

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΚΑΙ ΜΟΛΥΒΔΟΥ ΣΤΗΝ  
ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΚΑΙ  
ΤΗΣ ΩΣΜΩΤΙΝΗΣ ΣΕ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ  
*NICOTIANA GLAUCA* ΚΑΙ *NICOTIANA TABACUM*

ΜΑΣΟΥΡΑΚΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>Σελ.</b>
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	<b>2</b>
<b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
<b>A1. Γενικά χαρακτηριστικά βαρέων μετάλλων</b>	<b>6</b>
A1.1. Περιγραφή μολύβδου (Pb) και ψευδαργύρου (Zn)	8
<b>A2. Φυτοεξυγίανση</b>	<b>10</b>
<b>A3. Βοτανικά χαρακτηριστικά των φυτών <i>Nicotiana glauca</i> και <i>Nicotiana tabacum</i></b>	<b>13</b>
A3.1. <i>Nicotiana glauca</i>	13
A3.2. <i>Nicotiana tabacum</i>	14
<b>A4. Ανθεκτικότητα των φυτών στα βαρέα μέταλλα</b>	<b>16</b>
<b>A5. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στα βαρέα μέταλλα</b>	<b>18</b>
A5.1. Έλεγχος στην πλασματική μεμβράνη	18
A5.2. Χήλωση	19
A5.2.1. Φυτοχηλατίνες (Phytochelatins)	19
A5.2.2. Μεταλλοθειονίνες (Metallothioneins)	21
A5.3. Διαμερισματοποίηση στο χυμοτόπιο	23
<b>A6. Αντίδραση των φυτών στα βαρέα μέταλλα</b>	<b>25</b>
A6.1. Γλουταμική αφυδρογονάση (GDH)	26
A6.2. Ωσμωτίνη	29
<b>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
<b>B1. Φυτικό υλικό – Βαρέα μέταλλα</b>	<b>32</b>
<b>B2. Παρασκευή θρεπτικού MS για σπόρους – Ιστοκαλλιέργεια σπόρων</b>	<b>32</b>

<b>B3. Εκχύλιση πρωτεϊνών απο φυτικούς ιστούς</b>	<b>34</b>
<b>B4. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης</b>	<b>35</b>
<b>B5. Μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου GDH</b>	<b>36</b>
<b>B6. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)</b>	<b>36</b>
<b>B7. Χρωματισμός πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R-250</b>	<b>38</b>
<b>B8. Μεταφορά κατα Western Blot – Ανοσοανίχνευση</b>	<b>39</b>

## **Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

<b>Γ1. Επίδραση του ψευδαργύρου (Zn) και του μολύβδου (Pb) σε μορφολογικά χαρακτηριστικά φυτών <i>Nicotiana glauca</i></b>	<b>41</b>
<b>Γ2. Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης στις επεμβάσεις ψευδαργύρου (Zn) και μολύβδου (Pb) σε ιστούς <i>Nicotiana glauca</i></b>	<b>48</b>
<b>Γ3. Επίδραση ψευδαργύρου (Zn) και μολύβδου (Pb) στην έκφραση της GDH και της ωσμωτίνης σε φυτά <i>Nicotiana glauca</i></b>	<b>50</b>
Γ3.1. Γλουταμική αφυδρογονάση (GDH)	51
Γ3.2. Ωσμωτίνη	53
<b>Γ4. Επίδραση του ψευδαργύρου (Zn) και του μολύβδου (Pb) σε μορφολογικά χαρακτηριστικά φυτών <i>Nicotiana tabacum</i></b>	<b>54</b>
<b>Γ5. Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης στις επεμβάσεις ψευδαργύρου (Zn) και μολύβδου (Pb) σε ιστούς <i>Nicotiana tabacum</i></b>	<b>60</b>
<b>Γ6. Επίδραση ψευδαργύρου (Zn) και μολύβδου (Pb) στην έκφραση της GDH και της ωσμωτίνης σε φυτά <i>Nicotiana tabacum</i></b>	<b>62</b>
Γ6.1. Γλουταμική αφυδρογονάση (GDH)	63
Γ6.2. Ωσμωτίνη	64

**Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** **66**

**Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ** **68**

**ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

## Προλογος

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια ερευνητικού προγράμματος του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών της σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης με τίτλο <<Φυτοεξυγίανση εδαφών ρυπασμένων με βαρέα μέταλλα απο διασταλάζοντα υγρά χωματερών>> που αποτελεί υποέργο του έργου <<ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ-ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ: Ενίσχυση ερευνητικών ομάδων του Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ>> (ΕΠΕΑΕΚ II, ΕΝΕΡΓΕΙΑ 2.6.1, ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΠΡΑΞΕΩΝ 2.6.1.ιδ.), κατά το χρονικό διάστημα 2005-2006, και στοχεύει στη δοκιμή και αξιοποίηση των πλούσιων γενετικών πόρων της ελληνικής χλωρίδας για τη βιοεξυγίανση ρυπασμένων με βαρέα μέταλλα εδαφών, με πιλοτική εφαρμογή στα εδάφη της χωματερής Πέρα Γαλήνων του Νομού Ηρακλείου. Το Πρόγραμμα περιλαμβάνει:

1. Την εκτίμηση του μεγέθους της ρύπανσης στους χώρους της χωματερής.
2. Την επιλογή κατάλληλων για βιοεξυγίανση φυτικών γενοτύπων και τη δοκιμή τους σε υποστρώματα με βαρέα μέταλλα: α) *in vitro*, β) σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκηπίου και γ) στις πραγματικές συνθήκες της χωματερής.
3. Την παρακολούθηση της απορρύπανσης των υποστρωμάτων, της συσσώρευσης βαρέων μετάλλων στους φυτικούς ιστούς και τη συσχέτισή τους με μεταβολές μακροσκοπικών και βιοχημικών παραμέτρων των φυτών.
4. Τη γονιδιακή προσέγγιση του φαινομένου της βιοσυσσώρευσης.

Βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης του ψευδαργύρου και του μολύβδου στην έκφραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης και της ωσμωνίνης σε *in vitro* καλλιέργειες *Nicotiana glauca* και *Nicotiana tabacum*. Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται πληροφορίες για τα βαρέα μέταλλα για την τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης καθώς και για τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των φυτών στα βαρέα μέταλλα. Επίσης παραθέτονται στοιχεία για την επίδραση των βαρέων μετάλλων (Zn και Pb) στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των δύο φυτικών ειδών.

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

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά όλους τους συναδέλφους μου για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη συγγραφή και την διεξαγωγή του πειράματος, της πατούσας εργασίας.

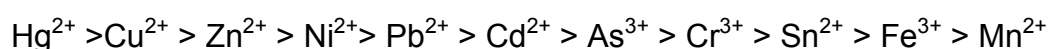
# Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Α1. Γενικά Χαρακτηριστικά βαρέων μετάλλων

Βαρέα ονομάζονται τα μέταλλα με ατομικό βάρος μεγαλύτερο από εκείνο του Fe ( $AB_{Fe}=56$ ) και πυκνότητα μεγαλύτερη από  $5 \text{ g/cm}^3$ . Υπάρχουν περίπου 40 στοιχεία (ψευδάργυρος Zn, χαλκός Cu, κάδμιο Cd, υδράργυρος Hg, νικέλιο Ni, μόλυβδος Pb) που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία.

Ορισμένα από τα βαρέα μέταλλα, είναι απαραίτητα σε μικρές συγκεντρώσεις για τη δράση των βιταμινών, τις διάφορες ζωτικές λειτουργίες καθώς και για την κανονική αύξηση και ανάπτυξη των φυτών εφόσον αυτά αποτελούν συστατικά πολλών ενζύμων και πρωτεϊνών (για παράδειγμα ο  $Zn^{2+}$  χρησιμεύει σαν συνένζυμο για αρκετά ένζυμα). Ωστόσο οι υψηλές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στο έδαφος μπορεί να οδηγήσουν σε τοξικά συμπτώματα και στην αναστολή της αύξησης των περισσότερων φυτών (Hall, 2002).

Η σειρά τοξικότητας τους είναι η εξής :



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

Οι κυριότεροι από τους μηχανισμούς τοξικής δράσης των βαρέων μετάλλων είναι:

- Δηλητηρίαση ενζυμικών συστημάτων.

Μέταλλο + ενεργή ομάδα ενζύμου  $\longrightarrow$  Σύμπλοκο μετάλλου πρωτεΐνης.

Ομάδα: αμινο ( $-NH_2$ ), ιμινο ( $-NH-$ ), σουλφυδρύλο ( $-SH$ ).

- Δημιουργία ανιόντων (π.χ. αρσενικά, αντιμονικά, σεληνιακά κ.τ.λ.) που δρουν ως “αντιμεταβλητές” παίρνοντας τη θέση των  $PO_4^{-3}$  ή  $NO_3^{-1}$ .
- Σχηματισμός ιζημάτων αντιδρώντας με φωσφορικά βιομόρια.
- Ένας μεγάλος αριθμός βαρέων μετάλλων επηρεάζει αρνητικά το φωτοσυνθετικό σύστημα των φυτών αναστέλλοντας τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στους χλωτοπλάστες.

- Αντιδρούν με τις μεμβράνες των κυττάρων, περιορίζοντας την δραστηριότητα τους (π.χ. τα μέταλλα Cd, Hg, Cu, Pb) έτσι ώστε να παρεμποδίζετε ή να διακόπτετε τελείως η μεταφορά Na, K Cl ή οργανικών μορίων δια μέσω της μεμβράνης.

Τα βαρέα μέταλλα αποτελούν ένα παγκόσμιο περιβαλλοντικό κίνδυνο γιατί σε αντίθεση με ορισμένους οργανικούς ρύπους δεν αποικοδομούνται αλλά καθιζάνουν ως δυσδιάλυτα άλατα ή σύμπλοκα, με αποτέλεσμα να παραμένουν στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα και να είναι τοξικά για τον βίοκοσμο. Οι κυριότερες πηγές ρύπανσης από βαρέα μέταλλα είναι φυσικές: (ηφαίστεια, πετρώματα) και ανθρωπογενείς (χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη γεωργία π.χ. μερικά γεωργικά φάρμακα και τα φωσφορικά λιπάσματα, καυσαέρια αυτοκινήτων, βιομηχανικά απόβλητα και ιδίως των μεταλλουργείων, χυτηρίων, εργοστασίων κ.τ.λ).

Βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης του ψευδαργύρου και του μολύβδου στην έκφραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης και της ωσμωτίνης σε *in vitro* καλλιέργειες *Nicotiana glauca* και *Nicotiana tabacum*. Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται πληροφορίες για τα βαρέα μέταλλα για την τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης καθώς και για τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των φυτών στα βαρέα μέταλλα. Επίσης παραθέτονται στοιχεία για την επίδραση των βαρέων μετάλλων (Zn και Pb) στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των δύο φυτικών ειδών.

### **A1.1. Περιγραφή μολύβδου (Pb) και Ψευδαργύρου (Zn)**

Ο Μόλυβδος και ο ψευδάργυρος αποτελούν δύο από τα πιο αμετάβλητα μέταλλα, με διάρκεια συγκράτησης τους από το έδαφος περίπου 150-5000 χρόνια. Είναι δύο από τα πιο τοξικά στοιχεία στο περιβάλλον, με περιορισμένη διαλυτότητα στα εδάφη και διαθεσιμότητα στα φυτά, λόγω της συμπλοκοποίησης τους με οργανική ύλη οπότε και κατακρημνίζονται ως ανθρακικά, υδροξειδία και φωσφορικά άλατα (Kambhampati et al., 2003).

**Μόλυβδος (Pb):** Ο μέσος όρος της περιεκτικότητας του εδάφους σε μόλυβδο εκτιμάται σε 15 mg/kg εδάφους.



Το κλάσμα του μολύβδου που είναι διαθέσιμο στις ρίζες των φυτών είναι μικρό αν αυτό συγκριθεί με την ολική συγκέντρωση του μολύβδου στο έδαφος. Αυτό συμβαίνει γιατί τα σωματίδια του μετάλλου που αιωρούνται στην ατμόσφαιρα, όταν φτάσουν στο έδαφος, προσροφώνται από τις επιφάνειες των αργιλούχων συστατικών και των οργανικών κολλοειδών και σχηματίζουν αδιάλυτα χημικά σύμπλοκα.

Είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση του μολύβδου στο φυτό παρατηρείται κυρίως στα φύλλα. Έτσι, τα λαχανικά που καταναλώνονται για το φύλλωμά τους μεταφέρουν περισσότερο μόλυβδο παρά οι καρποί. Έχει αναφερθεί ότι καθαρίζοντας (πλένοντας) την φυλλική επιφάνεια, 50% του αποθηκευμένου μολύβδου μπορεί να αφαιρεθεί.

Γνωστές ενώσεις μολύβδου είναι ο  $PbCO_3$  και το  $PbO$  ως λευκή σκόνη που χρησιμοποιούνται στη χρωματουργία καθώς και ο  $PbHAsO_4$  που χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο. Σημειώνεται ότι η επιβάρυνση της ατμόσφαιρας με μόλυβδο γίνεται κυρίως από την κατανάλωση της βενζίνης super (Ουζουνίδου, 1998).

**Ψευδάργυρος (Zn):** Η μέση τιμή της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου στο έδαφος δεν υπερβαίνει τα 70 mg/kg εδάφους.

Η περισσότερο διαδεδομένη μορφή ψευδαργύρου στη φύση είναι ο θειούχος ψευδάργυρος ( $ZnS$ ), γνωστός και ως σφαλερίτης. Ο ψευδάργυρος εμφανίζεται μόνο ως δισθενής και τα σουλφίδια του είναι αρκετά διαλυτά όπως και τα ανθρακικά του άλατα τα οποία σχηματίζονται στο έδαφος δευτερογενώς. Ο  $ZnS$  υπάρχει μεν στο εδαφικό διάλυμα όπου προσλαμβάνεται από τα φυτά, αλλά λόγω της διαλυτότητας του, δεσμεύεται εξίσου από τα ανθρακικά όταν αυτά είναι παρόντα. Ο ψευδάργυρος, όταν το pH είναι μικρότερο του 6,5, κινείται σχετικά εύκολα και πολλές φορές πολύ χαμηλότερα της ζώνης του ριζοστρώματος. Σε υψηλά pH ο ψευδάργυρος καθιζάνει υπό μορφή  $Zn(OH)_2$  και παρουσιάζει τη μικρότερη διαλυτότητα στην τιμή 9,5. Επειδή το  $Zn(OH)_2$  είναι ασταθές, μετατρέπεται σε  $ZnCO_3$  (σμιθσονίτης) ή και λιγότερο σε  $Zn_4(OH)_2SiO_2O_7 \cdot H_2O$  (ημιμορφίτη).

Την περιεκτικότητα του εδαφικού διαλύματος σε ψευδάργυρο ελέγχουν τα ορυκτά της αργίλου, τα οξειδία του σιδήρου και του αργιλίου και η οργανική ουσία. Από πειραματικά δεδομένα έχει γίνει γνωστό ότι από τους τρεις

παραπάνω εδαφολογικούς παράγοντες, η προσρόφηση του ψευδαργύρου από οξειδία και ένυδρα οξειδία σιδήρου, αργιλίου και μαγγανίου είναι ο πιο σημαντικός στα καλλιεργούμενα εδάφη. Φυσικά δεν θα πρέπει να ξεχνάμε ότι τα ανθρακικά άλατα, όπου υπάρχουν, ελέγχουν επίσης τη διαλυτότητα του ψευδαργύρου.

Επίσης ο  $ZnCO_3$  είναι πολλές φορές πιο ευδιάλυτος των εδαφικών σύμπλοκων ενώσεων του ψευδαργύρου. Η προσθήκη λιπάσματος  $(NH_4)_2SO_4$  επιδρά στη διαλυτότητα του ψευδαργύρου σε pH μεγαλύτερο του 6,5 σχηματίζοντας  $ZnSO_4$  σε συγκεντρώσεις  $SO_4^{2-}$  του επιπέδου  $10^{-3}$ . Η δημιουργία ενός τέτοιου συμπλόκου στο έδαφος εξηγεί την αυξημένη διαθεσιμότητα του ψευδαργύρου μετά από λίπανση. Σε αντίθεση με το θειικό ανιόν το φωσφορικό ανιόν μετά από λίπανση με  $(NH_4)_3PO_4$  είναι γνωστό ότι προκαλεί έλλειψη ψευδαργύρου στα φυτά.

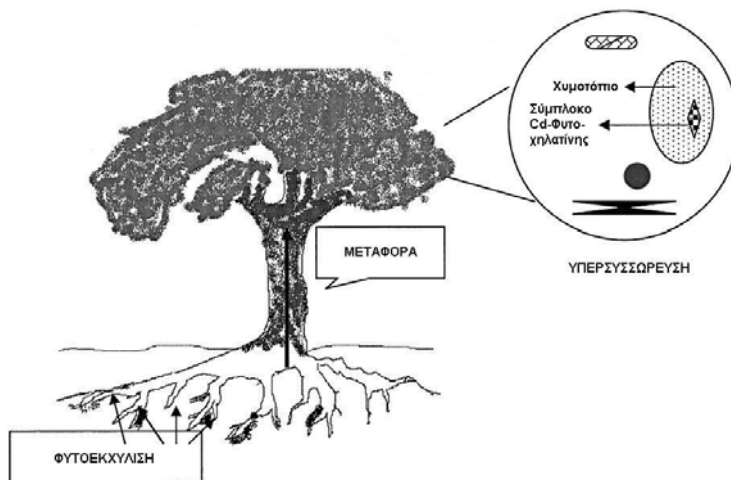
Τέλος, αναφέρεται ότι η περίσσεια ψευδαργύρου στην ατμόσφαιρα οφείλεται στην έκλυση του μετάλλου κατά την τήξη του, στις καύσεις του άνθρακα των καυσίμων και των ελαίων (McGrath and McCormack, 1999).

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις τα συγκεκριμένα μέταλλα, καθώς και πολλά άλλα ( Fe, Mn, Cu, Ni, Mo, Zn ), αποτελούν βασικά μικροστοιχεία για το μεταβολισμό των φυτών. Σε υψηλές συγκεντρώσεις όμως μπορεί να έχουν διάφορες αρνητικές επιδράσεις στα φυτά όπως (Kambhampati et al., 2003).

- Πρόκληση τοξικότητας
- Προβλήματα στη φωτοσύνθεση
- Βλάβες στις κυτοπλασμικές μεμβράνες
- Παρεμπόδιση ενζυμικών αντιδράσεων
- Βλάβες στο γενετικό υλικό ( DNA )
- Οξειδωση πρωτεϊνών

## A2. Φυτοεξυγίανση

Τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί οι ανθρώπινες δραστηριότητες που επιβαρύνουν το περιβάλλον με βαρέα μέταλλα. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η χρήση τεχνολογιών και μεθόδων για την εξυγίανση περιοχών, οι οποίες είναι μολυσμένες με τοξικά μέταλλα. Οι στρατηγικές της βιοεξυγίανσης έχουν προταθεί σαν ελκυστικές και εναλλακτικές, λόγω του χαμηλού κόστους τους και της υψηλής αποδοτικότητάς τους.



