

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

**ΔΙΑΓΟΝΙΑΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ ΚΑΠΝΟΥ
ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΑΤΑΛΛΑΞΗ ΣΑΤ Ι
ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΠΟΙΚΙΛΕΣ ΜΟΡΦΕΣ
ΑΒΙΟΤΙΚΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ**

Ιωάννης Δ. Ντελής

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Ηράκλειο, 2001**

**ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ ΚΑΠΝΟΥ
ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΑΤΑΛΑΣΗ CAT 1
ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΠΟΙΚΙΛΕΣ ΜΟΡΦΕΣ
ΑΒΙΟΤΙΚΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ**

Από το
Ντελή Δ. Ιωάννη

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

Επιτροπή Αξιολόγησης:

Καθηγήτρια ΚΑΛΛΙΟΠΗ Α. ΡΟΥΜΠΕΛΑΚΗ-ΑΓΓΕΛΑΚΗ

Αναπληρωτής Καθηγητής ΚΟΤΖΑΜΠΑΣΗΣ ΚΥΡΙΑΚΟΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Γενικά	1
1.2. Οι καταλασες	7
1.2.1. Ο ρόλος της καταλάσης στις βιοτικές καταπονήσεις	9
1.2.2. Ο ρόλος της καταλάσης στις αβιοτικές καταπονήσεις	11
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	13
2.1. Ανάπτυξη φυτών	13
2.2. Εκχύλιση πρωτεϊνών από φύλλα καπνού	13
2.3 Προσδιορισμός της ενεργότητας της καταλάσης (CAT)	14
2.4. Ανοσοεντοπισμός της καταλάσης	14
2.5. Έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις paraquat (methyl viologen)	16
2.6. Έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H ₂ O ₂	16
2.7. Εκχύλιση και ποσοτικός προσδιορισμός των χλωροφυλλών	17
2.8. Ποσοτικός Προσδιορισμος του Malondialdehyde ως δείκτη περοξειδωσης των λιπιδίων	17
2.9. Απομόνωση γενωμικού DNA	18
2.10. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	21
3.1. Ενζυμική ενεργότητα καταλάσης σε φυτά T ₁ γενιάς	21
3.2. Πιστοποίηση ενσωμάτωσης του διαγονιδίου στους T ₁ απογόνους	

με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	29
3.3. Αντοχή των T1 απογόνων στις αβιοτικές καταπονήσεις	31
3.3.1. Αντοχή σε paraquat	31
3.3.2. Αντοχή σε εξωγενή επίδραση H ₂ O ₂	34
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	40
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2000-2001, στο εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης. Για τη διεκπεραίωσή της απαιτήθηκε, πέραν της προσωπικής μου προσπάθειας, η πολύτιμη αρωγή και αμέριστη συμπαράσταση πολλών ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος και επιβλέπουσα της διατριβής μου, Καθηγήτρια Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, όχι μόνο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, προσφέροντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ με τη Φυσιολογία και Βιοχημεία Φυτών στο εργαστήριό της, αλλά και για την ηθική, επιστημονική και οικονομική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την επιστημονική μου υπεύθυνη, κα Μυλωνά Φωτεινή, για τη διάθεσή της να μου μεταδώσει τις γνώσεις της και την υπομονή της στις άτυχες στιγμές μου. Η συνεργασία μας ήταν πολύτιμη στα πρώτα μου ερευνητικά βήματα. Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κ. Κοτζαμπάση για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους «βετεράνους» του εργαστηρίου, Νικόλα Πριμηκόριο, Στάσα Παπαδάκη και Κώστα Πασχαλίδη για την έμπρακτη απόδειξη της φιλίας τους, σ'όλες τις δυσκολίες που συνάντησα. Ιδιαίτερα ευχαριστώ το Δημήτρη Αλεξάνδρου, που με μύησε στα μυστικά της έρευνας. Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, Δάκη Σκοπελίτη, Μαίρη Ζερβού, Αναστασία Μίσιου, Ευθύμη Ανδρώνη, Ελένη Πλιακώνη, Κώστα Καραντεμίρη και Μαριάνθη Πατεράκη για τη βοήθεια, την υπομονή και την κατανόησή τους. Στα υπόλοιπα παιδιά του μεταπτυχιακού προγράμματος εύχομαι κάθε επιτυχία για τα μελλοντικά τους σχέδια.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια και τους φίλους μου για την κατανόηση, την υπομονή και τη στήριξη που μου έδωσαν και μου δίνουν, στη διάρκεια μιας επίπονης αλλά εξαιρετικά διδακτικής προσπάθειας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ΕΜΟ) είναι μια αναπόφευκτη συνέπεια του αερόβιου μεταβολισμού. Αυτά τα ασταθή προϊόντα της αναγωγής του οξυγόνου είναι ιδιαίτερα δραστικά και αντιδρούν μη ειδικά με μια μεγάλη ποικιλία βιομορίων, επιφέροντας θανατηφόρες καταστροφές στο κύτταρο. Κάτω από συνθήκες βιοτικής ή αβιοτικής καταπόνησης παρατηρείται μια υπέρμετρη συσσώρευση ΕΜΟ, η απόσβεση των ποιών αποτελεί άμεση προτεραιότητα για το κύτταρο. Τα φυτά έχουν εξελικτικά συγκροτήσει μια αποτελεσματική άμυνα κατά των ΕΜΟ, που περιλαμβάνει φυσικά αντιοξειδωτικά προϊόντα και ένζυμα.. Ανάμεσά τους, η καταλάση κατέχει εξέχουσα θέση, επειδή αποτελεί την κύρια εστία απόσβεσης του H_2O_2 . Πρόκειται για ένα από τα κυριότερα και τα πιο χαρακτηριστικά ένζυμα των περοξεισωμάτων, στα οποία οδηγείται μέσω πεπτιδίου συνθήματος. Στα C_3 φυτά συναντάται με τρεις ισομορφές, που εμφανίζουν διαφορετική ιστοειδική κατανομή και λειτουργική αποστολή. Η καταλάση με υψηλή καταλατική ενεργότητα (CAT-1) είναι η κύρια ισομορφή των φύλλων. Για την διερεύνηση του πιθανού ρόλου της καταλάσης, στην προστασία ενάντια σε ποικίλες μορφές οξειδωτικής καταπόνησης, επιχειρήθηκε η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού, με εκφυλισμένο το πεπτίδιο σύνθημα ώστε η CAT-1 να εκφράζεται στο κυτόπλασμα. Οι T_1 απόγονοι παρουσίασαν αντοχή στις αβιοτικές καταπονήσεις του paraquat και του εξωγενούς H_2O_2 .

ABSTRACT

Oxygen is essential for existence of aerobic life; however activated oxygen species (AOS) are generated in all aerobic organisms, and their levels are enhanced by exposure to chemical and environmental stress. The toxic effects of AOS, termed oxidative stress, are circumvented by a combination of enzymic and non-enzymic mechanisms, that can reduce oxidative damage by converting AOS to harmless compounds. Among the enzymes involved in anti-oxidant defense mechanisms, catalase (EC 1.11.1.6) plays a key role, catalyzing the dismutation of hydrogen peroxide to water and molecular oxygen at an extremely rapid rate. This rapid H₂O₂ dismutation represents the catalatic mode of action of catalase. Catalase is a ubiquitous peroxisomal matrix enzyme that is targeted to the peroxisome via a peroxisome trageting motif (PTM). Catalase with high catalatic activity (CAT-1) is the major isoform in leaves, and there is relatively less CAT-1 in stem and sepal tissue. In order to further investigate the possible involvement and role of catalase as protection against oxidative stress, we have over-expressed a cytoplasm targeted catalase, due to AOS formation in/or diffusion through cytoplasm in certain conditions of biotic or abiotic stress. Thus, an enhancement of the antioxidant capacity in the cytoplasm was attempted. Accordingly, we developed transgenic tobacco genotypes expressing the tobacco *Cat1* gene lacking the peroxisome target motif. T1 progeny was analyzed for catalase specific activity in various developmental stages. Transgenic tobacco exhibited increased catalase specific activity from 1.2- to more than 2-fold compared to wild type plants. Transgenic plants were examined for tolerance to various abiotic stress conditions. Catalase over-expressing plants showed reduced levels of light-mediated cellular damage from the herbicide methyl viologen and exogenous H₂O₂.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά

Οι αερόβιοι οργανισμοί εκθέτονται συνεχώς στο οξυγόνο το οποίο επιφυλάσσει κινδύνους καθώς τα ενδιάμεσα προϊόντα της αναγωγής του έχουν μεγάλη τοξικότητα. Η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (EMO) είναι διαδικασία του κανονικού κυτταρικού μεταβολισμού. Τα ασταθή παράγωγα, που προκύπτουν από τη διαδοχική αναγωγή του οξυγόνου, είναι ιδιαίτερα δραστικά και αντιδρούν μη ειδικά με σημαντικά για το κύτταρο βιομόρια, όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια, επιφέροντας θανατηφόρες συνέπειες (Imlay and Linn, 1988; Halliwell and Gutteridge, 1989). Τα EMO αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα διαδοχικών αναγωγών του οξυγόνου με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου. Στη βασική του κατάσταση (ground state) το οξυγόνο είναι μόριο τριπλής κατάστασης και σχετικά ανενεργό. Με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου, από μια ποικιλία αναγωγικών παραγόντων, το οξυγόνο ανάγεται μέσα από μια αντίδραση τεσσάρων διαδοχικών σταδίων (Αντίδραση 1), παράγοντας ενεργές μορφές οξυγόνου (Frank Van Breusegem *et al.*, 2001). Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης απαιτεί ενεργειακό κόστος, ενώ τα επόμενα είναι εξώθερμα οπότε πραγματοποιούνται αυθόρμητα.



Στο πρώτο στάδιο της αναγωγής του οξυγόνου (Αντίδραση 1) παράγεται η υπερυδροξυλική ρίζα ($\text{HO}_2^{\bullet-}$), η οποία σχηματίζεται σε χαμηλό pH, και η υπεροξειδική ρίζα ($\text{O}_2^{\bullet-}$) με χρόνο ημιζωής περίπου 2-4 μs (Sutherland, 1991). Στα φυτικά κύτταρα η υπεροξειδική ρίζα βρίσκεται σε ισορροπία με την πρωτονιωμένη της μορφή, την υπερυδροξυλική ρίζα. Το $\text{O}_2^{\bullet-}$ είναι ασταθής και δυσκίνητη ρίζα και μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (hydrogen peroxide, H_2O_2) και O_2 στο σημείο σχηματισμού της αυθόρμητα ή με τη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1). Το μόριο του H_2O_2 είναι σχετικά σταθερό και ευδιάλυτο. Αυτή του η ιδιότητα, του επιτρέπει να διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και να δρα μακριά από το σημείο παραγωγής του. Η υδροξυλική ρίζα είναι

από τις πιο ενεργές μορφές οξυγόνου με χρόνο ημίσειας ζωής μικρότερη του 1 μs. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αντιδρά ιδιαίτερα δραστικά με μεγάλη ποικιλία βιομορίων στο σημείο παραγωγής της (Van Breusegem *et al.*, 2001). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή της πραγματοποιείται με πολύ βραδύ ρυθμό σε μη τοξικά για το κύτταρο επίπεδα από την άμεση αντίδραση μεταξύ $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 (αντίδραση Haber-Weiss). Αντίθετα, σε ιδιαίτερα τοξικά επίπεδα μπορεί να παραχθεί μέσω κυκλικών αντιδράσεων που εμπλέκουν την οξείδωση μετάλλων όπως Fe^{2+} και Cu^+ (αντίδραση Fenton). Η υδροξυλική ρίζα με την ικανότητά της να ξεκινά αλυσίδα αντιδράσεων παραγωγής EMO, θεωρείται ως η κυρίως υπεύθυνη EMO για τις μη αντιστρεπτές και καταστροφικές τροποποιήσεις των κυτταρικών βιομορίων και οργανιδίων.

Τα EMO είναι κυρίως παραπροϊόντα του κανονικού κυτταρικού μεταβολισμού, αλλά παράγονται επίσης από τη διατάραξη των συστημάτων μεταφοράς ηλεκτρονίων σε συνθήκες καταπόνησης. Τα κυριότερα σημεία παραγωγής EMO στο φυτικό κύτταρο, σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, εντοπίζονται σε οργανίδια υψηλού οξειδωτικού μεταβολισμού, όπως χλωροπλάστες, μιτοχόνδρια και μικροσώματα (Dat *et al.*, 2000). Στους χλωροπλάστες, ο σχηματισμός του υπεροξειδίου του υδρογόνου πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασης Mehler. Η φωτοαναπνοή στα υπεροξεισώματα, μέσω της οξειδάσης του γλυκολικού, είναι μια εναλλακτική διαδικασία παραγωγής H_2O_2 (Van Breusegem *et al.*, 2001). Συγχρόνως, H_2O_2 παράγεται στα μικροσώματα, κατά τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, καθώς και στον αποπλάστη, κατά τη λιγνιτοποίηση του κυτταρικού τοιχώματος μέσω της δράσης οξειδασών και περοξειδασών (π.χ. οξειδάση των πολυαμινών) (Elstner, 1982; Asada, 1994). Το $O_2^{\bullet-}$ παράγεται κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, κατά τη φωτοσύνθεση στους χλωροπλάστες και ως παραπροϊόν της δράσης διάφορων ενζύμων (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης) (Elstner, 1982; Fridovitch, 1986). Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι οι πιθανές πηγές EMO είναι ποικίλα ενζυμικά συστήματα με διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό, οπότε η ταυτοποίηση του μηχανισμού παραγωγής EMO αποτελεί πραγματική πρόκληση (Murphy *et al.*, 1998; Papadakis and Rubelakis-Angelakis, 1999).

Το ευρύ φάσμα των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων, όπως υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες, ξηρασία, αλατότητα, UV ακτινοβολία, ατμοσφαιρικοί ρυπαντές (π.χ. όζον και διοξείδιο του θείου), υδατική καταπόνηση, μολύνσεις από

παθογόνα, ζιζανιοκτόνα (π.χ. paraquat), έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή και συσσώρευση των EMO (Sutherland, 1991, Bowler et al., 1992). Οι στόχοι των EMO και κυρίως της υδροξυλικής ρίζας, είναι τα λιπίδια (περοξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων των μεμβρανών), οι πρωτεΐνες (αποδόμηση ενζύμων), οι υδατάνθρακες (διάσπαση πολυσακχαριτών), τα νουκλεϊκά οξέα (αποδιάταξη των ελίκων, σπασίματα σε χρωματίδες, μεταλλαγές) με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (Fridovitch, 1986).

Τα φυτά για να αντεπεξεχθούν στα τοξικά αποτελέσματα των EMO έχουν αναπτύξει ένα μεγάλο αριθμό στρατηγικών άμυνας, οι οποίες περιλαμβάνουν μικρού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικά μόρια (ασκορβικό οξύ, γουταθειόνη, μανιτόλη, α-τοκοφερόλη, υδροξυκινόνες, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, β-καροτένιο) (Noctor and Foyer, 1998) και αντιοξειδωτικά ένζυμα (υπεροξειδικές δισμουτάσες, καταλάσες, αναγωγάσες, περοξειδάσες) (Inze' and van Montagu, 1995). Μία άλλη σημαντική απόκριση των κυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση είναι η ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τη φυσιολογική διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης (Murray, 1992; Paulovich et al., 1997). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μείωση του αριθμού των κυττάρων και του ρυθμού της κυτταρικής διαίρεσης σε φυλλικούς και ριζικούς ιστούς (Bursens et al., 2000; Granier et al., 2000). Αυτό επιτρέπει τη διατήρηση ενέργειας για το φυτό δίνοντας προτεραιότητα στην ανάπτυξη συγκεκριμένων στρατηγικών άμυνας προκειμένου να αποσβέσουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες (Vernoux et al., 2000; May et al., 1998).

Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα, που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα φαίνονται στον Πίνακα 1. Η SOD είναι ο πρώτος κρίκος στην αλυσίδα των ενζυμικών συστημάτων του φυτικού κυττάρου, εξαιτίας της ικανότητάς της να μετατρέπει τα σουπεροξειδία σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (Scandalios, 1993). Στα φυτά υπάρχουν πολλαπλά ισοένζυμα της SOD, η παρουσία των οποίων ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στο καλαμπόκι (Baum and Scandalios, 1982). Πρόκειται για σύνθετες πρωτεΐνες, ασύνδετων πυρηνικών γονιδίων, οι οποίες στα ανώτερα φυτά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες ανάλογα με το μέταλλο, που φέρουν στην προσθετική τους ομάδα: Mn, Fe, και Cu/Zn (Eltner, 1982). Οι SODs με συμπάρογτα το Mn εντοπίζεται στην μιτοχονδριακή μήτρα (Baum and Scandalios, 1981), ενώ οι SODs με συμπάρογτα το Fe στο στρώμα των χλωροπλαστών. Η φυλογενετική κατανομή τοποθετεί τις MnSODs και FeSODs ως αρχαιότερες. Αντίθετα, οι Cu/ZnSODs, οι οποίες εδράζονται στους χλωροπλάστες και τα περοξεισώματα, είναι δομικά άσχετες

με τις προηγούμενες και τοποθετούνται κοντά στην έναρξη της ευκαρυωτικής γενεαλογίας (Asada, 1994; Bueno *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 1995). Γενετικά τροποποιημένα φυτά με υπερέκφραση των SODs παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο paraquat (Perl *et al.*, 1993), στο όζον και στην υδατική καταπόνηση (Tsang *et al.*, 1991; McKersie *et al.*, 1993; Van Camp *et al.*, 1994).

