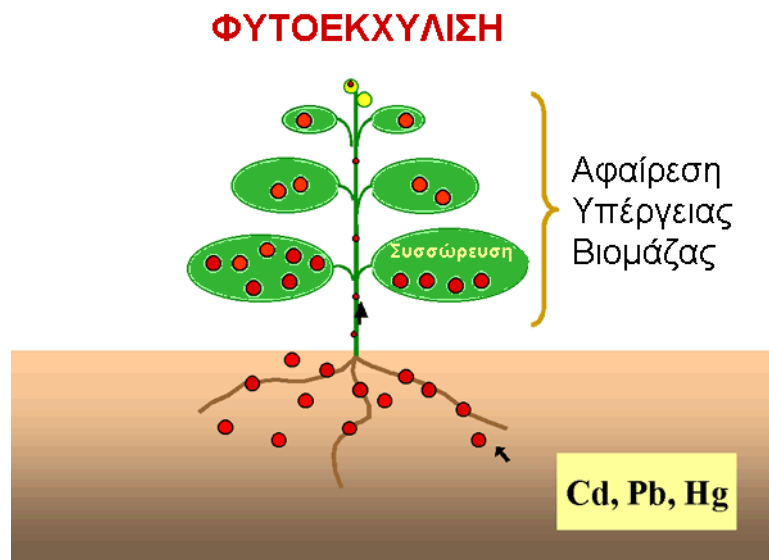


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ *NICOTIANA
GLAUCA* ΚΑΙ *ALYSSUM BALDACCII* ΓΙΑ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΡΥΠΑΣΜΕΝΩΝ
ΕΔΑΦΩΝ ΜΕ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ



ΧΡΙΣΤΟΦΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2006

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και Φυσιολογίας Φυτών της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Λουλακάκη Κων/νου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν κατά την διάρκεια της προσπάθειάς μου για την πολύτιμη συμπαράστασή τους. Τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Κ. Λουλακάκη και στον Δρ. Ν. Πριμηκύριο για την συνεχή καθοδήγησή τους, τις ανεκτίμητες επιστημονικές συμβουλές τους και το ενδιαφέρον που έδειξαν για τη διεκπεραίωση της εργασίας μου.

Η εργασία αποτελεί μέρος ερευνητικού προγράμματος που υλοποιείται στο εργαστήριο με τίτλο «Φυτοεξυγίανση εδαφών ρυπασμένων με βαρέα μέταλλα από διασταλάζοντα υγρά χωματερών» που αποτελεί υποέργο του έργου «ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ–ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ: Ενίσχυση ερευνητικών ομάδων του Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ» (ΕΠΕΑΕΚ ΙΙ, ΕΝΕΡΓΕΙΑ 2.6.1, ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΠΡΑΞΕΩΝ 2.6.1.ιδ.)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
A.1 ΡΥΠΟΙ – ΑΠΟΡΥΠΑΝΣΗ	5
A.2 ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ	8
A.2.1 Ψευδάργυρος (Zn) και Μόλυβδος (Pb)	9
A.3 ΦΥΤΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗ (Phytoremediation)	9
A.3.1 ΦΥΤΟΕΚΧΥΛΙΣΗ.....	13
A.4 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	19
A.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΑ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ	21
A.5.1 Γλουταμική αφυδρογονάση (GDH)	23
A.5.2 ΩΣΜΩΤΙΝΗ.....	26
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
B1. In vitro καλλιέργεια	28
B2. Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς	29
B3. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης (Modified Lowry)	30
B4. Μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου GDH	31
B5. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS – PAGE)	32
B6. Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R–250.	33
B7. Μεταφορά κατάWestern Blot - Ανοσοανίχνευση	34
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
Γ1. Γενικά χαρακτηριστικά φυτών <i>Nicotiana glauca</i> και <i>Alyssum baldaccii</i> ... 36	
Γ2. Επίδραση του Ψευδραργύρου (Zn) σε μορφολογικά χαρακτηριστικά φυτών <i>Nicotiana glauca</i> και <i>Alyssum baldaccii</i>	38
Γ3. Επίδραση του Ψευδραργύρου (Zn) στα ένζυμα GDH και ωσμωτίνη σε ιστούς φυτών <i>Nicotiana glauca</i> και <i>Alyssum baldaccii</i>	41
Γ3.1. Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH).	42
Γ3.2. ΩΣΜΩΤΙΝΗ	44
Γ4. Επίδραση του Μολύβδου (Pb) σε μορφολογικά χαρακτηριστικά φυτών <i>Nicotiana glauca</i> και <i>Alyssum baldaccii</i>	45
Γ5. Επίδραση του Μολύβδου (Pb) στα ένζυμα GDH και ωσμωτίνη σε ιστούς φυτών <i>Nicotiana glauca</i> και <i>Alyssum baldaccii</i>	48
Γ5.1. Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH).	50
Γ5.2. ΩΣΜΩΤΙΝΗ	51
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συνεχής ρύπανση των εδαφών από τοξικά βαρέα μέταλλα εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους τόσο για το περιβάλλον όσο και την ανθρώπινη υγεία. Η ρύπανση προέρχεται από ανθρώπινες δραστηριότητες όπως η εξόρυξη και η διαδικασία καθαρισμού μεταλλοφόρων ορυκτών, η χρήση φυσικών καυσίμων, η διαχείριση των αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων και η χρήση λιπασμάτων και παρασιτοκτόνων στη γεωργία. Επίσης στις χωματερές, συσσωρεύονται βαρέα μέταλλα στα εκρέοντα διασταλάζοντα υγρά τα οποία ρυπαίνουν τα εδάφη της κοίτης απορροής.

Οι συμβατικές μέθοδοι ανάκτησης των ρυπασμένων εδαφών, που βασίζονται στην απομάκρυνση ή στην καθήλωση των τοξικών μετάλλων, μηχανικά ή χημικά, παρουσιάζουν αρκετά προβλήματα (χώροι εναπόθεσης, υψηλό κόστος κ.ά.).

Τα τελευταία χρόνια έχει εισαχθεί μια ταχύτατα αναπτυσσόμενη εναλλακτική βιοτεχνολογική προσέγγιση του προβλήματος που χρησιμοποιεί φυτά για την απορρύπανση εδαφών (φυτοεξυγίανση). Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους η φυτοεξυγίανση είναι μια φυσική, χαμηλού κόστους (έως και 1000 φορές φθηνότερη από τις συμβατικές) και υψηλής αποτελεσματικότητας πράσινη τεχνολογία, που επιπλέον είναι αποδεκτή από τις γειτονικές, του προς εξυγίανση χώρου, κοινότητες.

Η φυτοεξυγίανση περιλαμβάνει αρκετές τεχνικές οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους στον τρόπο με τον οποίο τα φυτά μεταχειρίζονται τους ρυπαντές (αφαίρεση, σταθεροποίηση, διάσπαση) καθώς και στον τύπο του ρυπαντή που στοχεύουν (οργανικοί ή ανόργανοι ρυπαντές).

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια ερευνητικού προγράμματος του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών που στοχεύει στη δοκιμή και αξιοποίηση των πλούσιων γενετικών πόρων της ελληνικής χλωρίδας για τη βιοεξυγίανση ρυπασμένων με βαρέα μέταλλα εδαφών, με πιλοτική εφαρμογή στα εδάφη της χωματερής Πέρα Γαλήνων του Νομού Ηρακλείου. Το Πρόγραμμα περιλαμβάνει:

1. Την εκτίμηση του μεγέθους της ρύπανσης στους χώρους της χωματερής.
2. Την επιλογή κατάλληλων για βιοεξυγίανση φυτικών γενοτύπων και τη δοκιμή τους σε υποστρώματα με βαρέα μέταλλα: α) *in vitro*, β) σε

ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκηπίου και γ) στις πραγματικές συνθήκες της χωματερής.

3. Την παρακολούθηση της απορρύπανσης των υποστρωμάτων, της συσσώρευσης βαρέων μετάλλων στους φυτικούς ιστούς και τη συσχέτισή τους με μεταβολές μακροσκοπικών και βιοχημικών παραμέτρων των φυτών.
4. Τη γονιδιακή προσέγγιση του φαινομένου της βιοσυσσώρευσης.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται πληροφορίες για τα προβλήματα που προκαλεί η ρύπανση του περιβάλλοντος και για τις μεθόδους απορρύπανσης που χρησιμοποιούνται. Επίσης παραθέτονται στοιχεία για την επίδραση των βαρέων μετάλλων σε παραμέτρους του φυτικού μεταβολισμού.

Στα πλαίσια της διερεύνησης της καταλληλότητας των φυτικών ειδών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii* για βιοεξυγίανση μελετήθηκε στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας η επίδραση των βαρέων μετάλλων Zn και Pb σε *in vitro* καλλιέργειες. Μεταξύ άλλων παρακολουθήθηκαν οι μεταβολές σε μακροσκοπικές και βιοχημικές παραμέτρους των φυτών με έμφαση στα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών γλουταμική αφυδρογονάση (GDH) και ωσμωνίνη.

A.1 ΡΥΠΟΙ – ΑΠΟΡΥΠΑΝΣΗ

Γενικά οι ρύποι προέρχονται από προϊόντα πετρελαίου, προϊόντα καύσης ενεργειακών πόρων, χλωριωμένοι ή μη οργανικοί διαλύτες και πρώτες ύλες από διάφορες βιομηχανικές δραστηριότητες

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος εισροής ρύπων στο έδαφος είναι από τις υπόγειες δεξαμενές αποθήκευσης υγρών καυσίμων, διασταλάγματα από ΧΥΤΑ, τεχνητές λίμνες διάθεσης αποβλήτων, ατυχήματα και παράνομη διάθεση.

Πάνω από 1600 οργανικές ενώσεις (φυσικές ή ανθρωπογενείς) έχουν διαπιστωθεί ότι βρίσκονται σε φυσικές ή ρυπασμένες περιοχές. Η χημική δομή ενός ρυπαντή είναι πολύ σημαντική διότι καθορίζει τη «βιο-αποδομησιμότητα» του.

Η βιοαποικοδομητικότητα και ο βαθμός ευκολίας έχουν προσδιοριστεί για μια μεγάλη σειρά οργανικών ενώσεων. Στις οργανικές ενώσεις που

ακολουθούν ο βαθμός ευκολίας βιοαποικοδόμησης ελαττώνονται από τα πάνω προς τα κάτω:

- Απλοί υδρογονάνθρακες με 1 – 15 άτομα άνθρακα C1-C15
- Αλκοόλες, φαινόλες, αμίνες
- Οξέα, εστέρες, αμίδια
- Υδρογονάνθρακες με 12 – 20 άτομα άνθρακα C12-C20
- Αιθέρες, μονοχλωριωμένοι υδρογονάνθρακες
- Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
- Πολυχλωριωμένα διφαινύλια
- Φυτοφάρμακα

Κατά την εξέταση και χαρακτηρισμό των ρύπων στο υπέδαφος συνηθίζεται να χρησιμοποιούνται οι συγκεντρωτικοί δείκτες όπως οι κάτωθι:

- Ολικοί Πετρελαϊκοί Υδρογονάνθρακες (Total Petroleum Hydrocarbons)
- Ολικός Οργανικός Άνθρακας (Total Organic Carbon)
- Ολικά Διαλυτά Στερεά (Total Dissolved Solids)
- Βιολογικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (BOD₅)
- Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD)
- Βαριά Μέταλλα (Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn, Hg, As, Ag)

Οι βασικές μέθοδοι-τεχνικές βιο-αποκατάστασης είναι

I Εξαγωγή πτητικών ενώσεων από το έδαφος (Soil Vapour Extraction, SVE) :

Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) από την ακόρεστη ζώνη με κύριο μηχανισμό μεταφοράς μάζας την εξάτμιση και εν συνεχεία μεταφορά (συμμεταφορά) των ατμών (αέρια φάση).

II Βιο-αερισμός (Bioventing): Βιο-αερισμός είναι η βιολογική απομάκρυνση ρύπων από το υπέδαφος λόγω του αερισμού του εδάφους. Ο βιο-αερισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί:

i Για τη μείωση του κόστους επεξεργασίας των πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) που συλλέγονται με την τεχνική SVE.

ii Για την βιοαποικοδόμηση και ημιπτητικών οργανικών ενώσεων (Semi VOCs) που δεν μπορούν να απομακρυνθούν με την τεχνική του SVE.

III Τεχνική της άντλησης και επεξεργασίας (Pump and Treat Systems): Το σύστημα αυτό είναι μια τεχνική αποκατάστασης (remediation technology) ρυπασμένων υδροφόρων φορέων ή χωμάτων στην κεκορεσμένη ζώνη από οργανικές ενώσεις. Τα συστήματα άντλησης & επεξεργασίας έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον κυρίως στη δεκαετία του 80. Ένα τέτοιο σύστημα σχεδιάζεται με δύο στόχους:

i Ακίνητοποίηση της ρυπασμένης ζώνης του υδροφόρου φορέα ώστε να μην υπάρξει περαιτέρω εξάπλωση των ρύπων

ii Απορρύπανση με απομάκρυνση του ρυπασμένου ύδατος από το υπέδαφος και στη συνέχεια επεξεργασία σε κατάλληλες μονάδες στην επιφάνεια.

Και οι δύο παραπάνω στόχοι επιτυγχάνονται με τη χρήση πηγαδιών άντλησης. Η μόνη διαφορά είναι ότι αν έχουμε σα μοναδικό στόχο την ακίνητοποίηση (και αύξηση) της ζώνης ρύπανσης, τότε το κόστος είναι πολύ λιγότερο διότι ο αριθμός των απαιτούμενων πηγαδιών άντλησης είναι μικρότερος.

IV Τεχνική του in situ αερισμού: (In Situ Air Sparging): In situ αερισμός είναι μια τεχνική αποκατάστασης ρυπασμένων υδροφόρων φορέων ή χωμάτων στην κεκορεσμένη ζώνη από πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs) που άρχισε να χρησιμοποιείται από τα μέσα της δεκαετίας του 1980. Οι μηχανισμοί μεταφοράς μάζας κατά τη διάρκεια εφαρμογής του in situ αερισμού εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση σύνθετων φυσικών, χημικών και βιολογικών φαινομένων. Η τεχνική του αερισμού είναι πρακτικά εφαρμόσιμη όταν πτητικές ή βιοαποικοδομήσιμες οργανικές ενώσεις ρυπαίνουν κορεσμένες ζώνες σε σχετικά διαπερατά εδάφη.

Ένα κλασικό σύστημα αερισμού έχει ένα ή περισσότερα σημεία έκχυσης αέρα στον υδροφόρο φορέα. Στις πρώτες εφαρμογές της τεχνολογίας αυτής συχνά εθεωρείτο ότι ο αέρας μεταφέρεται εντός της κεκορεσμένης ζώνης υπο μορφή φυσαλίδων (air bubbles). Το πλέον ορθό είναι η μεταφορά αέρα διαμέσου συνεχών καναλιών (continues air channels).

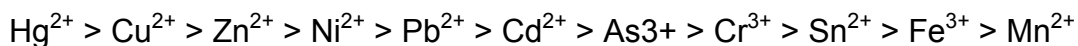
V Φυτο-εξυγίανση (Phytoremediation): Είναι ένα είδος τεχνολογίας που χρησιμοποιεί τα φυτά για την εξυγίανση του εδάφους, της επιφάνειας του

νερού και των υπόγειων υδάτων που περιέχουν τοξικά μέταλλα και άλλα οργανικά στοιχεία. Αναλυτικότερα παρουσιάζεται παρακάτω.

A.2 ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Βαρέα ονομάζονται τα μέταλλα με ατομικό βάρος μεγαλύτερο από εκείνο του Fe (ΑΒFe=56). Ενώ πολλά από αυτά τα μέταλλα σε μικρές ποσότητες είναι απαραίτητα για την δράση των βιταμινών και τις διάφορες ζωτικές λειτουργίες, σε μεγάλες ποσότητες προκαλούν σειρά δυσμενών επιδράσεων στους ζωντανούς οργανισμούς και κατά συνέπεια και στον άνθρωπο, όπως νευροφυσιολογικές διαταραχές, γενετικές αλλοιώσεις των κυττάρων (μεταλλάξεις), επιδράσεις στην ενζυμική και ορμονική δραστηριότητα, προβλήματα στην αναπαραγωγή, τερατογενέσεις και καρκινογενέσεις.

