

**Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ**  
**ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΝΟΣΟΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ**  
**ΤΗΣ ΩΣΜΩΤΙΝΗΣ**  
**ΣΤΟ *NICOTIANA GLAUCA***

**ΜΠΟΤΟΝΑΚΗΣ Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

**ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΛΟΥΛΑΚΑΚΗΣ Α. ΚΩΝ/ΝΟΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005**

*“Η εργασία αυτή αφιερώνεται  
στην οικογένεια μου”*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας & Φυσιολογίας Φυτών της σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης κατά το χρονικό διάστημα 2004-2005

Ολοκληρώνοντας την εργασία θα ήθελα να εκφράσω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου στους Δρ. Λουλακάκη Κων/νο, Δρ. Πριμηκύριο Νικόλα και Δρ. Βουτσινά Αλεξάνδρα για την συνεχή επίβλεψη καθ' όλη τη διάρκεια, τις ανεκτίμητες επιστημονικές συμβουλές τους και το ενδιαφέρον που έδειξαν για τη σωστή διεκπεραίωση της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους συναδέλφους μου για την βοήθεια που μου προσέφεραν κατά την διεξαγωγή του πειράματος αυτού.

# **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **A1. Πως ορίζεται η καταπόνηση**

### **A2. Αντιδράσεις των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις**

**A2.1.** Οι αβιοτικές καταπονήσεις μειώνουν σημαντικά την παραγωγή

**A2.2.** Στάδια αντιδράσεων του φυτού σε καταπονήσεις

**A2.3.** Μηχανισμοί αντοχής σε καταπονήσεις

### **A3. Αναγνώριση και μεταγωγή σήματος**

**A3.1.** Μεταγωγή του σήματος

**A3.2.** Συντονισμός των αντιδράσεων καταπόνησης

### **A4. Μοριακή αντίδραση του φυτού σε δυσμενή περιβάλλοντα**

**A4.1.** Ειδικοί υποκινητές προσδιορίζουν την έκφραση γονιδίων κατά τη διάρκεια καταπονήσεων

**A4.2.** Πρωτεΐνες και άλλοι μεταβολίτες σε φυτά που βιώνουν συνθήκες καταπόνησης.

### **A5 Αβιοτικές καταπονήσεις**

**A5.1.** Η οξειδωτική καταπόνηση

**A5.2. Καταπόνηση υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών**

**A5.3. Καταπόνηση από βαρέα μέταλλα**

**A5.4. Έλλειψη νερού και ξηρασία**

**A5.4.1.** Γονίδια που επάγονται από έλλειψη νερού

**A5.4.2.** Πρωτεΐνες συντιθέμενες σε συνθήκες έλλειψης νερού

**A5.4.3.** Η δράση της υδατοπορίνης

**A5.5. Καταπόνηση αλατότητας**

**A5.5.1.** Συσσώρευση ανόργανων ιόντων στα χυμοτόπια και ωσμωτική προσαρμογή

**A6. Η πρωτεΐνη της ωσμωτίνης**

**A7. Η ωσμωτίνη του αμπελιού**

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

**B1. Φυτικό υλικό**

**B2. Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς**

**B3. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης**

**B4. Μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου GDH**

**B5. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών**

**B6. Χρωματισμός πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R-250.**

**B7. Μεταφορά κατά Western Blot – Ανοσοανίχνευση**

## **Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

**Γ1. Γενικά χαρακτηριστικά δενδρώδων φυτών καπνού (*Nicotiana glauca*)**

**Γ2. Τιτλοδότηση, χαρακτηρισμός και εξειδίκευση του αντισώματος**

**Γ3. Επίδραση ωσμωτικής καταπόνησης και Ethephon στα ολικά πρωτεϊνικά πρότυπα φύλλων αμπελιού και δενδρώδους καπνού.**

**Γ4. Επίδραση αλατιού (NaCl) και PEG (Poly-Ethanol-Glycole) σε φύλλα αμπελιού**

**Γ5. Επίδραση αλατιού (NaCl) και PEG (Poly-Ethanol-Glycole) σε φύλλα δενδρώδους καπνού (*Nicotiana glauca*)**

**Γ6. Επίδραση αλατιού (NaCl), Σακχαρόζης και Ethrel σε φύλλα δενδρώδους καπνού**

**Γ7. Ενεργότητα του ενζύμου της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH)**

## **Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

## **Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

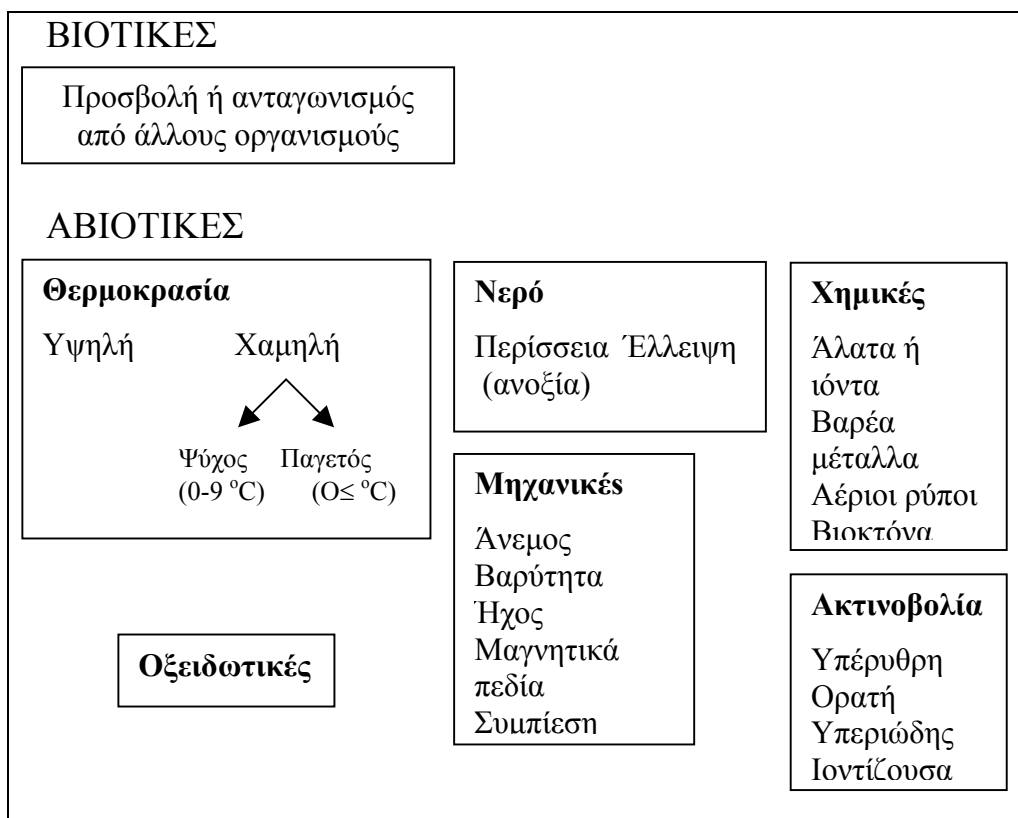
Τα φυτά αποτελούν την κύρια μορφή ζωής, από την οποία εξαρτώνται όλες οι άλλες. Κατά την πάροδο του χρόνου, όλοι οι οργανισμοί υπέστησαν την επίδραση ενός διαρκώς μεταβαλλόμενου περιβάλλοντος στον πλανήτη Γη. Λόγω της μακροχρόνιας παρουσίας των φυτών στον πλανήτη και της ευρύτατης εξάπλωσης τους, παρουσιάζουν γεωγραφική διαφοροποίηση που εκφράζει τη συνολική αντίδραση του φυτού στο περιβάλλον διαβίωσης του.

Η μεγάλη ποικιλότητα των περιβαλλοντικών συνθηκών εκθέτει αντιστοίχως τα φυτά σε μια πληθώρα, ως προς τον αριθμό και το είδος, περιβαλλοντικών καταπονήσεων, οι οποίες διακρίνονται σε **βιοτικές** και **αβιοτικές** ή **φυσικοχημικές**. Οι βιοτικές καταπονήσεις προκαλούνται με προσβολή ή ανταγωνισμό από άλλους οργανισμούς, όπως μύκητες, βακτήρια και ιούς, ενώ οι αβιοτικές προκαλούνται από ένα πλεόνασμα ή μια έλλειψη στο φυσικό ή χημικό περιβάλλον.

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες που μπορούν να καταπονήσουν τα φυτά είναι η υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία, η περίσσεια ή έλλειψη νερού, η ύπαρξη ή μη αλάτων, ιόντων, βαρέων μετάλλων, αέριων ρύπων και βιοκτόνων (χημικές), η συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (οξειδωτικές), η επίδραση ανέμου, βαρύτητας, ήχου, μαγνητικών πεδίων, συμπίεσης (μηχανικές) και τέλος η έκθεση σε υπέρυθη, ορατή, υπεριώδη και ιοντίζουσα ακτινοβολία.

Οι σημαντικότερες αβιοτικές καταπονήσεις, βάση των αλλαγών που προκάλεσαν στις μοριακές, βιοχημικές, φυσιολογικές και μορφολογικές αντιδράσεις των φυτών είναι: η οξειδωτική καταπόνηση, η έλλειψη νερού που μπορεί να προκληθεί από ξηρασία, αλατότητα, υψηλή θερμοκρασία και παγετό, η περίσσεια νερού που μπορεί να προκαλέσει ανοξία ή υποξία και η παρουσία βαρέων μετάλλων. Οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις δημιούργησαν συνθήκες ισχυρής επιλεκτικής πίεσης που συντέλεσαν στην προσαρμογή και την επιβίωση των φυτών στις δυσμενείς συνθήκες. Η προσαρμογή των φυτών στις διάφορες καταπονήσεις υποδηλώνει ότι οι φυτικοί οργανισμοί είναι ικανοί

να προσλαμβάνουν και να μεταφέρουν τα περιβαλλοντικά σήματα, και στη συνέχεια να μεταβάλλονται οι ίδιοι προκειμένου να μπορέσουν να προσαρμοστούν. Αυτές οι μεταβολές ενδέχεται να είναι παροδικές ή μόνιμες και να κληρονομούνται από τις επόμενες γενεές.



**Εικόνα 1.** Είδη καταπονήσεων. (Από Φυσιολογία Φυτών – “από το μόριο στο περιβάλλον”, επιμέλεια Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003)

### **A1. Πως ορίζεται η καταπόνηση**

Το 1972, ο Jacob Levitt πρότεινε ορισμούς για την καταπόνηση (stress) και την αντίδραση του φυτού, ανάλογους με αντίστοιχους της φυσικής, ως εξής:

- **Καταπόνηση** (stress) είναι η όποια δυνητικά επιβλαβής για το φυτό κατάσταση του περιβάλλοντος.
- **Βιολογική** διαταραχή (strain) είναι η αντίδραση του φυτού στην καταπόνηση και ορίζεται, ως η έκφραση της δύναμης που ασκήθηκε πριν προκληθεί οιαδήποτε βλάβη στο φυτό.

➤ **Βλάβη** (damage) είναι το αποτέλεσμα μιας καταπόνησης τόσο έντονης, την οποία δεν μπορεί πλέον να αντιμετωπίσει το φυτό.

Η βλάβη διαφοροποιείται περαιτέρω σε ελαστική, όταν η διαταραχθείσα λειτουργία του φυτού επανέρχεται στο βέλτιστο σημείο της, αφού απομακρυνθεί ο δυσμενής παράγοντας του περιβάλλοντος, και σε πλαστική, όταν η λειτουργία αυτή δεν επανέρχεται.

Η καταπόνηση διαφοροποιείται περαιτέρω σε ευοίωνα (eu-stress) και δυσοίωνα (dis-stress). Η πρώτη περίπτωση αφορά μια ήπια, διεγερτική καταπόνηση, που ενεργοποιεί τον μεταβολισμό και αυξάνει τη φυσιολογική δραστηριότητα του φυτού, ενώ η δεύτερη περίπτωση αφορά κάθε δυσμενή συνθήκη, που επηρεάζει αρνητικά τον μεταβολισμό και την ανάπτυξη.

## **A2. Αντιδράσεις των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις**

Οι αβιοτικές καταπονήσεις προκαλούν στα φυτά ποικίλες αντιδράσεις που αφορούν τα χαρακτηριστικά αύξησης και ανάπτυξης τους.

### **A2.1. Οι αβιοτικές καταπονήσεις μειώνουν σημαντικά την παραγωγή**

Η έκθεση των φυτών σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες προξενεί ένα ευρύ φάσμα αντιδράσεων που μπορεί να αφορούν αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και επακόλουθες μεταβολές στα βιοχημικά μονοπάτια, στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών.

Οι αβιοτικές καταπονήσεις όχι μόνο δημιουργούν σοβαρά προβλήματα και απειλούν τη γεωργία αλλά συμβάλλουν στη χειροτέρευση του περιβάλλοντος. Κύριος λόγος της μείωσης της παραγωγής παγκοσμίως από 50 ως 80%, είναι οι αβιοτικές καταπονήσεις. Για τη δημιουργία και επικράτηση καλλιεργειών ανθεκτικών σε αντίξοα περιβάλλοντα, και επομένως παραγωγικότερων, έχουν χρησιμοποιηθεί κλασικές και βιοτεχνολογικές μέθοδοι. Οι πρώτες προσέφεραν και συνεχίζουν να προσφέρουν πολλά. Οι βιοτεχνολογικές με την εισαγωγή-τροποποίηση κατάλληλων γονιδίων θα μπορούσαν να βελτιώσουν την ταχύτητα προσαρμογής και την παραγωγικότητα σε σύντομο διάστημα, δεν έχουν όμως προς το παρόν την



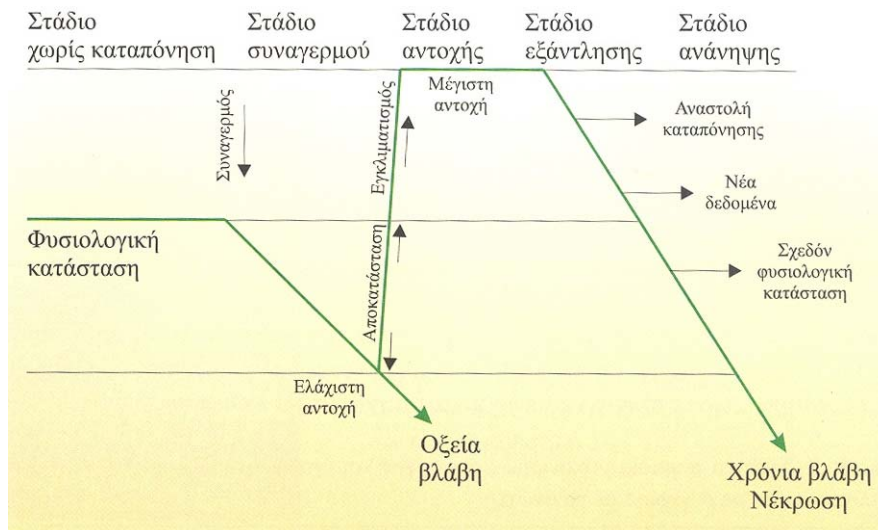
αναμενόμενη επιτυχία. Αυτό οφείλεται, πέραν άλλων αιτίων, στο γεγονός ότι η αντοχή του φυτού είναι συνήθως, ακόμη και για μεμονωμένη περιβαλλοντική καταπόνηση, ένα πολυγονιδιακό αποτέλεσμα.

#### **A2.2. Στάδια αντιδράσεων του φυτού σε καταπονήσεις**

Η ικανότητα αντίδρασης σε ένα διαρκώς μεταβαλλόμενο και δυσμενές περιβάλλον διαφέρει σημαντικά μεταξύ των φυτών. Εκτός από τις γονιδιακές διαφορές που υφίστανται, η ικανότητα αυτή εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτικού ιστού, οργάνου και οργανισμού, επηρεάζεται από τις συνθήκες ανάπτυξης του φυτού, τη συχνότητα τη διάρκεια και την ένταση έκθεσης του σε συνθήκες καταπόνησης καθώς και από κάθε συνεργιστικό αποτέλεσμα έκθεσης σε πολλαπλές αντίξοες συνθήκες.

Ο Lichtenthaler πρότεινε το 1996 τέσσερα εμπειρικά στάδια για την αντίδραση του φυτού στην καταπόνηση:

- Το στάδιο **συναγερμού** (alarm stage). Το στάδιο αυτό της αντίδρασης χαρακτηρίζεται από εκδήλωση συναγερμού. Ο μεταβολισμός αποκλίνει από την κανονική πορεία του και το φυτό οδηγείται σε οξεία βλάβη, εάν δεν έχει την ικανότητα να περάσει στο επόμενο στάδιο της αντοχής.
- Το στάδιο **αντοχής** (resistance). Το δεύτερο στάδιο, της αντοχής, χαρακτηρίζεται από μια γενική αναδιάταξη με διάφορες συνιστώσες.
- Το στάδιο **εξάντλησης** ή **τελικό** (exhaustion). Το στάδιο αυτό είναι αποτέλεσμα της υπερφόρτισης της ικανότητας προσαρμογής, καθώς η υπερβολική ένταση της καταπόνησης προκαλεί χρόνια βλάβη και τελικά νέκρωση των κυττάρων.
- Το στάδιο της **ανάληψης** ή **αναγέννησης** (regeneration). Το τέταρτο στάδιο, της ανάληψης ή αναγέννησης, περιλαμβάνει τη μερική ή ολοκληρωτική επαναφορά των φυσιολογικών λειτουργιών σε κανονικά επίπεδα, εφόσον η καταπόνηση ανασταλεί και εφόσον οι βλάβες είναι αναστρέψιμες.