**Εικόνα 1.** Τα στάδια που εμπλέκονται στην Φυτοεξυγίανση από βαρέα μέταλλα (από Suresh and Ravishankar, 2004)

Η Φυτοεξυγίανση είναι μία τεχνολογία που βασίζεται στη χρήση φυτών για την εξυγίανση μολυσμένων εδαφών, επιφανειακών και υπόγειων υδάτων (Εικ. 1), η οποία εκμεταλλεύεται τη φυσική ιδιότητα πολλών φυτικών ειδών να απορροφούν, να συσσωρεύουν και σε μερικές περιπτώσεις να μεταβολίζουν συστατικά του εδάφους και του νερού. Μερικά φυτά έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις ακόμη και μέταλλα, που δεν τους είναι χρήσιμα για την ανάπτυξή τους. Η χρήση της φυτοεξυγίανσης ενδείκνυται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ρύπανσης του εδάφους και του νερού με βαρέα μέταλλα και ραδιενεργά στοιχεία αλλά και με οργανικές ενώσεις, όπως χλωριωμένους διαλύτες, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, εκρηκτικές ουσίες, απορρυπαντικά, θρεπτικά συστατικά (π.χ. φωσφορικά, νιτρικά), που προκαλούν ευτροφισμό επιφανειακών υδάτων.

Η επιτυχία της εξαρτάται κυρίως από τους παρακάτω παράγοντες :

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

Η τεχνολογία της περιλαμβάνει τις παρακάτω πέντε βασικές τεχνικές (Suresh and Ravishankar, 2004):

1. Φυτοεκχύλιση (phytoextraction): Είναι η απομάκρυνση μετάλλων από μολυσμένα εδάφη όπου το μέταλλο εξάγεται από το έδαφος και μετά μεταφέρεται και συγκεντρώνεται στα υπέργεια μέρη του φυτού, τα οποία συγκομίζονται και αποτεφρώνονται.
2. Ριζοδιύλιση (rhizofiltration): Είναι η διύλιση ρύπων από το νερό μέσω της προσρόφησης τους από τις ρίζες των φυτών.
3. Φυτομετατροπή (phytotransformation): Η απορρόφηση και ο μεταβολισμός των μετάλλων σε μη τοξικά από τα φυτά.
4. Φυτοδιεγερση (phytostimulation): Στηρίζεται στη διέγερση της μικροβιακής αποικοδόμησης των μετάλλων, που συντελείται από μικροοργανισμούς, που βρίσκονται στις ρίζες των φυτών.
5. Φυτοσταθεροποίηση (phytostabilization): Περιλαμβάνει τη συσσώρευση και την κατακρήμνιση των μετάλλων και χρησιμοποιείται για να μειώσει την κινητικότητα των μετάλλων στο έδαφος έτσι ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα ή η είσοδος τους στην τροφική αλυσίδα.

Οι τεχνολογίες φυτοεξυγίανσης έχουν αρχίσει να αναγνωρίζονται ως οικονομικώς αποδοτικές μέθοδοι για την εξυγίανση περιοχών μολυσμένων με

τοξικά μέταλλα, με μικρότερο κόστος των συμβατικών τεχνολογιών, όπως οι στρατηγικές εδαφολογικής αντικατάστασης και σταθεροποίησης.

Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η φυτοεξυγίανση είναι τα εξής:

- Καθαρίζει τα επιβαρημένα από τα βαρέα μέταλλα εδάφη.
- Η βιομάζα ανακυκλώνεται εύκολα και τα βαρέα μέταλλα εκχυλίζονται εύκολα.
- Μειώνεται το κόστος όσον αφορά την απομάκρυνση των μολυσμένων εδαφών.
- Μείωση της υδάτινης μόλυνσης από τα απορριπτόμενα μολυσμένα εδάφη.
- Μειώνει τις συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στον αέρα.

Η φυτοεξυγίανση έχει και ορισμένα μειονεκτήματα (Salt, 1998)

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

### **A3. Βοτανικά χαρακτηριστικά των φυτών *Nicotiana glauca* και *Nicotiana tabacum***

#### **A3.1. *Nicotiana glauca***

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

Είναι ένας βραχύβιος θάμνος ή ένα μικρό δέντρο που συχνά φτάνει τα 7,5 μέτρα στη φύση. Είναι χαρακτηριστική η εμφάνιση του εξαιτίας των μεγάλων ωοειδών γαλάζο -πράσινων φύλλων του. Αυτά είναι παχιά, ελαστικά,

απλά, λεία, γλαυκά με διακεκριμένες νευρώσεις και εναλλάσσονται γύρω από τον κορμό με μακρύ μίσχο, έχουν μήκος περίπου 17,5 cm και πλάτος 15 cm. Η ταξιανθία είναι φόβυς με κίτρινα σωληνοειδή άνθη, με πέντε πέταλα, τα οποία αναπτύσσονται στο τέλος της διακλάδωσης χωρίς φύλλα. Τα άνθη είναι άοσμα και έχουν μήκος  $1 \frac{3}{4}$  ίντσες και πλάτος  $\frac{1}{2}$  ίντσες. Οι αγωγοί των ανθέων έχουν πέντε λοβούς και κλείνουν κατά τη διάρκεια του απογεύματος. Αυτά ακολουθούνται από μια ωοειδής



σποριόκαψα που περιέχει πολυάριθμους καφέ σπόρους. Το φυτό μπορεί να ανθίζει όλο το χρόνο σε θερμά κλίματα, αλλά συνήθως ανθίζει Αύγουστο έως Οκτώβριο.

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

Το *Nicotiana glauca* χρησιμοποιείται κυρίως σε δημόσιους χώρους, πάρκα και δρόμους. Το φυτό έχει φαρμακευτική χρήση, αλλά επειδή όλα τα μέρη του είναι εξαιρετικά δηλητηριώδη, πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερη

προσοχή. Το *Nicotiana glauca* ενώ σχετίζεται με το *Nicotiana tabacum* δεν περιέχει νικοτίνη.

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

### **A3.2. *Nicotiana tabacum***

Το φυτό *Nicotiana tabacum* ανήκει στην ομάδα των δικοτυλήδων και στην οικογένεια Solanaceae. Είναι ετήσιο φυτό, θάμνος ή μικρό δέντρο από 0.90 έως 1.50 m ύψος ανάλογα με την ποικιλία. Τα φύλλα του είναι ελλειπτικά ή λογχοειδή, η ταξιανθία είναι βότρυς στο τέλος της διακλάδωσης, έχουν κυλινδρικό κάλυκα και είναι πρασινωπά ή κοκκινωπά στο πάνω μέρος. Τα φρούτα έχουν διαφορετικό σχήμα με σφαιρικούς σπόρους.



Είναι ευαίσθητο στη θερμοκρασία, στον αέρα, στην υψηλή υγρασία και στον τύπο του εδάφους. Η θερμοκρασία των 20 με 30 °C είναι η καλύτερη για την επαρκή ανάπτυξη των φυτών, η ατμοσφαιρική υγρασία 80 – 85 % και έδαφος χωρίς υψηλά επίπεδα αζώτου είναι επίσης απαραίτητο.

Είναι ιθαγενές της τροπικής και υποτροπικής Αμερικής αλλά τώρα καλλιεργείται εμπορικά παγκοσμίως. Άλλες ποικιλίες καλλιεργούνται σαν διακοσμητικά φυτά ή αναπτύσσονται σαν αγριόχορτα.

Κάθε μέρος του φυτού εκτός από τους σπόρους περιέχει νικοτίνη, αλλά η συγκέντρωση σχετίζεται με τις διαφορετικές λειτουργίες ανάλογα με το είδος, τον τύπο του εδάφους, την καλλιέργεια και τις συνθήκες του καιρού. Η συγκέντρωση της νικοτίνης αυξάνεται με την ηλικία του φυτού. Τα φύλλα του καπνού περιέχουν 2 – 8 % νικοτίνη συνδυασμένη σαν μηλικό ή κιτρικό. Η κατανομή της νικοτίνης σε ένα ώριμο φυτό σε άγρια ποικιλία είναι: 64% στα φύλλα, 18% στο βλαστό, 13% στις ρίζες και 5% στα άνθη. Ο καπνός χρησιμοποιείται σαν τοπικό αναλγητικό. Τα στεγνά φύλλα του χρησιμοποιούνται για μάσημα ή για κάπνισμα.

Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του Cd και του Ni (με επεμβάσεις των 20ppm και 25ppm αντίστοιχα) στο *N.tabacum* παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης των ριζικών τριχιδίων του φυτού στην παρουσία των μετάλλων, γεγονός που καθιστά τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις Cd και Ni τοξικές για τα ριζικά τριχίδια του φυτού (Boominathan and Doran, 2003).

Απο πείραμα έχει διαπιστωθεί πως η ανάπτυξη του φυτού μειώνεται, όταν αυτό καλλιεργείται σε εδάφη με υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου και ψευδαργύρου.

#### **A4. Ανθεκτικότητα των φυτών στα βαρέα μέταλλα**

Τα φυτά είναι κατά βάση ακίνητοι οργανισμοί και σε περιπτώσεις όπου το έδαφος είναι μολυσμένο από μέταλλα, οι ρίζες τους είναι το άμεσο σημείο επαφής με τα μεταλλικά ιόντα. Τα φυτά έχουν την ιδιότητα να προσλαμβάνουν τα βαρέα μέταλλα από το έδαφος μέσω των ριζών.

Ορισμένα από αυτά τα στοιχεία, όπως ο χαλκός (Cu) και ο ψευδάργυρος (Zn), είναι απαραίτητα για την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Ωστόσο αυτά τα ίδια μέταλλα σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικά. Άλλα στοιχεία, όπως ο μόλυβδος (Pb) ο υδράργυρος (Hg) και το κάδμιο (Cd), τα οποία προσλαμβάνονται από το φυτό χωρίς να είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του, είναι τοξικά εξαιτίας της αντίδρασής τους με άτομα του θείου (S) και του αζώτου (N) σε πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων.

Για να διατηρηθούν οι συγκεντρώσεις των απαραίτητων μετάλλων μέσα σε φυσιολογικά επίπεδα και να ελαχιστοποιηθούν τα βλαβερά αποτελέσματα



των μη απαραίτητων μετάλλων, τα φυτά, όπως όλοι οι άλλοι οργανισμοί, έχουν αναπτύξει ομοιοστατικούς μηχανισμούς. Λόγω αυτών των μηχανισμών τα φυτά είναι ανθεκτικά στα βαρέα μέταλλα και έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν την πρόσληψη, συσσώρευση, κίνηση και αποτοξίνωση των μετάλλων. Τα κύρια συστατικά της ομοιόστασης των μετάλλων είναι οι διαδικασίες της μεταφοράς, της χήλωσης και της αντικατάστασης. Αυτές οι ρυθμιζόμενες δραστηριότητες εξασφαλίζουν την κατάλληλη κατανομή των ιοντικών μετάλλων σε κυτταρικό και οργανισμικό επίπεδο (Clemens, 2001).

Ανθεκτικότητα στα βαρέα μέταλλα μπορεί να προσδιοριστεί σαν την ικανότητα τους να επιβιώσουν σε ένα έδαφος το οποίο είναι τοξικό σε άλλα φυτά. Η ανθεκτικότητα είναι ευρέως διαδεδομένη. Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα φυτά μοιράζονται διάφορους κοινούς μηχανισμούς για την ανθεκτικότητα τους στα βαρέα μέταλλα. Μερικά φυτικά είδη και γενότυποι μπορούν να αναπτυχθούν σε εδάφη στα οποία περιέχονται απαγορευτικές για την ανάπτυξη συγκεντρώσεις μετάλλων. Αυτά τα φυτά ανήκουν σε μία εξειδικευμένη χλωρίδα που έχει αποικίσει σερπεντινικά εδάφη πλούσια σε νικέλιο (Ni) ή περιοχές ρυπασμένες με Zn από διαδικασίες εξόρυξης και επεξεργασίας. Τα φυτά αυτά μέσω της φυσικής επιλογής έχουν αυξημένα επίπεδα ανεκτικότητας στα βαρέα μέταλλα «υπερανεκτικότητα». Αυτή η ανεκτικότητα είναι ειδική για συγκεκριμένα μέταλλα (Zenk, 1996).

Ορισμένα φυτά δεν ανέχονται απλά υψηλά επίπεδα μετάλλων αλλά τα συσσωρεύουν σε τεράστιες ποσότητες στους βλαστούς, με αποτέλεσμα να τροποποιείται η γονιδιακή τους έκφραση από το ίδιο το μέταλλο. Κλασικό παράδειγμα είναι η *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), που συσσωρεύει Cd και Zn στους βλαστούς της. Περίπου 400 διαφορετικά φυτικά είδη που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες έχουν περιγραφεί ως υπερσυσσωρευτές. Οι υπερσυσσωρευτές αναφέρονται σε φυτά που είναι ικανά να συσσωρεύουν περισσότερο του 0,1% του ξηρού τους βάρους στοιχεία, όπως Ni, Co, Pb. Ο φαινότυπος του φυτού υπερσυσσωρευτή είναι η βάση της αρχής της φυτοεξυγίανσης (Zenk, 1996).

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

- Τύπος και συγκέντρωση του μετάλλου.

- Τύπος και είδος του φυτού.
- Ηλικία του φυτού.
- Ρυθμός και συνθήκες ανάπτυξης.
- Τύπος του εδάφους, καθώς φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του, όπως περιεκτικότητα σε οργανική ουσία και pH. (Cunninghaln et al., 1996).

Η ιδέα της φυτοεξυγίανσης με τη χρήση φυτών υπερσυσσωρευτών μετάλλων, για τον καθορισμό χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων που έχουν ρυπανθεί, αναπτύχθηκε μόλις την τελευταία 25ετία. Επειδή όμως οι περισσότεροι υπερσυσσωρευτές είναι μικρά φυτά και βραδείας ανάπτυξης, η δυνατότητα ευρείας χρήσης τους δυσχεραίνεται. Γι'αυτό έχει ενταθεί η μελέτη των βιοχημικών, φυσιολογικών και μοριακών μηχανισμών αντοχής, με απώτερο σκοπό τη μεταφορά γονιδίων αντοχής σε φυτά που παράγουν μεγαλύτερη βιομάζα.

## **A5. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στις βαρέα μέταλλα**

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στα βαρέα μέταλλα, που έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα, είναι:

- Ο έλεγχος στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης
- Η διαδικασία της χήλωσης και
- Η διαμερισματοποίηση στο χυμοτόπιο

### **A5.1. Έλεγχος στην πλασματική μεμβράνη**

Η πλασματική μεμβράνη των φυτών μπορεί να θεωρηθεί σαν την πρώτη ενεργή δομή η οποία είναι στόχος της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων. Η λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης ίσως επηρεάζεται ταχύτατα από τα βαρέα μέταλλα, όπως δείχνει η αυξημένη διαρροή από τα κύτταρα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων, ιδιαίτερος του Cu. Για παράδειγμα, αποδείχθηκε ότι ο Cu αλλά όχι ο Zn προκαλούσε αύξηση της εκροής του K από αποκομμένες ρίζες του *Agrostis capillaris*. Ομοίως άλλοι συμπέραναν ότι η ζημιά στην κυτταρική μεμβράνη, που αντιλαμβανόμαστε από εκροή ιόντων, ήταν η άμεση αιτία τοξικότητας Cu σε ρίζες του *Silene*

*vulgaris*, *Mimulus guttatus* και σιταριού. Τέτοια ζημιά μπορεί να προκληθεί με διάφορους μηχανισμούς στη μεμβράνη, όπως με την οξειδωση των σουλφυδρυλομάδων των κυστεϊνών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, την παρεμπόδιση ενζύμων κλειδιών της μεμβράνης (ΑΤΡάσες, αντλίες ιόντων) ή την αλλαγή στη σύσταση και ρευστότητα των λιπιδίων της, που επιδρούν άμεσα στη διαπερατότητά της (Hall, 2002).

Έτσι, η ανθεκτικότητα μπορεί να περιλαμβάνει την προστασία της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης από την ζημιά των βαρέων μετάλλων. Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να περιληφθεί στη διατήρηση της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης παρουσία βαρέων μετάλλων, είναι η αυξημένη επιδιόρθωση των μεμβρανών μετά τη ζημιά με την εμπλοκή των πρωτεϊνών που επάγονται από θερμική καταπόνηση ή των μεταλλοθειονίνων (πρωτεϊνών που δεσμεύουν μέταλλα και αναλύονται εκτενώς παρακάτω).

Εκτός της ανθεκτικότητας η μεμβράνη ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των μετάλλων, είτε εμποδίζοντας ή μειώνοντας την είσοδό τους στο κύτταρο ή μέσω μηχανισμών εκροής. Αρκετά από αυτά τα κατιόντα είναι απαραίτητα και έτσι ο πλήρης αποκλεισμός τους δεν είναι δυνατός. Η επιλεκτική εκροή θεωρείται περισσότερο ρεαλιστική. Στα βακτήρια τα περισσότερα συστήματα ανθεκτικότητας βασίζονται στην εξαρτώμενη από ενέργεια εκροή των τοξικών ιόντων. Φαίνεται πως η μεταβολική ποινή του να έχεις περισσότερο εξειδικευμένους μηχανισμούς πρόσληψης, και έτσι να περιορίζεις την είσοδο των τοξικών ιόντων, είναι μεγαλύτερη από το να έχει συστήματα εκροής.

## **A5.2. Χήλωση**

Χήλωση είναι η αντίδραση δημιουργίας συμπλόκου ενός μετάλλου με οργανική ουσία (χηλική ένωση). Η χημική ενεργότητα και η περιορισμένη διαλυτότητα των περισσότερων μεταλλικών ιόντων, απαιτεί σταθερή χήλωση από τη στιγμή που θα βρεθούν μέσα στο κύτταρο. Αυτό έχει αποδειχτεί σαφέστατα για την περίπτωση του χαλκού σε κύτταρα ζυμομύκητα. Αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα του ζυμομύκητα περιέχουν λιγότερο από ένα ελεύθερο άτομο Cu ανά κύτταρο. Χηλικές ενώσεις δεσμεύουν τα μεταλλικά

ιόντα ενδοκυτταρικά, συνεισφέροντας στη αποτοξίνωση του κυττάρου και ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση των μετάλλων στο κυτταρόπλασμα. Στα φυτά οι κυριότερες κατηγορίες των χηλικών ενώσεων των μετάλλων περιλαμβάνουν οργανικά οξέα και αμινοξέα, καθώς και πρωτεϊνικής φύσης μόρια (τις φυτοχηλατίνες και τις μεταλλοθειονίνες) (Clemens, 2001).

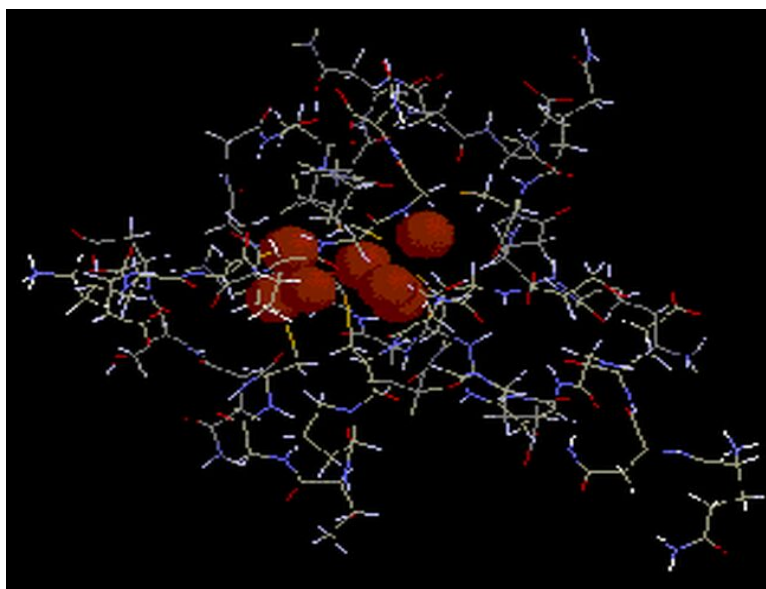
### **A5.2.1. Φυτοχηλατίνες (Phytochelatins)**

Οι φυτοχηλατίνες είναι μια ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες επάγονται στα φυτά όταν αυτά έλθουν αντιμέτωπα με καταπόνηση από βαρέα μέταλλα. Δρουν δεσμεύοντας τα ελεύθερα μεταλλικά ιόντα στο μόριό τους και τα μεταφέρουν στο χυμοτόπιο όπου δεν είναι πλέον τοξικά και απ' όπου τελικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το φυτό για την ανάπτυξη του, αν το μέταλλο αυτό είναι απαραίτητο στοιχείο, όπως ο Cu και ο Zn. Για να γίνει κατανοητός ο ρόλος των φυτοχηλατίνων στην αποτοξίνωση των βαρέων μετάλλων, πρέπει να κατανοηθούν τα χαρακτηριστικά τους όπως η δομή, η βιοσύνθεση, η λειτουργία, καθώς και η δομή του συμπλόκου φυτοχηλατίνης-μετάλλου.