Η σειρά τοξικότητάς τους είναι η εξής:



Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους, το είδος του μετάλλου, την ύπαρξη και συνεργιστική δράση άλλων μετάλλων και το είδος του οργανισμού.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά αυτών των στοιχείων είναι ότι δεν βιοαποικοδομούνται αλλά καθιζάνουν ως δυσδιάλυτα άλατα ή σύμπλοκα. Συνήθως μεταφέρονται μέσω των αστικών λυμάτων και βιομηχανικών καταλοίπων με τα νερά της βροχής ή των ποταμών, ακόμα και σε καλλιεργήσιμα εδάφη όπου παραμένουν για εκατονταετίες μιας και δεν υπάρχει κανένας φυσικός ή βιολογικός τρόπος για την καταστροφή τους. Υψηλή συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στην επιφάνεια το εδάφους μπορεί να προκαλέσει διάφορα προβλήματα στα καλλιεργούμενα φυτά (π.χ. τοξικότητα) αλλά και στον ίδιο τον άνθρωπο όπου θα τραφεί με αυτά στην συνέχεια.

A.2.1 Ψευδάργυρος (Zn) και Μόλυβδος (Pb)

Ο Μόλυβδος και ο Ψευδάργυρος αποτελούν δύο από τα πιο αμετάβλητα μέταλλα, με διάρκεια συγκράτησής τους από το έδαφος περίπου 150-5000 χρόνια. Είναι δυο από τα πιο τοξικά στοιχεία στο περιβάλλον, με περιορισμένη διαλυτότητα στα εδάφη και διαθεσιμότητα στα φυτά, λόγω της συμπλοκοποίησής τους με οργανική ύλη οπότε και κατακρημνίζονται ως ανθρακικά, υδροξειδία και φωσφορικά άλατα.

Η διαλυτότητά τους στα εδαφικά διαλύματα ελέγχεται από τα φωσφορικά άλατα ή τα ανθρακικά ιζήματα σε εδάφη με pH από 5,5-7,5. Υψηλά εδαφικά pH (άνω του 7,5) και ιδιαίτερα χαμηλά (κάτω του 5,5) είτε μειώνουν, είτε αυξάνουν την διαλυτότητα του Ψευδαργύρου και του Μολύβδου (Kambhampati et al., 2003).

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις τα συγκεκριμένα μέταλλα, καθώς και πολλά άλλα (Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo), αποτελούν βασικά μικροστοιχεία για τον μεταβολισμό των φυτών καθώς είναι συστατικά πολλών πρωτεϊνών και ενζύμων που εμπλέκονται σε αντιοξειδωτικές αντιδράσεις. Σε υψηλές συγκεντρώσεις όμως μπορεί να έχουν διάφορες αρνητικές επιδράσεις στα φυτά, όπως:

- ✓ Πρόκληση τοξικότητας.
- ✓ Προβλήματα στην φωτοσύνθεση.
- ✓ Βλάβες στις κυτοπλασμικές μεμβράνες.
- ✓ Παρεμπόδιση ενζυμικών αντιδράσεων.
- ✓ Βλάβες στον γενετικό κώδικα (DNA).
- ✓ Οξειδωση πρωτεϊνών.

A.3 ΦΥΤΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗ (Phytoremediation)

Η τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης εκμεταλλεύεται τη φυσική ιδιότητα πολλών φυτικών ειδών να απορροφούν, να συσσωρεύουν και σε μερικές περιπτώσεις να μεταβολίζουν συστατικά του εδάφους και του νερού. Μερικά φυτά έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις ακόμη και μέταλλα, που δεν τους είναι χρήσιμα για την ανάπτυξή τους. Η χρήση της

φυτοεξυγίανσης ενδείκνυται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ρύπανσης του εδάφους και του νερού με βαρέα μέταλλα και ραδιενεργά στοιχεία αλλά και με οργανικές ενώσεις, όπως χλωριωμένους διαλύτες, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, εκρηκτικές ουσίες, απορρυπαντικά, θρεπτικά συστατικά (π.χ.φωσφορικά, νιτρικά), που προκαλούν ευτροφισμό επιφανειακών υδάτων.

Αυτή η τεχνολογία χρησιμοποιεί την καλλιέργεια φυτών για την εξυγίανση μολυσμένων εδαφών, επιφανειακών και υπόγειων υδάτων. Εφαρμόζεται κυρίως σε περιπτώσεις, όπου η ρύπανση είναι:

- ευρείας έκτασης (σε επιφάνεια),
- βρίσκεται στα ανώτερα στρώματα του εδάφους (μέχρι 1 m βάθος) ή του υδροφόρου ορίζοντα (μέχρι 3 m βάθος), και
- έχει σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα ρυπαντών έτσι, ώστε η εκσκαφή του μολυσμένου εδάφους ή η άντληση του μολυσμένου νερού και η ακόλουθη επεξεργασία τους να καθίσταται αντισυμβατική.

Η επιτυχία της εξαρτάται κυρίως από τους παρακάτω παράγοντες:

- Επιλογή του κατάλληλου φυτικού είδους. Τα φυτά αυτά πρέπει να είναι ανθεκτικά στις τοξικές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων, να παράγουν μεγάλη βιομάζα και να έχουν την ικανότητα να απορροφούν και να μεταφέρουν τα μέταλλα από το ριζικό σύστημα στην υπέργεια βιομάζα.
- Η διαθεσιμότητα των μετάλλων. Τα μέταλλα είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε μη-υπολειμματική μορφή, έτσι ώστε να είναι δυνατή η απορρόφησή τους από τη ρίζα και ακολούθως η μεταφορά τους στο βλαστό. Για να αυξηθεί η διαθεσιμότητα των μετάλλων και κατά συνέπεια η πρόσληψή τους από τα φυτά, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτες χηλικοί παράγοντες (EDTA, κιτρικό οξύ, μαλικό οξύ και νιτρώδες αμμώνιο).

Η τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης περιλαμβάνει τις παρακάτω πέντε βασικές τεχνικές:

1. **Φυτοεκχύλιση (Phytoextraction):** Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την εξυγίανση ρυπασμένων εδαφών. Οι ρυπαντές απορροφούνται και

συσσωρεύονται σε όλους τους φυτικούς ιστούς και στο ριζικό σύστημα, που πρέπει να μαζευτούν κατά τη συγκομιδή για περαιτέρω επεξεργασία.

2. Ριζοδιύλιση (Rhizofiltration): Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για διύλιση ρύπων από το νερό μέσω της προσρόφησης τους από τις ρίζες των φυτών.

3. Φυτομετατροπή (Phytotransformation): Χρησιμοποιείται σε χώμα και νερό και βασίζεται στο μεταβολισμό των ρυπαντών από τα φυτά. Κατά τη φυτομετατροπή αποικοδομούνται από το φυτό πολύπλοκες οργανικές ουσίες, οι οποίες ενσωματώνονται υπό μορφή απλών μορίων στους φυτικούς ιστούς.

4. Φυτοδιέγερση (Phyostimulation): Χρησιμοποιείται σε χώμα και νερό και στηρίζεται στη διέγερση της μικροβιακής αποικοδόμησης των ρυπαντών, που συντελείται από μικροοργανισμούς (μικρόβια και μύκητες), που βρίσκονται στις ρίζες των φυτών. Τα φυτά απελευθερώνουν από το φυτικό τους σύστημα ένζυμα ή άλλα προϊόντα μεταβολισμού τους, τα οποία διεγείρουν το μεταβολισμό των ρυπαντών από τους μικροβιακούς πληθυσμούς, που υπάρχουν στο γύρω περιβάλλον.

5. Φυτοσταθεροποίηση (Phyostabilization): Περιλαμβάνει συσσώρευση και κατακρήμνιση των ρυπαντών και χρησιμοποιείται για να μειώσει την κινητικότητα των ρυπαντών στο έδαφος έτσι, ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα ή η μεταφορά τους με τον άνεμο ή ακόμη και η είσοδος τους στην τροφική αλυσίδα.

Συγκομιδή, επεξεργασία και διάθεση των φυτών

Μετά τη φυτοεξυγίανση των μολυσμένων περιοχών τα φυτά πρέπει να κοπούν και το φυτικό τους σύστημα να ξεριζωθεί. Η επεξεργασία, που θα ακολουθεί στη συνέχεια εξαρτάται από την τοξικότητα των βιοσυσσωρευμένων ουσιών. Η πιο συνηθισμένη επεξεργασία είναι η θερμική αποδόμηση ή η ελεγχόμενη αποτέφρωση, ιδιαίτερα στην περίπτωση των βαρέων μετάλλων. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων στην παραγόμενη στάχτη, η οποία καταλαμβάνει πολύ μικρό όγκο. Στην περίπτωση της συσσώρευσης ραδιενεργών στοιχείων από τα φυτά είναι απαραίτητη η διάθεσή

τους μαζί με άλλα ραδιενεργά απόβλητα σε ειδικά σχεδιασμένους χώρους υγειονομικής ταφής.

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της Φυτοεξυγίανσης

Πλεονεκτήματα

- ✓ Το βασικότερο προτέρημα της μεθόδου αυτής είναι ότι παράγονται λιγότερα δευτερογενή απόβλητα από ότι σε άλλες τεχνολογίες.
- ✓ Η φυτοεξυγίανση εφαρμόζεται επί τόπου και δεν είναι αναγκαία μία εκσκαφή ή άντληση για περαιτέρω επεξεργασία. Για αυτό το λόγο δε διαταράσσεται καθόλου το φυσικό τοπίο της μολυσμένης περιοχής.
- ✓ Είναι οικονομική επεξεργασία ιδιαίτερα για μεγάλους όγκους χώματος ή νερού, που είναι μολυσμένα με μικρές ποσότητες τοξικών ρυπαντών.
- ✓ Επιτυγχάνεται η συγκέντρωση των τοξικών ουσιών σε πολύ μικρούς όγκους. Για παράδειγμα σε πρόγραμμα φυτοεξυγίανσης απομακρύνθηκαν τα βαρέα μέταλλα από 5.000 τόνους μολυσμένου εδάφους. Το έδαφος αυτό που θα έπρεπε να εκσκαφθεί και να διατεθεί σε χώρους υγειονομικής ταφής, μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί για καλλιέργεια μετά από φυτοεξυγίανση. Τα βαρέα μέταλλα που υπήρχαν στο μολυσμένο χώμα συγκεντρώθηκαν σε 25 - 30 τόνους στάχτης φυτικών ιστών και επομένως μόνο αυτό το 1/200 του αρχικού όγκου πρέπει να διαθέτει σε ειδικούς χώρους υγειονομικής ταφής.

Μειονεκτήματα

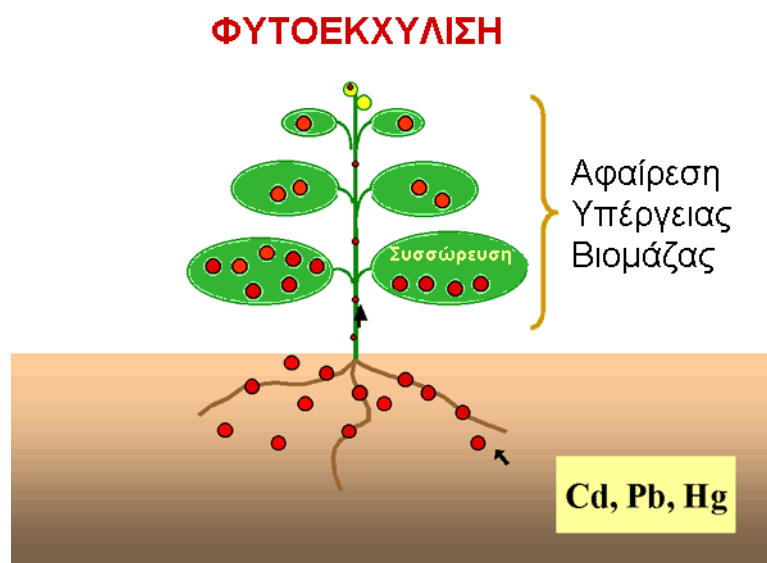
- Στα μειονεκτήματα συγκαταλέγονται οι ιδιαίτερα αργοί ρυθμοί φυτοεξυγίανσης, οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν μερικές συνεχόμενες περιόδους καλλιέργειας των φυτών μέχρι να εξυγιανθεί τελείως το περιβάλλον από τους ρυπαντές.
- Η φυτοεξυγίανση φέρνει μόνο αποτελέσματα, όταν το βάθος της μόλυνσης δε ξεπερνά το 1m στο έδαφος και τα 3m στον υδροφόρο ορίζοντα.
- Μειονεκτήματα αποτελεί η δυνατότητα να μεταδοθούν οι τοξικές ουσίες στην τροφική αλυσίδα μετά από πιθανή βρώση των φυτών από ζώα.

- Οι κλιματικές ή οι υδρολογικές συνθήκες στην μολυσμένη περιοχή μπορεί να μην επιτρέπουν την καλλιέργεια και ανάπτυξη των κατάλληλων για την φυτοεξυγίανση φυτών.

A.3.1 ΦΥΤΟΕΚΧΥΛΙΣΗ

Φυτοεκχύλιση είναι η πρόσληψη ρυπαντών από τις φυτικές ρίζες και η μετακίνησή τους στο υπέργειο μέρος των φυτών. Η απομάκρυνση των ρυπαντών από τη θέση της μόλυνσης γίνεται με τη συγκομιδή των φυτών. Η συγκομιζόμενη βιομάζα μπορεί να μειωθεί κατ' όγκο ή κατά βάρος, με θερμικά, μικροβιολογικά, φυσικά ή χημικά μέσα. Η ανάκτηση μερικών μετάλλων όπως των Ni, Zn και Cu μπορεί να δώσει και ένα επιπλέον έσοδο.

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται κυρίως σε περιπτώσεις εδαφών και αποβλήτων που έχουν μολυνθεί από βαρέα μέταλλα και ραδιενεργά υλικά. Μετά από ένα πρόγραμμα φυτοεκχύλισης, το έδαφος παραμένει γόνιμο και κατάλληλο για περαιτέρω καλλιέργεια.



Εικόνα 1: Συσσώρευση βαρέων μετάλλων στην φυτική βιομάζα.

Η φυτοεκχύλιση βαρέων μετάλλων μπορεί να επιτευχθεί με δύο προσεγγίσεις:

- **Φυσική φυτοεκχύλιση:** Χρησιμοποιούνται φυτά τα οποία έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες βαρέων μετάλλων στους

βλαστούς και τα φύλλα τους. Τυπικά, τα φυτά αυτά είναι μικρά, με μικρό ριζικό σύστημα και σχετικά αργή ανάπτυξη. Τα επιλεγμένα φυτά φυτεύονται ή μεταφυτεύονται στο ρυπασμένο έδαφος και αναπτύσσονται υπό κανονικές καλλιεργητικές συνθήκες. Μετά την πλήρη ανάπτυξη, τα υπέργεια μέρη των φυτών συλλέγονται και απομακρύνονται.

- **Επαγόμενη φυτοεκχύλιση:** Περιλαμβάνει την επιλογή και καλλιέργεια φυτών με γρήγορη ανάπτυξη στις μολυσμένες περιοχές. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών προστίθενται στο έδαφος χηλικές ενώσεις (π.χ. EDTA) προκειμένου να αυξήσουν τη διαθεσιμότητα των μετάλλων στα φυτά. Όταν τα φυτά ωριμάσουν, χρησιμοποιούνται χημικοί παράγοντες επαγωγής για να κατευθύνουν τη συσσώρευση των μετάλλων στο υπέργειο μέρος των φυτών. Τα φυτά τότε συλλέγονται και απομακρύνονται.

A.3.1.1 Φυτά Υπερσυσσωρευτές (*hyperaccumulators plants*)

Για τη φυτοεξυγίανση εδαφών από βαρέα μέταλλα απαιτούνται φυτά ικανά να αντέχουν και να συσσωρεύουν υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στην υπέργεια βιομάζα τους, η οποία είτε απλά απομακρύνεται ή και αξιοποιείται περαιτέρω για την απομόνωση και εμπορική εκμετάλλευση των μετάλλων.

Πολλά φυτικά είδη έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες μετάλλων, σε επίπεδα 100 φορές μεγαλύτερες από εκείνες που ανιχνεύονται στους ιστούς των κοινών φυτών (χαρακτηρίζονται ως υπερσυσσωρευτές). Όπως είναι φυσικό τα φυτικά αυτά είδη παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη χρησιμοποίησή τους σε προγράμματα φυτοεξυγίανσης. Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί περισσότερα από 400 φυτικά είδη, που ανήκουν σε τουλάχιστον 45 οικογένειες φυτών, με ικανότητες συσσώρευσης βαρέων μετάλλων (έως και 5% του ξηρού τους βάρους) εκ των οποίων κάποια χρησιμοποιούνται ήδη σε προγράμματα φυτοεξυγίανσης.