Πίνακας 1. Κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα

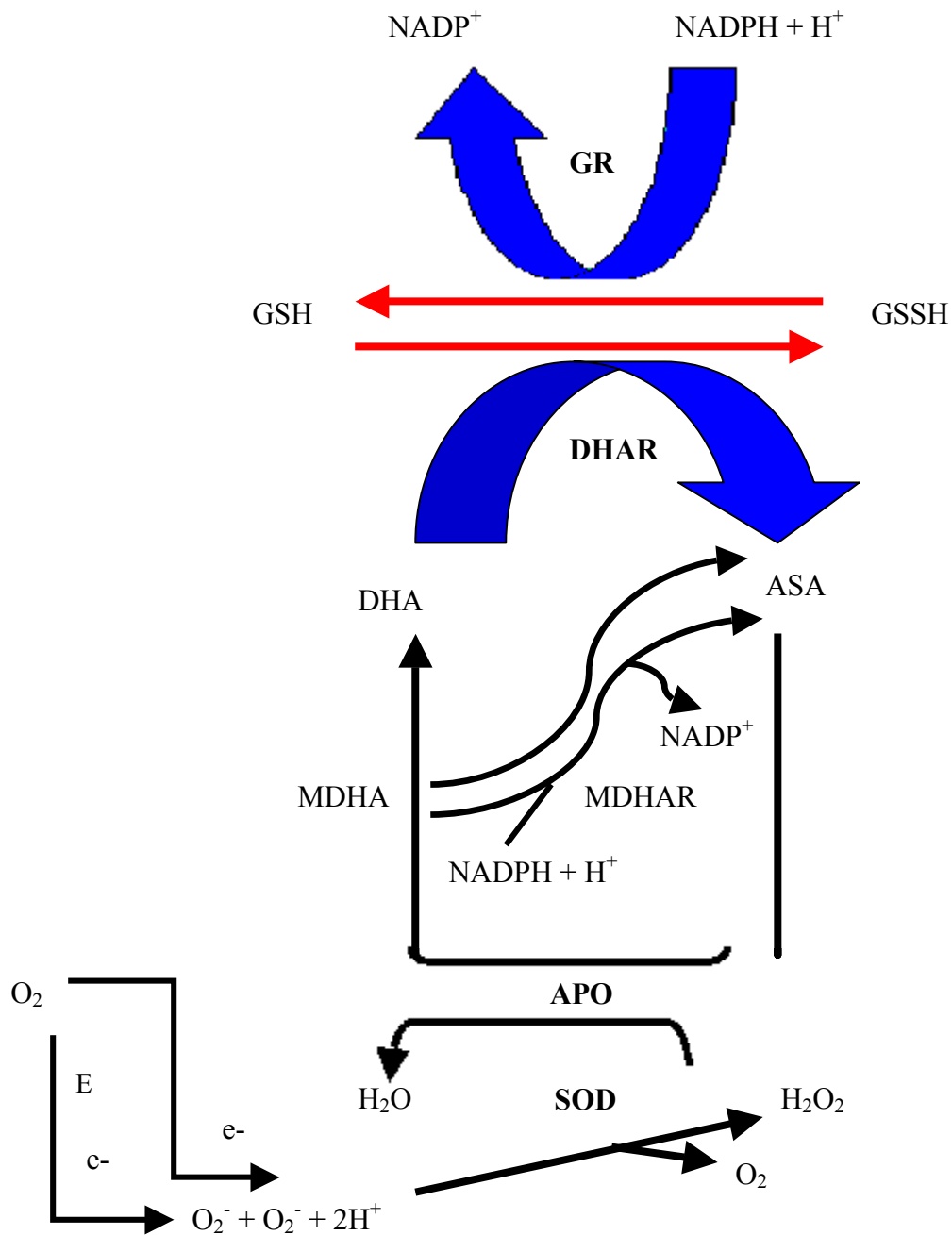
ENZYMΟ	ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΗ
Υπεροξειδική δισμουτάση (EC 1.15.1.1)	SOD
Ασκορβική περοξειδάση (EC 1.11.1.11)	APO
Αναγωγάση του Μονοδιυδροασκορβικού (EC 1.6.5.4)	MDHAR
Αναγωγάση του διυδροασκορβικού (EC 1.8.5.1)	DHAR
Αναγωγάση της γλουταθειόνης (EC 1.6.4.2)	GR
Καταλάση (EC 1.11.1.6)	CAT
Περοξειδάση της γλουταθειόνης (EC 1.11.1.9)	GS-POX
Περοξειδάση (EC1.11.1.7)	POX

Η απόσβεση του H₂O₂ επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των καταλασών και των περοξειδασών, όπως η ασκορβική περοξειδάση (APO), όμως η καταλάση έχει μικρότερη συγγένεια με το υπόστρωμα σε σχέση με την APO. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι καταλάσες να δρουν όταν το H₂O₂ βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο κύτταρο σε αντίθεση με τις ασκορβικές περοξειδάσες, οι οποίες δρουν όταν οι συγκεντρώσεις είναι πολύ χαμηλές (Scandalios, 1994; Creissen *et al.*, 1999). Η APO είναι μια αίμη-περοξειδάση, η οποία διακρίνεται σε τέσσερις καλά χαρακτηρισμένες μορφές στα φυτικά κύτταρα, μια κυτοπλασμική, μια

περοξεισωματική και δυο χλωροπλαστικές, μια στο στρώμα και μια άλλη συνδεδεμένη στις θυλακοειδείς μεμβράνες (Mittler and Zilinskas, 1991; Asada, 1992; Yamaguchi *et al.*, 1995), ενώ υπάρχουν ενδείξεις και για μια πέμπτη μιτοχονδριακή ισομορφή. Οι ισομορφές, που εδράζονται στα οργανίδια, αποσβένουν το H_2O_2 που παράγεται εκεί (de Marco *et al.*, 1996), ενώ η λειτουργία της κυτοπλασματικής ισομορφής είναι μάλλον η απομάκρυνση του H_2O_2 , που παράγεται στο κυτόπλασμα ή τον αποπλάστη (Papadakis *et al.*, 2001).

Η APO χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα δυο μόρια ασκορβικού (ASA) και ανάγει το H_2O_2 σε H_2O , ενώ παράλληλα οδηγεί στο σχηματισμό δυο μορίων μονοδιδροασκορβικού (MDHA). Το MDHA (ρίζα με μικρή ημιζωή) μετατρέπεται σε ασκορβικό και διδροασκορβικό (DHA). Το DHA ανάγεται σε ασκορβικό μέσω της αναγωγάσης του διδροασκορβικού (DHAR), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα αναγμένη γλουταθειόνη (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine; GSH). Αποτελεί το σημαντικότερο μικρού μοριακού βάρους μόριο, για το μεταβολισμό του θείου και την αποτοξίνωση από βαρέα μέταλλα, στα φυτά. Από την παραπάνω αντίδραση παράγεται οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), η οποία στη συνέχεια ανάγεται από τον συνενζυμικό παράγοντα NADPH σε μια αντίδραση, που καταλύεται από την αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR). Ο λόγος αναγμένης προς την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH/GSSG) είναι σημαντικός καθότι μεταβάλλεται σε ποικίλες καταστάσεις καταπονήσεων και φανερώνει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου (Foyer *et al.*, 1997).

Η παραπάνω σειρά αντιδράσεων, με την οποία επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του H_2O_2 , αναφέρεται ως κύκλος ασκορβικού – γλουταθειόνης ή Halliwell-Asada (Εικόνα 1). Ο οξειδοαναγωγικός αυτός κύκλος λειτουργεί στο κυτόπλασμα και στους χλωροπλάστες για την απομάκρυνση του H_2O_2 , που παράγεται από τη δράση κυρίως των SODs (Asada, 1992).



Εικόνα 1. Κύκλος του Halliwell-Asada.

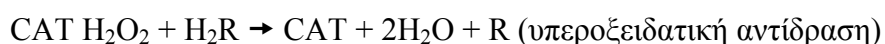
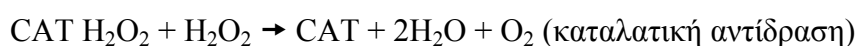
Γενετικά τροποποιημένα φυτά με υπερέκφραση των ενζύμων του κύκλου γλουταθειόνης – ασκορβικού δίνουν ελπιδοφόρα μηνύματα για την ανθεκτικότητα των φυτών σε διάφορες μορφές οξειδωτικής καταπόνησης. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της κυτοπλασμικής APO βελτίωσε την ανθεκτικότητα στο paraquat (Allen *et al.*, 1997), ενώ η καταστολή της έκφρασης της APO δημιούργησε φυτά με μεγαλύτερη ευαισθησία στο όζον (Orvar and Ellis, 1997). Επιπλέον τα υψηλότερα

επίπεδα ενεργότητας της GR σε γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού και λεύκης εμφάνισαν μεγαλύτερη ικανότητα διατήρησης των ενδογενών επιπέδων του ASA και της GSH όταν εκτέθηκαν σε paraquat (Foyer *et al.*, 1991; 1995).

1.2. Καταλάσεις

Η καταλάση (H_2O_2 : H_2O_2 οξειδοαναγωγή, CAT, E.C. 1.11.1.6) είναι ένα από τα σημαντικότερα ενζυμικά συστήματα των κυττάρων για την απόσβεση του H_2O_2 . Πρόκειται για μια τετραμερή πρωτεΐνη, με προσθετική ομάδα αίμης, η οποία εδράζεται στα μικροσώματα και αποτελεί το 10 έως 25% της συνολικής τους πρωτεΐνης (Huang *et al.*, 1983). Τα μικροσώματα, ανάλογα με τον ιστό που εντοπίζονται, διακρίνονται σε περοξεισώματα στα φωτοσυνθετικά κύτταρα του φύλλου, γλυοξυσώματα στους ελαιώδεις σπόρους των φυτών, εξειδικευμένα μικροσώματα σε μη χλωροφυλλόχους και μη ελαιώδεις αποθηκευτικούς ιστούς και μικροσώματα των φυματίων των ψυχανθών (Beavers, 1979; Haung *et al.*, 1983). Το πεπτίδιο συνθήματος για την τοπογένεση των καταλασών, αναγνωρίστηκε στη μεσοφυλλική καταλάση του καπνού και είναι μια εκφυλισμένη παραλλαγή του γενικού μοτίβου SKL (σερίνη-λυσίνη- λευκίνη) στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (Mullen *et al.*, 1997).

Τα ισοένζυμα της καταλάσης δείχνουν δύο ενεργότητες, την καταλατική και την υπεροξειδατική. Οι ενεργότητες αυτές περιγράφονται από τις παρακάτω αντιδράσεις:



Το υπόστρωμα H_2R θα μπορούσε να είναι αιθανόλη, μεθανόλη, φορμαλδεΐδη ή φορμικό οξύ (Huang *et al.*, 1983). Η καταλάση εμφανίζει υψηλό K_m (K_m : 5.3 mM), γεγονός που περιορίζει την αποτελεσματικότητά της σε υψηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 (π.χ. κατά τη διάρκεια του γλυκολικού κύκλου).

Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη πολλών μορφών καταλάσης σε διαφορετικά είδη φυτών, αλλά μόνο στο καλαμπόκι και στο βαμβάκι έχει γίνει συστηματική μελέτη, που αφορά τη δομή και τη φυσιολογική της λειτουργία. Στο καλαμπόκι (Scandalios, 1994) και στο βαμβάκι (Ni *et al.*, 1990) η καταλάση εμφανίζει πέντε ισοενζυμικές μορφές, οι οποίες εδράζονται στα μικροσώματα και προκύπτουν από όλους τους δυνατούς συνδυασμούς δυο διαφορετικών υπομονάδων. Στον καπνό και την άμπελο η καταλάση των φύλλων (CAT1) αναλύθηκε σε, 5 και 12 ισοένζυμα αντίστοιχα, με την τεχνική της ισοηλεκτρικής εστίασης (Siminis *et al.*, 1994). Οι ισοενζυμικές μορφές της CAT1 αποτελούνται από δύο υπομονάδες και στα δύο φυτά, την υπομονάδα α (περίπου 57 KD και στα δύο φυτά) και την υπομονάδα β (περίπου 56 και 55 KD στο καπνό και στην άμπελο, αντίστοιχα). Τα πολυπεπίδια α (λιγότερο όξινη) και β (περισσότερο όξινη) είναι προϊόντα δυο διαφορετικών γονιδιακών αλληλομόρφων (Scandalios *et al.*, 1984; Ni and Trelease, 1991). Ωστόσο, το πλήθος των αλληλομόρφων που έχει καταγραφή για το γονίδιο της μεσοφυλλικής καταλάσης (CAT 1) ποικίλει στα C₃ φυτά.

Στα ανώτερα φυτά (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Oriza sativa* και *Zea mays*), έχουν απομονωθεί cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν για τρεις διαφορετικές κατηγορίες καταλασών (Frugoli *et al.*, 1998; McClung, 1997). Αντίστοιχα, στο γονιδίωμα της *Nicotiana plumbaginifolia*, έχουν αναγνωριστεί τρία ενεργά γονίδια, που κωδικοποιούν για ισάριθμες ισοενζυμικές μορφές καταλάσης (CAT 1, CAT 2, CAT 3) (Willeken *et al.*, 1994). Παρόμοια μελέτη καταγράφει την ύπαρξη τριών βιοχημικά διακριτών ισοενζύμων, τα οποία κωδικοποιούνται από τρία ασύνδετα πυρηνικά γονίδια (cat 1, cat 2, cat 3) (Scandalios, 1994). Το cat 1 αντιπροσωπεύει το 80% της ενεργότητας του φύλλου, ενώ το cat 2 το 20% της συνολικής ενεργότητας (Van Breusegem *et al.*, 2001).

Οι καταλάσεις στα C₃ φυτά διακρίνονται σε τρεις κλάσεις με βάση την ομολογία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων τους, το φυσιολογικό τους ρόλο και την ιστοειδίκευσή τους. Η κλάση I περιλαμβάνει καταλάσεις εντοπισμένες στους φωτοσυνθετικά δραστήριους ιστούς του φυτού, όπως τα κύτταρα του μεσοφύλλου και το χλωροφυλλούχο παρέγχυμα του βλαστού, και ευθύνεται για την απομάκρυνση του H₂O₂ που παράγεται κατά τη φωτοαναπνοή. Στην κλάση αυτή εντάσσονται η CAT1 της *N. Plumbaginifolia*, η CAT2 της *Arabidopsis thaliana*, η CATST1 της πατάτας, SU2 του βαμβακιού κ.α. Στην κλάση II περιλαμβάνονται ισοένζυμα των καταλασών, τα οποία εδράζονται στα ηθμώδη στοιχεία του βλαστού,

των φύλλων και της ρίζας. Στην κλάση αυτή ανήκουν τα προϊόντα των γονιδίων CAT2 της *N. Plumbaginifolia* και CATST2 της πατάτας. Παρόλο που ο ακριβής ρόλος τους παραμένει ακόμη αινιγματικός, φαίνεται να συμμετέχουν στη λιγνιτοποίηση. Τέλος, η τρίτη κλάση των καταλασών (III) περιλαμβάνει ισοένζυμα, που εδράζονται αποκλειστικά στα γλυοξυσώματα του ενδοσπερμίου και η ενεργότητά τους συνδέεται με την απόσβεση του H₂O₂ που παράγεται κατά την οξείδωση των λιπαρών οξέων εκεί (Willekens *et al.*, 1994).

Η προηγούμενη διάκριση των καταλασών σε τρεις διαφορετικές κλάσεις δεν συμπίπτει με τις ισοενζυμικές μορφές, που έχουν αναγνωριστεί στα C4 φυτά (π.χ. καλαμπόκι). Συγκεκριμένα, τα γονίδια της καταλάσης του καλαμποκιού και τα αντίστοιχα ισοενζυμικά τους προϊόντα εμφανίζουν ένα ιδιαίτερο πρότυπο ιστολογικής κατανομής και αποκρίνονται διαφορετικά στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Scandalios *et al.*, 1984; Scandalios, 1994). Το μετάγραφο του γονιδίου *cat1*, για παράδειγμα, καθώς και το τελικό του προϊόν συγκεντρώνονται σε χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα του μεσοφύλλου, ανεπηρέαστα από την ποιότητα και την ένταση του φωτισμού (Redinbaugh *et al.*, 1990). Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου *cat2* εντοπίζεται στα κύτταρα του δεσμικού κολεού και ρυθμίζεται θετικά από το φως (Skadsen and Scandalios, 1987). Τέλος, το *cat3* (στα κύτταρα του μεσοφύλλου) είναι το μόνο γονίδιο καταλάσης το οποίο ρυθμίζεται μεταγραφικά από κερκαδικό ρολόι (Boldt *et al.*, 1995).

1.2.1. Ο ρόλος της καταλάσης στις βιοτικές καταπονήσεις

Υψηλά επίπεδα H₂O₂, στο σημείο προσβολής του φυτού από το παθογόνο, είναι ιδιαίτερα τοξικά, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα στο φυτό να προκαλεί τοπικό κυτταρικό θάνατο για την παρεμπόδιση της παραπέρα εξάπλωσης του παθογόνου. Αυτό περιγράφεται ως αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) για ασύμβατες σχέσεις φυτού – παθογόνου (Chamnongpol *et al.*, 1996).