Στη δομή των φυτοχηλατινών συμμετέχουν τρία αμινοξέα: γλουταμικό, κυστεΐνη και γλυκίνη. Η γενική δομή τους είναι η εξής  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  ( $n=2-11$ ). Τα μεταλλικά ιόντα δεσμεύονται από τις σουλφυδρυλικές ομάδες των κυστεϊνών (Εικ. 2). Οι φυτοχηλατίνες έχουν αναγνωριστεί σε αρκετές ομάδες φυτών και φωτοσυνθετικών οργανισμών, από τα γυμνόσπερμα και τα μονοκοτυλήδωνα έως τα δικοτυλήδωνα. Η βιοσύνθεση των φυτοχηλατίνων καταλύεται από το ένζυμο Συνθάση της φυτοχηλατίνης που χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα γλουταθειόνη (GSH). Τα βαρέα μέταλλα όχι μόνο επάγουν την έκφραση της Συνθάσης της φυτοχηλατίνης αλλά και ενεργοποιούν το ένζυμο (Clemens, 2001).

Αρκετές φυσιολογικές, βιοχημικές και γενετικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η GSH είναι το υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση της φυτοχηλατίνης. Μερικές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει ποικιλία φυτικών ειδών, μερικές φορές σαν άθικτα φυτά αλλά συχνά σε μορφή *in vitro* καλλιέργειας κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες με καλλιέργεια κυττάρων έχουν αποδείξει

ότι η επαγωγή της φυτοχηλατίνης παρουσία καδμίου συμπίπτει με μία παροδική μείωση των επιπέδων της GSH (Cobbett, 2002) .



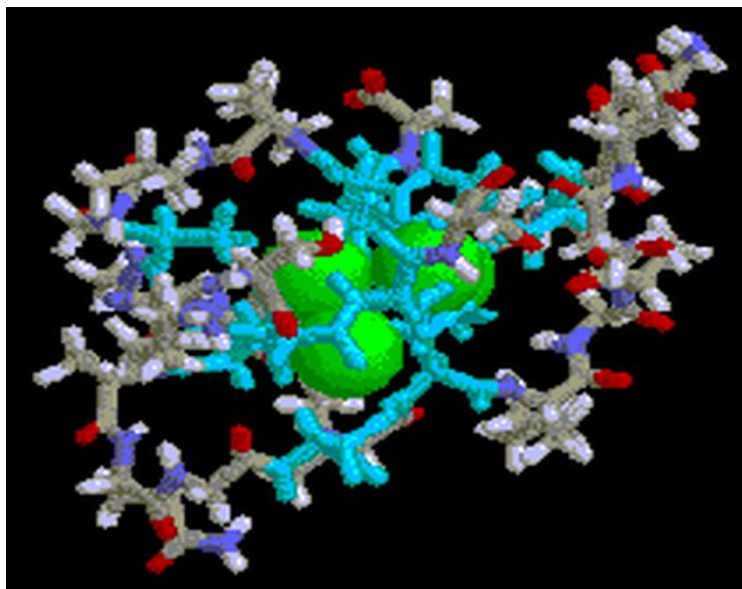
**Εικόνα 2.** Τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου φυτοχηλατίνης-μετάλλων.

Εκτός της αποτοξίνωσης οι φυτοχηλατίνες παίζουν σημαντικό ρόλο και στην ομοίωση των βαρέων μετάλλων στα φυτά, ρυθμίζοντας τη διαθεσιμότητα τους. Τα μεταλλικά ιόντα όπως ο Cu και ο Zn πρέπει να εισέλθουν στα κύτταρα για να γίνουν μέρος των καταλυτικών πρωτεϊνών. Οι φυτοχηλατίνες επομένως έχουν διπλό ρόλο. Από τη μία μεριά, πρέπει να συγκρατήσουν τα μεταλλικά ιόντα πολύ σφικτά να τα αδρανοποιήσουν και να τα αποθηκεύσουν στο χυμοτόπιο. Από την άλλη μεριά, πρέπει να μεταφέρουν τα απαραίτητα μέταλλα σε καινούργια συντιθέμενα αποένζυμα που απαιτούν Cu ή Zn (Zenk, 1996).

### **A5.2.2.Μεταλλοθειονίνες (Metallothioneins)**

Οι μεταλλοθειονίνες είναι πρωτεΐνες παρόμοιες με τις φυτοχηλατίνες σε αρκετά σημεία, συμπεριλαμβανομένου του υψηλού αριθμού υπολειμμάτων κυστεΐνης στο μόριό τους και του γεγονότος ότι και οι δύο είναι απαραίτητες για την αποτοξίνωση των βαρέων μετάλλων. Όλες οι μεταλλοθειονίνες έχουν τρία κοινά χαρακτηριστικά: α) χαμηλό μοριακό βάρος (6-7 kDa), β) ένα μεγάλο ποσοστό υπολειμμάτων κυστεΐνης και γ) υψηλή περιεκτικότητα σε μέταλλα που βρίσκονται δεσμευμένα από τις σουλφυδρυλικές ομάδες των κυστεϊνών

(Εικ. 3). Οι μεταλλοθειονίνες κατατάσσονται σε δύο κλάσεις, η πρώτη περιλαμβάνει τις μεταλλοθειονίνες των θηλαστικών και η δεύτερη όλες τις άλλες μεταλλοθειονίνες (Mejare and Bulow, 2001).



**Εικόνα 3.** Τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου μεταλλοθειονίνης-μετάλλων.

Οι μεταλλοθειονίνες της δεύτερης κλάσης, που έχουν ταυτοποιηθεί στα φυτά, μπορούν να ταξινομηθούν πραιτέρω βάση της ακολουθίας των αμινοξέων. Ο Robinson ήταν ο πρώτος που αναγνώρισε δυο τύπους φυτικών μεταλλοθειονίνων βασισμένες στη θέση των υπολειμάτων κυστεΐνης σε προβλέψιμες πρωτεΐνες. Απο τότε, ο αριθμός των χαρακτηρισμένων φυτικών μεταλλοθειονίνων έχει αυξηθεί δραματικά και αρκετές δεν συμπίπτουν με τους δύο τύπους. Ο Robinson κατασκεύασε ένα σύστημα το οποίο διαχωρίζει όλες τις γνωστές φυτικές μεταλλοθειονίνες σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων (Cobbett, 2002).

Οι μεταλλοθειονίνες του τύπου 1 περιέχουν ένα ολοκληρωμένο μοτίβο από έξι Cys-Χaa-Cys ( όπου το Χaa εκπροσωπεί ένα άλλο αμινοξύ) τα οποία είναι κατανομημένα εξίσου, μεταξύ δύο περιοχών. Στην πλειονότητα των μεταλλοθειονίνων του τύπου 1, οι δύο περιοχές χωρίζονται από περίπου σαράντα αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένου αρωματικών οξέων. Αυτό το μεγάλο διάστημα είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των μεταλλοθειονίνων των φυτών και αντιτίθενται με τις περισσότερες από τις μεταλλοθειονίνες, στις οποίες οι πλούσιες περιοχές σε κυστεΐνη χωρίζονται από ένα διάστημα από λιγότερο από δέκα αμινοξέα, όπου δεν συμπεριλαμβάνονται αρωματικά

υπολείμματα. Εν' τω μεταξύ οι μεταλλοθειονίνες του τύπου 1, αυτές από ποικίλα είδη της οικογένειας Brassicaceae (είδη των *Arabidopsis* και *Brassica*) έχουν ένα μεγάλο αριθμό διακριτών χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένου ενός πολύ μικρότερου διαστήματος μεταξύ των περιοχών που είναι πλούσιες σε κυστεΐνη και ένα επιπροσθέτως υπόλειμμα Cys (Cobbett, 2002)

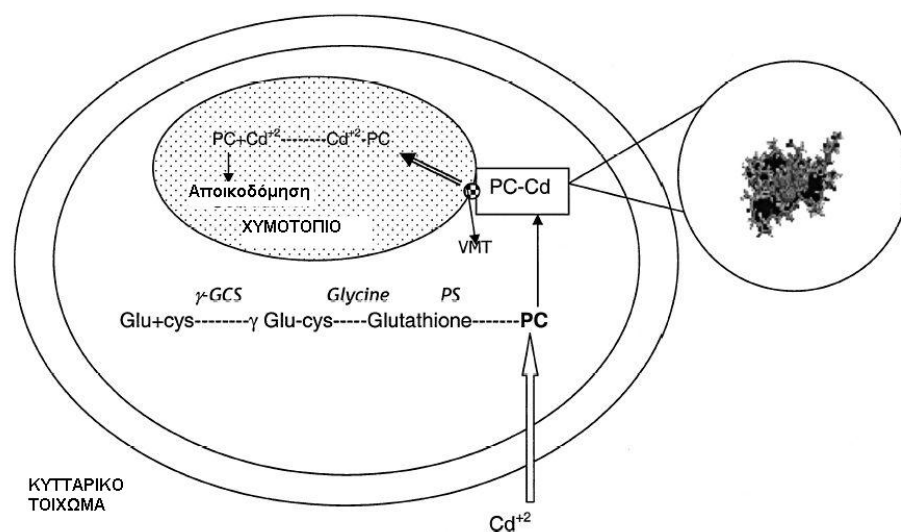
Οι μεταλλοθειονίνες του τύπου 2 περιέχουν επίσης δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη που χωρίζονται από ένα διάστημα από περίπου σαράντα υπολείμματα αμινοξέων. Ωστόσο, το πρώτο ζεύγος κυστεϊνών παρουσιάζεται σαν ένα μοτίβο Cys-Cys αμινοξέος στις θέσεις 3 και 4 αυτών των πρωτεϊνών. Ένα μοτίβο Cys-Gly-Gly-Cys παρουσιάζεται στο τέλος του αμινοτελικού άκρου στην πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή. Γενικά η ακολουθία της περιοχής του αμινοτελικού άκρου των μεταλλοθειονίνων του τύπου 2 είναι υψηλά συντηρημένη. Η περιοχή του C-τελικού περιέχει τρία μοτίβα Cys-Xaa-Cys. Το διάστημα που χωρίζει αυτές τις περιοχές στις μεταλλοθειονίνες του τύπου 2 είναι μεταβλητό μεταξύ των ειδών (Cobbett, 2002).

Οι μεταλλοθειονίνες του τύπου 3 περιέχουν μόνο τέσσερα υπολείμματα κυστεΐνης στην περιοχή του αμινοτελικού άκρου. Η συναινετική αλληλουχία για τα πρώτα τρία είναι Cys-Gly-Asn-Cys-Asp-Cys. Η τέταρτη κυστεΐνη δεν είναι μέρος ενός ζεύγους κυστεϊνών αλλά περιέχεται με ένα υψηλά συντηρημένο μοτίβο, Gln-Cys-Xaa-Lys-Lys-Gly. Τα έξι υπολείμματα κυστεΐνης στο C-τελικό άκρο της πλούσιας σε κυστεΐνη περιοχής arranged στο μοτίβο Cys-Xaa-Cys. Εξίσου καλά, στην πλειονότητα των τύπου 1 και 2 των μεταλλοθειονίνων των φυτών, οι δύο περιοχές χωρίζονται η μία από την άλλη από περίπου σαράντα υπολείμματα αμινοξέων (Cobbett, 2002)

Ο τύπος 4 διαφέρει από τις άλλες μεταλλοθειονίνες των φυτών γιατί έχει τρεις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη, κάθε περιοχή περιέχει 5 με 6 συντηρημένα υπολείμματα κυστεΐνης, τα οποία χωρίζονται από 10 έως 15 υπολείμματα. Οι περισσότερες κυστεΐνες παρουσιάζονται σαν το μοτίβο Cys-Xaa-Cys. Επίσης ένας μεγάλος αριθμός των μεταλλοθειονίνων του τύπου 4 δεν έχει αναγνωριστεί, συγκριτικά με αυτές των μονοκοτυλήδων οι τύπου 4 μεταλλοθειονίνες από τα δικοτυλήδονα περιέχουν επιπροσθέτως 8 με 10 αμινοξέα στην αμινοτελική περιοχή πριν από το πρώτο υπόλειμμα κυστεΐνης (Cobbett, 2002).

### A5.3. Διαμερισματοποίηση στο χυμοτόπιο

Η εκροή των μεταλλικών ιόντων στην πλασματική μεμβράνη ή η μεταφορά τους στο χυμοτόπιο είναι δύο τρόποι για να μειώσουν τα ενδογενή επίπεδα των τοξικών μετάλλων στο κυτταρόπλασμα και έτσι είναι σημαντικοί μηχανισμοί για την ανθεκτικότητα στα βαρέα μέταλλα. Ένα καλά τεκμηριωμένο παράδειγμα είναι η συσσώρευση Cd και φυτοχηλατινών στο χυμοτόπιο που πραγματοποιείται από ειδικές πρωτεΐνες μεταφορείς με την κατανάλωση ενέργειας (Hall, 2002).



**Εικόνα 4.** Το κάδμιο ενεργοποιεί την Συνθάση της φυτοχηλατίνης η οποία μετατρέπει τη γλουταθειόνη σε φυτοχηλατίνη. Στη συνέχεια τα μόρια των φυτοχηλατινών σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα του καδμίου δεσμεύοντάς τα και τα οδηγούν στο χυμοτόπιο (από Suresh and Ravishankar, 2004).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το χυμοτόπιο είναι η θέση για τη συσσώρευση και άλλων βαρέων μετάλλων, συμπεριλαμβανομένου του Zn και του Ni. Για παράδειγμα, μετά από επέμβαση με Zn σε μεριστωματικά κύτταρα της ρίζας του *Festuca rubra* παρατηρήθηκε αύξηση του σχηματισμού χυμοτοπίων ενώ μελέτες πρόσληψης με τη χρήση ραδιενεργού Zn σε φύλλα κριθαριού έδειξαν ότι η ταχεία διαμερισματοποίηση του Zn ήταν ένας σημαντικός μηχανισμός για την αντιμετώπιση των υψηλών εξωγενών επιπέδων του μετάλλου. Άλλες μελέτες σε φύλλα κριθαριού έδειξαν ότι αν και το Cd, ο Zn και το Mo βρέθηκαν κυρίως μέσα στο χυμοτόπιο, το Ni βρέθηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα.



Η ανάλυση των συστημάτων μεταφοράς του τονοπλάστη υποδεικνύει την ύπαρξη μηχανισμού ανθεκτικότητας σε επίπεδο χυμοτοπίου. Απομονωμένα κυστίδια τονοπλάστη από ρίζες δύο οικότυπων του ανθεκτικού στον Zn και του ευαίσθητου στον Zn του *Silene vulgaris*, έδειξαν ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις Zn, η μεταφορά του Zn ήταν 2,5 φορές υψηλότερη μέσα στα κυστίδια του ανθεκτικού οικότυπου σε σύγκριση με του ευαίσθητου, αποδεικνύοντας ότι ο τονοπλάστης παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσικά επιλεγμένη ανθεκτικότητα στον Zn. Χρησιμοποιώντας διασταυρώσεις φυτών, αυτή η αυξημένη πρόσληψη στα τονοπλαστικά συστήματα έδειξε να συσχετίζεται γενετικά με την ανθεκτικότητα στον Zn. Πρόσφατα απομονώθηκε ένα γονίδιο από την *Arabidopsis* που έχει στενή σχέση με το καλά χαρακτηρισμένο γονίδιο του μεταφορέα Zn των θηλαστικών (Hall, 2002).

## **A6. Αντίδραση των φυτών στα βαρέα μέταλλα**

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

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

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

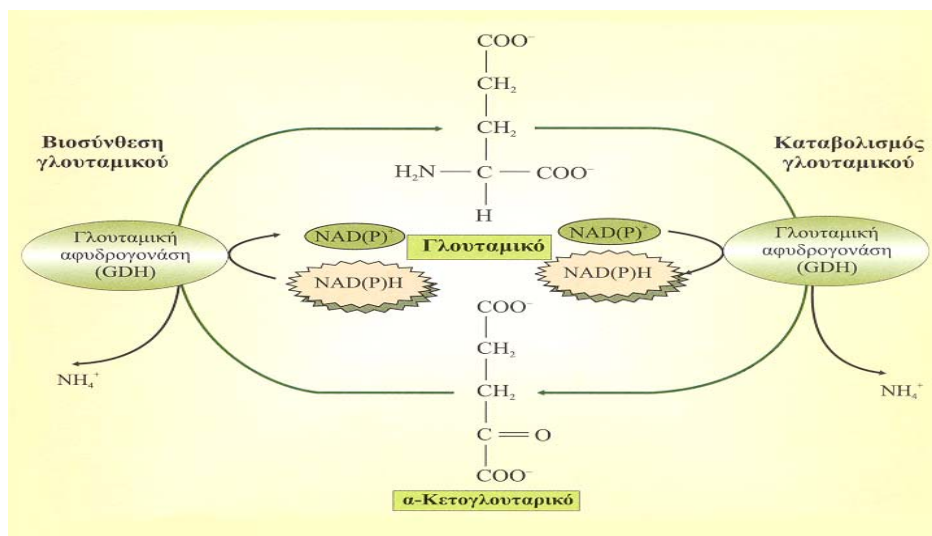
Μερικές από τις μεταβολές είναι αναμενόμενες και η ερμηνεία τους προφανής, όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε βλαστούς φυτών που υπόκεινται σε καταπονήσεις αλατότητας και ξηρασίας, όπου η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών ελαττώνεται εξαιτίας μειωμένης σύνθεσης, αλλά και αυξημένης πρωτεόλυσής τους. Αντιθέτως,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

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

### **A6.1. Γλουταμική αφυδρογονάση (GDH)**

Η γλουταμική αφυδρογονάση (Glutamate Dehydrogenase, GDH) βρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς και καταλύει την αφομοίωση των αμμωνιακών ιόντων και τη σύνθεση γλουταμικού, καθώς και την απαμίνωση του γλουταμικού οξέος προς α-κετογλουταρικό (Εικ.5).. Οι GDH είναι πολυμερικά αλλοστερικά ένζυμα που κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με τη μεταβολική εξειδίκευση και τη δομή τους. Οι τετραμερείς GDH είναι NAD-ένζυμα που καταβολίζουν το γλουταμικό. Οι εξαμερείς είναι NAD(P)H-ένζυμα που αφομοιώνουν αμμωνία. Οι τετραμερείς και οι εξαμερείς GDH έχουν σημαντικές διαφορές στην πρωτοταγή τους δομή. Πρόσφατα, με

βάση κρυσταλλογραφική ανάλυση, προτάθηκε ότι τα εξαμερή ένζυμα αποτελούν μία ξεχωριστή κατηγορία. Ανεξάρτητα από την εξειδίκευση για συνένζυμο.



