

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ

Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών

&

Διαχείρισης Περιβάλλοντος



## Πτυχιακή διατριβή

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ  
ΣΤΟΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΦΥΤΩΝ  
ΜΗΔΙΚΗΣ (*Medicago truncatula* L.)

Χρυστάλλα Αντωνίου

**Λεμεσός 2011**



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ

Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών

&

Διαχείρισης Περιβάλλοντος

Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, βιοτεχνολογίας και Επιστήμης

Τροφίμων

## Πτυχιακή διατριβή

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ  
ΣΤΟΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΦΥΤΩΝ  
ΜΗΔΙΚΗΣ (*Medicago truncatula* L.)

Χρυστάλλα Αντωνίου

Επιβλέπων: Δρ. Βασίλειος Φωτόπουλος, Λέκτορας

Συνεπιβλέπουσα: Δρ. Παναγιώτα Φιλίππου

Λεμεσός 2011

## **Πνευματικά δικαιώματα**

Copyright © Χρυστάλλα Αντωνίου, 2011

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

*Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Φυτικής Παραγωγής του τμήματος Γεωπονικών Επιστημών Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων.*

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Δρ Βασίλη Φωτόπουλο ο οποίος στάθηκε δίπλα μου με αμέριστη προσοχή και συμπαράσταση, με καθοδήγησε σε όλα τα στάδια του πειράματος και συνέβαλλε τα μέγιστα ώστε η παρούσα πτυχιακή διατριβή να είναι πλήρης και άρτια. Παράλληλα τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην ερευνητική του ομάδα για ένα μακρύ χρονικό διάστημα.*

*Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Παναγιώτα Φιλίππου, η οποία με καθοδήγησε με ιδιαίτερη φροντίδα κατά την διάρκεια των δυο χρόνων που εργάστηκα κοντά της στο εργαστήριο καθώς και για τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές. Το ενδιαφέρον της, οι παρατηρήσεις της τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας υπήρξαν για μένα πολύτιμα.*

*Ευχαριστώ γενικότερα όλους όσους μοιράστηκαν όλο αυτό τον καιρό τον ίδιο χώρο που όλα αυτά τα χρόνια αποκαλούμε "εργαστήριο". Η άψογη συνεργασία, το ευχάριστο κλίμα, η βοήθειά τους σε θεωρητικά και πρακτικά προβλήματα που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και η ειλικρινής φιλία που μας έδωσε αυτό το διάστημα αποτελούν για μένα πολύτιμη παρακαταθήκη για το μέλλον.*

*Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω το εργαστήριο Βιοχημείας του καθηγητή Δ. Κυριακίδη, του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για την παραχώρηση του χώρου για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ενζυμικής δραστηριότητας με ραδιενεργά ισότοπα.*

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα κάποιους σημαντικούς για μένα ανθρώπους χωρίς τη βοήθεια και συμπαράσταση των οποίων δεν θα ήταν εφικτή η πραγμάτωση της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ τη φίλη μου Μαρία, για τη φιλία και την υποστήριξή της. Ευχαριστώ τέλος τους γονείς μου, για την υποστήριξή τους, ψυχολογική και οικονομική. Κυρίως τους ευχαριστώ για τη συμπαράστασή τους στις δύσκολες στιγμές μου η οποία ήταν καθοριστική για τη συνέχιση των προσπαθειών μου. Τους ευχαριστώ γιατί πίστεψαν στις δυνάμεις μου και με εμπύχωναν σε κάθε προσπάθεια.*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) είναι ένα βιολογικά ενεργό μόριο το οποίο συμμετέχει σε πολυάριθμες βιολογικές διεργασίες. Αναφέρεται ότι προσδίδει προ-οξειδωτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες στα φυτά. Υπάρχουν αρκετές αναφορές οι οποίες αποδεικνύουν την προστατευτική δράση του νιτροπρωσσικού νατρίου (SNP), ενός μορίου-δότη NO, το οποίο δρα ως μόριο σηματοδότης στα φυτά ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν αρχικά προκαταρκτικές αναλύσεις ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη μέθοδος εφαρμογής του SNP. Έπειτα, σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να μελετηθεί η επίδραση της εφαρμογής χαμηλών (100  $\mu$ M) και υψηλών (2.5 mM) συγκεντρώσεων SNP σε ώριμα (40 ημερών) και γηρασμένα (65 ημερών) φυτά μηδικής (*Medicago truncatula* L.), ακολουθούμενη από συνδυασμό φυσιολογικών, βιοχημικών και μοριακών προσεγγίσεων. Οι υψηλές συγκεντρώσεις SNP αύξησαν τη ζημιά σε κυτταρικό επίπεδο, την υπεροξειδωση των λιπιδίων της μεμβράνης (MDA) και τη συγκέντρωση των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), ιδιαίτερα στους γηρασμένους ιστούς. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων των μεταβολιτών προλίνης και της πολυαμίνης πουτρεσκίνης, κάτι που οφείλεται στην αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας των βιοσυνθετικών ενζύμων P5CS και ADC αντίστοιχα.

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο με την οποία εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των αντιοξειδωτικών ενζύμων έδειξε ότι η χαμηλή συγκέντρωση εξωγενούς NO στα ώριμα φυτά οδήγησε σε μια γενική επαγωγή της έκφρασης των αντιοξειδωτικών γονιδίων, ενώ οι αυξημένες συγκεντρώσεις οδήγησαν στην καταστολή αυτών των γονιδίων. Αντιθέτως, τα γηρασμένα φυτά έδειξαν μια ευμετάβλητη ρύθμιση η οποία φαίνεται να εξαρτάται από το χρόνο. Γενικά, τα γηρασμένα φυτά της *Medicago truncatula* παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην προκαλούμενη από το NO οξειδωτική καταπόνηση, προτείνοντας μια εξαρτώμενη από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού καταστολή της ικανότητας του να αντεπεξέλθει στις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου.

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a bioactive molecule involved in numerous biological events, that has been reported to display both pro-oxidant and antioxidant properties in plants. Several reports exist which demonstrate the protective action of sodium nitroprusside (SNP), a NO donor, which acts as a signal molecule in plants responsible for the regulation of the expression of many antioxidant enzymes. Preliminary analyses were carried out in order to determine the optimal method of SNP application. This study subsequently attempted to provide novel insight into the effect to application of low (100 $\mu$ M) and high (2.5mM) concentrations of SNP on mature (40 day) and senescing (65 day) *Medicago truncatula* plants following a combined physiological, biochemical and molecular approach. Higher concentrations of SNP resulted in increased cellular damage levels, lipid peroxidation (MDA) and reactive oxygen species (ROS), further induced in older tissues. In addition, further accumulation in intracellular metabolic proline and putrescine was observed, as a result of an increase in biosynthetic enzyme activity of P5CS and ADC respectively.

Quantitative real-time RT-PCR data examining antioxidant gene expression levels suggest that low concentration of exogenous NO applied in mature leaves leads to an overall induction of antioxidant gene expression, while increasing concentration results in suppression of these genes. Conversely, older plants demonstrate a much more variable regulation which appears to be time-dependent. Overall, senescing *M. truncatula* plants demonstrated greater sensitivity to NO-induced oxidative damage, suggesting a developmental stage-dependent suppression in the plant's capacity to cope with free oxygen and nitrogen radicals.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<i>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</i> .....	<i>iii</i>
<i>ABSTRACT</i> .....	<i>iv</i>
<i>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ</i> .....	<i>v</i>
<i>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ</i> .....	<i>ix</i>
<i>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ</i> .....	<i>x</i>
<i>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</i> .....	<i>xii</i>
<i>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</i> .....	<i>xiii</i>
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Το μονοξείδιο του αζώτου (NO)</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες του μονοξειδίου του αζώτου (NO)</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 Βιοσύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (NO)</b> .....	<b>3</b>
1.3.1 Βιοσύνθεση NO μέσω μη ενζυμικών μεταβολικών οδών.....	4
1.3.2 Βιοσύνθεση NO μέσω ενζυμικών μεταβολικών οδών .....	4
<b>1.4 Ενεργές μορφές αζώτου (RNS)</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5 Λειτουργίες του NO σε αβιοτικές καταπονήσεις</b> .....	<b>9</b>
1.5.1 Ξηρασία .....	9
1.5.2 Αλατότητα .....	11
1.5.3 Υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες.....	12
1.5.4 Υπεριώδης ακτινοβολία (UV-B) .....	13
1.5.5 Βαρέα μέταλλα .....	14
1.5.6 Όζον.....	15
1.5.7 Φώς/σκοτάδι.....	16
<b>1.6 NO ως μόριο μεταγωγής σήματος στα φυτά</b> .....	<b>17</b>
<b>1.7 Συνεργιστική δράση RNS και ROS</b> .....	<b>20</b>
<b>2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>24</b>



<b>2.1</b>	<b>Συνθήκες Ανάπτυξης του πειραματικού φυτού <i>Medicago truncatula</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Αξιολόγηση των διαφόρων μεθόδων εφαρμογής του SNP (Sodium Nitroprusside) στο φυτό <i>M. truncatula</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3</b>	<b>Φυσιολογικές μετρήσεις.....</b>	<b>25</b>
2.3.1	Μέτρηση της αγωγιμότητας των στομάτων .....	25
2.3.2	Μέτρηση του φθορισμού του φωτοσυστήματος Π.....	25
<b>2.4</b>	<b>Ιστοχημικές αναλύσεις .....</b>	<b>25</b>
2.4.1	Ιστοχημική ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) στα φύλλα .....	25
2.4.2	Ιστοχημική ανίχνευση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων των μεμβρανών.....	26
<b>2.5</b>	<b>Βιοχημικές αναλύσεις.....</b>	<b>26</b>
2.5.1	Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφύλλης α, χλωροφύλλης β, καροτενοειδών και ανθοκυανίνης.....	26
2.5.2	Ποσοτικός προσδιορισμός του μονοξειδίου του αζώτου (NO).....	27
2.5.3	Ποσοτικός προσδιορισμός του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	28
2.5.4	Ποσοτικός προσδιορισμός της υπεροξειδωσής των λιπιδίων των μεμβρανών ...	29
2.5.5	Ποσοτικός προσδιορισμός της προλίνης.....	31
2.5.6	Ποσοτικός προσδιορισμός των πολυαμινών με αντίδραση βενζυλίωσης.....	32
2.5.7	Ανάλυση πολυαμινών με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) .....	33
<b>2.6</b>	<b>Ενζυμικές δοκιμές.....</b>	<b>34</b>
2.6.1	Αντίδραση Bradford για ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών.....	34
2.6.2	Μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (ADC) και της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (ODC).....	34
2.6.3	Μέτρηση της ενζυμικής δράσης της Δ <sup>1</sup> -πυρρολινο-5-καρβοξυλο συνθετάσης (P5CS) .....	35
<b>2.7</b>	<b>Μοριακές τεχνικές .....</b>	<b>37</b>
2.7.1	Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA) .....	37
2.7.2	Ποσοτικοποίηση ριβονουκλεϊκού οξέος .....	37
2.7.3	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription) .....	37
2.7.4	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time RT-PCR) .....	39

2.8	Στατιστική Ανάλυση .....	40
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	41
3.1	Επιλογή της κατάλληλης μεθόδου για την εφαρμογή του SNP ως δότης του NO στο φυτό <i>Medicago truncatula</i> .....	41
3.1.1	Εισαγωγή .....	41
3.1.1.1	<i>Medicago truncatula</i> .....	41
3.1.1.2	Νιτροπρωσσικό νάτριο (SNP).....	41
3.1.1.3	Διασυστηματικότητα .....	42
3.1.2	Αποτελέσματα .....	43
3.1.2.1	Μέθοδοι εισαγωγής του SNP ως δότης NO στο φυτό .....	43
3.2	Χωροχρονική μελέτη της επίδρασης του NO στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό της μηδικής σε δυο αναπτυξιακά στάδια .....	45
3.2.1	Εισαγωγή .....	45
3.2.1.1	Φυσιολογικός ρόλος του NO.....	45
3.2.1.2	Αντιοξειδωτική δράση του NO έναντι των ενεργών μορφών οξυγόνου.....	45
3.2.2	Αποτελέσματα .....	47
3.2.2.1	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του μονοξειδίου του αζώτου.....	47
3.2.2.2	Μακροσκοπικές παρατηρήσεις .....	49
3.2.2.3	Επίδραση του NO στις φυσιολογικές παραμέτρους.....	49
3.2.2.4	Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφύλλης και καροτενοειδών .....	52
3.2.2.5	Κυτταρική ζημιά και περιεκτικότητα σε ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) 55	
3.2.2.5.1	Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός της υπεροξειδωσης των λιπιδίων των μεμβρανών.....	55
3.2.2.5.2	Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	58
3.2.2.6	Έλεγχος των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων .....	60
3.3	Επίδραση του εξωγενούς μονοξειδίου του αζώτου στη βιοσύνθεση των μεταβολιτών πολυαμινών και προλίνης.....	62
3.3.1	Εισαγωγή .....	62
3.3.1.1	Πολυαμίνες.....	62
3.3.1.2	Προλίνη .....	65
3.3.2	Αποτελέσματα .....	67

3.3.2.1	Ποσοτικός προσδιορισμός των πολυαμινών .....	67
3.3.2.2	Έλεγχος της ενζυμικής δραστηρότητας της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (ADC) και αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (ODC) .....	70
3.3.2.3	Ποσοτικός προσδιορισμός προλίνης .....	73
3.3.2.4	Έλεγχος της ενζυμικής δραστηρότητας της Δ <sup>1</sup> -πυρρολινο-5- καρβοξυλο συνθεάσης (P5CS) .....	75
<b>4</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>85</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 2-1.</b> Πρόγραμμα HPLC .....	33
<b>Πίνακας 2-2.</b> Αντίστροφη μεταγραφή- Στάδιο 1 <sup>ο</sup> .....	38
<b>Πίνακας 2-3.</b> Αντίστροφη μεταγραφή- Στάδιο 2 <sup>ο</sup> .....	38
<b>Πίνακας 2-4.</b> Χαρακτηριστικά των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση αντιοξειδωτικών γονιδίων. ....	40

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 3.1.</b> Επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου εφαρμογής του SNP σε φυτά <i>Medicago truncatula</i> Jemalong A17 .....	44
<b>Σχήμα 3.2.</b> Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας .....	47
<b>Σχήμα 3.3.</b> Ποσοτικός προσδιορισμός του NO έπειτα από εφαρμογή SNP (100 $\mu$ M και 2,5 mM) σε φυτά <i>M. truncatula</i> 40 και 65 ημερών αντίστοιχα .....	48
<b>Σχήμα 3.4.</b> Μακροσκοπικές, φαινοτυπικές παρατηρήσεις σε φυτά <i>M. truncatula</i> 5 ημέρες μετά την εφαρμογή των διαφορετικών συγκεντρώσεων SNP (100 $\mu$ M και 2,5 mM) σε φυτά 40 και 65 ημερών αντίστοιχα. ....	49
<b>Σχήμα 3.5.</b> Επίδραση του NO στα επίπεδα των χλωροφυλλών σε φυτά <i>Medicago truncatula</i> Jemalong A17 δυο αναπτυξιακών σταδίων μετά από εφαρμογή SNP. Φθορισμός χλωροφύλλης ως δείκτης αποδοτικότητας του φωτοσυστήματος II (PS II) (Fv/Fm) στα φύλλα φυτών 40 και 65 ημερών .....	50
<b>Σχήμα 3.6.</b> Επίδραση του NO στην αγωγιμότητα στομάτων σε φυτά <i>Medicago truncatula</i> Jemalong A17 δυο αναπτυξιακών σταδίων (ώριμα και γηρασμένα) μετά από εφαρμογή SNP. ....	51
<b>Σχήμα 3.7.</b> Περιεκτικότητα των φύλλων σε ολικές χλωροφύλλες ( $\alpha+\beta$ ) μετά από μεταχείριση φυτών <i>M. truncatula</i> με διάφορες συγκεντρώσεις SNP (100 $\mu$ M και 2,5 mM).....	53
<b>Σχήμα 3.8.</b> Περιεκτικότητα των φύλλων σε καροτενοειδή μετά από μεταχείριση φυτών <i>M. truncatula</i> με διάφορες συγκεντρώσεις SNP (100 $\mu$ M και 2,5 mM) .....	54
<b>Σχήμα 3.9.</b> Ποσοτικός προσδιορισμός της υπεροξειδωσις των λιπιδίων μεμβρανών σε φυτά <i>Medicago truncatula</i> Jemalong A17 έπειτα από μεταχείριση με SNP .....	56
<b>Σχήμα 3.10.</b> Ιστοχημική αντίχνευση της υπεροξειδωσις των λιπιδίων των μεμβρανών σε φυτά <i>Medicago truncatula</i> Jemalong A17 έπειτα από μεταχείριση με SNP σε φυτά 65 ημερών.....	57
<b>Σχήμα 3.11.</b> Ποσοτικός προσδιορισμός των ενδοκυττάρων επιπέδων του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε φυτά <i>Medicago truncatula</i> Jemalong A17 έπειτα από μεταχείριση με διαφορετικές συγκεντρώσεις SNP.....	58

<b>Σχήμα 3.12.</b> Ιστοχημική ανίχνευση του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε φυτά <i>Medicago truncatula</i> Jemalong A17 έπειτα από μεταχείριση με διαφορετικές συγκεντρώσεις SNP (φυτά 65 ημερών) .....	59
<b>Σχήμα 3.13.</b> Επίπεδα σχετικής έκφρασης γονιδίων αντιοξειδωτικών ενζύμων ( <i>GST</i> , <i>cAPX</i> , <i>CAT</i> , <i>FeSOD</i> , <i>AOX</i> ) με ανάλυση qRT-PCR σε φυτά <i>M. truncatula</i> 40 και 65 ημερών τα οποία μεταχειρίστηκαν με SNP (100μM και 2,5 mM).....	61
<b>Σχήμα 3.14.</b> Επίπεδα ελεύθερων πολυαμινών σε φυτά <i>M. truncatula</i> , σε φυτά 40 ημερών μετά από μεταχείριση με SNP.....	68
<b>Σχήμα 3.15.</b> Επίπεδα ελεύθερων πολυαμινών σε φυτά <i>M. truncatula</i> 65 ημερών, μετά από μεταχείριση με SNP.....	69
<b>Σχήμα 3.16.</b> Επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης ADC σε φυτά <i>M. truncatula</i> μετά από μεταχείριση με SNP .....	71
<b>Σχήμα 3.17.</b> Επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης της ODC σε φυτά <i>M. truncatula</i> μετά από μεταχείριση με SNP .....	72
<b>Σχήμα 3.18.</b> Επίπεδα προλίνης σε φυτά <i>M. truncatula</i> μετά από μεταχείριση με SNP .....	74
<b>Σχήμα 3.19.</b> Επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας της P5CS σε φυτά <i>M. truncatula</i> .έπειτα από μεταχείριση με SNP.....	76

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.1.</b> Το NO σε υδατικό διάλυμα δρα άμεσα με το O <sub>2</sub> με αποτέλεσμα το σχηματισμό νιτρικών και νιτρωδών .....	3
<b>Εικόνα 1.2.</b> Αντίδραση των μορφών του NO με το O <sub>2</sub> <sup>-</sup> και το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	3
<b>Εικόνα 1.3.</b> Σχηματική απεικόνιση των πιθανών πηγών παραγωγής NO. ....	6
<b>Εικόνα 1.4.</b> NO κάτω από αβιοτικές καταπονήσεις.. ....	8
<b>Εικόνα 1.5.</b> Μονοπάτια μετάδοσης σήματος διαμέσου του NO επαγόμενα από τα διάφορα είδη καταπονήσεων....	20
<b>Εικόνα 2.1.</b> Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης κατά Griess .....	27
<b>Εικόνα 2.2.</b> Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παραγωγής MDA.....	30
<b>Εικόνα 2.3.</b> Διαγραμματική απεικόνιση της αντίδραση μεταξύ MDA και TBA για τη δημιουργία του χρωμογόνου συμπλόκου MDA-2TBA. ....	30
<b>Εικόνα 2.4.</b> Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας του χρωμογόνου συμπλόκου νινυδρίνης – αμινοξέος. ....	32
<b>Εικόνα 2.5.</b> Σχηματική αναπαράσταση της βενζυλίωσης πολυαμινών .....	33
<b>Εικόνα 2.6.</b> Σχηματική απεικόνιση του μεταβολικού μονοπατιού παραγωγής της προλίνης με τη χρήση του ενζύμου P5CS .....	36
<b>Εικόνα 3.1.</b> <i>Medicago truncatula</i> Jemalong A17 .....	41
<b>Εικόνα 3.2.</b> Νιτροπρωσσικό νάτριο (SNP).....	42
<b>Εικόνα 3.3.</b> Σχηματική απεικόνιση της βιοσύνθεσης πολυαμινών .....	65

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABA.:	Αμπισισσικό οξύ
Act II:	Ακτίνη II
ADC:	Αποκαρβοξυλάση της αργινίνης
ANOVA:	Ανάλυση της διακύμανσης
AOX:	Εναλλακτική οξειδάση
cAPX:	Ασκορβική υπεροξειδάση του κυτταροπλάσματος
CAT:	Καταλάση
c-PTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
DAB:	3-διαμινοβενζιδίνη
DAO:	Οξειδάση της διαμίνης
DMSO:	Διμέθυλο-σουλφοξείδιο
FeSOD:	Δισμουτάση του υπεροξειδικού ανιόντος (Fe)
GST:	Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
GSNO	S-νιτροσυγλουταθειόνη
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
HO· :	Ρίζα του υδροξυλίου
HPLC:	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
MDA:	Μηλονική διαλδεύδη
NiR	Αναγωγή του νιτρώδους
NO:	Μονοξείδιο του αζώτου
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Τριοξείδιο διαζώτου
NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> :	Νιτρώδες κατιόν
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	Νιτρώδες ανιόν



NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> :	Νιτρικό ανιόν
NO <sup>+</sup> :	Κατιόν μονοξειδίου του αζώτου
NO <sub>2</sub> :	Διοξείδιο του αζώτου
NOS:	Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
NR:	Νιτρική αναγωγή
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> :	Μονήρες οξυγόνο
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	Υπεροξειδικό ανιόν
ODC:	Αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης
ONOO <sup>-</sup> :	Υπεροξυνιτρώδες ανιόν
P5CS:	Δ <sup>1</sup> -πυρρολινο-5-καρβοξυλο συνθετάση
Put:	Πουτρεσκίνη
RNS:	Ενεργές μορφές αζώτου
ROS:	Ενεργές μορφές οξυγόνου
SNP:	Νιτροπρωσσικό νάτριο
SNOs	S-νιτροζοθειόλες
Spd:	Σπερμιδίνη
Spm:	Σπερμίνη

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Το μονοξείδιο του αζώτου (NO)

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένα βιολογικά ενεργό μόριο σηματοδότης που υπάρχει στο μεταβολισμό τόσο των θηλαστικών όσο και των φυτών. Στα κύτταρα των θηλαστικών μελετήθηκε η εμπλοκή του σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες όπως η μετάδοση νευρικών σημάτων και η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Schmidt and Walter, 1994). Η πρώτη αναφορά για τη διερεύνηση της δράσης του NO στην ανάπτυξη των φυτών έγινε από τον Klepper (1975) στη σόγια (*Glycine max* L. Merrill). Το 1992 ονομάστηκε ως «Το μόριο της χρονιάς» από την επιστημονική κοινότητα και από τότε άρχισε μια εντατική έρευνα για τη βιολογία του μορίου NO, με έμφαση στη μελέτη της επίδρασης του NO ως μόριο σηματοδότης στα φυτά (Delledonne *et al.*, 1998).

Το NO συμμετέχει σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες εντός του φυτικού κυττάρου, όπως η βλάστηση και η ανάπτυξη του φυτού (Beligni and Lamattina, 2000; Neill *et al.*, 2003; Zanardo *et al.*, 2005), στη διαδικασία της λιγνινοποίησης των κυτταρικών τοιχωμάτων (Ferrer and Ros Barcelo, 1999), καθώς και στην οργανογένεση των ριζών (Pagnussat *et al.*, 2002). Επίσης συμμετέχει στην άνθηση, στην ωρίμανση, στο γηρασμό των οργάνων (Arasimowicz *et al.*, 2007), στην εγγενή αναπαραγωγή (Grün *et al.*, 2006), και στη διακοπή του λήθαργου των σπόρων (Bethke *et al.*, 2006). Σημαντική είναι τέλος η επίδρασή του στην απόκριση του φυτού σε αβιοτική και βιοτική καταπόνηση.