Η πρώτη διαπίστωση ότι το H₂O₂ αποτελεί ένα δυναμικό για το φυτό ερέθισμα έρχεται με την ταυτοποίηση της καταλάσης ως πρωτεΐνης, που συνδέεται με το σαλικυλικό οξύ (SA). Το τελευταίο φέρεται ως το χημικό-μόριο κλειδί για την εκδήλωση τοπικής (LAR) και συστημικής (SAR) εξάπλωσης της ανθεκτικότητας σε πολλά φυτικά είδη (Friedrich *et al.*, 1995). Έχει προταθεί η αναστολή της δράσης της καταλάσης όταν δεσμεύει το σαλικυλικό οξύ (SA) και τα άλλα βιοενεργά παράγωγά

του (Takahashi *et al.*, 1997). Το παραπάνω έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση H_2O_2 , η οποία οδηγεί στην επαγωγή των PR γονιδίων (pathogenesis-related genes) (Chen *et al.*, 1993α; 1993β). Σε γενετικά τροποποιημένα φυτά με καταστολή της μεσοφυλλικής καταλάσης παρατηρήθηκε, κάτω από συνθήκες έντονου φωτισμού, εκτεταμένη νέκρωση στα παλαιότερα φύλλα και παραγωγή της PR-1 πρωτεΐνης στο υπόλοιπο υγιές φύλλωμα (Takahashi *et al.*, 1997; Chamnongpol *et al.*, 1998). Επιπλέον, όταν τα φυτά αυτά διασταυρώθηκαν με γενετικά τροποποιημένα φυτά *NAHG*, τα οποία υπερέκφραζαν το ένζυμο αποδόμησης του σαλικυλικού οξέος, η συστηματική επαγωγή της PR – 1 δεν υπήρχε στους απογόνους (Friedrich *et al.*, 1995). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι η υποέκφραση της καταλάσης δεν είναι αρκετή από μόνη της για την εκδήλωση της SAR (Du and Klessing, 1997).

Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις με το σαλικυλικό οξύ αποδίδονται στις καταλάσες της κλάσης I. Έχει όμως διαπιστωθεί ότι το σαλικυλικό οξύ μπορεί να δεσμευτεί και από τις καταλάσες της κλάσης II σε γενετικά τροποποιημένες πατάτες (υπερέκφραση του γονιδίου *cat2 Nt* από φυτά καπνού), εκδηλώνοντας SAR ενάντια στο παθογόνο μύκητα *P. infestans* (Yu *et al.*, 1999). Επιπλέον, η CAT2 έχει αναγνωριστεί ως κύριος αποδέκτης του SA, παρότι αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 20% της καταλατικής ενεργότητας στο φύλλο (Chen *et al.*, 1993α; 1993β). Το τελευταίο οδήγησε στην υπόθεση ότι η CAT2 συνιστά πιθανόν τον ευαίσθητο στο SA διακόπτη ο οποίος, αναστέλλοντας τη δράση της, ενισχύει την παραγωγή κύματος H_2O_2 (Nieben *et al.*, 1995). Το κύμα H_2O_2 μεταφέρεται, μέσω ενός μηχανισμού αυτοκατάλυσης, σε όλα τα τμήματα του φυτού προσδίδοντας του συστηματική εξάπλωση ανθεκτικότητας ενάντια στα παθογόνα (Rao *et al.*, 1997; Van Camp *et al.*, 1998).

Η παρατήρηση σχετικά με το ρόλο, που διαδραματίζει το H_2O_2 ως χημικό μήνυμα για την εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας καθώς και για την τοπική και συστηματική εξάπλωση της ανθεκτικότητας είναι ιδιαίτερα ελκυστική, γιατί αναδεικνύει τον σημαντικό ρόλο των EMO, γενικότερα, στην ανάπτυξη μηχανισμών προστασίας από το φυτό κατά τη διάρκεια βιοτικών καταπονήσεων. Για το λόγο αυτό, πολλά εργαστήρια προσπαθούν να αποκωδικοποιήσουν το κρίκο ανάμεσα στην καταλάση, το σαλικυλικό οξύ και τα φαινόμενα της HR, LAR και SAR.

1.2.2. Ο ρόλος της καταλάσης στις αβιοτικές καταπονήσεις

Το H_2O_2 είναι γνωστό ότι συμμετέχει σε μεγάλη ποικιλία αβιοτικών καταπονήσεων, όπως αλατότητα, ζιζανιοκτόνα (π.χ. paraquat, cercosporin), όζον, υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες, ατμοσφαιρικοί ρυπαντές (SO_2) κ.α. Η αυξημένη ευαισθησία, σε καταπονήσεις από αλατότητα και όζον (Orvar *et al.*, 1997), γενετικά τροποποιημένων φυτών που υποεκφράζουν την CAT1, αναδεικνύει τον ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο της καταλάσης, όσον αφορά την απομάκρυνση του H_2O_2 που παράγεται κατά τη διάρκεια της φωτοαναπνοής (Willekens *et al.*, 1997). Η δράση της καταλάσης μπορεί να παρατηρηθεί και σε σημεία εκτός του υποκυτταρικού της εντοπισμού. Το παραπάνω παρατηρήθηκε όταν η καταλάση ενέθηκε στο διακυτταρικό χώρο σε φύλλα φυτών με καταστολή της περοξεισωμικής καταλάσης (Willekens *et al.*, 1997).

Τα C4 φυτά εμφανίζουν αρκετά χαμηλότερα επίπεδα φωτοαναπνοής από ότι τα C3 φυτά, το οποίο εξηγεί τη μικρότερη ευαισθησία φυτών που υποεκφράζουν την καταλάση στις αβιοτικές καταπονήσεις (Scandalios, 1994). Η φωτοαναπνοή αποτελεί, επίσης, θεμελιώδη διαδικασία για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ φωτεινών και σκοτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης κατά τη διάρκεια αντίξοων περιβαλλοντικών συνθηκών. Μείωση στην αφομοίωση του άνθρακα, είτε εξαιτίας της μειωμένης διαθεσιμότητας του CO_2 ή επειδή τα ένζυμα αφομοίωσης του δεν είναι αρκετά λειτουργικά, παρατηρείται συχνά κατά τη διάρκεια καταπονήσεων. Αυτή η μείωση της αφομοίωσης άνθρακα μπορεί να αποφευχθεί από φυτά με υψηλότερη ενεργότητα καταλάσης οδηγώντας σε αυξημένη φωτοσυνθετική απόδοση (Brisson *et al.*, 1998).

Το μοντέλο της καταστολής της CAT1 σε φυτά καπνού είναι πολύ ελκυστικό, γιατί επιτρέπει την αύξηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε συνθήκες υψηλού φωτισμού (Willekens *et al.*, 1997). Η γλουταθειόνη είναι αναγκαία για την αντιοξειδωτική άμυνα, τη διατήρηση σταθερού οξειδοαναγωγικού δυναμικού και τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων στα φυτά (Foyer *et al.*, 1997), οπότε γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι στην οξειδωμένη της μορφή μπορεί να αποτελέσει δυναμικό εκκινήτη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (PCD).

Οξειδωτική καταπόνηση έχει διαπιστωθεί σε φυτά *A. thaliana* (παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργότητα της CAT3) ύστερα από μεταχείρισή τους με paraquat (Orendi *et al.*, 2001). Το paraquat διακόπτει την φωτοσυνθετική ροή

ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα τη διοχέτευση της ενέργειας στο O_2 και την αναγωγή του σε $O_2^{\bullet-}$ (Dodge, 1994). Η συνδυασμένη δράση του paraquat και του φωτός προκαλεί αυξημένη οξειδωτική καταπόνηση στους χλωροπλάστες, αφού το κύριο σημείο δέσμευσης ηλεκτρονίων από το paraquat θεωρείται το κέντρο Fe-S στο φωτοσύστημα I (Fujii *et al.*, 1990). Το $O_2^{\bullet-}$ μετατρέπεται, στην συνέχεια, σε H_2O_2 είτε αυθόρμητα ή με τη δράση της SOD (Bowler *et al.*, 1992). Φυλλικοί δίσκοι από γενετικά τροποποιημένα φυτά που υποεκφράζουν την καταλάση έδειξαν αξιοσημείωτη ευαισθησία σε μεταχειρίσεις με paraquat, παρουσία ήπιου φωτισμού (Willekens *et al.*, 1997).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, οδηγηθήκαμε στην πεποίθηση ότι η συστατική έκφραση κάποιων ενζύμων της αντιοξειδωτικής μηχανής πιθανότατα να βελτιώσει την αντοχή των C_3 φυτών σε ποικίλες μορφές αβιοτικής καταπόνησης. Ένα από τα υποψήφια ένζυμα είναι η καταλάση. Σκοπός της εργασίας, ήταν η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού, με κυτοπλασμική έκφραση της μεσοφυλλικής καταλάσης (CAT1). Για την έκφραση της CAT 1 στο κυτόπλασμα, είχε εκφυλιστεί το πεπτίδιο σύνθημα, το οποίο την οδηγεί κανονικά στα περοξεισώματα. Φυτά T_1 γενιάς αξιοποιήθηκαν στη μελέτη της συμβολής της αντιοξειδωτικής προστασίας, που παρέχει η καταλάση, στο paraquat και το H_2O_2 .

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Ανάπτυξη φυτών

T₁ γενιάς σπόροι καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1*) χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Οι T₁ απόγονοι προήλθαν από αυτογονιμοποίηση γενετικά τροποποιημένων φυτών με έκφραση του διαγονιδίου Cat1 στο κυτόπλασμα. Το διαγονίδιο Cat1 είχε προέλθει από εκφυλισμό του πεπτιδίου συνθήματος (οδηγεί την CAT 1 στα περοξεισώματα), μέσω αντίδρασης PCR (Polymerase Chain Reaction). Στην T₁ γενιά το διαγονίδιο βρίσκεται σε ομόζυγη κατάσταση.

Οι σπόροι υποβλήθηκαν σε επιφανειακή απολύμανση με διάλυμα υποχλωριώδους οξέος (εμπορικό σκεύασμα) σε αραιώση 10% v/v όπου και παρέμειναν για 10 min και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS, παρουσία καναμυκίνης (300 μg/mL) και απουσία ορμονών (Murashige and Skoog, 1962). Τα τριβλία διατηρήθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με φωτοπερίοδο 16/8h, ένταση φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας (PAR, 400-700nm) 40 μmole·m⁻²·sec⁻¹ και θερμοκρασία 25.5±0.5°C. Εκεί παρέμειναν μέχρι την πλήρη φύτευση των σπόρων (πάνω από 80%). Οι φυτρωμένοι σπόροι, στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε νέα τριβλία με MS για την καλύτερη ανάπτυξή τους και παρέμειναν εκεί μέχρι να ριζοβολήσουν. Όταν τα ριζοβολημένα φυτάρια απέκτησαν ύψος 2-3 cm, μεταφυτεύτηκαν σε μίγμα χώματος, τύρφης και περλίτη (4:2:1, v/v/v) και εξακολούθησαν να παραμένουν στο θάλαμο σταθερών συνθηκών, ώστε να σκληραγωγηθούν βαθμιαία στις κλιματικές συνθήκες. Η μεταφορά τους στο θερμοκήπιο έγινε όταν το ύψος τους ξεπέρασε τα 15 cm.

2.2. Εκχύλιση πρωτεϊνών από φύλλα καπνού

Για όλες τις πρωτεϊνικές εκχυλίσεις, επιλέχθηκε το 4^ο – 5^ο φύλλο από τη βάση φυτών ύψους 12-15 cm (στάδιο 6^{οο}-8^{οο} φύλλου). Αφού αφαιρέθηκε το κεντρικό νεύρο, το εμπρόσθιο τμήμα του φύλλου (~ 0,3 g) λειοτριβήθηκε μέσα σε 1 mL παγωμένου διαλύματος εκχύλισης με τη βοήθεια μικρής ποσότητας λεπτής

χαλαζιακής άμμου. Η σύσταση του διαλύματος εκχύλισης ήταν: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 500 μ M PMSF, 10 μ M Leupeptin, 0.1% (v/v) Triton X100 και 10% (w/v) PVPP. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στις 12000 g για 20 min στους 4°C (Heraeus, Biofuge 22R). Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τις ενζυμικές αντιδράσεις. Σε όλα τα βήματα της διαδικασίας, τα φυτικά εκχυλίσματα παρέμειναν στους 0°C.

2.3 Προσδιορισμός της ενεργότητας της καταλάσης (CAT)

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της καταλάσης πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα φύλλων και βασίστηκε στην αποδόμηση του H₂O₂, όπως αυτή προσδιορίζεται ποσοτικά με φασματοφωτομετρία. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε ο ρυθμός ελάττωσης της απορρόφησης του H₂O₂ στα 240 nm στους 30°C. Η αντίδραση της καταλάσης πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο της Perkin-Elmer (*Lamda 20*) και χρησιμοποιήθηκαν χαλαζιακές κυβέτες των 3 mL. Το διάλυμα αντίδρασης περιείχε 50 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄, pH 8.0, 15 μ M H₂O₂ και ποσότητα εκχυλίσματος ισοδύναμη με 20 μ g ολικής πρωτεΐνης σε τελικό όγκο 3 mL. Η λήψη των μετρήσεων έγινε με την βοήθεια αυτοματοποιημένου προγράμματος, σύμφωνα με το οποίο για κάθε αντίδραση λαμβάνονται τιμές απορρόφησης στα 240 nm, ανά 0.5 sec και για συνολική διάρκεια 1 min από τη στιγμή προσθήκης του εκχυλίσματος. Για κάθε φυτό πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις της αντίδρασης, για κάθε μέτρηση. Η μετατροπή της μετρούμενης διαφοράς απορρόφησης σε μονάδες ενζυμικής ενεργότητας (Units), έγινε με βάση το μοριακό συντελεστή απορρόφησης, $\epsilon = 0.036 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ και οι τιμές ανάχθηκαν στο 1 mg πρωτεΐνης (ειδική ενεργότητα). Τέλος, ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα με τους Lowry *et al.* (1951).

2.4. Ανοσοεντοπισμός της καταλάσης

Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έγινε ανοσοανίχνευση της καταλάσης, CAT-1, του καπνού με τη χρήση πολυκλωνικού ορού κατά του ιδίου ενζύμου της τομάτας. Ο ηλεκτροφορετικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το σύστημα Laemmli (Laemmli, 1970) και χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mini Protean II

της BioRad. Η περιεκτικότητα της πηκτής διαχωρισμού σε πολυακρυλαμίδη ήταν 7.5% και το πάχος της 1.5 mm. Η μετουσίωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε με την προσθήκη SDS-αποδιατακτικού διαλύματος σε τελική συγκέντρωση 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v/v) γλυκερόλη, 2% (w/v) SDS και 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλης (Mattoo *et al.*, 1981). Σε κάθε βοθρίο φορτώθηκαν 30 μg ολικής πρωτεΐνης. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν 80V για την πηκτική συσσώρευσης και 120V για την πηκτική διαχωρισμού.

Για την τεχνική του western blot χρησιμοποιήθηκε η συσκευή μεταφοράς Mini Trans Blot της BioRad και μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0.2 mm. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 25 mM Tris- γλυκίνης, pH 8.3, σε σταθερή τάση 80 V και συνεχίστηκε, μέχρις ότου, η τιμή της έντασης του ρεύματος φθάσει τα 400 mA (περίπου 45 min). Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πλύθηκε σε διάλυμα 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 διάλυμα PBS - 5% (w/v) αποβουτυρωμένης σκόνης γάλακτος, όπου και παρέμεινε, υπό ελαφρά ανάδευση, για 1h. Με τη διαδικασία αυτή μπλοκάρονται οι αδέσμευτες θέσεις στην επιφάνεια της μεμβράνης. Ακολούθησαν διαδοχικά πλυσίματα (5 φορές για 5 min) της μεμβράνης με διάλυμα PBS / 0.05% (v/v) Tween-20. Στην συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2h με το, αντίσωμα [αραίωση 1:5000 (v/v)]. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη, έγινε εναντίον της καταλάσης από καρπό ντομάτας (Inamine and Baker, 1989). Η αραίωση του αρχικού ορού έγινε σε διάλυμα PBS, 0.05% (v/v) Tween-20 και 1% (w/v) BSA. Κατόπιν, η μεμβράνη ξεπλύθηκε σε διάλυμα PBS – 0.05% (v/v) Tween-20 (5 φορές για 5 min), για να ακολουθήσει η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα (anti-Rabbit IgG; Sigma), αναγνωρίζει τη σταθερή περιοχή, Fc, των ανοσοσφαιρινών τάξεως IgG του κουνελιού και φέρει προσαρτημένο το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης. Η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα πραγματοποιήθηκε, επίσης, σε θερμοκρασία δωματίου, για 2h και με συνεχή ανακίνηση. Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, η μεμβράνη ξεπλύθηκε αρχικά με διάλυμα PBS – 0.05% (v/v) Tween-20 (2 φορές για 5 min) και στη συνέχεια με διάλυμα 0.1 M διαιθανολαμίνης (DEA), pH 9.6 (επίσης, 2 φορές για 5 min).