**Εικόνα 5:** Αμινωτική και απαμινωτική αντίδραση, που καταλύονται από τη γλουταμική αφυδρογονάση (από Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Στα φυτά, η GDH είναι εξαμερής και έχει 7 ισομορφές που αποτελούνται από συνδυασμό δύο υπομονάδων, της α- και β- υπομονάδας. Οι δύο ακραίες ισομορφές είναι ομοεξαμερείς της α- και β- υπομονάδας, αντίστοιχα, και οι 5 εν-διάμεσες είναι υβρίδια. Τα γονίδια της GDH έχουν κλωνοποιηθεί από πολλούς μικροοργανισμούς, τον άνθρωπο, το ποντίκι, το κοτόπουλο, και τελευταία από πέντε φυτικά είδη, το αμπέλι, το καλαμπόκι, την τομάτα, τον καπνό και την *Arabidopsis*. Με βάση φυλογενετικό δένδρογραμμα των αλληλουχιών 21 GDH, που έχουν χαρακτηριστεί, καταδείχθηκε ότι υπάρχουν 2 οικογένειες αντίστοιχων γονιδίων. Οι δύο μορφές των πρωτεϊνών GDH υπήρχαν σε έναν από τους τελευταίους κοινούς προγόνους των βασιλείων. Μετά το διαχωρισμό σε ευβακτήρια, αρχαιοβακτήρια και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, μόνο μια από αυτές τις μορφές κληρονομήθηκε στους οργανισμούς, χωρίς να αποκλείεται ότι κάποιος από τους συγκεκριμένους οργανισμούς που υπάρχουν σήμερα κληρονόμησε γονίδια και από τις δύο οικογένειες.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα μέχρι τώρα ερευνητικά αποτελέσματα, μπορούμε να πούμε ότι η βιοχημική οδός GS/GOGAT είναι η σημαντικότερη οδός ενσωμάτωσης της αμμωνίας σε αμινοξέα, στα φυτά. Ο

ρόλος της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) σήμερα στο μεταβολισμό των ανώτερων φυτών παραμένει αδιευκρίνιστος, παρά το γεγονός ότι ανιχνεύεται σε όλα τα φυτά και συχνά υπάρχει σε υψηλά επίπεδα στους διάφορους φυτικούς ιστούς. Φαίνεται ότι ενδεχομένως συμμετέχει στη χρήση της αμμωνίας, σε περιπτώσεις υψηλής ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση των κυττάρων. Σε αυτό συνηγορούν τα αποτελέσματα τελευταίων μελετών όπου, παρουσία υψηλών επιπέδων ενδοκυτταρικής αμμωνίας, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της α-υπομονάδας, σύνθεση των GDH ισομορφών, που αποτελούνται κυρίως από την α-υπομονάδα, και αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου.

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

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

- Σπορόφυτα σιταριού (*Triticum aestivum*) και κριθαριού (*Hordeum vulgare*), αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε Βόριο (B) σε συγκέντρωση 10 mM, για 5 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τοξικότητα του B αύξησε την ενεργότητα της GDH κατά 18 % στις ρίζες και κατά 30 % στα φύλλα (Mahboobi et al., 2002).
- Σπορόφυτα φασολιού (*Phaseolus vulgaris*) αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας που περιείχαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις Καδμίου (Cd). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι επεμβάσεις προκάλεσαν παρεμπόδιση της ανάπτυξης των φυταρίων. Επίσης, αναλογικά της αύξησης της συγκέντρωσης του μετάλλου στο θρεπτικό μέσο, αυξήθηκε και η ενεργότητα της GDH και ειδικά στα φύλλα και τις ρίζες. Σε αυτό τα γεγονόσ αποδίδεται και η αύξηση στην αφομοίωση του αζώτου που παρατηρήθηκε στους συγκεκριμένους ιστούς (Gouia et al., 2002).
- Σπορόφυτα καλαμποκιού (*Zea mays*) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε CdSO<sub>4</sub>, έτσι ώστε η συγκέντρωσή του σε Κάδμιο (Cd) να κυμαίνεται στα 20 μM. Δεν παρατηρήθηκε καμία αξιοσημείωτη μεταβολή όσον αφορά στα επίπεδα της GDH και της GOGAT ενώ παρατηρήθηκε σαφής αύξηση του επιπέδου της GS (Grace et al., 1997).
- Σπορόφυτα καλαμποκιού (*Zea mays*) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις σε Κάδμιο (Cd), για 12 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρεμποδίστηκε σημαντικά η δράση των ενζύμων GS και GOGAT , ενώ αντίθετα η δράση της GDH αυξήθηκε (Boussama et al., 1999).

## **A6.2. Ωσμωτίνη**

Σε απόκριση της εισβολής από μύκητες και από άλλα σημεία , τα φυτά συσσωρεύουν έναν αριθμό πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται στην άμυνα εναντίον των παθογόνων. Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών είναι και οι παθογενετικές πρωτεΐνες PR ( pathogenesis-related proteins ), οι οποίες είναι εξελικτικά συντηρημένες στο φυτικό βασίλειο και είναι επηρεασμένες από διάφορες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. (Kyeongsik et al., 2004)

Οι PR πρωτεΐνες ομαδοποιούνται σε πέντε οικογένειες που βασίζονται στην αρχέγονη δομή καθώς και στην ενζυματική και βιολογική δράση. Η PR 1

οικογένεια αποτελείται κατά το πλείστον από όξινες πρωτεΐνες, με μοριακές μάζες απο15-17 KDa. Οι PR2 και PR3 πρωτεΐνες είναι αναγνωρισμένες σαν β-1,3-γλουκανάσες και κιτινάσες αντιστοίχως, με δράση μυκητοκτόνου. Μέλη από την PR4 οικογένεια είναι όξινες πρωτεΐνες, αυτή η κατηγορία πρωτεϊνών έχει αποδειχθεί ότι έχει μυκητοκτόνο δράση και δρα συναγωνιστικά με βασικές PR2 και PR3 πρωτεΐνες. Τα μέλη της οικογένειας PR5 παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ομοιότητα με τη θοματίνη, μια γλυκόγευστη πρωτεΐνη από το *Thaumatooccus danialli*. Οι PR5 πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί από ένα ευρύ φάσμα φυτικών ειδών, μονοκοτυλήδων και δικοτυλήδων φυτών. Ωστόσο η βιολογική δράση των πρωτεϊνών που μοιάζουν με τη θοματίνη δεν έχει ακόμα καθιερωθεί, μέλη από αυτή την ομάδα έχουν δείξει ότι έχουν μυκητοκτόνο δράση ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων μυκήτων. (Xu and Reddy, 1997).

Οι PR5 πρωτεΐνες είναι μικρού μοριακού βάρους (24KD) και μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις υποκλάσεις που βασίζονται στο ισοηλεκτρικό σημείο (pI): όξινο, ουδέτερο και βασικό. Η οσμωτίνη είναι μια βασική PR5 πρωτεΐνη ((Kyeongsik et al., 2004).

Η οσμωτίνη είναι μια ομάδα κατιονικών πρωτεϊνών που υπάρχουν το πολύ σε δύο μορφές, η μία έχει ισοηλεκτρικό σημείο με pH 7 και η άλλη με ισοηλεκτρικό σημείο μεγαλύτερο από 8,2, αυτές διαφέρουν ξεκάθαρα στο μοριακό βάρος. Η σύνθεση και η συσσώρευση της mRNA οσμωτίνης ρυθμίζεται αναπτυξιακά και ελέγχεται τουλάχιστον από έξι ορμονικά ή περιβαλλοντικά σήματα, συμπεριλαμβανομένων του ABA, αιθυλένιο, η μόλυνση από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού, αλατότητα και αποξηράνση. Ωστόσο η αληθινή (ουσιώδης) συσσώρευση της πρωτεΐνης οσμωτίνη εμφανίζεται μόνο σε απόκριση σε οσμωτική καταπόνηση και παρουσία αιθυλενίου στην ποικιλία καπνού W38, το οποίο δεν έδειξε αντίδραση υπερευαισθησίας (Andrzej et al., 1992).

Η περισσότερη από την κυτταρική πρωτεΐνη βρέθηκε από την ανοσοκυτταροχημεία να εντοπίζεται σε έγκλειστα πυκνά ηλεκτρόνια στο χυμοτόπιο. Ένα χαμηλό ποσοστό της οσμωτίνης ανιχνεύθηκε σε μία ομάδα κυτοπλάσματος, αλλά δεν υπήρχε προνομιακή εντόπιση της πρωτεΐνης μέσα στο κυτόπλασμα. Ενίοτε κολλοειδή σωματίδια χρυσού θετικής οσμωτίνης βρέθηκαν προσαρτημένα στον τονοπλάστη, αλλά τα οργανίδια, πλασματική

μεμβράνη και κυτταρικό τοίχωμα ήταν χωρίς κανένα σωματίδιο χρυσού. Οσμωτίνη έχει επίσης ανακαλυφθεί σε θεμελιώδη ουσία εξωκυτταρικά στα κύτταρα των φυτών, παρόλο που δεν είναι γνωστό εάν η εξωκυτταρική οσμωτίνη είναι η ίδια με αυτή που βρέθηκε στο χυμοτόπιο ή εάν είναι ίσως μία όξινη δομή όπως είναι άλλες εξωκυτταρικές PR πρωτεΐνες (Andrzej et al., 1992) .

Τα προϊόντα των γονιδίων της οσμωτίνης εμφανίζουν in vitro αντιμυκητιακή δράση εναντίον πολλών μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των *Phytophthora infestans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa* και *Trichoderma reesei*. Η αντιπαθογόνα δράση της οσμωτίνης περιγράφεται ως εξής: οι υφές του μύκητα εκλύουν τοξίνες οι οποίες διασπούν την κυτταρική μεμβράνη του φυτού, προξενώντας διαρροή θρεπτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται από τον μύκητα. Έτσι μειώνεται η σπαργή του φυτού, οπότε αυξάνεται η συσσώρευση οσμωτίνης, που διαχέεται εκτός του φυτικού κυττάρου και επικάθεται σε ομόλογο δέκτη στην επιφάνεια του μύκητα. Στη συνέχεια, η οσμωτίνη εισχωρεί και σχηματίζει πόρους στις μυκηλιακές μεμβράνες, καθιστώντας τις διαπερατές και παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των μυκηλίων. Ο μηχανισμός δράσης της οσμωτίνης σε έλλειψη νερού και σε αλατότητα δεν είναι ακόμη γνωστός (Dong et al., 1994).

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **B1. Φυτικό υλικό – Βαρέα μέταλλα**

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν σπόροφυτα δύο φυτικών ειδών του *Nicotiana glauca* και του *Nicotiana tabacum* τα οποία καλλιεργήθηκαν *in vitro*. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης δύο βαρέα μέταλλα ο μόλυβδος (Pb) και ο ψευδάργυρος (Zn).

### **B2. Παρασκευή θρεπτικού MS για σπόρους - Ιστοκαλλιέργεια σπόρων**

Για την καλλιέργεια *in vitro* σπόρων καπνού, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Murashing and Skoog (MS), κάθε λίτρο του οποίου περιείχε εκτός των άλλων (Πίνακας 1) άγαρ (7 g), μόλυβδο (Pb) και ψευδάργυρο (Zn) σε διάφορες συγκεντρώσεις, ενώ δεν προστέθηκε σακχαρόζη.

Για την καλλιέργεια παρασκευάστηκαν 11 L θρεπτικού διαλύματος εκ των οποίων τα 8 L χωρίστηκαν σε τέσσερις κωνικές φιάλες του 1 L. Σε αυτές τις φιάλες προστέθηκαν δύο διαφορετικές ποσότητες βαρέων μετάλλων, μόλυβδου και ψευδαργύρου. Οι παραπάνω ποσότητες που προστέθηκαν ήταν σε μορφή αλάτων των αντίστοιχων μετάλλων (PbNO<sub>3</sub> και ZnSO<sub>4</sub>).

Οι δύο από τις τέσσερις φιάλες του 1 L περιείχαν Zn σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM, οι άλλες δύο περιείχαν Zn σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM. Ενώ οι άλλες τέσσερις περιείχαν Pb σε συγκεντρώσεις 0.1 mM και 0.5 mM ανά δύο φιάλες αντίστοιχα.

Στα 3 L από το αρχικό MS δεν έγινε καμία επέμβαση με μέταλλα, με σκοπό τη χρησιμοποίησή τους ως θρεπτικό υπόστρωμα για φυτά μάρτυρες.

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



**Πίνακας 1.** Σύσταση του βασικού θρεπτικού υποστρώματος MS που χρησιμοποιήθηκε για την in vitro καλλιέργεια σπόρων *Nicotiana glauca* και *Nicotiana tabacum*,

<b>ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ</b>	<b>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/L)</b>
KNO <sub>3</sub>	2000
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	150
<b>ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ</b>	0,83
KI	6,2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	22,3
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	8,6
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,83
NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25
FeNa EDFS	43
<b>ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ</b>	
Biotin	0,1
Nicotinic acid	5
Pyridoxine HCl	5
Thiamine HCl	5
D-Pantothenic acid	5
Myoinositol	100

Πριν την εμφύτευση οι σπόροι του *Nicotiana glauca* αποστειρώθηκαν ως εξής : αρχικά ξεπλύθηκαν για μερικά δευτερόλεπτα με διάλυμα αλκοόλης 70 %, στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 20 % εμπορικού σκευάσματος υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη) για 15 min και τέλος ξεπλύθηκαν με

απεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό έξι φορές, επί 5 min. Για την αποστείρωση των σπόρων του *Nicotiana tabacum*, οι σπόροι εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα 20 % εμπορικού σκευάσματος υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη) για 5 min και ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό έξι φορές, επί 5 min. Κατά την αποστείρωση και την προετοιμασία των σπόρων, τα εργαλία που χρησιμοποιήθηκαν (λαβίδες, νυστέρια κ.τ.λ) είχαν απολυμανθεί με εμβάπτισή τους σε 90 % αλκοόλη και στη συνέχεια με φλόγα λύχνου Bunsen.

Οι διαδικασίες της αποστείρωσης και της εμφύτευσης εκτελέστηκαν μέσα σε εστία νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Αφού οι σπόροι εμφυτεύτηκαν στους δοκιμαστικούς σωλήνες με το θρεπτικό υπόστρωμα, τοποθετήθηκαν στη συνέχεια σε θάλαμο ανάπτυξης με ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού ( 16 h φως και 8 h σκοτάδι ) και σε θερμοκρασία  $25 \pm 2$  °C.

Τα φυτάρια του καπνού παρέμειναν στο θάλαμο ανάπτυξης για τέσσερις μήνες. Μετά την πάροδο των τεσσάρων μηνών βγάλαμε τα φυτάρια και καταγράψαμε το ύψος, τον αριθμό φύλλων καθώς και το φρέσκο βάρος για το κάθε φυτικό είδος και επέμβαση. Στη συνέχεια απομακρύναμε τις ρίζες τους, τα τοποθετήσαμε μέσα σε διαφορετικά πλαστικά σακουλάκια και τα φυλάξαμε στην κατάψυξη έως περαιτέρω χρησιμοποίησή τους.

### **B3. Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς**

#### Διαλύματα :

Διάλυμα εκχύλισης (extraction buffer): 100 mM Tris-HCl pH 8, 2 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 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 διαλύματος εκχύλισης (διατηρημένου στους 4 °C), που λειοτριβήθηκε στο γουδί ήταν 1:4 και για τα δύο φυτικά είδη. Τα μίγματα μετά μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρου και ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή τρεις φορές, διάρκειας 30 sec η κάθε μία. Έπειτα προσθέσαμε Triton και αναδεύσαμε τα μίγματα στο Vortex.

Ακολούθησε επώαση σε πάγο για 10 min ανάδευση, και αφού έγινε ισοζύγισή τα εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 10000 rpm (στροφές ανά λεπτό) και στους 4 °C για 30 min. Μετά τη φυγοκέντρωση τα υπερκείμενα τοποθετήθηκαν σε μικροσωλήνες erpendorf και φυλάχθηκαν στον καταψύκτη για τη χρησιμοποίησή τους σε επόμενους προσδιορισμούς.

## **B4. 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 2x αραιωμένο 1:1 με H<sub>2</sub>O (παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση)

#### Διαδικασία:

Σε μικροσωλήνες erpendorf αναμειγνύονται 25 μL εκχυλίσματος και 25 μL 20 % TCA, τα erpendorf τοποθετούνται στο ψυγείο για 30 min. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 14000 rpm (στροφές) για 20 min. Στη συνέχεια γίνεται άντληση του υπερκείμενου με αντλία Bernoulli ή πιπέτα. Επαναδιαλύεται η πελέτα (πρωτεϊνικό ίζημα) σε 100 μL διαλύματος Α. Προστίθεται 1 mL διαλύματος Γ και επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται 100 μL διαλύματος Δ και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, κατά τη διάρκεια της επώασης γίνεται ανάδευση του διαλύματος με το χέρι 1 – 2 φορές.

Αφού μηδενιστεί το φασματοφωτόμετρο με το «τυφλό» διάλυμα ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης (Absorbance) των διαλυμάτων στα 625 nm.

## **B5. Μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου GDH**

### Διαλύματα:

- 1 M Tris – HCl pH 8,0
- 2 M NH<sub>4</sub>Cl
- 1 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, 50 μL 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mL 200 mM α-κετογλουταρικό οξύ και συμπληρώθηκε ο υπόλοιπος όγκος έως τα 42,5 mL με απιονισμένο H<sub>2</sub>O.

Ακολούθησε εξισορρόπηση του μίγματος με τοποθέτηση του στο υδατόλουτρο 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.

## **B6. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis, SDS – PAGE)**

### Διαλύματα:

- Διάλυμα μετουσίωσης δειγμάτων (6× sample buffer): 150 mM Tris – HCl pH 6,8, 9 % SDS, 15 % β-μερκαπταιθανόλη (β-mercaptoethanol, 0.1 % κυανού 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 4x)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοίβασης (stacking gel buffer): 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (Upper Tris 4x)
- 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 και για την μεταφορά τους σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (NC). Κάθε πήκτωμα αποτελείται από δυο επιμέρους πηκτώματα όπου το ένα (stacking gel) προηγείται του άλλου (resolving gel). Το resolving gel περιείχε 10 % πολυακρυλαμίδη και το stacking gel 4 % πολυακρυλαμίδη. Η επιμέρους σύσταση κάθε πηκτώματος φαίνεται στον Πίνακα 2.

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

Ηλεκτροφόρηση: η συσκευή ηλεκτροφόρησης συναρμολογήθηκε προσεκτικά (χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Mini Protean II της Bio Rad). Το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετήθηκε στη συσκευή και αφέθηκε μέχρι να πολυμεριστεί. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε και εφαρμόστηκε στη συσκευή το πήκτωμα επιστοίβασης. Αμέσως εφαρμόστηκε στον υποδοχέα η κτένα δημιουργίας «πηγαδιών» στα οποία τοποθετήθηκαν στην συνέχεια τα προς ανάλυση δείγματα. Το διάλυμα αφέθηκε να πολυμεριστεί. Τα δοχεία της ηλεκτροφόρησης γεμίστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tank Buffer). Τέλος η ποσότητα μετουσιωμένων δειγμάτων (17 – 25 μg ολικής

πρωτεΐνης κάθε δείγματος) μεταφέρθηκε με μικροσύριγγα στα πηγάδια (wells) και ηλεκτροφορήθηκαν στα 80 V για περίπου 2 ώρες.