**Εικόνα 2.** Γενικευμένη παρουσίαση της αλληλουχίας των σταδίων από τα οποία διέρχεται κατά τα φαινόμενα το φυτό, για να αντιμετωπίσει μια καταπόνηση. (Από “Φυσιολογία Φυτών –από το μόριο στο περιβάλλον”, επιμέλεια Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003)

Ο διαχωρισμός της αντίδρασης του φυτού σε στάδια για όλους τους παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση, και όχι ανά παράγοντα καταπόνησης, βασίζεται στο ότι υπάρχουν κοινά μάλλον παρά ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στην απόκριση του φυτού σε εντελώς διαφορετικές καταπονήσεις. Όπως πρώτος κατέγραψε ο Levitt, το φυτό αναπτύσσει κοινούς μηχανισμούς αντοχής στο επερχόμενο τελικό αποτέλεσμα που είναι όμοιο, αν και προξενείται από εντελώς διαφορετικά αίτια.

### **A2.3. Μηχανισμοί αντοχής σε καταπονήσεις**

Τα φυτά αντιδρούν στις καταπονήσεις αναπτύσσοντας μηχανισμούς είτε αποφυγής (avoidance) και ανοχής (tolerance), είτε αντοχής.

Οι μηχανισμοί αποφυγής παρεμποδίζουν την επίδραση της καταπόνησης στο κύτταρο (το κύτταρο αποφεύγει να έλθει σε φυσικοχημική ισορροπία με τον παράγοντα καταπόνησης) ή μειώνουν την έκθεση του φυτού στις καταπονήσεις. Οι μηχανισμοί ανοχής επιτρέπουν στο φυτό να ανεχθεί την αρνητική επίδραση μιας καταπόνησης που έχει ήδη επηρεάσει το κύτταρο (το κύτταρο βρίσκεται σε φυσικοχημική ισορροπία με την καταπόνηση). Οι

μηχανισμοί αποφυγής χαρακτηρίζουν περισσότερο εξελιγμένους οργανισμούς και της ανοχής λιγότερο εξελιγμένους.

Οι μηχανισμοί αντοχής κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

- Εγγενείς (constitutive)
- Προσαρμογής (adaptive)
- Εγκλιματισμού (acclimation, hardening)

Οι εγγενείς μηχανισμοί είναι γενετικώς καθορισμένα χαρακτηριστικά τα οποία εκφράζονται συνεχώς ανεξαρτήτως της ύπαρξης καταπόνησης.

Οι μηχανισμοί προσαρμογής είναι εξειδικευμένες μακροχρόνιες αντιδράσεις που αφορούν τροποποιήσεις σε βιοχημικά και άλλα χαρακτηριστικά.

Οι μηχανισμοί εγκλιματισμού είναι ταχείες αντιδράσεις μεταβολισμού και αύξησης σε μεταβολές περιβάλλοντος συνήθεις και βραχυχρόνιες. Κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού, το φυτό αγγίζει την ομοιόσταση του, αυξάνοντας τον αναβολισμό του και μειώνοντας τη συσσώρευση τοξικών υποπροϊόντων.

### **A3. Αναγνώριση και μεταγωγή σήματος**

Αρκετές και μάλιστα διαφορετικές καταπονήσεις προκαλούν διαταραχές σε βασικά κυτταρικά χαρακτηριστικά, όπως στο ενδοκυτταρικό pH, στη διαβάθμιση πρωτονίων σε συγκεντρώσεις του δευτερογενούς αγγελιοφόρου ασβεστίου, σε οξειδοαναγωγικά δυναμικά, στη διαβάθμιση ηλεκτρικών δυναμικών διαμέσου του πλασμαλήμματος και των μεμβρανών των οργανιδίων κ.ά. Πιθανολογείται ότι αυτές οι πρώτες διαταραχές αποτελούν ενδεχομένως έναν μηχανισμό αντίληψης, κοινό για πολλές καταπονήσεις. Η κοινή αυτή αναγνώριση της καταπόνησης, που στη συνέχεια διαμεταγωγείται, ίσως οδηγεί σε παρόμοια τελική αντίδραση, ανεξαρτήτως του είδους της καταπόνησης.

### **A3.1. Μεταγωγή του σήματος**

Η ρύθμιση των αντιδράσεων των φυτών στις αντίξοες συνθήκες ελέγχεται ως έναν βαθμό από ορμόνες. Ο ρυθμιστικός ρόλος των ορμονών σε καταπόνηση αφορά τρία επίπεδα:

- Τη μεταγωγή του σήματος (ρόλος αγγελιοφόρου).
- Τον συντονισμό των αντιδράσεων του φυτού μέσω ορμονικών μεταβολών.
- Τη ρύθμιση μεμονωμένων φυσιολογικών αντιδράσεων, που είναι γνωστό ότι επηρεάζονται από καταπονήσεις.

Η μεταγωγή του σήματος καταπόνησης επιτυγχάνεται μέσω ενός ενδογενούς ορμονικού “μηνύματος” που ενεργοποιείται από την καταπόνηση σε ένα όργανο και μεταβιβάζεται σε κάποιο άλλο που δεν έχει εκτεθεί σε καταπόνηση.

Εκτός από τον ρόλο τους ως αγγελιοφόρων, οι ορμόνες συμμετέχουν στον συντονισμό αντιδράσεων κατά τη διάρκεια της καταπόνησης μέσω μεταβολών των ενδογενών επιπέδων των ορμονών. Μεταβολές στις συγκεντρώσεις των ορμονών παρατηρήθηκαν σε όλα ανεξαιρέτως τα στάδια αντίδρασης του φυτού, αλλά οι περισσότερες ενδιαφέρουσες μεταβολές συμβαίνουν στα στάδια του συναγεμού και της ανάνηψης. Για την ίδια αντίδραση συνεργάζονται διάφορες ορμόνες (κυρίως το αμπισισικό οξύ και οι κυτοκινίνες).

Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος των ορμονών καθώς ρυθμίζουν με την ύπαρξη τους μεμονωμένες φυσιολογικές αντιδράσεις, που επηρεάζονται από τις καταπονήσεις. Η υψηλή περιεκτικότητα ορμονών (ABA) κάποιων ποικιλιών προκαλεί την επαγωγή ειδικών πρωτεϊνών με την βοήθεια των οποίων προστατεύονται από διάφορες καταπονήσεις.

### **A3.2. Συντονισμός των αντιδράσεων καταπόνησης**

Ο βασικός ρόλος αποδίδεται στις ορμόνες. Οι ορμονικές μεταβολές θεωρούνται ως μια από τις βασικότερες συνέπειες των καταπονήσεων. Σύμφωνα με τελευταία αποτελέσματα, θεωρείται ότι οι ορμόνες παίζουν

κεντρικό ρόλο στον συντονισμό των αντιδράσεων που εμφανίζονται μετά την καταπόνηση.

Τα φυτά αντιδρούν σε διαφορετικές καταπονήσεις με συναφή τρόπο. Καταπονήσεις, όπως η ξηρασία, η αλατότητα, η ανοξία, οι υψηλές θερμοκρασίες και ο παγετός, σχετίζονται με την ίδια τελική αντίδραση, συγκεκριμένα με την απώλεια σπαργής. Επίσης, πολλές από τις πρωτεΐνες καταπόνησης (stress proteins) είναι συγγενείς ή όμοιες ακόμα και μεταξύ διαφορετικών φυτών και διαφορετικών καταπονήσεων. Επειδή αρκετές πρωτεΐνες καταπόνησης επάγονται από την ίδια ορμόνη (το ABA) πιθανολογείται αφ' ενός η ύπαρξη ομάδας γονιδίων που εκφράζονται στις περισσότερες αβιοτικές καταπονήσεις και αφ' ετέρου κάποιων επιπλέον γονιδίων χαρακτηριστικών για ειδικές καταπονήσεις, φυτικά είδη και αναπτυξιακά στάδια.

Η αντίδραση στην καταπόνηση είναι αποτέλεσμα συντονισμού πολλών διεργασιών. Εφόσον οι διεργασίες που έπονται μιας καταπόνησης, συντονισθούν προς την ορθή κατεύθυνση, οδηγούν στον εγκλιματισμό του φυτού. Οι αλλαγές στο ορμονικό σύστημα που συντονίζουν αυτές τις διεργασίες, επομένως και τον εγκλιματισμό του φυτού επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση των γονιδίων και της συνεπακόλουθης αλλαγής στην ενζυμική σύνθεση. Τα ένζυμα που συντίθενται συμμετέχουν κατόπιν στη σύνθεση ή την αποδόμηση των ορμονών. Επειδή αρκετές ορμόνες επάγουν τη σύνθεση πρωτεϊνών καταπόνησης, οι αλλαγές αυτές στα ορμονικά επίπεδα προκαλούν έναν δεύτερο κύκλο ενεργοποίησης γονιδίων, που καταλήγει ακριβώς στη σύνθεση αυτών των πρωτεϊνών καταπόνησης.

Και οι πέντε ομάδες ορμονών συμμετέχουν στο συντονισμό των διεργασιών που έπονται της καταπόνησης. Σε συνθήκες καταπόνησης παρατηρείται μια ορμονική αστάθεια, κατά την οποία αυξάνεται το ABA (απενεργοποιητής) και το αιθυλένιο ενώ μειώνονται οι κυτοκινίνες (ενεργοποιητές). Οι γιββερελίνες μειώνονται με την ξηρασία, τις πλημμύρες και τον παγετό, ενώ οι πληροφορίες που υπάρχουν για τις αυξίνες είναι ελάχιστες.

|     | ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ | ΑΝΟΞΙΑ | ΚΑΥΣΩΝΑΣ | ΠΑΓΕΤΟΣ | ΨΥΧΡΕΣ<br>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ | ΧΑΜΗΛΟ<br>ΥΔΑΤΙΚΟ<br>ΔΥΝΑΜΙΚΟ | ΣΚΙΑΣΗ |
|-----|-----------|--------|----------|---------|------------------------|-------------------------------|--------|
| ABA | ↑         | ↑      | ↑        | ↑       | ↑                      | ↑                             | ↑      |
| CK  | ↓         | ↓      | ↓        | ↓       |                        | ↓                             | ↓      |
| GA  | ↓         |        | ↓        |         | ↓                      |                               |        |
| IAA | ↓         |        | ↑        |         | ↓                      |                               |        |
| ETH | ↑         | ↑      | ↑        |         | ↑                      | ↑                             |        |

**Πίνακας 1.** Αύξηση και μείωση των επιπέδων διαφόρων ορμονών σε καταπονήσεις. (Από “Φυσιολογία Φυτών – από το μόριο στο περιβάλλον”, επιμέλεια Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003)

Από όλα τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνουμε ότι η μεταβολή στην ορμονική ισορροπία δεν είναι απλώς συνέπεια, αλλά είναι ο παράγοντας που πρωταγωνιστεί στον συντονισμό όλων των αντιδράσεων σε μια καταπόνηση.

#### **A4. Μοριακή αντίδραση του φυτού σε δυσμενή περιβάλλοντα**

Από τα τέλη της δεκαετίας του `70 εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που εμφανίζονται αμέσως μετά την έκθεση των φυτών σε διάφορες καταπονήσεις. Αργότερα, επιβεβαιώθηκε η επαγωγή έκφρασης γονιδίων μετά από καταπόνηση, αλλά και η καταστολή άλλων.

**A4.1.** Ειδικοί υποκινητές προσδιορίζουν την έκφραση γονιδίων κατά τη διάρκεια καταπονήσεων.

Η ταυτόχρονη έκφραση γονιδίων που επάγονται από διαφορετικά αίτια (π.χ. ξηρασία ή αλατότητα) υποδεικνύει ότι ενδεχομένως έχουν κοινά χαρακτηριστικά στη ρύθμισή τους. Πράγματι, διαφορετικά γονίδια ελέγχονται από οδούς μεταγωγής σημάτων που οδηγούν στην ενεργοποίηση ειδικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών, των παραγόντων μεταγραφής. Η μεταγραφή γονιδίων ρυθμίζεται μέσω της επίδρασης αυτών ακριβώς των παραγόντων μεταγραφής σε ειδικές ρυθμιστικές αλληλουχίες στοιχείων, γνωστών ως υποκινητών (promoter elements), τα οποία βρίσκονται στα γονίδια που πρόκειται να μεταγραφούν. Στους υποκινητές αρκετών από τα γονίδια που αποκρίνονται σε διαφορετικά σήματα καταπόνησης εντοπίστηκαν ειδικές αλληλουχίες οι οποίες είναι κοινές. Πρόσθετες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, που ονομάζονται στοιχεία

σύζευξης (coupling elements), είναι ίσως απαραίτητες για την τελική ενεργοποίηση των γονιδίων.

**A4.2.** Πρωτεΐνες και άλλοι μεταβολίτες σε φυτά που βιώνουν συνθήκες καταπόνησης.

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 και οξειδωτική καταπόνηση. Μερικές από τις πρωτεΐνες αυτές είναι χαρακτηριστικές για ένα συγκεκριμένο είδος καταπόνησης, π.χ. οι φυτοηλατίνες για καταπόνηση από βαρέα μέταλλα, ή είναι κοινές για περισσότερες της μιας καταπονήσεις, π.χ. η **ωσμωτίνη** και οι LEA (late embryogenesis abundant proteins) για καταπόνηση από ψύχος, ξηρασία, αλατότητα, ενώ επιπλέον απαντούν και σε φυσιολογικά κύτταρα μετά από επίδραση ABA. 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 διευκρινισθεί για τις περισσότερες από αυτές.

## **A5 Αβιοτικές καταπονήσεις**

### **A5.1.** Η οξειδωτική καταπόνηση

Η συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου προκαλεί οξειδωτική καταπόνηση. Οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων, προκειμένου να επιτύχουν υψηλότερη ενεργειακή απόδοση από τον καταβολισμό σακχάρων ή άλλων μορίων. Ωστόσο, συγχρόνως παράγονται ανηγμένες, ενδιάμεσες μορφές οξυγόνου. Αυτές οι ανηγμένες μορφές οξυγόνου είναι ισχυρότερα οξειδωτικά από το ίδιο το οξυγόνο, όταν αυτό

βρίσκεται στη βασική του κατάσταση, και ονομάζονται συλλογικά ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) και είναι τοξικές. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου είναι ελεύθερες ρίζες, δηλαδή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική ηλεκτρονιακή τους στοιβάδα, σχετικώς σταθερά, που μπορούν να υφίστανται αυτόνομα. Προσβάλλουν πρωτεΐνες, λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, νουκλεϊκά οξέα και πολλά μικρά μόρια. Οι βλάβες που προξενούν εκδηλώνονται με μεταβολή των ιδιοτήτων και της λειτουργικότητας των μεμβρανών, εκροή ενδοκυτταρικών συστατικών, μεταλλάξεις DNA, διάσπαση χρωστικών, μείωση φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής ικανότητας, γήρανση και νέκρωση.

Για την αντιμετώπιση πιθανής οξειδωτικής βλάβης στα κυτταρικά συστατικά, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει έναν εντυπωσιακό αντιοξειδωτικό μηχανισμό, που περιλαμβάνει πλειάδα αντιοξειδωτικών ενζύμων και μη ενζυμικών μικρών μορίων. Κύριος ρόλος τους είναι η απόσβεση και η εξουδετέρωση των ROS ή της βλάβης που τα ROS προξενούν. Αναλόγως της συγκέντρωσης τους, τα ROS οδηγούν σε τρεις αποκρίσεις: ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή σε γενικευμένη νέκρωση, όταν η συγκέντρωσή τους είναι υψηλή. Εκτός από τη συγκέντρωση, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση του φυτού είναι το είδος των ROS, η διαμερισματοποίησή τους, η διάρκεια της καταπόνησης και η ηλικία του φυτού.

Όταν η παραγωγή των ROS υπερβαίνει την απόσβεσή τους από τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό, που το φυτό ενεργοποιεί, προκαλείται οξειδωτική καταπόνηση (oxidative stress).

#### **A5.2. Καταπόνηση υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών**

Παρ' ότι οι υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες προξενούν διάφορες αντιδράσεις στο φυτό, υπάρχει πάντα ο κοινός παρονομαστής της αφυδάτωσης. Στις υψηλές θερμοκρασίες, αφυδάτωση επέρχεται λόγω αύξησης της διαπνοής



και μείωσης της σπαργής, ενώ στις χαμηλές λόγω εξόδου του ενδοκυτταρικού νερού ή λόγω του ενδοκυτταρικού παγώματος.