## 1.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες του μονοξειδίου του αζώτου (NO)

Το NO είναι ένα από τα μικρότερα διατομικά μόρια σε αέρια μορφή. Περιλαμβάνει ένα ασύζευκτο ζεύγος  $e^-$  στην  $\pi_2$  τροχιακή ηλεκτρονιακή στιβάδα αλλά παραμένει με τη μορφή αφόρτιστου μορίου. Ως μόριο παρουσιάζει τόσο υδρόφιλες όσο και λιπόφιλες ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές του προσδίδουν την ικανότητα διάχυσης τόσο διαμέσου υδρόφιλων περιοχών ( $4.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$  στο νερό) όπως το κυτταρόπλασμα, όσο και διαμέσου λιπόφιλων περιοχών της μεμβράνης (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007). Έτσι το NO μπορεί να διέλθει εύκολα από κύτταρο σε κύτταρο και να δρα ως διακυτταρικός και ενδοκυτταρικός αγγελιοφόρος, ρυθμίζοντας τις διάφορες φυσιολογικές και βιοχημικές διαδικασίες. Ο χρόνος ημιζωής του NO σε βιολογικά συστήματα είναι 6

sec (Bethke *et al.*, 2004). Σε αυτό το σχετικά μικρό χρονικό διάστημα αντικατοπτρίζεται η υψηλή δραστηριότητα του, αντιδρώντας άμεσα με μεταλλικά σύμπλοκα και ελεύθερες ρίζες καθώς και έμμεσα ως ενεργή μορφή αζώτου (Reactive Nitrogen Species - RNS) με νουκλειϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια (Wick and Michell, 1998).

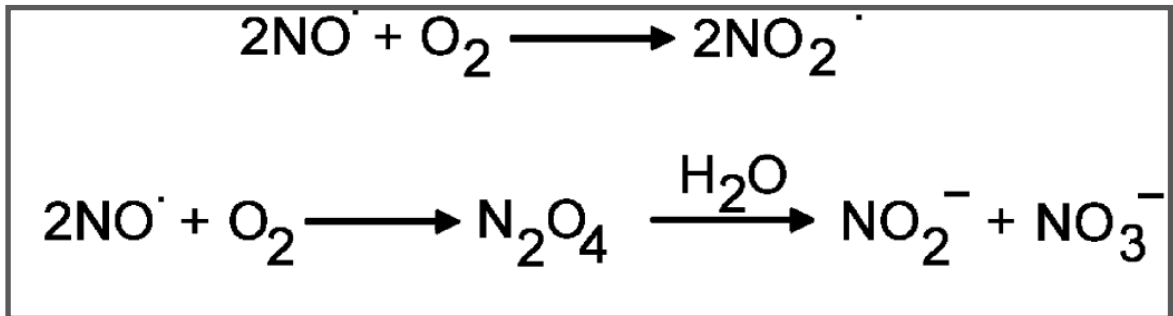
Εντός του κυττάρου μπορεί να υιοθετήσει τρεις ενεργειακά ευνοούμενες ηλεκτρονικές μορφές: ρίζα ( $\text{NO}^\cdot$ ), κατιόν ( $\text{NO}^+$ ) και ανιόν ( $\text{NO}^-$ ) (Stamleret *et al.*, 1992; Wojtaszek, 2000).

Στα βιολογικά συστήματα το  $\text{NO}^\cdot$  αντιδρά άμεσα με το  $\text{O}_2$  και με μεταβατικά μέταλλα. Η αντίδραση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό ενώσεων του τύπου  $\text{NO}_x$  ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ , και  $\text{N}_2\text{O}_4$ ) πολύ δραστηκότερες από το  $\text{NO}^\cdot$  (εικόνα 1.1). Τα μόρια αυτά στη συνέχεια αντιδρούν με τις αμίνες του κυττάρου και με τις σουλφυδρλικές ομάδες των πρωτεϊνών ή υδρολύονται σε νιτρικά ( $\text{NO}_3^-$ ) και νιτρώδη ιόντα ( $\text{NO}_2^-$ ). Για τα λόγο αυτό τα νιτρικά ( $\text{NO}_3^-$ ) και νιτρώδη ιόντα ( $\text{NO}_2^-$ ) χρησιμοποιούνται συνήθως ως δείκτες του παραγόμενου  $\text{NO}$  (Neill *et al.*, 2003). Τόσο το  $\text{NO}^\cdot$  όσο και το  $\text{NO}_2^\cdot$  εύκολα αποβάλλουν το μονήρες ηλεκτρόνιο τους και σχηματίζουν το κατιόν μονοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}^+$ ) και το κατιόν διοξειδίου αζώτου ( $\text{NO}_2^+$ ), αντίστοιχα (Wojtaszek, 2000).

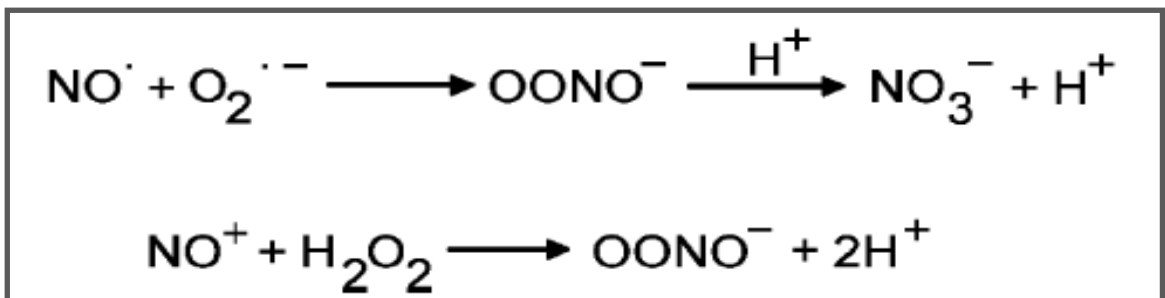
Σε συνθήκες ακραίων περιβαλλοντικών αλλαγών το  $\text{NO}$  μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, αντιδρώντας με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) (Laspina *et al.*, 2005) όπως το  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ή ως μόριο σηματοδότης επηρεάζοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (Lamatina *et al.*, 2003; Laspina *et al.*, 2005).

Στη παρουσία υπεροξειδωτικών ανιόντων ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) και υπεροξειδίου του υδρογόνου  $\text{H}_2\text{O}_2$  εντός του κυττάρου, το  $\text{NO}$  με τη μορφή ελεύθερης ρίζας ( $\text{NO}^\cdot$ ) ή κατιόντος ( $\text{NO}^+$ ) αντιδρά αντίστοιχα με τις πιο πάνω ενώσεις σχηματίζοντας υπερνιτροζικά ανιόντα ( $\text{ONOO}^-$ ) (εικόνα 1.3). Τα υπερνιτροζικά ανιόντα είναι προϊόντα με επιβλαβή δράση. Ο μεγάλος σχετικά χρόνος ημιζωής (περίπου 1s) τους δίνει την ικανότητα να διαχέονται σε μεγάλες αποστάσεις εντός του κυττάρου, αντιδρώντας με τις σουλφυδρλικές ομάδες των πρωτεϊνών και τις ρίζες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των μεμβρανών προκαλώντας σημαντικές καταστροφές του κυττάρου. Σε φυτικά κύτταρα που επικρατούν μεγάλες ποσότητες το  $\text{O}_2^{\cdot-}$  η ένταση των καταστροφικών συμπτωμάτων είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τη παρουσία του  $\text{NO}$  και του  $\text{ONOO}^-$  (Wink *et al.*, 1993). Παράλληλα το

ONOO<sup>-</sup> μπορεί να εξουδετερωθεί παρουσία ασκορβικού και γλουταθειόνης (Shamsul *et al.*, 2010).



**Εικόνα 1.1.** Το NO σε υδατικό διάλυμα δρα άμεσα με το O<sub>2</sub> με αποτέλεσμα το σχηματισμό νιτρικών και νιτροδών (Neill *et al.*, 2003).



**Εικόνα 1.2.** Αντίδραση των μορφών του NO με το O<sub>2</sub><sup>·-</sup> και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το NO με τη μορφή ελεύθερης ρίζας (NO<sup>·</sup>) αντιδρά με το O<sub>2</sub><sup>·-</sup> ενώ με τη μορφή κατιόντος (NO<sup>+</sup>) αντιδρά με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παράγοντας το ασταθές μόριο ONOO<sup>-</sup> (Neill *et al.*, 2003).

### 1.3 Βιοσύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (NO)

Υπάρχουν διάφορες πιθανές πηγές NO που μπορούν να εμπλακούν στο μεταβολισμό των φυτών. Ανάλογα με την προέλευση των πηγών αυτών διακρίνονται στις εξωγενείς και ενδογενείς πηγές. Ως εξωγενείς πηγές NO θεωρούνται αυτές που βρίσκονται στο περιβάλλον ανάπτυξης του φυτού. Τα φυτά μπορούν να πάρουν το NO τόσο από το έδαφος όσο και από την ατμόσφαιρα. Πηγή NO στο έδαφος μπορεί να θεωρηθεί ο κύκλος του αζώτου που πραγματοποιείται με την επέμβαση των μικροοργανισμών (Wojtaszek, 2000). Παράλληλα, NO στην ατμόσφαιρα παράγεται με τις διαδικασίες της νιτροποίησης - απονιτροποίησης. Η νιτροποίηση του κατιόντος αμμωνίας (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) στην ατμόσφαιρα αποτελεί τη μεγαλύτερη πηγή NO<sub>2</sub>. Το NO σχηματίζεται ακολούθως ως παραπροϊόν της οξείδωσης του NO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα (Durner and Klessig, 1999) (εικόνα 1.2).

Σημαντική πηγή NO στα φυτά θεωρείται και το ενδογενώς παραγόμενο NO. Υπάρχουν διάφορες ενδογενείς πηγές NO. Ο καθορισμός της σημαντικότητας της κάθε πηγής στη φυσιολογική παραγωγή του NO είναι ανάλογη με: το είδος του φυτού, το κύτταρο/ιστό, τις συνθήκες κάτω από τις οποίες αναπτύσσεται το φυτό και το μεταβολικό μονοπάτι που ενεργοποιείται κάτω από τις υπάρχουσες συνθήκες. Γενικότερα η παραγωγή NO στα φυτά μπορεί να ταξινομηθεί σε δυο οδούς: την ενζυμική, στην οποία χρειάζεται η παρουσία ενζύμου για τη παραγωγή NO και τη μη ενζυμική οδό, όπου το NO δημιουργείται κάτω από συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες με χημικές αντιδράσεις.

### **1.3.1 Βιοσύνθεση NO μέσω μη ενζυμικών μεταβολικών οδών**

Το NO μπορεί να παραχθεί μέσω μη ενζυμικών μεταβολικών οδών κάτω από συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες. Όπως έχει αποδειχθεί από τους Bethke *et al.* (2004) σε όξινες ή αναγωγικές συνθήκες στον αποπλάστη, το NO<sub>2</sub> μετατρέπεται σε NO με τη μεσολάβηση ενός σταδίου παραγωγής νιτρώδους οξέος το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με έναν αναγωγικό παράγοντα. Στη περίπτωση που ως αναγωγικός παράγοντας δρα το ασκορβικό οξύ παράγονται ως τελικά προϊόντα της αντίδρασης το διυδροασκορβικό οξύ και το NO (Bethke *et al.*, 2004) (εικόνα 1.2).

Ένας δεύτερος τρόπος παραγωγής NO είναι η μετατροπή του NO<sub>2</sub> σε NO παρουσία φωτός εξαιτίας της δράσης των καροτενοειδών (Cooney *et al.*, 1994; Wojtaszek, 2000). Η αντίδραση αυτή συμβαίνει σε όξινες συνθήκες και σε ορισμένα μόνο κυτταρικά οργανίδια και η αναγωγική ουσία που χρησιμοποιείται από το κύτταρο πιθανώς να είναι κάποιος πολυσακχαρίτης (Nishimura *et al.*, 1986) ή το ασκορβικό οξύ (Crawford, 2006) (εικόνα 1.2).

### **1.3.2 Βιοσύνθεση NO μέσω ενζυμικών μεταβολικών οδών**

Στα φυτά η μεγαλύτερη ενδογενής παραγωγή του NO πραγματοποιείται μέσω δύο κυρίως ενζύμων, της νιτρικής αναγωγάσης (NR) και της νιτρώδους αναγωγάσης (NiR), τα οποία είναι εξαρτώμενα της παρουσίας του NAD(P)H ως συνένζυμο (Yamasaki *et al.*, 1999). Η NR ήταν το πρώτο ένζυμο με το οποίο γνωστοποιήθηκε ο μηχανισμός παραγωγής NO στα φυτά. Με τη δράση των πιο πάνω ενζύμων τα νιτρικά ιόντα (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) αρχικά μετατρέπονται σε νιτρώδη (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) και ακολούθως τα τελευταία μετατρέπονται σε NO (Crawford, 2006) (εικόνα 1.2). Ως αποτέλεσμα, η παραγόμενη ποσότητα NO είναι

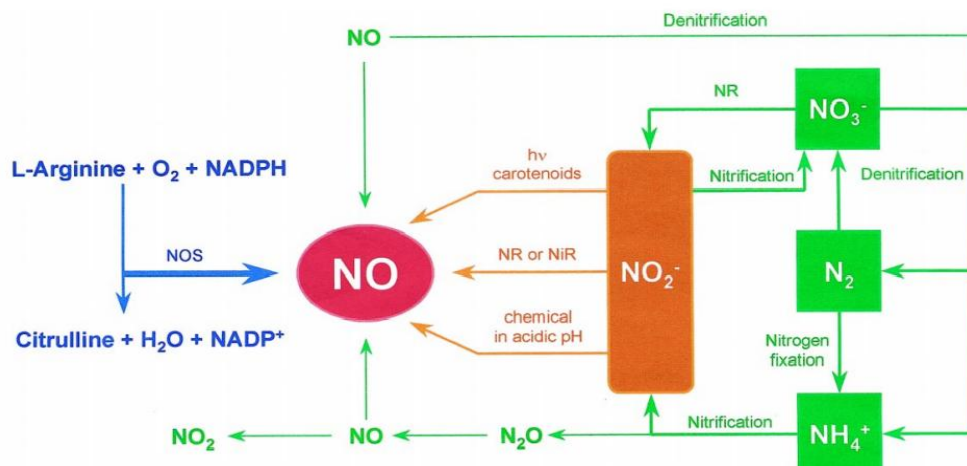
αυστηρά εξαρτώμενη από την παρούσα ποσότητα νιτρικών και νιτρωδών. Η παραγωγή NO με τη δράση του ενζύμου NR αναφέρεται σε πολλά είδη φυτών όπως η αγγουριά (Haba *et al.*, 2001), ο ηλιάνθος, το σπανάκι, το καλαμπόκι (Rockel *et al.*, 2002) και το *Arabidopsis thaliana* (Desikan *et al.*, 2002).

Στα ανώτερα φυτά η NR απαντάται κυρίως ως ομοδιμερές με μοριακή μάζα 100-115 kDa η κάθε υπομονάδα, παρόλο που σε μερικά είδη απαντάται ως τετραμερές και περιέχει τρεις προσθετικές ομάδες: τη FAD, την αίμη και ένα σύμπλοκο μολυβδαινο-κοβαλτίου. Η NR εικάζεται ότι δομείται από περιοχές με αυτόνομη ενζυμική δράση (Neill *et al.*, 2003). Η δραστηριότητα του ενζύμου αυτού αποδείχτηκε τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Courtois *et al.*, 2008).

Άλλα είδη ενζύμων που συμπεριλήφθηκαν στον κατάλογο των ενζύμων που καταλύουν την παραγωγή του NO είναι η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (XOR), ή αλλιώς οξειδάση της ξανθίνης (XO) ή αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH) (Harrison, 2002; Corpas *et al.*, 2001) και η αναγωγή-NO (Ni-NOR) (Stohr *et al.*, 2001). Η XOR βρίσκεται στα υπεροξεισωμάτια των φυτών. Όπως και στην περίπτωση της NR, η XOR είναι ένα οξειδοαναγωγικό ένζυμο με μεταλλικό συμπάραγοντα μολυβδαινίου όπου σε συνθήκες ανοξίας ευνοεί τη μετατροπή του NO<sub>2</sub> σε NO<sup>•</sup> (Godber *et al.*, 2000), ενώ παρουσία O<sub>2</sub> παράγεται το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (που στη συνέχεια μετατρέπεται σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Για το λόγο αυτό, σε αναγωγικές συνθήκες εξαιτίας του ανταγωνισμού για τα ηλεκτρόνια, το ένζυμο παράγει τόσο NO όσο και O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Όσον αφορά την αναγωγή-NO (Ni-NOR), είναι ένα ένζυμο το οποίο αναγνωρίστηκε στις ρίζες φυτών καπνού και καταλύει την αντίδραση παραγωγής NO στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες των ριζών. Η προέλευση του συγκεκριμένου ενζύμου παραμένει άγνωστη.

Ανάλογο ένζυμο που εμπλέκεται στη παραγωγή NO στους ζωικούς ιστούς είναι η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Οι NOS είναι μια ομάδα ενζύμων που περιλαμβάνει τρία ισοένζυμα: α) τη ενδοθηλιακή eNOS, β) την nNOS που πρώτη φορά ταυτοποιήθηκε σε νευρικό ιστό και γ) iNOS ή mNOS που είναι μια επαγόμενη μορφή παρουσία λιποπολυσακχαριτών ή ιντερφερόνης (Furchgott, 1995). Η παρουσία μιας μιτοχονδριακής ισομορφής mtNOS έχει επίσης αναφερθεί στο παρελθόν (Tatoyan & Ginlivi, 1998). Η NOS απαντάται στο κυτταρόπλασμα ή στην κυτταρική μεμβράνη και καταλύει την οξείδωση της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη και NO παρουσία NADPH και O<sub>2</sub> (Furchgott, 1995; Wendehenne *et al.*, 2001) (εικόνα 1.2).

Σήμερα ένα από τα πιο αμφισβητούμενα ζητήματα είναι η ύπαρξη ή μη της NOS στα φυτά. Μέχρι πρόσφατα, παρόλο που δεν έχει αποδειχθεί, εθεωρείτο πιθανή η ύπαρξη στους φυτικούς ιστούς μιας NOS όπως αυτή των ζωικών ιστών που καταλύει την παραγωγή του NO με υπόστρωμα την L-αργινίνη. Αν και διάφορες μελέτες υποστήριξαν αυτή την πιθανότητα, το 2003 αναφέρθηκε ότι δύο τύποι NOS που αναγνωρίστηκαν σε φυτικούς ιστούς (iNOS και AtNOS1) δεν είναι ομόλογοι με τη NOS των ζωικών ιστών αλλά ίσως να δρουν μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού παραγωγής της L-αργινίνης και στη συνέχεια σύνθεσης του NO (Yamasaki, 2005).



Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση των πιθανών πηγών παραγωγής NO (Wojtasze, 2000).

#### 1.4 Ενεργές μορφές αζώτου (RNS)

Ο όρος ‘ενεργές μορφές αζώτου’ περιλαμβάνει το NO και άλλα μόρια τα οποία σχετίζονται με το NO όπως S-νιτροζοθειόλες (SNOs), S-νιτροζογλουταθειόνη (GSNO), υπεροξεινιτρώδες ανιόν (ONOO<sup>-</sup>), τριοξείδιο διαζώτου (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) και διοξείδιο του αζώτου (NO<sub>2</sub>) τα οποία έχουν παρόμοια δράση σε πληθώρα φυσιολογικών διαδικασιών στα ζωικά και φυτικά κύτταρα (Corpas *et al.*, 2007; Halliwell *et al.*, 2007).

Οι S-νιτροζοθειόλες (SNOs) και συγκεκριμένα η GSNO φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στη βιοχημεία του NO γιατί μπορεί να λειτουργήσει ταυτόχρονα τόσο ως ενδοκυττάρια δεξαμενή NO καθώς και ως μεταφορέας του NO διαμέσου του κυττάρου

(Singh *et al.*, 1996). Στο πλαίσιο αυτό η αντίδραση της *S-trans*-νιτροσουλίου θεωρείται ο κύριος μηχανισμός δράσης των SNOs (Liu *et al.*, 1998). Ως αποτέλεσμα τα SNOs μπορούν να συμμετέχουν σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις διαδικασίες μετάδοσης σήματος εντός του κυττάρου κάτω από διάφορες φυσιολογικές και φυτοπαθολογικές συνθήκες. Παρόλα αυτά στα ανώτερα φυτά οι διαθέσιμες πληροφορίες για τον μεταβολισμό των SNOs και RNS γενικότερα είναι ακόμα περιορισμένες συγκριτικά με τα ζωικά συστήματα.

Ο όρος οξειδωτική καταπόνηση χρησιμοποιείται για να περιγράψει την κυτταρική ζημιά που προκαλείται από την υπερπαραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS). Παράλληλα ο όρος νιτροδοτική καταπόνηση (nitrosative stress) χρησιμοποιείται για να περιγράψει παρόμοιες διαδικασίες που προκαλούνται από την υπερπαραγωγή NO και άλλων μορίων-παραγώγων του NO, όταν το φυτό αναπτύσσεται κάτω από συνθήκες καταπόνησης. Όταν το φυτό βρίσκεται κάτω από συνθήκες νιτροδοτικής καταπόνησης παράγονται μόρια όπως, νιτροτυροσίνη, νιτροσουλωμένες σε τυροσίνη πρωτεΐνες, και επίπεδα νιτρικών/νιτρωδών που χρησιμοποιούνται ως δείκτες καταπόνησης (Valderrana *et al.*, 2007; Corpas *et al.*, 2011).

Η παραγωγή του NO και των άλλων μορίων-παραγώγων του NO είναι έντονη κατά τη διάρκεια των διαφόρων αβιοτικών καταπονήσεων όπως αλατότητα, ξηρασία, χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες και τραυματισμού του φυτικού ιστού. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω το NO μπορεί να παραχθεί με τη μεσολάβηση δυο βασικών ενζύμων, της NOS-like (αφού δεν έχει αποδειχτεί η ύπαρξη NOS σε φυτά) με υπόστρωμα την L-αργινίνη και της NR με υπόστρωμα τα νιτρικά ή νιτρώδη, χρησιμοποιώντας ως αναγωγικό παράγοντα το NADPH. Εναλλακτικά το NO μπορεί να παραχθεί από το μεταβολικό μονοπάτι των πολυαμινών με τη χρήση της L-αργινίνης (εικόνα 1.3).

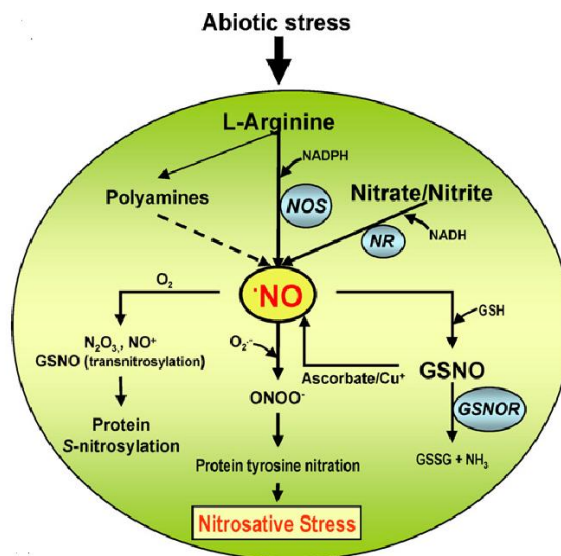
Ακολούθως, από το NO σχηματίζεται η GSNO με τη δράση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GSH) παρουσία O<sub>2</sub>. Ο μεταβολίτης αυτός αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα μόρια μεταφοράς του NO εντός του κυττάρου εξαιτίας της έντονης κινητικότητας του (Wang *et al.*, 2006). Η ποσότητα του GSNO εντός του κυττάρου ρυθμίζεται από το ένζυμο αναγωγάση της GSNO (GSNOR), το οποίο μετατρέπει την GSNO σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) και αμμωνία (NH<sub>3</sub>) (Lui *et al.*, 2001). Εναλλακτικά, το GSNO μπορεί να οδηγήσει στη παραγωγή NO παρουσία κάποιου



αναγωγικού παράγοντα όπως η GSH ή το ασκορβικό οξύ και ιόντων χαλκού ( $\text{Cu}^+$ ) (εικόνα 1.3) (Smith and Dasgupta, 2000).

Εναλλακτικά, το NO μπορεί να αντιδράσει με τις σουλφυδρυλομάδες της κυστεΐνης των πρωτεϊνών (S-νιτροσυλίωση) μεταβάλλοντας τη λειτουργία τους. Αυτή η ομοιοπολική τροποποίηση δεν είναι μια άμεση αντίδραση του NO με της σουλφυδρυλομάδες και θα μπορούσε πιθανότατα να πραγματοποιηθεί δια μέσου του σχηματισμού  $\text{N}_2\text{O}_3$  παρουσία  $\text{O}_2$  ή δια μέσου του  $\text{NO}^+$  ή από διαδικασία τρανσνιτροσυλίωσης μεταξύ του GSNO και άλλων ενώσεων (εικόνα 1.3) (Martinez-Ruiz and Lamas, 2009).