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

<b>SDS - PAGE (15 mL)</b>			
<b>STOCK SOLUTION</b>	<b>STACKING</b>	<b>RESOLVING GEL %</b>	
	<b>GEL (7,5 mL)</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>

## **B7. 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 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.

## **B8. Μεταφορά κατά Western Blot – Ανοσοανίχνευση**

### Διαλύματα:

- Διάλυμα μεταφοράς: 20 mM Tris, 192 mM γλυκίνη
- PBS (phosphate buffered saline): 0,8 % NaCl, 0,02% KCl, 0,115 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 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 ωσμωνίνης καθώς και για το ένζυμο GDH με την βοήθεια του κατάλληλου αντισώματος.

Τα κύρια στάδια της ανίχνευσης ήταν:

1. Πλύσιμο NC σε διάλυμα PBS 1× για 10 – 15 min.

2. Η NC τοποθετείται σε διάλυμα 2 % BSA σε διάλυμα PBS 1× (0,5 g BSA in 25 mL PBS 1×) ανάδευση για 30 min (blocking).
3. Πλύσιμο 3 × 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 1:2500 σε διάλυμα 1 % BSA σε διάλυμα PBS 1× + 0.05 % TWEEN 20 και γίνεται επώαση με ανάδευση για τουλάχιστον 1 h 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, 3 mg NBT, 30 μL BCiP), έως να εμφανιστούν οι ζώνες.
9. Διακοπή της χρώσης με πλύσιμο με απιονισμένο H<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 πλασμιδικό 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

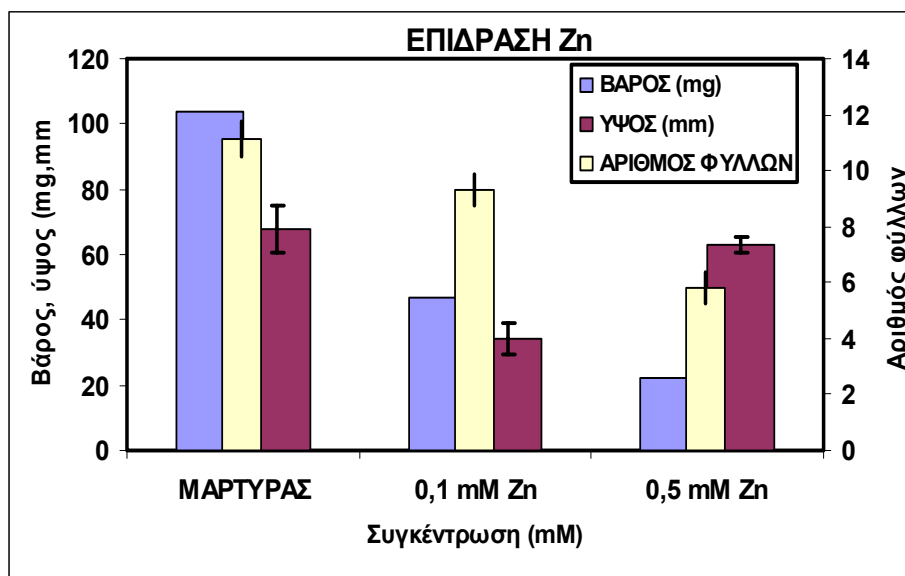
### Γ1. Επίδραση του Ψευδαργύρου (Zn) και Μολύβδου (Pb) σε μορφολογικά χαρακτηριστικά φυτών *Nicotiana glauca*.

Κατά την εκτέλεση του πειράματος διάφορες ποσότητες άλατος Ψευδάργυρου ( $ZnSO_4$ ), και μολύβδου (Pb-EDTA) προστέθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας ώστε τελικά να επιτύχουμε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις των στοιχείων (0,1 και 0,5 mM Zn και 0,1 και 0,5 mM Pb) μέσα στο θρεπτικό μέσο.

Στα έξι υποστρώματα που προέκυψαν (τέσσερα με ποσότητες μετάλλων και δύο για μάρτυρα) φυτεύτηκαν σπόροι *Nicotiana glauca*. Έπειτα από δύο εβδομάδες υπολογίσθηκε το ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων ανά επέμβαση (Πίνακας 5). Μετά την πάροδο 4 μηνών τα φυτά αφαιρέθηκαν από τους σωλήνες ανάπτυξης και μετρήθηκε το βάρος, το ύψος καθώς και ο αριθμός φύλλων του κάθε φυτού και ακολούθως υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι αυτών των μετρήσεων. Οι μέσοι όροι των παραπάνω μετρήσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 3 και 4 ενώ το ποσοστό φυτρωτικότητας στον πίνακα 5.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.** Μέσοι όροι του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων κάθε φυτού ανά επέμβαση ψευδαργύρου (Zn). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

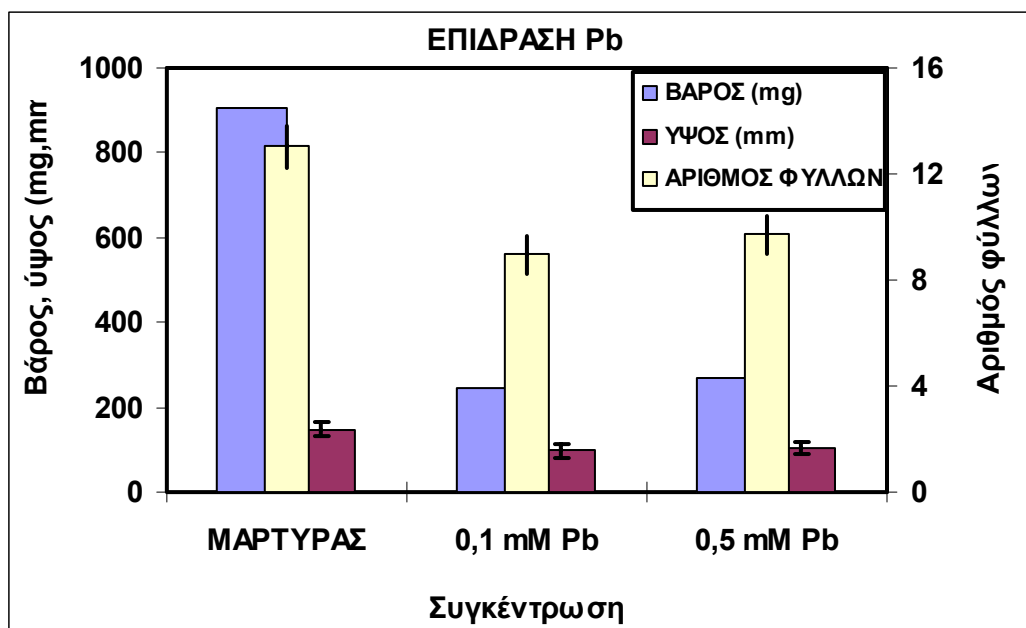
ΕΠΕΜΒΑΣΗ	ΒΑΡΟΣ (mg)	ΥΨΟΣ (mm)	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ
ΜΑΡΤΥΡΑΣ	103,7	67,7	11,13
0,1 mM Zn	46,7	34,1	9,33
0,5 mM Zn	22,3	6,3	5,83



**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4.** Μέσοι όροι του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων κάθε φυτού ανά επέμβαση ψευδαργύρου (Zn). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4.** Μέσοι όροι του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων κάθε φυτού ανά επέμβαση μολύβδου (Pb). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

	ΒΑΡΟΣ (mg)	ΥΨΟΣ (mm)	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ
<b>ΜΑΡΤΥΡΑΣ</b>	<b>905,8</b>	<b>148,1</b>	<b>13,04</b>
<b>0,1 mM Pb</b>	<b>246,3</b>	<b>97,9</b>	<b>8,95</b>
<b>0,5 mM Pb</b>	<b>267,6</b>	<b>103,6</b>	<b>9,73</b>



**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2.** Μέσοι όροι του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων κάθε φυτού ανά επέμβαση μολύβδου (Pb). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.** Ποσοστό φυτρωτικότητας σπόρων *Nicotiana glauca* ανά επέμβαση ψευδαργύρου (Zn) και μολύβδου (Pb).

ΕΠΕΜΒΑΣΗ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΦΥΤΡΩΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (%)
ΜΑΡΤΥΡΑΣ Zn	100
0,1 mM Zn	87.5
0,5 mM Zn	41.6
ΜΑΡΤΥΡΑΣ Pb	100
0,1 mM Pb	83.3
0,5 mM Pb	91.6

Απο τα αποτελέσματα που καταγράφονται στους πίνακες 3, 4 και 5 διαπιστώνουμε ότι ο ψευδάργυρος και ο μόλυβδος, είχαν αρνητική επίδραση στην αύξηση και την ανάπτυξη των φυταρίων.

Συγκεκριμένα συγκρίνοντας το ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων του *Nicotiana glauca* στην υψηλότερη συγκέντρωση ψευδαργύρου (0,5 mM), το οποίο κυμάνθηκε στο 41,6 %, σε σχέση με τα αντίστοιχα των φυτών

μαρτύρων (100 %) καθώς και με τις επεμβάσεις του μολύβδου, διαπιστώνουμε ότι η υψηλή συγκέντρωση του στοιχείου αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα για τη βλάστηση των σπόρων. Επίσης παρατηρούμε πως όσο αυξανόταν βαθμιαία η συγκέντρωση του ψευδαργύρου (Zn) μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα, τόσο ελαττωνόταν η φυτρωτική ικανότητα των σπόρων (Πίνακας 5).

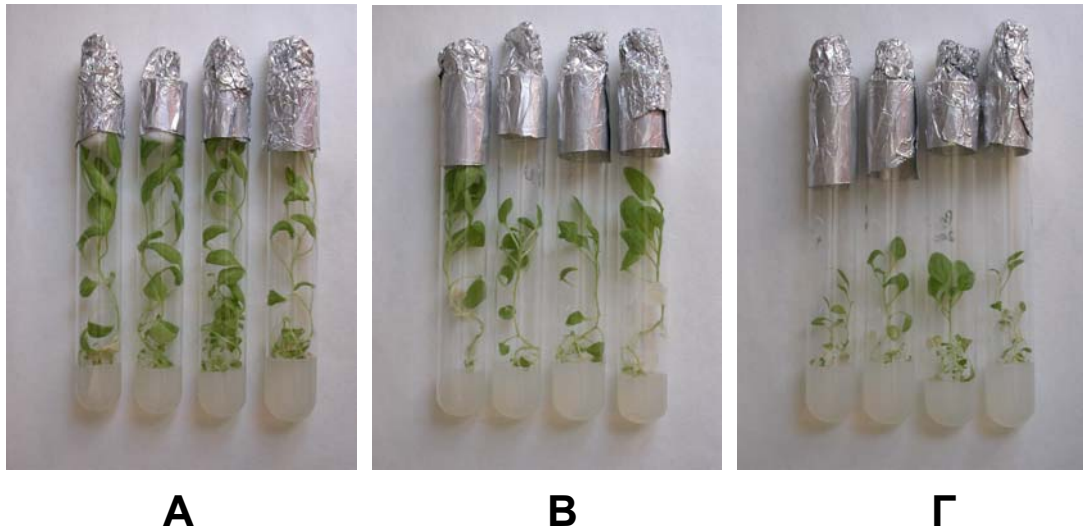
Μεταβολές παρατηρήθηκαν ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μείωση του μέσου όρου του ύψους, του βάρους καθώς και του αριθμού των φύλλων των φυτών, αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου (Zn). Αξιόλογη είναι η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των φυτών μαρτύρων και των φυτών που αναπτύχθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση Zn (0,5 mM). Όσο αφορά τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό μέσο που περιείχε μόλυβδου παρατηρούμε μείωση του μέσου όρου του ύψους, του βάρους καθώς και του αριθμού των φύλλων των φυτών όχι όμως αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του στοιχείου, στην συγκέντρωση Pb 0,1 mM τα φυτά είχαν μικρότερο βάρος, ύψος και αριθμό φύλλων σε σχέση με τα φυτά της συγκέντρωσης των 0,5 mM. Αξιόλογη είναι επίσης η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των φυτών μαρτύρων και των φυτών που αναπτύχθηκαν και στις δύο συγκεντρώσεις Pb (0,1mM και 0,5 mM)

Στις εικόνες 6 και 7 όπου παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά δείγματα κάθε επέμβασης, φυτών *Nicotiana glauca*, είναι εμφανής η διαφορά στην ανάπτυξη των φυταρίων.

Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ψευδαργύρου στο θρεπτικό μέσο, τόσο αλλοιώνονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών (Διάγραμμα 1). Παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη των φυτών, που καλλιεργήθηκαν στο υπόστρωμα που περιείχε ψευδάργυρο, ήταν πιο λεπτά σε σχέση με τα στελέχη του μάρτυρα. Επίσης, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις και ειδικά στην επέμβαση με 0,5 mM Zn, τα φύλλα των φυτών παρουσίασαν έναν ευδιάκριτο ανοιχτό πράσινο μεταχρωματισμό καθώς και το σύμπτωμα της βραχυγονάτωσης (Εικόνα 6).

**A****B****Γ**

**ΕΙΚΟΝΑ 6:** Φυτά *Nicotiana glauca* από ιστοκαλλιέργεια σπόρων που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog, διαφορετικών συγκεντρώσεων ψευδαργύρου, 0 mM (Α), 0,1 mM (Β) και 0,5 mM (Γ), για 4 μήνες.



**ΕΙΚΟΝΑ 7:** Φυτά *Nicotiana glauca* από ιστοκαλλιέργεια σπόρων που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog, διαφορετικών συγκεντρώσεων μολύβδου, 0 mM (Α), 0,1 mM (Β) και 0,5 mM (Γ), για 4 μήνες.

Η παρουσία μολύβδου στο θρεπτικό μέσο είχε δυσμενείς επιπτώσεις στην αύξηση των σποροφύτων. Παρατηρήθηκε επίσης πως αυτή η αρνητική επίδραση ήταν ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του μολύβδου, διότι και στις δύο συγκεντρώσεις (0,1 mM και 0,5 mM) τα φυτά δεν παρουσίασαν έντονες διαφορές όσο αφορά τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Εικόνα 7).

## **Γ2. Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης στις επεμβάσεις Ψευδαργύρου (Zn) και Μολύβδου (Pb) σε ιστούς *Nicotiana glauca*.**

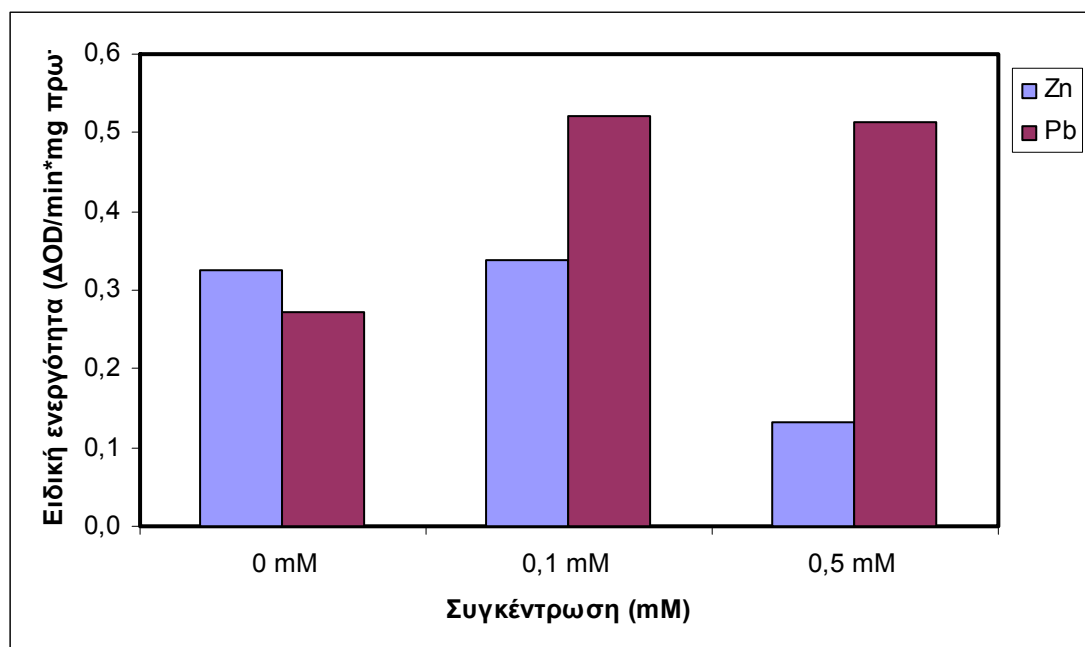
Με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών και τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου GDH σε φυτά *Nicotiana glauca*, χρησιμοποιήσαμε φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας και σε θρεπτικά υποστρώματα συγκεντρώσεως 0, 0,1 και 0,5 mM Zn και 0, 0,1 και 0,5 mM Pb. Ακολούθησε εκχύλιση των πρωτεϊνών από φύλλα και βλαστούς και τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης (GDH) και της ωσμωτίνης.

Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες προσδιορίστηκε με την μέθοδο Lowry. Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εκτιμήθηκε επίσης η ενζυμική ενεργότητα της GDH, μέσω της αμινωτικής αντίδρασης, μετρώντας την

μεταβολή της απορρόφησης (ΔOD) στα 340 nm σε φασματοφωτόμετρο. Μέσω της ΔOD υπολογίσθηκε η ειδική ενεργότητα, καθώς και η καταλυτική ενεργότητα σε κάθε ιστό. Τα αποτελέσματα των δύο παραπάνω επεμβάσεων παραθέτονται στον Πίνακα 6.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6.** Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της GDH, των φυτών *Nicotiana glauca*, ανα επέμβαση Zn και Pb.

ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ mg/mL	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*50 $\mu$ L	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*mL	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ $\Delta$ OD/min*mg πρωτ.	$\mu$ mol NADH/min*mg	ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ $\mu$ molNADH/min*g φυτ. ιστού
M	0,601	0,0098	0,196	0,326	0,052	0,125
0,1 mM Zn	0,646	0,0109	0,218	0,337	0,054	0,140
0,5 mM Zn	0,755	0,005	0,100	0,132	0,021	0,064
M	0,515	0,007	0,140	0,272	0,043	0,090
0,1 mM Pb	0,50	0,013	0,260	0,520	0,083	0,166
0,5 mM Pb	0,556	0,0143	0,286	0,514	0,082	0,183



**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.** Μεταβολή των τιμών της ειδικής ενεργότητα ( $\Delta$ OD/min\*mg πρωτ.) στους ιστούς του *Nicotiana glauca*, υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ψευδάργυρου (Zn) και μολύβδου (Pb).

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν (Πίνακας 6) διαπιστώνουμε τάση αύξησης της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών, στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα που περιείχε ψευδάργυρο (Zn) σε συγκεντρώσεις 0,1 mM και 0,5 mM (0,646 mg/mL και 0,755 mg/mL αντίστοιχα), σε σχέση με τον μάρτυρα (0,601 mg/mL). Τάση αύξησης της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών, στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα που περιείχε μόλυβδο (Pb) σε συγκέντρωση 0,5 mM (0,556 mg/mL), ενώ αντίθετα τάση μείωσης στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα που περιείχε μόλυβδο (Pb) σε συγκέντρωση 0,1 mM (0,50 mg/mL), σε σχέση με το μάρτυρα (0,515 mg/mL).