Η χαρακτηριστικότερη αντίδραση στην έκθεση των φυτών σε θερμοκρασίες ελάχιστα μεγαλύτερες της βέλτιστης για την ανάπτυξη τους, είναι η δραστική αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση, με συνέπεια την καταστολή της σύνθεσης των περισσότερων φυσιολογικών πρωτεϊνών και την επαγωγή της σύνθεσης θερμοπληξιακών πρωτεϊνών (heat shock proteins, HSP), μιας μικρής ομάδας 30-50 πρωτεϊνών. Μερικές φυτικές θερμοπληξιακές πρωτεΐνες επάγονται και προφυλάσσουν όχι μόνο από υψηλές θερμοκρασίες, αλλά και από έλλειψη νερού, χαμηλή θερμοκρασία, αλατότητα, μηχανική καταπόνηση, ακόμα και από την εφαρμογή ABA.

Η επαγωγική σύνθεση θερμοπληξιακών πρωτεϊνών σε κύτταρα ή σε ολόκληρα φυτά βελτίωσε τη θερμική αντοχή τους, καθιστώντας τα ικανά να ανεχθούν θανατηφόρες θερμοκρασίες. Η σύνθεση θερμοπληξιακών πρωτεϊνών αποτελεί σημαντική συνιστώσα στη βραχεία τουλάχιστον προσαρμογή σε υψηλές θερμοκρασίες.

Κατά τη διάρκεια παγετού, στη διάρκεια της βλαστικής τους περιόδου, τα φυτά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην ενδοκυτταρική δημιουργία παγοκρυστάλλων μεγάλου μεγέθους που πολλαπλασιάζονται αρχικά μόνον εκτός του κυττάρου, στους μεσοκυττάριους χώρους και στα αγγεία του ξυλώματος. Εάν ο παγετός διαρκέσει περισσότερο, ο εξωκυτταρικός πολλαπλασιασμός παγοκρυστάλλων προξενεί διαρκή έξοδο νερού από το κύτταρο στον αποπλάστη, επειδή το χημικό δυναμικό του πάγου είναι μικρότερο από εκείνο του νερού, οπότε το κύτταρο αφυδατώνεται. Η αφυδάτωση του πρωτοπλάσματος μπορεί να οδηγήσει σε διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη νέκρωση, ενώ αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών κατά τον εγκλιματισμό έχει ιδιαίτερη σημασία για την αποφυγή σχηματισμού ενδοκυτταρικών παγοκρυστάλλων.

Μερικά από τα γονίδια που επάγονται από χαμηλές θερμοκρασίες επάγονται και από την έλλειψη νερού ή από ABA όπως οι πρωτεΐνες LEA καθώς και προϊόντα ειδικότερων γονιδίων, επίσης συσσωρεύονται σε αντίξοες

συνθήκες ψύχους. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι το cor (cold regulated, γονίδιο ρυθμιζόμενο από το ψύχος).

Στην αντοχή σε παγετό εμπλέκονται πολλαπλοί μοριακοί μηχανισμοί.

Τρεις από τους καλύτερα τεκμηριωμένους είναι:

- Η σταθεροποίηση των μεμβρανών
- Η συσσώρευση σακχάρων και άλλων μορίων που επηρεάζουν την ώσμωση (ωσμωλυτών)
- Η συσσώρευση αντιψυκτικών πρωτεϊνών

### **A5.3. Καταπόνηση από βαρέα μέταλλα**

Το κύτταρο χρειάζεται βαρέα μέταλλα (Zn, Co, Cu, Mn, Fe) ως δομικά συστατικά πρωτεϊνών και ενζύμων και ως συνένζυμα. Σε περίσσεια, τα ιχνοστοιχεία αυτά, και άλλα βαρέα μέταλλα (Cd, Co, Ni, Se, Hg, Ag, Pb), είναι εξαιρετικά τοξικά για τις φωτοσυνθετικές διεργασίες, τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων κ.λπ. Τα φυτά όμως διαθέτουν μοναδική ικανότητα προσαρμογής, τουλάχιστον όταν εκτίθενται διαχρονικά σε περίσσεια μετάλλων. Επιπλέον είναι ήδη γνωστό ότι υπάρχουν περί τα 200 είδη που όχι μόνο αντέχουν, αλλά συσσωρεύουν και τεράστιες ποσότητες βαρέων μετάλλων σε διάφορα όργανά τους.

Γνωρίζουμε πέντε μηχανισμούς αντοχής, που χρησιμοποιούνται επιλεκτικά και σε διαφορετική έκταση από ανθεκτικά φυτά ή από υπερσυσσωρευτές βαρέων μετάλλων:

**(α). Αποφυγή ρυπασμένων σημείων.** Είναι γνωστό, τόσο από παρατηρήσεις στην ύπαιθρο όσο και από πειράματα με διαχωρισμένες ρίζες, ότι ακόμη και σχετικά ανθεκτικά φυτά αποφεύγουν να αναπτύξουν τις ρίζες τους στα πλέον επιβαρυσμένα σημεία εδαφών με διαφορεική κατανομή μετάλλων. Οι αισθητήρες τους παραμένουν άγνωστοι.

**(β). Κινητοποίηση μετάλλων στη ριζόσφαιρα.** Οι ρίζες είναι σε θέση να εκκρίνουν ουσίες που μεταβάλλουν τη διαλυτότητα-διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων. Παρόμοιο μηχανισμό χρησιμοποιούν φυτά ανθεκτικά στο Al, που ως μέρος της αντοχής τους εκκρίνουν κιτρικό ή μηλικό οξύ στη ριζόσφαιρα

(αντίδραση που παρατηρείται μόλις 30 sec μετά την έκθεση τους), διευκολύνοντας συγχρόνως και την πρόσληψη φωσφορικών.

**(γ). Μεταφορά και συμπλοκοποίηση στο κυτταρόπλασμα.** Έχει ανιχνευθεί ένας πρωτεϊνικός ενεργός μηχανισμός αποκλεισμού (στα ευαίσθητα) ή απορρόφησης (στους υπερσυσσωρευτές) των βαρέων μετάλλων, στα κύτταρα της ρίζας και του βλαστού. Τα βαρέα μέταλλα αποτοξινώνονται και μεταφέρονται με πρόσδεση σε μικρού βάρους ουσίες, όπως σε οργανικά οξέα, αμινοξέα, πολυπεπίδια ή σε μη πρωτεϊνικά πεπτίδια-θειόλες τις φυτοχηλατίνες όπου και συμπλοκοποιούνται.

**(δ). Αποθήκευση στα χυμοτόπια.** Μεταλλικά συμπλέγματα με φυτοχηλατίνες ή με οργανικά οξέα (κιτρικό, μηλικό και φυτικό οξύ) ανιχνεύονται ως αποθηκευτικές μορφές στα χυμοτόπια. Σε ότι αφορά τον επιπλέον Fe, ο οποίος μπορεί να αντιδράσει με οξυγόνο και να δημιουργήσει τοξικές ρίζες υδροξυλίου (ROS), αυτός δεν αποθηκεύεται στα χυμοτόπια, αλλά στα πλαστίδια ως φερριτίνη. Η φερριτίνη μπορεί να αποθηκεύσει στην κοιλότητα της πάνω από 4500 άτομα Fe, γεγονός που την καθιστά στόχο για την γενετική βελτίωση, προκειμένου να αυξηθεί η περιεκτικότητα των φυτών σε Fe.

**(ε). Έκλυση στην ατμόσφαιρα.** Για μερικά μέταλλα (Hg, Se), η εξάχνωσή τους στην ατμόσφαιρα είναι δυνητικά ένας μηχανισμός αντοχής. Η πρώτη προσπάθεια με στόχο την οικοτοξικολογική προστασία έδωσε θετικά αποτελέσματα. Απομένει να εξακριβωθεί κατά πόσον ο μηχανισμός αυτός είναι ενεργός και στη φύση.

#### **A5.4. Έλλειψη νερού και ξηρασία**

Μείωση ή απουσία βροχοπτώσεων οδηγεί σε παροδικές ή μόνιμες περιόδους ξηρασίας, με επακόλουθο την έλλειψη νερού από το έδαφος. Η έλλειψη νερού από το έδαφος λόγω ξηρασίας, είναι ο πλέον περιοριστικός παράγοντας αύξησης των φυτών. Οι κυριότερες επιπτώσεις της αφορούν αρχικώς τη μείωση του ρυθμού κυτταρικής αύξησης και στη συνέχεια, της σύνθεσης κυτταρικών τοιχωμάτων, πρωτεϊνών, πρωτοχλωροφυλλιδίου, καθώς και ενζύμων του αζωτούχου και του δευτερογενούς μεταβολισμού. Ακολουθεί

μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και αύξηση των ορμονών γήρανσης και απόπτωσης (αιθυλενίου και ABA), με αποτέλεσμα τη γήρανση, τη νέκρωση και την απόπτωση των διαφόρων οργάνων.

Αναλόγως των απαιτήσεων τους σε νερό, τα φυτά κατατάσσονται σε:

**Υδρόφυτα**, που απαιτούν διαρκή προσφορά νερού.

**Μεσόφυτα**, που αναπτύσσονται εφόσον η διαθεσιμότητα νερού είναι ικανοποιητική. **Ξηρόφυτα**, που αναπτύσσονται σε συνθήκες έλλειψης νερού.

Οι τρόποι αντοχής στην ξηρασία, τους οποίους χρησιμοποιούν τα μεσόφυτα και τα ξηρόφυτα, διακρίνονται στους παρακάτω μηχανισμούς:

- **Αποφυγή της αφυδάτωσης.** Αφορά την ικανότητα του φυτού να διατηρεί την ενυδάτωση των κυττάρων του, παρά τις συνθήκες ξηρασίας.
- **Ανοχή στην αφυδάτωση.** Αφορά τη διατήρηση του μεταβολισμού αφυδατωμένων κυττάρων.
- **Διαφυγή της αφυδάτωσης.** Αφορά την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του φυτού κατά τη διάρκεια της υγρής περιόδου, πριν ενσκήψει η ξηρή περίοδος.

Τα φυτά που επιστρατεύουν μηχανισμούς αποφυγής διαχωρίζονται περαιτέρω σε **αποθηκευτές** και σε **καταναλωτές** νερού.

#### **A5.4.1.** Γονίδια που επάγονται από έλλειψη νερού

Έλλειψη νερού στο έδαφος λόγω ξηρασίας (καθώς και αλατότητας ή παγετού) προκαλεί πτώση του ωσμωτικού δυναμικού του εδάφους, που όταν φθάσει σε τιμές περισσότερο αρνητικές από εκείνες του φυτού, προκαλείται στα κύτταρα ωσμωτική καταπόνηση, δηλαδή δυσχέρεια απορρόφησης νερού από το έδαφος και αύξηση της συγκέντρωσης ανόργανων ιόντων στο κύτταρο, σε τοξικά επίπεδα.

Ένας μηχανισμός αντοχής σε ωσμωτική καταπόνηση οιασδήποτε προέλευσης, που απαντάται σε αρκετά είδη φυτών, είναι η ωσμωτική προσαρμογή. Συνίσταται στη συσσώρευση διαλυτών ουσιών, των λεγόμενων συμβατών μεταβολιτών ή ωσμωλυτών. Πρόκειται για οργανικούς μεταβολίτες

που δεν είναι τοξικοί για το κύτταρο και που συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα ώστε αφ' ενός το υδατικό δυναμικό του να διατηρείται σε ισορροπία με εκείνο του χυμοτοπίου και αφ' ετέρου το όλο υδατικό δυναμικό του κυττάρου να διατηρείται χαμηλό χωρίς απώλεια της σπαργής του. Κυριότεροι ωσμωλύτες είναι η προλίνη, η σορβιτόλη, η γλυκίνη, η γλυκίνη μεταΐνη κ.ά. Η συσσώρευση τους προϋποθέτει την ενεργοποίηση των μεταβολικών οδών που συμμετέχουν στη βιοσύνθεσή τους. Διάφορα γονίδια που επάγονται από ωσμωτική καταπόνηση κωδικοποιούν ένζυμα αυτών ακριβώς των οδών.

Η ωσμωτική καταπόνηση επάγει διάφορα άλλα γονίδια που κωδικοποιούν πλειάδα γνωστών ενζύμων, όπως την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Έτσι επιτυγχάνεται αύξηση της ροής άνθρακα προς οργανικούς ωσμωλύτες και, επομένως, ωσμωτική προσαρμογή. Σε ανθεκτικά στην ξηρασία φυτά, η ωσμωτική καταπόνηση επάγει διάφορα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα του CAM-μεταβολισμού (PEP-καρβοξυλάση). Άλλα γονίδια που αποκρίνονται στην ωσμωτική καταπόνηση κωδικοποιούν ΑΤΡάσες απαραίτητες για την υδρόλυση του ΑΤΡ, υδατοπορίνες, δηλαδή πρωτεΐνες-κανάλια για τη μετακίνηση του νερού και πρωτεάσες. Εξαιτίας κυρίως του παγετού και δευτερευόντως εξαιτίας της ξηρασίας και αλατότητας, επάγονται τα γονίδια *cor* ή ρυθμιζόμενα από το ψύχος γονίδια.

Μια μεγάλη ομάδα γονιδίων που ρυθμίζονται από ωσμωτική καταπόνηση και που αναγνωρίστηκαν αρχικά σε έμβρυα, κατά τη διάρκεια της φυσικής τους ωρίμανσης και ξήρανσης, είναι τα γονίδια όψιμης εμβρυογένεσης, γνωστά ως LEA. Τα γονίδια αυτά επάγονται επίσης στους βλαστούς, όταν οι τελευταίοι εκτεθούν σε συνθήκες έλλειψης νερού. Στις αντίστοιχες πρωτεΐνες LEA αποδίδεται ρόλος προστασίας των κυτταρικών μεμβρανών, δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες LEA είναι ισχυρά υδρόφιλες.

Άλλα γονίδια που επάγονται από την έλλειψη νερού είναι αυτά που κωδικοποιούν αφυδρίνες (dehydrins) και την **ωσμωτίνη** (osmotin). 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 την αυξίνη.

Αρκετά γονίδια που επάγονται ως αντίδραση στην έλλειψη νερού ρυθμίζονται σε επίπεδο μεταγραφής από το ABA, τη φυτική ορμόνη που αυξάνεται σε περιόδους έλλειψης νερού και χαμηλών θερμοκρασιών.

#### **A5.4.2.** Πρωτεΐνες συντιθέμενες σε συνθήκες έλλειψης νερού

Η σύνθεση πρωτεϊνών με ειδικούς ή γενικότερους ρόλους παρατηρείται στην έλλειψη νερού λόγω ξηρασίας, αλλά και λόγω αλατότητας. Οι γνωστότερες πρωτεΐνες, που ονομάζονται πρωτεΐνες ωσμωτικής καταπόνησης, είναι η ωσμωτίνη, οι LEA, οι αφυδρίνες ή RAB, όταν η έκφραση τους ελέγχεται από το ABA, και οι θερμοπληξιακές.

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 ανήκουν σε ομάδα πρωτεϊνών μικρού MB (26 kD), είναι ομόλογες με τις παθογενετικές πρωτεΐνες, με αντιμυκητολογική δράση (pathogenesis-related, PR) και αρκετά συγγενείς με τις θαυματίνες (thaumatin).

#### **A5.4.3.** Η δράση της υδατοπορίνης

Η υδρόφοβη διπλή λιπιδική στιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών αποτελεί ένα εμπόδιο για την ελεύθερη κίνηση του νερού προς το κύτταρο και μεταξύ των ενδοκυτταρικών οργανιδίων, παρ' ότι η κίνηση του θεωρείται και εκεί σχετικά γρήγορη. Ωστόσο το νερό μπορεί και διαπερνά ακόμη ευκολότερα τις μεμβράνες του κυττάρου και του τονοπλάστη με τη βοήθεια πρωτεϊνικών διαμεμβρανικών υδάτινων καναλιών, που ονομάζονται υδατοπορίνες. Οι υδατοπορίνες είναι σχετικά μικρές πρωτεΐνες που εκφράζονται έντονα στις

μεμβράνες και είναι μέλη μιας οικογένειας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, των MIP. Η δράση των υδατοπορινών αυξάνεται σε συνθήκες ξηρασίας. Οι υδατοπορίνες διευκολύνουν τη ροή του νερού σε ιστούς που ζουν σε συνθήκες ξηρασίας και προάγουν επίσης τη γρήγορη αποκατάσταση της σπαργής μετά από άρδευση. Η ροή του νερού μέσω των υδατοπορινών λαμβάνει χώρα πράγματι ταχύτατα, καθώς προσπερνάτε η εναλλακτική δίοδος της μεταφοράς του νερού δια μέσου του διφασικού λιπιδικού στρώματος.