Επιπλέον το NO εντός του κυττάρου μπορεί να αντιδράσει με τις ρίζες υπεροξειδίου και να δημιουργήσει το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ( $\text{ONOO}^-$ ), ένα ενεργό οξειδωτικό μόριο το οποίο μπορεί να νιτροσυλιώσει το αμινοξύ τυροσίνη δημιουργώντας μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αυτή η τροποποίηση συμπεριλαμβάνει την προσθήκη της ομάδας αζώτου (N) σε ένα από τους δυο ισοδύναμους άνθρακες που βρίσκονται στην όρθο-θέση του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης (εικόνα 1.3) (Radi, 2004). Εν κατακλείδι, σε συνθήκες καταπόνησης τα RNS παράγονται στις διάφορες μορφές τους και δημιουργούν τις πιο πάνω τροποποιήσεις ως απόκριση του κυττάρου στη νιτροδωτική καταπόνηση που υφίσταται.



**Εικόνα 1.4.** NO κάτω από αβιοτικές καταπονήσεις. GSNOR: αναγωγή της S-νιτροσουλφουταθειόνης,  $\text{NO}^+$ : ανιόν μονοξειδίου του αζώτου, NOS: συνθάση του NO, NR: νιτρική αναγωγή (Corpas et al., 2011).

## 1.5 Λειτουργίες του NO σε αβιοτικές καταπονήσεις

Σχεδόν όλα τα είδη καταπονήσεων επάγουν την παραγωγή ελευθέρων ενεργών ριζών και άλλων οξειδωτικών μορίων. Πιο συγκεκριμμένα η παραγωγή τους πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες, τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξεισώματα (Mano, 2002), έχοντας ως αποτέλεσμα την οξειδωτική καταπόνηση λόγω των αυξημένων επιπέδων ROS στα κύτταρα (Mittler, 2002). Τα ROS ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους στο κύτταρο μπορεί να συμμετέχουν σε οξειδωτικές διαδικασίες καταστροφικές για το κύτταρο, αλλά ταυτόχρονα μπορεί να εμπλέκονται σε διάφορα μονοπάτια μετάδοσης σήματος (Neill *et al.*, 2002; Vranova *et al.*, 2002).

Η διατήρηση των ROS σε ικανοποιητικά επίπεδα είναι καθοριστικός παράγοντας για την επιβίωση του κυττάρου. Το NO είναι ένα μόριο το οποίο μπορεί να δράσει αντιοξειδωτικά περιορίζοντας τις παραγόμενες ποσότητες των ROS (αντιοξειδωτικός μηχανισμός του NO) (Beligni and Lamatina, 1999). Η ικανότητα του NO να αντιδρά με τα σχηματιζόμενα υπεροξειδία (Caro and Puntarulo, 1998) και να παρεμποδίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι μια ακόμα λειτουργία του που απεικονίζει τον αντιοξειδωτικό του ρόλο (Boveris *et al.*, 200). Παράλληλα το NO μπορεί να δράσει και ως μόριο μεταγωγής σήματος επηρεάζοντας την έκφραση σημαντικών γονιδίων που επάγονται με τη καταπόνηση. Από την άλλη, η υπερβολική συγκέντρωση NO στο κύτταρο μπορεί να οδηγήσει σε νιτροδωτική καταπόνηση (Shingles *et al.*, 1996). Έτσι η ισορροπία της αναλογίας ROS/RNS είναι καθοριστικής σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου. Παρακάτω παρουσιάζεται βιβλιογραφική ανασκόπηση του ρόλου του NO κάτω από διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης.

### 1.5.1 Ξηρασία

Η έλλειψη νερού είναι ένας από τους μεγαλύτερους περιβαλλοντικούς περιορισμούς για την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα μιας καλλιέργειας. Οι κυτταρικές διαδικασίες οι οποίες επάγονται ως απόκριση της ξηρασίας είναι πολύ σημαντικές για να κατανοήσουμε τους διάφορους μηχανισμούς επιβίωσης του φυτού. Κάτω από συνθήκες ξηρασίας αυξάνεται η παραγόμενη ποσότητα ROS οι οποίες ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων των αντιοξειδωτικών ενζύμων ως απόκριση του κυττάρου.

Ένα από τα σημαντικότερα μόρια που επάγονται από τη ξηρασία είναι η φυτοορμόνη αποσκιστικό οξύ (ABA) που παίζει καθοριστικό ρολό στη ρύθμιση του ανοίγματος των στομάτων. Με την έκκριση της ορμόνης αυτής τα καταφρακτικά κύτταρα χάνουν την σπαργή τους ενώ παράλληλα επάγεται η σύνθεση NO και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Neill *et al.*, 2003; Lamattina *et al.*, 2003). Η σύνθεση του ABA σε ρίζες κριθαριού παρουσιάστηκε αυξημένη στην παρουσία εξωγενούς NO και ROS, υποδηλώνοντας το συνεργιστικό ρόλο μεταξύ τους. Ως επιβεβαίωση του πιο πάνω, η συγκέντρωση του ABA περιορίζεται παρουσία παρεμποδιστών των ROS και των ενζύμων παρόμοιων της NOS (Zhao *et al.*, 2001).

Οι Leshen and Haramaty (1996) αναφέρουν ότι με το μαρασμό των φύλλων του μπιζελιού αυξάνονται τα επίπεδα του NO. Σε φυτά *A. thaliana* εμφανίστηκαν αντίθετα αποτελέσματα (Magalhaes *et al.*, 2000). Αυτό δηλώνει τη διαφορετικότητα στην απόκριση μεταξύ των διαφορετικών φυτών. Παρόλα αυτά η εφαρμογή του δότη NO σε αρκετά είδη φυτών μείωσε το άνοιγμα των στομάτων με αποτέλεσμα να μειωθεί και ο ρυθμός διαπνοής (Mata and Lamattina, 2001). Η δράση του NO στο κλείσιμο των στομάτων είναι το πιο πιθανό συνεργιστική με άλλα μόρια-σήματα όπως το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ερευνητικά αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση του NO με τα ROS στη βιοσύνθεση του ABA (Neill *et al.*, 2003).

Οι Sang *et al.* (2008) απέδειξαν ότι σε συνθήκες ξηρασίας επάγεται η σύνθεση του NO στα κύτταρα του μεσοφύλλου φυτών καλαμποκιού, μέσω της ενεργοποίησης του ενζύμου NOS-like στο κυτταρόπλασμα. Η προμεταχείριση των φυτών με παρεμποδιστές των βιοσυνθετικών ενζύμων NOS και NR μειώνει την παραγωγή NO, αποδεικνύοντας ότι η σύνθεση του NO σε συνθήκες ξηρασίας σε φυτά καλαμποκιού πραγματοποιείται από αυτά τα ένζυμα. Παράλληλα η αναστολή της βιοσύνθεσης του NO παρεμποδίζει τη δραστηριότητα διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, APX, και GR) απαραίτητων για την αποτοξικοποίηση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που παράγεται κατά την καταπόνηση.

Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την επίδραση του επαναποτίσματος σε φυτά που αναπτύσσονταν για ένα χρονικό διάστημα σε συνθήκες ξηρασίας. Σύμφωνα με τους Filippou *et al.* (2011), φυτά μηδικής μετά από 11 μέρες σε συνθήκες ξηρασίας παρουσίασαν συμπτώματα οξειδωτικής και νιτροδωτικής καταπόνησης μέσω των αυξημένων επιπέδων NO και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> τόσο στα φύλλα όσο και στις ρίζες. Παράλληλα, τα επίπεδα υπεροξειδωσίας των λιπιδίων της μεμβράνης και της προλίνης ως επιπρόσθετοι

δείκτες καταπόνησης ήταν υψηλά. Ενδιαφέρον παρουσίαζε το γεγονός ότι φυτά τα οποία αφέθηκαν για 9 μέρες σε ξηρασία και επαναποτίστηκαν παρουσίασαν μείωση των επιπέδων RNS/ROS καθώς επίσης και παράλληλη μείωση του επιπέδου υπεροξειδωσής των λιπιδίων των μεμβρανών. Η επίδραση του επαναποτίσματος μετά από συνθήκες ξηρασίας αντίστρεψε την ευαισθησία που παρουσίασαν τα φυτά στις συνθήκες ξηρασίας, προσδίδοντάς στα φυτά την ικανότητα να αντιστέκονται στις καταστροφικές συνέπειες των RNS/ROS μετά από συνθήκες ξηρασίας.

### 1.5.2 Αλατότητα

Σχεδόν οι μισές αρδευόμενες καλλιέργειες και 20% των καλλιεργειών παγκοσμίως επηρεάζονται από τα αλατούχα εδάφη (Mirsa et al., 2001). Υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των φυτών οδηγεί σε ωσμωτική και ιοντική καταπόνηση. Ως αποτέλεσμα επηρεάζονται σημαντικές μεταβολικές διαδικασίες του κυττάρου και περιορίζεται η αύξηση και η ανάπτυξη των φυτών (Siddiqui et al., 2008; Khan et al., 2010). Ένα μεγάλο μέρος της ζημιάς σε κυτταρικό επίπεδο οφείλεται στην οξειδωτική καταπονήσεις από τις διάφορες μορφές ROS. Τα φυτά παρουσιάζουν ένα μεγάλο αριθμό αμυντικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται κατά την καταπόνηση ιδιαίτερα για τον περιορισμό των ROS.

Η συμμετοχή του NO στην αντοχή των φυτών στην αλατότητα συγκεντρώνει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Οι λειτουργίες του NO για την επαγωγή ανεκτικότητας των φυτών στην αλατότητα επιδείχθηκαν σε πολλά είδη φυτών. Η προμεταχείριση σε σπορόφυτα ρυζιού με δότη NO προκάλεσε πιο εύρωστη ανάπτυξη των φυτών, με ταυτόχρονη διατήρηση της ενεργότητας του φωτοσυστήματος II (PS II), αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων και έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας στην αλατότητα (Uhida et al., 2002). Από την άλλη μεριά βραχυχρόνια καταπόνηση μπορεί να προκαλέσει υπερπαραγωγή του NO ή των προϊόντων που προέρχονται από αυτό οδηγώντας σε νιτροδωτική καταπόνηση (Uhida et al., 2002).

Φυτά με ανθεκτικότητα στην αλατότητα παρουσιάζουν μεγάλη συγκέντρωση ιόντων καλίου ( $K^+$ ) και χαμηλή συγκέντρωση ιόντων νατρίου ( $Na^+$ ) στο κυτταρόπλασμα κάτω από συνθήκες αλατότητας. Οι συγκεντρώσεις αυτές ρυθμίζονται από τους αντλίες πρωτονίων ( $H^+$ -ATPases) και άλλα κανάλια που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (PM) και στον τονοπλάστη. Το NO που παράγεται κατά την καταπόνηση

εμπλέκεται ως δευτερογενής μεταφορέας σήματος στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις H<sup>+</sup>-ATPases (Zhao *et al.*, 2004, 2007).

Πρόσφατα, οι Valderrama *et al.* (2007) απέδειξαν πως η αλατότητα προκάλεσε στα φύλλα ελιάς την επαγωγή της παραγωγής RNS (NO, GSNO, RSNO) και αύξηση της νιτροσυλώσεως σε τυροσίνη πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως δείκτες της νιτροδωτικής καταπόνησης. Επιπρόσθετα, έδειξαν πως τα κύτταρα των αγγείων παίζουν σημαντικό ρόλο στην επανακατανομή των διάφορων μορφών NO κατά τη νιτροδωτική καταπόνηση και στις εξαρτώμενες από το NO διαδικασίες μετάδοσης σήματος.

Σε πρόσφατες εργασίες αποδείχτηκε ότι σε συνθήκες αλατότητας το NO μειώνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης, το ρυθμό παραγωγής ROS, την υπεροξειδωση των λιπιδίων, το παραγόμενο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του CO<sub>2</sub>. Τα πιο πάνω επιτυγχάνονται με την ενεργοποίηση των διάφορων αντιοξειδωτικών ενζύμων (CAT, POD, SOD και APX) και αύξηση της συγκέντρωσης της προλίνης (López-Carrión *et al.*, 2008; Sheokand *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009). Γενικότερα το NO δεν επάγει μόνο τα ένζυμα καταβολισμού των ROS, αλλά εμπλέκεται και στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την καταπόνηση όπως η συνθετάση της φωσφορικής σακχαρόζης και η Δ<sup>1</sup>-πυρρολινο-5-καρβοξύλο συνθετάση (P5CS) (Uchida *et al.*, 2002). Παράλληλα, συμμετέχει στην ενίσχυση της αποδοτικότητας της φωτοσύνθεσης (Fan *et al.*, 2007), στη σύνθεση ATP και σε δυο μεταβολικές οδούς μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (Yamasaki *et al.*, 2001; Zottini *et al.*, 2002).

### **1.5.3 Υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες**

Οι ακραίες θερμοκρασίες είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που οδηγούν στη μείωση της αύξησης και ανάπτυξης των φυτών. Υπάρχουν αρκετές πληροφορίες που υποστηρίζουν την αύξηση της παραγωγής NO σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών. Για παράδειγμα, βραχυχρόνια καταπόνηση με υψηλές θερμοκρασίες οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής NO στη μηδική (Leshem, 2001).

Εν αντιθέσει, φυτά μπιζελιού που εκτέθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες (38°C) για 4 ώρες παρουσίασαν μείωση της συγκέντρωσης του NO στα φύλλα, χωρίς σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα των ενζύμων ομοίων της NOS, ενώ η συγκέντρωση των SNOs τριπλασιάστηκε (Corpas *et al.*, 2008). Φυτά ηλίανθου τα οποία εκτέθηκαν στις ίδιες

συνθήκες (38°C για 4 ώρες) υπέστησαν οξειδωτική καταπόνηση με ταυτόχρονη μείωση της παραγωγής NO, αναστολή της δραστηριότητας της GSNOR και συσσώρευση διαφόρων μορφών RNS (SNOs, ONOO<sup>-</sup>) (Chaki *et al.*, 2011).

Οι χαμηλές θερμοκρασίες είναι μια άλλη μορφή αβιοτικής καταπόνησης, η οποία επηρεάζει την ανάπτυξη των φυτών με αποτέλεσμα τη μείωση της ποσότητας και ποιότητας της παραγωγής (Sharma *et al.*, 2005). Σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζεται ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων, καθώς και τα επίπεδα ορισμένων πρωτεϊνών και μεταβολιτών. Αναλύσεις για τα επίπεδα των RNS που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά μπιζελιού μετά από έκθεση τους σε χαμηλές θερμοκρασίες έδειξαν ενεργοποίηση παρόμοιων με τη NOS ενζύμων και της GSNOR, ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε η συγκέντρωση των SNOs (Corpas *et al.*, 2008). Επιπλέον, η εξωγενής εφαρμογή του NO σε φυτά οδηγεί στην επαγωγή της ανθεκτικότητας σε χαμηλές θερμοκρασίες στη ντομάτα, κριθάρι και καλαμπόκι (Lamattina *et al.*, 2001). Αυτό το αποτέλεσμα είναι πιθανό να αντικατοπτρίζει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του NO μέσω της μείωσης των υψηλών επιπέδων ROS τα οποία συσσωρεύονται εξαιτίας της έκθεσης των φυτών σε υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες (Neill *et al.*, 2002).

#### **1.5.4 Υπεριώδης ακτινοβολία (UV-B)**

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αναφέρουν τη σχέση της UV-B ακτινοβολίας και του μεταβολισμού του NO. Η UV-B ακτινοβολία (280-320nm) στην ατμόσφαιρα αυξήθηκε εξαιτίας της καταστροφής του στρώματος του όζοντος. Η ακτινοβολία αυτή βρίσκεται στο περιβάλλον ανάπτυξης των φυτών, επηρεάζοντας την αύξηση των φυτών και συχνά προκαλώντας σε αυτά οξειδωτική καταπόνηση.

Οι Mackerness *et al.* (2001) έδειξαν τη συμμετοχή του NO στην απόκριση του φυτού (*Arabidopsis thaliana*) κάτω από συνθήκες υπεριώδους ακτινοβολίας UV-B. Παρατήρησαν επαγωγή της έκφρασης γονιδίων άμυνας όπως η *CHS* (chalcone synthase), αύξηση της δραστηριότητας παρόμοιων με τη NOS ενζύμων και αύξηση των επιπέδων του NO. Αποτελέσματα της εργασίας του Shi *et al* (2005) έδειξαν ότι σε φυτά φασολιού που υποβλήθηκαν σε μεταχείριση με UV-B ακτινοβολία, η εξωγενής εφαρμογή του NO περιόρισε τα καταστροφικά αποτελέσματα. Αντίθετα, σε φυτά που δεν προμεταχειρίστηκαν με NO, παρατηρήθηκε μείωση των χλωροφυλλών και οξειδωτική

καταστροφή των μεμβρανών των θυλακοειδών. Το NO προστατεύει το φυτό από τη UV-B ακτινοβολία πιθανότατα μέσω της αύξησης της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή NO σε κονδύλους πατάτας πριν την έκθεση αυτών σε UV-B ακτινοβολία είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή 50% πιο υγιών φύλλων σε σύγκριση με φυτά στα οποία δεν έγινε προμεταχείριση με NO (Neill *et al.*, 2003).

### **1.5.5 Βαρέα μέταλλα**

Τα βαρέα μέταλλα αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα μόλυνσης της βιόσφαιρας σε πολλές χώρες του κόσμου. Το NO παίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού των φυτών και στην παρεμπόδιση της τοξικότητάς τους από τα βαρέα μέταλλα.

Εξωγενής εφαρμογή του SNP (δότης μονοξειδίου του αζώτου) προκαλεί μείωση της τοξικότητας από το χαλκό και της συγκέντρωσης αμμωνίας ( $\text{NH}_4^+$ ) σε φύλλα ρυζιού. Η προστατευτική δράση του NO μπορεί να παρεμποδιστεί από έναν αναστολέα του NO (c-PTIO), δηλώνοντας έτσι τον ουσιαστικό ρόλο του NO (Yu *et al.* 2005). Οι Koryga and Gwózdź (2003) παρατήρησαν ότι η προμεταχείριση με SNP μείωσε σημαντικά τις συγκεντρώσεις του  $\text{O}_2^-$  στις ρίζες λούπινων σε συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα. Οι ιδιότητες αποτοξικοποίησης και η αντιοξειδωτική ικανότητα του NO έχει επίσης επιβεβαιωθεί σε ιστοκαλλιέργεια φυτού σόγιας κάτω από συνθήκες καταπόνησης με κάδμιο και χαλκό (Singh *et al.*, 2008).

Η εφαρμογή του SNP εκτός των άλλων ενεργοποιεί ένζυμα που διασπούν τις διάφορες μορφές των ROS με αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στο κύτταρο, ενεργοποιεί τις αντλίες πρωτονίων στη κυτταροπλασματική μεμβράνη ή τον τονοπλάστη αντίστοιχα και περιορίζει την αναστολή της ανάπτυξης που προκαλείται από το  $\text{CuCl}_2$  σε φυτά τομάτας. Οι ευνοϊκές αυτές επιδράσεις υποδηλώνουν ότι η εξωγενής εφαρμογή του NO ευνοεί την ανάπτυξη σποροφύτων τομάτας κάτω από συνθήκες τοξικότητας Cu και διατηρεί τη μεταβολική ικανότητα και φυσιολογική ανάπτυξη του φυτού σε συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cui *et al.*, 2009).

Οι Hu *et al.* (2007) παρατήρησαν ότι η προμεταχείριση των σπόρων κριθαριού με NO βελτίωσε τη βλαστική ικανότητα τους και παρεμπόδισε την οξειδωτική καταπόνηση από

την τοξικότητα Cu. Παράλληλα οι Wang and Yang (2005) διατύπωσαν ότι η εφαρμογή SNP αυξάνει την επιμήκυνση της ρίζας και την οξειδωτική καταπόνηση κάτω από την παρουσία  $Al^{3+}$ . Η παρεμπόδιση της οξείδωσης πραγματοποιήθηκε με την ενίσχυση της ενεργότητας των ενζύμων SOD και CAT, και με τη μείωση της δραστηριότητας της λιποξειγενάσης και της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων των μεμβρανών. Πιθανολογείται ότι το NO δρα μέσω της τροποποίησης της ενεργότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων του κυττάρου (CAT, POD, και APX) που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του  $H_2O_2$ . Παράλληλα το NO συμβάλει στην αποτοξικοποίηση με τη διατήρηση του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού και των επιπέδων των αντιοξειδωτικών μορίων όπως το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη. (Tewari *et al.* 2008).

Σημαντική είναι η συμβολή του εξωγενούς NO στη βιοσύνθεση της προλίνης σε φυτικά κύτταρα που μεταχειρίστηκαν με Cu. Οι Zhang *et al.* (2008) αναφέρουν ότι η περιεκτικότητα των κυττάρων σε προλίνη όταν τα φυτά προμεταχειρίστηκαν με SNP ήταν 1,5 φορές μεγαλύτερη, ενώ με τη χρήση του καταστολέα του NO (c-PTIO) δεν υπήρχε ουσιαστική αλλαγή στη συγκέντρωση της προλίνης. Τα ιόντα Cu και το NO είναι ικανά να ρυθμίσουν την ενεργότητα της  $\Delta^1$ -πυρρολινο-5-καρβοξυλο συνθετάσης (P5CS, EC 2.7.2.11) που εμπλέκεται στο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης σε άλγη. Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η απόκριση του Cu στη βιοσύνθεση της προλίνης στο *Chlamydomonas reinhardtii* σχετίζεται με το παραγόμενο NO, υποστηρίζοντας το ρυθμιστικό ρόλο του NO στη βιοσύνθεση της προλίνης σε συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα.

### 1.5.6 Όζον

Το όζον ( $O_3$ ) είναι ένας ατμοσφαιρικός ρύπος ο οποίος εισέρχεται εντός του φύλλου μέσω των στομάτων. Οι συνέπειες της συσσώρευσής του εντός του φυτού είναι ανάλογες της συγκέντρωσης και του χρόνου έκθεσης του φυτού σε αυτό.

Με την έκθεση των φυτών σε χαμηλά επίπεδα  $O_3$  μειώνεται ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης, η αύξηση των φυτών και προκαλείται η πρόωρη γήρανση των φύλλων ευαίσθητων φυτικών ειδών και καλλιεργειών. Αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις  $O_3$  επέρχεται κυτταρικός θάνατος με εμφανή συμπτώματα στα φύλλα (Corpas *et al.*, 2011).



Σε φυτά *A. thaliana* η μεταχείριση με  $O_3$  επάγει τη δραστικότητα των ομοίων της NOS ενζύμων με ταυτόχρονη συσσώρευση του σαλικιλικού οξέος που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Η συσσώρευση του NO στα φύλλα της *A. thaliana* μπορεί να επάγει τον κυτταρικό θάνατο με ταυτόχρονη επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του σαλικιλικού οξέος όπως και άλλων γονιδίων που συνδέονται με την άμυνα του φυτού (Ahlfors *et al.*, 2009). Από την άλλη μεριά, αρκετές μεταχειρίσεις με  $O_3$  σε φυτά *A. thaliana* αποδεικνύουν την ταυτόχρονη συσσώρευση τόσο ROS όσο και NO καθώς και τη μείωση των υδατοδιαλυτών αντιοξειδωτικών ασκορβικού και γλουταθειόνης (Mhalingam *et al.*, 2006).

Σε φυτά καπνού που εκτέθηκαν σε  $O_3$  αποδείχθηκε η συσσώρευση  $H_2O_2$  στα μιτοχόνδρια και μια πιο πρόωμη συσσώρευση NO στο φυτικό ιστό. Αυτό παρατηρήθηκε παράλληλα με τη μείωση της περιεκτικότητας του κυττάρου σε κυτόχρωμα C, τη θετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της εναλλακτικής οξειδάσης (AOX) και τη συσσώρευση της αέριας ορμόνης αιθυλένιο. Περαιτέρω αναλύσεις έδειξαν ότι το NO αποτελεί το κυρίαρχο μόριο σηματοδότη που εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης της AOX σε συνεργασία με το αιθυλένιο. Όταν σε φυτά που μεταχειρίστηκαν με  $O_3$  έγινε η εφαρμογή των αναστολέων cPTIO και L-NNA, δεν ανιχνεύτηκε παραγωγή αιθυλενίου, ούτε επαγωγή του γονιδίου ACS2 *συνθάση* που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του αιθυλενίου (Ederli *et al.*, 2006).