Μελετώντας τον Πίνακα 6 παρατηρούμε μια αύξηση της ειδικής ενεργότητας της GDH στις επεμβάσεις με τις συγκεντρώσεις 0,1 mM και 0,5 mM Pb (0,520 και 0,514 ΔOD/min\*mg πρωτ. αντίστοιχα) συγκριτικά με το μάρτυρα (0,272 ΔOD/min\*mg πρωτ.). Όμοια αύξηση παρατηρούμε και στην επέμβαση με 0,1 mM Zn (0,337 ΔOD/min\*mg πρωτ.) σε αντίθεση με την επέμβαση με 0,5 mM Zn (0,132 ΔOD/min\*mg πρωτ.) που διαπιστώνουμε μείωση της ειδικής ενεργότητας. Παρατηρείται επίσης μεγαλύτερη αύξηση της ειδικής ενεργότητας στις επεμβάσεις με μόλυβδο (Pb) συγκριτικά με τις επεμβάσεις με ψευδάργυρο (Zn) (Διάγραμμα 6).

Η καταλυτική ενεργότητα παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή της στην επέμβαση 0,5 mM Pb (0,183 μmolNADH/ min\*g φυτ. ιστού). Η μικρότερη τιμή καταλυτικής ενεργότητας σε αυτό το φυτικό είδος καταγράφηκε στην επέμβαση 0,5 mM Zn και ήταν 0.064 μmolNADH/ min\*g φυτ. ιστού.

### **Γ3. Επίδραση Ψευδαργύρου (Zn) και Μολύβδου (Pb) στην έκφραση της GDH και της ωσμωνίνης σε φυτά *Nicotiana glauca*.**

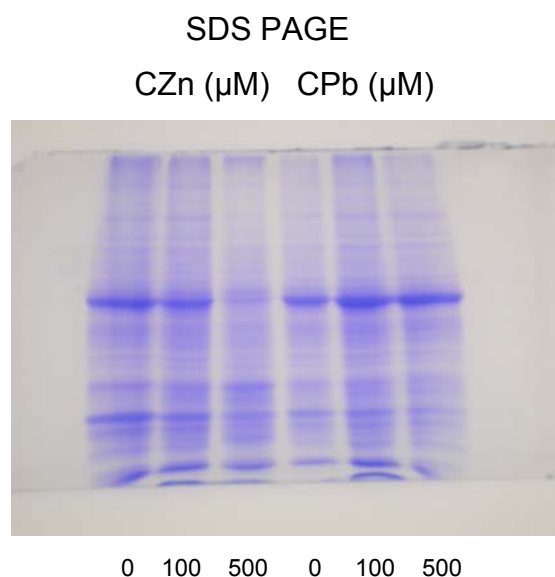
Για την μελέτη της έκφρασης της GDH και της ωσμωνίνης του *Nicotiana glauca* τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαφόρων δειγμάτων αναλύθηκαν με SDS-PAGE, υποβλήθηκαν Western Blot. Με τη μέθοδο αυτή οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε σταθερό υπόστρωμα, στην προκειμένη περίπτωση μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου στην συνέχεια



μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί ανοσολογικά με το κατάλληλο αντίσωμα μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, από το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί.

Ίση ποσότητα ολικών πρωτεϊνών από κάθε δείγμα μετουσιώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε με SDS-PAGE σε επίπεδα πηκτώματα 10 % (GDH) και 12 % (ωσμωτίνη) ακρυλαμίδης, με σκοπό τη ανάλυση των πολυπεπτιδίων τους στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Το πρωτεϊνικό πρότυπο κάθε δείγματος προέκυψε μετά τη χρώση του πηκτώματος με Coomassie brilliant blue R-250.

Στην Εικόνα 8 παρουσιάζονται τα ολικά πρότυπα που προέκυψαν μετά την SDS-PAGE των εκχυλισμάτων. Μεταξύ των μεταχειρίσεων διακρίνονται αρκετές διαφορές στην ένταση των ζωνών που παρατηρήθηκαν.



**Εικόνα 8:** Ολικά πρωτεϊνικά πρότυπα φυτικών ιστών από φυτά *Nicotiana glauca*. Τα πρότυπα προέκυψαν μετά από ανάλυση με SDS-PAGE και χρώση του πηκτώματος Coomassie Brilliant Blue R-250.

Σε όλα τα παραπάνω πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έγινε προσπάθεια ανοσοανίχνευσης (με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν τα ένζυμα GDH και ωσμωτίνη του αμπελιού) και μελέτης των δύο ενζύμων (GDH και ωσμωτίνη) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε ένζυμο στην συνέχεια.

### Γ3.1. Γλουταμική αφυδρογονάση (GDH)

Για την μελέτη της GDH τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE (10 %) ακρυλαμίδης και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Western Blot). Μετά την ανοσοανίχνευση της GDH με ειδικό αντίσωμα, αναπτύχθηκε μία ζώνη σε κάθε επέμβαση. Στην Εικόνα 9 παρουσιάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ανοσοανίχνευση της GDH.



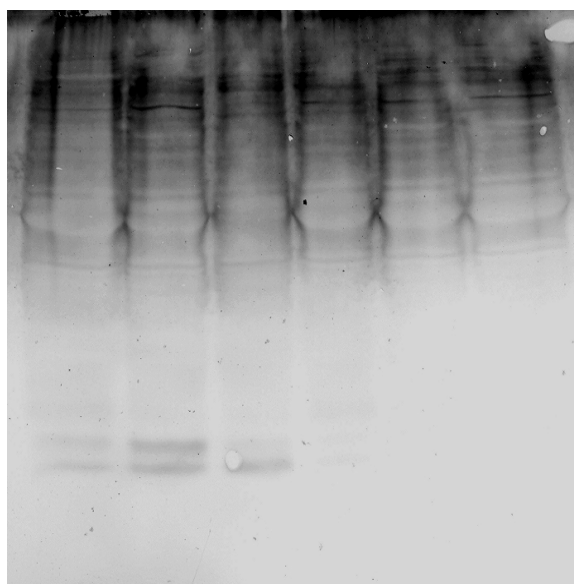
**ΕΙΚΟΝΑ 9:** Πρωτεϊνικές ζώνες της GDH από φυτικούς ιστούς του *Nicotiana glauca* που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog συγκεντρώσεως 0, 0,1 και 0,5 mM σε Ψευδράργυρο (Zn) και 0, 0,1 και 0,5 mM σε μόλυβδο (Pb). Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης με την μέθοδο Western Blot. Στο φίλτρο έγινε ανίχνευση της GDH με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Στους φυτικούς ιστούς του *Nicotiana glauca*, ο μάρτυρας φαίνεται να έχει ίση ποσότητα ενζύμου με την συγκέντρωση 0,1 mM Zn, ενώ στη συγκέντρωση 0,5 mM Zn η ποσότητα είναι περισσότερη. Παρατηρώντας την μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης μετά την ανοσοανίχνευση της GDH βλέπουμε σταδιακή μείωση της ποσότητας του ένζυμου καθώς αυξάνει η ποσότητα του

μολύβδου στο υπόστρωμα. Συγκρίνοντας τις δύο επεμβάσεις παρατηρείται εμφανώς περισσότερη ποσότητα ενζύμου στις επεμβάσεις με ψευδάργυρο σε σχέση με τις επεμβάσεις με μόλυβδο (Εικόνα 9).

### Γ3.2. Ωσμωτίνη

Οι ολικές πρωτείνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα 12 % συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης και μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στο φίλτρο έγινε ανίχνευση της ωσμωτίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος. Μετά την ανοσοανίχνευση της ωσμωτίνης, αναπτύχθηκαν δύο ζώνες σε κάθε επέμβαση. Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ανοσοανίχνευση της ωσμωτίνης.



0 100 500 0 100 500  
CZn (μM) CPb (μM)

**ΕΙΚΟΝΑ 10.** Πρωτεϊνικές ζώνες της ωσμωτίνης από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα *Nicotiana glauca*. Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στο φίλτρο έγινε ανίχνευση της ωσμωτίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Στα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος παρατηρούμε την μεταβολή της έκφρασης της ωσμωτίνης του *Nicotiana glauca* στις διάφορες επεμβάσεις ψευδαργύρου και μολύβδου. Η ποσότητα της ανοσοανιχνευόμενης ωσμωτίνης είναι περισσότερη στη συγκέντρωση 0,1 mM Zn σε σχέση με τον μάρτυρα και με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Μεγάλη ποσότητα υπάρχει και στη συγκέντρωση 0,5 mM Zn. Η ποσότητα της ανοσοανιχνευόμενης ωσμωτίνης στις συγκεντρώσεις με μολύβδο είναι ελάχιστη.

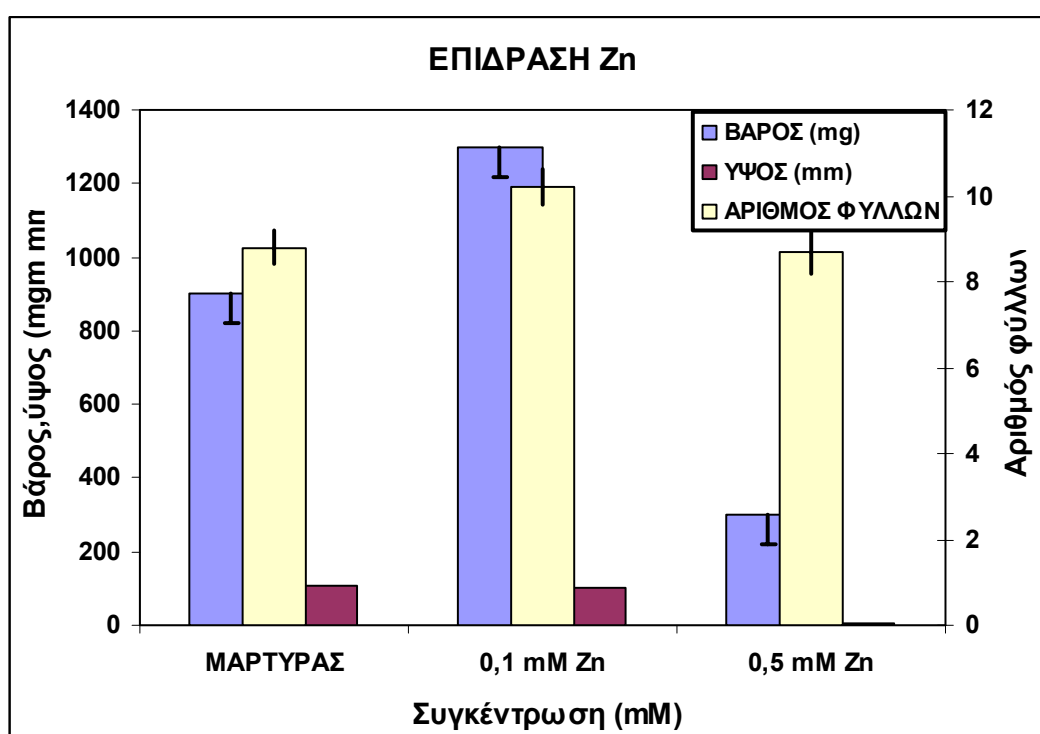
#### **Γ4. Επίδραση του Ψευδαργύρου (Zn) και Μολύβδου (Pb) σε μορφολογικά χαρακτηριστικά φυτών *Nicotiana tabacum*.**

Κατά την εκτέλεση του πειράματος διάφορες ποσότητες άλατος Ψευδάργυρου ( $ZnSO_4$ ), και μολύβδου (Pb-EDTA) προστέθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας ώστε τελικά να επιτύχουμε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις των στοιχείων (0, 100 και 500  $\mu M$  Zn και 0, 100, και 500  $\mu M$  Pb) μέσα στο θρεπτικό μέσο.

Στα πέντε υποστρώματα που προέκυψαν (τέσσερα με ποσότητες μετάλλων και ένα για μάρτυρα) φυτεύτηκαν σπόροι *Nicotiana tabacum*. Έπειτα από δύο εβδομάδες υπολογίσθηκε το ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων ανά επέμβαση (Πίνακας 9). Μετά την πάροδο 4 μηνών τα φυτά αφαιρέθηκαν από τους σωλήνες ανάπτυξης και μετρήθηκε το βάρος, το ύψος καθώς και ο αριθμός φύλλων του κάθε φυτού και ακολούθως υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι αυτών των μετρήσεων. Οι μέσοι όροι των παραπάνω μετρήσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 7 και 8 ενώ το ποσοστό φυτρωτικότητας στον πίνακα 9.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.** Μέσοι όροι του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων κάθε φυτού ανά επέμβαση ψευδαργύρου (Zn). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

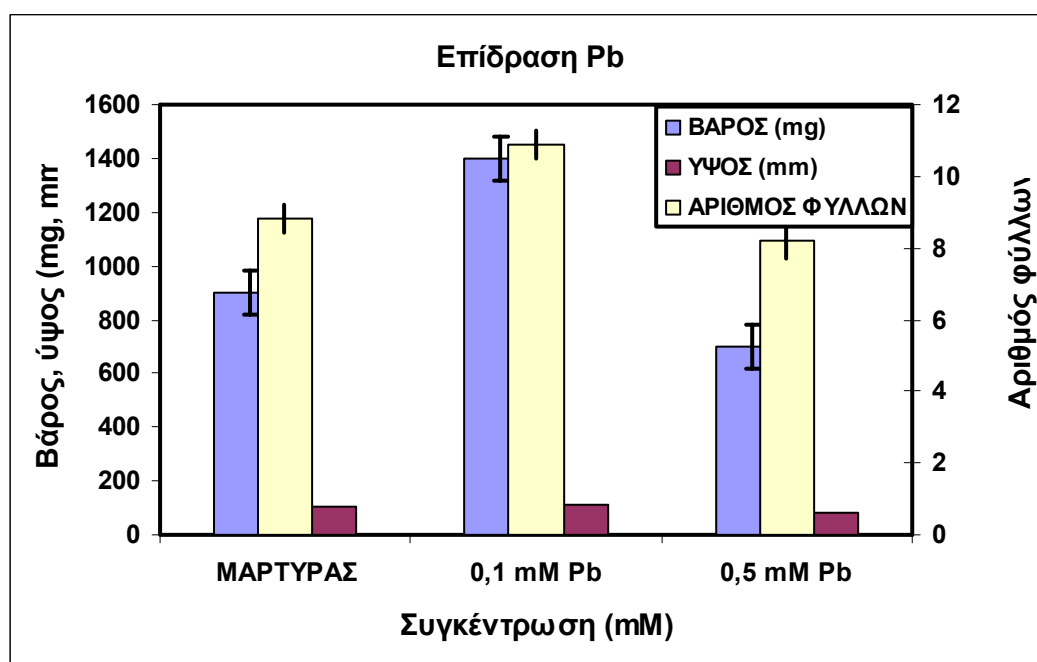
ΕΠΕΜΒΑΣΗ	ΒΑΡΟΣ (mg)	ΥΨΟΣ (mm)	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ
ΜΑΡΤΥΡΑΣ	900	107	8,8
0,1 mM Zn	1300	101	10,2
0,5 mM Zn	300	5	8,7



**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4.** Μέσοι όροι του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων κάθε φυτού ανά επέμβαση ψευδαργύρου (Zn). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.** Μέσοι όροι του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων κάθε φυτού ανά επέμβαση μολύβδου (Pb). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ	ΒΑΡΟΣ (mg)	ΥΨΟΣ (mm)	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ
ΜΑΡΤΥΡΑΣ	900	107	8,8
0,1 mM Pb	1400	112	10,9
0,5 mM Pb	700	84	8,2



**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5.** Μέσοι όροι του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων κάθε φυτού ανά επέμβαση μολύβδου (Pb). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9.** Ποσοστό φυτρωτικότητας σπόρων *Nicotiana tabacum* ανά επέμβαση ψευδαργύρου (Zn) και μολύβδου (Pb).

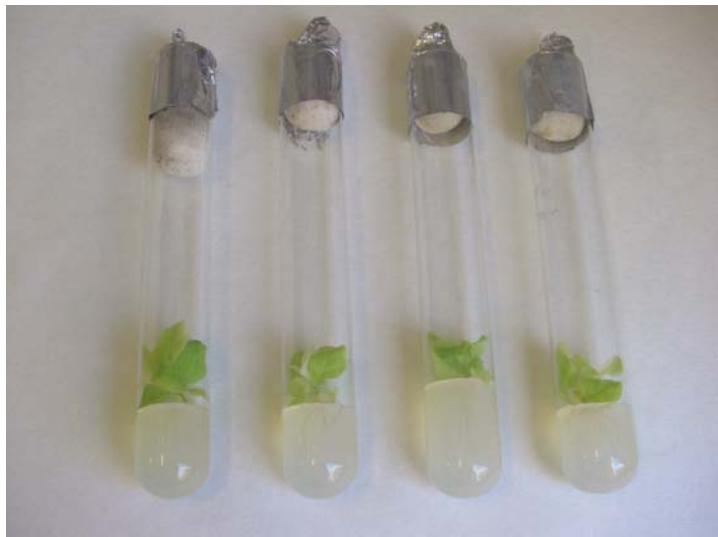
ΕΠΕΜΒΑΣΗ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΦΥΤΡΩΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (%)
<b>ΜΑΡΤΥΡΑΣ</b>	<b>100</b>
<b>0,1 mM Zn</b>	<b>88.6</b>
<b>0,5 mM Zn</b>	<b>90.9</b>
<b>0,1 mM Pb</b>	<b>97.7</b>
<b>0,5 mM Pb</b>	<b>81.8</b>

Απο τα αποτελέσματα που καταγράφονται στους πίνακες 7, 8 και 9 διαπιστώνουμε ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις του μολύβδου (Pb) και του ψευδαργύρου (Zn) είχαν αρνητική επίδραση στην αύξηση και ανάπτυξη των φυταρίων.

Συγκρίνοντας το ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων του *Nicotiana tabacum* όλων των επεμβάσεων με τον μάρτυρα διαπιστώνουμε ότι καμμία συγκέντρωση δεν αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα για τη βλάστηση των σπόρων. Το μεγαλύτερο ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 0,1 mM Pb, το οποίο κυμάνθηκε στο 97,7 %. Ενώ το μικρότερο ποσοστό φυτρωτικότητας των σπόρων παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 0,5 mM Pb, το οποίο κυμάνθηκε στο 81,8 % (Πίνακας 9).

Μεταβολές παρατηρήθηκαν ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του μέσου όρου του βάρους, του ύψους και του αριθμού των φύλλων των φυτών στις υψηλότερες συγκεντρώσεις Zn και Pb (0,5 mM). Στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν ψευδάργυρο (Zn) και μόλυβδο (Pb) σε συγκεντρώσεις 0,1 mM παρατηρήθηκε αύξηση του μέσου όρου του βάρους, του ύψους και του αριθμού των φύλλων σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Αξιόλογη είναι επίσης η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα με συγκεντρώσεις 0,1 mM Zn και 0,5 mM Zn και των φυτών των συγκεντρώσεων 0,1 mM Pb και 0,5 mM Pb (Πίνακες 7,8).

Στις εικόνες 11 και 12 όπου παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά δείγματα κάθε επέμβασης, φυτών *Nicotiana tabacum*, είναι εμφανής η διαφορά στην ανάπτυξη των φυταρίων.

**A****B****Γ**

**ΕΙΚΟΝΑ 11:** Φυτά *Nicotiana tabacum* από ιστοκαλλιέργεια σπόρων που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog, διαφορετικών συγκεντρώσεων ψευδαργύρου, 0 mM (A), 0,1 mM (B) και 0,5 mM (Γ), για 4 μήνες.



**A****B****Γ**

**ΕΙΚΟΝΑ 12:** Φυτά *Nicotiana tabacum* από ιστοκαλλιέργεια σπόρων που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog, διαφορετικών συγκεντρώσεων μολύβδου, 0 mM (A), 0,1 mM (B) και 0,5 mM (Γ), για 4 μήνες.