Ένας υπερσυσσωρευτής μπορεί να συγκεντρώνει περισσότερα από 10 ppm Υδραργύρου (Hg), 100 ppm Καδμίου (Cd), 1000 ppm Κοβαλτίου (Co), Χρωμίου (Cr), Χαλκού (Cu) και Μολύβδου (Pb), 10.000 ppm Ψευδαργύρου (Zn) και Νικελίου (Ni).

Τα περισσότερα από τα γνωστά φυτά συσσωρεύουν Ni, περίπου 30 Co, Cu και Zn, και λιγότερα έχουν βρεθεί να συσσωρεύουν τα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα. Επίσης πρόσφατα βρέθηκε ότι η φτέρη *Pteris vitatta* συσσωρεύει στους υπέργειους ιστούς της έως και 14.500 ppm Αρσενικού (As), χωρίς να εμφανίζει συμπτώματα τοξικότητας. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται μερικά από τα σημαντικότερα φυτικά είδη με ικανότητα συσσώρευσης βαρέων μετάλλων.

Πίνακας 1: Υπερσυσσωρευτές μετάλλων και το βιοσυσσωρευτικό δυναμικό τους.

Φυτικό είδος	Μέταλλο	Συσσώρευση μετάλλου στα φύλλα, ppm
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Zn	39.600
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Cd	1.800
<i>Ipomea alpina</i>	Cu	12.300
<i>Sebertia acuminata</i>	Ni	25% του ξηρού βάρους
<i>Haumaniastrum robertii</i>	Co	10.200
<i>Astragalus racemosus</i>	Se	14.900

Ο πιο γνωστός υπερσυσσωρευτής είναι το *Thlaspi caerulescens*. Ενώ τα περισσότερα φυτά εμφανίζουν συμπτώματα τοξικότητας σε συγκεντρώσεις Zn περίπου 100 ppm, το *Thlaspi caerulescens* μπορεί να συσσωρεύσει έως και 26.000 ppm χωρίς κανένα σύμπτωμα. Εκτός από Zn, έχει την ικανότητα να συσσωρεύει και μεγάλες ποσότητες Cd.



Εικόνα 2: Ο υπερσυσσωρευτής *Thlaspi caerulescens*.

Επίσης, το Indian mustard (*Brassica juncea*) συσσωρεύει σημαντικές ποσότητες μολύβδου και χρησιμοποιείται ευρέως σε προγράμματα φυτοεξυγίανσης. Άλλα φυτικά είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η λεύκα, το τριφύλλι, ο ηλίανθος, το καλάμι, το άλυσο και η τσουκνίδα. Οι λεύκες έχουν αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικές στην προσρόφηση και συσσώρευση αρσενικού και καδμίου. Οι ηλίανθοι έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την εξυγίανση επιφανειακών υδάτων κοντά στο Τσερνόμπιλ κυρίως από ραδιενεργό στρόντιο και καίσιο.

A.3.1.2 Πρόσληψη μετάλλων από τα φυτά

Τα φυτά για να αναπτυχθούν χρειάζονται τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία (μακρο- μικροστοιχεία) και διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς πρόσληψης, μεταφοράς και αποθήκευσης καθενός από τα στοιχεία αυτά.

Τα βαρέα μέταλλα Zn, Mn, Ni και Cu είναι απαραίτητα μικροστοιχεία για τα φυτά. Τα κοινά φυτά προσλαμβάνουν και συσσωρεύουν μικρές ποσότητες αυτών των μικροστοιχείων (< 10ppm), που δεν ξεπερνούν τις μεταβολικές τους

ανάγκες. Αντίθετα, ένας υπερσυσσωρευτής μπορεί να προσλάβει πολύ μεγαλύτερες ποσότητες (χιλιάδες ppm). Είναι γεγονός ότι η διαδικασία αυτή είναι ενεργοβόρος και επομένως εύλογα τίθεται το ερώτημα πιο είναι το εξελικτικό πλεονέκτημα των φυτών αυτών. Πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει την συσσώρευση βαρέων μετάλλων στο φύλλωμα των φυτών με την ανθεκτικότητά τους σε εχθρούς και ασθένειες (έντομα, μύκητες και βακτήρια).

Επίσης, οι υπερσυσσωρευτές προσλαμβάνουν όχι μόνο τα απαραίτητα μικροστοιχεία, αλλά και άλλα μη απαραίτητα μέταλλα, όπως το Cd. Στις περιπτώσεις αυτές, φαίνεται ότι τα μη απαραίτητα μέταλλα προσλαμβάνονται και μεταφέρονται στο φυτό με τους μηχανισμούς πρόσληψης και μεταφοράς άλλων απαραίτητων μικροστοιχείων (π.χ. το Cd με το μηχανισμό του Zn).

Η πρόσληψη των μετάλλων από τα φυτά υπερσυσσωρευτές εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες:

- ✓ Τύπος και συγκέντρωση του μετάλλου.
- ✓ Τύπος και είδος του φυτού.
- ✓ Ηλικία του φυτού.
- ✓ Ρυθμός και συνθήκες ανάπτυξης.
- ✓ Τύπος του εδάφους, καθώς φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του, όπως περιεκτικότητα σε οργανική ουσία και pH.

A.3.1.3 Περιοριστικοί παράγοντες της φυτοεκχύλισης

Όπως προαναφέρθηκε, πολλά φυτικά είδη συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες τοξικών μετάλλων στους ιστούς τους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα βιοεξυγίανσης ρυπασμένων περιοχών. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν παράγοντες που περιορίζουν την επιτυχία και την εφαρμοσιμότητα της τεχνολογίας αυτής. Τέτοιοι περιοριστικοί παράγοντες είναι:

- Η μικρή βιομάζα και η αργή ανάπτυξη των υπερσυσσωρευτών
- Η περιορισμένη ανθεκτικότητα πολλών φυτών στους ρύπους
- Η ανάγκη καλλιέργειας πολλών διαφορετικών ειδών για την αντιμετώπιση των ρύπων
- Η μειωμένη μετακίνηση σε αρκετά φυτικά είδη των μετάλλων από τη ρίζα στο βλαστό

- Το πρόβλημα της εναπόθεσης των ρυπασμένων φυτών μετά τη συγκομιδή τους
- Ο κίνδυνος μεταφοράς των τοξικών μετάλλων στην τροφική αλυσίδα μετά από βρώση των φυτών

A.3.1.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι τα φυτά διαθέτουν το γενετικό δυναμικό για την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από ρυπασμένες περιοχές με την τεχνική της φυτοεκχύλισης. Βέβαια, η σχετικά μικρή βιομάζα και η αργή ανάπτυξη των περισσότερων υπερσυσσωρευτών αποτελούν τους κύριους αρνητικούς παράγοντες για την αποτελεσματική φυτοεξυγίανση εδαφών από βαρέα μέταλλα και περιορίζουν την χρησιμοποίηση αγρονομικών πρακτικών, όπως τη μηχανική συλλογή των φυτών.

Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων έχουν γίνει προσπάθειες μεταφοράς της ικανότητας υπερσυσσώρευσης μετάλλων από φυτά υπερσυσσωρευτές σε ταχέως αναπτυσσόμενα, υψηλής βιομάζας φυτικά είδη, με τη χρήση της κλασσικής βελτίωσης φυτών. Δυστυχώς όμως, η κλασσική βελτίωση δεν έχει δώσει σημαντικά αποτελέσματα λόγω της φυλετικής ασυμβατότητας που οφείλεται σε ανατομικές διαφορές μεταξύ των ειδών.

Εναλλακτικά, η βιοτεχνολογία με τη γενετική τροποποίηση φυτών παρέχει τη δυνατότητα για άμεση μεταφορά των υπεύθυνων γονιδίων, ξεπερνώντας έτσι το πρόβλημα της ασυμβατότητας μεταξύ των ειδών. Τα ερευνητικά αποτελέσματα στον τομέα αυτό φανερώνουν ότι είναι δυνατή η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών με αυξημένη ικανότητα βιοσυσσώρευσης.

Σε πλήθος πειραμάτων έχουν μελετηθεί οι μηχανισμοί πρόσληψης και συσσώρευσης των βαρέων μετάλλων από τα φυτά και επίσης έχουν απομονωθεί γονίδια υπεύθυνα για τη βιοσυσσώρευση. Η περαιτέρω κατανόηση των φυσιολογικών και μοριακών μηχανισμών πρόσληψης και συσσώρευσης αποτελούν σήμερα θέματα ερευνητικής αιχμής διεθνώς και αποσκοπούν τελικά στη δημιουργία αποτελεσματικών υπερσυσσωρευτών.

A.4 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Nicotiana glauca

Το φυτό *Nicotiana glauca* ανήκει στην ομάδα των δικοτυλήδων και στην οικογένεια Solanaceae. Είναι αυτοφυές στη Βολιβία, στην Αργεντινή, Ν. Αμερική και στις Μεσογειακές χώρες.

Το *Nicotiana glauca* είναι ένας βραχύβιος θάμνος ή ένα μικρό δέντρο που συχνά φτάνει τα 7,5 m στη φύση. Είναι χαρακτηριστική η εμφάνιση του εξαιτίας των μεγάλων ωοειδών γαλάζο -πράσινων φύλλων του. Αυτά είναι παχιά, ελαστικά, απλά, λεία, γλαυκά με διακεκριμένες νευρώσεις και εναλλάσσονται γύρω από τον κορμό με μακρύ μίσχο, έχουν μήκος περίπου 17,5 cm και πλάτος 15 cm. Η ταξιανθία είναι φόβυς με κίτρινα σωληνοειδή άνθη, με πέντε πέταλα, τα οποία αναπτύσσονται στο τέλος της διακλάδωσης χωρίς φύλλα. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, άοσμα και έχουν μήκος 1 $\frac{3}{4}$ ίντσες και πλάτος $\frac{1}{2}$ ίντσες. Οι αγωγοί των ανθέων έχουν πέντε λοβούς και κλείνουν κατά τη διάρκεια του απογεύματος. Αυτά ακολουθούνται από μια ωοειδή σποριόκαψα που περιέχει πολυάριθμους καφέ σπόρους. Το φυτό μπορεί να ανθίζει όλο το χρόνο σε θερμά κλίματα, αλλά συνήθως ανθίζει Αύγουστο έως Οκτώβριο.

Το φυτό είναι καλλιεργούμενο και απαιτεί πλήρη ηλιοφάνεια ή ημισκιά. Στην σκιά δεν μεγαλώνει. Επίσης μπορεί να αναπτυχθεί σε αμμώδη ή αργιλώδη, υγρά και καλά στραγγιζόμενα, όξινα, ουδέτερα ή αλκαλικά εδάφη. Γενικά δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις. Ένα κατάλληλο κόμπποστ καλλιέργειάς του συνιστάται από δύο μέρη πηλού, δύο μέρη τύρφης peat moss και 1 μέρος άμμου. Λιπαίνεται μηνιαία με ισορροπημένο λίπασμα. Για την βέλτιστη ανάπτυξη του φυτού τοποθετείται σε υγρό μέρος. Το φυτό είναι ταχείας ανάπτυξης. Το κλάδεμα προάγει την ανάπτυξη περισσότερων βραχιόνων και περισσότερων ανθέων. Κατά το κλάδεμα δεν πρέπει να απομακρύνουμε τα μαραμένα άνθη έτσι ώστε το φυτό να μπορεί να παράγει σπόρους. Το φυτό μπορεί να γίνει ζιζάνιο αν το τοποθετήσουμε σε θερμοκήπιο. Πολλαπλασιάζεται με τμήματα φυτού ή με σπόρους. Οι εχθροί του είναι πουλιά και έντομα κυρίως της τάξης Lepidoptera.

Το *Nicotiana glauca* χρησιμοποιείται κυρίως σε δημόσιους χώρους, πάρκα και δρόμους. Το φυτό έχει φαρμακευτική χρήση, αλλά επειδή όλα τα

μέρη του είναι εξαιρετικά δηλητηριώδη, πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή. Το *Nicotiana glauca*, ενώ σχετίζεται με το *Nicotiana tabacum*, δεν περιέχει νικοτίνη.

Έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα φυτοεξυγίανσης ως υπερσυσσωρευτής εξαιτίας της γρήγορης ανάπτυξής του, της μεγάλης βιομάζας του και της προσαρμοστικότητάς του στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά ιδιαίτερα στις περιπτώσεις του Pb, Cd και Zn αφού μπόρεσε να αναπτυχθεί πολύ καλά χωρίς να αλλοιωθούν ιδιαίτερα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του και να συγκεντρώσει πάνω από 10000 ppm βαβαίου μετάλλου. Τέτοιου είδους πειράματα έχουν γίνει σε Ευρώπη, Αυστραλία και Αμερική, όπου το *Nicotiana glauca* βρέθηκε φυτό κατάλληλο για φυτοεξυγίανση.

Alyssum baldaccii

Το γένος *Alyssum* ανήκει στην τάξη Capparales της οικογένειας Cruciferae και περιλαμβάνει 170 περίπου είδη, από τα οποία τα 60 συναντώνται στην Ευρώπη. Στην Κρήτη και γενικότερα στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί πολλά είδη *Alyssum*, αρκετά από τα οποία είναι ενδημικά. Για παράδειγμα το *Alyssum handelii* είναι ενδημικό του Ολύμπου ή το *Alyssum samium* το οποίο φύεται μόνο στον Κέρκη. Μεταξύ των ενδημικών φυτικών ειδών της ελληνικής χλωρίδας περιλαμβάνεται και το *Alyssum baldaccii*. Το αρχικό του όνομα ήταν *Alyssum fallacinum*, το οποίο αργότερα μετονομάστηκε σε *Alyssum baldaccii*.

Το γένος *Alyssum* περιλαμβάνει διετείς και πολυετείς πόες με πράσινο φύλλωμα. Τα περισσότερα είδη του έχουν εύοσμα άνθη, μικρά, διαφόρων χρωμάτων και ανθίζουν όλο το καλοκαίρι. Σε ήπια κλίματα το φυτό ανθίζει όλο το χρόνο. Το *Alyssum baldaccii* είναι πολυετές φυτό 20-50 εκ. με μακριά μη ανθίζοντα στελέχη. Τα φύλλα του έχουν μέγεθος 15-25*2-2,5 mm, είναι αντιλογχοειδή, αμβλεία, η πάνω επιφάνεια των οποίων είναι πράσινη και η κάτω λευκή. Τα φύλλα της βάσης είναι μικρότερα, με πέταλα 2,5 – 3 mm και νήματα στημόνων με πολύ-οδοντωτό εξάρτημα. Το κεράτιο έχει μέγεθος 4 - 4,5 * 2,5- 3,3 mm πλατύ ελλειπτικό (σε αντωειδές) με αμβλύ άκρο ή μερικές φορές με ακρόκοιλο άκρο. Το διάφραγμα είναι συχνά ασύμμετρο στο περίγραμμα, τα καρπόφυλλα ασύμμετρα φουσκωτά και σπάνια τριχωτά

(τριχίδια με περίπου 15 ακτίνες, η παρουσία και το σχήμα των οποίων είναι κριτήριο για τη διάκριση ορισμένων ειδών). Ο στύλος έχει μέγεθος 1- 1,5 mm, τα σπέρματα 1,5 -2 mm και το πτερύγιο έχει πλάτος περίπου 0,2 mm.

Το φυτό *Alyssum* αναπτύσσεται σε καλά στραγγιζόμενα εδάφη, σε προσήλιες θέσεις με μέτριες απαιτήσεις σε νερό. Πολλαπλασιάζεται με σπόρο και διαίρεση. Όσον αφορά το σπόρο καλό είναι να μην καλύπτεται, αλλά να πιέζεται ελάχιστα στην μέσα επιφάνεια, εφόσον χρειάζεται φως για να βλαστήσει. Είναι φυτό κατάλληλο για παρτέρια ή βραχόκηπους. Κυριότερος εχθρός του είναι η μέλισσα.

Γενικά, πολλά είδη του *Alyssum* έχουν χρησιμοποιηθεί σε έρευνες και πειράματα φυτοεξυγίανσης εδαφών με βαρέα μέταλλα, όπως νικέλιο (Ni) και κοβάλτιο (Co). Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά, αφού τα φυτά μπόρεσαν όχι μόνο να αναπτυχθούν κανονικά σε εδάφη πλούσια σε νικέλιο αλλά και να συγκεντρώσουν μεγάλες ποσότητες νικελίου (1000 mg Ni/kg ξηρού βάρους).