Το ισοπρένιο είναι η πιο γνωστή πτητική οργανική ουσία που εκπέμπεται από τα φυτά. Στα φύλλα του φυτού *Phragmites* που ήταν εκτεθειμένα σε  $O_3$ , το ενδογενές ισοπρένιο βρέθηκε να μειώνει τη συγκέντρωση του NO και την κυτταρική ζημιά (Velikova *et al.*, 2005). Έτσι το ισοπρένιο μπορεί να θεωρηθεί ως προστατευτικό μόριο σε συνθήκες καταπόνησης από  $O_3$  (Velikova *et al.*, 2008).

### **1.5.7 Φώς/σκοτάδι**

Η διάρκεια του σκότους και της ημέρας επηρεάζουν διάφορες διεργασίες του κυττάρου που είναι καθοριστικές για την ανάπτυξη των διαφόρων φυτών. Η ένταση και η συχνότητα του φωτισμού που δέχεται ένα φυτό επηρεάζουν τις διάφορες λειτουργίες του. Όταν τα επίπεδα της έντασης του φωτός είναι υψηλότερα από αυτά που το φυτό ανέχεται τότε αυτό καταπονείται και ενεργοποιεί τους μηχανισμούς άμυνάς του. Η εξωγενής εφαρμογή του NO βρέθηκε να μειώνει της καταστροφικές συνέπειες της υψηλής έντασης φωτισμού.

Τα ευεργετικά αποτελέσματα της εφαρμογής του NO είναι εμφανή σε φυτά *Festuca arundinaceae* που αναπτυχθήκαν σε χαμηλή ένταση φωτισμού ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) αρχικά και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε μεγαλύτερη ένταση ( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Στα φυτά έγινε εξωγενής εφαρμογή NO με τη χρήση του SNP (100  $\mu\text{M}$ ) πριν από την τοποθέτησή τους σε υψηλή ένταση φωτισμού. Ως αποτέλεσμα, παρατηρήθηκε περιορισμός της υπεροξειδωσής των λιπιδίων των μεμβρανών και των επιπέδων καρβονυλίωσης στα φύλλα ενώ τα επίπεδα του  $\text{H}_2\text{O}_2$  και των υπεροξειδοτικών ανιόντων ( $\text{O}_2^-$ ) μειώθηκαν. Παράλληλα, αυξήθηκε η ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, CAT και APX, αποδεικνύοντας τη δράση του NO ως μόριο σήματος. Αυτά τα αποτελέσματα δε διατηρήθηκαν με τη μεταχείριση των φυτών με ουσίες που αποικοδομούν το NO (c-PTIO) (Xu *et al.*, 2010).

Τα φυτά φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα στις τοξικές επιδράσεις του διοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}_2$ ) όταν αναπτύσσονται στο σκοτάδι. Το β-καροτένιο και άλλα καροτενοειδή αντιδρούν με το  $\text{NO}_2$  στο σκοτάδι για την παραγωγή ενδιάμεσων νιτροσυλιωμένων αντιδραστηρίων σύμφωνα με το σχηματισμό νιτροδο-εστέρων. Ταυτόχρονη έκθεση των καροτενοειδών στο  $\text{NO}_2$  και το φως μειώνει το σχηματισμό νιτροσυλιωμένων ενδιάμεσων και απελευθερώνεται NO. Η μεσολάβηση του φωτός για την μετατροπή του  $\text{NO}_2$  σε NO παρουσία καροτενοειδών είναι ένας σημαντικός μηχανισμός για την αποφυγή της ζημιάς που προκαλείται από το  $\text{NO}_2$  (Cooney *et al.*, 1994).

## 1.6 NO ως μόριο μεταγωγής σήματος στα φυτά

Κάθε παράγοντας που προκαλεί καταπόνηση στο φυτό οδηγεί στην επαγωγή μαζικής μετάδοσης σήματος για ενεργοποίηση του μηχανισμού άμυνάς του. Η αναγνώριση του σήματος που οφείλεται στην καταπόνηση από τους υποδοχείς των κυτταρικών μεμβρανών έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μορίων-σημάτων. Τα μόρια-σήματα στη συνέχεια οδηγούν σε αλλαγή της συγκέντρωσης ή τροποποίηση των λεγόμενων δευτερογενών μηνυμάτων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μηχανισμού άμυνας του φυτού. Ένα μόριο για να μπορεί να λάβει μέρος στη μεταγωγή σήματος θα πρέπει να έχει κάποιες κατάλληλες ιδιότητες, όπως απλή χημική δομή, μικρές διαστάσεις και υψηλή διαχυτικότητα. Φανερά το NO ανήκει σε αυτή την ομάδα μορίων-σημάτων (Arasimowicz and Wiczonek, 2007).

Η κινούμενη φύση του NO και η χημική αντίδραση του με διάφορους κυτταρικούς στόχους υποδεικνύει ότι ο ρόλος του ως μόριο μεταγωγής σήματος πραγματοποιείται α)

άμεσα εξαιτίας της αλληλεπίδρασής του με πρωτεΐνες που ελέγχουν τους διαύλους ιόντων ή την έκφραση των γονιδίων ή β) έμμεσα μέσω της αλληλεπίδρασης του NO με πρωτεΐνες των οδών σηματοδότησης όπως οι κινάσες των πρωτεϊνών, τα κανάλια ιόντων ή ενζύμων που καταλύουν την παραγωγή δευτερογενών αγγελιοφόρων σημάτων.

Το NO αντιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες μέσω νιτροσυλίνωσης, αναστέλλει τη δραστηριότητα ακονιτάσης στα καπνά ρυθμίζοντας τα επίπεδα σιδήρου στα φυτά, αναστέλλει τη δραστηριότητα καταλάσης και ασκορβικής υπεροξειδάσης, ενώ επίσης ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα όπως *PAL1*, *PRI*, *GST* κατά τη διάρκεια αλληλεπιδράσεων φυτού-παθογόνου (Delledonne *et al.*, 1998). Άλλο γονίδιο-στόχος του NO είναι το *PIOX* (Pathogen-induced oxygenase) που εμπλέκεται σε αποκρίσεις στην άμυνα του φυτού.

Οι βιολογικές επιδράσεις του NO στα ζωικά κύτταρα αποδίδονται στην ικανότητα του α) να αντιδρά με μεταβατικά μέταλλα και αιμοπρωτεΐνες, β) να νιτροσυλινώνει τις πρωτεΐνες και γ) να αντιδρά με τα ROS και να σχηματίζει RNS.

Το NO ως μόριο σηματοδότης αντιδρά άμεσα με τις μεταλλικές και σουλφυδριλικές ενώσεις τροποποιώντας μετα-μεταφραστικά ένα μεγάλο φάσμα λειτουργικών πρωτεϊνών του κυττάρου όπως, υποδοχείς, μεταγραφικούς παράγοντες και μόρια που δρουν ως κυτταρικά μηνύματα (Stamler *et al.*, 2001). Σύμφωνα με τους Besson-Bard *et al.* (2008), πάνω από 100 πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν μέχρι τώρα στις οποίες μπορεί να επιδράσει το NO *in vivo* και/ή *in vitro*. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι η αιμογλοβίνη, η λιποξειγενάση, η καταλάση, η ασκορβική υπεροξειδάση, η μιτοχονδριακή ακονιτάση και η οξειδάση του κυττοχρώματος C στις οποίες αποδείχτηκε ότι το NO δρα με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκου ανάμεσα στο NO και στο μέταλλο της προσθετικής ομάδας που περιέχουν (Wendehenne *et al.*, 2001).

Η ομοιοπολική πρόσδεση του NO στις σουλφυδριλικές ομάδες της κυστεΐνης (S-νιτροσυλίνωση), καθώς επίσης και η οξείδωση τους από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> θεωρούνται οι πιο διαδεδομένες λειτουργίες για τη δημιουργία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Hess *et al.*, 2005) (εικόνα 1.4). Ο ρυθμός σύνθεσης και απομάκρυνσης του NO στο κύτταρο είναι αυτός που καθορίζει την πραγματοποίηση της αντίδρασης της νιτροσυλίνωσης (Grawford, 2006).

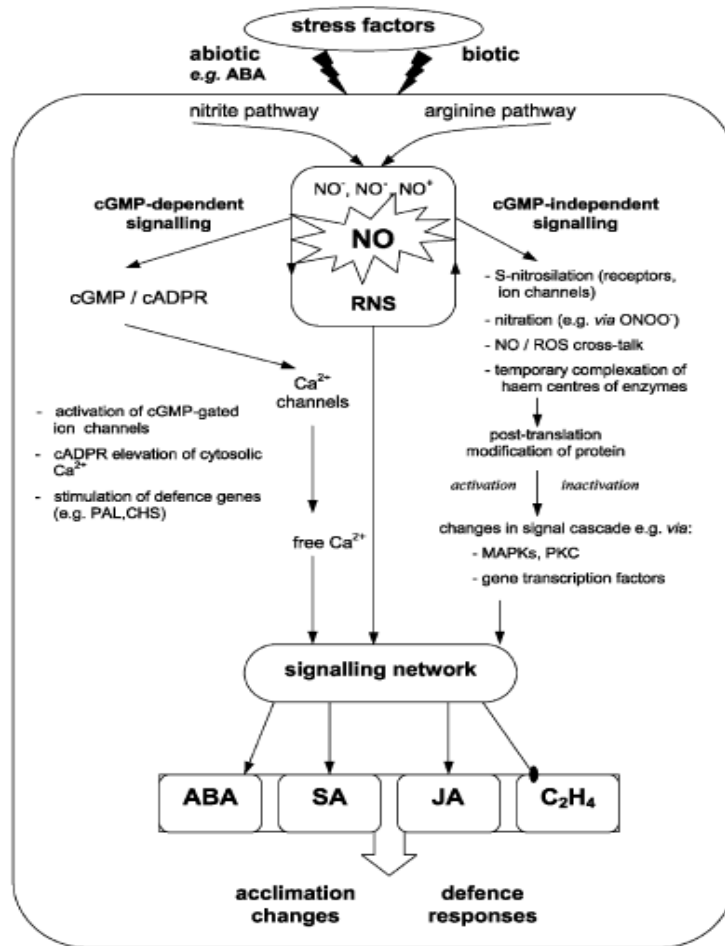
Η διακίνηση  $Ca^{2+}$  και η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση πρωτεϊνών είναι κύρια χαρακτηριστικά των ευκαρυωτικών μονοπατιών μετάδοσης σήματος. Αύξηση στη συγκέντρωση  $Ca^{2+}$  έχει διαπιστωθεί ως αποτέλεσμα έπειτα από τις περισσότερες συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης. Εφόσον υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός κινασών/φωσφατασών στο γένωμα φυτών και εξαιτίας της πολυπλοκότητας της μετάδοσης σήματος είναι πολύ αναγκαίος ο χαρακτηρισμός ενός δικτύου αλληλεπίδρασης κινασών/φωσφατασών και άλλων συστατικών μετάδοσης σήματος. Μία ομάδα πρωτεϊνών που ενεργοποίησης από το NO είναι οι MAPK κινάσες (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007). Η ενεργοποίηση της MAPK μέσω φωσφορυλίωσης διευκολύνει τη μετατόπισή της στον πυρήνα όπου μπορεί να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμίζοντας στη συνέχεια τη γονιδιακή έκφραση. Στα φυτά οι MAPK κινάσες μπορούν να ενεργοποιηθούν ως απόκριση στα εξωκυττάρια σήματα όπως η ξηρασία, κρύο, φυτοορμόνες, πρόκληση παθογόνου και ωσμωτικό στρες που οδηγεί στην ενεργοποίηση μονοπατιών μετάδοσης σήματος με επακόλουθη τη γονιδιακή έκφραση στον πυρήνα (εικόνα 1.4).

Είναι ξεκάθαρο πως το  $H_2O_2$  και το NO μεσολαβούν στη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Η διαδικασία μέσω της οποίας δρουν θα μπορούσε να είναι μέσω άμεσων επιδράσεών τους σε μεταγραφικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα οξειδωση κυστεΐνης (για το  $H_2O_2$ ) ή S-νιτροσυλίωση (για το NO). Επίσης μπορεί να γίνει έμμεσα με την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων μέσω φωσφορυλίσεων MAPK κινασών. Με δεδομένο το ότι τόσο το  $H_2O_2$  όσο και το NO ενεργοποιούν MAPKs, αυτός είναι ο πιο πιθανός μηχανισμός ενεργοποίησης της γονιδιακής έκφρασης. Το  $H_2O_2$  και το NO ως μόρια μετάδοσης σήματος δε δρουν ξεχωριστά αλλά σε συνδυασμό με άλλα μόρια μετάδοσης σήματος. Τέτοια μόρια μπορεί να αυξάνουν σε συγκέντρωση/δραστικότητα κατά τη διάρκεια καταπονήσεων και περιλαμβάνουν ενώσεις όπως το ABA, ιασμωνικό οξύ (JA) και σαλικυλικό οξύ (SA) (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007).

Βρέθηκε πως το NO ενεργοποιεί τις MAP κινάσες στον καπνό και στην *A. thaliana*. Οι NO-ενεργοποιημένες MAP κινάσες στον καπνό μπορεί να ενεργοποιηθούν και από άλλα μόρια-σήματα όπως το σαλικυλικό οξύ και το  $H_2O_2$  (Kumar and Klessig, 2000).

Όλες οι παραπάνω θεωρήσεις υποδεικνύουν την πολυπλοκότητα της βιοχημείας του NO. Η σχετική σημασία του κάθε μηχανισμού μεταγωγής μηνυμάτων εξαρτάται από το

ρυθμό παραγωγής του NO και την παρουσία υποστρωμάτων και αντιδρώντων στα διάφορα οργανίδια του κυττάρου (Grant and Loake, 2000).



**Εικόνα 1.5.** Μονοπάτια μετάδοσης σήματος διαμέσου του NO επαγόμενα από τα διάφορα είδη καταπονήσεων. ABA: Αβιστικό οξύ, cADPR: Κυκλική ADP ριβόζη, CHA: Συνθάση του –Chalcon synthase, cGMP: Κυκλικό GMP, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>: Αιθυλένιο, JA: Ιασημονικό οξύ, MAPK: ενεργοποιημένες πρωτεϊνικές κινάσες, PAL: Λυάση της αμμωνιακής φαινυλανανίνης, ROS: Ενεργές μορφές οξυγόνου, RNS: Ενεργές μορφές αζώτου, SA: Σαλικυλικό οξύ (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007).

## 1.7 Συνεργιστική δράση RNS και ROS

Αρκετά δεδομένα στηρίζουν την αλληλεπίδραση των ROS/RNS στη μετάδοση σήματος σε συνθήκες οξειδωτικής και νιτροδωτικής κατάστασης, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια αβιοτικών καταπονήσεων. Σημαντική και καθοριστικής σημασίας για το κύτταρο είναι η

αλληλεπίδραση των RNS και ROS στη γονιδιακή και πρωτεϊνική ρύθμιση. Επιπλέον τα RNS/ROS συμμετέχουν σε παράλληλες/κοινές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Είναι ξεκάθαρο πως και τα δύο (NO και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) επιδρούν στη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Το NO επάγει την έκφραση της λύσης της αμμωνιακής φαινυλαλανίνης (PAL) μέσω του ανεξάρτητου μονοπατιού του SA (Durner *et al.*, 1998) ενώ η επαγωγή του PAL από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> απαιτεί το σαλικυλικό οξύ (Chamngpol *et al.*, 1998). Επομένως, τόσο το NO όσο και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παρουσιάζουν συμπληρωματική δράση στην ενεργοποίηση των αποκρίσεων άμυνας του φυτού (Camp *et al.*, 1998). Το NO βρέθηκε να δρα συνεργιστικά με τα ROS για να αυξήσει τον κυτταρικό θάνατο του ξενιστή σε κύτταρα σόγιας (Delledonne *et al.*, 1998). Έπειτα από έκθεση στα παθογόνα, τα φυτά γρήγορα παράγουν ενεργές μορφές οξυγόνου όπως το (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οδηγώντας σε απόκριση υπερευαισθησίας (HR) (Wojtaszek, 1997; Alvarez *et al.*, 1998).

Τα NO και τα ROS παράγονται ως απόκριση σε παρόμοιο σήμα με παρόμοια κινητική. Το NO και το ROS αλληλεπιδρούν με διάφορους τρόπους. Το κύριο στοιχείο που δηλώνει την αλληλεπίδραση RNS/ROS είναι η χημική αντίδραση του NO με το O<sub>2</sub><sup>-</sup> με την παραγωγή του ONOO<sup>-</sup> (Molassiotis and Fotopoulos, 2011). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως ένας σημαντικός μηχανισμός μετάδοσης σήματος στα φυτά είναι αυτός του ONOO<sup>-</sup> που συμμετέχει σε βιολογικές αποκρίσεις συμπεριλαμβανομένων των αποκρίσεων άμυνας έναντι της αβιοτικής καταπόνησης (Saito *et al.*, 2006, Romero-Puertas *et al.*, 2007).

Εκτός από την παραγωγή ONOO<sup>-</sup> υπάρχουν και άλλες ενεργές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε ROS/RNS, κυρίως στην περίπτωση NO και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Και τα δύο μόρια σήματος είναι παρόντα σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες και η παραγωγή τους παρουσιάζει αλληλεξάρτηση υπό συνθήκες (Molassiotis and Fotopoulos, 2011). Πρόσφατα, οι Zafra *et al.* (2010) απέδειξαν πως και τα NO και ROS παράγονται ενεργά στα φυτά ελιάς μέσω της ανάπτυξης κατά την άνθηση, ενώ οι Filippou *et al.* (2011) έδειξαν την επαγωγή τόσο του NO όσο και του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα φύλλα και ρίζες του φυτού *Medicago truncatula* έπειτα από συνθήκες ξηρασίας.

Το NO μπορεί επίσης να αλλάξει τις δραστηριότητες ενζύμων που επηρεάζουν τα επίπεδα των ROS και αντίστροφα. Επομένως, μπορεί να επιδράσουν θετικά ή αρνητικά στο ίδιο ή σχετιζόμενα μονοπάτια σήματος, οδηγώντας σε πιθανές συνεργιστικές αποκρίσεις.

Οι Lum *et al.* (2002) παρατήρησαν πως το εξωγενές H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οδήγησε σε επαγωγή της παραγωγής NO σε φύλλα του φυτού *Phaseolus aureus*. Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός πως παρεμποδίστηκε το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -επαγόμενο NO από αναστολέα του καναλιού Ca<sup>2+</sup>. Επομένως είναι δυνατό τα Ca<sup>2+</sup> να επηρεάζουν αυτή την επίδραση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (She *et al.*, 2004).

Μεταγραφική ανάλυση με τεχνολογία μικροσυστοιχιών αναγνώρισε τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση σε οξειδωτική καταπόνηση καθώς και των πρωτεϊνών τους στα φυτά (Desikan *et al.*, 2001, Wan and Lui *et al.*, 2008). Από την άλλη μεριά, οι εξαρτώμενες από το NO αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση έχουν βρεθεί με τη χρήση διάφορων χημικών-δοτών NO. Τα αποκρινόμενα στο NO γονίδια ρυθμίζουν διάφορες λειτουργίες όπως η άμυνα του φυτού, οι αποκρίσεις στην οξειδωτική καταπόνηση και η ορμονική αλληλεπίδραση στον μεταβολισμό και την ανάπτυξη, προβάλλοντας για το NO το ρόλο του μορίου-σήματος που εμπλέκεται στην απόκριση του φυτού στις περιβαλλοντικές καταστάσεις οξείδωσης (Huang *et al.*, 2002, Parani *et al.*, 2004).

Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην οξειδωτική και νιτροδωτική μετάδοση σήματος και τη γονιδιακή έκφραση ενισχύθηκε περαιτέρω από την αλληλεπικάλυψη της NO- και O<sub>3</sub>-επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης στην *A. thaliana*. Αυτή η μελέτη έδειξε πως η εφαρμογή με SNP ενεργοποίησε την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα ενώ τα SNP-ρυθμιζόμενα γονίδια επίσης ενεργοποιούνταν επίσης ισχυρά από το O<sub>3</sub> μαρτυρώντας μια σημαντική αλληλεπικάλυψη του NO<sup>•</sup> και O<sub>3</sub> μονοπατιών μετάδοσης σήματος (Molassiotis and Fotopoulos, 2011). Επιπρόσθετα, μια σύντομη πρωτεομική μελέτη στο ρυθμιστικό ρόλο της νιτροδωτικής και οξειδωτικής καταπόνησης κατά τη διάρκεια της προσαρμογής των εσπεριδοειδών στην αλατότητα αποδεικνύει την ισχυρή αλληλεπίδραση ανάμεσα στις NO<sup>•</sup>- και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-πρωτεΐνες απόκρισης στα καταπονημένα από την αλατότητα φυτά (Tanou *et al.*, 2009).

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που σχετίζονται με τα ROS/RNS είναι ρυθμιστές κλειδιά για το μηχανισμό νιτροδωτικής και οξειδωτικής καταπόνησης. Η ομοιοπολική τροποποίηση της ομάδας NO στην ενεργή κυστεΐνη για τη δημιουργία της S-νιτροζοθειόλης (SNO), μια διαδικασία γνωστή ως νιτροσυλίωση τώρα φαίνεται ως ένας επαγόμενος από το NO μηχανισμός μετάδοσης σήματος (Molassiotis and Fotopoulos, 2011). Εφόσον οι κυστεΐνες είναι επίσης ευαίσθητες στη δράση των ROS προς δημιουργία

πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης, είναι φανερό πως υπάρχει μια αρνητική αλληλεπίδραση ανάμεσα στις διαφορετικές τροποποιήσεις κυστεΐνης από τα ROS και RNS. Πειραματικές αποδείξεις έδειξαν πως η εξωγενής εφαρμογή NO και/ή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επηρεάζει άμεσα την πρωτεϊνική νιτροσυλίωση και καρβονυλίωση προτείνοντας ένα φυσιολογικό ρόλο για τα ROS και RNS και ένα σύνδεσμο ανάμεσα στην οξειδωτική/νιτροδοτική μετάδοση σήματος και εξειδικευμένες πρωτεϊνικές τροποποιήσεις (Jasid *et al.*, 2008, Tanou *et al.*, 2009).



## 2 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Συνθήκες Ανάπτυξης του πειραματικού φυτού *Medicago truncatula*

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν φυτά μηδικής (*Medicago truncatula*) του οικότυπου Jemalong A17. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μηχανικό σκαριφάρισμα των σπόρων για την απομάκρυνση πιθανών παρεμποδιστών της βλάστησης που βρίσκονται στο εξωτερικό περίβλημα του σπόρου. Ακολούθως οι σπόροι τοποθετήθηκαν για στρωμάτωση σε γλαστράκια που περιείχαν μείγμα από χώμα και περλίτη σε αναλογία 3:1, στους 4°C. Μετά τη στρωμάτωση η οποία διήρκεσε 4 μέρες τα γλαστράκια τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης. Στο θάλαμο ανάπτυξης διατηρήθηκαν σταθερές οι εξής συνθήκες: θερμοκρασία  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  την ημέρα και  $16\pm 1^{\circ}\text{C}$  τη νύκτα, σχετική υγρασία 60-70%, φωτοπερίοδος 16/8 ώρες και φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Η ανάπτυξη των φυτών έγινε κάτω από συνεχή φροντίδα θρέψης και άρδευσης. Τα φυτά παρέμεναν στο θάλαμο μέχρι να φτάσουν τα κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο για την εκτέλεση του πειράματος, δηλαδή για 40 ημέρες (ώριμα φυτά) και 65 ημέρες (γηρασμένα φυτά).

### 2.2 Αξιολόγηση των διαφόρων μεθόδων εφαρμογής του SNP (Sodium Nitroprusside) στο φυτό *M. truncatula*

Για την επιλογή της αποτελεσματικότερης μεθόδου εισαγωγής του δότη μονοξειδίου του αζώτου στα φυτά αξιολογήθηκαν πέντε διαφορετικοί μέθοδοι. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα νιτροπρωσσικού νατρίου τελικής συγκέντρωσης 2.5 mM. Στην πρώτη μέθοδο η εισαγωγή της ουσίας πραγματοποιήθηκε στα υπέργεια τμήματα υπό κενό, στη δεύτερη εφαρμόστηκε διαφυλλικός ψεκασμός της ουσίας μέχρι σημείου απορροής, στην τρίτη ριζοπότισμα μέχρι κορεσμού, στην τέταρτη μέθοδο φύλλα από το φυτό τοποθετήθηκαν σε δοχεία που περιείχαν την ουσία και στην πέμπτη πραγματοποιήθηκε εφαρμογή μέσω υδροπονίας. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές χρονικά συγκομιδές των φύλλων για κάθε μέθοδο ξεχωριστά. Η πρώτη συγκομιδή πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την εφαρμογή της ουσίας (0 ώρες) και η δεύτερη 24 ώρες μετά την εφαρμογή της ουσίας. Τα φύλλα τοποθετήθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και

ακολουθώς αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για την περαιτέρω ποσοτικοποίηση του μονοξειδίου του αζώτου.