Η χρώση της μεμβράνης από τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης στηρίζεται στον οξειδωτικό πολυμερισμό του άλατος του τετραζολίου NBT (μπλε του

νιτροτετραζολίου), προς κεραμέρυθρη φορμαζάνη. Το απαιτούμενο οξειδοαναγωγικό δυναμικό προκύπτει από τη μετατροπή του υποστρώματος του ενζύμου, 5-βρώμο-4-χλώρο-3-ίνδολο φωσφορικού οξέος (BCIP) Το διάλυμα αντίδρασης περιείχε 0.1 M DEA, pH 9.6, 0.01% (w/v) NBT και 1‰ (w/v) BCIP. Η αντίδραση τερματίστηκε με εμφύσηση της μεμβράνης σε απιονισμένο ύδωρ.

2.5. Έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις paraquat (methyl viologen)

Οκτώ φυλλικοί δίσκοι από κάθε φυτό, κόπηκαν με τη χρήση φελλοτρυπητήρα και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες falcon με paraquat σε συγκεντρώσεις 0 μM, 0.6μM και 1.2μM. Εκεί επώαστηκαν για 12h στο σκοτάδι σε θάλαμο σταθερών συνθηκών, θερμοκρασίας $25.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, επιτρέποντας στο paraquat να διεισδύσει στα φωτοσυνθετικά κύτταρα. Ακολούθησε έκθεση των φυλλικών δίσκων για 3h σε συνθήκες κανονικού φωτισμού ($100 \mu\text{mole} \cdot \text{photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$) εξασφαλίζοντας πλήρη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Οι φυλλικοί δίσκοι μεταφέρθηκαν στην συνέχεια για 16h στο σκοτάδι για έκλυση ηλεκτρολυτών (ion leakage). Η έκλυση ηλεκτρολυτών είναι αποτέλεσμα της αποδιάταξης των κυτταρικών μεμβρανών, εξαιτίας της δράσης του paraquat στους χλωροπλάστες, κατά τη διάρκεια της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας.

Η ζημιά που προκλήθηκε στα φυτικά κύτταρα προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της αγωγιμότητας των ηλεκτρολυτών για τις διάφορες συγκεντρώσεις paraquat ως κινητική στο χρόνο. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της επώασης των φυλλικών δίσκων για 16h στο σκοτάδι, ενώ η τελική μέτρηση καταγράφηκε 10h μετά τη λήξη της επώασης. Η μέτρηση της αγωγιμότητας των ηλεκτρολυτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αγωγιμόμετρου.

Ο προσδιορισμός του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων στους φυλλικούς δίσκους, καθώς και της περιεκτικότητάς τους σε χλωροφύλλη, αποτελούν δύο ακόμη δείκτες της ζημιάς που προκλήθηκε από το paraquat.

2.6. Έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂

Οκτώ φυλλικοί δίσκοι από κάθε φυτό, κόπηκαν με τη χρήση φελλοτρυπητήρα και, αφού τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες falcon με H₂O₂ σε συγκεντρώσεις

10 mM και 100 mM, μεταφέρθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με συνεχές φωτισμό, ένταση φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας (PAR, 400-700nm) 40 $\mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ και θερμοκρασία $25.5\pm 0.5^\circ\text{C}$. Η ζημιά που προκλήθηκε στα φυτικά κύτταρα προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της αγωγιμότητας των ηλεκτρολυτών για τις διάφορες συγκεντρώσεις H_2O_2 ως κινητική στο χρόνο. Οι μετρήσεις ξεκίνησαν αμέσως μετά τη μεταφορά των φυλλικών δίσκων στο θάλαμο σταθερών συνθηκών.

2.7. Εκχύλιση και ποσοτικός προσδιορισμός των χλωροφυλλών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των χλωροφυλλών α και β έγινε φασματοφωτομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο της Holden (1965). Σε φυλλικούς δίσκους (περίπου 0.1 gr) έγινε εκχύλιση των χλωροφυλλών με προσθήκη 80-90% μεθανόλης. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε για 5min σε 13000 g. Το υπερκείμενο, στη συνέχεια φωτομετρήθηκε στα 650 και 665 nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των χλωροφυλλών βασίστηκε στις παρακάτω εξισώσεις. Οι τελικές τιμές εκφράστηκαν σε $\mu\text{g}/\text{mL}$.

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

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

2.8. Ποσοτικός Προσδιορισμος του Malondialdehyde ως δείκτη περοξειδωσης των λιπιδίων

Για τον προσδιορισμό του Malondialdehyde χρησιμοποιήθηκαν 100 mg ιστού τα οποία λειοτριβήθηκαν σε υγρό άζωτο και ομογενοποιήθηκαν σε 1.2 mL διαλύματος 5% TCA (trichloroacetic acid) και 0.12 mL διαλύματος μεθανολικού BHT (butylated hydroxytoluene, 0.5 g/L). Το εκχύλισμα επώαστηκε για 30min σε νερό θερμοκρασίας περίπου 95°C για την ελευθέρωση του πρωτεϊνοσυνδεδετού MDA και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε για 15min σε 10000 g. Η ίδια διαδικασία φυγοκέντρωσης επαναλήφθηκε άλλες δύο ως τρεις φορές, μέχρι τον καθαρισμό του υπερκειμένου. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και σε αυτό προστέθηκε ίσος όγκος 0.67% TBA (thiobarbituric acid). Ακολούθησε επώαση του συνολικού μίγματος για 30 min σε βραστό νερό ($\sim 95^\circ\text{C}$) επιτρέποντας την ολική ελευθέρωση MDA.

Το συνολικό μίγμα (αφού κρύωσε πρώτα σε θερμοκρασία δωματίου) φωτομετρήθηκε στα 600 nm. Για τον προσδιορισμό της απορρόφησης στα 600 nm το φωτόμετρο μηδενίστηκε πρώτα στα 532 nm. Η σύσταση του τυφλού ήταν 5% TCA, 50 μ L methanolic BHT και 67% TBA σε τελικό όγκο 1 mL. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του MDA βασίστηκε στην παρακάτω εξίσωση:

$$\text{MDA (nmol/g φ. β.)} = \frac{\Delta A(600\text{nm} - 532\text{nm}) / \varepsilon * b}{500} \times 10^9 \text{ φρέσκο βάρους (mg)}$$

(ε : 155,000; b: πάχος κυψελίδας = 1 cm; φ.β.: φρέσκο βάρος; ΔA : διαφορά απορρόφησης)

2.9. Απομόνωση γενωμικού DNA

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA από φύλλα εφαρμόστηκε παραλλαγή του πρωτοκόλλου που καθιερώθηκε από τους Delaporta *et al.* (1983). Αναλυτικότερα, 1 g φύλλου από κάθε φυτό κονιορτοποιήθηκε, με λειοτρίβηση παρουσία υγρού αζώτου και η λεπτή σκόνη, που σχηματίστηκε, αιωρήθηκε σε 15 mL διαλύματος εκχύλισης (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β -μερκαπτοαιθανόλη). Ακολούθησε προσθήκη 1 mL διαλύματος 20% SDS και, μετά από ήπια ανάδευση, το αιώρημα επώαστηκε στους 65°C, για 15 min. Στη συνέχεια, εξισορροπήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκαν 5 mL παγωμένου διαλύματος 5 M οξικού καλίου. Το αιώρημα αναμιείχθηκε ελαφρά και παρέμεινε στον πάγο για 30 min. Κατόπιν, φυγοκεντρήθηκε στις 5000 g για 15 min στους 4°C και συλλέχθηκε το διαυγές υπερκείμενο. Για την αποτελεσματικότερη απομάκρυνση των υπολειμμάτων φυτικού ιστού, το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσα από φίλτρο Miracloth (Hoechst; 18" x 50'). Στο διήθημα προστέθηκαν 10 mL ισοπροπανόλης και το διάλυμα μεταφέρθηκε στους -20°C, όπου και παρέμεινε για 30 min. Ύστερα από φυγοκέντρηση στις 12000 g για 30 min στους 4°C, το γενωμικό DNA εμφανίστηκε ως πελλέτα υπόλευκου χρώματος και επαναδιαλύθηκε σε 400 μ L ρυθμιστικού διαλύματος TE (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA). Η διαδικασία συνεχίστηκε με την προσθήκη 400 μ L διαλύματος 2% CTAB [200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 2 M NaCl και 2%(w/v) βρωμιούχο σετρίμιονιο] και επώαση στους 65°C για 15 min. Ακολούθησε σχολαστική ανάμιξη με ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1), συλλογή της υδατικής φάσης και

κατακρήμνιση του DNA, με την προσθήκη υποδεκαπλάσιου όγκου διαλύματος 3 M οξικού νατρίου, pH 5.4, διπλάσιου όγκου 100% αιθανόλης και φυγοκέντρωση στις 14000 g για 15 min στους 4°C. Η πελλέτα ξεπλύθηκε σε 70% αιθανόλη και επαναδιαλύθηκε σε 100 µL διαλύματος TE. Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά, με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4°C.

2.10. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Τα φυτά της T₁ γενιάς ελέγχθηκαν για την παρουσία του *nptII* στο γένωμά τους. Το *nptII* είναι το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη και ήταν ενσωματωμένο στο φορέα pBIPVMI (Μυλωνά, αδημοσίευτα αποτελέσματα), που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την τροποποίηση των φυτών (T₀ γενιά). Στο pBIPVMI είχε κλωνοποιηθεί το μεταλλαγμένο, για το πεπτίδιο σύνθημα, Cat 1 γονίδιο. Η μεταλλαγή στο πεπτίδιο σύνθημα είχε γίνει με την χρησιμοποίηση εκφυλισμένων εκκινητών, οι οποίοι πολλαπλασίασαν το πλήρες μήκος του cDNA κλώνου του Cat 1 γονιδίου του καπνού (*N. tabacum*).

Για τον πολλαπλασιασμό του *nptII* γονιδίου κατασκευάστηκαν οι παρακάτω εκκινητές:

NPT – US1

5' – GGT TCT CCG GCC GCT TGG – 3'

Ποσότητα	7.7 O.D, 245 µg, 44.5 nM
Συγκέντρωση (όγκος 1 mL)	45 pmol/µL
Μοριακό Βάρος	5499 g/mol
Θερμοκρασία υβριδοποίησης (T _m)	62.8 ⁰ C
Μήκος εκκινητών	18 nt
Περιεκτικότητα σε GC	72.2 %

NPT – US2

5' – TCG GGA GCG GCG ATA CCG – 3'

Ποσότητα	7.4 O.D, 210 µg, 37.8 nM
Συγκέντρωση (όγκος 1 mL)	38 pmol/µL
Μοριακό Βάρος	5566 g/mol
Θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_m)	62.8 ⁰ C
Μήκος εκκινητών	18 nt
Περιεκτικότητα σε GC	72.2 %

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 µL, ο οποίος περιείχε 20 – 30 ng γενωμικού DNA. Συγκεκριμένα, για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε όγκος 5 µL (20 – 30 ng) DNA, ο οποίος προστέθηκε σε 20 µL PCR μείγματος αντίδρασης. Η σύσταση για κάθε μείγμα αντίδρασης ήταν η ακόλουθη:

- 4 µL διαλύματος MgCl₂
- 4 µL dNTPs
- 0.5 µL NPT - US1
- 0,5 µL NPT – US2
- 0.2 µL Taq DNA polymerase
- 10.8 µL H₂O

Στην αρχή της αντίδρασης το DNA αποδιατάκτηκε για 5 min στους 95⁰ C (1 κύκλος αντίδρασης). Ακολούθησαν άλλοι 46 κύκλοι στις εξής συνθήκες:

→ 1 min αποδιάταξη του DNA σε θερμοκρασία 95⁰

→ 1 min υβριδισμός των εκκινητών σε θερμοκρασία 62⁰C

→ 2 min επιμήκυνση σε θερμοκρασία 72⁰C

Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με 5 min επιμήκυνση στους 72⁰C. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν σε 1.5% πηκτώματος αγαρόζης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φυτά T₁ γενιάς (φέρουν το διαγονίδιο σε ομόζυγη κατάσταση), τα οποία προήλθαν από αυτογονιμοποίηση γενετικά τροποποιημένων φυτών (T₀ γενιά) που έφεραν το construct pBPIVM1 (Μυλωνά, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το construct αυτό περιείχε τον πλήρη cDNA κλώνο της CAT 1 (*N. tabacum*), μεταλλαγμένο ως προς το πεπτίδιο σύνθημα.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 20 διαφορετικοί γενότυποι (σειρές). Η κάθε σειρά περιελάμβανε 5 επαναλήψεις οπότε ο συνολικός αριθμός των φυτών ήταν 100. Μεταξύ των 100 φυτών υπήρχαν και 5 φυτά μάρτυρες (SR1). Αρχικά, τα 100 φυτά (γενετικά τροποποιημένα και φυτά μάρτυρες) αναλύθηκαν ως προς τις ενζυμικές τους ενεργότητες σε τρία διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, και πριν ακόμα απομακρυνθούν από το θάλαμο σταθερών συνθηκών, προκειμένου να εξασφαλιστεί η ομοιομορφία. Ο καθορισμός των αναπτυξιακών σταδίων έγινε ως εξής:

- 1⁰ αναπτυξιακό στάδιο → το ύψος του φυτού ήταν 2 – 3 cm και ο αριθμός των φύλλων του δεν ξεπερνούσε τα 3 – 4,
- 2⁰ αναπτυξιακό στάδιο → το ύψος του φυτού ήταν 5 – 6 cm και ο αριθμός των φύλλων του 6 – 7,
- 3⁰ αναπτυξιακό στάδιο → το ύψος του φυτού δεν ξεπερνούσε τα 12 cm και ο αριθμός των φύλλων του 12 – 15.

3.1. Ενζυμική ενεργότητα καταλάσης σε φυτά T₁ γενιάς

Η εξέταση, συνολικά, των φυτών στο 1⁰ αναπτυξιακό στάδιο (Πίνακας 1) αποκάλυψε αξιοσημείωτες διακυμάνσεις στην ενεργότητα της καταλάσης. Πιο συγκεκριμένα υπήρχαν φυτά, τα οποία με βάση την ειδική ενεργότητα καταλάσης, εμφάνισαν τιμές μέχρι και 2 φορές πάνω σε σχέση με φυτά μάρτυρες. Τα υπόλοιπα φυτά παρουσίασαν μια ήπια, έως αμελητέα, αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας και μερικά ακόμα και φαινόμενα καταστολής. Ωστόσο, δεν έχει προταθεί συσχετισμός μεταξύ του επιπέδου καταστολής της ενεργότητας της καταλάσης και του αριθμού ενσωμάτωσης του διαγονιδίου στο φυτικό γονιδίωμα. Για την ακρίβεια ο Brisson *et al.* (1998) και οι συνεργάτες του παρατήρησαν μεγαλύτερη καταστολή της

ενεργότητας του ενζύμου σε γενετικά τροποποιημένα φυτά με ένα αντίτυπο του διαγονιδίου, απ' ότι σε φυτά που περιείχαν τουλάχιστον δυο αντίτυπα του διαγονιδίου στο γονιδίωμά τους.

Πίνακας 1. Ειδική ενεργότητα καταλάσης στο 1^ο Αναπτυξιακό Στάδιο. SR1: φυτά μάρτυρες; 1-A8: γενετικά τροποποιημένα φυτά

CAT activity(U/mg)						
Γενότυπος	α φυτό	β φυτό	γ φυτό	δ φυτό	ε φυτό	Mean±SD
1	1.47	2.09	1.92	2.04	1.70	1.84 ± 0.25
2	1.73	1.63	1.88	1.75	1.68	1.73 ± 0.09
4	1.72	1.83	1.52	1.37	1.63	1.62 ± 0.17
5	1.75	1.99	2.02	2.18	1.97	1.98 ± 0.17
6	1.24	0.76	1.04	1,80	1.74	1.31± 0.44
8	1.65	2.05	2.11	2.17	1.45	1.89 ± 0.31
9	1.20	1.22	1.88	1.23	1.96	1.50 ± 0.38
11	1.53	1.86	0.78	0.457		1.15 ± 0.65
12	0.74	1.80	0.63	0.64	0.51	0.87 ± 0.52
13	1.71	1.60	1.22	1.36	1.25	1.43 ± 0.21
16	1.29	1.06	1.14	1.30	1.15	1.19 ± 0.10
18	1.27	1.02	0.77	1.32	1.41	1.16 ± 0.26
19	1.06	1.23	1.82	1.53	1.87	1.50 ± 0.35
20	1.11	1.19	1.42	1.35	1.27	1.27 ± 0.12
21	1.89	1.11	0.43	1.02	0.42	0.97 ± 0.60
A1	1.29	2.02	2.10	1.73	1.84	1.79 ± 0.31
A3	0.50	0.74	0.57	0.85	0.76	0.68 ± 0.14
A5	1.76	2.10	1.935	1.35	1.56	1.74 ± 0.29
A8	1.10	0.78	0.54	1.49	0.73	0.93 ± 0.37
SR1	1.00	0.86	0.77	0.86	1.66	1.03 ± 0.09

Στο 2^ο αναπτυξιακό στάδιο (Πίνακας 2) όλα τα φυτά εμφάνισαν, γενικότερα, πιο αυξημένη ενεργότητα καταλάσης. Αυτό ήταν κάτι το αναμενόμενο καθότι όσο το φυτό αναπτύσσεται, παρατηρείται παράλληλα και αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου. Στο στάδιο αυτό τα φυτά στα οποία παρατηρήθηκε η πιο αυξημένη ενεργότητα ήταν τα A5α, A5γ, 11α, 11β και 5δ. Σημαντικό, επίσης, είναι το γεγονός ότι πολλά φυτά εξακολουθούσαν να διατηρούν χαμηλή ενεργότητα, σε σχέση με φυτά μάρτυρες.