A.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΑ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Η υψηλή συγκέντρωση βαρέων μετάλλων και γενικότερα οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις προκαλούν μοριακές, βιοχημικές, φυσιολογικές και μορφολογικές αντιδράσεις των φυτών. Οι μεταβολές τις οποίες προκαλούν οι καταπονήσεις στη γονιδιακή έκφραση προξενούν αλλαγές στη συμπεριφορά πολλών ενζύμων, στην αύξηση ή τη μείωση των αντίστοιχων μεταβολικών προϊόντων και μεταβολές στη σύνθεση νέων πρωτεϊνικών ομάδων και πολυπεπτιδίων. Έχει αποδειχθεί η επαγωγή σύνθεσης πρωτεϊνών (πρωτεϊνών καταπόνησης, stress ή shock proteins) από αλατότητα, ωσμωτική καταπόνηση, θερμοπληξία, παγετό, ανοξία (αναεροβίωση), μηχανική καταπόνηση, ατμοσφαιρική ρύπανση, υπεριώδη ακτινοβολία, οξειδωτική καταπόνηση και βαρέα μέταλλα.

Μερικές από τις πρωτεΐνες είναι χαρακτηριστικές για ένα συγκεκριμένο είδος καταπόνησης, π.χ οι φυτοχλατίνες για καταπόνηση από βαρέα μέταλλα, ή είναι κοινές για περισσότερες τις μιας καταπονήσεις, π.χ. η ωσμωτίνη και οι LEA για καταπόνηση από ψύχος, ξηρασία, αλατότητα, ενώ επιπλέον απαντούν και σε φυσιολογικά κύτταρα μετά από επίδραση ABA. Αρκετές από τις πρωτεΐνες αυτές έχουν ταυτοποιηθεί, όπως π.χ. τα πολυπεπτίδια που

επάγονται από αναεροβίωση και έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες (ένζυμα γλυκόλυσης, ζυμώσεων), οι θερμοπληξιακές πρωτεΐνες (μοριακοί συνοδοί) ή συντιθέμενες *de novo* από αλατότητα πρωτεΐνες LEA (δραστηριοποιούνται ως κυτταροπλασματικοί ωσμωλύτες). Οι περισσότερες, όμως, αν και ενδεχομένως προστατεύουν από τις αρνητικές συνέπειες μιας καταπόνησης, αποδομούνται αμέσως μετά. Ο ακριβής φυσιολογικός ρόλος τους, ο οποίος προσδίδει ανθεκτικότητα, δεν έχει διευκρινιστεί για τις περισσότερες από αυτές.

Μερικές από τις μεταβολές είναι αναμενόμενες και η ερμηνεία τους προφανής, όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε βλαστούς φυτών που υπόκεινται σε καταπονήσεις αλατότητας και ξηρασίας, όπου η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών ελαττώνεται εξαιτίας μειωμένης σύνθεσης, αλλά και αυξημένης πρωτεόλυσής τους. Αντιθέτως, κατά την εκβλάστηση σπόρων στις ίδιες καταπονήσεις, η ποσότητα των πρωτεϊνών αυξάνεται, όχι λόγω αυξημένης σύνθεσης, αλλά λόγω μειωμένης πρωτεόλυσής τους. Η γενική αντίληψη είναι, πάντως, ότι οι αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και η παρουσία βαρέων μετάλλων έχουν αρνητική επίδραση σε όλο τον πρωτεϊνικό μεταβολισμό.

Έχουν αναφερθεί παραπάνω τα φυτά υπερσυσσωρευτές, που έχουν την ικανότητα να συγκεντρώνουν μεγάλες ποσότητες βαρέων μετάλλων στους βλαστούς και τα φύλλα τους, με αποτέλεσμα να τροποποιείται η γονιδιακή τους έκφραση από το ίδιο το μέταλλο. Τα βαρέα μέταλλα μεταφέρονται με πρόσδεση σε μικρού βάρους ουσίες, όπως τις φυτοχηλατίνες, οι οποίες είναι μικρά πλούσια σε θείο πολυπεπτίδια. Οι φυτοχηλατίνες είναι ασυνήθιστα πεπτίδια με γενικό τύπο (γ-γλουταμικό οξύ.- κυστίνη)_v-γλυκίνη, όπου v=2-8. Η ασυνήθιστη δομή τους οφείλεται στο γεγονός, ότι το πεπτίδιο συνδέεται μεταξύ γλουταμίνης και κυστίνης χρησιμοποιώντας the side chain, ή γ, καρβοξυλομάδα της γλουταμίνης, περισσότερο από το α-καρβοξύλιο, χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών. Ο δεσμός αυτός υποδεικνύει, ότι οι φυτοχηλατίνες δεν συνθέτονται στα ριβοσώματα αλλά είναι προϊόν κάποιων βιοσυνθετικών μονοπατιών. Η αδυναμία σύνθεσης φυτοχηλατίνης, που επιτελείται με μια μη ενζυμική οδό και με πρόδρομη ένωση γλουταθειόνη, οδηγεί σε νέκρωση του φυτού. Οι φυτοχηλατίνες συμπλέκονται στο κυτταρόπλασμα με τα μέταλλα και πιθανόν τα μεταφέρουν για αποθήκευση στο χυμοτόπιο, όπου τα παραδίνουν για πρόσδεση σε οργανικά οξέα, ενώ το αποπεπτιδικό τμήμα τους ελευθερώνεται και πάλι στον συμπλάστη, για να προσδέσει και να μεταφέρει πρόσθετα

μέταλλα. Σημαντικές ποσότητες φυτοχηλατινών βρέθηκαν όταν οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων ήταν σε τοξικά επίπεδα.

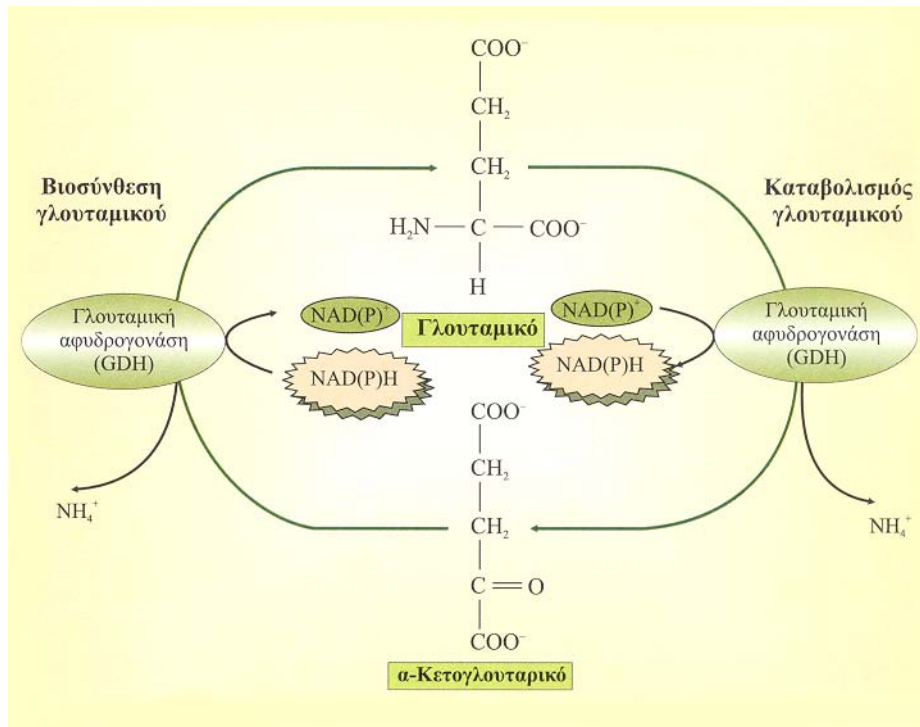
Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί σε σχετικά λίγες περιπτώσεις η επίδραση της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων στα επίπεδα πρωτεϊνών όπως η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH), ένζυμο που φαίνεται να επηρεάζεται από διάφορες συνθήκες καταπόνησης, και η ωσμωτίνη. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα χαρακτηριστικά αυτών των πρωτεϊνών καθώς και τα μέχρι σήμερα δεδομένα.

A.5.1 Γλουταμική αφυδρογονάση (GDH)

Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH) είναι το ένζυμο που καταλύει την αναγωγική αμίνωση του α-κετογλουταρικού οξέος σε γλουταμικό οξύ (αναβολική αντίδραση, NADH-GDH) και την απαμίνωση του γλουταμικού οξέος (καταβολική αντίδραση, NAD-GDH):



Ο ρόλος της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) σήμερα στο μεταβολισμό των ανώτερων φυτών παραμένει αδιευκρίνιστος, παρά το γεγονός ότι ανιχνεύεται σε όλα τα φυτά και συχνά υπάρχει σε υψηλά επίπεδα στους διάφορους φυτικούς ιστούς. Το ένζυμο μπορεί να λειτουργεί με δυο τρόπους. Στην αφομοίωση ή την επαναφομοίωση του αμμωνίου, δρώντας έτσι συμπληρωματικά με το δίδυμο GS/GOGAT στη σύνθεση του γλουταμικού οξέος, ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες stress (υψηλή θερμοκρασία, έλλειψη νερού, αλατότητα, μολύνσεις από παθογόνα) ή σε ειδικά στάδια ανάπτυξης. Εναλλακτικά, το ένζυμο μπορεί να καταλύει την οξειδωση του γλουταμικού οξέος, εξασφαλίζοντας ανθρακικούς σκελετούς για την αποτελεσματική λειτουργία του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος Krebs), κάτω από περιοριστικές συνθήκες άνθρακα.



Εικόνα 4: Αμινωτική και απαμινωτική αντίδραση, που καταλύονται από τη γλουταμική αφυδρογονάση (από Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Στα ανώτερα φυτά έχουν αναφερθεί δύο κύριες μορφές της GDH : μια μορφή εξαρτώμενη από NADH (NADH-GDH) που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και μια NADPH (NADPH-GDH) εξαρτώμενη μορφή που σχετίζεται με τους χλωροπλάστες. Η NADH-GDH είναι όπως προαναφέρθηκε μιτοχονδριακό ένζυμο με πολλαπλές ισοενζυμικές μορφές. Σε βιοχημικό επίπεδο, το ένζυμο έχει μελετηθεί εκτενώς σε διάφορα φυτικά είδη, ιδιαίτερα στο αμπέλι, τη σόγια και το *Arabidopsis*. Τα μοριακά δεδομένα υποδεικνύουν την παρουσία δυο διακριτών γονιδίων της GDH, που εμφανίζουν διαφοροποιημένη έκφραση ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο των ιστών / οργάνων και εξωγενείς παράγοντες όπως το φως και η πηγή αζώτου (Loulakakis and Roubelakis-Agelakis, 1992; Loulakakis and Roubelakis-Agelakis, 1991).

Τα χαρακτηριστικά της GDH έχουν μελετηθεί σε αρκετά φυτικά είδη, εκτενέστερα δε στο αμπέλι. Το ένζυμο παρουσιάζει πρότυπο επτά συνενζύμων σε όλους τους ιστούς, σε διαφορετικές ποσότητες. Το ένζυμο είναι εξαμερές αποτελούμενο από 2 είδη υπομονάδων, την α και τη β, που διαφέρουν μεταξύ τους στο μοριακό βάρος και στο φορτίο τους. Βρέθηκε ότι όλα τα ισοένζυμα της

GDH περιέχουν και τους δυο τύπους υπομονάδων. Το ισοένζυμο 7 της GDH περιέχει μόνο α-υπομονάδες και το ισοένζυμο 1 μόνο β-υπομονάδες, ενώ τα ενδιάμεσα ισοένζυμα αποτελούνται και από τις δυο υπομονάδες σε μια διατεταγμένη σειρά. Δηλαδή από το ισοένζυμο 1 προς το ισοένζυμο 7, η συμμετοχή της α-υπομονάδας αυξάνει και της β- μειώνεται. Τα δυο ακραία είναι ομοεξαμερή ενώ τα ισοένζυμα δυο έως έξι περιέχουν της α- και β- υπομονάδες σε αναλογία 1:5, 2:4, 3:3, 4:2 και 5:1 αντίστοιχα. Σε ότι αφορά το φυσιολογικό ρόλο των 7 ισοενζύμων της GDH, δείχθηκε ότι κάθε ένα από αυτά, εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά ως προς την *in vitro* αναβολική και καταβολική του ενεργότητα. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από τη μελέτη της GDH του *Persea spp.* αβοκάντο. Το μοντέλο έχει επιβεβαιωθεί πρόσφατα από άλλους ερευνητές σε διάφορα φυτικά είδη, όπως το *Arabidopsis thaliana*.

Επίσης το αμπέλι ήταν το πρώτο φυτικό είδος στο οποίο μελετήθηκαν τα γονίδια της GDH. Συγκεκριμένα από μια cDNA βιβλιοθήκη απομονώθηκε ένας κλώνος της GDH του αμπελιού. Ο κλώνος αυτός φέρει ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1233 νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί πρωτεΐνη αποτελούμενη από 411 αμινοξέα. Η παράγωγος αμινοξική αλληλουχία εμφανίζει υψηλή ομολογία με άλλες φυτικές GDHs και σχετικά υψηλότερη ομολογία με την GDH των εξτρεμόφιλων αρχαιοβακτηρίων, παρά με τις αλληλουχίες μη φυτικών ευκαρυωτικών οργανισμών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει λειτουργική ή και εξελικτική σχέση μεταξύ των δυο αυτών ενζύμων. Τα αποτελέσματα μπορούν να υποστηρίξουν την προσαρμογή του φυτικού ενζύμου για λειτουργία υπο συνθήκες καταπόνησης (stress). Εντοπίστηκε επίσης η ύπαρξη περισσότερων του ενός γονιδίων της GDH στο γονιδίωμα του αμπελιού, υποδηλώνοντας ότι η σύνθεση κάθε υπομονάδας του ενζύμου ελέγχεται από διαφορετικό γονίδιο. Ο κλώνος της GDH του αμπελιού που απομονώθηκε, αντιστοιχεί στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α-υπομονάδα του ενζύμου.

Σε μερικά φυτικά είδη έχει μελετηθεί η επίδραση των βαρέων μετάλλων στα επίπεδα της GDH. Σε πειράματα που έγιναν για το σκοπό αυτό, διάφορες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων προστέθηκαν στο μέσο ανάπτυξης των φυτών και ακολούθως έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν οι αλλαγές που επήλθαν στο ένζυμο. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα μέταλλα και τα φυτικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν σε κάποιες από αυτές τις έρευνες, καθώς και τα αποτελέσματα στα οποία αυτές κατέληξαν:

- Σπορόφυτα σιταριού (*Triticum aestivum*) και κριθαριού (*Hordeum vulgare*), αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε Βόριο (B) σε συγκέντρωση 10mM, για 5 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τοξικότητα του B αύξησε την ενεργότητα της GDH κατά 18% στις ρίζες και κατά 30% στα φύλλα (Mahboobi et al., 2002).
- Σπρόφυτα μπιζελιού (*Pisum sativum*) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα συγκέντρωσης 10mM σε Κάδμιο (Cd) . τα επίπεδα ενεργότητας της GDH πενταπλασιάστηκαν στις ρίζες και τριπλασιάστηκαν στους βλαστούς (Chugh et al., 1992).
- Σπορόφυτα φασολιού (*Phaseolus vulgaris*) αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας που περιείχαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις Καδμίου (Cd). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι επεμβάσεις προκάλεσαν παρεμπόδιση της ανάπτυξης των φυταρίων. Επίσης, αναλογικά της αύξησης της συγκέντρωσης του μετάλλου στο θρεπτικό μέσο, αυξήθηκε και η ενεργότητα της GDH και ειδικά στα φύλλα και τις ρίζες. Σε αυτό τα γεγονόσ αποδίδεται και η αύξηση στην αφομοίωση του αζώτου που παρατηρήθηκε στους συγκεκριμένους ιστούς (Gouia et al., 2003).

A.5.2 ΩΣΜΩΤΙΝΗ

Οι ωσμωτίνες είναι πρωτεΐνες που ανήκουν σε ομάδα πρωτεϊνών μικρού MB (24 kD), που συντίθεται ως προ-πρωτεΐνες, καθίστανται ώριμες με την απομάκρυνση ενός τμήματός τους και διαμερισματοποιούνται κυρίως στο χυμοτόπιο, στον τονοπλάστη, στο πλασμάλημμα, αλλά και στους μεσοκυττάριους χώρους. Η ωσμωτίνη θεωρείται χαρακτηριστική εκπρόσωπος των πρωτεϊνών ωσμωτικής καταπόνησης, όμως η μεταγραφή των γονιδίων της επάγεται, εκτός από την έλλειψη νερού λόγω ξηρασίας, αλατότητας και ψύχους, και από τουλάχιστον επτά επιπλέον σήματα, όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, ο μηχανικός τραυματισμός, οι μυκητιακές προσβολές, η προσβολή από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV), το ABA, το αιθυλένιο και η αυξίνη. Τα γονίδια της ωσμωτίνης επάγονται από αρκετές καταπονήσεις, η πρωτεΐνη όμως, συσσωρεύεται σε ικανές ποσότητες μόνο μετά από εφαρμογή αιθυλενίου, προσβολή μυκήτων, ή κατά τον εγκλιματισμό σε έλλειψη νερού και σε αλατότητα. Οι ωσμωτίνες είναι ομόλογες με τις παθογενετικές πρωτεΐνες, με αντιμυκητολογική δράση PR (pathogenesis-related proteins) οι οποίες

αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια των αμυντικών πρωτεϊνών των φυτών. Οι ωσμωνίνες πιο συγκεκριμένα ανήκουν στην πέμπτη οικογένεια των PR πρωτεϊνών και είναι αρκετά συγγενείς με τις θαυματίνες (thaumatin).