## **2.3 Φυσιολογικές μετρήσεις**

### **2.3.1 Μέτρηση της αγωγιμότητας των στομάτων**

Για την μέτρηση της αγωγιμότητας των στομάτων χρησιμοποιήθηκε πορόμετρο (ΔΤ-Porometer AP4 Delta-T Devices – Cambridge). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **2.3.2 Μέτρηση του φθορισμού του φωτοσυστήματος II**

Η ένταση του φθορισμού των χλωροφυλλών (ενδεικτική της αποτελεσματικότητας του φωτοσυστήματος II (Fv/Fm) μετρήθηκε με τη χρήση φθορισμόμετρου OS-30p (Opti Sciences, U.S.A.), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

## **2.4 Ιστοχημικές αναλύσεις**

### **2.4.1 Ιστοχημική ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) στα φύλλα**

Η ιστοχημική ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου DAB (3-Diaminobenzidine) - HCl (pH 3.8) ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Φύλλα από κάθε μεταχείριση τοποθετήθηκαν σε δοχεία που περιείχαν αντιδραστήριο και αφέθηκαν στο σκοτάδι για 8-10 ώρες.

Κατά το διάστημα αυτό το DAB αντιδρά με το παραγόμενο  $\text{H}_2\text{O}_2$  του φυτικού ιστού και εμφανίζονται καφέ χρωματικές κηλίδες στο φύλλο ως ένδειξη παρουσίας του  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Για τον αποχρωματισμό των φύλλων χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη (95% v/v). Τα φύλλα παρέμειναν στην αιθανόλη μέχρι τον τελικό αποχρωματισμό τους.

## 2.4.2 Ιστοχημική ανίχνευση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων των μεμβρανών

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών εξετάστηκε ιστοχημικά με τη χρήση του αντιδραστηρίου Schiff όπως περιγράφεται από τους Pompella *et al* (1987). Το αντιδραστήριο Schiff ανιχνεύει τις αλδεύδες που παράγονται ως αποτέλεσμα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Δισκία φύλλων από όλες τις μεταχειρίσεις τοποθετήθηκαν στο αντιδραστήριο Schiff σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Ακολούθως τα δισκία μεταφέρθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα (0.5% [w/v] K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> σε 0.05 M HCl) για ξέπλυμα και παρέμειναν στο διάλυμα μέχρι το χρωματισμό τους. (Pompella *et al* 1987).

## 2.5 Βιοχημικές αναλύσεις

### 2.5.1 Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφύλλης α, χλωροφύλλης β, καροτενοειδών και ανθοκυανίνης

Ο προσδιορισμός των χρωστικών έγινε μετά από εκχύλιση του φυτικού ιστού με τη χρήση του διαλύτη DMSO. Για κάθε εκχύλιση, 5 δισκία φυτικού υλικού τοποθετήθηκαν σε 5 ml DMSO και αφέθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60°C για 30 λεπτά.

Μετά το τέλος της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική ανάλυση με μέτρηση της απορρόφησης στα εξής μήκη κύματος: 661nm, 643nm, 470nm, 534nm. Για μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης DMSO. Ο υπολογισμός των ποσοτήτων των χρωστικών σε gr L<sup>-1</sup>, έγινε με τη χρήση των ακόλουθων εξισώσεων (Richardson *et al.*, 2002):

$$\text{Ανθοκυανίνη} = 0,082 * A_{534} - 0,00687 * A_{643} - 0,002423 * A_{661}$$

$$\text{Χλωροφύλλη } \beta = 0,02255 * A_{643} - 0,00439 * A_{534} - 0,004488 * A_{661}$$

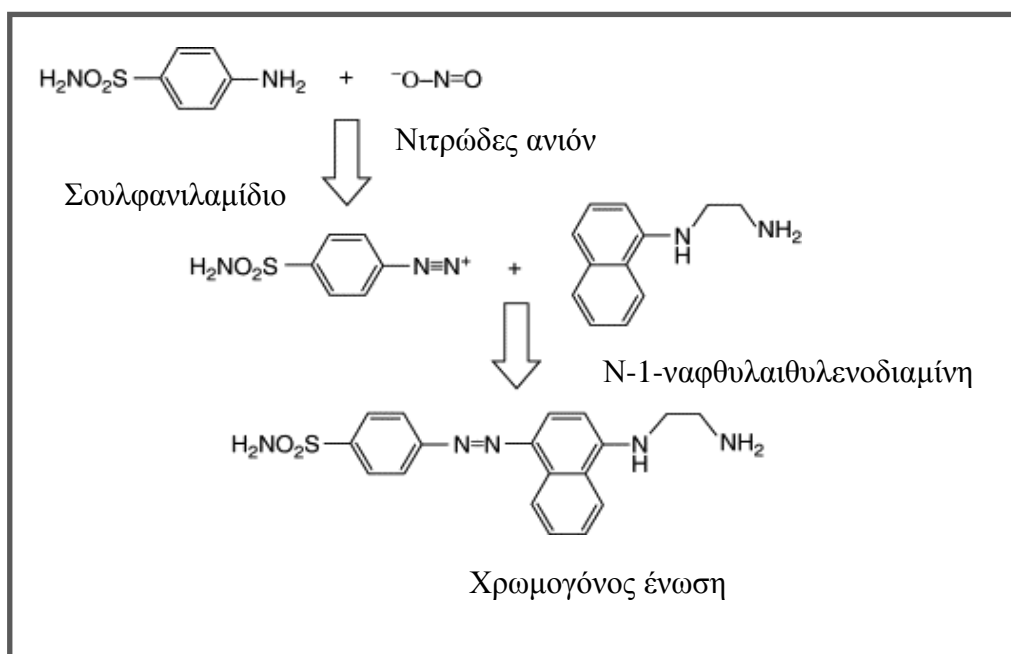
$$\text{Χλωροφύλλη } \alpha = 0,01261 * A_{661} - 0,001023 * A_{534} - 0,0022 * A_{643}$$

$$\text{Καροτενοειδή} = [A_{470} - 17,1 * (\text{Χλωροφύλλη } \alpha + \text{Χλωροφύλλη } \beta) - 9,479 * \text{Ανθοκυανίνη}] / 119,26$$

## 2.5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του μονοξειδίου του αζώτου

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των φυτικών κυττάρων σε μονοξείδιο του αζώτου στηρίζεται στην αντίδραση διαζώωσης με τη χρήση του αντιδραστήριου Griess (Griess, 1879). Το αντιδραστήριο Griess αποτελείται από τις χημικές ενώσεις, σουλφανιλαμίδιο(sulfanilamide) και N-1-ναφθυλαιθυλενοδιαμίνη (N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride - NED) κάτω από όξινες συνθήκες.

Για την παρασκευή του διαλύματος Griess χρησιμοποιήθηκαν 0,2% (w/v) N-1-ναφθυλαιθυλενοδιαμίνη και 2% (w/v) σουλφανιλαμίδιο διαλυμένο σε 5% (v/v) φωσφορικό οξύ. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη δυνατότητα του σουλφανιλαμίδιου να αντιδρά αρχικά με το  $\text{NO}_2^-$  (μια σταθερή ένωση στην οποία μετατρέπεται το NO) και στη συνέχεια, η αντίδραση με την N-1-ναφθυλαιθυλενοδιαμίνη να παράγει χρωμογόνο ένωση που μπορεί να φασμαφωτομετρηθεί στα 540nm (εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης κατά Griess

Η πειραματική διαδικασία ποσοτικοποίησης του μονοξειδίου του αζώτου περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω και αποτελείται από δυο στάδια:

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση με τη χρήση κατάλληλου διαλύματος που αποτελείται από 4% (w/v) οξικού ψευδαργύρου σε 50 mM οξικού οξέος (pH 3.6). Στη διαδικασία της εκχύλισης αρχικά ομογενοποιήθηκαν 0,01gr κονιορτοποιημένου φυτικού

υλικού σε 1ml του παραπάνω διαλύματος με τη χρήση γουδιού και γουδοχειριού. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000 x g για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα. Στη ίζημα που παρέμεινε στη βάση του αρχικού σωλήνα προστέθηκε 0,5 ml διαλύματος εκχύλισης και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση στις 10000 x g για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης έγινε η ανάμειξη των δυο υπερκειμένων. Στη συνέχεια για την απομάκρυνση του πράσινου χρώματος από το υπερκείμενο (που οφείλεται στη χρωστική χλωροφύλλη) προστέθηκαν δύο κουταλιές ενεργού άνθρακα και ακολούθησε έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 15000 x g για 15 λεπτά για πλήρη αποχρωματισμών των υπερκειμένων. Ο αποχρωματισμός του διαλύματος είναι απαραίτητος γιατί μπορεί να παρεμποδίσει τη διαδικασία της φασματοφωτομέτρησης που θα ακολουθήσει, λόγω της απορρόφησης της χρωστικής σε παρόμοιο μήκος κύματος.

Στο δεύτερο στάδιο της διαδικασίας, προστέθηκε 1ml αντιδραστηρίου Griess σε κάθε 1ml υπερκειμένου και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 540nm. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε 1 ml αντιδραστηρίου Griess σε 1 ml διαλύματος εκχύλισης.

Η συγκέντρωση του NO στα άγνωστα δείγματα εκτιμήθηκε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς με εύρος γνωστής συγκέντρωσης  $\text{NaNO}_2$ . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως  $\text{nmole NO g}^{-1} \text{FW}$  (Kumar *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2005, Tewari *et al.*, 2008, Vitecek *et al.*, 2008).

### **2.5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

Για την ποσοτικοποίηση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια: τριχλωρικό οξύ 0,1% w/v (TCA), 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.0) και 1M ιωδιούχο κάλιο (KI). Η θεωρία αυτής της μεθόδου στηρίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση που πραγματοποιείται μεταξύ του  $\text{H}_2\text{O}_2$  και το KI.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση των δειγμάτων με τη χρήση TCA. Για κάθε δείγμα ζυγίστηκε ποσότητα φυτικού υλικού 20-50mg στα οποία προστέθηκε TCA (0,5ml TCA/10mg φυτικού ιστού). Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση πορσελάνινου γουδιού και γουδοχειριού. Η διαδικασία της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε στο πάγο. Μετά την ομογενοποίηση ακολούθησε έντονη ανάδευση των δειγμάτων. Ακολούθως τα

δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 15000 x g για 15 λεπτά στους 4°C. Από κάθε υπερκείμενο λήφθηκε 0,5 ml και τοποθετήθηκε σε καθαρό σωλήνα.

Η χρωματική αντίδραση πραγματοποιήθηκε με την διαδοχική προσθήκη των αντιδραστηρίων και του υπερκειμένου. Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων έγινε ως εξής: 0,5 ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 0,5 ml υπερκειμένου και στο τέλος 1 ml KI. Με τη προσθήκη του KI πραγματοποιήθηκε η αντίδραση η οποία διήρκησε ένα λεπτό. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 390nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε 0,5ml TCA, 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και 1ml KI.

Η ποσοτικοποίηση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα βιολογικά δείγματα έγινε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς που πραγματοποιήθηκε με γνωστές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως  $\mu\text{mole H}_2\text{O}_2 \text{ gr}^{-1} \text{ FW}$  (Loreto and Velikova (2001); Baptista *et al.*, 2001).

#### **2.5.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της υπεροξειδωσης των λιπιδίων των μεμβρανών**

Για το ποσοτικό προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων των μεμβρανών χρησιμοποιήθηκαν 0,1% w/v TCA ως διαλύτης εκχύλισης και 0,5% 2-θειό βαρβυτουρικό οξύ (TBA) διαλυτοποιημένο σε 20% TCA. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρωμογόνο αντίδραση του TBA με το MDA (malondialdehyde). Το MDA αποτελεί ένα δευτερογενές προϊόν της υπεροξειδωσης των φωσφολιπιδίων. Με την ποσοτικοποίηση του MDA μπορούμε να προσδιορίσουμε την υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών. Πιο κάτω περιγράφεται σχηματικά η παραγωγή του MDA μετά από υπεροξειδωση του πολυακόρεστου λιπαρού οξέος (εικόνα 2.2) και η αντίδραση του MDA με το TBA (εικόνα 2.3).

Όσον αφορά τη διαδικασία της ποσοτικοποίησης, αρχικά πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση των δειγμάτων κατά τα γνωστά με αναλογία βάρους ιστού:όγκο TCA 1:3. Μετά την ομογενοποίηση τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 15000 x g στους 4°C και ακολούθως σε κάθε 0,5 ml υπερκειμένου προστέθηκε 1,5 ml διαλύματος 0,5% (w/v) TBA. Ακολούθησε επώαση για 25 λεπτά στους 95°C και η αντίδραση τερματίστηκε με την



### 2.5.5 Ποσοτικός προσδιορισμός της προλίνης

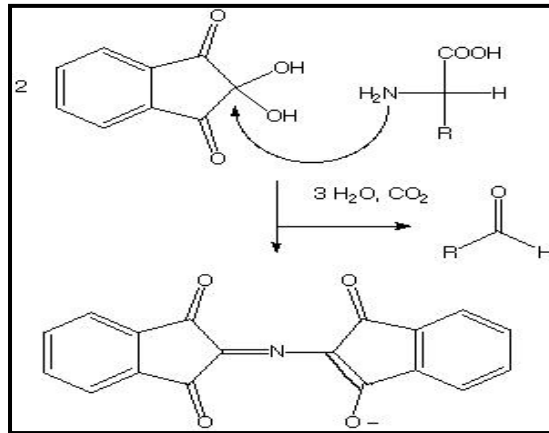
Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της προλίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου της όξινης νινυδρίνης (acid-ninhydrin). Η παρασκευή του αντιδραστηρίου της όξινης νινυδρίνης έγινε με τη συνεχή θέρμανση και ανάδευση 1,25gr νινυδρίνης σε 30ml οξικού οξέος (glacial acetic acid) και 20ml 6M φωσφορικού οξέος (phosphoric acid) μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή της. Η όξινη νινυδρίνη έχει την ικανότητα να δημιουργεί χρωμογόνο σύμπλοκο με την προλίνη (εικόνα 4). Για την εκχύλιση του φυτικού ιστού χρησιμοποιήθηκε 3% (w/v) σουλφοσαλικυλικό οξύ (aqueous sulfosalicylic acid). Η χρήση του σουλφοσαλικυλικού οξέος ως διαλύτη εκχύλισης είχε ως σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών για την αποφυγή της ποσοτικοποίησης τους μαζί με την ελεύθερη μορφή προλίνης.

Η διαδικασία ποσοτικοποίησης της προλίνης άρχισε με την ομογενοποίηση 0.01gr φυτικού ιστού σε 0,5ml 3% (w/v) σουλφοσαλικυλικό οξύ. Η ομογενοποίηση πραγματοποιήθηκε σε πάγο με τη χρήση γουδιού και γουδοχειριού. Ακολούθως τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12000 x g για 10 λεπτά με σκοπό να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά της εκχύλισης.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης προστέθηκε σε 1 ml του υπερκειμένου, 1 ml οξικού οξέος και 1 ml όξινης νινυδρίνης και ακολούθησε επώαση στους 100°C για 1 ώρα. Η αντίδραση τερματίστηκε με την τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο. Ακολούθως προστέθηκαν 2 ml τολουόλιου υπό έντονη ανάδευση για την καλύτερη εκχύλιση στην οργανική φάση του συμπλόκου προλίνης-νινυδρίνης. Με την προσθήκη του τολουόλιου ως οργανικός διαλύτης, το χρωμογόνο σύμπλοκο προλίνης-νινυδρίνης μεταφέρθηκε στο υπερκείμενο τμήμα του σωλήνα έτσι απομακρύνθηκαν τυχόν παραπροϊόντα ή ενδιάμεσα προϊόντα της αντίδρασης. Οι δυο φάσεις διαχωρίστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και 1 ml της οργανικής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος στα 520nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε τολουόλιο.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της προλίνης στα βιολογικά δείγματα έγινε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς με διαφορετικές συγκεντρώσεις DL-προλίνης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως  $\mu\text{mol gr}^{-1}$  FW (Bates *et al.*, 1973; Hamid *et al.*, 2003).





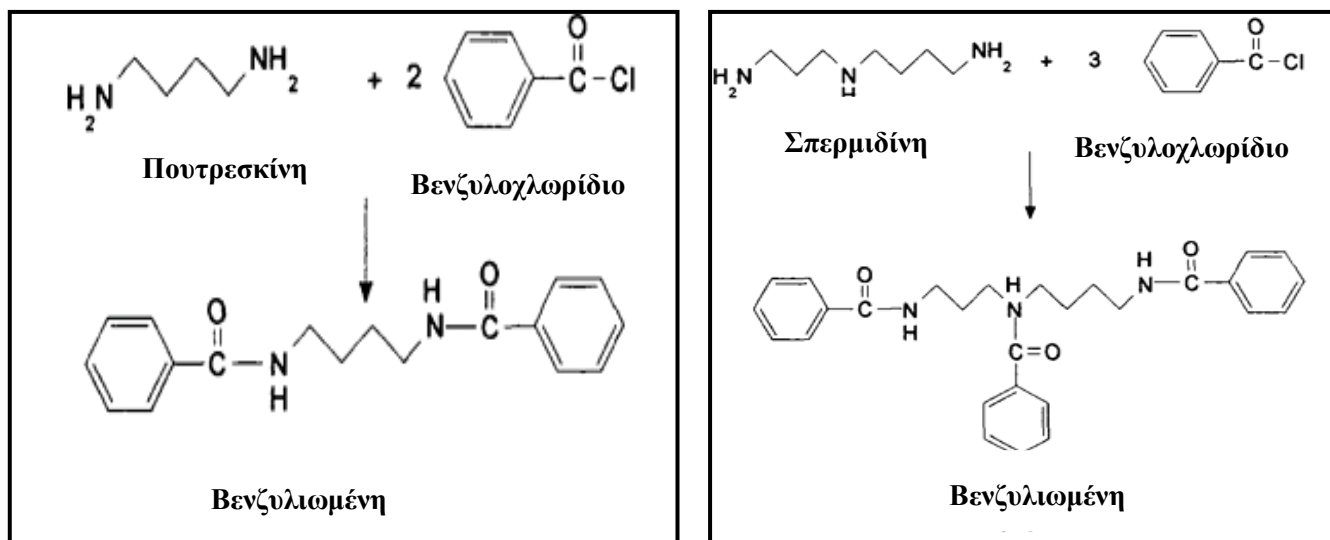
**Εικόνα 2.4.** Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας του χρωμογόνου συμπλόκου νινυδρίνης – αμινοξέος.

### 2.5.6 Ποσοτικός προσδιορισμός των πολυαμινών με αντίδραση βενζυλίωσης

Για τον προσδιορισμό των ελεύθερων πολυαμινών στα βιολογικά δείγματα πραγματοποιήθηκε αντίδραση βενζυλίωσης. Αρχικά ο φυτικός ιστός εκχυλίστηκε με τη χρήση παγωμένου 5% (v/v) HClO<sub>4</sub> (Perchloric acid) με αναλογία 0,1gr φυτικού ιστού:1,5ml HClO<sub>4</sub> κατά τα γνωστά. Μετά την εκχύλιση το ομογενοποίημα επώαστηκε στους 4°C για 1 ώρα και ακολούθως φυγοκεντρήθηκε για 40 λεπτά στις 15000 x g. Το υπερκείμενο που προέκυψε και περιέχει τις ελεύθερες πολυαμίνες μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση βενζυλίωσης όπου οι ελεύθερες πολυαμίνες αντιδρούν με το βενζυλοχλωρίδιο μέσω της υποκατάσταση του -Cl από την -NH<sub>2</sub> ομάδα των πολυαμινών (εικόνα 2.5). Η αντίδραση αρχίζει με την ανάμιξη 1ml 2N NaOH και 500μl υπερκειμένου. Ακολούθως προστέθηκαν 10μl βενζυλοχλωριδίου και εφαρμόστηκε έντονη ανάδευση για 30-60 δευτερόλεπτα μέχρι πλήρους ανάμιξης των συστατικών. Τα δείγματα επώαστηκαν υπό συνεχή ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Για τον τερματισμό της αντίδρασης προστέθηκαν 2 ml υπερκορεσμένου NaCl υπό ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προστέθηκε στο κάθε δείγμα 2 ml διαιθυλαιθέρα (diethyl ether) για να πάρουμε στην υπερκείμενη φάση τις βενζυλιωμένες πολυαμίνες. Για τον καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων μετά την εκχύλιση, το υπερκείμενο επώαστηκε για 1 ώρα στους -20°C. Ακολούθως 1 ml από τη υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα ο οποίος τοποθετήθηκε στους 50-60° C με σκοπό την εξάτμιση και απομάκρυνση του διαιθυλαιθέρα. Μετά την απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη, ακολούθησε επαναδιαλυτοποίηση σε 200μl μεθανόλης και τα βενζυλιωμένα

δείγματα αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθούν για τον διαχωρισμό τους (Kotsabasis *et al.*, 1993; Flores and Gaslston, 1981).

Η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε και στα πρότυπα διαλύματα πολυαμινών, πουτρεσκινής (put), σπερμιδίνης (spd), σπερμίνης (spm) συγκεκριμένων συγκεντρώσεων για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.



Εικόνα 2.5. Σχηματική αναπαράσταση της βενζυλίωσης πολυαμινών

### 2.5.7 Ανάλυση πολυαμινών με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)

Τα βενζυλιωμένα παράγωγα των πολυαμινών διαχωρίστηκαν και αναλύθηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) (Waters series HPLC, Milford MA) (Kotzabasis *et al.* 1993). 20 μl από κάθε δείγμα εισήχθησαν ενέσιμα στη στήλη ανάστροφης φάσης C18 (25 cm x 2,1 mm, 5 μm, Supelco Analytical, USA) κάτω από σταθερή θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα εκλούστηκαν από τη στήλη μέσω διαβαθμισμένης έκλουσης με το σύστημα διαλυτών φορμικό οξύ σε νερό (διαλύτης Α) και μεθανόλη (διαλύτης Β) σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα:

Πίνακας 2-1. Πρόγραμμα HPLC

	Χρόνος (λεπτά)	Ροή (ml)	Νερό (%)	Μεθανόλη (%)
1	0	0.2	45	55
2	23	0.2	16	84
3	26	0.2	16	84
4	30	0.2	45	55

Η ταχύτητα ροής της έκλουσης που επιλέγηκε για το συγκεκριμένο σύστημα είναι 0,2 ml/min. Οι κορυφές των βενζυλιωμένων παραγώγων ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση του ανιχνευτή υπεριώδους φωτός στα 254 nm. Πρότυπα διαλύματα και των 3 πολυαμινών (put, spd και spm) παρασκευάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις για την κατασκευή των πρότυπων καμπύλων αναφοράς. Η συλλογή των δεδομένων και η ανάλυση για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης σε κάθε δείγμα έγινε με το λογισμικό «Empower software». Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως nmol gr<sup>-1</sup> FW.

## **2.6 Ενζυμικές δοκιμές**

### **2.6.1 Αντίδραση Bradford για ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών**

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αλλαγή του χρώματος του αντιδραστηρίου Coomassie Brilliant Blue G-250 κατά τη δέσμευση του μορίου με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μεγίστου απορρόφησης της χρωστικής από τα 465nm στα 595nm. Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bradford, η παρασκευή του οποίου έγινε ως εξής: διαλυτοποιήθηκαν 0,2 g Coomassie Brilliant Blue G-250 σε 200 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% v/v. Το διάλυμα αφού αφέθηκε υπό ανάδευση για 12-16 ώρες αραιώθηκε με H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 1L. Μετά τη διήθηση του αντιδραστηρίου, αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευμένο από το φως. (Bradford, 1976; Bearden, 1978)

Για την ποσοτικοποίηση της ολικής πρωτεΐνης στα βιολογικά δείγματα προστέθηκαν 2 ml απεσταγμένο νερό, το ενζυμικό παρασκεύασμα και άλλα 2 ml αντιδραστηρίου Bradford (Bradford, 1976). Μετά από ανακίνηση μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, για την κατασκευή της οποίας χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη από ορό βοδιού.