Πίνακας 2. Ειδική ενεργότητα καταλάσης στο 2^ο Αναπτυξιακό Στάδιο. SR1: φυτά μάρτυρες; 1-A8: γενετικά τροποποιημένα φυτά

CAT activity(U/mg)						
Γενότυπος	α φυτό	β φυτό	γ φυτό	δ φυτό	ε φυτό	Mean±SD
1	1.777	1.914	2.130	1.949	2.021	1.95 ± 0.13
2	1.445	1.949	1.770	1.842	1.553	1.71 ± 0.2
4	1.661	1.805	1.769	1.697	1.552	1.69 ± 0.09
5	1.632	1.841	1.948	2.654	1.841	1.98 ± 0.39
6	1.351	0.984	1.243	1.752	1.146	1.29 ± 0.28
8	1.555	1.843	1.963	1.748	2.413	1.90 ± 0.32
9	1.279	1.122	1.639	0.798	1.457	1.25 ± 0.32
11	3.219	3.025	1.085	1.195	0.150	1.70 ± 1.37
12	1.231	2.036	1.639	0.761	1.057	1.34 ± 0.49
13	2.165	2.129	1.480	1.805	1.588	1.83 ± 0.3
16	0.509	1.446	1.589	1.423	1.697	1.33 ± 0.47
18	1.409	1.244	1.625	1.847	1.588	1.54 ± 0.22
19	1.361	1.200	1.018	1.489	1.712	1.35 ± 0.26
20	1.047	1.229	1.120	1.243	1.553	1.23 ± 0.19
21	1.232	1.444	1.086	1.157	0.908	1.16 ± 0.19
A1	1.446	1.805	1.404	1.590	1.516	1.55 ± 0.15
A3	0.976	0.761	0.904	0.883	0.977	0.90 ± 0.08
A5	2.826	1.673	3.118	1.480	1.521	2.12 ± 0.78
A8	1.236	0.555	0.564	2.400	1.787	1.30 ± 0.79
SR1	1.561	1.509	1.299	1.254	2.370	1.59 ± 0.45

Μετά την ολοκλήρωση και του 3^ο αναπτυξιακού σταδίου (Πίνακας 3) μπορούμε να έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη άποψη για την ειδική ενεργότητα της καταλάσης σε κάθε φυτό ξεχωριστά. Οι τιμές της ειδικής ενεργότητας του ενζύμου διατηρήθηκαν γενικά σταθερές για κάθε φυτό και στα τρία αναπτυξιακά στάδια. Εξαίρεση αποτέλεσαν τα φυτά 19β και 1ε, τα οποία στο τρίτο αναπτυξιακό στάδιο εμφάνισαν τιμές αρκετά υψηλότερες σε σχέση με τα προηγούμενα δυο αναπτυξιακά στάδια. Ειδικότερα, το 19β παρουσίασε την υψηλότερη τιμή από όλα τα φυτά, η οποία ήταν σχεδόν διπλάσια από το SR1β και SR1γ και σχεδόν πενταπλάσια από το SR1α. Αντίθετα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει και η περίπτωση του 11γ, για το οποίο δεν μετρήθηκε καθόλου ενεργότητα καταλάσης στο τρίτο αναπτυξιακό στάδιο, ενώ και

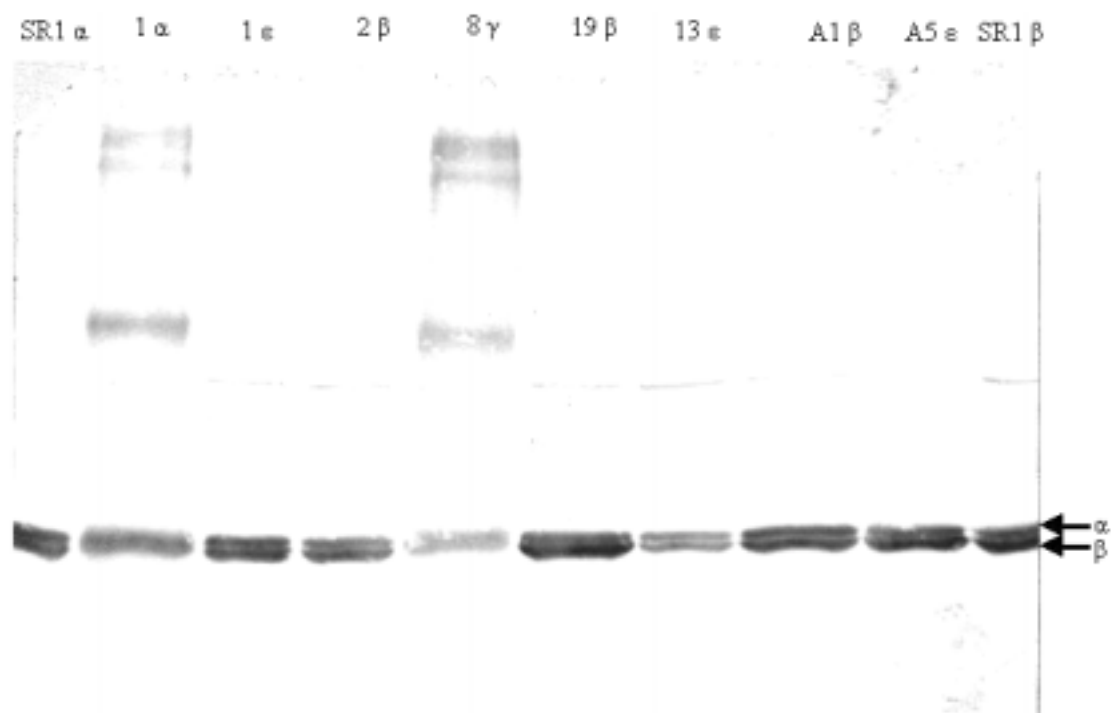
στα δύο προηγούμενα παρουσίασε πολύ χαμηλή τιμή. Τέλος, σταθερά υψηλή ενεργότητα και στα τρία αναπτυξιακά στάδια εμφάνισαν τα φυτά A5α, A5γ, 11α, 11β και 5δ.

Πίνακας 3. Ειδική ενεργότητα καταλάσης στο 3^ο Αναπτυξιακό Στάδιο. SR1: φυτά μάρτυρες; 1-A8: γενετικά τροποποιημένα φυτά

CAT activity(U/mg)						
Γενότυπος	α φυτό	β φυτό	γ φυτό	δ φυτό	ε φυτό	Mean±SD
1	4.200	3.050	3.231	2.670	5.900	3.81± 1.29
2	1.860	2.450	1.950	3.330	1.805	2.28 ± 0.64
4	1.850	2.102	2.300	1.848	1.805	1.98 ± 0.21
5	4.620	3.290	5.600	4.440		4.49 ± 0.94
6	1.552	1.589	1.770	2.130	1.842	1.78 ± 0.23
8	1.805	2.430	3.600	2.129	2.201	2.43 ± 0.68
9	1.554	1.589	2.129	3.440	2.273	2.20 ± 0.76
11	5.920	4.200	0.000	3.230	0.623	3.49 ± 2.21
12	2.420	2.093	1.302	1.122	1.231	1.63 ± 0.58
13	2.530	1.530	1.420	2.400	4.240	2.42 ± 1.13
16	2.100	2.250	1.900	1.900	1.800	1.99 ± 0.18
18	1.445	1.121	1.337	0.440	1.900	1.25 ± 0.53
19	1.844	7.120	4.280	1.769	1.958	3.39 ± 2.33
20	1.296	1.121	1.060	1.228	1.322	1.21 ± 0.11
21	1.986	1.698	1.423	1.445	1.122	1.53 ± 0.32
A1	2.416	5.400	1.690	4.239	2.273	4.00 ± 1.55
A3	1.085	1.122	1.480	1.698	1.233	1.32 ± 0.25
A5	4.910	2.136	5.320	4.980		4.34 ± 1.47
A8	2.090	1.157	1.056	1.518	1.229	1.41 ± 0.41
SR1	1.598	3.990	3.990	1.970	1.900	2.69 ± 1.19

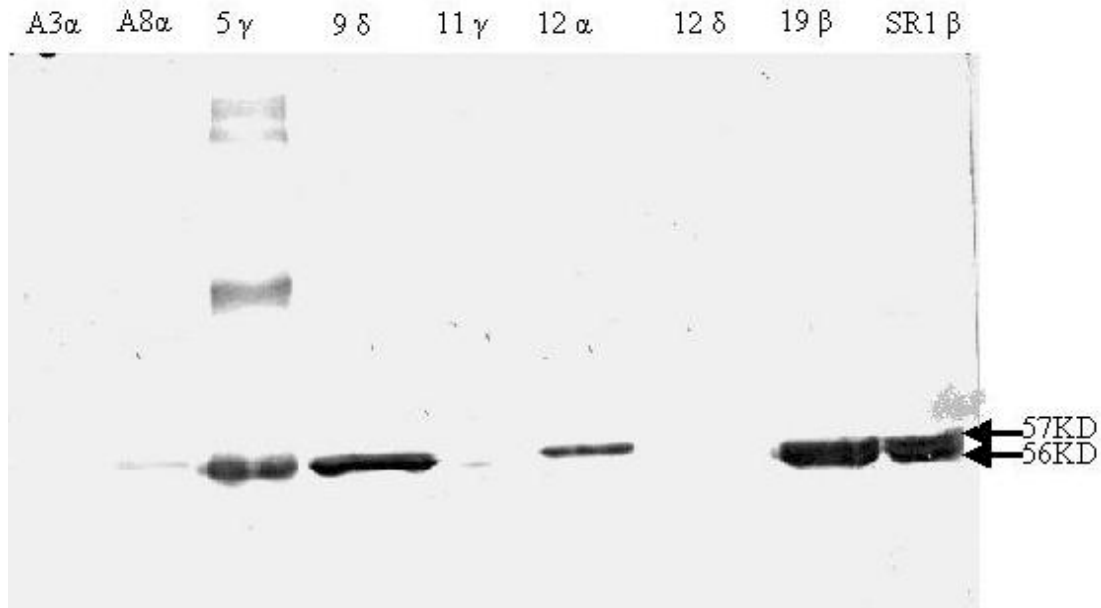
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ενζυμικής ενεργότητας της καταλάσης στα παραπάνω φυτά συγκρίθηκαν με την ποσότητα της πρωτεΐνης (western blots). Συνολικά εξετάστηκαν οι 20 διαφορετικές σειρές στο τρίτο αναπτυξιακό στάδιο, στο οποίο όλα τα φυτά παρουσίασαν γενικά υψηλότερες τιμές ειδικής ενεργότητας καταλάσης συγκριτικά με τα δύο προηγούμενα. Το παραπάνω επιτρέπει την σαφέστερη αποτύπωση των όποιων διαφορών στην πρωτεΐνη μεταξύ των φυτών, και συνεπώς την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

Πρωτεΐνες από φύλλο καπνού αναλύθηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και η καταλάση ανοσοεντοπίστηκε με Western blot. Ο ανοσοεντοπισμός της καταλάσης έδειξε, ότι γενικά η ενζυμική ενεργότητα συμβαδίζει με την ποσότητα της πρωτεΐνης (Εικόνες 1, 2, 3). Εξαιρέση αποτελούν τα φυτά A3α, A8α και 12δ στα



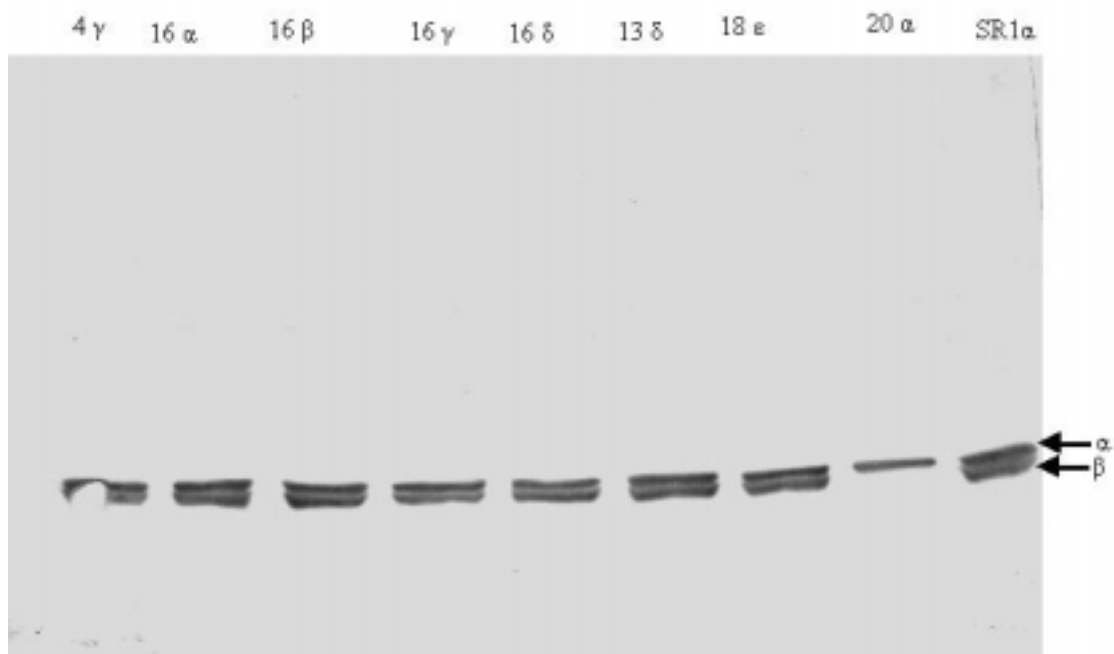
Εικόνα 1. Ανοσοεντοπισμός της καταλάσης με western blot. Το α και β υποδηλώνουν τις υπομονάδες της καταλάσης. 20 μg πρωτεΐνης αναλύθηκαν με SDS-PAGE (αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση) για τον ανοσοεντοπισμό της καταλάσης στα αντίστοιχα φυτικά εκχυλίσματα.

πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των οποίων, η ποσότητα της καταλάσης ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμη (Εικόνα 2), αλλά η μετρούμενη ενεργότητα ήταν στα επίπεδα των SR1α, SR1δ και SR1ε. Αυτό ενδεχομένως υποδηλώνει μετά-μεταφραστική τροποποίηση του ενζύμου. Στο παραπάνω συνηγορεί και το γεγονός ότι η καταλάση είναι ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό ένζυμο, το οποίο ακόμη και σε μικρή ποσότητα είναι ικανό να παρέχει προστασία στο φυτικό κύτταρο απέναντι στο H_2O_2 που παράγεται κάτω από συνθήκες ήπιου φωτισμού (περίπου $70-80 \mu\text{mole}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$). Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι η δράση κάποιου παράγοντα κατά τη διαδικασία εκχύλισης του ενζύμου δεν επιτρέπει την ανοσοανίχνευσή του από το αντίσωμα.



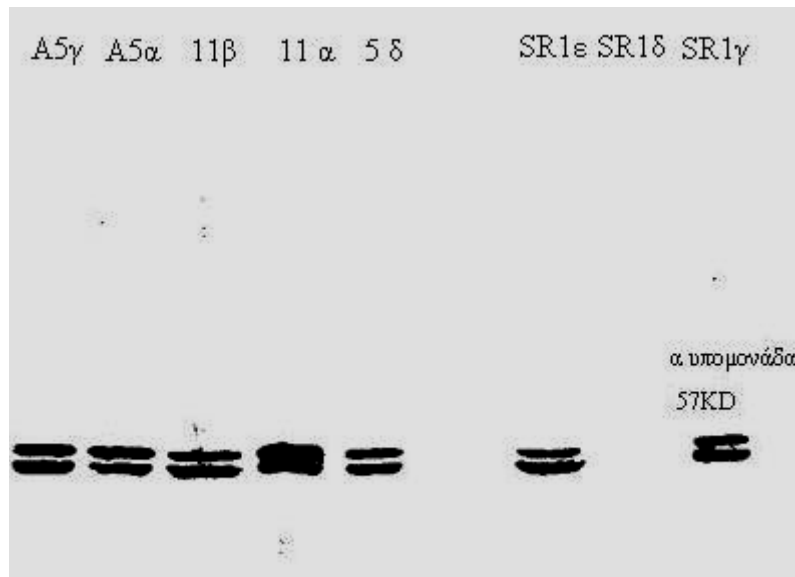
Εικόνα 2. Ανοσοεντοπισμός της καταλάσης με western blot. 57 και 56 KD είναι το μοριακό βάρος των υπομονάδων της καταλάσης α και β αντίστοιχα. 20 μg πρωτεΐνης αναλύθηκαν με SDS-PAGE (αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση) για τον ανοσοεντοπισμό της καταλάσης στα αντίστοιχα φυτικά εκχυλίσματα.