Τα προϊόντα των γονιδίων της ωσμωνίνης εμφανίζουν *in vitro* αντιμυκητιακή δράση. Η αντιπαθογόνα δράση της ωσμωνίνης περιγράφεται ως εξής: οι υφές του μύκητα εκλύουν τοξίνες οι οποίες διασπούν την κυτταρική μεμβράνη του φυτού, προξενώντας διαρροή θρεπτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται από τον μύκητα. Έτσι, μειώνεται η σπαργή του φυτού, οπότε αυξάνεται η συσσώρευση ωσμωνίνης, που διαχέεται εκτός του φυτικού κυττάρου και επικάθεται σε ομόλογο δέκτη στην επιφάνεια του μύκητα. Στη συνέχεια, η ωσμωνίνη εισχωρεί και σχηματίζει πόρους στις μυκηλιακές μεμβράνες, καθιστώντας τις διαπερατές και παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των μυκηλίων. Ο μηχανισμός δράσης της ωσμωνίνης σε έλλειψη νερού και σε αλατότητα δεν είναι ακόμη γνωστός.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B1. In vitro καλλιέργεια

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*, τα οποία αναπτύχθηκαν σε *in vitro* καλλιέργεια.

Συγκεκριμένα οι σπόροι αφού πλύθηκαν με νερό, τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια και ξεπλύθηκαν για μερικά δευτερόλεπτα με διάλυμα αλκοόλης 70%. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 20% εμπορικού σκευάσματος υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη) για 20 min. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με απεσταγμένο – αποστειρωμένο νερό, διάρκειας 5, 10 και 15 λεπτών αντίστοιχα, μέσα στην εστία νηματικής ροής, με στόχο την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων χλωρίνης από τους σπόρους. Κατά την αποστείρωση και την προετοιμασία των σπόρων, τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν (λαβίδες, νυστέρια κ.τ.λ) είχαν απολυμανθεί με εμβάπτισή τους σε 90% αλκοόλη και στη συνέχεια με φλόγα λύχνου Bunsen.

Για την καλλιέργεια *in vitro* σπόρων *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Murashing and Skoog (MS), κάθε λίτρο του οποίου περιείχε εκτός των άλλων (Πίνακας 2) και 7,5 gr άγαρ (agar), ενώ δεν προστέθηκε σακχαρόζη.

Για την καλλιέργεια κάθε φυτικού είδους παρασκευάστηκαν 3 L θρεπτικού διαλύματος εκ των οποίων τα 2 χωρίστηκαν σε 4 κωνικές φιάλες των 500 mL. Στις φιάλες αυτές προστέθηκαν δύο διαφορετικές ποσότητες δύο βαρέων μετάλλων, Μολύβδου (Pb) και Ψευδαργύρου (Zn), ανά δύο φιάλες αντίστοιχα. Οι παραπάνω ποσότητες που προστέθηκαν ήταν σε μορφή αλάτων των αντίστοιχων μετάλλων ($PbNO_3$ και $ZnSO_4$) και ήταν τέτοιες, ώστε στα τελικά διαλύματα ο Μόλυβδος και ο Ψευδάργυρος να βρίσκονται σε συγκεντρώσεις των 0,1 και 0,5 mM.

Στο 1 L από το αρχικό MS δεν έγινε καμία επέμβαση με μέταλλα, με σκοπό τη χρησιμοποίησή του ως θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης για τα φυτά μάρτυρες.

Στη συνέχεια έγινε ρύθμιση του pH όλων των υποστρωμάτων στο 6.0 με 1N NaOH και κατόπιν αυτά μοιράστηκαν ισόποσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι σφραγίστηκαν με βαμβάκι και φύλλο αλουμινοχαρτού και τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο για αποστείρωση στους 121 °C για 20 min.

Όλη η διαδικασία εμφύτευσης εκτελέστηκε μέσα σε εστία νηματικής ροής υπο ασηπτικές συνθήκες. Αφού οι σπόροι εμφυτεύτηκαν στους δοκιμαστικούς σωλήνες με το θρεπτικό υπόστρωμα, τοποθετήθηκαν στη συνέχεια σε θάλαμο ανάπτυξης με ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού (16h φως και 8h σκοτάδι) και σε θερμοκρασία 25 ± 2 °C.

Τα φυτάρια του *Nicotiana* και του *Alyssum* παρέμειναν στον θάλαμο ανάπτυξης για διάστημα 2 και 4 μηνών αντίστοιχα. Κατά την εξαγωγή των φυτών από τους σωλήνες καταγράφηκε ο αριθμός των φύλλων, καθώς και το ύψος τους ανά φυτικό είδος και επέμβαση.

Μετά την πάροδο 2 μηνών για το *Nicotiana* και 4 μηνών για το *Alyssum*, τα φυτά βγήκαν από τους σωλήνες, απομακρύνθηκαν οι ρίζες τους, τοποθετήθηκαν μέσα σε διαφορετικά πλαστικά σακουλάκια και φυλάχτηκε στην κατάψυξη έως περαιτέρω χρησιμοποίησή τους.

B2. Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς

Διαλύματα :

Διάλυμα εκχύλισης (extraction buffer): 100 mM Tris-HCl pH 8,2, 10 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 10% Glycerol, 0,2% Triton X 100 και 5 mM DTT

Διαδικασία:

Ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τον Κων/νο Α. Λουλακάκη (1999). Όλα τα στάδια της εκχύλισης πρωτεϊνών εκτελέστηκαν μέσα σε πάγο. Όλα τα διαλύματα και οι μικροσυσκευές που χρησιμοποιήθηκαν διατηρήθηκαν μέσα σε πάγο. Η αναλογία φυτικού ιστού και extraction buffer (διατηρημένου στους 4 °C), που λειοτριβήθηκε στο γουδί ήταν 1:4. Τα μίγματα μετά μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρου και ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή τρεις φορές, διάρκειας 30 sec η κάθε μία. Ακολούθησε επώαση σε πάγο για 10 min, ανάδευση, και αφού έγινε ισοζύγισή φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχωμένη φυγόκεντρο στις 10,000 rpm (στροφές ανά λεπτό) και στους 4 °C για 30 min. Τα υπερκείμενα μοιράστηκαν σε μικροσωλήνες erpendorf και φυλάχτηκαν στον καταψύκτη για να χρησιμοποιηθούν σε επόμενους προσδιορισμούς.

Πίνακας 2: Σύσταση του βασικού θρεπτικού υποστρώματος MS, που χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* καλλιέργεια *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*.

ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/L)
KNO ₃	1900
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ 2H ₂ O	150
ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	0,83
KI	6,2
H ₃ BO ₃ 6H ₂ O	22,3
MnSO ₄ 4H ₂ O	8,6
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,025
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,83
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,25
NaMoO ₄ 2H ₂ O	43
FeNa EDFS	
ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ	
Biotin	0,1
Nicotinic acid	5
Pyridoxine HCl	5
Thiamine HCl	5
D-Pantothenic acid	5
Myoinositol	100

B3. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης (Modified Lowry)

Διαλύματα:

- Διάλυμα Α: 2 g NaOH, 10 g Na₂CO₃, 0,1 g τρυγικό Na–K σε 500 mL H₂O
- Διάλυμα Β: 0,5 g CuSO₄ 5H₂O σε 100 mL H₂O
- Διάλυμα Γ: Διάλυμα Α & Διάλυμα Β σε αναλογία 100:2 (παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση).
- Διάλυμα Δ: Folin-Phenol 2× αραιωμένο 1:1 με H₂O (παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση).

Διαδικασία:

Σε μικροσωλήνες erpendorf αναμειγνύονται 25 μL εκχυλίσματος και 25 μL 20% TCA, και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14,000 rpm (στροφές) για 20 min. Έπειτα γίνεται άντληση του υπερκείμενου με αντλία Bernoulli ή πιπέτα. Επαναδιαλύεται η πελέτα (πρωτεϊνικό ίζημα) σε 100 μL διαλύματος Α. Προστίθεται 1 mL διαλύματος Γ και επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται 100 μL διαλύματος Δ και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Αφού μηδενιστεί το φασματοφωτόμετρο με το «τυφλό» διάλυμα ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης (Absorbance) των διαλυμάτων στα 625 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg πρωτεϊνών ανά mL διαλύματος.

B4. Μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου GDH

Διαλύματα:

- 1M Tris – HCl pH 8,0.
- 2 M NH_4Cl .
- 10 mM CaCl_2 .
- 200 mM α -κετογλουταρικό οξύ.
- 2 mM NADH.

Διαδικασία:

Η ενεργότητα της GDH μετρήθηκε μέσω της αμινωτικής αντίδρασης (Λουλακάκης, 1999). Από τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάστηκε μίγμα (GDH Mix) που αποτελούνταν από: 5 mL 1M Tris – HCl, 5 mL 2 M NH_4Cl , 5 mL 10 mM CaCl_2 , 5 mL 200 mM α -κετογλουταρικό οξύ και 22,5 mL DH_2O .

Ακολούθησε εξισορρόπηση του μίγματος στους 27°C. Για την αμινωτική αντίδραση προστέθηκαν σε κυβέττα του 1 mL, 850 μL GDH Mix, 50 μL εκχυλίσματος φυτικού ιστού και τελικά 100 μL 2 mM NADH για την έναρξη της αντίδρασης. Η ενζυμική ενεργότητα προσδιορίστηκε με την μέτρηση της αλλαγής της απορρόφησης στα 340 nm σε φασματοφωτόμετρο. Στην συνέχεια υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητα της GDH [Specific activity = GDH activity ($\Delta\text{OD} / \text{min} * \text{mL}$) / συνολικές πρωτεΐνες (mg / mL)]. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν επίσης σε μmol NADH που καταναλώθηκε / min και σε μmol NADH που καταναλώθηκε / g φυτικού ιστού.

B5. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS – PAGE)

Διαλύματα:

- Διάλυμα μετουσίωσης δειγμάτων (3× sample buffer): 150 mM Tris – HCl pH 6,8, 9% SDS, 15% β–μερκαπτοαιθανόλη (b–mercaptoethanol, 0.1% κυανούν της βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερόλη.
- Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης: 29,2% ακρυλαμίδα (acrylamide), 0,8% δις–ακρυλαμίδα (bis–acrylamide).
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (resolving gel buffer): 1.5 M Tris–HCl pH 8.9 (Lower Tris 4×).
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοίβασης (stacking gel buffer): 0.5 M Tris–HCl pH 6.8 (Upper Tris 4×).
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tank Buffer): 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS.
- 10% διάλυμα ammonium per sulfate (APS)
- 20% διάλυμα SDS
- 50% διάλυμα γλυκερόλης
- Temed

Διαδικασία:

Παρασκευάστηκαν επίπεδα πηκτώματα (gel) πάχους 1,5 mm τα οποία μετά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν για την χρώση ολικών πρωτεϊνών ή για την μεταφορά τους σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (NC). Κάθε πήκτωμα αποτελείται από δυο επιμέρους πηκτώματα όπου το ένα (stacking gel) προηγείται του άλλου (resolving gel). Το resolving gel περιείχε 10% πολυακρυλαμίδα και το stacking gel 4% πολυακρυλαμίδα. Η επιμέρους σύσταση κάθε πηκτώματος φαίνεται στον Πίνακα 3.

Για την μετουσίωση των δειγμάτων προστέθηκε σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα διάλυμα μετουσίωσης (sample buffer) σε αναλογία 2:1. Το μίγμα επωάστηκε στους 100 °C για 5 min και στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε πάγο.

Ηλεκτροφόρηση: Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συναρμολογήθηκε προσεκτικά (χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Mini Protean II της Bio Rad). Το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετήθηκε στη συσκευή και αφέθηκε μέχρι να πολυμεριστεί. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε και εφαρμόστηκε στη συσκευή

το πήκτωμα επιστοίβασης. Αμέσως εφαρμόστηκε στον υποδοχέα η κτένα δημιουργίας «πηγαδιών» στα οποία τοποθετήθηκαν στην συνέχεια τα προς ανάλυση δείγματα. Το διάλυμα αφέθηκε να πολυμεριστεί. Τα δοχεία της ηλεκτροφόρησης γεμίστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tank Buffer). Τέλος η ποσότητα μετουσιωμένων δειγμάτων (17 – 25 µg ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος) μεταφέρθηκε με μικροσύριγγα στα πηγάδια (wells) και ηλεκτροφορήθηκαν στα 80 V για περίπου 2 ώρες.

Πίνακας 3: Ποσοτική σύσταση των πηκτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

SDS-PAGE			
STOCK SOLUTION	STACKING GEL	RESOLVING GEL	
	Συγκέντρωση ακρυλαμίδης, %		
	4,00%	7,50%	10,00%
d H₂O	4,59	7,43	6,18
Upper Tris (4x) (ml)	1,88	0	0
Lower Tris (4x) (ml)	0	3,75	3,75
Acryl.:Bis (30:0,8) (ml)	1	3,75	5
10% APS (µl)	26	64	64
TEMED (µl)	11	6	5
TOTAL (ml)	7,5	15	15

B6. Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R-250.

Η μέθοδος έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τον Λουλακάκη Κ. (1999).

Διαλύματα:

- Διάλυμα χρώσης (stain): 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ.

- Διάλυμα αποχρωματισμού (distain): 20% μεθανόλη, 7% οξικό οξύ.

Διαδικασία:

Με την συμπλήρωση της SDS – PAGE, το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλο δοχείο το οποίο περιείχε διάλυμα χρώσης (περίπου 100 mL). Το δοχείο τοποθετήθηκε σε ανακινούμενη πλάκα και αφέθηκε να αναδευτεί ελαφρά για τουλάχιστον 1 ώρα. Στην συνέχεια αφού απομακρύνθηκε το διάλυμα χρώσης και το gel ξεπλύθηκε με D-H₂O, προστέθηκε το διάλυμα αποχρωματισμού και η ανάδευση συνεχίστηκε για αρκετές ώρες. Με την διαδικασία αυτή η πηκτή (gel) αποχρωματίστηκε και παρέμειναν χρωματισμένες (μπλε – μοβ) μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά πρότυπα παρατηρήθηκαν σε φωτεινή τράπεζα. Με την διαδικασία αυτή ανιχνεύτηκαν ζώνες που περιείχαν το λιγότερο 0,1 – 1 μg πρωτεΐνης.

B7. Μεταφορά κατάWestern Blot - Ανοσοανίχνευση

Διαλύματα:

- Διάλυμα μεταφοράς: 20mM Tris, 192mM γλυκίνη,
- PBS (phosphate buffered saline): 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,115% Na₂HPO₄, 0,02% KH₂PO₄.
- 2% BSA (αλβουμίνη από ορό βοδιού) σε PBS 1x.
- 20% Tween – 20.
- Διάλυμα πλύσης: 0,05% Tween – 20 σε PBS
- 1% BSA σε διάλυμα πλύσης.

Διαδικασία:

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα αφαιρέθηκε από της συσκευή και τοποθετήθηκε προσεχτικά σε δοχείο που περιείχε διάλυμα μεταφοράς για 5 min. Στην συνέχεια το πήκτωμα και τα άλλα απαραίτητα υλικά τοποθετήθηκαν στην κασέτα της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς με την εξής σειρά (από κάτω προς τα πάνω): σπόγγος – χαρτί Whatman – πήκτωμα – μεμβράνη νιτροκυτταρίνης – χαρτί Whatman – σπόγγος. Η τοποθέτηση τους στην κασέτα της συσκευής ηλεκτροφόρησης έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε όταν η κασέτα τοποθετηθεί στην συσκευή το πήκτωμα να βρίσκεται προς τον αρνητικό

πόλο και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης προς τον θετικό, για να είναι εφικτή η μεταφορά των πρωτεϊνών.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε στα 80 V (400 mA σταθερά) για 1 ώρα και 15 λεπτά. Κάθε μεμβράνη NC που ετοιμάστηκε με αυτό τον τρόπο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της πρωτεΐνης της ωσμωτίνης και του ενζύμου GDH με την βοήθεια του κατάλληλου αντισώματος.