### **2.6.2 Μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (ADC) και της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (ODC)**

Η δραστηριότητα των ενζύμων ODC και ADC στα φύλλα προσδιορίστηκε με τη χρήση των ραδιενεργών αμινοξέων [<sup>14</sup>C]-ορνιθίνη και [<sup>14</sup>C]-αργινίνη αντίστοιχα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η ομογενοποίηση των δειγμάτων με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος (0.1gr φυτικού ιστού/1ml διαλύματος). Το ρυθμιστικό διάλυμα περιείχε 25 mM Tris-HCl

pH 8.2, 20 mM EDTA, 100  $\mu$ M 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), 1 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT). Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 15000 x g για 20 λεπτά.

Το υπερκείμενο τμήμα χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της ADC. Αντίθετα το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος και ακολούθως χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της δραστηριότητας της ODC. Η αντίδραση ελέγχου της δραστηριότητας των δυο ένζυμων πραγματοποιήθηκε ως εξής: σε κατάλληλους σωλήνες πολυστυρενίου (σωλήνες RIA) προστέθηκαν 35  $\mu$ l ρυθμιστικού διαλύματος, 10  $\mu$ l φυτικού εκχυλίσματος (υπερκείμενο-ADC, ίζημα-ODC) και 5  $\mu$ l (35  $\mu$ Ci/ml) της ραδιενεργής DL-[ $^{14}$ C-Ορνιθίνης] (56 mCi/mmol, Moravек Biochemicals Inc. Brea, CA) ή της DL-[ $^{14}$ C-αργινίνης] (50 mCi/mmol, Moravек Biochemicals Inc. Brea, CA) αντίστοιχα. Οι σωλήνες έκλεισαν με ένα πώμα μέσα από το οποίο εισήχθηκε μια βελόνα που περιέχει ένα φίλτρο διαποτισμένο με 20  $\mu$ l 4N KOH. Αυτό γίνεται γιατί το KOH είναι η ουσία η οποία αντιδρά και δεσμεύει το  $^{14}$ CO<sub>2</sub> που απελευθερώνεται κατά την αποκαρβοξυλίωση της ορνιθίνης ή της αργινίνης. Με την προσθήκη του ραδιενεργού υποστρώματος και το κλείσιμο των σωλήνων η αντίδραση επώαστηκε στους 37°C για 1 h. Για το τέλος της αντίδρασης προστέθηκαν 0,2 ml 10% v/v τριγλωροξικού οξέος διαμέσου της βελόνας και τα δείγματα αφήθηκαν για άλλα 30 λεπτά στους 37°C για πλήρη προσρόφηση του  $^{14}$ CO<sub>2</sub> (Morilla *et al.*, 1996).

Το φίλτρο στη συνέχεια εμβαπτίστηκε σε 3ml σπινθηριστικού υγρού και προσδιορίστηκε η ραδιενέργεια. Η ραδιενέργεια μετρήθηκε σε CPM και εκφράστηκε σε μονάδες ενζυμικής δραστηριότητας (Kyriakidis *et al.*, 1978). Ως μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας της ODC ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου η οποία καταλύει την απελευθέρωση 1 nmol CO<sub>2</sub> σε 1 ώρα στις παραπάνω συνθήκες, ενώ η μονάδα ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ως nmol  $^{14}$ CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> mg πρωτεΐνης<sup>-1</sup> (units mg<sup>-1</sup>).

### **2.6.3 Μέτρηση της ενζυμικής δράσης της $\Delta^1$ -πυρρολινο-5-καρβοξυλο συνθετάσης (P5CS)**

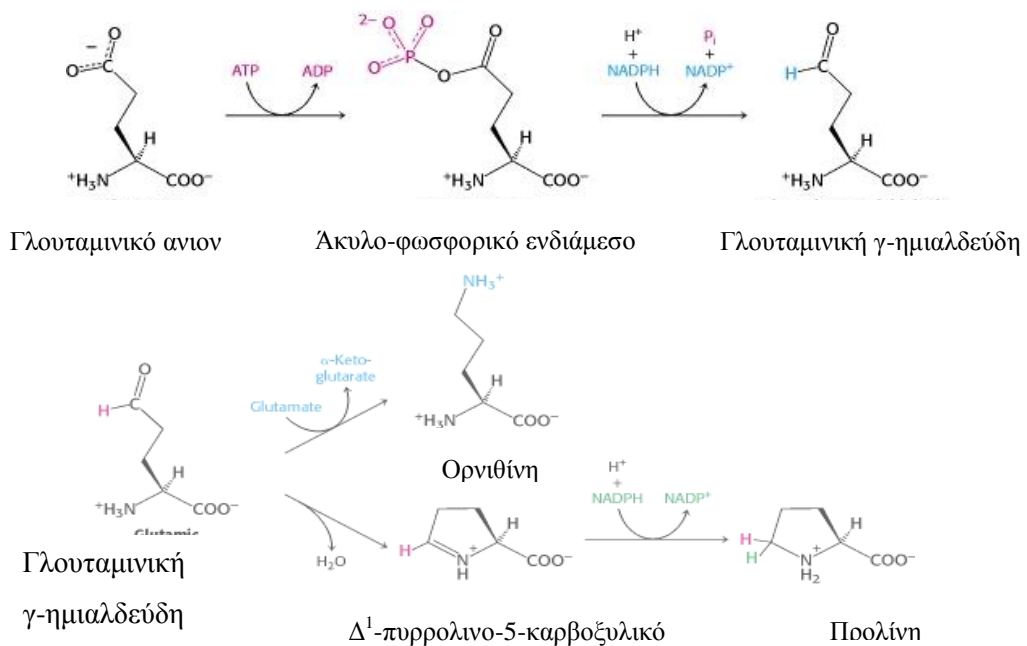
Η ενεργότητα του ενζύμου που εμπλέκεται στο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης εκτιμήθηκε φασματοφωτομετρικά.

Ο φυτικός ιστός ομογενοποιήθηκε κατά τα γνωστά με τη χρήση εκχυλιστικού διαλύματος (2 κουταλιές ιστού/1ml διαλύματος) το οποίο περιείχε 0,1 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM  $\beta$ -μερκαπτομεθανόλη, 10 mM MgCl<sub>2</sub> και 1 mM PMSF (αναστολέας

πρωτεασών). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000 x g για 20 λεπτά στους 4°C. Στο πρώτο στάδιο υπολογίστηκε η περιεκτικότητα της ολικής πρωτεΐνης στο υπερκείμενο κάθε δείγματος με βάση την αντίδραση Bradford που αναφέρθηκε πιο πάνω.

Στο δεύτερο στάδιο υπολογίστηκε η δραστικότητα του ενζύμου P5CS όπως περιγράφεται από τους Garcia-Rios *et al* (1997), με τη προσθήκη γνωστής σταθερής συγκέντρωσης πρωτεΐνης στα δείγματα της αντίδρασης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρησιμοποίηση από το ένζυμο P5CS του υποστρώματος NADPH (εικόνα 2.6).

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τη προσθήκη του διαλύματος αντίδρασης (100 mM Tris-HCl (pH 7.2), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM γλουταμινικό μονονάτριο και 5 mM ATP) στο υπερκείμενο κάθε δείγματος. Με την προσθήκη του υποστρώματος (0.4 mM NADPH) άρχισε η πραγματοποίηση της αντίδρασης η οποία πραγματοποιήθηκε για 15 λεπτά στους 37°C. Η ταχύτητα κατανάλωσης του NADPH στα 15 λεπτά της αντίδρασης οριοθετήθηκε με την μέτρηση της απορρόφησης στα 340nm. Η μείωση της απορρόφησης στα 340nm σε συνάρτηση με τον χρόνο εκφράζει την ενεργότητα του ενζύμου στο κάθε πρωτεϊνικό βιολογικό δείγμα. Η δραστικότητα του ενζύμου εκφράστηκε ως units mg<sup>-1</sup> (οξειδωμένα μmol NADPH mg πρωτεΐνης<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>). Η ταχύτητα της αντίδρασης υπολογίστηκε με την αναλογία του NADPH που χρησιμοποιήθηκε με αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης στο πέρας του χρόνου (εικόνα 2.6) (Yang *et al.*, 2009; Garcia-Rios *et al.*, 1997).



**Εικόνα 2.6.** Σχηματική απεικόνιση του μεταβολικού μονοπατιού παραγωγής της προλίνης με τη χρήση του ενζύμου P5CS

## **2.7 Μοριακές τεχνικές**

### **2.7.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA)**

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Purezol της εταιρίας Bio-Rad σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη διαδικασία αυτή τα συγκομισμένα φύλλα κάθε μεταχείρισης κονιορτοποιήθηκαν σε υγρό άζωτο με τη χρήση γουδιού και γουδοχειριού. 50-100mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού αναμείχθηκαν με 1ml του αντιδραστηρίου Purezol και έπειτα από έντονη ανάδευση για 2-3 λεπτά το ομογενοποιημένο δείγμα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 25°C. Ακολούθησε προσθήκη 0.2 ml χλωροφόρμιου, έντονη ανάδευση για 2-3 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 12000 x g στους 4°C για 15 λεπτά. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα και ακολούθησε κατακρήμνιση του RNA με τη προσθήκη 0.5 ml ισοπροπανόλης για 30 λεπτά στους -20°C. Το ίζημα που περιέχει το RNA παραλήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση στις 12000 x g στους 4°C για 15 λεπτά. Η απομάκρυνση των αλάτων έγινε με έκπλυση του ιζήματος με 1ml διαλύματος αιθανόλης 75% (v/v). Το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία 50-55°C και ακολούθησε επαναιώρησή του σε 20-50μl απιονισμένου νερού (απαλλαγμένου ριβονουκλεασών) ανάλογα με τη ποσότητα του RNA που ιζηματοποιήθηκε. Το RNA φυλάχτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

### **2.7.2 Ποσοτικοποίηση ριβονουκλεϊκού οξέος**

Η συγκέντρωση του RNA (ng/μl) και ο έλεγχος της καθαρότητάς του (ποιοτική και ποσοτική ανάλυση) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **2.7.3 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription)**

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής εφαρμόστηκε για τη δημιουργία συμπληρωματικού DNA, το οποίο χρησιμοποιείται έπειτα για αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης μέσω RT-PCR. Για την δημιουργία του cDNA χρησιμοποιήθηκε το Primescript 1<sup>st</sup> Strand Synthesis Kit (Takara). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας η αντίδραση σύνθεσης του cDNA πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο 1μg ολικού RNA με 0.5μg εκκινητή oligo (dT) και dNTPs σε τελικό όγκο 10μl τοποθετήθηκαν στους

65°C για 5 λεπτά. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η αποδιάταξη δευτεροταγών δομών RNA καθώς και των εκκινητών. Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις του πρώτου σταδίου αναγράφονται παρακάτω. Όλα τα συστατικά της αντίδρασης τοποθετήθηκαν μετά το πέρας της στον πάγο.

<b>Πίνακας 2-2. Αντίστροφη μεταγραφή- Στάδιο 1°</b>	
Συστατικά Αντίδρασης	Όγκος
Ολικό RNA	X μl (1μg)
Εκκινητής Oligo dT (50μM)	1μl
dNTPs (10mM)	1μl
H <sub>2</sub> O	έως τα 10μl
Τελικός όγκος αντίδρασης 10μl	

Κατά το δεύτερο στάδιο προστέθηκαν τα υπόλοιπα αντιδραστήρια (ρυθμιστικό διάλυμα, παρεμποδιστής ριβονουκλεασών, ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης).

<b>Πίνακας 2-3. Αντίστροφη μεταγραφή- Στάδιο 2°</b>	
Συστατικά Αντίδρασης	Όγκος
Μείγμα εκμαγείου RNA/εκκινητών	10μl
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (5x)	4μl
Παρεμποδιστής ριβονουκλεασών (40 units/μl)	0.5μl
Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης (100 units/μl)	1μl
H <sub>2</sub> O (RNAse-free)	έως 20μl

Ακολούθως τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή και το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την αντίδραση της σύνθεσης είναι το εξής:

1. 30°C για 10 λεπτά
2. 42°C για 60 λεπτά
3. 95°C για 5 λεπτά
4. 4°C ∞

#### **2.7.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time RT-PCR)**

Οι αντιδράσεις RT-PCR πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή Biorad IQ5 (Biorad, USA). Κάθε αντίδραση περιείχε 4 μl cDNA ( αραιωμένο 1:5), 5 μl 2x μείγματος αντίδρασης (SYBR Green Super Mix, Invitrogen) και 0,5μl από κάθε εκκινητή (ανοδικός και καθοδικός τελικής συγκέντρωσης 10 μM ο καθένας). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10μl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε δείγμα. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το δομικό γονίδιο της β-ακτίνης II. Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των διαφόρων αντιδράσεων περιλαμβάνει τους εξής κυκλούς:

1. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη της διπλής έλικας στους 95°C για 5 λεπτά.

2. Ακολούθησε η αποδιάταξη της έλικας για 30 δευτερόλεπτα στους 95°C, ο υβριδισμός των εκκινητών για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία η οποία ποικίλει ανάλογα με τον εκκινητή (πίνακας 2.1) και η δράση της πολυμεράσης για επιμήκυνση της αλυσίδας στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα. Ο δεύτερος κύκλος επαναλήφθηκε 40 φορές.

3. Στον τελευταίο κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε μια σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας κατά 5°C από τους 65°C στους 95°C σε χρονικό διάστημα 30 δευτερολέπτων. Ο κύκλος αυτός επαναλήφθηκε 61 φορές. Σε αυτό το στάδιο γίνεται ο διαχωρισμός του κύριου προϊόντος από πιθανά διμερή εκκινητών ή παραπροϊόντα της αντίδρασης, με σκοπό την ανίχνευση μη επιθυμητών παραπροϊόντων λόγω επιμολύνσεων ή μη συγκεκριμένης δραστηριότητας των εκκινητών.



**Πίνακας 2-4. Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση αντιοξειδωτικών γονιδίων.**

Γονίδιο	Εκκινητής	Νουκλεϊνική αλληλουχία	Μέγεθος ενισχυμένων γονιδιακών τμημάτων (bp)	Tm (°C)
<b>CAT</b>	F-Catmiddle	5'-CCA ACC CCA AGT CCC ACA TT-3'	405	54
	R-Catmiddle	5'-CA G GCC AA GTCT TAG TTA CA T CAA-3'		
<b>Act11</b>	F-Actin11	5'-ATG CCA TCC TTC GTC TTG A-3'	182	53
	R-Actin11	5'-GCT GGT CC T GGC TGT CTC-3'		
<b>cAPX</b>	F-Apx-cyt	5'-GGT CGC TTG CC T GAT GC-3'	206	56
	R-Apx-cyt	5'-CCA CCC AAC AAC TCC GTA AA-3'		
<b>FeSOD</b>	F-SodB3	5'-TCT TGC AAC TGA GGA GGA C-3'	227	52
	R-SodB3	5'-AGG AC G CC G ATT CTG ATA-3'		
<b>AOX</b>	F-Aox5	5'-TTG GAT CGA AGA TGA TGA TGA G-3'	269	53
	R-Aox5	5'-ACC AGC ACC ACC CTG AGA C-3'		
<b>GST</b>	F-Gst-A1	5'-TGG CAA AGG CTT CAA TAG AT-3'	145	53
	R-Gst-A1	5'-AGC AGC AGC CAC CAA GTA GT-3'		

## 2.8 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της RT-PCR έγινε με τη χρήση του προγράμματος REST σύμφωνα με τους Pfaffl *et al*, (2002). Όσον αφορά τα αποτελέσματα των βιοχημικών και φυσιολογικών μετρήσεων έγιναν με τη χρήση της ANOVA. Για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των μεταξύ των μέσων ορών χρησιμοποιήθηκε ο δίπλευρος έλεγχος με επίπεδο σημαντικότητας 5%.

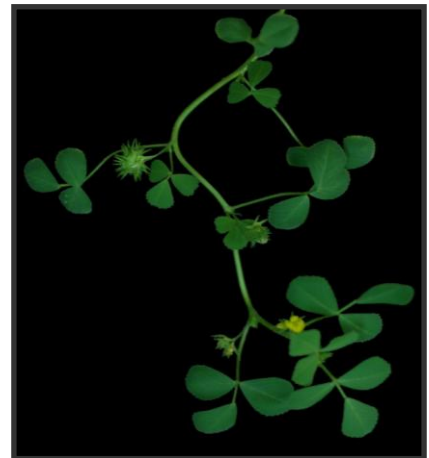
## 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Επιλογή της κατάλληλης μεθόδου για την εφαρμογή του SNP ως δότης του ΝΟ στο φυτό *Medicago truncatula*

#### 3.1.1 Εισαγωγή

##### 3.1.1.1 *Medicago truncatula*

Ως αρχικό φυτικό υλικό για την εκτέλεση των πειραμάτων επιλέγηκε το φυτό *Medicago truncatula* Jemalong A17. Η *Medicago truncatula* είναι ένα ετήσιο ψυχανθές φυτό το οποίο προέρχεται από τις περιοχές της Μεσογείου. Ως ψυχανθές φυτό, αποτελεί πλούσια πηγή πρωτεϊνών και μπορεί να αναπτυχθεί ανεξάρτητα εξωγενούς αζωτούχας θρέψης, χάρη στην ικανότητά του να σχηματίζει ριζικά φυμάτια πάνω στις ρίζες του στις οποίες συμβιώνει το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Sinorhizobium meliloti*.



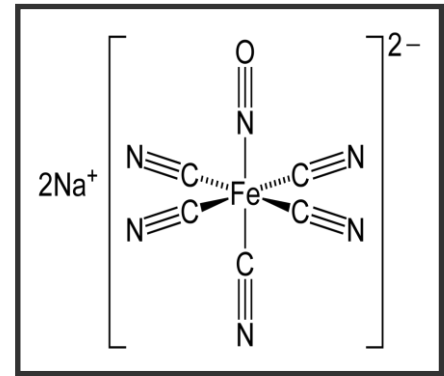
**Εικόνα 3.1.** *Medicago truncatula* Jemalong A17

Σημαντικά χαρακτηριστικά που κάνουν τη *M. truncatula* ένα επιθυμητό πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη των ψυχανθών είναι ότι είναι διπλοειδές ( $2n=16$ ) και αυτόγαμο φυτό. Επίσης το μέγεθος του γονιδιώματος της είναι μικρό (500-600 Md/IC), με σύντομο βιολογικό κύκλο ζωής και με πληθώρα αριθμού διαθέσιμων ποικιλιών όπως π.χ. η ποικιλία Jemalong A17 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

##### 3.1.1.2 Νιτροπρωσσικό νάτριο (SNP)

Το SNP είναι ένας δότης του ΝΟ που χρησιμοποιείται συχνά για τη μελέτη της επίδρασης του ΝΟ στα φυτά κάτω από συνθήκες καταπόνησης (Vladkova *et al.*, 2010). Το ΝΟ μέσω του SNP δρα συνήθως ως μόριο σήματος στα φυτά (Evdei and Kolbert, 2008).

Το SNP είναι ένα σύμπλοκο μεταλλικό ανιόν σιδήρου με οκταεδρική δομή. Το άτομο του σιδήρου είναι ενωμένο με 5 μόρια κυανίου και με ένα άτομο μονοξειδίου του αζώτου. Οι χημικές του αντιδράσεις κυρίως συνδέονται με το NO. Το SNP διατίθεται στο εμπόριο σε στερεή μορφή ενυδατωμένου άλατος νατρίου ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5 \text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Στη στερεή του μορφή είναι κόκκινου χρώματος, διαλύεται εύκολα στο νερό και λιγότερο στην αλκοόλη. (Coppens *et al.*, 2002).



**Εικόνα 3.2.** Νιτροπρωσσικό νάτριο (SNP)

### 3.1.1.3 Διασυστηματικότητα

Το NO μπορεί να μετακινηθεί μέσω διάχυσης μέσα στο κύτταρο από το μέρος της σύνθεσης του σε άλλες κυτταρικές περιοχές όπου μπορεί να επάγει ένα αποτέλεσμα αλληλεπιδρώντας εξειδικευμένα με συγκεκριμένες πρωτεΐνες-στόχους (Misra *et al.*, 2010). Υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να διαχυθεί έξω από το κύτταρο μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης σε γειτονικά κύτταρα και έτσι να δημιουργήσει μια μικρή περιοχή από κύτταρα ικανά να αποκρίνονται στο NO, κάτι όμως που δεν έχει ακόμη διασαφηνισθεί. Παρόλα αυτά λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη τάση του NO να αντιδρά γρήγορα με άλλες ενώσεις, μια τέτοια διάχυση μπορεί να περιορισθεί. Το NO αποτελεί μια λιπόφιλη ένωση που μπορεί να συσσωρεύεται επιλεκτικά στις μεμβράνες και να κινείται μέσω αυτού του μονοπατιού (Liu *et al.*, 1998).

Μια εναλλακτική υπόθεση της μεταφοράς του NO είναι μέσω των πρόδρομων μορίων NO ή των ενώσεων που αποτελούν "αποθήκες NO" που οδηγούν σε απελευθέρωση σε διακριτές περιοχές με τρόπο ανάλογο της μεταφοράς της πρόδρομης ένωσης του αιθυλενίου ACC. Η ένωση SGNO φαίνεται να είναι μια τέτοια ένωση στα φυτά (Valderrama *et al.*, 2007), αφού η γλουταθειόνη είναι παρούσα σε υψηλές (της τάξεως του mM) συγκεντρώσεις στα κύτταρα. Εναλλακτικά, η αργινίνη και τα νιτρώδη μπορούν να θεωρηθούν ως πρόδρομα μόρια μεταφορείς του NO (Rockel *et al.*, 2002; Modolo *et al.*, 2005).

### 3.1.2 Αποτελέσματα

#### 3.1.2.1 Μέθοδοι εισαγωγής του SNP ως δότης NO στο φυτό

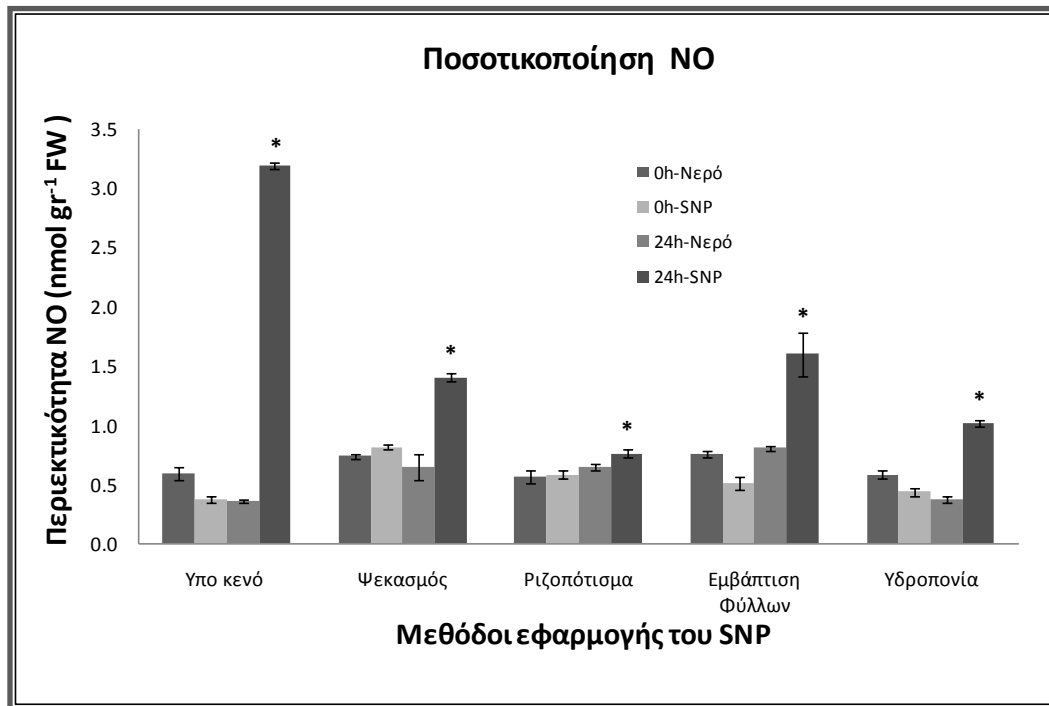
Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αποτελούν το κεντρικό άξονα της εργασίας αυτής, πραγματοποιήθηκε η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εφαρμογής του SNP ως δότη του NO. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκαν πέντε διαφορετικές μέθοδοι και στη συνέχεια υπολογίστηκε η συγκέντρωση του NO. Η συγκέντρωση του SNP που επιλέχθηκε για το πιο κάτω πείραμα είναι αυτή των 2,5 mM. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και με νερό για τα δείγματα μάρτυρες.

