 19-44
- Scandalios JG** (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv Gen* **28**: 1-41
- Scandalios JG** (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* **101**: 7-12

- Scandalios JG** (1994) Molecular biology of superoxide dismutase. *In* RG Alscher, AR Wellburn, eds, Plant responses to the gaseous environment. Molecular, metabolic and Physiological Aspects, ISBN 0-4125-8170-1, Butterworth's London pp 147-164
- Scandalios JG, Tong W-F, Roupakias DG** (1980) Cat 3, a third gene locus coding for tissue-specific catalase in maize: genetics, intracellular localization, and some biochemical properties. *Mol Gen* **179**: 3-41
- Segal AW, Abo AW** (1993) The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci* **18**: 43-47
- Seiler N, Dezeure F** (1990) Polyamine transport in mammalian cells. *Int J Biochem* **3**: 211-218
- Sen Gupta A, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD** (1993a) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1629-1633
- Sen Gupta A, Webb R, Holaday AS, Allen RD** (1993b) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. *Plant Physiol* **103**: 1067-1073
- Serafini-Fracassini D** (1991) Polyamine biosynthesis and conjugation to macromolecules during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* tuber. *In* AW Galston, AF Tiburcio, eds, Lecture course on polyamines as regulators of plant development, Foundation Juan March, pp 40-45
- Serrano A, Cordoba F, Gonzales-Reyes JA, Navas P, Villalba JM** (1994) Purification and characterization of two distinct NAD(P)H dehydrogenases from onion (*Allium cepa* L) root plasma membrane. *Plant Physiol* **106**: 87-96
- Sgherri CLM, Loggini B, Bochicchio A, Navari-Izzo F** (1994) Antioxidant system in *Boea hygrosopica*: changes in response to rapid or slow desiccation and rehydration. *Phytochemistry* **37**: 377-381
- Sharon A, Fuchs Y, Anderson JD** (1993) The elicitation of ethylene

- biosynthesis by a *Trichoderma* xylanase is not related to the cell wall degradation activity of the enzyme. *Plant Physiol* **102**: 1325-1329
- Siminis CI, Kanellis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (1993) Differences in protein synthesis and peroxidase isoenzymes between recalcitrant and regenerating protoplasts. *Physiol Plant* **87**: 263-270
- Siminis CI, Kanellis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (1994) Catalase is differentially expressed in dividing and non dividing protoplasts. *Plant Physiol* **105**: 1375-1383
- Slooten L, Capiou K, Van Camp W, Van Montagu M, Sybesma. C, Inze D** (1995) Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol* **107**: 737-750
- Smirnoff N, Colombe SV** (1988) Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. *J Exp Bot* **39**: 1097-1108
- Smirnoff N, Pallanca JE** (1996) Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* **24**: 472-478
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA** (1989) Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiol Plant* **77**: 449-456
- Smith TA** (1985a) The di- and polyamine oxidases of higher plants. *Biochem Soc Trans* **13**: 319-322
- Smith TA** (1985b) Polyamines. *Ann Rev Plant Physiol* **36**: 117-143
- Stevens R, Creissen G, Mullineaux P** (1997) Cloning and characterization of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum*, L) and its expression in response to stress. *Plant Mol Biol* **35**: 641-654
- Strid A** (1993) Increased expression of defense genes in *Pisum sativum* after exposure to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Physiol* **34**: 949-953
- Strid A, Chow W, Anderson JM** (1994) UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth Res* **39**: 475-489
- Sutherland MW** (1991) The generation of oxygen radicals during host plant

- responses to infection. *Physiol Mol Plant Path* **9**: 79-93
- Suzuki Y, Kyuwa K** (1972) Activation and inactivation of alcohol dehydrogenase in germinating pea cotyledons. *Physiol Plant* **27**: 121-125
- Szigeti Z, Racz I, Darko E, Lasztity D, Lehoczki E** (1996) Are either SOD and catalase or the polyamines involved in the paraquat resistance of *Conyza canadensis*. *Environ Sci Health* **31**: 599-604
- Takahama U** (1993) Redox state of ascorbic acid in the apoplast of stems of *Kalanchoe daigremontiana*. *Physiol Plant* **89**: 791-798
- Takahama U, Oniki T** (1994) Effects of ascorbate on the oxidation of derivatives of hydroxycinnamic acid and the mechanism of oxidation of sinapic acid by cell wall-bound peroxidases. *Plant Cell Physiol* **35**: 593-600
- Takahashi Y, Kuroda H, Tanaka T, Machida Y, Takebe I, Nagata T** (1989) Isolation of an auxin-regulated gene cDNA expressed during the transition from G₀ to S phase in tobacco mesophyll protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9279-9283
- Takahashi Y, Nagata N** (1992b) *Par B*: an auxin regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 56-59
- Takahashi Y, Nagata T** (1992a) Expression of an auxin- regulated gene, *parC* and a novel related gene, *C-7*, from tobacco mesophyll protoplasts in response to external stimuli and in plant tissues. *Plant Cell Physiol* **33**: 779-787
- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C** (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4158-4163
- Tepperman JM, Dunsmuir P** (1990) Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol Biol* **14**: 501-511
- Theodoropoulos PA, Roubelakis-Angelakis KA** (1989) Mechanism of arginine transport in *Vitis vinifera* L. protoplasts. *J Exp Bot* **40**: 1223-1230
- Theodoropoulos PA, Roubelakis-Angelakis KA** (1990) Progress in leaf protoplast isolation and culture from virus-free axenic shoot cultures of *Vitis*