Κάποια φυτά, όπως το 12α και το 20α εμφάνισαν επιλεκτικά καταστολή της β υπομονάδας (Εικόνες 2, 3), ενώ αξιοσημείωτη ήταν και η περίπτωση του 11γ στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα του οποίου, τόσο η ποσότητα καταλάσης όσο και η μετρούμενη ενεργότητά της ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμες. Η πιθανή αιτία για την αποτυχία υπερέκφρασης της καταλάσης στο φυτό αυτό αποδίδεται πιθανόν στη θέση ένθεσης του διαγονιδίου στο φυτικό του γονιδίωμα ή, στη δράση διάφορων παραγόντων που δρουν σε επιγενετικό επίπεδο και αντιμάχονται την ανατροπή της γονιδιακής δόσης σε αυτό (Finnegan and McElroy, 1994; Matzke and Matzke, 1995). Το φαινόμενο περιγράφεται ως συγκαταστολή (co-suppression) και κατά την εκδήλωσή του επηρεάζεται αρνητικά η έκφραση και των ενδογενών γονιδίων, οδηγώντας τελικά στο αντίθετο αποτέλεσμα.



Εικόνα 3. Ανοσοεντοπισμός της καταλάσης με western blot. Τα α και β υποδηλώνουν τις υπομονάδες της καταλάσης. 20 μg πρωτεΐνης αναλύθηκαν με SDS-PAGE (αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση) για τον ανοσοεντοπισμό της καταλάσης στα αντίστοιχα φυτικά εκχυλίσματα.

Τα φυτά A5α, A5γ, 11α, 11β και 5δ, με τις σταθερά υψηλές ενζυμικές ενεργότητες και στα τρία αναπτυξιακά στάδια, εξετάστηκαν μαζί για την ποσότητα της καταλάσης σε σύγκριση με 3 φυτά μάρτυρες (SR1γ, SR1δ, SR1ε). Η επιλογή των τελευταίων έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτεται όλο το εύρος των ενζυμικών ενεργοτήτων που καταγράφηκαν για τα φυτά μάρτυρες στο τρίτο αναπτυξιακό στάδιο. Η ποσότητα της πρωτεΐνης εμφανίστηκε ελαφρώς αυξημένη στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των γενετικά τροποποιημένων φυτών σε σύγκριση με αυτά από τα τρία φυτά μάρτυρες (Εικόνα 4). Ειδικότερα, η μεγαλύτερη ποσότητα καταλάσης ανιχνεύτηκε στο εκχύλισμα του φυτού 11α, γεγονός το οποίο συμβαδίζει με τη μετρούμενη ενζυμική ενεργότητα. Η ενεργότητα του ενζύμου στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και των άλλων φυτών βρέθηκε να συμβαδίζει με την ποσότητα της πρωτεΐνης.



Εικόνα 4. Ανοσοεντοπισμός της καταλάσης με western blot. 20 μg πρωτεΐνης αναλύθηκαν με SDS-PAGE (αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση) για τον ανοσοεντοπισμό της καταλάσης στα αντίστοιχα φυτικά εκχυλίσματα.

Ωστόσο, ούτε ο παραπάνω ανοσοεντοπισμός της καταλάσης έδειξε αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα στα γενετικά τροποποιημένα φυτά και τα φυτά μάρτυρες. Το παραπάνω σχετίζεται πιθανόν με τον υψηλό ρυθμό αποδόμησης (turn over rate) του ενζύμου στο φως (Hertwig,1992), ακόμη και κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Μια εναλλακτική εξήγηση προτείνει ότι το φυτό, σε κανονικές συνθήκες, είναι προγραμματισμένο να διατηρεί συγκεκριμένη ποσότητα καταλάσης στα κύτταρά του. Αν, λοιπόν, για κάποιο λόγο η ποσότητα της καταλάσης ξεπεράσει κάποιο όριο, «κατώφλι», μέσα στο φυτικό κύτταρο, τότε προκαλείται η ενεργοποίηση διάφορων παραγόντων που δρουν για την αποδόμηση της περιττής πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα, της μετρούμενης ενζυμικής ενεργότητας καθώς και του ανοσοεντοπισμού της καταλάσης, οδήγησαν τελικά στην επιλογή των A5α, A5γ, 11α, 11β, 5δ, SR1γ, SR1δ και SR1ε φυτών για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αβιοτικής καταπόνησης.

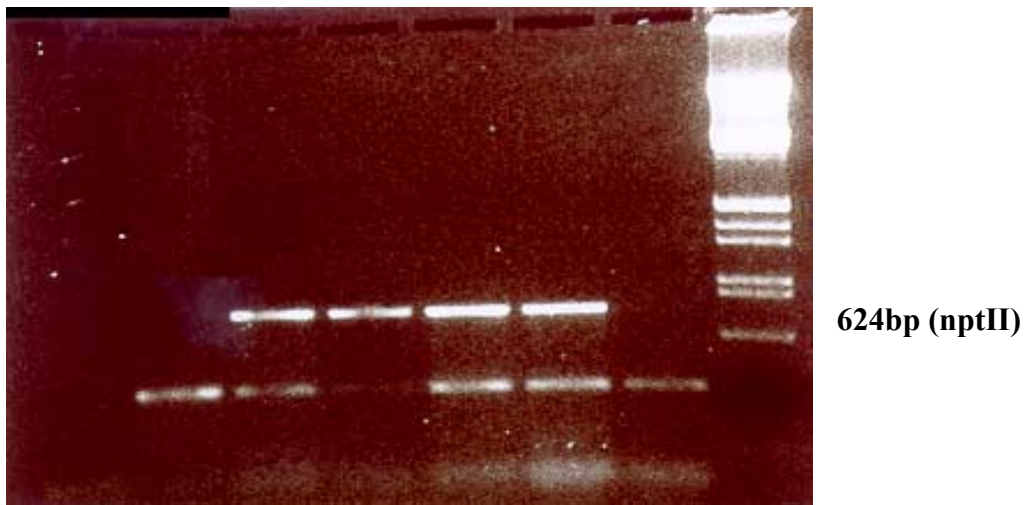
3.2. Πιστοποίηση ενσωμάτωσης του διαγονιδίου στους T₁ απογόνους με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Οι T₁ απόγονοι επιλέχθηκαν αρχικά για την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS (Murashige and Skoog, 1962), παρουσία καναμυκίνης (300 μg/mL). Πάνω από το 80% των φυτών της T₁ γενιάς έδειξε ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Γενωμικό DNA από φύλλα φυτών με ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη ελέγχθηκε για την παρουσία του *nptII*. Το *nptII* είναι το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη και ήταν ενσωματωμένο στο construct pBIPVMI, που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την τροποποίηση των φυτών. Η διαδικασία δημιουργίας του πλασμιδίου περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Ο πολλαπλασιασμός του *nptII* γονιδίου πραγματοποιήθηκε στα φυτά A5α, A5γ, 11α, 11β, 5δ, τα οποία παρουσίασαν σταθερά υψηλότερη ειδική ενεργότητα καταλάσης σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, καθώς και στα φυτά μάρτυρες SR1γ, SR1δ και SR1ε. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR παρουσιάζονται στην Εικόνα 5. Όπως αναμενόταν τα φυτά, τα οποία αρχικά επιβίωσαν από την αυστηρή επιλογή της καναμυκίνης, βρέθηκαν θετικά για την ύπαρξη του *nptII* γονιδίου στο γονιδίωμά τους, ενώ τα φυτά μάρτυρες όχι. Από το παραπάνω προκύπτει ότι τα θετικά, για την ύπαρξη του *nptII* γονιδίου, φυτά φέρουν ενσωματωμένο στο γονιδίωμά τους ένα ή περισσότερα αντίτυπα του διαγονιδίου. Τα αποτελέσματα της PCR δε μπορούν να αποδώσουν τον αριθμό ενσωματωμένων αντιτύπων του διαγονιδίου. Τέτοια μελέτη απαιτεί αυτοραδιογραφία σε κατά Southern αναλύσεις.

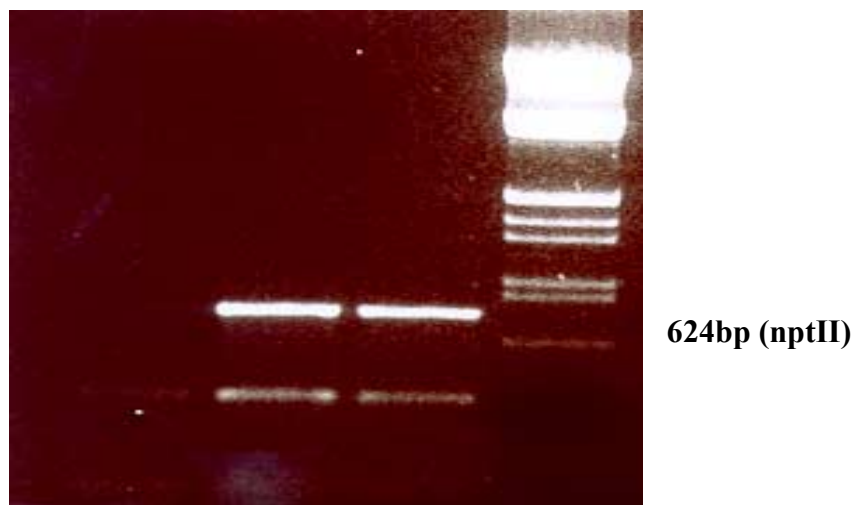
A.

M.A. SR1 γ A5 α A5 γ A5 δ 5 δ SR1 δ λ Hind III/EcoRI



B.

SR1 ϵ 11 α 11 β λ Hind III/EcoRI



Εικόνα 5 A,B. Τα προϊόντα της PCR για κάθε φυτό, όπως αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%. M.A.: Μίγμα Αντίδρασης; SR1 α , SR1 δ και SR1 ϵ : Φυτά μάρτυρες. Διακρίνεται η έντονη ζώνη μεγέθους 624 bp που αντιστοιχεί στο *nptII* γονίδιο. Η αχνή ζώνη χαμηλότερα αποτελεί παραπροϊόν της αντίδρασης και οφείλεται στη μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών. Με τη μορφή νέφους κάτω από την αχνή ζώνη διακρίνονται οι εκκινητές.

3.3. Αντοχή των T1 απογόνων στις αβιοτικές καταπονήσεις

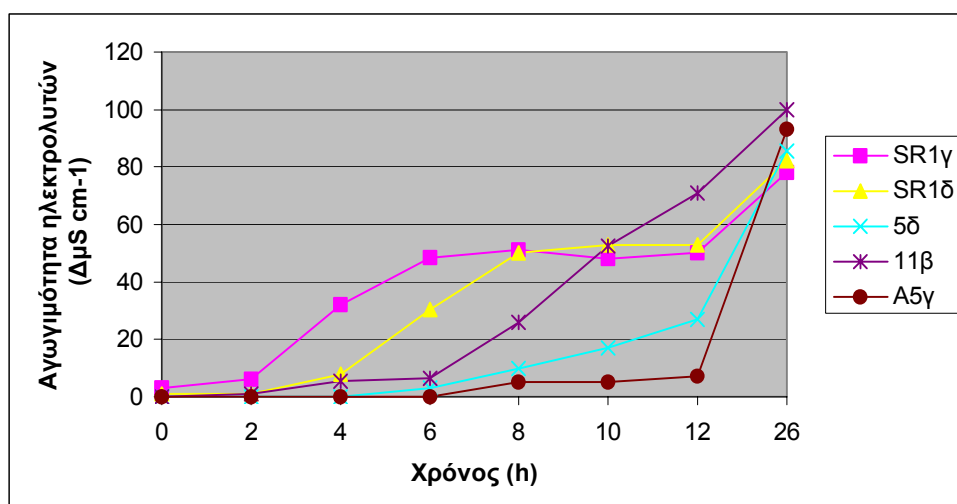
Η καταλάση, ανεξάρτητα από τον υποκυτταρικό της εντοπισμό, μπορεί να προστατεύει λειτουργικά το φυτικό κύτταρο από το H_2O_2 ακόμη και σε μακρινή απόσταση από το σημείο παραγωγής του τελευταίου (Willekens *et al.*, 1997). Η παραπάνω παρατήρηση αποτέλεσε το αρχικό ερέθισμα για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών με έκφραση του, μεταλλαγμένου ως προς το πεπτιδίο σύνθημα, γονιδίου *cat1*. Το αποτέλεσμα είναι η CAT 1 να μην οδηγείται στα υπεροξεισώματα, αλλά να παραμένει στο κυτόπλασμα. Το ερώτημα, συνεπώς, που προκύπτει είναι αν με την υπερέκφραση της καταλάσης CAT 1 στο κυτόπλασμα επιτυγχάνεται αντοχή των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις, όπως paraquat, H_2O_2 , κ.α. Για την απάντηση του παραπάνω ερωτήματος, διεξάχθηκαν πειράματα αβιοτικής καταπόνησης στα επιλεγμένα γενετικά τροποποιημένα φυτά (A5γ, 11β, 5δ) σε σύγκριση με φυτά μάρτυρες (SR1γ, SR1δ). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, που ακολουθούν προτείνεται η αντοχή των γενετικά τροποποιημένων φυτών στο paraquat και στο H_2O_2 σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες.

3.3.1. Αντοχή σε paraquat

Το paraquat είναι γνωστό ότι διεισδύει στα φωτοσυνθετικά, όπου διακόπτει την φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα τη διοχέτευση της ενέργειας στο O_2 και την αναγωγή του σε $O_2^{\bullet-}$ (Dodge, 1994). Το $O_2^{\bullet-}$ μετατρέπεται, στην συνέχεια, σε H_2O_2 είτε αυθόρμητα ή με τη δράση της SOD (Bowler *et al.*, 1994). Η συνδυασμένη δράση του paraquat και του φωτός προκαλεί αυξημένη οξειδωτική καταπόνηση στους χλωροπλάστες, αφού το κύριο σημείο δέσμευσης ηλεκτρονίων από το paraquat θεωρείται το κέντρο Fe-S στο φωτοσύστημα I (Fujii *et al.*, 1990). Προτείνεται, επίσης, η πιθανή ύπαρξη εναλλακτικών σημείων αναγωγής του paraquat στο κύτταρο, επειδή είναι αρκετά μικρό και διεισδυτικό μόριο. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου, που παράγονται εξαιτίας της αναγωγής του paraquat στους χλωροπλάστες, καταλήγουν στην κυτταρική μεμβράνη, την οποία καταστρέφουν, προκαλώντας αυξημένη έκλυση ηλεκτρολυτών.

Αρχικά μετρήθηκε η αγωγιμότητα ηλεκτρολυτών από φυλλικούς δίσκους καπνού σε διάλυμα 5 μM paraquat (αρκετά υψηλή συγκέντρωση). Αυτή

προσδιορίστηκε με τη μορφή κινητικής στο χρόνο (time-course), συνολικής διάρκειας 26 ωρών, σε συνθήκες κανονικού φωτισμού ($100 \mu\text{mole}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$). Οι φυλλικοί δίσκοι από γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού παρουσίασαν μικρότερη ευαισθησία στο paraquat συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες (Εικόνα 6). Ειδικότερα, οι φυλλικοί δίσκοι των διαγονιδιακών φυτών έδειξαν αρκετά μειωμένη έκλυση ηλεκτρολυτών μετά από 6 ώρες μεταχείριση με paraquat. Αντίθετα, οι αντίστοιχες τιμές στα φυτά μάρτυρες, μετά από το ίδιο χρονικό διάστημα μεταχείρισής τους, ήταν μέχρι και 8 φορές υψηλότερες. Το παραπάνω υποδηλώνει ότι οι κυτταρικές μεμβράνες των φυλλικών δίσκων από γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού είχαν υποστεί μικρή ζημιά από τη δράση του paraquat, γι αυτό εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα έκλυσης ηλεκτρολυτών. Η παραπάνω παρατήρηση είναι πολύ σημαντική καθότι αναδεικνύει τον ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο της CAT 1 για την προστασία του φυτικού κυττάρου από το H_2O_2 .

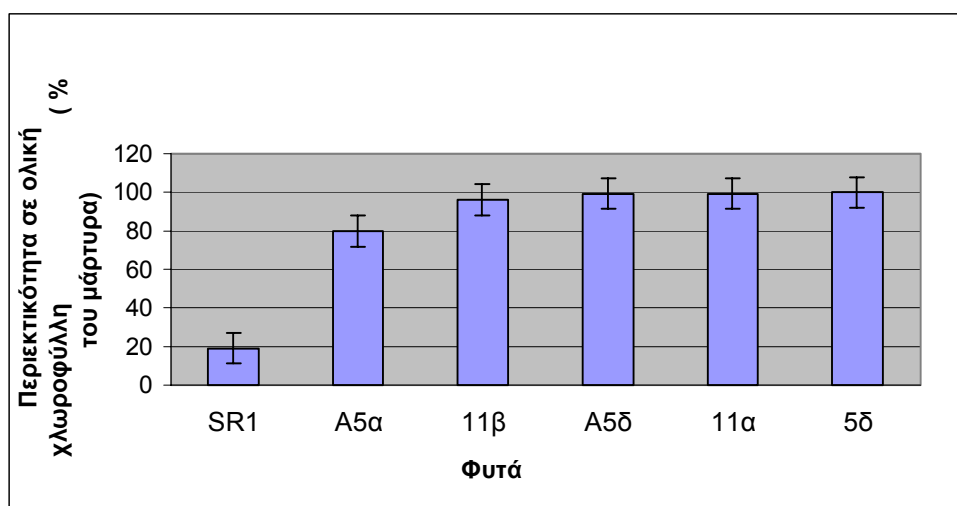


Εικόνα 6. Έκλυση ηλεκτρολυτών σε $5 \mu\text{M}$ paraquat. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Στην Εικόνα 6 παρατηρείται, επίσης, τάση αύξησης στην έκλυση ηλεκτρολυτών από φυλλικούς δίσκους διαγονιδιακών φυτών, στο διάστημα 12-26 ωρών. Αυτό αποδίδεται στην αδυναμία, ακόμη και της υπερεκφραζόμενης καταλάσης, να προστατεύσει το φυτικό κύτταρο ύστερα από πολύωρη έκθεσή σε τόσο τοξική συγκέντρωση paraquat. Ωστόσο, οι φυλλικοί δίσκοι από τροποποιημένα φυτά παρουσίασαν, σε γενικές γραμμές, μικρότερη έκλυση ηλεκτρολυτών σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες κατά την έκθέσή τους σε paraquat.