Η εφαρμογή του SNP πραγματοποιήθηκε στο φυτό *Medicago truncatula* μέσω των ακόλουθων μεθόδων:

- I. Εμβάπτιση των φύλλων στο SNP
- II. Ριζοπότισμα με SNP
- III. Εφαρμογή στο φυλλικό σύστημα υπό κενό
- IV. Ψεκασμός μέχρι απορροής
- V. Υδροπονία

Αμέσως μετά την εφαρμογή του SNP πραγματοποιήθηκε η πρώτη συγκομιδή των φύλλων (0 h) και ακολούθως η δεύτερη συγκομιδή μετά από 24 ώρες (24 h). Στη συνέχεια έγινε η ποσοτικοποίηση του NO στα διάφορα δείγματα όπως περιγράφεται αναλυτικά στα υλικά και μέθοδοι.

Από το παρακάτω γράφημα (**σχήμα 3.1**) παρατηρείται πως η καταλληλότερη μέθοδος εφαρμογής του SNP στη *M. truncatula* για παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου στα φύλλα είναι η εφαρμογή υπό κενό. Ακολουθούν οι μέθοδοι εμβάπτισης των φύλλων και ψεκασμός, με βάση την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του NO που προσδιορίζεται κάθε φορά. Η μέθοδος ριζοποτίσματος κρίθηκε ακατάλληλη λόγω της χαμηλής προσδιορισθείσας συγκέντρωσης NO μέσα στο κύτταρο.



**Σχήμα 3.1.** Επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου εφαρμογής του SNP σε φυτά *M. truncatula* Jemalong A17. Εφαρμογή του SNP (2,5 mM) στα φύλλα: Α. Υπό κενό, Β. Ψεκασμός, Γ. Ριζοπότισμα, Δ. Εμβάπτιση φύλλων και προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε NO. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα, n=3). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.

## **3.2 Χωροχρονική μελέτη της επίδρασης του NO στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό της μηδικής σε δυο αναπτυξιακά στάδια**

### **3.2.1 Εισαγωγή**

#### **3.2.1.1 Φυσιολογικός ρόλος του NO**

Η φωτοσύνθεση είναι μια από τις σημαντικότερες φυσιολογικές διαδικασίες που πραγματοποιείται στα φυτά. Αν και ο ρόλος του NO στη διαδικασία αυτή δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως, το SNP ως δότης NO έχει βρεθεί να μειώνει τα επίπεδα ενζύμων που ρυθμίζουν τη φωτοσύνθεση στο σιτάρι (Tu *et al.*, 2003) και στο φασόλι (Lum *et al.*, 2005). Συγκεκριμένα το NO μπορεί να επηρεάζει άμεσα τη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και το φωτοσύστημα II (PSII). Επίσης το SNP βρέθηκε να μειώνει τα επίπεδα φθορισμού χλωροφύλλης (Fv/Fm) ενδεικτικά της αποδοτικότητας του PSII στα φύλλα πατάτας (Yang *et al.*, 2004). Παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλες στη πατάτα, το μαρούλι και την *A. thaliana* μετά από μεταχείριση με SNP (Beligni and Lamattina, 2000).

Άλλος φυσιολογικός ρόλος του NO είναι η ικανότητά του να επηρεάζει τις διαδικασίες που σχετίζονται με το άνοιγμα των στομάτων. Μελέτες έδειξαν ότι εξωγενής εφαρμογή του σε μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά οδήγησαν στο κλείσιμο των στομάτων μέσω της  $Ca^{2+}$  εξαρτώμενης διαδικασίας (Garcia-Mata and Lamattina, 2001). Στα φυτά *Pisum sativum* και *Vicia faba* το ABA οδήγησε σε αύξηση του ενδογενούς NO το οποίο θεωρείται ο λόγος του επαγόμενου από το ABA κλεισίματος των στομάτων (Neill *et al.*, 2002).

#### **3.2.1.2 Αντιοξειδωτική δράση του NO έναντι των ενεργών μορφών οξυγόνου**

Η οξειδωτική καταπόνηση είναι το πιο συχνό αποτέλεσμα για πολλές αβιοτικές καταπονήσεις και εκδηλώνεται εντός του κυττάρου με την αύξηση των επιπέδων των ROS. Η κυτταρική προστασία που προσφέρει το NO στηρίζεται κυρίως στην ικανότητα του να διατηρεί την κυτταρική ομοιόσταση και να ρυθμίζει τα επίπεδα και την τοξικότητα των ROS (Mittler, 2002).

Η ικανότητα του NO να ασκεί προστατευτική λειτουργία κατά της οξειδωτικής καταπόνησης προκύπτει από τις εξής ιδιότητες του:

- Αντιδρά με ρίζες λιπιδίων (lipid radicals) με αποτέλεσμα να διακόπτεται η διαδικασία οξείδωσης των λιπιδίων
- Αντιδρά με τα υπεροξειδοτικά ανιόντα ( $O_2^{\cdot-}$ ) και σχηματίζει υπερνιτροζικά ανιόντα ( $ONOO^-$ )
- Ενεργοποιεί διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα (SOD, CAT και APX)

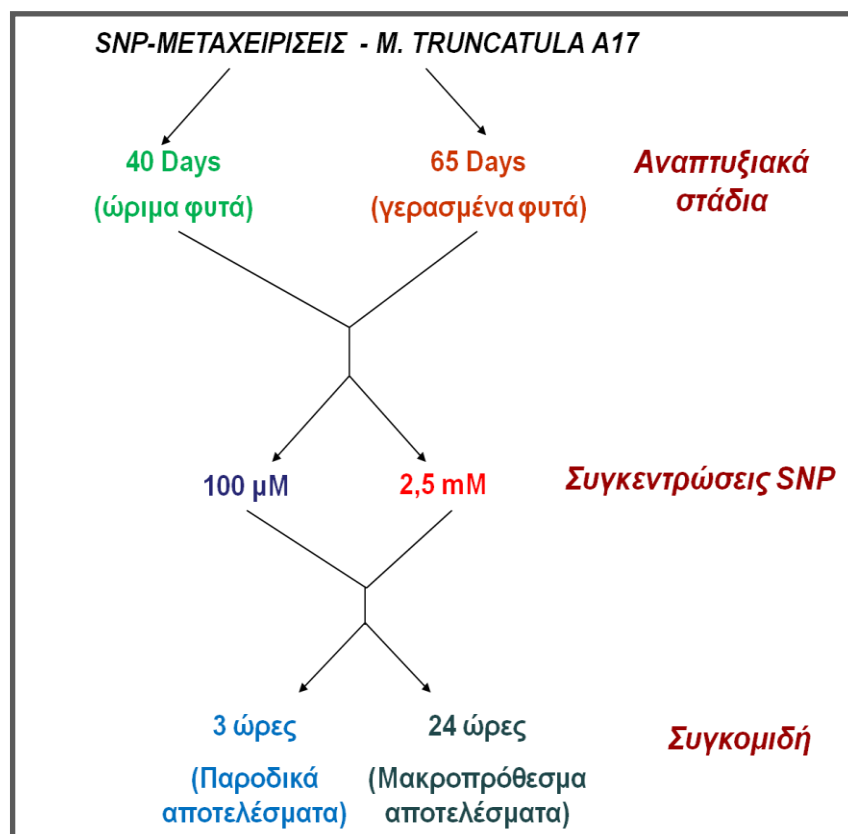
Εκτός της δράσης του NO για τον περιορισμό των ROS που αποτελούν απειλή για τα κύτταρα και προκαλούν, εξαιτίας της συσσώρευσης τους, οξειδωτική καταπόνηση, σημαντική είναι και η συμβολή διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Σε αυτά ανήκουν η δισμουτάση του υπεροξειδικού ανιόντος (SOD; EC 1.15.1.1), η καταλάση (CAT; EC 1.11.1.6) και η ασκορβική υπεροξειδάση (APX; EC 1.11.1.11).

Οι SODs είναι μια οικογένεια μεταλλοενζύμων (CuZn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD) που καταλύουν την επιτόπου μετατροπή των  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$  και  $O_2$  μη επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό στις  $O_2^{\cdot-}$  να διαχυθούν μέσω των βιολογικών μεμβρανών (Halliwell & Gutteridge, 2006). Οι SODs απαντώνται στα διάφορα κυτταρικά οργανίδια, ιδίως στους χλωροπλάστες (Cu/Zn-SOD και Fe-SOD), το κυτταρόπλασμα (Cu/Zn-SOD) και τα μιτοχόνδρια (Mn-SOD και Cu/Zn-SOD), (Del Rio *et al.*, 1992; Bowler *et al.*, 1994 Halliwell & Gutteridge, 2006), ενώ διαπιστώθηκε η παρουσία τους και στα υπεροξεισωμάτια φυτικών ιστών (Cu/Zn-SOD) (Del Rio *et al.*, 1983). Στη συνέχεια η εκκαθάριση του  $H_2O_2$  είναι δυνατό να λαμβάνει χώρα επιτόπου ή τις περισσότερες φορές μακριά από τη θέση σχηματισμού του, με τη δράση ενζύμων όπως οι καταλάσες και οι υπεροξειδάσες.

Οι καταλάσες, οι περισσότερες από τις οποίες είναι αιμο-πρωτεΐνες (Halliwell & Gutteridge, 2006) δρουν κυρίως στα υπεροξεισωμάτια και καταλύουν την διάσπαση του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$  (Schrader & Fahimi, 2004). Παρόλο που η διάσπαση του  $H_2O_2$  από την CAT είναι ταχεία, εντούτοις δεν είναι το σημαντικότερο ένζυμο εκκαθάρισης του  $H_2O_2$  που παράγεται από τις SODs, αφού η μεγαλύτερη ποσότητα των  $O_2^{\cdot-}$  παράγεται και εκκαθαρίζεται στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες (Halliwell & Gutteridge, 2006), όπου η CAT δεν είναι παρούσα. Ένα δεύτερο ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της διάσπασής του  $H_2O_2$  είναι η υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος (APX) που δρα στους χλωροπλάστες και στο κυτταρόπλασμα, όπου και αποτοξικοποιεί το  $H_2O_2$  οξειδώνοντας το ασκορβικό οξύ σε μια πολύ ασθενώς ενεργή ρίζα (Mano *et al.*, 2001).

### 3.2.2 Αποτελέσματα

Στο κυρίως πείραμα της παρούσας εργασίας εφαρμόστηκαν δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις SNP (100 $\mu$ M και 2,5 mM) σε φυτά μηδικής (*Medicago truncatula* Jemalong A17) δυο διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων (ώριμα - 40 ημερών - και γηρασμένα - 65 ημερών). Ακολούθησε η συγκομιδή των φύλλων σε τρία χρονικά διαστήματα, αμέσως μετά την εφαρμογή του SNP (0 ώρες), 3 ώρες μετά την εφαρμογή για διερεύνηση των παροδικών αποτελεσμάτων και 24 ώρες μετά την εφαρμογή για μακροπρόθεσμα αποτελέσματα (σχήμα 3.2).

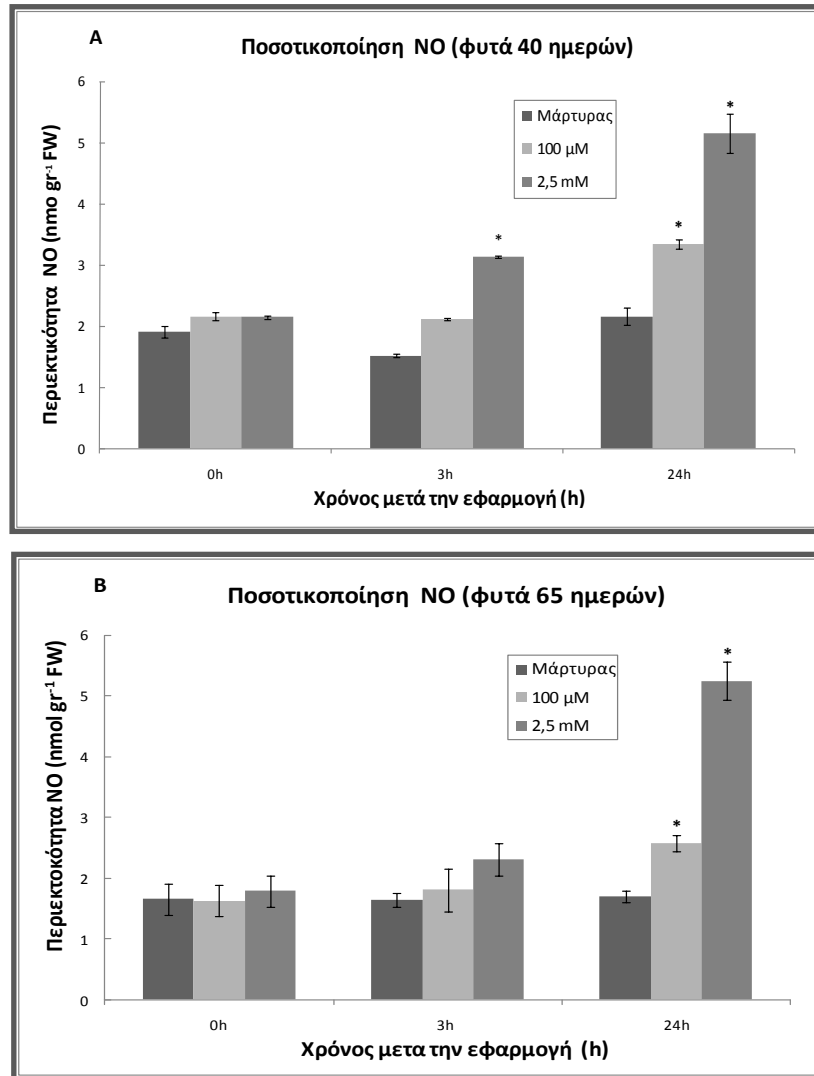


Σχήμα 3.2. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας

#### 3.2.2.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του μονοξειδίου του αζώτου

Μετά τη μεταχείριση των φυτών με SNP δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων (100  $\mu$ M και 2,5 mM) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο εφαρμογή υπό κενό, προσδιορίστηκε σε κάθε δείγμα η συγκέντρωση του NO, όπως περιγράφεται αναλυτικά στις μεθόδους (ενότητα 2.5.2), για έλεγχο της αποτελεσματικότητας της εφαρμογής (σχήμα 3.3).





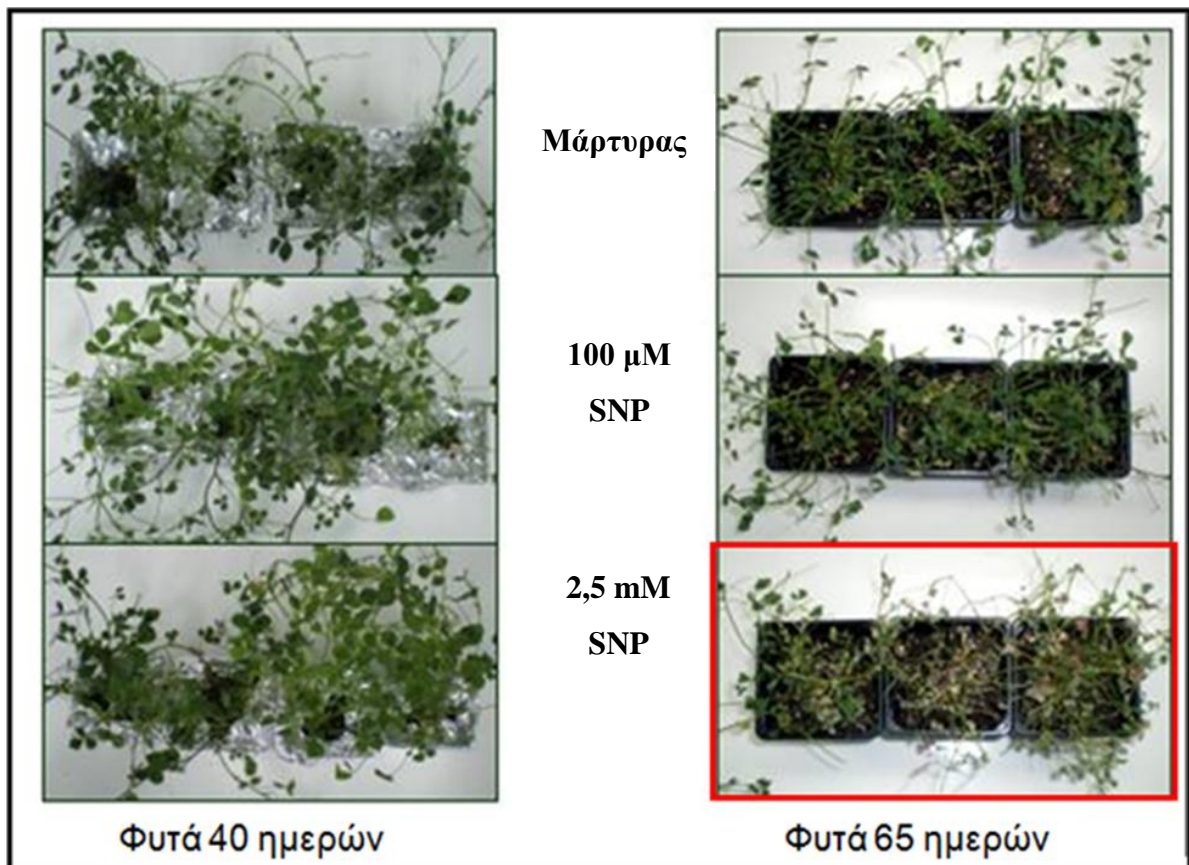
**Σχήμα 3.3.** Ποσοτικός προσδιορισμός του NO έπειτα από εφαρμογή SNP (100  $\mu$ M και 2,5 mM) σε φυτά *M. truncatula* 40 και 65 ημερών αντίστοιχα. Η εφαρμογή SNP έγινε με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις 100  $\mu$ M και 2,5 mM σε ώριμα (40 ημερών) (A) και γηρασμένα (65 ημερών) (B) φυτά. Η συγκομιδή των φύλλων έγινε σε τρία χρονικά διαστήματα (0h, 3h και 24h) και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε NO.

Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα, n=3). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η περιεκτικότητα των φυτών σε NO έπειτα από τη μεταχείριση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση SNP (2,5 mM) ήταν αυξημένη σε σχέση με τα φυτά που μεταχειρίστηκαν με τη μικρότερη συγκέντρωση (100  $\mu$ M). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση NO παρατηρήθηκε μακροπρόθεσμα έπειτα από 24 ώρες εφαρμογής SNP σε σύγκριση με το παροδικό αποτέλεσμα των 3 ωρών εφαρμογής SNP. Τα επίπεδα του NO ήταν παρόμοια και για τα δυο αναπτυξιακά στάδια των φυτών (σχήμα 3.3).

### 3.2.2.2 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

Πέντε μέρες μετά την εφαρμογή πραγματοποιήθηκαν φαινοτυπικές παρατηρήσεις στα πειραματικά φυτά (σχήμα 3.4). Όπως παρατηρούμε παρακάτω τα φυτά με τις δραματικότερες αλλαγές στο φαινότυπο (χλώρωση και μερική νέκρωση φυλλώματος) είναι αυτά των 65 ημερών (γηρασμένα φυτά) στη μεγαλύτερη συγκέντρωση SNP των 2,5 mM. Αντίθετα τα φυτά των 40 ημερών δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες μεταβολές στο φαινότυπο τους.

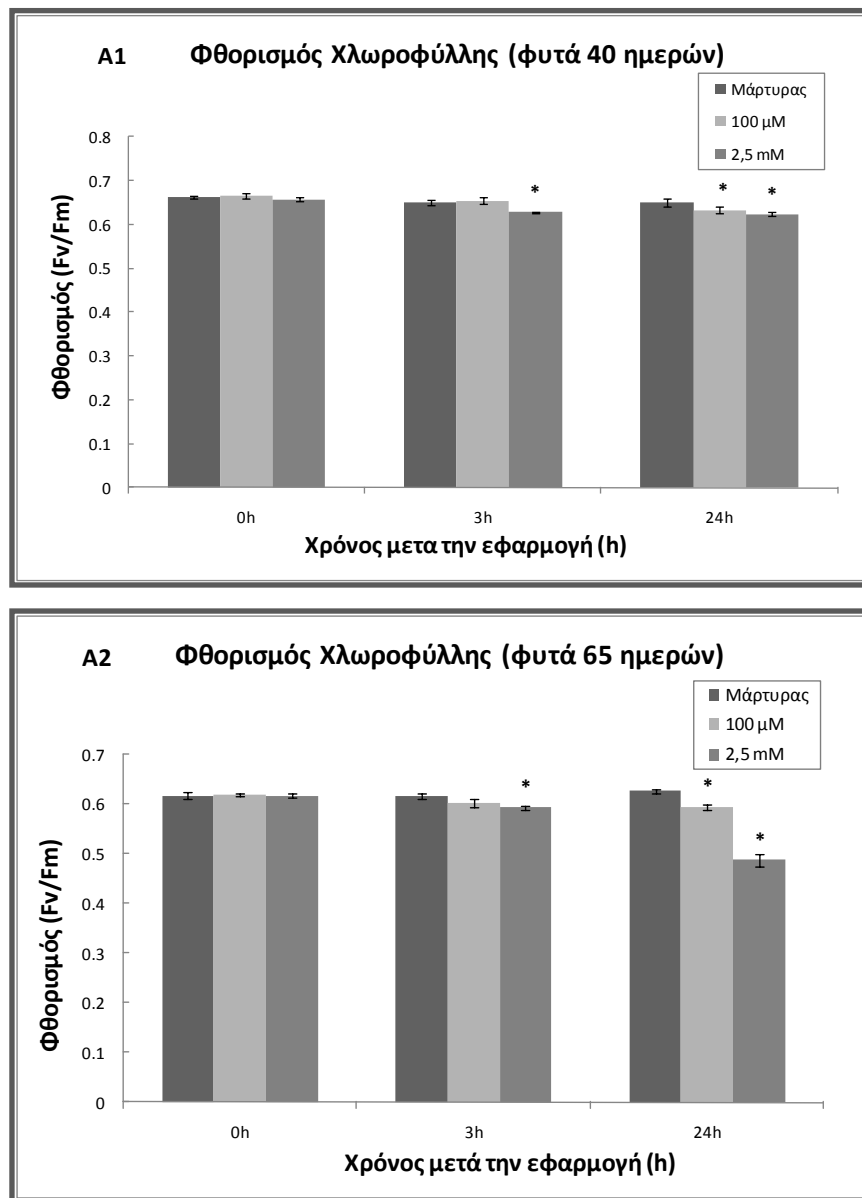


Σχήμα 3.4. Μακροσκοπικές, φαινοτυπικές παρατηρήσεις σε φυτά *M. truncatula* 5 ημέρες μετά την εφαρμογή των διαφορετικών συγκεντρώσεων SNP (100 μM και 2,5 mM) σε φυτά 40 και 65 ημερών αντίστοιχα.

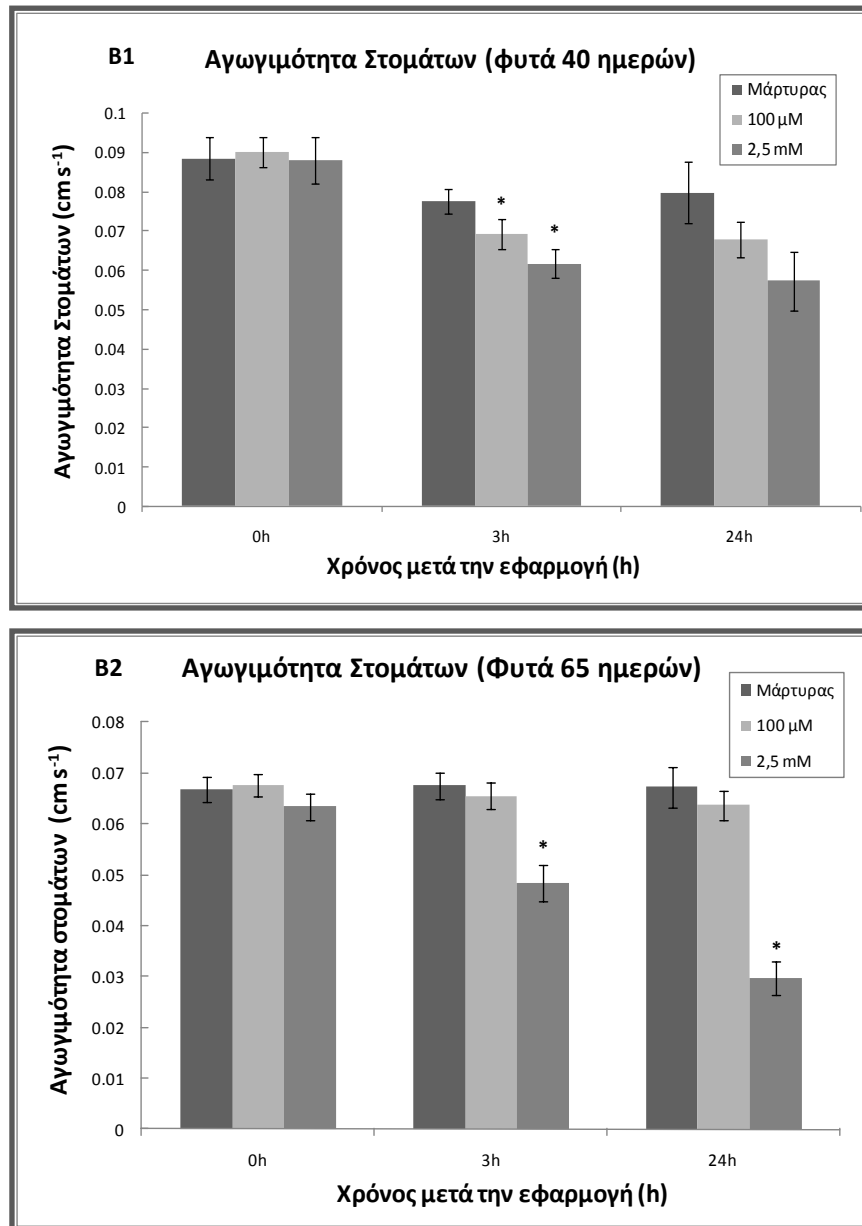
### 3.2.2.3 Επίδραση του NO στις φυσιολογικές παραμέτρους

Οι φυσιολογικές παράμετροι προσδιορίστηκαν μετρώντας τον φθορισμό της χλωροφύλλης ( $F_v/F_m$ ) ως δείκτης αποδοτικότητας του φωτοσυστήματος II (PS II) καθώς και την αγωγιμότητα των στομάτων στα φύλλα. Οι τιμές των παραμέτρων καταγράφηκαν

με τη χρήση ειδικών μηχανημάτων (ενότητα 2.3) και τα αποτελέσματα παρατίθενται στα παρακάτω διαγράμματα (σχήμα 3.5 και σχήμα 3.6).