#### **A5.5. Καταπόνηση αλατότητας**

Το πρόβλημα της υψηλής συγκέντρωσης αλάτων δεν περιορίζεται μόνο στις παραθαλάσσιες περιοχές, αλλά επεκτείνεται και σε καλλιεργούμενες εκτάσεις. Το 1/3 της συνολικής καλλιεργούμενης και αρδευόμενης έκτασης θεωρείται προβληματικό, εξαιτίας της κακής ποιότητας του νερού άρδευσης, κυρίως σε άνυδρες και ημιάνυδρες περιοχές. Με την εξάτμισή του συσσωρεύονται στο έδαφος μεγάλες ποσότητες αλάτων. Τα εξαιρετικώς χαμηλά ωσμωτικά δυναμικά που δημιουργούνται στο έδαφος παρακρατούν το διαθέσιμο νερό, οπότε τα φύλλα πρέπει να αποκτήσουν ακόμη αρνητικότερο υδατικό δυναμικό για να διατηρήσουν τη διαβάθμιση του στο σύστημα έδαφος-ρίζα-φυτό. Υπ' αυτή την έννοια, η αντοχή στην ξηρασία και στην αλατότητα συσχετίζονται άμεσα.

Αντοχή στην αλατότητα είναι η ικανότητα των φυτών να αναπτύσσονται και να συμπληρώνουν τον κύκλο ζωής τους σε υποστρώματα υψηλής περιεκτικότητας διαλυτού αλατιού. Μεταξύ υποχρεωτικών αλοφύτων (euhalophytes), δηλαδή φυτών που έχουν άριστη ανάπτυξη μόνο σε πολύ αλατούχα εδάφη, και γλυκοφύτων (glycophytes), δηλαδή φυτών που δεν επιβιώνουν σε αλατούχα εδάφη, υπάρχουν διαβαθμίσεις αντοχής όπως τα ιδιαίτερα ευαίσθητα, τα ευαίσθητα, τα ενδιάμεσα και τα ανθεκτικά. Ακόμα και τα γλυκόφυτα διαθέτουν μηχανισμούς προσαρμογής, οι οποίοι όμως είναι τόσο βραδείς ώστε αποβαίνουν αναποτελεσματικοί, εκτός εάν η καταπόνηση επέλθει σταδιακά.

Τα φυτά αναπτύσσουν μια πληθώρα από βιοχημικούς και μοριακούς μηχανισμούς για να αντιμετωπίζουν την ύπαρξη υψηλής συγκέντρωσης άλατος. Τα βιοχημικά μονοπάτια οδηγούν σε προϊόντα και διαδικασίες που βελτιώνουν την αντοχή σε αλατότητα και δρουν πιθανώς προσθετικά και συνεργιστικά. Οι βιοχημικές στρατηγικές περιλαμβάνουν: (i) επιλεκτική συσσώρευση ή παρεμπόδιση εισόδου των ιόντων, (ii) έλεγχο πρόσληψης ιόντων από τις ρίζες και μεταφορά στα φύλλα, (iii) διαμερισματοποίηση ιόντων σε κυτταρικό επίπεδο και σε ολόκληρο το φυτό, (iv) σύνθεση συμβατών διαλυμάτων, (v) αλλαγές στα φωτοσυνθετικά μονοπάτια, (vi) μεταβολές στη δομή των μεμβρανών, (vii) επαγωγή αντιοξειδοτικών ενζύμων, και (viii) επαγωγή φυτικών ορμονών. Οι μηχανισμοί αντοχής στο αλάτι είναι είτε υψηλής είτε χαμηλής πολυπλοκότητας. Οι χαμηλής πολυπλοκότητας μηχανισμοί φαίνεται να περιλαμβάνουν αλλαγές σε πολλά βιοχημικά μονοπάτια. Οι υψηλής πολυπλοκότητας μηχανισμοί περιλαμβάνουν αλλαγές που προστατεύουν κύριες διαδικασίες όπως η φωτοσύνθεση και η αναπνοή, η αποτελεσματικότητα χρήσης του νερού και μηχανισμούς που διατηρούν τόσο σημαντικά χαρακτηριστικά όπως ο κυττοσκελετός, το κυτταρικό τοίχωμα, η αλληλεπίδραση πλασματικής μεμβράνης με το κυτταρικό τοίχωμα και οι αλλαγές στη δομή χρωμοσωμάτων και χρωματίδων. Πιστεύεται πως η προστασία των ανώτερων διαδικασιών συντονίζεται με την επαγωγή μηχανισμών χαμηλής περιπλοκότητας,

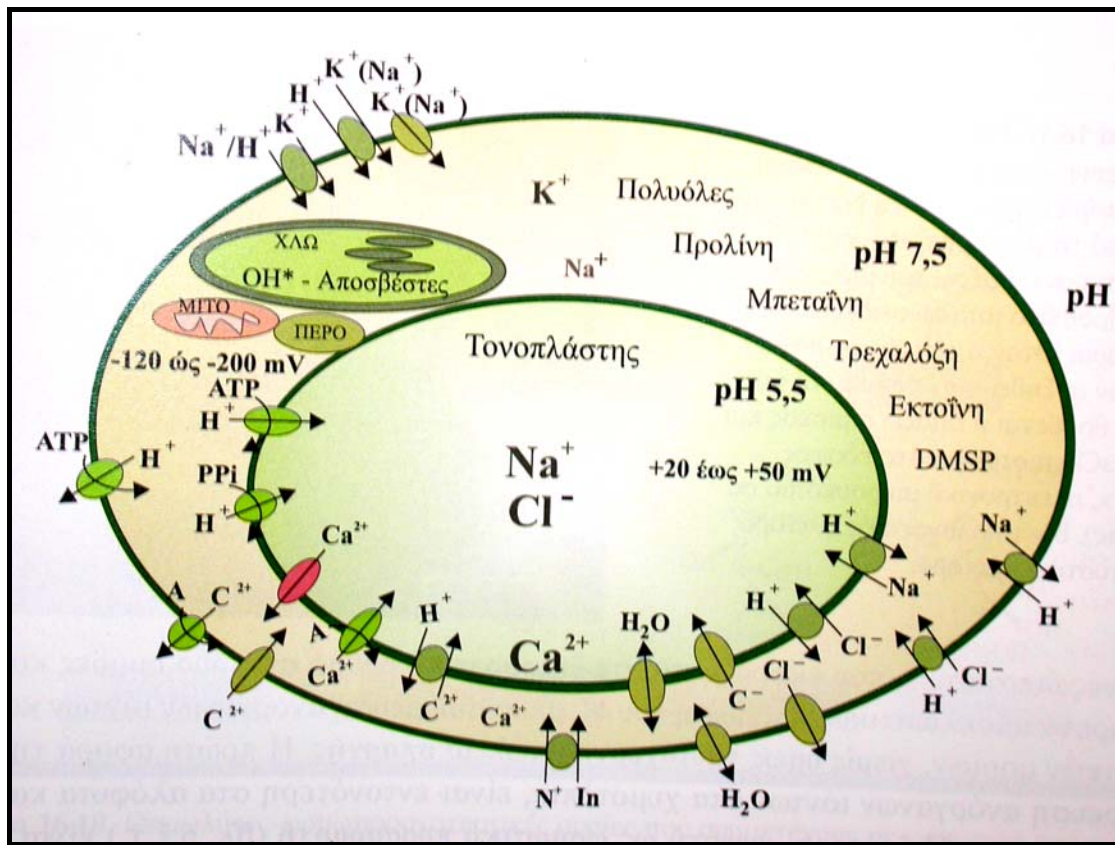
Εάν τα γλυκόφυτα περιορίζουν την είσοδο ιόντων στο βλαστό, ελέγχοντας τη δίοδο τους στη ρίζα (ταινία Caspary – μηχανισμός αποφυγής), τα αλόφυτα (πλην των μαγκροβίων) τείνουν να έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις  $\text{Na}^+$  στον βλαστό παρά στη ρίζα τους. Με μια ιδιόρρυθμη ωσμωτική προσαρμογή (διαμερισματοποίηση της περίσσειας  $\text{Na}^+$ , απομάκρυνση της από το κυτταρόπλασμα, ATP-εξαρτώμενη μεταφορά της στο χυμοτόπιο και εκτός κυττάρου), αναπτύσσονται άριστα, επιζητώντας κυτταρικές συγκεντρώσεις  $\text{NaCl}$  από 20 έως 500 mM. Η ικανότητα της απορρόφησης και του περιορισμού του  $\text{Na}^+$  στα χυμοτόπια, σε αλατούχα περιβάλλοντα, μειώνει ικανοποιητικά το υδατικό δυναμικό των φύλλων,



διευκολύνοντας έτσι την πρόσληψη νερού από το έδαφος και ελαττώνοντας το μεταβολικό κόστος σύνθεσης δαπανηρών ωσμωλυτών.

#### **A5.1.** Συσσώρευση ανόργανων ιόντων στα χυμοτόπια και ωσμωτική προσαρμογή

Η σύγκριση αλοφύτων και γλυκοφύτων αποκαλύπτει δύο κοινές διεργασίες, που εκφράζονται σε διαφορετικό βαθμό στις δύο ομάδες και που αφορούν αποκλειστικά τη μείωση του υδατικού δυναμικού με συσσώρευση ανόργανων ιόντων και οργανικών μορίων, χωρίς όμως ταυτόχρονη απώλεια σπαργής. Η πρώτη αφορά τη συσσώρευση ανόργανων ιόντων στα χυμοτόπια και είναι εντονότερη στα αλόφυτα. Προκειμένου λοιπόν, τα αλόφυτα να συσσωρεύσουν  $\text{Na}^+$  στα χυμοτόπια, θα πρέπει να το αντισταθμίσουν με άντληση πρωτονίων και να έχουν πρόσθετους μηχανισμούς για την απόκτηση άλλων ιόντων, κυρίως  $\text{K}^+$ , που συνήθως είναι περιορισμένα στα αλατούχα εδάφη. Πράγματι, η αλατότητα αυξάνει τη δραστηριότητα των χυμοτοπιακών αντιμεταφορέων  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  σε πολλά φυτά συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών γλυκοφύτων. Η λειτουργία αυτού του αντιμεταφορέα προϋποθέτει μια διαβάθμιση ηλεκτροχημικού δυναμικού κατά μήκος του τονοπλάστη, η οποία προέρχεται κυρίως από διαβαθμίσεις του pH, που δημιουργούνται από τη δράση αντλιών  $\text{H}^+$ . Η αύξηση της δραστηριότητας του αντιμεταφορέα  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  που προκαλείται από το  $\text{NaCl}$ , ενεργοποιεί τη μεταφορά πλεονάζοντος  $\text{Na}^+$  στα χυμοτόπια, επιτρέποντας την ανάπτυξη φυτών σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων.



**Εικόνα 3.** Κυτταρική ομοιόσταση, μετά από προσαρμογή σε NaCl. (Από “Φυσιολογία Φυτών–από το μόριο στο περιβάλλον”, επιμέλεια Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003)

Στην πολύπλοκη αυτή σχέση τα αλόφυτα θα πρέπει συνεχώς να εξισορροπούν τις ανάγκες τους. Μια από αυτές, η συσσώρευση  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$  ως αδάπανων ωσμωλυτών, προϋποθέτει συνεχή δημιουργία νέων χυμοτοπίων, δηλαδή συνεχή αύξηση. Έτσι αρκετά αλόφυτα είναι χυμώδη έχουν δηλαδή υψηλή αναλογία όγκου προς επιφάνεια, επειδή διογκώνονται με απορρόφηση νερού, οπότε προκύπτει και αραίωση των αλάτων. Άλλα όπως τα μαγκρόβια, επιτυγχάνουν την αραίωση αυτή στο βλαστό με ταχεία αύξηση και με σύγχρονο αποκλεισμό της εισόδου τους από τη ρίζα. Μερικά αλόφυτα δεν αποκλείουν την είσοδο NaCl αλλά ενισχύουν την αποβολή των  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$ , με έκκριση τους από εξειδικευμένους αδένες και κύστες που είναι εξελικτικώς νεότερα κύτταρα των βλαστών τους.

Η δεύτερη κοινή διεργασία, γνωστή ως ωσμωτική προσαρμογή είναι εντονότερη στα γλυκόφυτα και στα μαγκρόβια και επιτυγχάνεται με τη

συσσώρευση οργανικών μορίων (ωσμωλυτών) που παρουσιάζουν όλα υψηλή διαλυτότητα και δεν εμπλέκονται στον κυτταρικό μεταβολισμό, ακόμη και σε αυξημένες συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση ωσμωλυτών, που επιτυγχάνεται μέσω της ωσμωτικής προσαρμογής, υπερβαίνει εκείνη που προκύπτει όταν διαλυμένες ουσίες συγκεντρώνονται παθητικά λόγω της αφυδάτωσης. Η ωσμωτική προσαρμογή παίζει σημαντικό ρόλο στον εγκλιματισμό του φυτού σε συνθήκες ξηρασίας ή αλατότητας, καθώς μειώνει το υδατικό δυναμικό του φυτού και οδηγεί το υδατικό δυναμικό της ρίζας σε τιμές αρνητικότερες του εδάφους, επιτρέποντας έτσι στο νερό να εισρεύσει από το έδαφος στο φυτό. Στην ωσμωτική προσαρμογή συμβάλλουν διάφορες οργανικές ενώσεις, που έχουν ανόμοια χημική δομή και είναι κοινές σε βακτήρια, ζώα και φυτά. Οι συχνότερα απαντώμενες είναι σάκχαρα, πολυαμίνες, μεθυλιωμένες ινοσιτόλες, πολυυδατωμένες αλκοόλες ή φορτισμένοι μεταβολίτες. Σημαντικό ποσοστό άνθρακα δαπανάται από το φυτό για την σύνθεση των ωσμωλυτών. Αυτοί διαμερισματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, στο στρώμα και στις κοιλότητες των οργανιδίων, προσφέροντας ζωτική ωσμωτική εξισορρόπηση μεταξύ τους και με το χυμοτόπιο, και επομένως αντοχή. Είναι πιθανόν ότι μεταφορείς στις μεμβράνες συμμετέχουν στην διαφοροποιημένη κατανομή των ωσμωλυτών μέσα στο κύτταρο και στη ρύθμιση της κυκλοφορίας και διανομής των μορίων αυτών μέσα στο φυτό. Εφόσον οι αντίξοες συνθήκες ανασταλούν τα μονομερή πολυμερίζονται σε άμυλο και φρουκτάνες και αποθηκεύονται, ώστε μελλοντικά να διευκολύνουν τη γρήγορη και αναστρέψιμη ωσμωτική προσαρμογή.

Εκτός από τη συμμετοχή τους στην ωσμωτική προσαρμογή, πιθανολογείται ότι η συσσώρευση ωσμωλυτών λειτουργεί επίσης προστατευτικά στην έλλειψη νερού. Επειδή είναι υδρόφιλοι, οι ωσμωλύτες μπορούν να υποκαταστήσουν το ελλειπόν νερό στο πρωτεϊνικό κέλυφος ή στις μεμβράνες, επομένως δρουν ως ωσμωπροστάτες (osmoprotectors). Επιπλέον, σε μεγάλες συγκεντρώσεις μειώνουν την αρνητική επίδραση του NaCl στην ενεργότητα των ενζύμων, δρώντας ως μη ενζυμικοί μικρού μοριακού βάρους

συνοδοί. Είναι πιθανόν ορισμένοι ωσμωλύτες να συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος της ωσμωτικής καταπόνησης.

Για να αντιμετωπίσουν τα φυτά τις περιβαλλοντικές καταπονήσεις ενεργοποιούν μια μεγάλη ομάδα γονιδίων που οδηγούν στη σύνθεση πρωτεϊνών καταπόνησης. Η έλλειψη νερού λόγω αλατότητας επάγει δηλαδή την ενεργοποίηση γονιδίων και σύνθεση πρωτεϊνών που αναφέρθηκαν και στην περίπτωση της ξηρασίας, δηλαδή σύνθεση πρωτεϊνών ωσμωτικής καταπόνησης (ωσμωτίνης, LEA, αφυδρίνες), υδατοπορίνης, HSP και ενζύμων αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Μια ιδιαίτερη ίσως πρωτεΐνη είναι η SalT, μια πρωτεΐνη μικρού βάρους που ανιχνεύθηκε στο εγκλιματισμένο σε αλατότητα ρύζι. Η αυξανόμενη διασαφήνιση των μοριακών μηχανισμών ελέγχου αντοχής σε αβιοτικές καταπονήσεις, που μπορεί να αποτελεί το έναυσμα για ανθεκτικότερα φυτά, βασίζεται στην έκφραση των ειδικών αυτών γονιδίων και κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: (1) γονίδια που εμπλέκονται στη μετάδοση σήματος και τον έλεγχο μεταγραφής, (2) γονίδια που λειτουργούν άμεσα στην προστασία των μεμβρανών και των πρωτεϊνών και (3) γονίδια που εμπλέκονται στην πρόσληψη νερού και ιόντων, μεταφορά υδατοπορινών και ιοντικών μεταφορέων.

Συμπερασματικά η αλατότητα είναι η πιο σοβαρή απειλή της γεωργίας, και του περιβάλλοντος σε πολλά μέρη του κόσμου. Με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής μπορούν να παραχθούν ανθεκτικά στην αλατότητα φυτά τα οποία θα υπερεκφράζουν ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες, χαρακτηριστικά πρωτεϊνών, υπερπαραγωγή ωσμωπροστατών, έκφραση υδάτινων καναλιών μεταφοράς πρωτεϊνών και ιόντων, και έκφραση και χαρακτηρισμός μοριακών συνοδών.