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη αποτελεί ένα ακόμη σημαντικό ενδεικτικό στοιχείο, της ζημιογόνου δράσης που προκαλείται σε φυλλικούς δίσκους που εκθέτονται σε paraquat. Αυτός ελέγχθηκε σε φυλλικούς δίσκους των φυτών A5α, A5δ, 11α, 11β, 5δ, SR1γ και SR1δ, οι οποίοι αρχικά εκτέθηκαν σε διάλυμα 5μM paraquat για 26 ώρες, σε συνθήκες κανονικού φωτισμού ($100 \mu\text{mole}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$). Παράλληλα, φυλλικοί δίσκοι από τα ίδια φυτά εκτέθηκαν για 26 ώρες σε απιονισμένο νερό. Η ζημιά που προκλήθηκε στους φυλλικούς δίσκους από τη δράση του paraquat, προσδιορίστηκε ως η περιεκτικότητά τους σε ολική χλωροφύλλη σε σχέση με την ολική χλωροφύλλη κατά την έκθεσή τους σε νερό, εκφρασμένη επί τοις %.

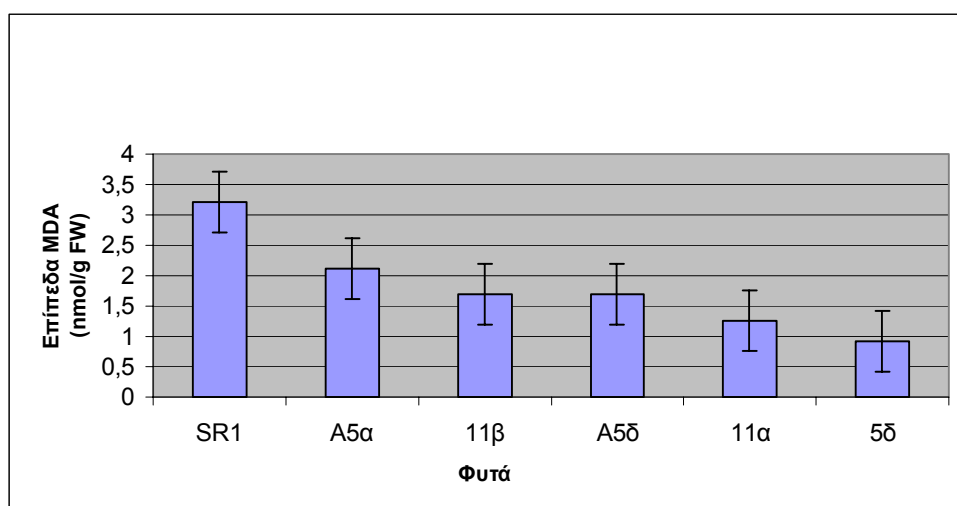
Οι φυλλικοί δίσκοι των διαγονιδιακών φυτών έδειξαν από ελάχιστη ως μικρή μείωση της % περιεκτικότητάς τους σε ολική χλωροφύλλη, με το τέλος της έκθεσης τους στο paraquat (Εικόνα 7). Αντίθετα, τα φυτά μάρτυρες παρουσίασαν συμπτώματα δριμείας λεύκανσης, το οποίο ήταν αποτέλεσμα της φωτοκαταστροφής των χρωστικών (Willekens *et al.*, 1997). Το τελευταίο, δικαιολογείται από τη ραγδαία μείωση της % περιεκτικότητάς τους σε ολική χλωροφύλλη, όπως αποτυπώνεται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Η % περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη μετά από μεταχείριση με 5μM paraquat. Αντίστοιχοι φυλλικοί δίσκοι επωασμένοι σε απιονισμένο νερό χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Μία τρίτη παράμετρος για την εκτίμηση του κυτταρικού τραυματισμού στους παραπάνω φυλλικούς δίσκους από τη δράση του paraquat, αποτελεί ο προσδιορισμός

του βαθμού περοξειδωσης των λιπιδίων. Δείκτης του βαθμού περοξειδωσης των λιπιδίων είναι η παραγωγή του malondialdehyde (παράγωγο της β-οξειδωσης των λιπιδίων). Τα αποτελέσματα από τη μέτρηση του τελευταίου, έδειξαν ότι η παραγωγή του ήταν περίπου δύο φορές μικρότερη στους φυλλικούς δίσκους των διαγονιδιακών φυτών σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες (Εικόνα 8).



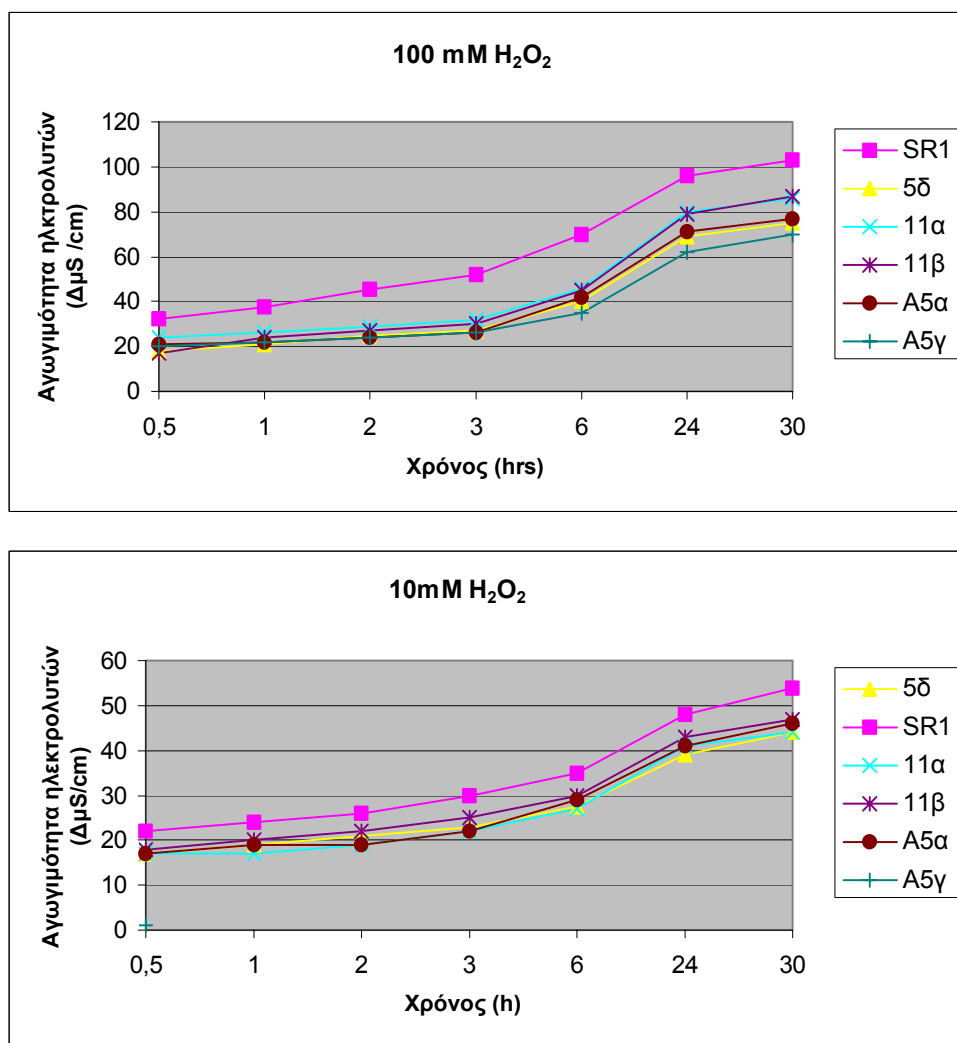
Εικόνα 8. Βαθμός υπεροξειδωσης των λιπιδίων μετά από μεταχείριση με 5 μM paraquat. Οι τιμές είναι μέσοι όροι από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Η παραπάνω διαπίστωση είναι ιδιαίτερα σημαντική, διότι συνδέει την έκλυση ηλεκτρολυτών με την περοξειδωση των λιπιδίων σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης με paraquat.

3.3.2. Αντοχή σε εξωγενή επίδραση H_2O_2

Η αγωγιμότητα ηλεκτρολυτών από φυλλικούς δίσκους καπνού, μετρήθηκε σε δύο διαφορετικά διαλύματα H_2O_2 , συγκέντρωσης 10 mM και 100 mM αντίστοιχα. Αυτή προσδιορίστηκε με τη μορφή κινητικής στο χρόνο (time-course), συνολικής διάρκειας 30 ωρών, σε συνθήκες κανονικού φωτισμού ($100 \mu\text{mole}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$). Οι φυλλικοί δίσκοι από γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού παρουσίασαν μικρότερη ευαισθησία, και στις δυο συγκεντρώσεις H_2O_2 , συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες (Εικόνα 9). Ειδικότερα, οι φυλλικοί δίσκοι από τα φυτά μάρτυρες έδειξαν, όπως ήταν αναμενόμενο, μεγαλύτερη ευαισθησία στα 100 mM H_2O_2 , ενώ οι

αντίστοιχοι από τα γενετικά τροποποιημένα φάνηκε να αντέχουν το ίδιο και στις δύο συγκεντρώσεις H_2O_2 .



Εικόνα 9. Εκκλυση ηλεκτρολυτών σε 10 mM και 100 mM H_2O_2 . Οι τιμές είναι μέσοι όροι από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Τα φυτικά κύτταρα είναι σχετικά ανθεκτικότερα στο εξωγενές H_2O_2 σε σχέση με τα κύτταρα των θηλαστικών (Guyton *et al.*, 1996) και αυτό πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία εξωκυτταρικών περοξειδασών στο κυτταρικό τοίχωμα (Willekens *et al.*, 1997). Οι μηχανισμοί, ωστόσο, με τους οποίους το φυτικό κύτταρο αποσβένει το εξωγενές H_2O_2 , παραμένουν ακόμη ανεξιχνίαστοι. Επιπλέον, δε μπορεί να αποδοθεί με βεβαιότητα το μεγαλύτερο μέρος της απόσβεσής του στη καταλάση.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φυτά T₁ γενιάς (προήλθαν με αυτογονιμοποίηση) μεταμορφωμένα με το construct pBPIVM1 (Μυλωνά, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το construct περιείχε τον πλήρη cDNA κλώνο της CAT1 του καπνού (*N. tabacum*), με μεταλλαγή στο πεπτίδιο σύνθημα, προκειμένου να προκαλέσει την έκφραση του γονιδίου στο κυτόπλασμα. Εξετάστηκαν, συνολικά, 100 φυτά για την ειδική ενεργότητα της καταλάσης τρία διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Η εξέταση τους αποκάλυψε, από 1.2 μέχρι και πάνω από 2 φορές, αύξηση σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες (Πίνακας 1, 2 και 3). Ανάμεσα στα φυτά που εξετάστηκαν, βρέθηκαν μερικά με αρκετά χαμηλότερη ειδική ενεργότητα καταλάσης σε σχέση με φυτά άγριου τύπου. Αυτά τα φυτά αποτελούν, ενδεχομένως, παραδείγματα στα οποία η εισαγωγή του διαγονιδίου προκάλεσε «συγκαταστολή», φαινόμενο το οποίο παρατηρείται σε κάποιες περιπτώσεις (Flavell, 1994). Τέτοιες ήταν πιθανόν οι περιπτώσεις των φυτών 11γ και 18δ (Πίνακας 3). Παρόμοιες προσπάθειες για υπερέκφραση της CAT1 στον καπνό έχουν γίνει στο παρελθόν από τους Brisson *et al.* (1998), οι οποίοι πέτυχαν, από 1.25 μέχρι πάνω από 2 φορές, αύξηση της ειδικής ενεργότητας σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Υπερέκφραση καταλάσης παρατηρήθηκε σε ένα μετάλλαγμα (Zelitch, 1989), σαρώνοντας απλοειδή *N. tabacum* φυτάρια για αυξημένη ανάπτυξη κάτω από συνθήκες υψηλής φωτοαναπνευστικής δραστηριότητας (42% O₂). Οι διπλοειδείς απόγονοι του μεταλλάγματος είχαν αυξημένη ενεργότητα καταλάσης (1.4 φορές πάνω σε σχέση με του άγριου τύπου) καθώς και υψηλά επίπεδα μεταγραφής (Zelitch *et al.*, 1991).

Έχει προταθεί ότι η έκφραση και η ενεργότητα της καταλάσης ρυθμίζονται από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού (Scandalios *et al.*, 1984; Ni and Trelease, 1991). Σταθερά υψηλή ειδική ενεργότητα καταλάσης και στα τρία αναπτυξιακά στάδια, παρατηρήθηκε στα φυτά A5α, A5γ, 11α, 11β και 5δ. Τα επίπεδα της ενζυμικής πρωτεΐνης στα παραπάνω φυτά ήταν αντίστοιχα της μετρούμενης ενεργότητας. Επιπλέον, ο ανοσοεντοπισμός της καταλάσης στα εκχυλίσματά τους έδειξε ελαφρώς αυξημένα επίπεδα ενζυμικής πρωτεΐνης συγκριτικά με τα φυτά άγριου τύπου, χωρίς ωστόσο την αποτύπωση ιδιαίτερα σημαντικών διαφορών (Εικόνα 4). Ο πιθανότερος λόγος για το τελευταίο είναι ο υψηλός ρυθμός αποδόμησης του ενζύμου (high turn-over rate) (Hertwig, 1992). Εναλλακτική

εξήγηση είναι η υποψία παρουσίας κίρκαδικού μοτίβου έκφρασης στο γονίδιο της καταλάσης (cat 1) (δεν έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά), συνεπώς η χρονική στιγμή εκχύλισης της πρωτεΐνης στην διάρκεια της ημέρας αντανακλά και τη συγκέντρωσή της στο εκχύλισμα. Κίρκαδικό μοτίβο έκφρασης έχει προταθεί για το γονίδιο cat 3 στο καλαμπόκι (Boldt *et al.*, 1995) καθώς και για τα γονίδια cat 2 και cat 3 στην *Arabidopsis* (Frugoli *et al.*, 1996; Zentgraf *et al.*, 1996) Συγκεκριμένα, τα επίπεδα μεταγραφής του cat 2 της *Arabidopsis* παρουσιάζονται υψηλότερα νωρίς το πρωί, ενώ τα αντίστοιχα για το cat 3 το βράδυ (Zhong *et al.*, 1996).

Τα αποτελέσματα της ανοσοανίχνευσης καθώς και της μετρούμενης ενεργότητας στα φυτικά εκχυλίσματα των 5 παραπάνω φυτών, οδήγησαν στην επιλογή τους για τη διεξαγωγή πειραμάτων αβιοτικής καταπόνησης. Στις μεταχειρίσεις με paraquat τα διαγονιδιακά φυτά έδειξαν αντοχή σε σύγκριση με τα φυτά άγριου τύπου, στα οποία παρατηρήθηκε φωτοκαταστροφή των χρωστικών (Εικόνα 7), υπεροξειδωση των λιπιδίων (Εικόνα 8) και αυξημένη έκλυση ηλεκτρολυτών (Εικόνα 6). Το γεγονός αυτό αποδίδεται πιθανόν στην προστασία που παρείχε η υπερεκφρασμένη CAT 1 για την απόσβεση του H₂O₂ που παράχθηκε από τη δράση του paraquat. Αντίθετα, η ευαισθησία γενετικά τροποποιημένων με καταστολή της CAT 1, αυξήθηκε μετά τη μεταχείρισή τους για 6 ώρες με paraquat (Willekens *et al.*, 1997). Δείκτης της ζημιάς που προκλήθηκε, ήταν η υπεροξειδωση των λιπιδίων στις κυτταρικές τους μεμβράνες από την παρουσία H₂O₂ και η επακόλουθη έκλυση ηλεκτρολυτών

Σε φυτά *Arabidopsis thaliana* παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας της CAT 3 μετά από ήπια μεταχείρισή τους με παρακουάτ (Orendí *et al.*, 2001). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη χαμηλή ενεργότητα των άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD και APX), αναδεικνύει την CAT 3 σε κύριο ένζυμο για τη προστασία του φυτικού κυττάρου σε αβιοτικές καταπονήσεις. Στο καλαμπόκι, η ενεργότητα της CAT 3 αυξήθηκε ως απόκριση στην επαγωγή οξειδωτικής καταπόνησης από τη δράση της κερκοσπορίνης, ενώ η αντίστοιχη της CAT 2 παρουσίασε μικρή μείωση (Auh *et al.*, 1997).