- vinifera* L. Plant Cell Tiss Org Cult **20**: 15-23
- Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, Galston AW** (1990) Polyamine metabolism. In BJ Miflin, PJ Lea, eds, The biochemistry of plants, intermediary nitrogen fixation, Academic, New York pp 283-325
- Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, Galston AW** (1997) Polyamine metabolism and its regulation. Physiol Plant **100**: 664-674
- Tiburcio AF, Masdeu MA, Dumortier FM, Galston AW** (1986) Polyamine metabolism and osmotic stress. I. Relation to protoplast viability. Plant Physiol **82**: 369-374
- Torsethaugen G, Pitcher LH, Zilinskas B, Pell EJ** (1997) Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. Plant Physiol **114**: 529-537
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA **76**: 4350-4354
- Tsang EWT, Bowler C, Herouart D, Van Camp W, Villarroel R, Genetello C, Van Montagu M, Inze D** (1991) Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. Plant Cell **3**: 783-792
- Ushimaru T, Shibasaka M, Tsuji H** (1992) Development of the O₂⁻-detoxification system during adaptation to air of submerged rice seedlings. Plant Cell Physiol **33**: 1065-1071
- Van Camp W, Bowler C, Villarroel R, Tsang E, Van Montagu M, Inze D** (1991) Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA **87**: 99003-9907
- Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, Inze D, Slooten L** (1996) Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. Plant Physiol **112**: 1703-1714
- Van Camp W, Willekens H, Bowler C, Van Montagu M, Inze D, Reupold-Popp P, Sandermann H, Langebartels C** (1994) Elevated levels of SOD

- protect transgenic plants against ozone damage. *Biotech* **12**: 165-168
- Van Gestelen P, Asard H, Caubergs RJ** (1997) Solubilization and separation of a plant plasma membrane NADPH-superoxide synthase from other NAD(P)H oxidoreductases. *Plant Physiol* **115**: 543-550
- Vasil IK, Vasil V** (1992) Advances in cereal protoplast research. *Physiol Plant* **85**: 279-283
- Vera-Estrella R, Blumwald E, Higgins VJ** (1992) Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells. *Plant Physiol* **99**: 1208-1215
- Walker MA, McKersie BD** (1993) Role of the ascorbate-glutathione system in chilling resistance of tomato. *J Plant Physiol* **141**: 234-239
- Walker MA, Roberts DR, Shih CY, Dumbroff EB** (1985) A requirement for polyamines during the cell division phase of radical emergence in seeds of *Acer saccharum*. *Plant Cell Physiol* **26**: 967-971
- Wallin A, Johansson L** (1989) Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *in vitro* cultured shoot of a columnar apple. *J Plant Physiol* **135**: 565-570
- Wang H, Culter AJ, Saleem M, Fowke LC** (1989) DNA replication in maize leaf protoplasts. *Plant Cell Tissue Org Cult* **18**: 33-46
- Wang SY, Jiao HJ, Faust M** (1991) Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during thiadiazuron-induced bud break of apple. *Physiol Plant* **82**: 231-236
- Wang J, Zhang H, Allen RD** (1999) Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol* **40**: 725-732
- Willekens H, Van Camp W, Van Montagu M, Inze D, Langebartels C, Sandermann H** (1994b) Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiol* **106**: 1007-1014
- Wingate VPM, Lawton MA, Lamb CJ** (1988) Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiol* **31**: 205-211

- Wingsle G, Karpinski S** (1996) Differential redox regulation by glutathione of glutathione reductase and CuZn-superoxide dismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L. needles. *Planta* **198**: 151-157
- Wise RR, Naylor AW** (1987) Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol* **83**: 278-282
- Wojtaszek P** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* **322**: 681-692
- Xing H, Higgins VJ, Blumwald E** (1997) Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell* **9**: 249-259
- Yahraus T, Chandra S, Legendre L, Low PS** (1995) Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiol* **109**: 1259-1266
- Yamaguchi K, Mori H, Nishimura M** (1995) A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol* **36**: 1157-1162
- Ye B, Muller HH, Zhang J, Gressel J** (1997) Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Coryza canadensis* and wheat. *Plant Physiol* **115**: 1443-1451
- Zhang H, Wang J, Nickel U, Allen RD, Goodman HM** (1997) Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Mol Biol* **34**: 967-971

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΕΣ ΔΙΑΤΡΙΒΕΣ

- Πριμηκύριος Ν Ι** (1999) Βιοχημικός, μοριακός και ανοσολογικός χαρακτηρισμός και ρύθμιση της έκφρασης της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης της αμπέλου (*Vitis vinifera* L.). Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, αρ. σελ. 182
- Συμινής Χ Ι** (1996) Αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα σε πρωτοπλάστες από μεσόφυλλο *Vitis vinifera* L. και *Nicotiana tabacum* L.. Τμήμα

Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, αρ. σελ. 135

Χρηστάκη-Χάμσα Μ (1995) Πολυαμίνες και μορφογενετική έκφραση εκφύτων και πρωτοπλαστών *Vitis vinifera* L. (Sultanina) και *Nicotiana tabacum* L. (Xanthi). Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, αρ. σελ. 128