#### **A6. Η πρωτεΐνη της ωσμωτίνης**

Τα φυτά παράγουν έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν ενεργά σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες των κυττάρων. 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 ωσμοτίνη θεωρείται χαρακτηριστική εκπρόσωπος των πρωτεϊνών ωσμοτικής 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 ωσμοτίνης 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 ωσμοτίνες 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 ωσμοτίνες πιο συγκεκριμένα ανήκουν στην πέμπτη οικογένεια των PR πρωτεϊνών και είναι αρκετά συγγενείς με τις θαυματίνες (thaumatin).

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

## A7. Η ωσμοτίνη του αμπελιού

Οι ωσμοτίνες και οι ομοιάζουσες με ωσμοτίνη πρωτεΐνες (osmotin-like proteins, OLP), έχουν μελετηθεί εκτενώς σε μονοετή φυτικά είδη και φαίνεται να αποτελούν μέρος του μηχανισμού άμυνας των φυτών στην καταπόνηση, που προκαλείται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η ρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν ομοιάζουσες με ωσμοτίνη πρωτεΐνες (OLP), των μονοετών φυτών που έχουν μελετηθεί φαίνεται να είναι αρκετά περίπλοκη. Η έκφραση τους ρυθμίζεται αναπτυξιακά και επάγεται από διάφορες καταστάσεις καταπόνησης που προκαλούνται από βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες.

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενός cDNA κλώνου του πολυετούς φυτικού είδους, αμπελιού (*Vitis vinifera* L. cv. Sultanina), έδειξε ότι κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με χαρακτηριστικά ωσμοτίνης (OLP). Η αλληλουχία του παραπάνω cDNA κλώνου παρουσιάζει ομοιότητες με ωσμοτίνες και με ομοιάζουσες με ωσμοτίνη πρωτεΐνες (OLP) ετησίων και πολυετών φυτών. Πιο συγκεκριμένα παρουσιάζει υψηλό ποσοστό ομολογίας με την πρωτεΐνη της ωσμοτίνης των φυτικών ειδών σόγιας (76%), *Arabidopsis* (68%), καπνού (65%) και την ομοιάζουσα με ωσμοτίνη πρωτεΐνη του *Solanum commersonii* (63%). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του κλώνου της αμπέλου έχει μήκος 898 bp και περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί πολυπεπτίδιο 225 αμινοξέων, αναμενόμενου μοριακού βάρους 23,87 kD.

Κατά τη μελέτη της γονιδιακής οργάνωσης της ωσμοτίνης του αμπελιού, με ανάλυση κατά Southern χρησιμοποιώντας τον παραπάνω cDNA κλώνο σαν ανιχνευτή, παρατηρήθηκαν πολλαπλές ζώνες υβριδισμού του ανιχνευτή με το γενωμικό DNA του αμπελιού μετά από πέψη του με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI*, *EcoRV* και *KpnI*. Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν ότι το παραπάνω γονίδιο είναι μέλος μιας πολυγονιδιακής οικογένειας στο γονιδίωμα της αμπέλου, που αποτελείται από τουλάχιστον τέσσερα μέλη.

Κατά την πραγματοποίηση ανάλυσης κατά northern ο κλώνος της ωσμοτίνης του αμπελιού υβριδίσθηκε με mRNAs, μεγέθους περίπου 1,0 kb, τα οποία παρουσίασαν διαφοροποιημένη έκφραση στους διάφορους ιστούς της

αμπέλου. Υψηλά επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στη ρίζα, το βλαστό και τα φύλλα φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro*, ενδιάμεσα σε κάλλους και ράγα και χαμηλά σε αιωρούμενες καλλιέργειες κυττάρων στη στατική φάση.

Επιπλέον, η έκφραση του γονιδίου της ωσμοτίνης του αμπελιού μελετήθηκε σε κυτταροκαλλιέργειες που μεταχειρίστηκαν με αμπισικό οξύ (ABA), 2-chloro-ethylphosphonic acid (ethephon, πρόδρομη ένωση του αιθυλενίου), NaCl και σακχαρόζη σε τελικές συγκεντρώσεις 75  $\mu$ M, 1 mM, 100 mM, και 170 mM, αντίστοιχα. Και στις τέσσερις επεμβάσεις παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων του αντίστοιχου mRNA, με παρόμοιο ρυθμό συσσώρευσης. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η έκφραση του γονιδίου της αμπέλου ρυθμίζεται από όλους τους αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης που μελετήθηκαν.

Η ρύθμιση της έκφρασης των ωσμοτινών και των συγγενών τους γονιδίων φαίνεται ότι είναι πολύ περίπλοκη. Αυτά τα γονίδια είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενα και επίσης ελέγχονται από πολλαπλά σήματα όπως το ABA, το σαλικυλικό οξύ, χαμηλό υδατικό δυναμικό, χαμηλές θερμοκρασίες, τραυματισμός και αιθυλένιο. Έχει προταθεί ότι η επαγωγή των ωσμοτινών από ωσμωτική καταπόνηση μπορεί απλά να αντανάκλα την ενεργοποίηση της αντίδρασης από γενικές καταπονήσεις φυτών που αναπτύσσονται για να αμυνθούν σε παθογόνα. Η έκφραση του γονιδίου της ωσμοτίνης του αμπελιού επάγεται καθαρά από το αμπισικό οξύ και το αιθυλένιο, τις δυο φυτικές ορμόνες που σχετίζονται με την ωσμωτική και παθογενετική καταπόνηση (Loulakakis, 1997a, b).

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **B1. Φυτικό υλικό**

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό από φυτά αμπελιού (*Vitis vinifera* L. cv. **Sultanina**) τα οποία αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο του αγροκτήματος του Τ.Ε.Ι. Κρήτης και από αυτοφυή φυτά του δενδρώδους καπνού (*Nicotiana glauca*) τα οποία βρίσκονταν στον περιβάλλοντα χώρο του Τ.Ε.Ι. Κρήτης σε συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος.

Αρχικά έγινε η συλλογή φρέσκων φύλλων από τα φυτά αμπελιού (*Vitis vinifera* L. cv. **Sultanina**) και στη συνέχεια στο χώρο του εργαστηρίου αφαιρέθηκαν οι μίσχοι των φύλλων, ξεπλύθηκαν, στέγνωσαν, και ισοζυγίστηκαν πριν εφαρμοστούν οι πειραματικές επεμβάσεις.

Συγκεκριμένα τα φύλλα αμπελιού τοποθετήθηκαν σε τριβλία όπου είχαν παρασκευαστεί σε τελικό όγκο 100 mL τα εξής διαλύματα:

- ΜΑΡΤΥΡΑΣ 0 mM
- NaCl 250 mM και
- PEG 50 %

Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν μαζί με τα ισοζυγισμένα φύλλα σε τριβλία, και αφέθηκαν για επώαση. Πραγματοποιήθηκε μια δειγματοληψία, καθώς τα φύλλα συλλέχθηκαν στις 3 ώρες.

Με τον ίδιο τρόπο συλλέχθηκαν και προετοιμάστηκαν φύλλα από φυτά δενδρώδους καπνού (*Nicotiana glauca*) και έπειτα παρασκευάστηκαν σε τελικό όγκο 50 mL τα εξής διαλύματα:

1. ΜΑΡΤΥΡΑΣ (1) 0 mM
2. NaCl 50 mM
3. NaCl 200 mM
4. ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ 3 %
5. ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ 6,8 %
6. ΜΑΡΤΥΡΑΣ (2) 0 mM
7. ΕΤΗΕΡΗΟΝ 1 mM
8. ΕΤΗΕΡΗΟΝ 3 mM



Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν μαζί με τα ισοζυγισμένα φύλλα σε τριβλία, και αφέθηκαν για επώαση. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά δυο δειγματοληψίες, καθώς τα φύλλα συλλέχθηκαν στις 24 και στις 72 ώρες.

Με τον ίδιο τρόπο συλλέχθηκαν και προετοιμάστηκαν ξανά φύλλα από φυτά δενδρώδους καπνού (*Nicotiana glauca*) και έπειτα παρασκευάστηκαν σε τελικό όγκο 100 mL τα εξής διαλύματα:

- ΜΑΡΤΥΡΑΣ 0 mM
- NaCl 250 mM και
- PEG 27 %

Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν μαζί με τα ισοζυγισμένα φύλλα σε τριβλία, και αφέθηκαν για επώαση. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά τρεις μετρήσεις, καθώς τα φύλλα συλλέχθηκαν στις 3, στις 8 και στις 24 ώρες. Το φυτικό υλικό που συλλέχθηκε μετά από κάθε μέτρηση ξεπλύθηκε, στέγνωσε, ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη έως την περαιτέρω χρησιμοποίησή του.

## **B2. Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς**

### Διαλύματα :

Διάλυμα εκχύλισης (extraction buffer): 100 mM Tris-HCl pH 8,2, 10 mM EDTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 για τα φύλλα. 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 ισοζύγιση φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη 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.

### **B3. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης (Modified Lowry)**

#### Διαλύματα:

- Διάλυμα Α: 2 g NaOH, 10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 g τρυγικό Na-K σε 500 mL H<sub>2</sub>O
- Διάλυμα Β: 0,5 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O σε 100 mL H<sub>2</sub>O
- Διάλυμα Γ: Διάλυμα Α & Διάλυμα Β σε αναλογία 100:2 (παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση).
- Διάλυμα Δ: Folin-Phenol 2× αραιωμένο 1:1 με H<sub>2</sub>O (παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση).
- Διάλυμα BSA 1 mg/ mL.

#### 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 100μL 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.

Από πυκνό διάλυμα BSA (1 mg/mL) παρασκευάζεται μια σειρά διαλυμάτων με περιεκτικότητα 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 και 100 μg BSA ανά 0,25 mL τελικού διαλύματος. Σε μικρούς σωλήνες τοποθετείται 0,25 mL από τα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης BSA και ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία.

Οι τιμές απορρόφησης των διαλυμάτων BSA (0-100 μg BSA) θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (γραφική παράσταση της απορρόφησης σε σχέση με την περιεκτικότητα του διαλύματος σε BSA). Από την πρότυπη καμπύλη θα προσδιοριστεί η περιεκτικότητα κάθε φυτικού εκχυλίσματος σε πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg πρωτεϊνών ανά mL διαλύματος και ανά g φρέσκου βάρους.

#### **B4. Μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου GDH**

##### Διαλύματα:

- 1M Tris – HCl pH 8,0.
- 2 M NH<sub>4</sub>Cl.
- 10 mM CaCl<sub>2</sub>.
- 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<sub>4</sub>Cl, 5 mL 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mL 200 mM α-κετογλουταρικό οξύ και 22,5 mL DH<sub>2</sub>O.

Ακολούθησε εξισορρόπηση του μίγματος στους 27°C. Για την αμινωτική αντίδραση προστέθηκαν σε κυβέτα 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 (ΔOD / min \* 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–μερκαπταιθανόλη (b–mercaptoethanol, 0.1% κυανούν της βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερόλη.
- Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης: 29,2% ακρυλαμίδη (acrylamide), 0,8% δις–ακρυλαμίδη (bis–acrylamide).
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (resolving gel buffer): 1.5 M Tris–HCl pH 8.9 (Lower Tris 4×).
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοιβάσης (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 πηκτώμα αποτελείται από δυο επιμέρους πηκτώματα όπου το ένα (stacking gel) προηγείται του άλλου (resolving gel). Το resolving gel περιείχε 10% πολυακρυλαμίδη και το stacking gel 4% πολυακρυλαμίδη. Η επιμέρους σύσταση κάθε πηκτώματος φαίνεται στον πίνακα 1.

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.

| <b>SDS - PAGE (15 mL)</b>       |                              |                      |               |
|---------------------------------|------------------------------|----------------------|---------------|
| <b>STOCK SOLUTION</b>           | <b>STACKING GEL (7,5 mL)</b> | <b>RESOLVING GEL</b> |               |
|                                 |                              | <b>% ACRYLAMIDE</b>  |               |
|                                 | <b>4,00%</b>                 | <b>10,00%</b>        | <b>12,00%</b> |
| <b>d H<sub>2</sub>O (mL)</b>    | 4,59                         | 6,18                 | 5,19          |
| <b>Upper Tris (4x) (mL)</b>     | 1,88                         | 0                    | 0             |
| <b>Lower Tris (4x) (mL)</b>     | 0                            | 3,75                 | 3,75          |
| <b>Acryl.:Bis (30:0,8) (mL)</b> | 1                            | 5                    | 6             |
| <b>10% APS (μL)</b>             | 26                           | 64                   | 60            |
| <b>TEMED (μL)</b>               | 11                           | 5                    | 5             |
| <b>TOTAL (mL)</b>               | <b>7,5</b>                   | <b>15</b>            | <b>15</b>     |

**Πίνακας 2:** Ποσοτική σύσταση των πήκτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

#### **B6. Χρωματισμός πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R-250.**

Η μέθοδος έγινε σύμφωνα με τον Λουλακάκη (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-H<sub>2</sub>O, 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 κατά Western Blot - Ανοσοανίχνευση**

#### Διαλύματα:

- Διάλυμα μεταφοράς: 20mM Tris, 192mM γλυκίνη,
- PBS (phosphate buffered saline): 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,115% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- 2% BSA (αλβουμίνη από ορό βοδιού) σε PBS 1×.
- 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 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 αραιώση 1:1000 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  
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 DH<sub>2</sub>O.

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 δενδρωδών φυτών καπνού (*Nicotiana glauca*)

Για τον ανασοχαρακτηρισμό και τη μελέτη της έκφρασης της ωσμωτίνης στο *Nicotiana glauca* χρησιμοποιήθηκαν φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος. Από τα φυτά αυτά συλλέχθηκαν φύλλα στα οποία έγιναν επεμβάσεις με παράγοντες που προκαλούν ωσμωτική καταπόνηση και με Ethephon (μία ουσία που εκλύει αιθυλένιο).



**Εικόνα 4.** Φυτό δενδρώδους καπνού (*Nicotiana glauca*).

Για την πραγματοποίηση της ωσμωτικής καταπόνησης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- NaCl
- ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ
- PEG

Τα φύλλα που συλλέχτηκαν τοποθετήθηκαν σε τριβλία, τα οποία περιείχαν τις παραπάνω ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις σε τελικό όγκο 100 mL. Εκεί αφήθηκαν για κάποιο χρονικό διάστημα ώστε να πραγματοποιηθεί η ωσμωτική καταπόνηση.



**Εικόνα 5.** Φύλλα από φυτά δενδρώδους καπνού υπό την επίδραση διαφόρων ουσιών για την πραγματοποίηση ωσμωτικής καταπόνησης.

Έπειτα ακολούθησε εκχύλιση των πρωτεϊνών των καταπονημένων φύλλων του δενδρώδους καπνού με σκοπό την μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης της ωσμωτίνης. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, με σκοπό την εκτίμηση της σχετικής περιεκτικότητας των ιστών σε πρωτεΐνες.

Στην συνέχεια ίση ποσότητα πρωτεϊνών από κάθε δείγμα φυτικού ιστού μετουσιώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε με SDS-PAGE σε επίπεδα πηκτώματα 12% ακρυλαμίδης, με σκοπό την ανάλυση των πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Το πρωτεϊνικό πρότυπο κάθε δείγματος προέκυψε μετά τη χρώση του πηκτώματος με Coomassie Brilliant Blue R-250.

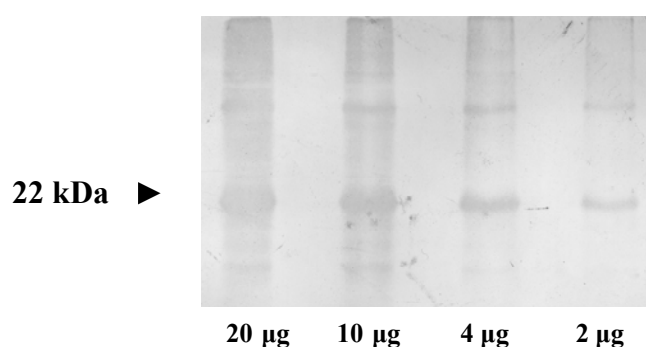
Για τη μελέτη της έκφρασης της ωσμωτίνης του δενδρώδους καπνού (*Nicotiana glauca*), τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαφόρων δειγμάτων αναλύθηκαν με SDS-PAGE, υποβλήθηκαν σε Western Blot (με τη μέθοδο αυτή οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε σταθερό υπόστρωμα,

στην προκειμένη περίπτωση μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου στη συνέχεια μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, από το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί και η ανοσοανίχνευση της ωσμωτίνης έγινε με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη της ωσμωτίνης του αμπελιού.