Τα κύρια στάδια της ανίχνευσης ήταν:

1. Πλύσιμο NC σε διάλυμα PBS 1× για 10 – 15 min.
2. Η NC τοποθετείται σε διάλυμα 2% BSA σε διάλυμα PBS 1× (0,5 g BSA in 25 mL PBS 1×) ανάδευση για 30 min (blocking).
3. Πλύσιμο 1 × 5 min σε διάλυμα PBS 1× + 0,05% TWEEN 20
4. Προστίθεται το πρώτο αντίσωμα σε αραιώσεις (1:1000 για ωσμωτίνη και 1:2500 για GDH) σε διάλυμα 1% BSA σε PBS 1×+ 0.05% TWEEN 20 και γίνεται επώαση με ανάδευση για τουλάχιστον 1h και 30 min.
5. Πλύσιμο 5 × 5 min σε διάλυμα PBS 1× + 0.05% TWEEN 20
6. Προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα (αντι-αντίσωμα Alkaline Phosphatase, Anti Rabbit) σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα 1% BSA σε διάλυμα PBS 1× + 0.05% TWEEN 20 και γίνεται επώαση με ανάδευση για τουλάχιστον 1h και 30 min.
7. Πλύσιμο 2 × 5 min σε διάλυμα PBS 1× + 0.05% TWEEN 20
 - a. Πλύσιμο 2 × 5 min σε διάλυμα 100 mM Tris pH 9,0.
8. Επώαση στο διάλυμα χρώσης (100 mM Tris pH 9,0, 0,1 mg/mL NBT, 5 mg/mL BCiP), έως να εμφανιστούν οι ζώνες.
9. Διακοπή της χρώσης με πλύσιμο με DH₂O.

Το αντίσωμα εναντίον της ωσμωτίνης που χρησιμοποιήθηκε, παρασκευάστηκε με εισαγωγή σε κουνέλι πρωτεΐνης ωσμωτίνης που παράχθηκε σε βακτήρια μετά τον μετασχηματισμό τους με κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης ο οποίος περιείχε το cDNA της ωσμωτίνης του αμπελιού (Loulakakis, 1997) και καθαρισμό της με προπαρασκευαστική SDS ηλεκτροφόρηση. (Βουτσινά et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ1. Γενικά χαρακτηριστικά φυτών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*.

Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα ανίχνευσης των υπό εξέταση πρωτεϊνών (GDH και ωσμωτίνη) σε ιστούς *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*, χρησιμοποιήθηκαν φυτά μάρτυρες τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog, στις ίδιες ακριβώς συνθήκες με τα φυτά των επόμενων πειραμάτων.

- ✓ Τα φυτά μάρτυρες του *Nicotiana glauca* μετά την πάροδο 2 μηνών και λίγο πριν εξαχθούν από τους σωλήνες είχαν αναπτυχθεί αρκετά όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην Εικόνα 4. Τα φυτά του *Alyssum baldaccii* αναπτύχθηκαν και αυτά ικανοποιητικά μετά την πάροδο όμως 4 μηνών όπως παρατηρείται στην Εικόνα 5.
- ✓ Μακροσκοπικά και στα δύο φυτικά είδη δεν παρουσιάστηκαν μορφολογικές ανωμαλίες, ενώ η ανάπτυξή τους χαρακτηρίστηκε ομοιόμορφη.
- ✓ Το ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων του *Nicotiana glauca* καθώς και του *Alyssum baldaccii* κυμάνθηκε στο 100%.



Εικόνα 1 : Φυτά *Nicotiana glauca* που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Η ανάπτυξή τους έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και διήρκεσε 2 μήνες.



Εικόνα 2 : Φυτά *Alyssum baldaccii* που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Η ανάπτυξή τους έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και διήρκεσε 4 μήνες.

Ακολούθησε εκχύλιση πρωτεϊνών, με σκοπό την απομόνωση τους, στους φυτικούς ιστούς από τα φυτά μάρτυρες και τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών GDH και ωσμωτίνη των δύο φυτικών ειδών. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, με σκοπό την εκτίμηση της σχετικής περιεκτικότητας στους φυτικούς ιστούς σε πρωτεΐνες.

Στην συνέχεια ίση ποσότητα πρωτεϊνών από κάθε φυτικό ιστό μετουσιώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε με SDS-PAGE σε επίπεδα πηκτώματος 10% ακρυλαμίδης, με σκοπό τη ανάλυση των εκχυλισμάτων στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Στο πρωτεϊνικό πρότυπο κάθε φυτικού ιστού, που προέκυψε μετά τη χρώση του πηκτώματος με Coomassie brilliant blue R-250, διακρίνονται διαφορές στην παρουσία αλλά και στην ένταση των ζωνών μεταξύ των ιστών.

Με σκοπό την μελέτη των υπομονάδων των δύο πρωτεϊνών, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τους φυτικούς ιστούς αναλύθηκαν με SDS-PAGE, υποβλήθηκαν σε Western Blot (με τη μέθοδο αυτή οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηκτή σε σταθερό υπόστρωμα, στην προκειμένη περίπτωση μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου στην συνέχεια μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, από το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί και ανιχνεύτηκαν ανοσολογικά. Η ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών

έγινε με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες GDH και ωσμωνίνη του αμπελιού.

Στο *Nicotiana glauca* και στην περίπτωση των πρωτεϊνών GDH και ωσμωνίνη, ανιχνεύτηκαν δύο τύποι υπομονάδων με την μορφή δύο διακριτών ζωνών που αντιστοιχούν σε δυο ισοένζυμα της κάθε πρωτεΐνης αντίστοιχα.

Στο *Alyssum baldaccii* ανιχνεύτηκε μία ζώνη της GDH και μια ζώνη της ωσμωνίνης.

Γ2. Επίδραση του Ψευδραργύρου (Zn) σε μορφολογικά χαρακτηριστικά φυτών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*.

Κατά την εκτέλεση του πειράματος διάφορες ποσότητες άλατος Ψευδραργύρου ($ZnSO_4$), προστέθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας ώστε τελικά να επιτύχουμε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις του στοιχείου (0,1 mM και 0,5 mM Zn) μέσα στο θρεπτικό μέσο.

Στις δύο διαφορετικές επεμβάσεις φυτεύτηκαν σπόροι *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii* και αφέθηκαν να αναπτυχθούν υπό ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας για 2 και 4 μήνες αντίστοιχα. Λίγο πριν τα φυτά εξαχθούν από τους σωλήνες ανάπτυξης υπολογίσθηκε το ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων ανά φυτικό είδος και επέμβαση (Πίνακας 3).

Πίνακας 3 : Ποσοστό φυτρωτικότητας σπόρων ανά φυτικό είδος και επέμβαση.

Συγκέντρωση Zn, mM	Ποσοστό φυτρωτικότητας σπόρων (%)	
	<i>NICOTIANA GLAUCA</i>	<i>ALYSSUM BALDACCII</i>
0	100	100
0,1	41,66	83,33
0,5	37,5	58,33

Κατά την εξαγωγή των φυτών από τους σωλήνες καταγράφηκε το ύψος των φυταρίων καθώς και ο αριθμός των φύλλων τους και ακολούθως υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι αυτών των μετρήσεων ανά φυτικό είδος και επέμβαση. Τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4 : Μέσος όρος ύψους φυτών (cm) και αριθμού φύλλων *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii* ανά επέμβαση Ψευδραργύρου (Zn). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν στο τέλος της ανάπτυξής τους.

Συγκέντρωση Zn, mM	Μ.Ο ύψους φυτών (cm)		Μ.Ο αριθμού φύλλων	
	<i>NICOTIANA GLAUCA</i>	<i>ALYSSUM BALDACCII</i>	<i>NICOTIANA GLAUCA</i>	<i>ALYSSUM BALDACCII</i>
0	8,12	6,91	11,51	19,46
0,1	6,2	4,13	12,6	8,6
0,5	2,4	3,04	7	5,5

Από τα αποτελέσματα που καταγράφονται στους Πίνακες 3 και 4 διαπιστώνουμε πως ο Ψευδράργυρος και ειδικά οι μεγάλες συγκεντρώσεις του, είχαν αρνητική επίδραση στην βλάστηση και την ανάπτυξη των φυταρίων.

Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας το ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων του *Nicotiana glauca* και του *Alyssum baldaccii* στην υψηλότερη συγκέντρωση Zn (0,5 mM), το οποίο κυμάνθηκε στο 37,5% και 58,5% αντίστοιχα, σε σχέση με τα αντίστοιχα των φυτών μαρτύρων (100%) διαπιστώνουμε ότι η υψηλή συγκέντρωση του στοιχείου αποτέλεσε ισχυρό ανασταλτικό παράγοντα για την βλάστηση των σπόρων. Επίσης παρατηρούμε πως όσο αυξανόταν βαθμιαία η συγκέντρωση του μετάλλου μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα, τόσο ελαττωνόταν και η φυτρωτική ικανότητα των σπόρων και στα δύο φυτικά είδη (Πίνακας 3).

Μεταβολές όμως παρατηρήθηκαν και ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών. Και στα δύο φυτικά είδη παρατηρήθηκε μείωση του μέσου όρου του ύψους των φυτών καθώς και του αριθμού των φύλλων τους, αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του στοιχείου. Αξιόλογη είναι η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των φυτών μαρτύρων και των φυτών που αναπτύχθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση Zn (0,5 mM). Ενώ τα φυτά μάρτυρες του *Nicotiana glauca* και του *Alyssum baldaccii*, κατά την εξαγωγή τους από τους σωλήνες, είχαν φτάσει κατά μέσο όρο τα 8,12 και 6,91 cm αντίστοιχα, εκείνα της επέμβασης Zn (0,5 mM) είχαν φτάσει μόνο τα 2,4 και 3,04 cm αντιστοίχως (Πίνακας 4).

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί και στην Εικόνα 3 και 4, όπου παρουσιάζονται συγκριτικά αντιπροσωπευτικά δείγματα κάθε επέμβασης, φυτών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*, είναι εμφανής η διαφορά στην ανάπτυξη των φυταρίων.



Εικόνα 3: Φυτά *Nicotiana glauca* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog για 2 μήνες, παρουσία 0 (Α), 0,1 (Β) και 0,5 (Γ) mM Zn.

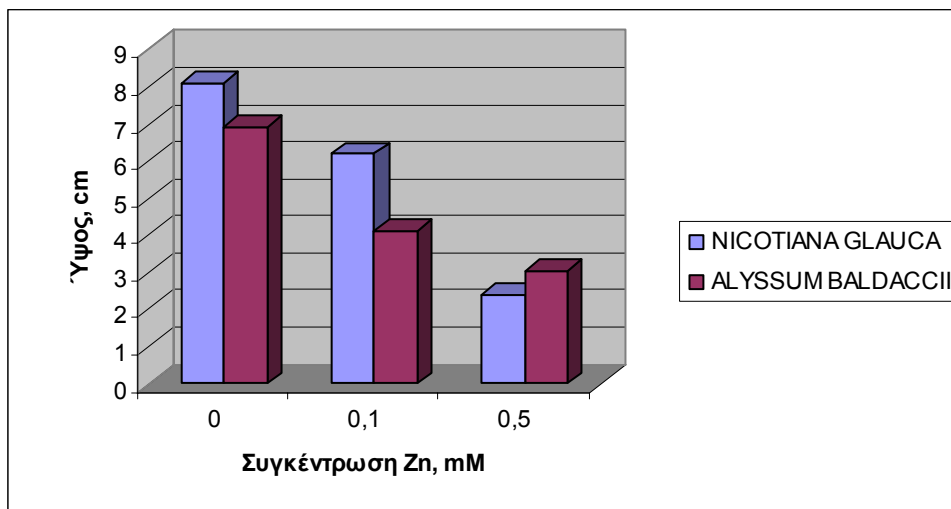


Εικόνα 4: Φυτά *Alyssum baldaccii* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog για 4 μήνες, παρουσία 0 (Α), 0,1 (Β) και 0,5 (Γ) mM Zn.

Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του Ψευδαργύρου, τα φυτά και των δύο ειδών παρουσιάζουν ανάλογα όλο και πιο μειωμένη ανάπτυξη (Διάγραμμα 1). Επίσης παρατηρήθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση Zn (0,5 mM), ότι τα

φύλλα των φυτών και από τα δύο είδη παρουσίασαν έναν έντονο κίτρινο μεταχρωματισμό, έως και μάρανση των νεότερων φύλλων.

Διάγραμμα 1: Μεταβολή του Μ.Ο. του ύψους των φυτών ανά φυτικό είδος και επέμβαση.



Γ3. Επίδραση του Ψευδραργύρου (Zn) στα ένζυμα GDH και ωσμωτίνη σε ιστούς φυτών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*.

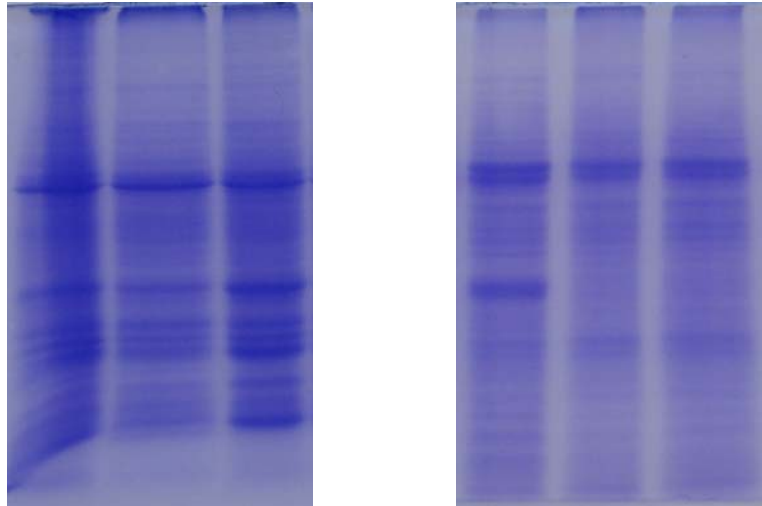
Με σκοπό την μελέτη της επίδρασης του Ψευδραργύρου στις πρωτεΐνες GDH και ωσμωτίνη του *Nicotiana glauca* και του *Alyssum baldaccii*, χρησιμοποιήσαμε φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας και σε θρεπτικά υποστρώματα συγκεντρώσεως (0,1 και 0,5 mM) σε Zn. Ακολούθησε εκχύλιση των πρωτεϊνών στους φυτικούς ιστούς και τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των ενζύμων GDH και ωσμωτίνη των δύο φυτικών ειδών.

Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες προσδιορίστηκε με την μέθοδο Lowry και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Στους του *Nicotiana glauca* παρατηρήθηκε μια ελάχιστα αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στη μεγαλύτερη συγκέντρωση Zn, σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα. Αντίθετα, στους ιστούς του *Alyssum baldaccii* παρατηρήθηκε μια ελαττωμένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη σε όλες τις συγκεντρώσεις Zn, σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα.

Στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται τα ολικά πρότυπα που προέκυψαν μετά την SDS-PAGE των εκχυλισμάτων φυτικών ιστών *Nicotiana glauca* και

Alyssum baldaccii. Μεταξύ των μεταχειρίσεων διακρίνονται αρκετές διαφορές στην ένταση των ζωνών που παρατηρήθηκαν.

Σε όλα τα παραπάνω πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έγινε προσπάθεια ανοσοανίχνευσης και μελέτης των δύο ενζύμων (GDH και ωσμωτίνης) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε ένζυμο στην συνέχεια.



Εικόνα 5: Zn *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*

Γ3.1. Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH).

Η ενζυμική ενεργότητα της υπολογίσθηκε μέσω της αμινωτικής αντίδρασης και τα αποτελέσματα των επεμβάσεων παραθέτονται στον Πίνακα 5.