Παρατηρώντας την εικόνα 11 διαπιστώνουμε ότι τα φυτά που καλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ψευδάργυρο (Zn) σε συγκέντρωση 0,5 mM παρουσίασαν ένα ευδιάκριτο ανοιχτό πράσινο μεταχρωματισμό των φύλλων τους, ευδιάκριτο είναι επίσης και το σύμπτωμα της βραχυγονάτωσης.

Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων μολύβδου αλλά και ψευδαργύρου (0,5 mM) στο θρεπτικό μέσο επηρέασαν αρνητικά την ανάπτυξη των φυτών. Η αρνητική αυτή επίδραση φαίνεται να εξαρτάται από τη συγκέντρωση των στοιχείων, αφού οι μικρότερες συγκεντρώσεις των δύο στοιχείων (0,1 mM) επωφέλησαν τα φυτά.

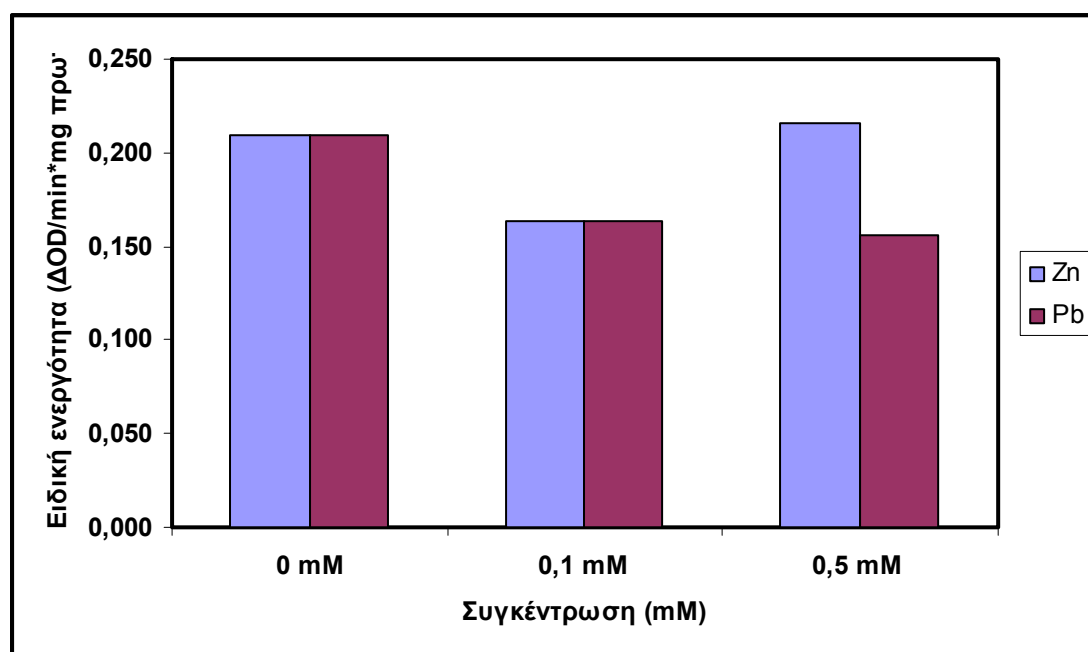
#### **Γ5. Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης στις επεμβάσεις Ψευδαργύρου (Zn) και Μολύβδου (Pb) σε ιστούς *Nicotiana tabacum*.**

Με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών και τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου GDH σε φυτά *Nicotiana tabacum*, χρησιμοποιήσαμε φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας και σε θρεπτικά υποστρώματα συγκεντρώσεως 0, 0,1 και 0,5 mM Zn και 0, 0,1 και 0,5 mM Pb. Ακολούθησε εκχύλιση των πρωτεϊνών από φύλλα και βλαστούς και τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης (GDH) και της ωσμωτίνης.

Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες προσδιορίστηκε με την μέθοδο Lowry. Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εκτιμήθηκε επίσης η ενζυμική ενεργότητα της GDH, μέσω της αμινωπικής αντίδρασης, μετρώντας την μεταβολή της απορρόφησης (ΔOD) στα 340 nm σε φασματοφωτόμετρο. Μέσω της ΔOD υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητα, καθώς και η καταλυτική ενεργότητα σε κάθε ιστό. Τα αποτελέσματα των δύο παραπάνω επεμβάσεων παραθέτονται στον Πίνακα 10.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 10.** Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της GDH, των φυτών *Nicotiana tabacum*, ανα επέμβαση Zn και Pb.

ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ mg/mL	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*50 $\mu$ L	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*mL	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ A $\Delta$ OD/min*mg πρωτ.	$\mu$ mol NADH/min*mg	ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ $\mu$ molNADH/min*g φυτ. ιστού
M	0,44	0,0046	0,092	0,209	0,033	0,059
0,1 mM Zn	0,54	0,0044	0,088	0,163	0,026	0,056
0,5 mM Zn	0,65	0,007	0,140	0,215	0,034	0,090
0,1 mM Pb	0,54	0,0044	0,088	0,163	0,026	0,056
0,5 mM Pb	0,55	0,0043	0,086	0,156	0,025	0,055



**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.** Μεταβολή των τιμών της ειδικής ενεργότητα ( $\Delta$ OD/min\*mg πρωτ.) στους ιστούς του *Nicotiana tabacum*, υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ψευδάργυρου και μολύβδου.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν (Πίνακας 10) διαπιστώνουμε τάση αύξησης της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών, στα φυτά όλων των επεμβάσεων (0,1, 0,5 mM Zn και Pb), σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ψευδάργυρο σε συγκέντρωση 0,5 mM παρουσίασαν την μεγαλύτερη

αύξηση των ολικών πρωτεϊνών (0,65 mg/mL) σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις αλλά και με τον μάρτυρα.

Μελετώντας τον πίνακα παρατηρούμε μείωση της ειδικής ενεργότητας της GDH στις επεμβασίες με μόλυβδο (Pb) αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του στοιχείου. Μείωση παρατηρούμε επίσης στην επέμβαση με συγκέντρωση ψευδαργύρου (Zn) 0,1 mM (0,163 ΔOD/min\*mg πρωτ.), ενώ αντίθετα αύξηση στη συγκέντρωση ψευδαργύρου (Zn) 0,5 mM (0,215 ΔOD/min\*mg πρωτ.). Η χαμηλότερη τιμή της ειδικής ενεργότητας της GDH παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 0,5 mM Pb (0,156 ΔOD/min\*mg πρωτ.). Η υψηλότερη τιμή της ειδική ενεργότητα της GDH παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 0,5 mM Zn (0,215 ΔOD/min\*mg πρωτ.).

Η καταλυτική ενεργότητα παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή της στην επέμβαση 0,5 mM Zn (0,090 μmol NADH/ min\*g φυτ. ιστού). Η τιμή της καταλυτικής ενεργότητας σε όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις είναι σχεδόν η ίδια. Η μικρότερη τιμή καταλυτικής ενεργότητας σε αυτό το φυτικό είδος καταγράφηκε στην επέμβαση 0,5 mM Pb και ήταν 0,055 μmol NADH/ min\*g φυτ. ιστού.

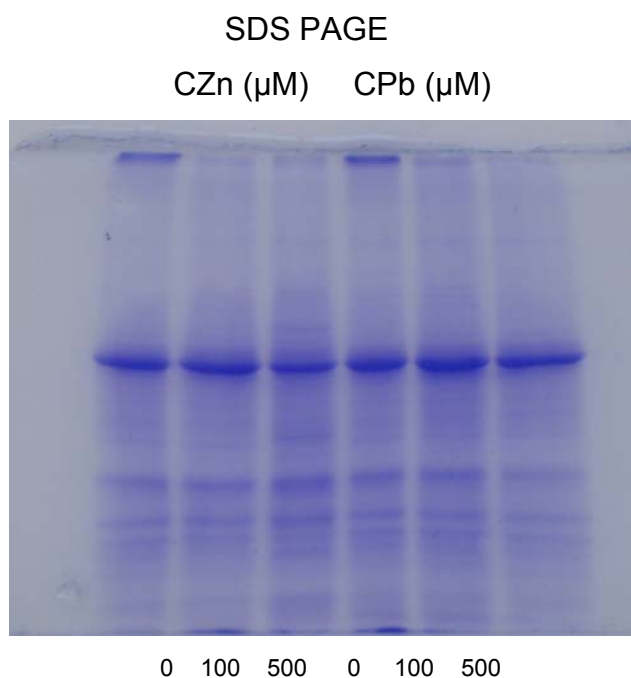
## **Γ6. Επίδραση Ψευδαργύρου (Zn) και Μολύβδου (Pb) στην έκφραση της GDH και της ωσμωτίνης σε φυτά *Nicotiana tabacum*.**

Για την μελέτη της έκφρασης της GDH και της ωσμωτίνης του *Nicotiana tabacum* τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαφόρων δειγμάτων αναλύθηκαν με SDS-PAGE, υποβλήθηκαν Western Blot. Με τη μέθοδο αυτή οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε σταθερό υπόστρωμα, στην προκειμένη περίπτωση μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου στην συνέχεια μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί ανοσολογικά με το κατάλληλο αντίσωμα μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, από το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί.

Ίση ποσότητα ολικών πρωτεϊνών από κάθε δείγμα μετουσιώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε με SDS-PAGE σε επίπεδα πηκτώματα 10 % (GDH) και 12 % (ωσμωτίνη) ακρυλαμίδης, με σκοπό τη ανάλυση των πολυπεπτιδίων τους στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Το πρωτεϊνικό πρότυπο κάθε

δείγματος προέκυψε μετά τη χρώση του πηκτώματος με Coomassie brilliant blue R-250.

Στην Εικόνα 13 παρουσιάζονται τα ολικά πρότυπα που προέκυψαν μετά την SDS-PAGE των εκχυλισμάτων. Μεταξύ των μεταχειρίσεων διακρίνονται αρκετές διαφορές στην ένταση των ζωνών που παρατηρήθηκαν.



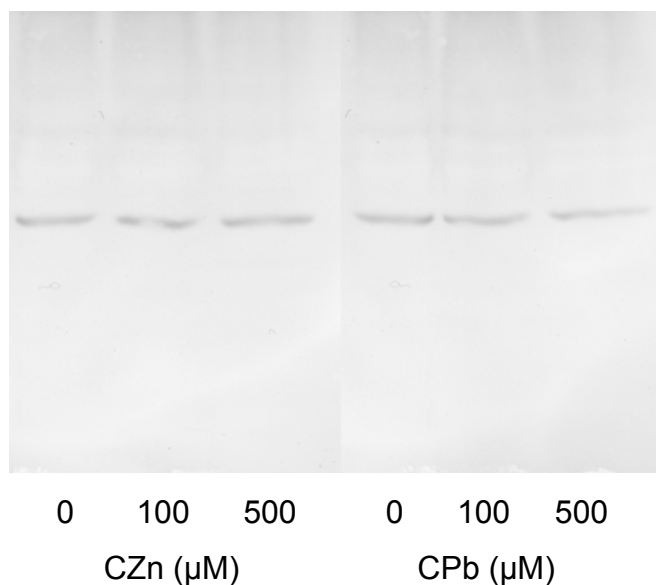
**Εικόνα 13:** Ολικά πρωτεϊνικά πρότυπα φυτικών ιστών από φυτά *Nicotiana tabacum*. Τα πρότυπα προέκυψαν μετά από ανάλυση με SDS-PAGE και χρώση του πηκτώματος Coomassie Brilliant Blue R-250.

Σε όλα τα παραπάνω πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έγινε προσπάθεια ανοσοανίχνευσης (με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν τα ένζυμα GDH και ωσμωτίνη του αμπελιού) και μελέτης των δύο ενζύμων (GDH και ωσμωτίνη) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε ένζυμο στην συνέχεια.

### **Γ6.1. Γλουταμική αφυδρογονάση (GDH)**

Για την μελέτη της GDH τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE (10 %) ακρυλαμίδης και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Western Blot). Μετά την ανοσοανίχνευση της GDH με ειδικό αντίσωμα, αναπτύχθηκε μία ζώνη σε κάθε επέμβαση. Στην Εικόνα 14

παρουσιάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ανοσοανίχνευση της GDH.

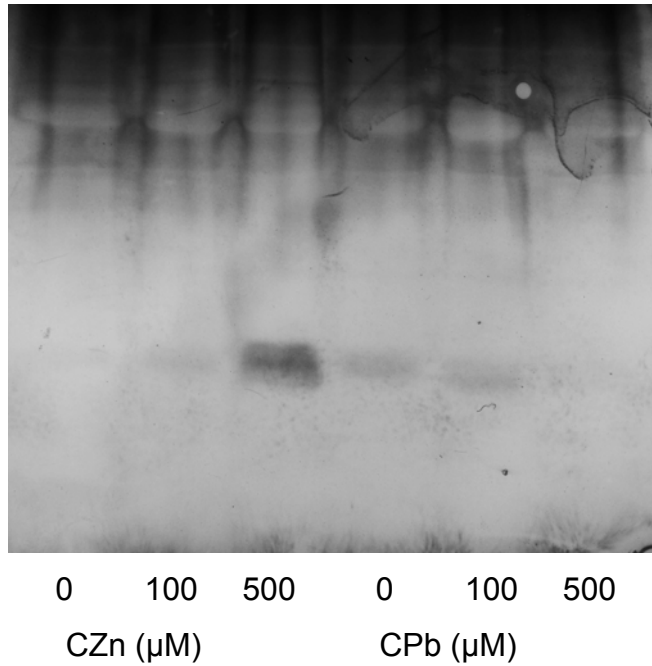


**ΕΙΚΟΝΑ 14** : Πρωτεϊνικές ζώνες της GDH απο φυτικούς ιστούς του *Nicotiana tabacum* που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog συγκεντρώσεως 0, 0,1 και 0,5 mM σε Ψευδράργυρο (Zn) και 0,1 και 0,5 mM σε μόλυβδο (Pb). Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης με την μέθοδο Western Blot. Στο φίλτρο έγινε ανίχνευση της GDH με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Η ποσότητα της ανοσοανιχνευόμενης GDH αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ψευδαργύρου στο υπόστρωμα, ενώ μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του μολύβδου. Η περισσότερη ποσότητα είναι στη συγκέντρωση των 0,5 mM Zn ενώ η μικρότερη στη συγκέντρωση 0,5 mM Pb (Εικόνα 14).

## Γ6.2. Ωσμωτίνη

Οι ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (12 %) και μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στα φίλτρα έγινε ανίχνευση της ωσμωτίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος. Μετά την ανοσοανίχνευση της ωσμωτίνης, αναπτύχθηκαν δύο ζώνες σε κάθε επέμβαση. Στην Εικόνα 15 παρουσιάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ανοσοανίχνευση της ωσμωτίνης.



**ΕΙΚΟΝΑ 15:** Πρωτεϊνικές ζώνες της ωσμωτίνης από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα *Nicotiana tabacum*. Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στο φίλτρο έγινε ανίχνευση της ωσμωτίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Μέσω της εικόνας 15 παρατηρούμε πως η περισσότερη ποσότητα της ανισοανιχνευόμενης ωσμωτίνης είναι στη συγκέντρωση 0,5 mM Zn. Η ποσότητα της ωσμωτίνης στη συγκέντρωση 0,1 mM Zn είναι περισσότερη από τον μάρτυρα αλλά μικρότερη από την συγκέντρωση 0,5 mM Zn. Στη συγκέντρωση 0,1 mM Pb η ποσότητα της ανισοανιχνευόμενης ωσμωτίνης είναι περισσότερη σε σχέση με την ποσότητα που ανιχνεύθηκε στη συγκέντρωση 0,5 mM Pb, αλλά λιγότερη από τον μάρτυρα.

## Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων (Zn, Pb), ως συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας, στην έκφραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης και της ωσμωτίνης σε φυτά *Nicotiana glauca* και *Nicotiana tabacum*.

Η προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων αλάτων Zn και Pb στα υποστρώματα των *in vitro* καλλιεργειών, φαίνεται ότι επηρέασαν την βλάστηση των σπόρων των δύο φυτικών ειδών αλλά και την ανάπτυξη των σπορόφυτων. Συγκεκριμένα η παρουσία βαρέων μετάλλων είχε δυσμενείς επιπτώσεις στην φυτρωτικότητα των σπόρων και των δύο φυτικών ειδών. Όσον αφορά την ανάπτυξη των φυτών *Nicotiana glauca* και τα δύο στοιχεία επηρέασαν αρνητικά το βάρος, το ύψος καθώς και τον αριθμό των φύλλων τους. Η επίδραση των μετάλλων στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών ήταν εντονότερη στις υψηλές συγκεντρώσεις των στοιχείων, όπου σε πολλές περιπτώσεις τα φυτά παρέμειναν καχεκτικά και σχεδόν παραμορφωμένα. Επίσης, αυξανόμενων των συγκεντρώσεων του ψευδαργύρου, παρατηρήθηκε όλο και πιο έντονος ανοιχτός πράσινος μεταχρωματισμός των φύλλων καθώς και λεπτότερα στελέχη. Όσον αφορά την ανάπτυξη των φυτών *Nicotiana tabacum*, οι υψηλές συγκεντρώσεις των δύο στοιχείων (0,5 mM) προκάλεσαν παρεμπόδιση της ανάπτυξης των φυταρίων και επηρέασαν αρνητικά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών. Αντιθέτως τα φυτά στις μικρότερες συγκεντρώσεις των στοιχείων (0,1 mM) δεν παρουσίασαν ευδιάκριτες μεταβολές των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών σε σχέση με τον μάρτυρα.

Η συγκέντρωση των δύο μετάλλων στο μέσο καλλιέργειας, συσχετίστηκε θετικά με την ειδική ενεργότητα και τα επίπεδα πρωτεΐνης της GDH. Συγκεκριμένα στο *Nicotiana glauca*, όλες οι επεμβάσεις με Pb προκάλεσαν την αύξηση της ενεργότητας, όπως επίσης και η επέμβαση Zn σε συγκέντρωση 0,1 mM σε αντίθεση με την συγκέντρωση 0,5 mM Zn που προκάλεσε μείωση της ενεργότητας. Στο *Nicotiana tabacum* όλες οι επεμβάσεις με Pb είχαν αποτέλεσμα την μείωση της ενεργότητας, όπως επίσης και η επέμβαση Zn σε συγκέντρωση 0,1 mM σε αντίθεση με την



συγκέντρωση 0,5 mM Zn που είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας.

Η επαγωγή της GDH και της ωσμωτίνης είναι χαρακτηριστικά φαινόμενα υπό διάφορες συνθήκες καταπόνησης, όπως η αλατότητα, η ανεπάρκεια ύδατος και η γήρανση των φύλλων. Η παρουσία του Zn ή του Pb σε οποιαδήποτε συγκέντρωση στα υποστρώματα της *in vitro* καλλιέργειας των *Nicotiana glauca* και *Nicotiana tabacum* επηρέασε ποσοτικά και τα δύο ένζυμα που μελετήθηκαν. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η περίσσεια βαρέων μετάλλων προκαλεί μια απόκριση καταπόνησης.

Κατά τον ανοσοχαρακτηρισμό της ωσμωτίνης ανιχνεύθηκαν δύο ζώνες. Το γεγονός αυτό οφείλεται είτε στην ύπαρξη δύο διαφορετικών γονιδίων, είτε στο ότι η μία ζώνη (μεγαλύτερου MB) είναι το άωρο πεπτιδίο που δεν έχει εισέλθει στο χυμοτόπιο. Στο *Nicotiana glauca* και στο *Nicotiana tabacum* η αύξηση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου (Zn) προκαλεί επαγωγή στην έκφραση του γονιδίου ή των γονιδίων της ωσμωτίνης, ενώ αντίθετα η αύξηση της συγκέντρωσης του μολύβδου (Pb) προκαλεί καταστολή της έκφρασης.