Το αντίσωμα εναντίον της ωσμωτίνης που χρησιμοποιήθηκε, παρασκευάστηκε με εισαγωγή σε κουνέλι ως αντιγόνου υβριδικής 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 α) στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την αλληλουχία του πλασμιδίου που κωδικοποιεί πολυπεπτιδίο μοριακού βάρους 4 kD και καθαρισμό της με προπαρασκευαστική SDS ηλεκτροφόρηση (Βουτσινά et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

## Γ2. Τιτλοδότηση, εξειδίκευση και χαρακτηρισμός του αντισώματος

Κατ' αρχάς ελέγχθηκαν τα όρια ανίχνευσης του αντισώματος χρησιμοποιώντας τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (20 μg, 10μg, 4 μg και 2μg) εκχυλίσματος ολικών πρωτεϊνών βακτηρίων που υπερεκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη της ωσμωτίνης του αμπελιού (το αντιγόνο δηλαδή με το οποίο έγινε ανοσοποίηση του κουνελιού) σε ανάλυση Western blot.



**Εικόνα 6.** Ετερόλογη έκφραση της ωσμωτίνης του αμπελιού σε βακτήρια. Διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης του βακτηριακού εκχυλίσματος που υπερεκφράζει την ωσμωτίνη του αμπελιού χρησιμοποιήθηκαν για την τιτλοδότηση του αντισώματος. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE, μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης τα οποία επώασθησαν με τον αντιγόνο εναντίον της υβριδικής πρωτεΐνης της ωσμωτίνης σε αραιώση 1/2000 (Βουτσινά et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6 ο αντιορός αντέδρασε κυρίως με μια πρωτεϊνική ζώνη μεγέθους 25 kDa περίπου και ασθενέστερα και με άλλες πρωτεϊνικές ζώνες. Η πρωτεϊνική ζώνη των 25 kDa ανιχνεύθηκε καθαρά ακόμα και στην μικρότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης (2μg) ενώ στις ασθενέστερα ανιχνευόμενες ζώνες μειώθηκε η ένταση τους ή ακόμα και εξαφανίστηκαν με τη μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

Στη συνέχεια εξετάστηκε κατά πόσο ο αντιορός εναντίον της υβριδικής πρωτεΐνης της ωσμοτίνης του αμπελιού αλληλεπιδρά με την ωσμοτίνη του αμπελιού και ακόμα περισσότερο με την ωσμοτίνη του δενδρόδους καπνού.

Η ωσμοτίνες θεωρούνται χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι πρωτεϊνών ωσμοτικής καταπόνησης και επάγονται, 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. Οι ωσμοτίνες, ανήκουν στην πέμπτη οικογένεια των PR πρωτεϊνών (pathogenesis-related proteins) με αντιμυκητολογική δράση οι οποίες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια αμυντικών πρωτεϊνών των φυτών, είναι αρκετά συγγενείς με τις θαυματίνες (thaumatins) και παρουσιάζουν σημαντική αμινοξική ομολογία στο φυτικό βασίλειο.

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών ωσμοτινών και θαυματινών 12 φυτικών ειδών όπου φαίνονται οι σημαντικές ομολογίες μεταξύ τους.

**Πίνακας 3.** Στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών ωσμοτινών και θαυματινών 12 φυτικών ειδών (το \* δηλώνει την ύπαρξη ίδιου αμινοξέος [ταυτότητα], ενώ η : δηλώνει συντηρητικές αλλαγές).

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Nicotiana_tabacum       | -----LV-----FF----LLAFVTTYTYASGVFEVHNNCPYTVWAAA     |
| Nicotiana_tabacumOSM    | MSHLTTFLV-----FF----LLAFVTTYTYASGVFEVHNNCPYTVWAAA   |
| Nicotiana_sylvestrisOSM | MSHLITCVV-----FF----LLAFVTTYTHASGVFEVHNNCPYTVWAAA   |
| Capsicum_annuumOSM      | MGHLTTCLV-----FF----LLAFVTTYTYASGVFEVHNNCPYTVWAAA   |
| Linum_usitatissimumOSM  | MTHFPILLIP-----LFSS--LLLWVSITNAA-VIDIFNNCPYTVWAAAS  |
| Solanum_tuberosumTHA    | -MHFLKFSP-----LFVF-----LYFLSVTHAA-TFDITNRCTYPVWAAA  |
| Vitis_viniferaTHA       | -MRFTTTLF-----ILIPLLL--SLLFTS-THAA-TFDILNKCTYTVWAAA |
| Theobroma_cacaoOSM      | -----WAAA   |
| Vitis_riparia           | -MFSSKLPMS-DLRILFIF--FLCFISSIHAA-TFQITNQCSYTVWAAA   |
| Vitis_vinifera          | -MGLCKILS----ISSFLLT--TLFFTS-SYAA-TFNIQNHCSYTVWAAA  |
| Actinidia_deliciosaTHA  | -----CPFTVWAAA                                      |
| Oryza_sativa            | -MAAPAILR-----LLP----LLLLAAAANAATFTITNKCQITVWAAA    |
| Hordeum_vulgareTHA1     | -MASSRVVY-----LLAGL-LLAALAATDAATITVNVNRCSTVWPGA     |

Hordeum\_vulgareOSM -MASSRVVY-----LLAGL-LLAALAATTAATITVVNRCYSYTVWPGA  
 Hordeum\_vulgareTHA2 -MASSHVVS-----LLAGL-LLAALAASTDAATITVVNRCYSYTVWPGA  
 Hordeum\_vulgare -----RSATITVVNRCYSYTVWPGA  
 Triticum\_aestivumTHA -MASTRVLH-----LIA---LVLAVATAADAATITVVNRCYSYTVWPGA  
 \*...:

Nicotiana\_tabacum TPVGGRRRLERGOSSWWFAPPGTMARIWGRNTCNFDGAGRGWCQTGDCG  
 Nicotiana\_tabacumOSM TPVGGRRRLERGOSSWWFAPPGTMARIWGRNTCNFDGAGRGWCQTGDCG  
 Nicotiana\_sylvestrisOSM TPVGGRRRLERGOSSWWFAPPGTMARIWGRNTCNFDGAGRGWCQTGDCG  
 Capsicum\_annuumOSM TPVGGGKLLERGOSSWWFAPPGTMARIWGRNTCNFDGAGRGWCQTGDCG  
 Linum\_usitatissumOSM TPIGGRRQLDHGQWTWIIYPPAGTSMARIWGRNTCNFDGSGRGWCETGDCG  
 Solanum\_tuberosumTHA SP-GGRRRLDLGQTTWNIINVNPGTTMGRWGRNTCNFDGSGRGKCGTGDGN  
 Vitis\_viniferaTHA SP-GGRRRLDSGQSWITIVNPGTTNARIWGRNTSCTFDANGRGKCEITGDCN  
 Theobroma\_cacaoOSM VP-GGRRRLDRGGVWNLNVPNGTTGARVWARTKCFDAGRGRCETGDCG  
 Vitis\_riparia SP-GGRRRLDRGQSWITLNVNPGTGMARIWGRNTNCHFDASGRGRCITGDCG  
 Vitis\_vinifera VP-GGGMQLGSGQSWSLNVNAGTTGARVWGRNTCNFDASGNGKCEITGDCG  
 Actinidia\_deliciosaTHA VP-GGGKRLDRGQNWIIINPAGTKGARVWPRTGCFDAGRGKCGTGDGN  
 Oryza\_sativa VPSGGGQQLDPGQQWIDVNPAGTTGGRVWARTGCSFDGSGNGRCQITGDCG  
 Hordeum\_vulgareTHA1 LP-GGGVRLDPGQSWALNMPAGTAGARVWPRTGCTFDGSGRGRCITGDCN  
 Hordeum\_vulgareOSM LP-GGGVRLDPGQSWALNMPAGTAGARVWPRTGCTFDGSGRGRCITGDCN  
 Hordeum\_vulgareTHA2 LP-GGGVRLDPGQSWALNMPAGTAGARVWPRTGCTFDGSGRGRCITGDCG  
 Hordeum\_vulgare LP-GGGVRLDPGQSWALNMPAGTAGARVWPRTGCTFDGSGRGRCITGDCG  
 Triticum\_aestivumTHA LP-GGGVRLDPGQSWALNMPAGTAGARVWPRTGCTFDGSGRGRCITGDCG  
 \* \* \* \* \* : . \* \* . \* : \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \*

Nicotiana\_tabacum GVLECKGWGKPPNTLAEYALNQFNSLDFWDISVIDGFNIPMSFGPTKPGP  
 Nicotiana\_tabacumOSM GVLECKGWGKPPNTLAEYALNQFNSLDFWDISVIDGFNIPMSFGPTKPGP  
 Nicotiana\_sylvestrisOSM GVLECKGWGKPPNTLAEYALNQFNSLDFWDISVIDGFNIPMSFGPTKPGP  
 Capsicum\_annuumOSM GVLECKGWGKPPNTLAEYALNQFNSLDFWDISVIDGFNIPMSFGPTKPGP  
 Linum\_usitatissumOSM GVLNCGQGWGPPNTLAEYALNQFNSLDFYDISLVDGFNIPMIFTPTANVG  
 Solanum\_tuberosumTHA GRLECGQFGTVPNTLAEFALNQPNLDFVDISLVDGFNIPMEFSPIN---  
 Vitis\_viniferaTHA GLLQCQGYGSPNTLAEFALNQPNLDFYIDISLVDGFNIPMDFS-----  
 Theobroma\_cacaoOSM GLLQCQAYGAPPNTLAEYALNQFNNKDFDIDISLVDGFNIPMDFSPTSG--  
 Vitis\_riparia GVLNCGQGWGPPNTLAEYALNQFNGKDFDIDISLVDGFNIPMDFSPTSG--  
 Vitis\_vinifera GLLQCQAYGPPNTLAEFALNQFNSLDFDIDISLVDGFNIPMAFNPTSN--  
 Actinidia\_deliciosaTHA GLLQCQAFGQPPNTLAEYALNQFNNLDFDIDISLVDGFNIPMEFSPIN---  
 Oryza\_sativa GVLRCAYGQPPNTLAEFALNQFNSLDFDIDISLVDGFNIPMDFLPAGDG--  
 Hordeum\_vulgareTHA1 GVLACRVSGQQPTTLAEYTLGQGANKDFDLSVIDGFNIPMSFEPVGG--  
 Hordeum\_vulgareOSM GVLACRVSGQQPTTLAEYTLGQGANKDFDLSVIDGFNIPMSFEPVGG--  
 Hordeum\_vulgareTHA2 GALACRVSGQQPTTLAEYTLGQGANKDFDLSVIDGFNIPMSFEPVGG--  
 Hordeum\_vulgare GALACRVSGQQPTTLAEYTLGQGANKDFDLSVIDGFNIPMSFEPVGG--  
 Triticum\_aestivumTHA GTLACRVSGQQPTTLAEYTLGQGANKDFDLSVIDGFNIPMNFEPVGG--  
 \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \*

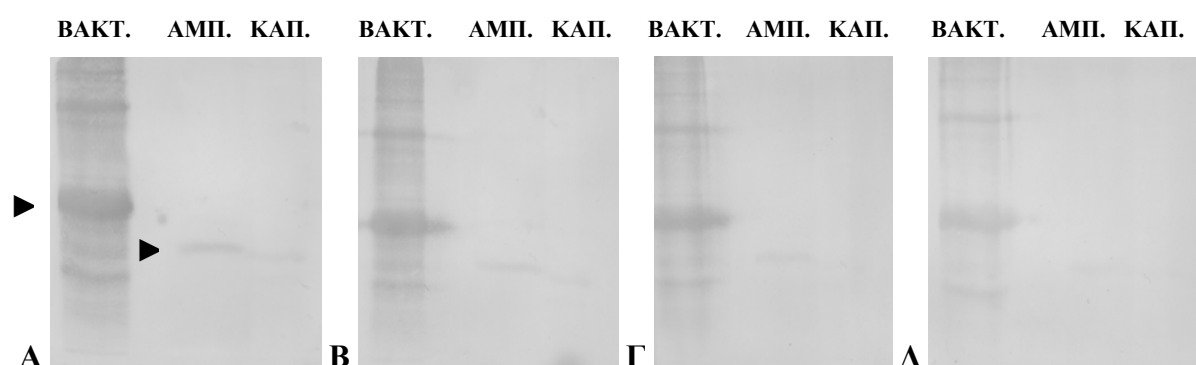
Nicotiana\_tabacum -GKCH--GIQCTANINGECPGSLRVPGGCNPCTTFGGQQYCCTQG---P  
 Nicotiana\_tabacumOSM -GKCH--GIQCTANINGECPGSLRVPGGCNPCTTFGGQQYCCTQG---P  
 Nicotiana\_sylvestrisOSM -GKCH--GIQCTANINGECPGALRVPGGCNPCTTFGGQQYCCTQG---P  
 Capsicum\_annuumOSM -GKCH--PIQCVANINGECPGSLRVPGGCNPCTTFGGQQYCCTQG---P  
 Linum\_usitatissumOSM SGNQC--SLTCTADINTQCPGELRAPGGCNPCTVFKTNEYCCTQYGG-T  
 Solanum\_tuberosumTHA -GGCR--KIRCSADINGQCPSELRAPGGCNPCTVFKMKEFCCTNGPG-S  
 Vitis\_viniferaTHA --GCR--GIQCSVDINGQCPSELKAPGGCNPCTVFKTNEYCCTDGP-S  
 Theobroma\_cacaoOSM --GCTR--GIRCTADITIGQCPNQLKAPGGCNPCTVFRDQYCCNSG---N  
 Vitis\_riparia --GCR--GIKCTANINGQCPQALKASGGCNPCTVFKTNEYCCTDGP-S  
 Vitis\_vinifera --GCTR--GISCTADIVGECPAALKTTGGCNPCTVFKTNEYCCTDGP-S  
 Actinidia\_deliciosaTHA --GCTR--GIKCTADINGQCPNELRAPGGCNPCTVFKTNEYCCTDGP-S  
 Oryza\_sativa -AGCAKGGPRCEADVAGQCPSELRAPGGCNPCTVFKTNEYCCTDGP-S  
 Hordeum\_vulgareTHA1 ---CR--AARCATDITKDKLQVPGGCASACGKFGGDTYCCRGQFEHN  
 Hordeum\_vulgareOSM ---CR--AARCATDITKDKLQVPGGCAT-CGKFGGDTYCCRGQFEHN  
 Hordeum\_vulgareTHA2 ---CR--AARCATDITKECLKELQVPGGCASACGKFGGDTYCCRGQFEHN  
 Hordeum\_vulgare ---CR--AARCATDITKECLKELQVPGGCASACGKFGGDTYCCRGQFEHN  
 Triticum\_aestivumTHA ---CR--AARCATDITKECLKELQVPGGCASACGKFGGDTYCCRGQFEHN  
 \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \*

Nicotiana\_tabacum CGPTELSRWFKQRCPDAYSYPQDDPTSTFTCTSWTTDYKVMFCPYGSAH-  
 Nicotiana\_tabacumOSM CGPTELSRWFKQRCPDAYSYPQDDPTSTFTCTSWTTDYKVMFCPYGSAH-  
 Nicotiana\_sylvestrisOSM CGPTELSRWFKQRCPDAYSYPQDDPTSTFTCTSWTTDYKVMFCPYGSAH-  
 Capsicum\_annuumOSM CGPTDLSRFFKQRCPDAYSYPQDDPTSTFTCQSWTTDYKVMFCPYGSAH-  
 Linum\_usitatissumOSM CGPTGFSRFFKDRCPDAYSYPQDDPTSTFTCPGG-TNYRVVFCPYGSAH-  
 Solanum\_tuberosumTHA CGPTDYSRFFKQRCPDAYSYPQDDPTSMFTCHAG-TNYRVVFCPYGSAH-  
 Vitis\_viniferaTHA CGPTTYSKFFKDRCPDAYSYPQDDPTSLFTCPGG-TNYRVVFCPYGSAH-  
 Theobroma\_cacaoOSM CRPTDYSRFFKTRCPDAYSYPQDDPTSTFTCPGG-TNYRVVFCPYGSAH-  
 Vitis\_riparia CGPTDYSRFFKTRCPDAYSYPQDDPTSTFTCPGG-ANYRVVFCPYGSAH-



Η σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των ωσμοτινών του *Vitis vinifera* και *Nicotiana glauca* έδειξε ότι οι δυο πρωτεΐνες παρουσιάζουν ταυτότητα 56% και ομοιότητα 73% (όπου ομοιότητα = ταυτότητα + τις συντηρητικές αλλαγές). Η υψηλή αυτή ομοιότητα των ωσμοτινών των δυο φυτικών ειδών μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι το αντίσωμα για την ωσμοτίνη του αμπελιού μπορεί να αλληλεπιδρά και με την ωσμοτίνη του δενδρώδους καπνού.