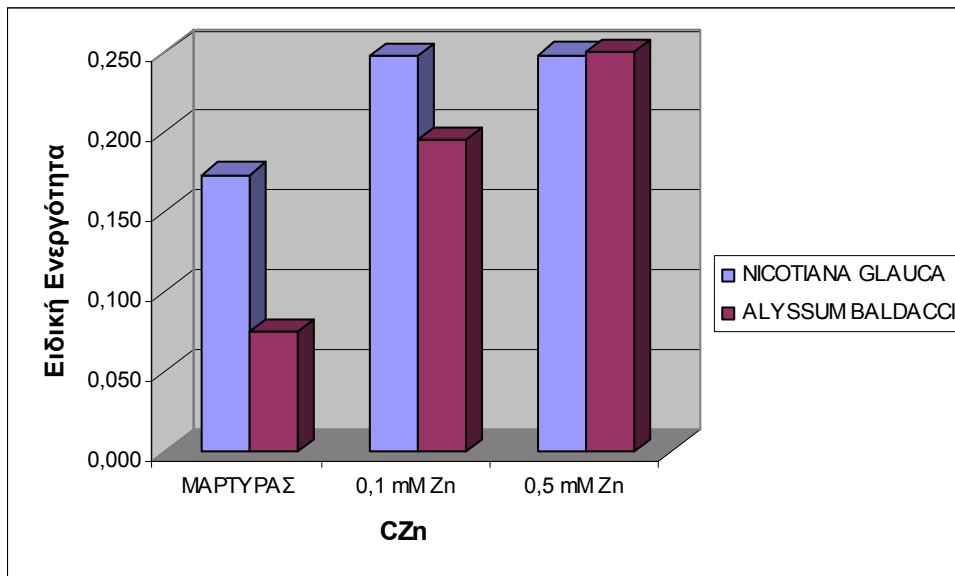
Στο *Nicotiana glauca* θα λέγαμε ότι παρατηρείται γενικά μια αύξηση της ειδικής ενεργότητας της GDH σε όλες τις επεμβάσεις συγκριτικά με τον μάρτυρα.

Στο *Alyssum baldaccii* οι τιμές της ειδικής ενεργότητας της GDH σε όλες τις επεμβάσεις παρουσιάζονται υψηλότερες από εκείνες των αντίστοιχων μαρτύρων.

Για την μελέτη των υπομονάδων της GDH τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των φυτικών ιστών αναλύθηκαν με SDS-PAGE (10%) ακρυλαμίδης και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Western Blot). Μετά την ανοσοανίχνευση της GDH με ειδικό αντίσωμα, αναπτύχθηκε μία ζώνη σε κάθε επέμβαση.

Πίνακας 5: Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της GDH, ανά φυτικό είδος και επέμβαση Zn.

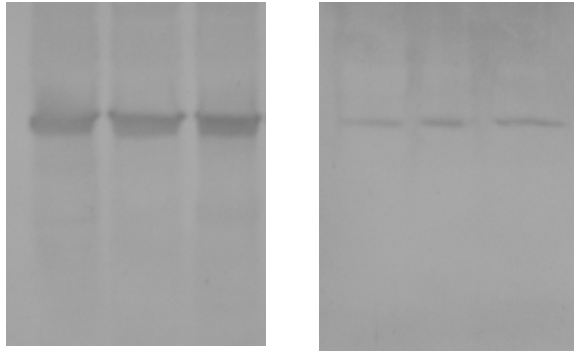
	ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ mg/ML	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*5 0μL	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*ML	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΔOD/min*mg ολ. πρωτ.	μmolNADH/min*mg	ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ μmolNADH/min* g φυτ. ιστού
NICOTIANA GLAUCA	MARTYΡΑΣ	0,67	0,0058	0,116	0,173	0,028	0,074
	0,1 mM Zn	0,67	0,0083	0,166	0,248	0,040	0,106
	0,5 mM Zn	0,7	0,0087	0,174	0,249	0,040	0,111
ALYSSUM BALDACCII	MARTYΡΑΣ	1,23	0,0046	0,092	0,075	0,012	0,059
	0,1 mM Zn	0,86	0,0084	0,168	0,195	0,031	0,108
	0,5 mM Zn	0,84	0,0105	0,21	0,250	0,040	0,134



Διάγραμμα 2: Μεταβολή των τιμών της Ειδικής Ενεργότητας στους φυτικούς ιστούς, ανα φυτικό είδος, υπο την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Ψευδαργύρου (Zn).

Στους ιστούς του *Nicotiana glauca*, ο μάρτυρας φαίνεται να έχει ίση περίπου ποσότητα ενζύμου με όλες τις επεμβάσεις Zn εκτός από εκείνη της επέμβασης των 0,5 mM Zn, όπου παρουσιάζεται συγκριτικά ελάχιστα πιο αυξημένη.

Στους ιστούς του *Alyssum baldaccii* δεν παρατηρήθηκε κάποια έντονη αλλαγή όσον αφορά την ποσότητα του ενζύμου στις διάφορες συγκεντρώσεις σε σχέση με τον μάρτυρα, παρά μόνο στην μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζεται με ελάχιστα πιο αυξημένη ένταση.



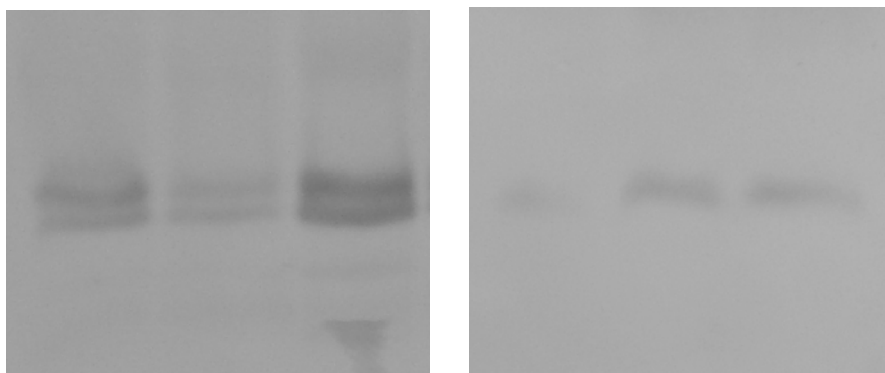
Εικόνα 6: Πρωτεϊνικές ζώνες της GDH από φυτικούς ιστούς των φυτών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii* που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog συγκεντρώσεως 0, 0,1 και 0,5 mM σε Ψευδράργυρο (Zn). Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με την μέθοδο Western Blot. Στα φίλτρα έγινε ανίχνευση των υπομονάδων της GDH με την χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Γ3.2. ΩΣΜΩΤΙΝΗ

Για την μελέτη των υπομονάδων της ωσμωτίνης τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των φυτικών ιστών αναλύθηκαν με SDS-PAGE (10%) ακρυλαμίδης και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Western Blot). Μετά την ανοσοανίχνευση της GDH με ειδικό αντίσωμα, αναπτύχθηκε μία ζώνη σε κάθε επέμβαση.

Στους ιστούς του *Nicotiana glauca*, ο μάρτυρας φαίνεται να έχει ίση περίπτωση ποσότητα ενζύμου με την χαμηλότερη επέμβαση Zn αλλά με εκείνη των 0,5 mM Zn παρουσιάζεται συγκριτικά με πιο αυξημένη ένταση.

Στους ιστούς του *Alyssum baldaccii* παρατηρήθηκε κάποια έντονη αλλαγή όσον αφορά την ποσότητα του ενζύμου στις διάφορες συγκεντρώσεις σε σχέση με τον μάρτυρα. Ο μάρτυρας φαίνεται να έχει μικρότερη ποσότητα πρωτεΐνης σε σύγκριση με εκείνες των επεμβάσεων με Zn, όπου στη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαίνεται να έχει αυξημένη ένταση.



Εικόνα 7: Πρωτεϊνικές ζώνες της ωσμωτίνης από φυτικούς ιστούς των φυτών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii* που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog συγκεντρώσεως 0, 0,1 και 0,5 mM σε Ψευδράργυρο (Zn). Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με την μέθοδο Western Blot. Στα φίλτρα έγινε ανίχνευση των υπομονάδων της ωσμωτίνης με την χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Γ4. Επίδραση του Μολύβδου (Pb) σε μορφολογικά χαρακτηριστικά φυτών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*.

Κατά την εκτέλεση του πειράματος διάφορες ποσότητες άλατος Μολύβδου ($Pb(NO_3)_3$), προστέθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας ώστε τελικά να επιτύχουμε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις του στοιχείου (0,1 και 0,5 mM Pb) μέσα στο θρεπτικό μέσο.

Στις δύο διαφορετικές επεμβάσεις φυτεύτηκαν σπόροι *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii* και αφέθηκαν να αναπτυχθούν υπό ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας για 2 και 4 μήνες αντίστοιχα. Λίγο πριν τα φυτά εξαχθούν από τους σωλήνες ανάπτυξης υπολογίσθηκε το ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων ανά φυτικό είδος και επέμβαση (Πίνακας 5).

Πίνακας 6 : Ποσοστό φυτρωτικότητας σπόρων ανά φυτικό είδος και επέμβαση.

Συγκέντρωση Μολύβδου, mM	Ποσοστό φυτρωτικότητας σπόρων (%)	
	<i>N. GLAUCA</i>	<i>A. BALDACCII</i>
0	100	100
0,1	91,6	66,66
0,5	58,33	63,48

Κατά την εξαγωγή τους από τους σωλήνες, καταγράφηκε το ύψος των φυταρίων καθώς και ο αριθμός των φύλλων τους και ακολούθως υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι αυτών των μετρήσεων ανά φυτικό είδος και επέμβαση. Τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 7: Μέσος όρος ύψους φυτών (cm) και αριθμού φύλλων *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii* ανά επέμβαση Μολύβδου (Pb). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την εξαγωγή τους από τους σωλήνες.

Συγκέντρωση Μολύβδου, mM	Μ.Ο. ύψους φυτών (cm)		Μ.Ο. αριθμού φύλλων	
	<i>N. GLAUCA</i>	<i>A. BALDACCII</i>	<i>N. GLAUCA</i>	<i>A. BALDACCII</i>
0	8,12	6,91	11,51	19,46
0,1	6,84	4,2	10,72	14,5
0,5	6,48	3,77	11,41	11,93

Από τα αποτελέσματα που καταγράφονται στους Πίνακες 6 και 7 διαπιστώνουμε πως ο Μόλυβδος είχε αρνητική επίδραση στην βλάστηση και την ανάπτυξη των φυταρίων.

Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας το ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων του *Nicotiana glauca* και του *Alyssum baldaccii* στην υψηλότερη συγκέντρωση Pb (0,5 mM), το οποίο κυμάνθηκε στο 58,33% και 63,48% αντίστοιχα, σε σχέση με τα αντίστοιχα των φυτών μαρτύρων (100%) διαπιστώνουμε ότι η υψηλή συγκέντρωση του στοιχείου αποτέλεσε ισχυρό ανασταλτικό παράγοντα για την βλάστηση των σπόρων. Επίσης παρατηρούμε πως όσο αυξανόταν βαθμιαία η συγκέντρωση του μετάλλου μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα, τόσο ελαττωνόταν και η φυτρωτική ικανότητα των σπόρων και στα δύο φυτικά είδη (Πίνακας 5).

Μεταβολές όμως παρατηρήθηκαν και ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών. Και στα δύο φυτικά είδη παρατηρήθηκε μείωση του μέσου όρου του ύψους των φυτών καθώς και του αριθμού των φύλλων τους, αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του στοιχείου. Αξιόλογη είναι η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των φυτών μαρτύρων και των φυτών που αναπτύχθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση Pb (0,5 mM). Ενώ τα φυτά μάρτυρες του *Nicotiana glauca* και του *Alyssum baldaccii*, κατά την εξαγωγή τους από τους σωλήνες, είχαν φτάσει κατά μέσο όρο τα 8,12 και 6,91 cm αντίστοιχα, εκείνα της

επέμβασης Pb (0,5 mM) είχαν φτάσει μόνο τα 6,48 και 3,77 cm αντιστοίχως (Πίνακας 6).

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί και στην Εικόνα 5 και 6, όπου παρουσιάζονται συγκριτικά αντιπροσωπευτικά δείγματα κάθε επέμβασης, φυτών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*, είναι εμφανής η διαφορά στην ανάπτυξη των φυταρίων.

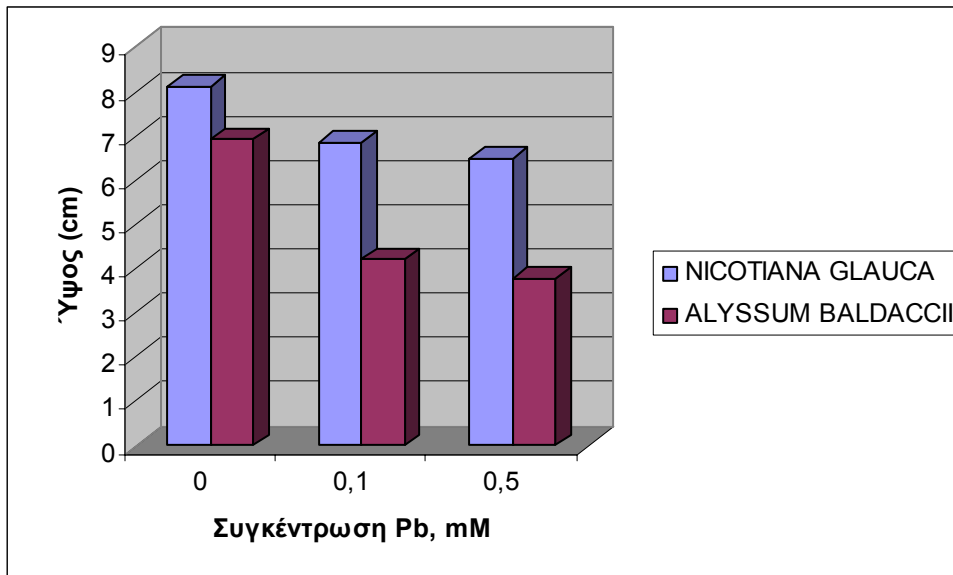


Εικόνα 8: Φυτά *Nicotiana glauca* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog για 2 μήνες, παρουσία 0 (A), 0,1 (B) και 0,5 (Γ) mM Pb.



Εικόνα 9: Φυτά *Alyssum baldaccii* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog για 4 μήνες, παρουσία 0 (A), 0,1 (B) και 0,5 (Γ) mM Pb.

Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του Μολύβδου, τα φυτά και των δύο ειδών παρουσιάζουν ανάλογα όλο και πιο μειωμένη ανάπτυξη (Διάγραμμα2). Επίσης παρατηρήθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση Pb (0.5 mM), ότι τα φύλλα των φυτών και από τα δύο είδη παρουσίασαν έναν έντονο κίτρινο μεταχρωματισμό.



Διάγραμμα 2 : Μεταβολή του Μ.Ο του ύψους των φυτών ανά φυτικό είδος και επέμβαση.

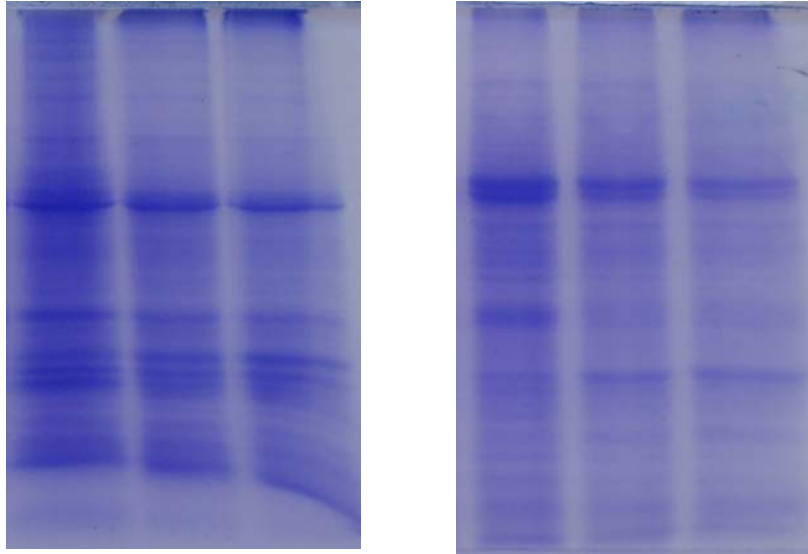
Γ5. Επίδραση του Μολύβδου (Pb) στα ένζυμα GDH και ωσμωτίνη σε ιστούς φυτών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*.

Με σκοπό την μελέτη της επίδρασης του Μολύβδου στις πρωτεΐνες GDH και ωσμωτίνη του *Nicotiana glauca* και του *Alyssum baldaccii*, χρησιμοποιήσαμε φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας και σε θρεπτικά υποστρώματα συγκεντρώσεως (0,1 και 0,5 mM) σε Pb. Ακολούθησε εκχύλιση των πρωτεϊνών στους φυτικούς ιστούς και τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των ενζύμων GDH και ωσμωτίνη των δύο φυτικών ειδών.

Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες προσδιορίστηκε με την μέθοδο Lowry και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 8. Σε όλους τους ιστούς και των δύο φυτικών ειδών παρατηρήθηκε πως η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, με μια ελάχιστη μείωση, συγκριτικά με τους αντίστοιχους μάρτυρες.