Η αύξηση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου (Zn) στο θρεπτικό μέσο και των δύο φυτικών ειδών προκαλεί επαγωγή της GDH, σε αντίθεση με την αύξηση της συγκέντρωσης του μολύβδου (Pb) η οποία προκαλεί την καταστολή της έκφρασης της GDH.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της εργασίας αποδεικνύουν την παρουσία της GDH και της ωσμωτίνης στους ιστούς των *Nicotiana glauca* και *Nicotiana tabacum*. Τα επίπεδά τους επηρεάστηκαν σημαντικά από την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων (Zn και Pb) στα θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης των δύο φυτικών ειδών.

Συμπερασματικά, κρίνοντας από παρόμοιες μελέτες επάνω σε άλλα βαρέα μέταλλα και τις επιδράσεις τους σε διάφορα φυτικά είδη, μπορούμε να πούμε ότι η ύπαρξή τους στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των φυτών μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξή τους και να επηρεάσει το ένζυμο της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) αλλά και την ωσμωτίνη, είτε αρνητικά είτε θετικά. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος φαίνεται να συμφωνούν γενικά με αυτές τις μελέτες και τα συμπεράσματά τους.

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Kononowicz AK, Nelson DE, Singh NK, Hasegawa PM and Bressan RA 1992. Regulation of the Osmotin Gene Promoter. *The plant cell* 4: 513-524
- Boominathan R and Doran PM 2003. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol. Bioeng.* 20;83(2):158-67
- Boussama N, Ouariti O, Suzuki A and Ghorbal MH 1999. Cd-stress on nitrogen assimilation. *J. Plant Physiol.* 155: 310-317
- Βουτσινά Α, Πριμηκύριος ΝΙ και Λουλακάκης ΚΑ 2005. Παραγωγή αντισώματος εναντίον της ωσμωτίνης του αμπελιού, (αδημοσίευτο)
- Clemens S 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486
- Cobbett C 2002. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in heavy metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:159-82
- Cunningham SD, Anderson TA, Schwab AP and Hsu FC 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy* 56: 55-114
- Dong Liu, Raghothama KG, Hasegawa PM and Bressan RA 1994. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Plant Biology* 91: 1888-1892
- Gouia H, Suzuki A, Brulfert J, Ghorbal MH 2002. Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. *J. Plant Physiol.* 160:367-376
- Hall JL 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53: 1-11
- Kambhampati MS, Begonia GB, Begonia MFT and Bufford Y 2003 Phytoremediation of a Lead- contaminated soil using morning glory (*Ipomoea lacunose* L.): Effects of a synthetic Chelate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71:379-386
- Kyeongsik Min, Sung Chul Ha, Hasegawa PM, Bressan RA, Dae-Jin Yun and Kyeong Kyu Kim 2004. Crystal Structure of Osmotin, a Plant Antifungal Protein. *Proteins: structure, function and bioinformatics* 54:170-173

- Λουλακάκης ΚΑ 1999. Σημειώσεις εργαστηρίου βιοτεχνολογίας φυτών. Σ.Τ.Ε.Γ. Τ.Ε.Ι. Κρήτης, Ηράκλειο
- Loulakakis ΚΑ 1997. Nucleotide sequence of a *Vitis vinifera* L. cDNA (Accession No. Y10992) encoding for osmotin-like protein. *Plant Physiol.* 113: 1464
- Loulakakis ΚΑ, and Roubelakis-Angelakis Κ.Α 1991. Plant NAD(H)- glutamate dehydrogenase consists of two subunit polypeptides and their participation in the seven isoenzymes occurs in an ordered ratio. *Plant Physiol.* 97: 104-111
- Loulakakis ΚΑ, and Roubelakis-Angelakis Κ.Α 1992. Ammonium- induced increase in NAD(H)-glutamate dehydrogenase activity is caused by *de novo* synthesis of the α-subunit. *Planta* 187: 322-327
- Loulakakis ΚΑ, and Roubelakis-Angelakis Κ.Α 2000. Enzymes of ammonia assimilation in *Vitis vinifera*. *Acta Hort.* 526: 209-223.
- Mahboobi H, Yucel M and Oktem H.A 2002. Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities of resistant and sensitive cultivars of wheat and barley under Boron toxicity. *Journal of plant nutrition* 25(8): 1829-1837
- McGrath D and McCormack RJ 1999. The significance of heavy metal and organic micropollutants in soils. Irish Agriculture and Food Development Authority
- Mejare M and Bulow L 2001. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotech.* 19: 67-73
- Ουζουνίδου ΓΝ 1998. Μελέτη της επίδρασης βαρέων μετάλλων σε αυτοφυή φυτικά είδη μεταλλοφόρων περιοχών της Β. Ελλάδας. Διδακτορική διατριβή
- Ρουμπελάκη–Αγγελάκη ΚΑ 2003. Φυσιολογία φυτών. Πρώτη έκδοση. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο. 260-290
- Salt DE, Smith RD and Raskin I 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643–68
- Suresh B and Ravishankar GA 2004. Phytoremediation - A Novel and Promising Approach for Environmental Clean-up. *Crit. Rev. Biotech.* 24: 97-124

Xu Hu and Reddy ASN 1997. Cloning and expression of a PR5-like protein from Arabidopsis: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Molecular Biology* 34: 949-959

Zenk MH 1996. Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179: 21-30

## ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακας 1.** Αναλυτικές μετρήσεις του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων ανά φυτό *Nicotiana glauca* και ανά επέμβαση ψευδαργύρου (Zn). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

### N. glauca

α/α	ΜΑΡΤΥΡΑΣ Zn			0,1 mM Zn			0,5 mM Zn		
	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ
1	0,0221	3,4	8	0,0718	3,8	10	0,0123	0,4	4
2	0,143	8,4	13	0,0416	4,3	10	0,0119	0,3	7
3	0,0175	3	8	0,0803	5,5	11	0,042	0,3	5
4	0,0803	7,3	10	0,0667	3,8	11	0,0199	1,3	7
5	0,1035	6,2	10	0,0492	2,3	9	0,0086	0,6	6
6	0,0994	7,3	12	0,0531	3,3	9	0,025	0,6	6
7	0,3087	13,6	15	0,0779	5	11	0,017	0,5	4
8	0,0843	7,7	11	0,0261	2,5	8	0,0322	0,6	6
9	0,0917	7,6	11	0,1192	4,9	11	0,0153	0,5	4
10	0,0162	1,7	8	0,0343	3,4	10	0,014	0,6	7
11	0,0889	8,2	11	0,0430	3,6	10	0,008	0,7	4
12	0,1068	6,9	10	0,0408	3,1	10	0,0154	0,6	7
13	0,2261	11	16	0,0603	4,2	11	0,0316	0,4	8
14	0,0608	4,1	10	0,0329	3,4	8	0,0291	0,5	6
15	0,2493	10,3	12	0,0274	2,5	8	0,0224	0,6	4
16	0,0448	3,9	8	0,0170	1,7	8	0,0127	0,7	6
17	0,061	5,2	10	0,0383	3,6	9	0,0634	1,1	8
18	0,0449	5,8	10	0,0227	3,2	8	0,0211	1,1	6
19	0,0777	6,6	12	0,0323	2,2	6			
20	0,0934	6,7	10	0,0170	2,1	8			
21	0,0945	7,1	12	0,0279	3,3	10			
22	0,0876	5,9	11						
23	0,0698	5,7	10						
24	0,0908	3,4	11						
25	0,0567	5,3	11						
26	0,0634	5,1	10						
27	0,0364	3,2	10						
28	0,2379	12,2	16						
29	0,2513	10,9	16						
30	0,0869	9,4	12						
ΜΕΣΟΣ	0,1037	6,77	11,13	0,05	3,41	9,33	0,02	0,63	5,83
STDEV	0,08	2,87	2,24	0,03	1,00	1,39	0,01	0,27	1,38
ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ	0,12	0,72	0,64	0,07	0,47	0,55	0,06	0,25	0,57

**Πίνακας 2.** Αναλυτικές μετρήσεις του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων ανά φυτό *Nicotiana glauca* και ανά επέμβαση μολύβδου (Pb). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

α/α	ΜΑΡΤΥΡΑΣ Pb			0,1 mM Pb			0,5 mM Pb		
	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ
1	1,219	14	15	0,679	11,3	10	0,305	13,4	12
2	0,818	11	12	0,217	9,8	10	0,077	6,2	8
3	0,6	9	8	0,45	13	12	0,14	9	7
4	1	18,5	18	0,96	12,4	10	0,056	7,3	6
5	0,94	12,7	10	0,546	10,6	10	0,14	8,2	7
6	0,662	12,5	10	0,162	10,4	8	0,25	10,3	14
7	1,27	15,9	14	0,37	16,3	12	0,1	7,7	8
8	1,64	20,4	13	0,152	10,5	7	0,07	8	8
9	0,65	12,4	10	0,2	10,7	14	0,43	13,7	14
10	0,7	21,1	16	0,127	8,3	10	0,15	11,1	10
11	0,86	15,9	10	0,11	8,3	8	0,5	16	14
12	0,86	17,6	16	0,14	8,1	6	0,1	9,1	8
13	0,702	13,4	10	0,07	8,2	10	0,27	10,2	8
14	0,9	20,6	18	0,06	7	6	0,24	12,2	12
15	0,76	10,8	11	0,134	6,9	7	0,56	11,8	12
16	0,84	14,2	13	0,132	7,4	8	0,29	11,7	10
17	1,19	18,2	16	0,087	8,2	7	0,37	8,9	10
18	0,823	12,4	11	0,13	11,2	10	0,44	9,9	10
19	0,9	18,3	16	0,09	8,4	8	0,3	11,4	8
20	1,7	14,9	14	0,109	8,8	6	0,4	10,9	10
21	1	18,5	17				0,26	11,1	8
22	0,26	6,5	12				0,44	9,9	10
23	0,54	11,8	10						
<b>ΜΕ</b>									
<b>ΣΟ</b>	0,91	14,81	13,04	0,25	9,79	8,95	0,27	10,36	9,73
<b>Σ</b>									
STDEV	0,89	3,89	2,99	0,22	2,33	2,21	0,27	2,31	2,39
ΤΥΠΙΚΟ	0,90	0,90	0,79	0,22	0,72	0,70	0,27	0,70	0,71
ΣΦΑΛΜ									
Α									

**Πίνακας 3.** Αναλυτικές μετρήσεις του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων ανά φυτό *Nicotiana glauca* και ανά επέμβαση ψευδαργύρου (Zn). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

α/α	ΜΑΡΤΥΡΑΣ			0,1 mM Zn			0,5 mM Zn		
	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ
1	0,795	11,4	9	1,415	9,5	12	0,239	0,4	9
2	0,645	9,5	8	1,75	10,5	11	0,248	0,4	9
3	0,823	9,6	11	1,577	12	11	0,226	0,4	8
4	0,639	8,5	8	0,954	9	11	0,247	0,5	9
5	0,927	9,6	9	1,181	12,3	10	0,421	0,7	9
6	0,817	12,3	9	1,586	10,7	10	0,331	0,6	10
7	1,484	12,6	11	1,021	11	9	0,205	0,4	9
8	0,627	7,7	8	1,487	10,7	11	0,217	0,5	8
9	0,612	8,4	8	1,473	9,5	11	0,176	0,4	10
10	1,561	9	10	1,029	10,2	10	0,495	0,8	11
11	0,631	10,3	8	0,81	8,4	9	0,183	0,6	7
12	0,803	10	9	1,024	10,5	9	0,168	0,3	6
13	0,586	13,5	8	1,05	10	9	0,258	0,4	10
14	1,495	12,1	10	0,711	9,5	8	0,261	0,6	8
15	0,766	10,7	9	0,781	9,7	9	0,266	0,7	9
16	1,017	12	10	1,749	12,6	11	0,384	0,7	10
17	1,027	7,5	9	1,337	9,5	9	0,298	0,3	9
18	0,667	11	8	1,751	10,3	12	0,148	0,3	6
19	1,03	11,1	9	1,175	8,4	12	0,263	0,4	8
20	0,738	10,5	8	1,54	8,7	12	0,234	0,5	10
21	0,697	12,5	8	2	11,4	12	0,403	0,5	10
22	0,678	11,7	8	1,73	12,3	10	0,198	0,4	8
23	0,731	13,5	9	1,759	11,7	11	0,22	0,7	9
24	0,667	12,5	8	1,74	11,1	11	0,209	0,5	9
25	0,989	10,3	10	1,397	11,2	10	0,344	0,5	9
26	1,067	11,5	8	1,647	11,9	10	0,315	0,3	7
27				1,24	10,3	10	0,245	0,4	7
28				1,327	9,4	10	0,222	0,5	8
29				1,198	10	10	0,359	0,3	8
30				1,507	12,1	10	0,189	0,6	10
31				1,454	10	9	0,268	0,5	7
32				1,803	8,7	9	0,179	0,6	10
33				1,289	9,8	9	0,195	0,5	8
34				1,139	7,5	10	0,284	0,5	9
35				0,984	7,2	9	0,164	0,3	9
36				0,93	7	10	0,289	0,7	11
37				1,072	10	10	0,157	0,3	8
38				0,819	8,5	10	0,273	0,7	10
39				1,281	10,5	11	0,229	0,3	6
40							0,27	0,4	10
41									
42									
43									
ΜΕΣΟΣ	0,9	10,7	8,8	1,3	10,1	10,2	0,3	0,5	8,7
STDEV	0,3	1,7	1,0	0,3	1,4	1,0	0,1	0,1	1,3
ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ									

**Πίνακας 4.** Αναλυτικές μετρήσεις του βάρους (mg), του ύψους (mm) και του αριθμού των φύλλων ανά φυτό *Nicotiana glauca* και ανά επέμβαση μολύβδου (Pb). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige and Skoog και οι μετρήσεις έγιναν κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

α/α	ΜΑΡΤΥΡΑΣ			0,1 mM Pb			0,5 mM Pb		
	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ
1	0,795	11,4	9	1,507	9,5	11	0,426	2,6	7
2	0,645	9,5	8	1,439	12,2	11	0,54	8	7
3	0,823	9,6	11	1,614	10,3	12	0,79	10,5	9
4	0,639	8,5	8	1,592	11,4	12	0,652	9,5	7
5	0,927	9,6	9	1,428	11,5	11	0,195	0,3	5
6	0,817	12,3	9	1,791	13,2	12	0,419	6,5	7
7	1,484	12,6	11	1,57	13	11	0,485	7,2	7
8	0,627	7,7	8	1,617	11,5	11	0,482	8	6
9	0,612	8,4	8	1,439	13	11	1,308	7,3	10
10	1,561	9	10	1,574	13,5	11	0,577	10	7
11	0,631	10,3	8	1,325	12,3	12	0,745	9,7	10
12	0,803	10	9	1,329	12	10	0,848	8,7	10
13	0,586	13,5	8	1,726	13,2	12	1,282	10	10
14	1,495	12,1	10	1,364	13,5	11	1,56	8,6	9
15	0,766	10,7	9	1,059	11	10	0,995	10,4	10
16	1,017	12	10	0,888	10,5	9	0,905	12,2	10
17	1,027	7,5	9	1,261	12,9	10	1,042	10,5	10
18	0,667	11	8	1,131	12,4	10	0,569	7,9	8
19	1,03	11,1	9	0,882	12	10	0,951	12,4	10
20	0,738	10,5	8	1,462	12	11	0,52	9	8
21	0,697	12,5	8	1,124	13,3	10	0,604	8,3	7
22	0,678	11,7	8	1,754	9,2	12	0,793	11,2	7
23	0,731	13,5	9	1,067	8,1	11	0,448	9,5	8
24	0,667	12,5	8	2,102	13,3	12	0,607	8,5	8
25	0,989	10,3	10	0,937	9	9	0,509	7	7
26	1,067	11,5	8	0,844	8	10	0,577	6,6	7
27				1,508	12,5	10	1,017	10,5	8
28				1,285	9	12	0,469	7,5	8
29				1,59	10,3	12	1,452	12,1	9
30				1,193	8,5	8	0,521	6,3	7
31				1,783	12,4	12	0,623	8	7
32				1,104	10,1	10	0,608	9,5	6
33				1,044	11,3	11	0,855	8	9
34				1,368	10,7	11	1,036	6,5	11
35				1,308	10,4	11	0,534	4	9
36				1,284	8,1	11	0,795	8,5	10
37				0,822	9,5	12			
38				0,992	9,5	10			
39				1,599	12,5	11			
40				1,029	9,4	11			
41				1,558	10,5	12			
42				1,689	12,9	11			
43				1,43	12,7	11			
ΜΕΣΟΣ	0,9	10,7	8,8	1,4	11,2	10,9	0,7	8,4	8,2
ΣΤΔΕV	0,3	1,7	1,0	0,3	1,7	1,0	0,3	2,5	1,5
ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ									



**Πίνακας 5.** Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH), των φυτών *Nicotiana glauca* και *Nicotiana tabacum*, ανά επέμβαση Zn και Pb.

	ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ mg/mL	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*50 $\mu$ L	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*mL	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ $\Delta$ OD/min*mg πρωτ.	$\mu$ mol NADH/ min*mg	ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ $\mu$ molNADH/ min*g φυτ. ιστού
<i>Nicotiana glauca</i>	M	0,601	0,0098	0,196	0,326	0,052	0,125
	0,1mM Zn	0,646	0,0109	0,218	0,337	0,054	0,140
	0,5mM Zn	0,755	0,005	0,100	0,132	0,021	0,064
	M	0,515	0,007	0,140	0,272	0,043	0,090
	0,1mM Pb	0,50	0,013	0,260	0,520	0,083	0,166
	0,5mM Pb	0,556	0,0143	0,286	0,514	0,082	0,183
<i>Nicotiana tabacum</i>	M	0,44	0,0046	0,092	0,209	0,033	0,059
	0,1mM Zn	0,54	0,0044	0,088	0,163	0,026	0,056
	0,5mM Zn	0,65	0,007	0,140	0,215	0,034	0,090
	0,1mM Pb	0,54	0,0044	0,088	0,163	0,026	0,056
	0,5mM Pb	0,55	0,0043	0,086	0,156	0,025	0,055

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6.** Ποσοστό φυτρωτικότητας σπόρων *Nicotiana tabacum* ανά επέμβαση ψευδαργύρου (Zn) και μολύβδου (Pb).

<i>Nicotiana tabacum</i>	ΕΠΕΜΒΑΣΗ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΦΥΤΡΩΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (%)
	<b>ΜΑΡΤΥΡΑΣ</b>	
	<b>0,1mM Zn</b>	<b>88.6</b>
	<b>0,5mM Zn</b>	<b>90.9</b>
	<b>0,1mM Pb</b>	<b>97.7</b>
	<b>0,5mM Pb</b>	<b>81.8</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.** Ποσοστό φυτρωτικότητας σπόρων *Nicotiana glauca* ανά επέμβαση ψευδαργύρου (Zn) και μολύβδου (Pb).

	ΕΠΕΜΒΑΣΗ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΦΥΤΡΩΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
		(%)
<i>Nicotiana glauca</i>	ΜΑΡΤΥΡΑΣ Zn	100
	0,1mM Zn	87.5
	0,5mM Zn	41.6
	ΜΑΡΤΥΡΑΣ Pb	100
	0,1mM Pb	83.3
	0,5mM Pb	91.6