Για την επαλήθευση της υπόθεσης της αλληλεπίδρασης του αντισώματος υβριδικής πρωτεΐνης της ωσμοτίνης του αμπελιού με την ωσμοτίνη του αμπελιού και δενδρώδους καπνού πρωτεϊνικά εκχυλίσματα 1) βακτηρίων που υπερεκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη της ωσμοτίνης του αμπελιού (Βουτσινά et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα), 2) φύλλων αμπελιού στα οποία προκλήθηκε ωσμωτική καταπόνηση με PEG, 3) φύλλων δενδρώδους καπνού στα οποία προκλήθηκε ωσμωτική καταπόνηση με PEG αναλύθηκαν με SDS-PAGE, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Western Blot) και έγινε ανοσοανίχνευση με την βοήθεια πάντα του αντισώματος της υβριδικής πρωτεΐνης της ωσμοτίνης του αμπελιού. Τέσσερις πανομοιότυπες μεμβράνες επώαστηκαν με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντισώματος (1/500, 1/1000, 1/2000 και 1/4000).



**Εικόνα 7.** Ανίχνευση της ωσμοτίνης με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισώματος 1/500 (Α), 1/1000 (Β), 1/2000 (Γ) και 1/4000 (Δ). Χρησιμοποιήθηκαν: βακτηριακό εκχύλισμα που υπερεκφράζει την ωσμοτίνη του αμπελιού (ΒΑΚΤ.), εκχυλίσματα φύλλων δενδρώδους καπνού (ΚΑΠ.) και αμπελιού (ΑΜΠ) που υπέστησαν ωσμωτική καταπόνηση με PEG.

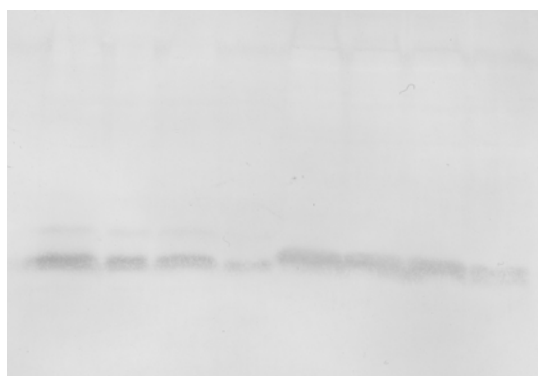
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7 το αντίσωμα: στα βακτηριακά εκχυλίσματα αντιδρά έντονα με την πρωτεϊνική ζώνη μοριακού βάρους 25 kDa και στις 4 συγκεντρώσεις του αντιορού, στα εκχυλίσματα των φύλλων του αμπελιού αντιδρά με πρωτεϊνική ζώνη μοριακού βάρους 21 kDa στις 3 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του αντιορού και ασθενέστερα στη μικρότερη συγκέντρωση (1/4000) ενώ στα εκχυλίσματα των φύλλων του καπνού αντιδρά με πρωτεϊνική ζώνη μοριακού βάρους 21 kDa στις δυο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του αντιορού και ασθενέστερα στη συγκέντρωση 1/2000 και ακόμα ασθενέστερα στη συγκέντρωση 1/4000. Η διαφορά στο μοριακό βάρος της πρωτεϊνικής ζώνης που ανιχνεύει ο αντιορός στο βακτηριακό εκχύλισμα (25 kDa) και στα εκχυλίσματα φύλλων αμπελιού και καπνού (21 kDa) δικαιολογείται γιατί τα βακτήρια εκφράζουν μια υβριδική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από την κωδική περιοχή του cDNA της ωσμοτίνης του αμπελιού στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης μετά από αλληλουχία του πλασμιδίου έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε που κωδικοποιεί πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 4 kDa.

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος συμπεραίνουμε ότι το αντίσωμα που παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας σαν αντιγόνο την υβριδική πρωτεΐνη της ωσμοτίνης του αμπελιού αναγνωρίζει τόσο την ωσμοτίνη του αμπελιού όσο και την ωσμοτίνη του δενδρώδους καπνού. Επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της έκφρασης της ωσμοτίνης του δενδρώδους καπνού. Βρέθηκε ακόμα ότι η κατάλληλη αραίωση του αντισώματος για την ανίχνευση της ωσμοτίνης του αμπελιού είναι η 1/2000 ενώ για την ανίχνευση της ωσμοτίνης του δενδρώδους καπνού η 1/1000.

Στη συνέχεια αναλύθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων αμπελιού και δενδρώδους καπνού. Συγκεκριμένα μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο LOWRY αναλύθηκαν 50 μg, 30 μg, 20 μg και 10 μg ολικών πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και Western blot. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης μετά την ανοσοανίχνευση της ωσμοτίνης.



ΑΜΠΕΛΙ ΔΕΝΔΡ. ΚΑΠΝΟΣ



50μg 30μg 20μg 10μg 50μg 30μg 20μg 10μg

**Εικόνα 8.** Πρωτεϊνικές ζώνες της ωσμωτίνης από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αμπελιού και δενδρώδους καπνού. Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στα φίλτρα έγινε ανίχνευση της ωσμωτίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Στα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος παρατηρούμε την μεταβολή της έκφρασης της ωσμωτίνης του αμπελιού και του δενδρώδους καπνού για τις διάφορες συγκεντρώσεις ολικών πρωτεϊνών που αναλύθηκαν.

### **Γ3. Επίδραση ωσμωτικής καταπόνησης και Ethephon στα ολικά πρωτεϊνικά πρότυπα φύλλων αμπελιού και δενδρώδους καπνού.**

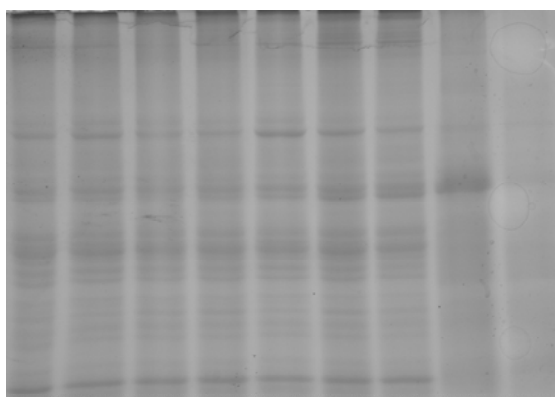
Ίσες ποσότητες πρωτεϊνών από φύλλα αμπελιού (*Vitis vinifera* L. cv. Sultanina) και φύλλα του δενδρώδους καπνού (*Nicotiana glauca*) που είχαν υποστεί ωσμωτική καταπόνηση ή επίδραση με Ethephon μετουσιώθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν με SDS-PAGE. Συγκεκριμένα έγιναν οι εξής επεμβάσεις:

Νεαρά φύλλα (3,5 g) τοποθετήθηκαν σε 250 mM NaCl και 50 % PEG σε τελικό όγκο 100 mL για 3, 8 και 24 ώρες (Α) ή σε 50 mM και 200 mM NaCl, δυο συγκεντρώσεις σακχαρόζης 3% και 6,8% και δυο συγκεντρώσεις Ethephon 1 mM και 3 mM σε τελικό όγκο 100 mL για 24 (Β) και 72 ώρες (Γ).

Στην Εικόνα (9) διακρίνονται διαφορές στην παρουσία αλλά και στην ένταση των ζωνών μεταξύ των επεμβάσεων.

ΔΕΝΔΡΩΔΗΣ ΚΑΠΝΟΣ ΑΜΠΕΛΙ

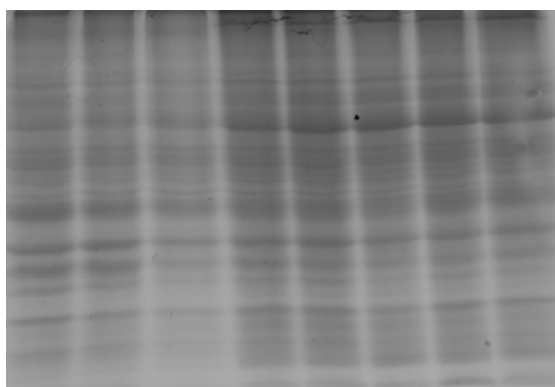
**A**



M 3h 8h 24h 3h 8h 24h  
NaCl PEG

ΔΕΝΔΡΩΔΗΣ ΚΑΠΝΟΣ (24 ΩΡΕΣ)

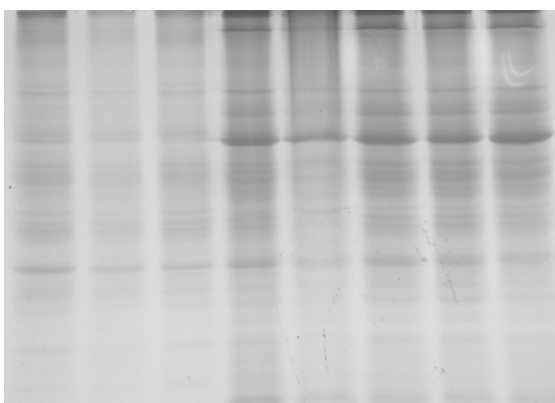
**B**



M 50mM 200mM 3% 6,8% M 1mM 3mM  
NaCl ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ ETHREL

ΔΕΝΔΡΩΔΗΣ ΚΑΠΝΟΣ (72 ΩΡΕΣ)

**Γ**



M 50Mm 200mM 3% 6,8% M 1mM 3mM  
NaCl ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ ETHERPHON

**Εικόνα 9.** Ολικά πρωτεϊνικά πρότυπα φύλλων από φυτά αμπελιού και δενδρώδους καπνού. Τα πρότυπα προέκυψαν μετά από ανάλυση με SDS-PAGE και χρώση του πηκτώματος με με Coomassie Brilliant Blue R-250.

Στη συνέχεια σε όλα τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε ανοσοανίχνευση της ωσμοτίνης με κατάλληλο αντίσωμα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

#### **Γ4. Επίδραση αλατιού (NaCl) και PEG (Poly-Ethanol-Glycole) σε φύλλα αμπελιού**

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 250 mM NaCl και 50 % PEG σε τελικό όγκο 100 mL. Μετά το πέρας των τριών ωρών επίδρασης των δυο ουσιών, ακολούθησε όπως έχει αναλυτικά αναφερθεί εκχύλιση των φύλλων, ανάλυση με SDS-PAGE 12% ακρυλαμίδα, μεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Western Blot) και προσπάθεια ανοσοανίχνευσης με ειδικό αντίσωμα. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην Εικόνα 10. Παρατηρούμε την εμφάνιση δυο ζωνών \*. Για την καλύτερη σύγκριση των αποτελεσμάτων αναλύθηκε στο ίδιο πήκτωμα εκχύλισμα βακτηρίων.

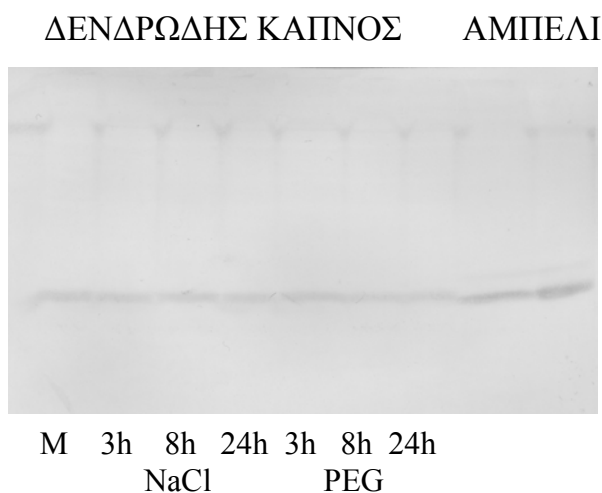


**Εικόνα 10.** Πρωτεϊνικές ζώνες ωσμοτίνης από φύλλα αμπελιού που υπέστησαν ωσμωτική καταπόνηση με PEG και NaCl και από εκχύλισμα βακτηρίων που υπερεκφράζουν την ωσμοτίνη του αμπελιού (Βουτσινά et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στα φίλτρα έγινε ανίχνευση της ωσμοτίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Η ωσμοτίνη ανιχνεύθηκε και στις δυο επεμβάσεις, εντονότερα όμως εμφανίζεται στην περίπτωση του βακτηριακού εκχυλίσματος. Συγκρίνοντας την έκφραση της ωσμοτίνης στα δυο δείγματα που υπέστησαν ωσμωτική καταπόνηση με NaCl και PEG παρατηρούμε ότι είναι μεγαλύτερη στο NaCl.

### **Γ5. Επίδραση αλατιού (NaCl) και PEG (Poly-Ethanol-Glycole) σε φύλλα δενδρώδους καπνού (*Nicotiana glauca*)**

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 250 mM NaCl και 27 % PEG σε τελικό όγκο 100 mL. Τα φύλλα αφέθηκαν υπό την επίδραση των δύο ουσιών για τρεις διαφορετικούς χρόνους 3, 8 και 24 ώρες, ώστε να παρατηρηθούν χρονικά υπάρχουσες μεταβολές. Αφού πραγματοποιήθηκε η επίδρασή τους, ακολούθησε όπως έχει αναλυτικά αναφερθεί εκχύλιση των φύλλων, ανάλυση με SDS-PAGE 12% ακρυλαμίδης, μεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Western Blot) και προσπάθεια ανοσοανίχνευσης με ειδικό αντίσωμα. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην Εικόνα 11 όπου παρουσιάζεται ανάπτυξη μίας ζώνης σε κάθε επέμβαση. Για την καλύτερη σύγκριση των αποτελεσμάτων αναλύθηκαν στο ίδιο πήκτωμα και τα δυο δείγματα του αμπελιού.



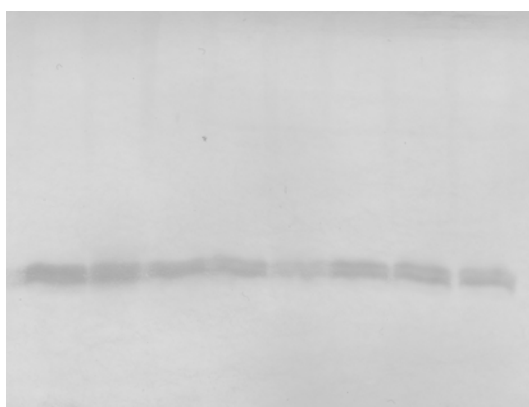
**Εικόνα 11.** Πρωτεϊνικές ζώνες ωσμωτικής από φύλλα δενδρώδους καπνού και αμπελιού που υπέστησαν ωσμωτική καταπόνηση. Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στα φίλτρα έγινε ανίχνευση της ωσμωτικής με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Από την παραπάνω μεμβράνη συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές της έκφρασης της ωσμωτικής στις επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν.

### **Γ6. Επίδραση αλατιού (NaCl), Σακχαρόζης και Ethephon σε φύλλα δενδρώδους καπνού**

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δυο συγκεντρώσεις αλατιού (NaCl) 50 mM και 200 mM, δυο συγκεντρώσεις Σακχαρόζης 3% και 6,8% και δυο συγκεντρώσεις Etherphon 1 mM και 3 mM σε τελικό όγκο 100 mL. Τα φύλλα αφέθηκαν υπό την επίδραση των ουσιών για δυο διαφορετικούς χρόνους 24 και 72 ώρες. Αφού πραγματοποιήθηκε η επίδρασή τους, ακολούθησε όπως έχει αναλυτικά αναφερθεί εκχύλιση των φύλλων, ανάλυση με SDS-PAGE 12% ακρυλαμίδης, μεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Western Blot) και προσπάθεια ανοσοανίχνευσης με ειδικό αντίσωμα. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην Εικόνα 12. και Εικόνα 13 όπου παρουσιάζεται ανάπτυξη δυο ζωνών σε κάθε επέμβαση.

#### 24 ΩΡΕΣ



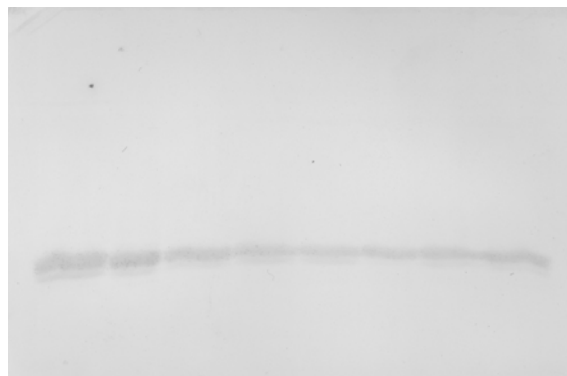
M 50mM 200mM 3% 6,8% M 1mM 3mM  
NaCl ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ ETHERPHON

**Εικόνα 12.** Πρωτεϊνικές ζώνες της ωσμοτίνης από φύλλα δενδρώδους καπνού που υπέστησαν ωσμωτική καταπόνηση για 24 ώρες. Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στα φίλτρα έγινε ανίχνευση της ωσμοτίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Στις 24 ώρες επίδρασης των ουσιών εμφανίζονται δυο πρωτεϊνικές ζώνες της ωσμοτίνης με το ίδιο περίπου μέγεθος. Στις δυο επεμβάσεις του NaCl η έκφραση της ωσμοτίνης δεν παρουσιάζει μεγάλη μεταβολή σε σχέση με το μάρτυρα, σε αντίθεση τις επεμβάσεις της σακχαρόζης που εμφανίζουν σημαντική μείωση. Οι επεμβάσεις με Etherphon δεν παρουσιάζουν μεταβολές σε σχέση με το μάρτυρα. Γενικότερα μπορούμε να πούμε πως και το NaCl και

η Σακχαρόζη και το Ethephon επάγουν την ωσμωτίνη με μικρότερη επαγωγή στη περίπτωση της σακχαρόζης.