Στις Εικόνες 10 και 11 παρουσιάζονται τα ολικά πρότυπα που προέκυψαν μετά την SDS-PAGE των εκχυλισμάτων φυτικών ιστών *Nicotiana glauca* και

Alyssum baldaccii. Μεταξύ των μεταχειρίσεων διακρίνονται αρκετές διαφορές στην ένταση των ζωνών που παρατηρήθηκαν.



Εικόνα 10: *Pb Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*.

Σε όλα τα παραπάνω πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έγινε προσπάθεια ανοσοανίχνευσης και μελέτης των δύο ενζύμων (GDH και ωσμωτίνης) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε ένζυμο στην συνέχεια.

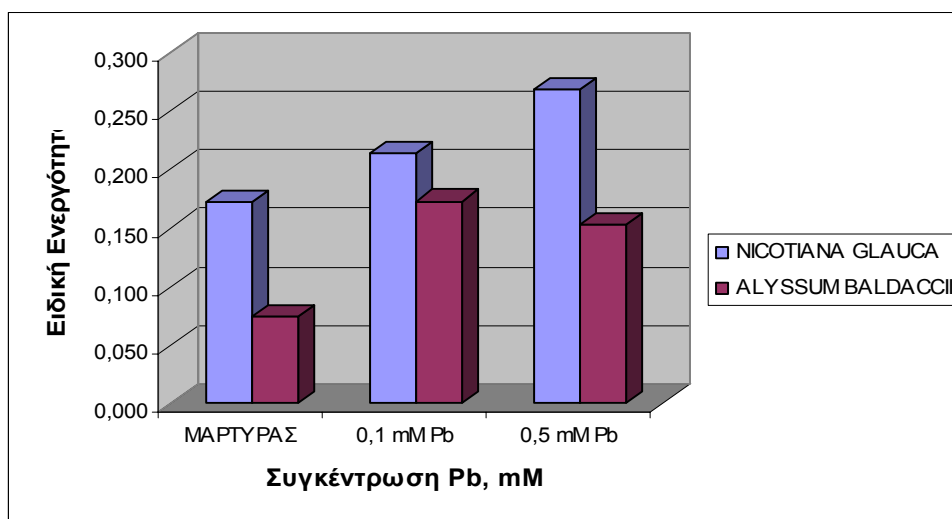
Γ5.1. Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH).

Η ενζυμική ενεργότητα της υπολογίσθηκε μέσω της αμινωτικής αντίδρασης και τα αποτελέσματα των επεμβάσεων παραθέτονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 8: Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της GDH, ανα φυτικό είδος και επέμβαση.

	ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ mg/ML	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*5 0μL	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*ML	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΔOD/min*mg ολ. πρωτ.	μmolNADH/min*mg	ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ μmolNADH/min* g φυτ. ιστού
NICOTIANA GLAUCA	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	0,67	0,0058	0,116	0,173	0,028	0,074
	0,1 mM Pb	0,7	0,0075	0,15	0,214	0,034	0,096
	0,5 mM Pb	0,58	0,0078	0,156	0,269	0,043	0,100
ALYSSUM BALDACCII	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	1,23	0,0046	0,092	0,075	0,012	0,059
	0,1 mM Pb	1,2	0,0104	0,208	0,173	0,028	0,133
	0,5 mM Pb	1,1	0,0084	0,168	0,153	0,024	0,108

Διάγραμμα 5: μεταβολή των τιμών της Ειδικής Ενεργότητας στους φυτικούς ιστούς, ανα φυτικό είδος, υπο την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Μολύβδου (Pb).

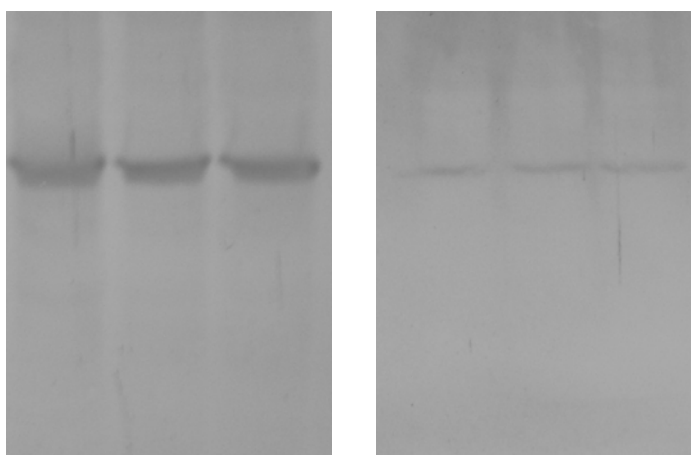


Στο *Nicotiana glauca* θα λέγαμε ότι παρατηρείται γενικά μια αύξηση της ειδικής ενεργότητας της GDH σε όλες τις επεμβάσεις συγκριτικά με τον μάρτυρα.

Στο *Alyssum baldaccii* οι τιμές της ειδικής ενεργότητας της GDH σε όλες τις επεμβάσεις παρουσιάζονται υψηλότερες από εκείνες των αντίστοιχων μαρτύρων.

Για την μελέτη των υπομονάδων της GDH τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των φύλλων αναλύθηκαν με SDS-PAGE (10%) ακρυλαμίδης και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Western Blot). Μετά την ανοσοανίχνευση της GDH με ειδικό αντίσωμα, αναπτύχθηκε μία ζώνη σε κάθε επέμβαση.

Στους ιστούς του *Nicotiana glauca*, ο μάρτυρας φαίνεται να έχει ίση ποσότητα ενζύμου με όλες τις επεμβάσεις Pb. Το ίδιο συμβαίνει όσον αφορά και το *Alyssum baldaccii*, η ένταση της έκφρασης του ενζύμου είναι ίδια σε όλες τις μεταχειρίσεις συμπίπτοντας με εκείνη του μάρτυρα.



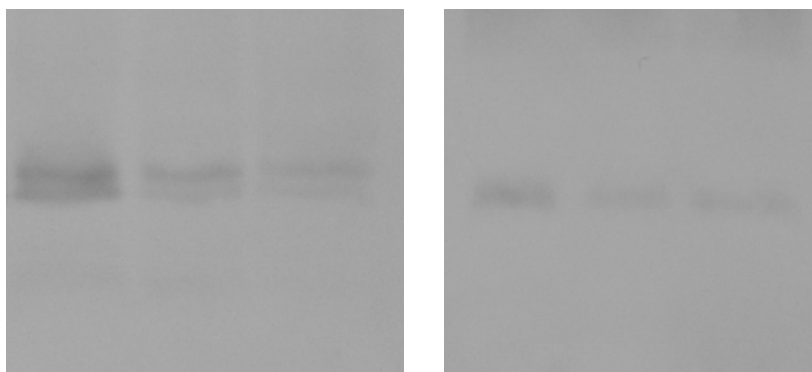
Εικόνα 11: Πρωτεϊνικές ζώνες της GDH από φυτικούς ιστούς των φυτών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii* που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog συγκεντρώσεως 0,1 και 0,5 mM σε Μόλυβδο (Pb). Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με την μέθοδο Western Blot. Στα φίλτρα έγινε ανίχνευση των υπομονάδων της GDH με την χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Γ5.2. ΩΣΜΩΤΙΝΗ

Για την μελέτη των υπομονάδων της ωσμωτίνης τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των φυτικών ιστών αναλύθηκαν με SDS-PAGE (10%) ακρυλαμίδης και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Western Blot). Μετά την ανοσοανίχνευση της ωσμωτίνης με ειδικό αντίσωμα, αναπτύχθηκε μία ζώνη σε κάθε επέμβαση.

Στους ιστούς του *Nicotiana glauca*, η συνολική ποσότητα της ωσμωτίνης εμφανίστηκε μεγαλύτερη στον μάρτυρα και παρουσιάστηκε μια βαθμιαία μείωσή της στις επεμβάσεις με διάφορες συγκεντρώσεις Pb.

Όσον αφορά το *Alyssum baldaccii* παρατηρήθηκε επίσης, αυξημένη ένταση της ωσμωτίνης στον μάρτυρα και μείωσή της αναλογικά όσο αυξανόταν η συγκέντρωση Pb.



Εικόνα 12: Πρωτεϊνικές ζώνες της ωσμωτίνης από φυτικούς ιστούς των φυτών *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii* που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog συγκεντρώσεως 0, 0,1 και 0,5 mM σε Μόλυβδο (Pb). Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με την μέθοδο Western Blot. Στα φίλτρα έγινε ανίχνευση των υπομονάδων της GDH με την χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εργασία αυτή έγινε με σκοπό την μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων (Zn και Pb), ως συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας, στις πρωτεΐνες GDH και ωσμωτίνη στο *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*. Για την ανίχνευση των δύο αυτών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα από κουνέλι τα οποία αναγνώριζαν την GDH και την ωσμωτίνη του αμπελιού, αντίστοιχα. Το γεγονός ότι τα αντισώματα αυτά αναγνώρισαν και τα ένζυμα του *Nicotiana glauca* και του *Alyssum baldaccii* υποδεικνύει την συγγένεια των πρωτεϊνών των τριών φυτικών ειδών. Γενικά οι δύο αυτές πρωτεΐνες παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομολογίας σε όλα τα ανώτερα φυτά που έχουν μελετηθεί.

Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, η GDH των διαφόρων φυτικών ειδών που έχουν μελετηθεί παρουσιάζει πρότυπο επτά ισοενζύμων και είναι εξαμερές ένζυμο αποτελούμενο από δύο είδη υπομονάδων. Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά όσον αφορά την παρουσία δύο υπομονάδων στους ιστούς του *Nicotiana glauca*, ενώ στους ιστούς του *Alyssum baldaccii* οι δύο υπομονάδες δεν μπόρεσαν να διαχωριστούν. Τα αποτελέσματα της μέτρησης της ενεργότητας της GDH και της

ανάλυσης των ισοενζύμων έδειξαν την παρουσία του ενζύμου σε όλους τους φυτικούς ιστούς του *Nicotiana glauca* και του *Alyssum baldaccii*.

Η προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων αλάτων Zn και Pb στα υποστρώματα των *in vitro* καλλιεργειών, φαίνεται ότι επηρέασαν την βλάστηση των σπόρων του *Nicotiana glauca* και του *Alyssum baldaccii* αλλά και την ανάπτυξη των σποροφύτων, όπως και στην βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα η παρουσία βαρέων μετάλλων επηρέασε σημαντικά το ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων, το οποίο παρουσίαζε σταθερή ελάττωση αναλογικά της αύξησης των συγκεντρώσεών τους. Όσον αφορά την ανάπτυξη των φυτών και τα δύο στοιχεία επηρέασαν αρνητικά το ύψος καθώς και τον αριθμό των φύλλων τους. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μάλιστα είχαμε και τις πιο ευδιάκριτες μεταβολές στα παραπάνω χαρακτηριστικά, όπου σε πολλές περιπτώσεις τα φυτά παρέμειναν καχεκτικά και σχεδόν παραμορφωμένα. Επίσης, αυξανόμενων των συγκεντρώσεων, παρατηρήθηκε όλο και πιο έντονος κίτρινος μεταχρωματισμός στα νεότερα φύλλα και σε ορισμένες περιπτώσεις έως και μάρανσή τους.

Η προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων Zn και Pb στα υποστρώματα της *in vitro* καλλιέργειας του *Nicotiana glauca* και του *Alyssum baldaccii* επηρέασαν ποσοτικά και τα δύο ένζυμα που μελετήθηκαν. Στην περίπτωση της GDH παρατηρήθηκαν διαφορετικές μεταβολές όσον αφορά στους ιστούς των δύο εξεταζόμενων φυτικών ειδών.

Συγκεκριμένα στο *Nicotiana glauca*, όλες οι επεμβάσεις με Zn αλλά και με Pb είχαν αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας στους φυτικούς ιστούς. Το ίδιο συμβαίνει και στο *Alyssum baldaccii*, αφού όλες οι επεμβάσεις και των δύο στοιχείων οδήγησαν σε αύξηση της ενεργότητας της GDH στους φυτικούς ιστούς του.

Όσον αφορά την ποσότητα του ενζύμου, στο *Nicotiana glauca* φαίνεται πως γενικά οι επεμβάσεις Zn οδήγησαν στην αύξησή της, ενώ στις επεμβάσεις με Pb η ποσότητα του ενζύμου παρέμεινε περίπου ίση. Στο *Alyssum baldaccii* θα λέγαμε ότι συμβαίνει το ίδιο στις διάφορες επεμβάσεις των δύο μετάλλων.

Πίνακας 10: Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της GDH σε ιστούς *Nicotiana glauca* και *Alyssum baldaccii*.

	ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ mg/ML	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*5 0μL	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*ML	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΔOD/min*mg ολ. πρωτ.	μmolNADH/min*mg	ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ μmolNADH/min* g φυτ. ιστού
NICOTIANA GLAUCA	MΑΡΤΥΡΑΣ	0,67	0,0058	0,116	0,173	0,028	0,074
	0,1 mM Zn	0,67	0,0083	0,166	0,248	0,040	0,106
	0,5 mM Zn	0,7	0,0087	0,174	0,249	0,040	0,111
	0,1 mM Pb	0,7	0,0075	0,15	0,214	0,034	0,096
	0,5 mM Pb	0,58	0,0078	0,156	0,269	0,043	0,100
ALYSSUM BALDACCII	MΑΡΤΥΡΑΣ	1,23	0,0046	0,092	0,075	0,012	0,059
	0,1 mM Zn	0,86	0,0084	0,168	0,195	0,031	0,108
	0,5 mM Zn	0,84	0,0105	0,21	0,250	0,040	0,134
	0,1 mM Pb	1,2	0,0104	0,208	0,173	0,028	0,133
	0,5 mM Pb	1,1	0,0084	0,168	0,153	0,024	0,108

Επίσης, και στην περίπτωση της ωσμωτίνης παρατηρήθηκαν διαφορετικές μεταβολές όσον αφορά στους ιστούς των δύο εξεταζόμενων φυτικών ειδών. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την ποσότητα του ενζύμου, φαίνεται πως γενικά οι επεμβάσεις Zn οδήγησαν στην αύξησή της στους φυτικούς ιστούς του *Nicotiana glauca* αλλά και του *Alyssum baldaccii* αναλογικά, όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του στοιχείου στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας. Αντίθετα αποτελέσματα είχαμε στις επεμβάσεις με Pb, όπου παρατηρήσαμε μείωση του ενζύμου και στα δύο φυτικά είδη.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της εργασίας αποδεικνύουν την παρουσία και των δύο ενζύμων, GDH και ωσμωτίνη στους φυτικούς ιστούς του *Nicotiana glauca* και του *Alyssum baldaccii*. Τα επίπεδά τους επηρεάστηκαν σημαντικά από

την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων (Zn και Pb) στα θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης των δύο φυτικών ειδών.

Η επίδραση των συγκεκριμένων μετάλλων στο *Nicotiana glauca* και στο *Alyssum baldaccii*, δεν έχει αποτελέσει μέχρι τώρα αντικείμενο μελέτης και έτσι δεν υπάρχουν παρόμοια αποτελέσματα για διασταύρωση και επαλήθευση των παρατηρήσεων του συγκεκριμένου πειράματος. Συμπερασματικά, κρίνοντας από παρόμοιες μελέτες επάνω σε άλλα βαρέα μέταλλα και τις επιδράσεις τους σε διάφορα φυτικά είδη, μπορούμε να πούμε ότι η ύπαρξή τους στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των φυτών μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξή τους και να επηρεάσει τις πρωτεΐνες GDH και ωσμωτίνη, είτε αρνητικά είτε θετικά. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος φαίνεται να συμφωνούν γενικά με αυτές τις μελέτες και τα συμπεράσματά τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Brooks, R.R., M.F. Chambers, L.J. Nicks and B.H. Robinson, 1998. Phytomining. *Trends Plant Sci.* 3: 359-362.
2. Clemens, S., M.G. Palmgren, and U. Kramer, 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* 7: 309-315.
3. Mejare, M. and L. Bulow, 2001. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol.* 19: 67-73.
4. Salt, D.E., R.D. Smith and I. Raskin, 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643–68.
5. Sandalio, L.M., H.C. Dalurzo, M. Gomez, M.C. Romero-Puertas and L.A. del Rio, 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52: 2115-2126.
6. Singer, A.C., D.E. Crowley and I.P. Thompson, 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends Biotechnol.* 21: 123-130.
7. Μανιός, Θ., 2003. Σημειώσεις Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον. ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο.
8. Χατζόπουλος, Π., 2001. Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.