Αντοχή των τροποποιημένων φυτών παρατηρήθηκε, επίσης, κατά την επίδραση 10 mM και 100 mM εξωγενούς H₂O₂. Ειδικότερα, μικρότερη αντοχή διαπιστώθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση H₂O₂ (Εικόνα 9). Από το παραπάνω αποτέλεσμα προκύπτει ότι ο λειτουργικός ρόλος της καταλάσης εντοπίζεται στην απόσβεση του κυριότερου όγκου H₂O₂. Η μειωμένη ικανότητα για

απομάκρυνση του εξωγενούς H_2O_2 συνδέθηκε με την αυξημένη ευαισθησία στο H_2O_2 , σε γενετικά τροποποιημένα φυτά με καταστολή της CAT 1 (Willekens *et al.*, 1997). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Levine *et al.* (1994) η απομάκρυνση του εξωγενούς H_2O_2 οφείλεται στην παρουσία εξωκυτταρικών περοξειδασών στο κυτταρικό τοίχωμα. Ερευνητικά αποτελέσματα για την σχετική συμμετοχή των περοξειδασών και των καταλασών στην απομάκρυνση του εξωγενούς H_2O_2 δεν έχουν αναφερθεί.

Η παρουσία εξωκυτταρικής πηγής H_2O_2 διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην επαγωγή ποικίλων κυτταρικών αποκρίσεων. Σε φυτά *Zea mays*, με αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες, η πρόωμη αύξηση H_2O_2 προκάλεσε επαγωγή της καταλάσης για την αντιμετώπιση μετέπειτα οξειδωτικής καταπόνησης (Prasad *et al.*, 1994). Σε φυτά σόγιας, το H_2O_2 φάνηκε να λειτουργεί ως μοριακό σύνθημα για την επικοινωνία των κύτταρων (Levine *et al.* 1994). Στην ίδια μελέτη, το εξωκυτταρικό H_2O_2 ενεργοποίησε την έκφραση των PR γονιδίων. Έκφραση PR γονιδίων παρατήρησαν, επίσης, οι Chamnongpol *et al.* (1996) σε φυτά με καταστολή της CAT 1 παρουσία υψηλού φωτισμού. Υποστηρίζεται ότι το παραγόμενο στην επιφάνεια των κυττάρων H_2O_2 , μετά την επίδραση μικροβιακού παράγοντα, αποτελεί το έναυσμα για την αντίδραση υπερευαισθησίας στην *Glycine max* (Levine *et al.*, 1994). Στη *Rosa damascena* παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του H_2O_2 , μετά την επίδραση μικροβιακού παράγοντα, οφείλεται στη μετατροπή του $O_2^{\bullet-}$ από την SOD (Auh and Murphy, 1995).

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει με σκοπό να βελτιώσουν ή να μελετήσουν την ανθεκτικότητα στις καταπονήσεις, αυξάνοντας ή μειώνοντας αντίστοιχα τα *in vitro* επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων μέσω γενετικού μετασχηματισμού (Foyer *et al.*, 1994). Αποτελέσματα, που προκύπτουν από την υπερέκφραση της SOD είναι κάπως διφορούμενα. Πιο συγκεκριμένα, γενετικά τροποποιημένα φυτά με 30-50 φορές μεγαλύτερη ενεργότητα της SOD σε σύγκριση με το μαρτυρά, 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 της SOD από *Nicotiana plumbaginifolia* έδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο paraquat και στο όζον (Perl *et al.*, 1993; Van Camp *et al.*, 1994). Η SOD μετατρέπει, ως γνωστό, το $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 , ρίζες οι οποίες 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

αυξημένη ικανότητα αποτοξίνωσης του H_2O_2 , συγχρόνως με την αύξηση της SOD, ώστε να απομακρύνεται η αυξημένη παραγωγή H_2O_2 εξαιτίας της μεγαλύτερης ενεργότητας της SOD (Foyer *et al.*, 1994). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διεξαγωγή πειραμάτων με χημικούς παράγοντες (paraquat, H_2O_2), που προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση στα φυτά A5α, A5 γ, 11α, 11β και 5δ είναι αρκετά ενθαρρυντικά, υποστηρίζοντας την υπόθεση των Willekens *et al.* (1997) για το ρόλο της, εκφρασμένης στο κυτόπλάσμα, CAT 1 στην προστασία του φυτικού κυττάρου από το H_2O_2 . Ωστόσο, επιπλέον διερεύνηση απαιτείται για την κατανόηση των μηχανισμών λειτουργίας της.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η χρήση των γενετικά τροποποιημένων φυτών στην σύγχρονη έρευνα, αποτελεί μια συνηθισμένη προσέγγιση των ερευνητικών ζητημάτων. Ιδιαίτερη είναι η ώθηση που έδωσε στο χώρο της μοριακής φυσιολογίας φυτών, σε μία προσπάθεια διερεύνησης διαφόρων βιοχημικών και φυσιολογικών μηχανισμών στο φυτικό κύτταρο. Επιπλέον, οδήγησε στην αντικατάσταση των φυσικών ή τεχνητών μεταλλαγμάτων, μοντέλα ιδιαίτερα χρονοβόρα και επίπονα. Η γενετική τροποποίηση του καπνού για το γονίδιο της μεσοφυλλικής καταλάσης δεν αποτελεί, παρά μία μικρή, προσπάθεια διερεύνησης διαφόρων φυσιολογικών μηχανισμών. Τα αποτελέσματα αυτής ανέδειξαν τη σημασία της καταλάσης CAT 1, στην προστασία των C₃ φυτών από διάφορες μορφές αβιοτικής καταπόνησης π.χ. paraquat.

Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά, που δημιουργήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, θα αποτελέσουν υλικό για περαιτέρω έρευνα, με απώτερο σκοπό να δοθεί απάντηση σε μια σειρά από ερωτήματα. Αυτά αφορούν αφενός, την επίδραση των αλλαγών στην ενεργότητα της καταλάσης στην αντοχή των φυτών καπνού σε διάφορες μορφές αβιοτικής καταπόνησης (αλατότητα, ατμοσφαιρική ρυπαντές κ.α.) και αφετέρου, τη συμβολή της στο φαινόμενο της συστημικής εξάπλωσης της ανθεκτικότητας (SAR).

Προκαταρκτικά πειράματα, έχουν ήδη διεξαχθεί με την επίδραση χλωριούχου νατρίου (NaCl), σε φύλλα, κυτταροκαλλιέργειες και πρωτοπλάστες, οι οποίοι απομονώθηκαν από τα επιλεγμένα, για την υψηλή ενεργότητα καταλάσης, φυτά. Το NaCl προτείνεται ότι συμμετέχει έμμεσα στην παραγωγή EMO στο κύτταρο. Η παραγωγή τους προκαλεί φωτοκαταστροφή των χρωστικών και υπεροξειδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. Ο βαθμός υπεροξειδωσης των λιπιδίων προσδιορίστηκε με τη μέτρηση του malondialdehyde, ουσία η οποία παράγεται κατά την οξειδωση των λιπιδίων. Επιπλέον, συνεχίζεται η διερεύνηση των κυτταρικών αποκρίσεων που επάγει η οξειδωτική καταπόνηση εξωκυτταρικής πηγής H₂O₂.

Ο πειραματικός σχεδιασμός είναι, επίσης, στραμμένος στην βελτίωση της αναγεννητικής ικανότητας πρωτοπλαστών καπνού. Η τελευταία σχετίζεται με την συστατική έκφραση ενζύμων της αντιοξειδωτικής μηχανής. Στο πλαίσιο αυτό, κινείται η δημιουργία φυτών με υπερέκφραση της CAT 1. Τα φυτά αυτά θα αξιοποιηθούν στη μελέτη της συμβολής της αντιοξειδωτικής προστασίας, που

παρέχει η καταλάση, στην αναγεννητική ικανότητα των πρωτοπλαστών. Απώτερο σκοπό αποτελεί η πρόταση ενός μοντέλου ικανού να βελτίωση την αναγεννητική ικανότητα πολλών « δύστροπων » φυτικών ειδών. Τεχνικές όπως ο σωματικός υβριδισμός, η διανομή « γυμνού » DNA ή η μεταφορά γονιδίων, που επιτρέπουν την άμεση προσέγγιση του στόχου, εφαρμόζονται αποκλειστικά στους πρωτοπλάστες.

Παράλληλα, διεξάγονται πειράματα για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης της CAT 2 και των άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, APX) σε επιλεγμένα φυτά, που υπερέκφραζουν τη καταλάση, τα οποία βρίσκονται υπό την επίδραση παραγόντων (paraquat, NaCl) που προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αναμένονται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι θα αποτελέσουν σημαντικές ενδείξεις για το πιθανό ρόλο και τη συμπεριφορά των άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allen RD, Webb RP, Sheryl AS** (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Rad Biol Med* **23**: 473-479
- Asada K** (1992) 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
- Assaad F, Tucker KL, Singer ER** (1993) Epigenetic repeat induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **22**: 1067-1085
- Auh CK, Murphy TM** (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol* **107**: 1241-1247
- Auh CK and Scandalios JG** (1997) Spatial and temporal responses of the maize catalases to low temperature. *Physiol Plant* **101**: 149-156
- 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 and Scandalios JC** (1982) Multiple genes controlling superoxide dismutase expression in maize. *J. Hered* **73**: 95-100
- Beevers H** (1979) Microbodies in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* **30**: 159-193
- Boldt R, Scandalios JG** (1995) Circadian regulation of the *Cat3* catalase gene in maize (*Zea mays* L.) entrainment of the circadian rhythm of *Cat3* by different light treatments. *Plant J* **7**: 989-999
- Bowler C, VanCamp W, VanMontagu M, Inze' D** (1994) Superoxide dismutases in plants. *Crit Rev Plant Sci* **13**: 199-218
- Bowler C, VanMontagu M, Inze' D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 83-116
- Brisson LF, Zelitch I, Havir EA** (1998) Manipulation of catalase levels produces altered photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* **116**: 259-269

- Bueno P, Varela J, Gimeenez- Gallego G, del Rio LA** (1995) Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiol* **108**: 1151-1160
- Burssens S, Himanen K, Van de Cotte B, Beeckman T, Van Montagu M, Inze' D, Verbruggen N** (2000) Expression of cell cycle regulatory and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**: 632-640
- Chamnongpol S, Willekens H, Langerbartels C, VanMontagu M, Inze D, VanCamp W** (1996) Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant J* **10**: 491-503
- Chen Z, Ricigliano JW, Klessig DF** (1993a) Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 9533-9537
- Chen Z, Silva H, Klessig DF** (1993b) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262**: 1883-1886
- 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
- Dat JF, Vanndenabeele S, Vranova' E, Van Montagu M, Inze' M, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Science* **57**: 779-795
- 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
- Dodge AD** (1994) Herbicide action and effects on detoxification processes. *In* CH Foyer and PM Mullineaux, eds, *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL
- Du H, Klessig DF** (1997) Role of salicylic acid in the activation of defense responses in catalase-deficient transgenic tobacco. *MPMI* **10**: 922-925
- Elstner EF** (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physiol* **33**: 73-96

- Finnegan J, McElroy D** (1994) Transgene inactivation: Plants Fight Back! *BioTech* **12**: 883-889
- Flavell RB** (1994) Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3490-3496
- 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 defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Envir* **17**: 507-523
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JE, Scott IM** (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* **100**: 241-254
- 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
- Friedrich L, Vernooij B, Gaffney T, Morse A, Ryals J** (1995) Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol Biol* **29**:
- Frugoli JA, Zhong HH, Nuccio ML, McCourt P, McPeck MA, Thomas TL, McClung CR** (1996) Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* L. *Heyhn Plant Physiol* **112**: 327-336
- Frugoli JA, McPeck MA, Thomas TL, McClung CR** (1998) Intron loss and gain during evolution of the catalase gene family in angiosperms. *Genetics* **149**: 355-365
- Fujii T, Yokoyama E, Inoue K, Sakurai H** (1990) The site of electron donation of photosystem I to methyl viologen. *Biochimica Biophysica Acta* **1015**: 41-48
- Granier C, Inze' T, Tardieu F** (2000) Spatial distribution of cell division rate can be reduced from that of p34^{cdc2} kinase activity in maize leaves grown at

- contasting temperatures and soil water conditions. *Plant Physiol* **124**: 1393-1402
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ** (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J. Biol Chem* **271**: 4138-4142
- Halliwell B and Gutteridge JMC** (1989) *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- Hertwig B, Streb P, Feierabend J** (1992) Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol* **100**: 1547-1553
- Huang AHC, Trelease RN, Moore TS** (1983) *Plant Peroxisomes*. Acaemic Press, London
- Imlay JA and Linn S** (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**: 1302-1309
- Inamine GS and Baker JE** (1989) A catalase from tomato fruit. *Phytochemistry* **28**: 345-348
- Inze' D and Van Montagu M** (1995) Oxidative stress in plants. *Curr Opinion Biotechnol* **6**: 158-158
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- 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
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent 1. *J Biol Chem* **193**: 265-275
- 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* **787**: 1572-1576
- Matzke MA, Matzke AM** (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans)genes. *Plant Physiol* **107**: 679-685
- McClung CR** (1997) Regulation of catalase in *Arabidopsis*. *Free Rad Bio Med* **23**: 489-496

- May MJ, 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
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inze' D, D'Halluin K, Botterman J** (1993) SOD enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa. *Plant Physiol* **103**: 1155-1163
- Mittler R, Zilinskas BA** (1991) Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol* **97**: 962-968
- Mullen RT, Lee MS, Trelease RN** (1997) Identification of the peroxisomal targeting signal for cottonseed catalase. *Plant J* **12**: 312-322
- Murphy TM, Huerta AJ** (1990) Hydrogen peroxide formation in cultured rose cells in response to UV-C radiation. *Physiol Plant* **78**: 247-253
- Myrray AW** (1992) Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* **359**: 599-604
- Ni W, Trelease RN, Eising R** (1990) Two temporally synthesized charge subunits interact to form the five isoforms of cottonseed (*Gossypium hirsutum*) catalase. *Biochem J* **269**: 233-238
- Ni W and Trelease RN** (1991) Post-translational regulation of catalase isozyme expression in cotton seeds. *Plant Cell* **3**: 737-744
- Nieben A, Heungens K, Bartels N, Inze D, Van Montagu M, Gheysen G** (1995) Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *Mol Plant Microb Int* **3**: 371-378
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Mol Biol* **49**: 249-79
- 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
- Orendi G, Zimmermann P, Baar C, Zentgraf U** (2001) Loss of stress-induced expression of catalase 3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress. *Plant Science* **161**: 301-314

- 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
- Orvar BL, McPherson AJ, Ellis BE** (1997) Pre-activation wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. *Plant J* **203**: 203-212
- Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (1999) The generation of active oxygen species differs in *Nicotiana* and *Vitis* plant protoplasts. *Plant Physiol* **121**: 197-245
- Papadakis AK, Siminis CI, Roubelakis-Angelakis KA** (2001) Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiol* **126**: 434-444
- Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH** (1997) When checkpoints fail. *Cell* **88**: 315-321
- 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
- Pitcher LH and 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
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR** (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell* **6**: 65-74
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB** (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. *Plant Physiol* **115**: 137-149
- Redinbaugh MG, Sabre M, Scandalios. JG** (1990) Expression of the maize Cat3 catalase gene is under the influence of a circadian rhythm. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 6853-6857
- Reichheld J-P, Vernoux T, Lardon F, Van Montagu M, Inze' D** (1999) Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J* **17**: 647-656

- Scandalios JG, Tsaftaris AS, Chandlee JM, Skadsen RW** (1984) Expression of the developmentally regulated catalase (cat) genes in maize. *Dev Gen* **4**: 281-293
- 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
- Siminis CI, Kanellis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (1994) Catalase is differentially expressed in dividing and non dividing protoplasts. *Plant Physiol* **105**: 1375-1383
- Skadsen RW, Scandalios JG** (1987) Translational control of photo-induced expression of the Cat2 catalase gene during leaf development in maize. *Proc Natl Acad Sci* **84**: 2785-2789
- Sutherland MW** (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol Mol Plant Path* **9**: 79-93
- Takahashi H, Chen Z, Du H, Liu Y, Klessig DF** (1997) Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *Plant J* **11**: 993-1005
- Tepperman JM and Dunsmuir P** (1990) Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol Biol* **14**: 501-511
- 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
- Van Breusegem F, Vranova' F, Dat FJ, Inze' D** (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* **161**: 405-414
- 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
- Vernoux T, Wilson RC, Seely KA, Reichheld JP, Muroy K, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inze' D, May MJ, Sung ZR** (2000) The root meristemless1 / cadmium sensitive2 gene defines a glutathione-dependent

- pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* **12**: 97-110
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, VanMontagu M, Inze' D, VanCamp W** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J* **16**: 4806-4816
- Willekens H, Langerbartels C, Tire C, VanMontagu M, Inze' D, VanCamp W** (1994) Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc Natl Acad Sci* **91**: 10450-10454
- 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
- Yu D, Xie Z, Chen C, Fan B, Chen Z** (1999) Expression of tobacco class II catalase gene activates the endogenous homologous gene and is associated with disease resistance in transgenic potato plants. *Plant Mol Biol* **39**: 477-488
- Zelitch I** (1989) Selection and characterization of tobacco plants with novel O₂-resistant photosynthesis. *Plant Physiol* **90**: 1457-1464
- Zelitch I, Havir EA, McGonigle B, McHale NA, Nelson T** (1991) Leaf catalase mRNA and catalase-protein levels in a high-catalase tobacco mutant with O₂-resistant photosynthesis. *Plant Physiol* **97**: 1592-1595
- Zentgraf U, Zinkernagel I** (1996) A gene encoding a catalase isoform from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **110**:1047