72 ΩΡΕΣ



M 50mM 200mM 3% 6,8% M 1mM 3mM  
NaCl ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ ΕΤΗΕΡΦΟΝ

**Εικόνα 13.** Πρωτεϊνικές ζώνες της ωσμωτίνης από φύλλα δενδρώδους καπνού που υπέστησαν ωσμωτική καταπόνηση για 72 ώρες. Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στα φίλτρα έγινε ανίχνευση της ωσμωτίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Στις 72 ώρες επίδρασης των ουσιών εμφανίζονται επίσης δυο πρωτεϊνικές ζώνες της ωσμωτίνης με το ίδιο περίπου μέγεθος. Στα δείγματα του NaCl η έκφραση της ωσμωτίνης είναι μικρότερη από το μάρτυρα ενώ εντονότερη μείωση εμφανίζεται στα δύο επόμενα δείγματα της σακχαρόζης. Στις επεμβάσεις με Ethephon παρατηρούμε αύξηση της έκφρασης της ωσμωτίνης σε σχέση με τον μάρτυρα με εντονότερη αύξηση στην επέμβαση με 3 mM Ethephon.

### **Γ7. Ενεργότητα του ενζύμου της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH)**

Η ενεργότητα του ενζύμου της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) προσδιορίστηκε διότι δρα στην αφομοίωση ή την επαναφομοίωση της αμμωνίας ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες καταπόνησης (υψηλή θερμοκρασία, έλλειψη νερού, αλατότητα, μολύνσεις από παθογόνα).

Η ενζυμική ενεργότητα της GDH προσδιορίστηκε μέσω της αμινωτικής αντίδρασης και τα αποτελέσματα των επεμβάσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

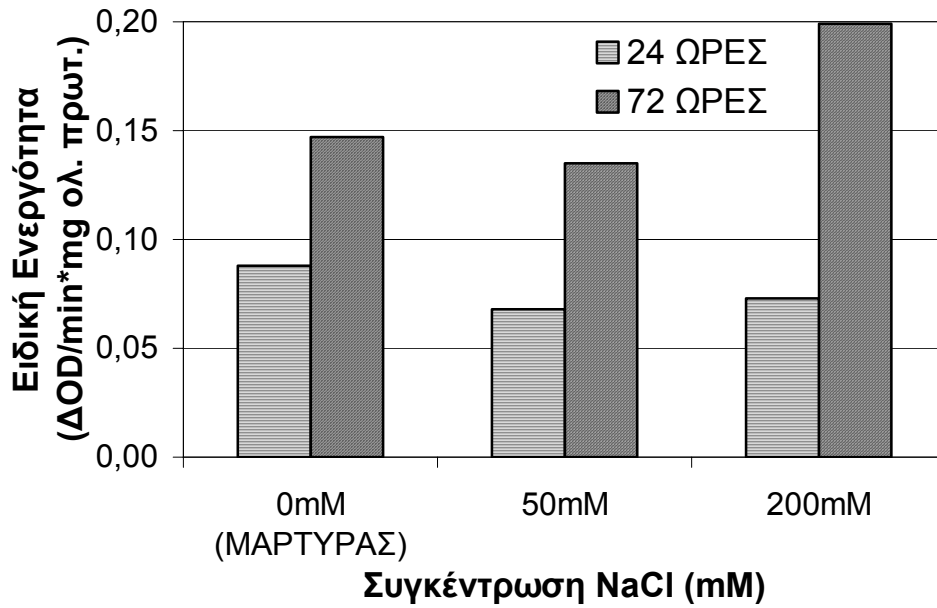
Στα δείγματα που αφέθηκαν 24 ώρες υπό την επίδραση των παραπάνω ουσιών παρατηρούμε μια μείωση της Ειδικής Ενεργότητας σε όλες τις επεμβάσεις συγκριτικά με τον μάρτυρα. Η μείωση είναι εντονότερη για τις επεμβάσεις με σακχαρόζη, λιγότερο γι' αυτές με NaCl και ακόμα λιγότερη για τις επεμβάσεις με Ethephon.

Για τα δείγματα που αφέθηκαν 72 ώρες υπό την επίδραση των παραπάνω ουσιών παρατηρούμε επίσης μείωση της Ειδικής Ενεργότητας για τις επεμβάσεις με NaCl και σακχαρόζη ενώ αύξηση παρατηρείται στην Ειδική Ενεργότητα των επεμβάσεων του Ethephon.

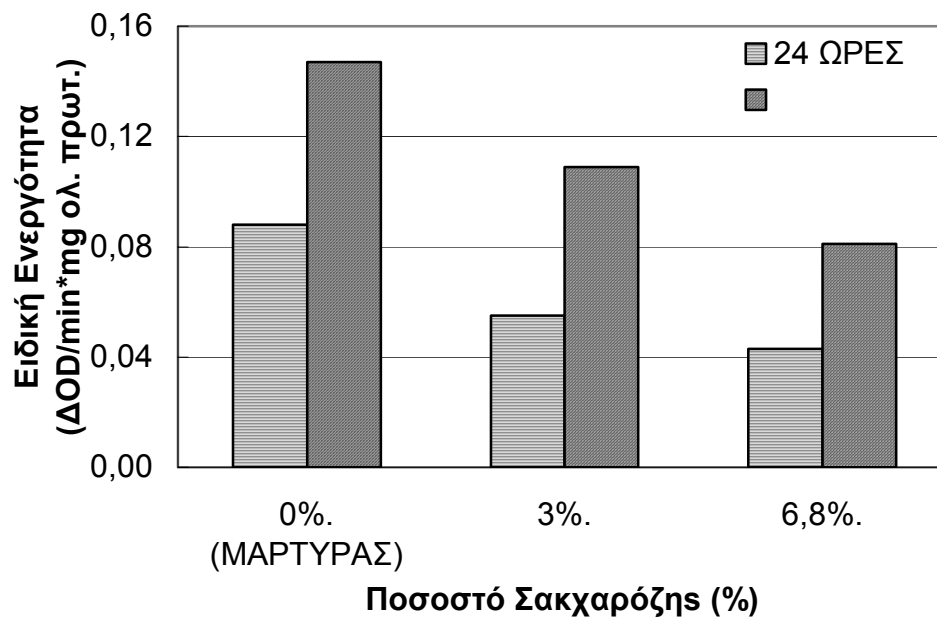
**Πίνακας 3.** Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της GDH ανά επέμβαση στα φύλλα του δενδρώδους καπνού (*Nicotiana glauca*).

| ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ | ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ<br>OD/mL | ΟΛΙΚΗ<br>ΠΡΩΤΕΪΝΗ<br>mg/mL | ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ<br>GDH<br>OD/min*50 $\mu$ L | ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ<br>GDH<br>OD/min*mL | ΕΙΔΙΚΗ<br>ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ<br>$\Delta$ OD/min*mg<br>πρωτ. | $\mu$ mol<br>NADH/<br>min*mg | ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ<br>ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ<br>$\mu$ molNADH/<br>min*g φwt.<br>ιστού |       |
|------------|---------------------|----------------------------|--|--------------------------------|---|------------------------------|---|-------|
| 24 ΩΡΕΣ    | M                   | 0,276                      | 0,88                                   | 0,0039                         | 0,078   | 0,088                        | 0,014   | 0,050 |
|            | 50mM NaCl           | 0,306                      | 0,98                                   | 0,0034                         | 0,068   | 0,069                        | 0,011   | 0,044 |
|            | 200mM NaCl          | 0,307                      | 0,98                                   | 0,0036                         | 0,072   | 0,073                        | 0,012   | 0,046 |
|            | 3% ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ        | 0,320                      | 1,02                                   | 0,0028                         | 0,056   | 0,055                        | 0,009   | 0,036 |
|            | 6,8% ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ      | 0,319                      | 1,02                                   | 0,0022                         | 0,044   | 0,043                        | 0,007   | 0,028 |
|            | M                   | 0,272                      | 0,87                                   | 0,0040                         | 0,080   | 0,092                        | 0,015   | 0,051 |
|            | 1mM Ethephon        | 0,325                      | 1,04                                   | 0,0044                         | 0,088   | 0,085                        | 0,014   | 0,056 |
|            | 3mM Ethephon        | 0,407                      | 1,30                                   | 0,0048                         | 0,096   | 0,074                        | 0,012   | 0,061 |
| 72 ΩΡΕΣ    | M                   | 0,162                      | 0,52                                   | 0,0038                         | 0,076   | 0,147                        | 0,023   | 0,049 |
|            | 50mM NaCl           | 0,181                      | 0,58                                   | 0,0039                         | 0,078   | 0,135                        | 0,022   | 0,050 |
|            | 200mM NaCl          | 0,132                      | 0,42                                   | 0,0042                         | 0,084   | 0,199                        | 0,032   | 0,054 |
|            | 3% ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ        | 0,200                      | 0,64                                   | 0,0035                         | 0,070   | 0,109                        | 0,018   | 0,045 |
|            | 6,8% ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ      | 0,246                      | 0,79                                   | 0,0032                         | 0,064   | 0,081                        | 0,013   | 0,041 |
|            | M                   | 0,185                      | 0,59                                   | 0,0033                         | 0,066   | 0,111                        | 0,018   | 0,042 |
|            | 1mM Ethephon        | 0,191                      | 0,61                                   | 0,0054                         | 0,108   | 0,177                        | 0,028   | 0,069 |
|            | 3mM Ethephon        | 0,179                      | 0,57                                   | 0,0041                         | 0,082   | 0,143                        | 0,023   | 0,052 |

Τα αποτελέσματα της Ειδικής Ενεργότητας εμφανίζονται στα παρακάτω διαγράμματα για κάθε επέμβαση χωριστά (NaCl, σακχαρόζη και Ethrel).

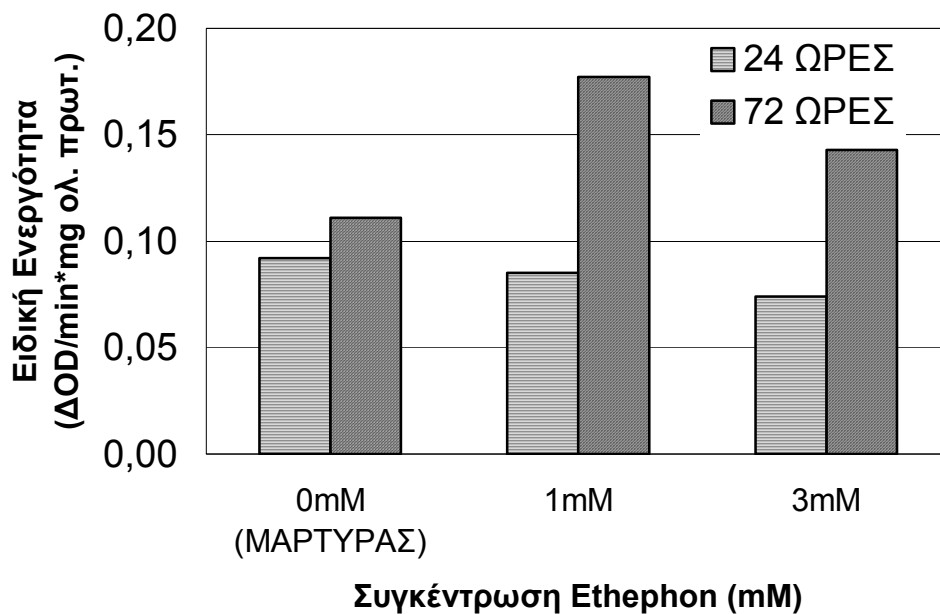


**Εικόνα 14.** Μεταβολή των τιμών της Ειδικής Ενεργότητας ( $\Delta\text{OD}/\text{min} \cdot \text{mg}$  ολ. πρωτεΐνης) των φύλλων του δενδρώδους καπνού υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl για τις δυο χρονικές επεμβάσεις (24 και 72 ώρες).



**Εικόνα 15.** Μεταβολή των τιμών της Ειδικής Ενεργότητας ( $\Delta\text{OD}/\text{min} \cdot \text{mg}$  ολ. πρωτεΐνης) των φύλλων του δενδρώδους καπνού υπό την επίδραση διαφορετικών ποσοστών Σακχαρόζης για τις δυο χρονικές επεμβάσεις (24 και 72 ώρες).





**Εικόνα 16.** Μεταβολή των τιμών της Ειδικής Ενεργότητας ( $\Delta\text{OD}/\text{min} \cdot \text{mg}$  ολ. πρωτεΐνης) των φύλλων του δενδρώδους καπνού υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Ethephon για τις δυο χρονικές επεμβάσεις (24 και 72 ώρες).

## Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εργασία αυτή έγινε με σκοπό τον ανοσοχαρακτηρισμό και την μελέτη της έκφρασης της ωσμοτίνης στο φυτικό είδος του δενδρώδους καπνού (*Nicotiana glauca*). Η ωσμοτίνη είναι μια πρωτεΐνη η οποία επάγεται κυρίως από περιβαλλοντικές καταπονήσεις (stress) αλλά και από προσβολές μυκήτων κατά τη βιβλιογραφία. Για την ανίχνευση της ωσμοτίνης χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο αντίσωμα από κουνέλι το οποίο αναγνώριζε την αντίστοιχη ωσμοτίνη του αμπελιού. Το γεγονός ότι το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει την ωσμοτίνη του δενδρώδους καπνού (*Nicotiana glauca*) υποδηλώνει την συγγένεια των πρωτεϊνών των δυο φυτικών ειδών. Γενικά οι ωσμοτίνες παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομολογίας στα περισσότερα μονοετή φυτά που έχουν μελετηθεί.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η ανοσοανίχνευση της ωσμοτίνης στον δενδρώδη καπνό, πάντα με τη βοήθεια του αντισώματος της αμπέλου και βρέθηκε η κατάλληλη συγκέντρωση του αντισώματος για την άριστη έκφραση της, ενώ έπειτα προσδιορίστηκε η ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που πρέπει να αναλυθεί με SDS-PAGE 12% ακρυλαμίδης.

Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων διαλυμάτων PEG (Polyethylene-glycol), αλατιού (NaCl), σακχαρόζης και Ethephon σε φύλλα δενδρώδους καπνού, φαίνεται ότι επηρέασαν την επαγωγή της πρωτεΐνης ωσμοτίνης άλλοτε θετικά και άλλοτε αρνητικά. Πρέπει να αναφερθεί ότι σε όλες τις επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν έγινε ανίχνευση της ωσμοτίνης. Εντονότερη έκφραση της ωσμοτίνης φαίνεται να επιτυγχάνεται στην περίπτωση της επίδρασης του Ethephon (3 mM), και ακολουθούν οι επεμβάσεις με NaCl και PEG. Στην περίπτωση της σακχαρόζης εμφανίζεται η μικρότερη επαγωγή της ωσμοτίνης σε σχέση με τις άλλες επεμβάσεις.

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abad, L. R., D'Urzo, M. P., Liu, D., Narasimhan, M. L., Reuveni, M., Zhu, J. K., Niu, X., Singh, N. K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., 1996. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science* 118: 11-23.
- Anzlovar, S., Dermastia, M., 2003. The comparative analysis of osmotins and osmotin-like PR-5 proteins. *Plant Biol.* 5: 116-124.
- Βουτσινά, Α., Πριμηκόριος, Ν. Ι., Λουλακάκης, Κ. Α., 2005. Παραγωγή αντισώματος εναντίον της ωσμοτίνης του αμπελιού, (αδιμοσίευτο).
- Γαλάτης, Β., Γανωτάκης, Δ., Γκάνη-Σπυροπούλου, Κ., Καραμπουρνιώτης, Γ., Κοτζαμπάσης, Κ., Κωνσταντινίδου, Ε. Ι., Μανέτας, Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ. Α., 2003. Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον.
- Loulakakis, K. A., 1997. Genomic organization expression of an osmotin-like gene in *Vitis vinifera* L. *Vitis* 36(3), 157-158.
- Loulakakis, K. A. and K. A. Roubelakis-Angelakis, 1992. Ammonium-induced increases in NAD(H)-glutamate dehydrogenase activity is caused by de novo synthesis of the  $\alpha$ -subunit. *Planta* 187: 322-327.
- Loulakakis, K. A., 1997. Nucleotide sequence of a *Vitis vinifera* L. cDNA (Accession No. Y10992) encoding for osmotin-like protein. *Plant Physiol.* 113: 1464.
- Λουλακάκης, Κ. Α., 2000. Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας Φυτών. Σ.ΤΕ.Γ. Τ.Ε.Ι. Κρήτης, Ηράκλειο.
- Λουλακάκης, Κ. Α., 2000. Σημειώσεις Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών. Σ.ΤΕ.Γ. Τ.Ε.Ι. Κρήτης, Ηράκλειο.
- Parida, A. K., Das, A. B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:324-349.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003. Plant response to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.

- Zhu, B., Chen, T. H. H., Li, P. H., 1995. Activation of two osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. *Plant Physiology*. 108: 929-937.