**Σχήμα 3.5.** Επίδραση του NO στα επίπεδα των χλωροφυλλών σε φυτά *Medicago truncatula* Jemalong A17 δυο αναπτυξιακών σταδίων (ώριμα και γηρασμένα) μετά από εφαρμογή SNP. Φθορισμός χλωροφύλλης ως δείκτης αποδοτικότητας του φωτοσυστήματος II (PS II) (Fv/Fm) στα φύλλα 40 ημερών (A1) και 65 ημερών (A2). Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα, n=3). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.



**Σχήμα 3.6.** Επίδραση του NO στην αγωγιμότητα στομάτων σε φυτά *Medicago truncatula* Jemalong A17 δυο αναπτυξιακών σταδίων (ώριμα και γηρασμένα) μετά από εφαρμογή SNP. Αγωγιμότητα στομάτων σε φύλλα 40 ημερών (B1) και 65 ημερών (B2).

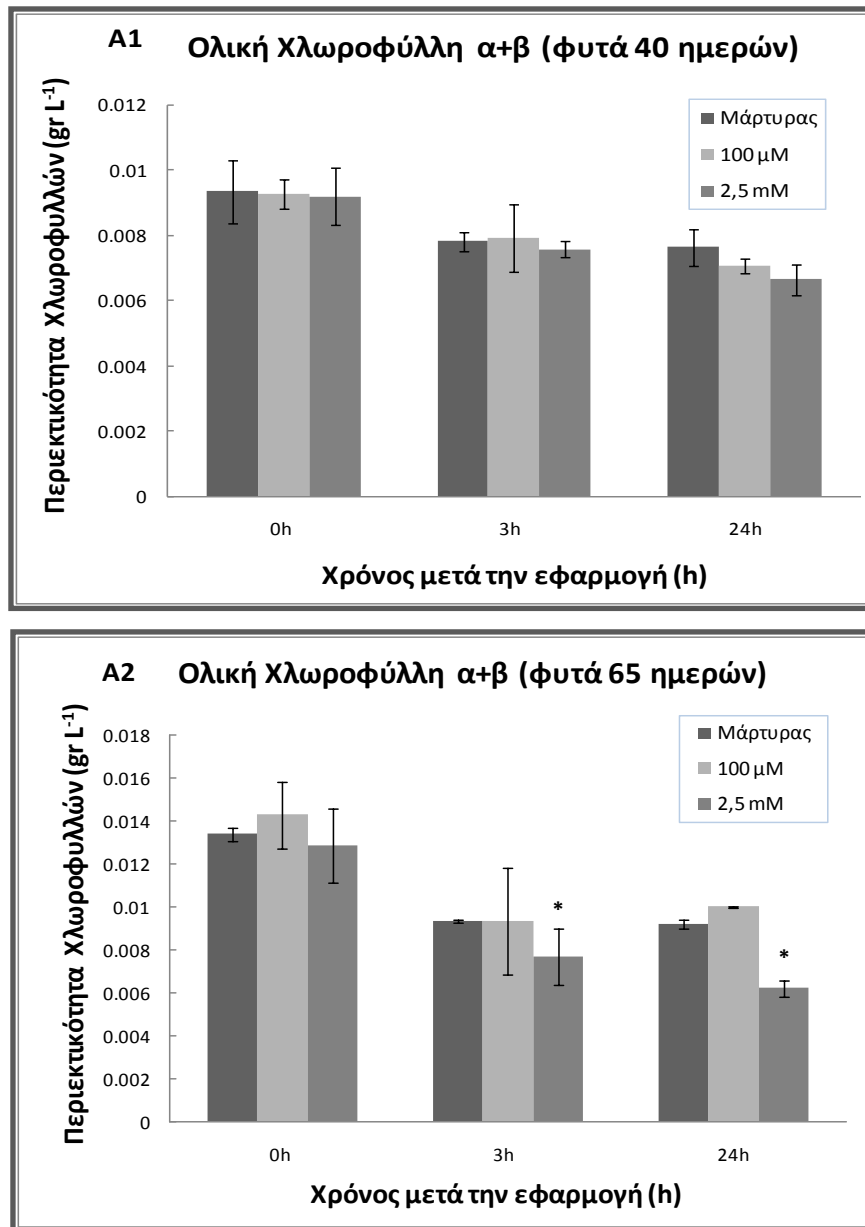
Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα, n=3). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.

Στα φυτά των 40 ημερών (ώριμα φυτά) παρατηρείται μια μικρή μείωση της φωτοχημικής ικανότητας του φωτοσυστήματος II (PSII) (Fv/Fm) τόσο στις 3 ώρες όσο και στις 24 ώρες μετά την εφαρμογή SNP (**σχήμα 3.5 A1**). Αντίθετα, στα φυτά των 65 ημερών (γηρασμένα φυτά), ενώ διατηρείται η μικρή μείωση στις 3 ώρες, στις 24 ώρες παρατηρείται σημαντική πτώση στη φωτοχημική ικανότητα του PSII (**σχήμα 3.5 A2**).

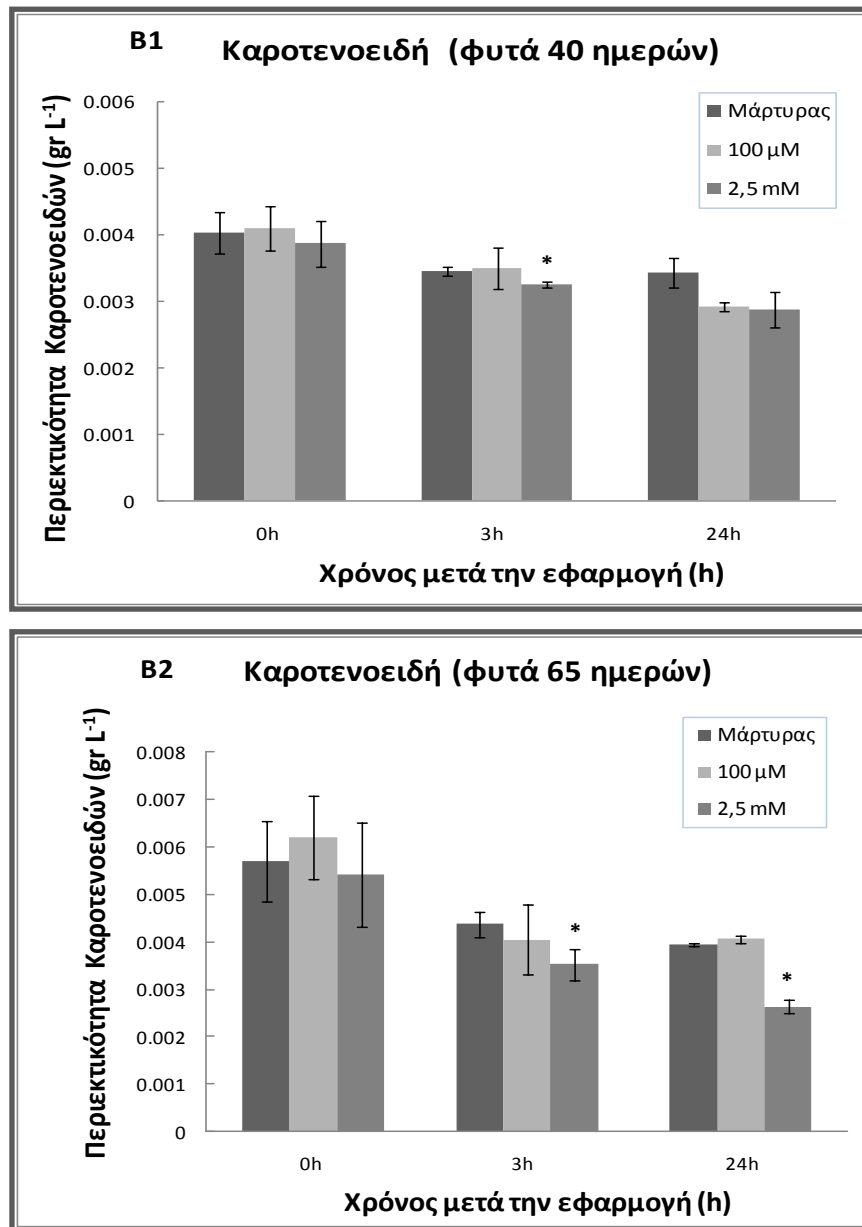
Στις μετρήσεις καταγραφής αγωγιμότητας στομάτων τα φυτά 40 ημερών (ώριμα φυτά) παρουσίασαν αισθητή μείωση στο άνοιγμα των στομάτων τόσο στις 3 ώρες όσο και στις 24 ώρες μετά την εφαρμογή SNP. Στη συγκέντρωση των 2,5 mM παρουσιάστηκε η μεγαλύτερη μείωση στις 24 ώρες σε σχέση με τη μικρότερη συγκέντρωση των 100  $\mu$ M (σχήμα 3.6 B1). Στα φυτά των 65 ημερών (γηρασμένα φυτά) παρατηρείται μείωση στα 100  $\mu$ M που διατηρείται στις 3 και 24 ώρες αντίστοιχα. Αντίθετα στη συγκέντρωση των 2,5 mM παρατηρείται μια αισθητή μείωση στις 3 ώρες που γίνεται πιο σημαντική στις 24 ώρες (σχήμα 3.6 B2).

#### **3.2.2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφύλλης και καροτενοειδών**

Ενισχύοντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων που πήραμε *in situ* στα φύλλα των φυτών (φθορισμός χλωροφυλλών), προχωρήσαμε σε ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής χλωροφύλλης ( $\alpha+\beta$ ) εντός του κυττάρου. Παράλληλα με τη χλωροφύλλη υπολογίστηκαν και τα ενδοκυττάρια επίπεδα των καροτενοειδών που αποτελούν μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια τα οποία δεσμεύουν το μονήρες οξυγόνο ( $^1\text{O}_2$ ). Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με εκχύλιση των δειγμάτων με το διαλύτη DMSO και φασματοφωτομετρική ανάλυση όπως περιγράφεται από τους Richardson *et al.* (2002) (ενότητα 2.5.1). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρατίθενται στο πιο κάτω διάγραμμα (σχήμα 3.7).



**Σχήμα 3.7.** Περιεκτικότητα των φύλλων σε ολικές χλωροφύλλες (α+β) μετά από μεταχείριση φυτών *M. truncatula* με διάφορες συγκεντρώσεις SNP (100μM και 2,5 mM). Ποσοτικός προσδιορισμός της χλωροφύλλης (α+β) φασματοφωτομετρικά στα φυτά 40 ημερών (A1) και 65 ημερών (A2). Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα, n=3). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.



**Σχήμα3.8.** Περιεκτικότητα των φύλλων σε καροτενοειδή μετά από μεταχείριση φυτών *M. truncatula* με διάφορες συγκεντρώσεις SNP (100μM και 2,5 mM). Ποσοτικός προσδιορισμός των καροτενοειδών στα φυτά 40 ημερών (B1) και 65 ημερών (B2).

Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα, n=3). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.

Στα φυτά 40 ημερών παρατηρείται μείωση στα επίπεδα ολικής χλωροφύλλης η οποία είναι πιο έντονη στις 24 ώρες μετά την εφαρμογή για την συγκέντρωση των 2,5 mM SNP (σχήμα 3.7 A). Στα φυτά 65 ημερών παρατηρείται μια στατιστικώς σημαντική πτώση τόσο στις τρεις ώρες όσο και στις 24 ώρες με τη μεγαλύτερη μείωση να παρατηρείται στις 24 ώρες μετά την εφαρμογή (σχήμα 3.7 A2).

Στις συγκεντρώσεις των καροτενοειδών στα ώριμα φυτά (40 ημερών) δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στα χρονικά διαστήματα (3 h και 24 h) και στις συγκεντρώσεις SNP (100μM και 2,5 mM) που εξετάστηκαν (**σχήμα 3.8 B1**). Αντιθέτως, στα φυτά 65 ημερών παρατηρείται πτώση των επιπέδων καροτενοειδών αρχικά στις 3 ώρες και ακολούθως πιο αισθητή πτώση στις 24 ώρες μετά την εφαρμογή του SNP (**σχήμα 3.8 B2**).

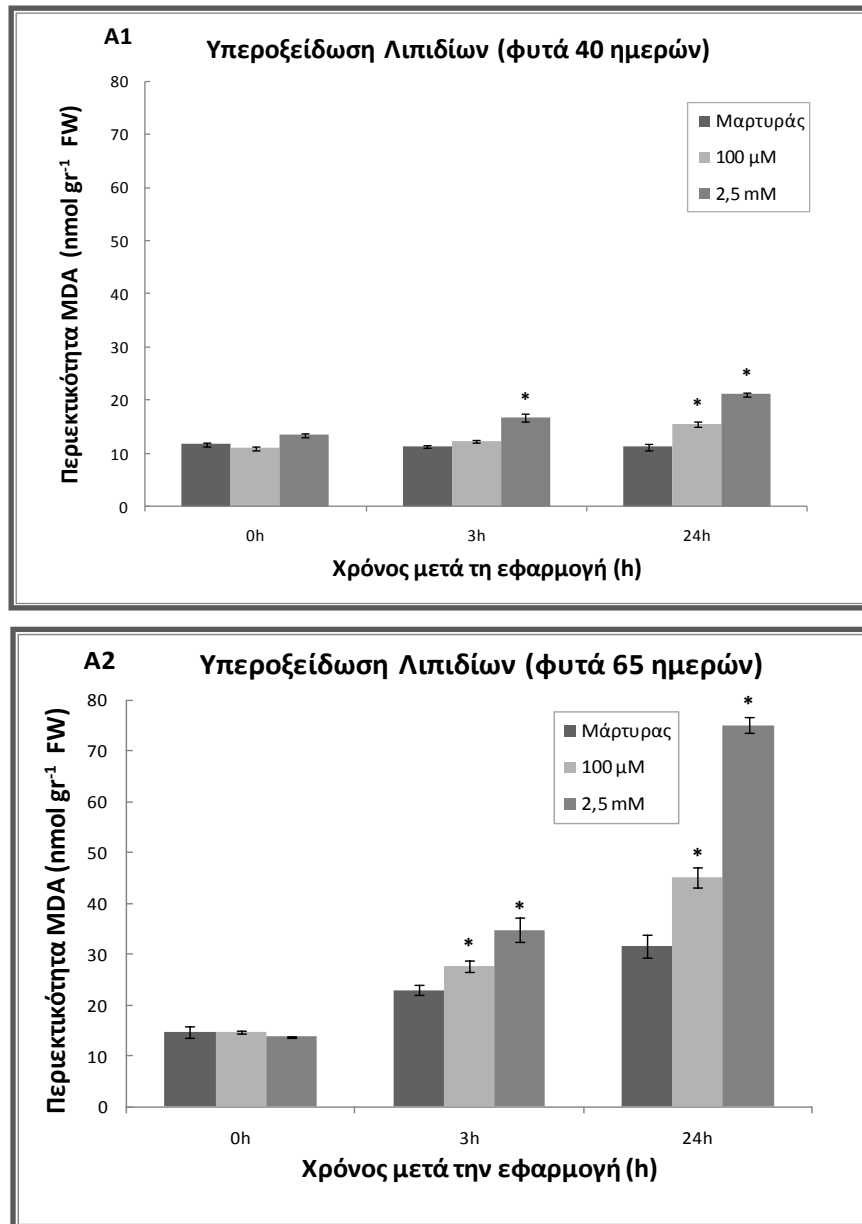
### **3.2.2.5 Κυτταρική ζημιά και περιεκτικότητα σε ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS)**

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ζημιάς στα φυτά που μεταχειρίστηκαν με τις δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις SNP εξετάστηκαν τα επίπεδα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων των μεμβρανών. Παράλληλα εξετάστηκαν τα επίπεδα των ROS με προσδιορισμό της συγκέντρωσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ο ποσοτικός προσδιορισμός τόσο της υπεροξειδωσής των λιπιδίων των μεμβρανών (MDA) όσο και του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> πραγματοποιήθηκε με χημικές αντιδράσεις και φασματοφωτομετρική ανάλυση. Η ποιοτική ανάλυση έγινε μέσω ιστοχημικής ανίχνευσης με τη χρήση κατάλληλων χημικών αντιδραστηρίων, DAB-HCl για το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και Schiff's για την υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών.

#### **3.2.2.5.1 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός της υπεροξειδωσής των λιπιδίων των μεμβρανών**

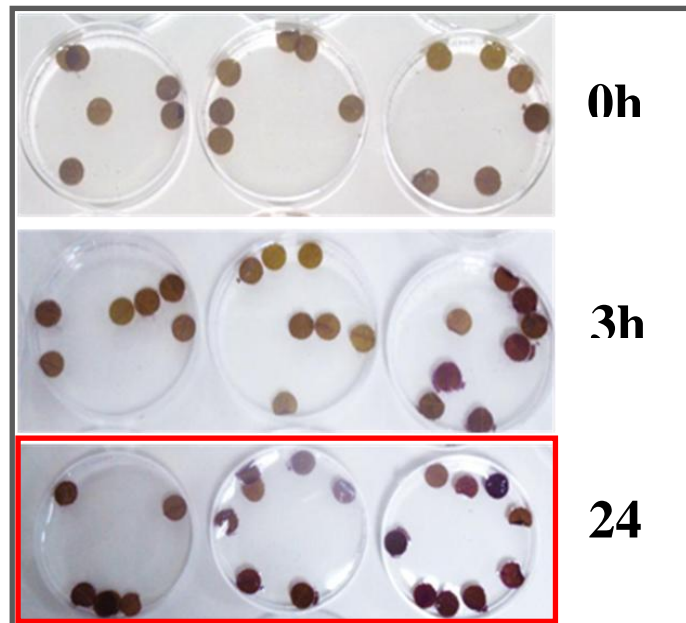
Ο ποσοτικός προσδιορισμός της υπεροξειδωσής των λιπιδίων των μεμβρανών, έγινε μετρώντας τα επίπεδα του προϊόντος MDA έπειτα από την αντίδραση με το TBA και φασματοφωτομετρική ανάλυση όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.5.4 στα υλικά και μέθοδοι. Η ιστοχημική ανάλυση έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Schiff (ενότητα 2.4.2)





**Σχήμα 3.9.** Ποσοτικός προσδιορισμός της υπεροξείδωσης των λιπιδίων μεμβρανών σε φυτά *Medicago truncatula* Jemalong A17 έπειτα από μεταχείριση με SNP. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του MDA φασματοφωτομετρικά στα φυτά 40 ημερών (A1) και 65 ημερών (A2).

Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα,  $n=3$ ). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.



**Σχήμα 3.10.** Ιστοχημική ανίχνευση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων των μεμβρανών σε φυτά *Medicago truncatula* Jemalong A17 έπειτα από μεταχείριση με SNP (φυτά 65 ημερών)\*<sup>1</sup>.

\*<sup>1</sup> Λόγω των όμοιων αποτελεσμάτων με τα φυτά των 40 ημερών παρατίθενται μόνο τα αποτελέσματα των 65 ημερών.

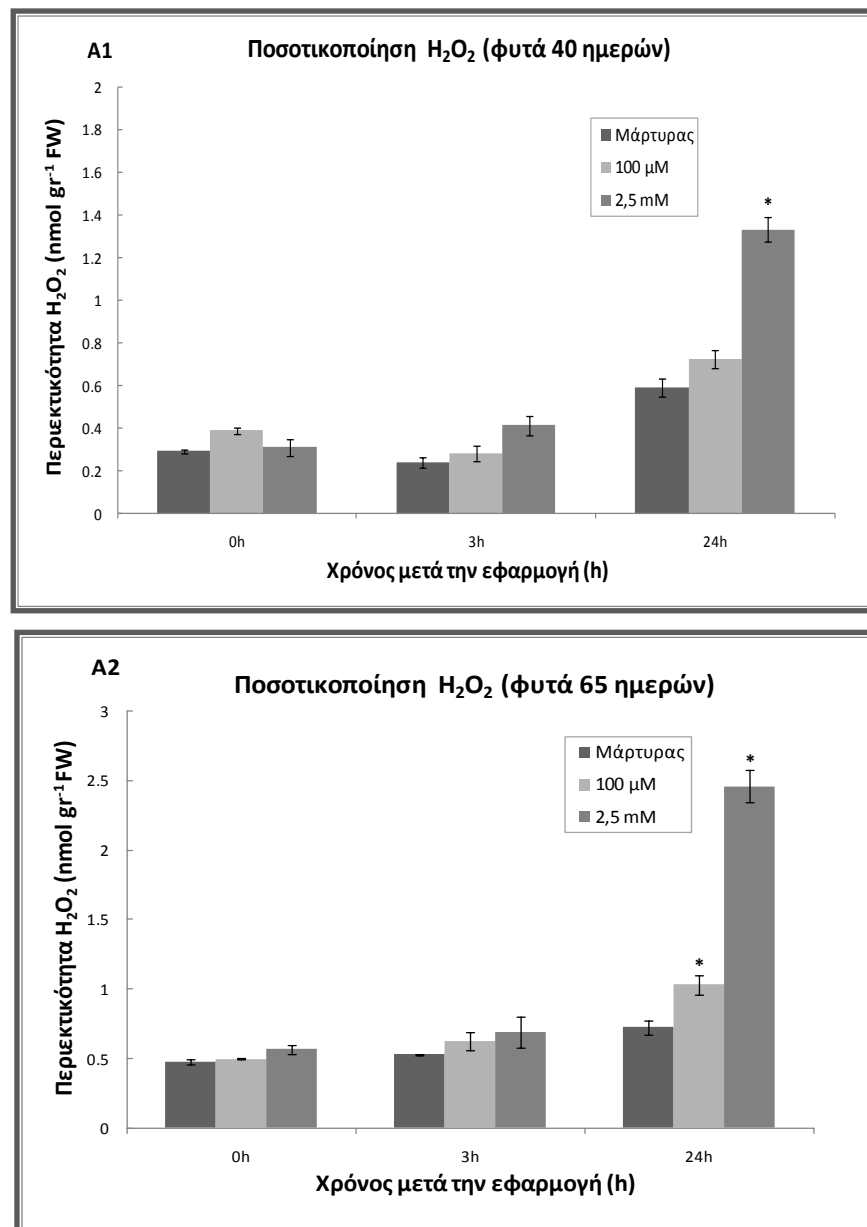
Σε ένα γενικότερο πλαίσιο παρατηρούνται χαμηλότερα επίπεδα στις τιμές του MDA στα φυτά 40 ημερών (ώριμα φυτά) τόσο στις 3 ώρες όσο και στις 24 ώρες σε σχέση με τα φυτά των 65 ημερών (γηρασμένα φυτά) (**σχήμα 3.9 A1**).

Ειδικότερα στα φυτά των 40 ημερών παρατηρείται μια μικρή αύξηση στις 3 ώρες στα 2,5 mM συγκέντρωση, ενώ στις 24 ώρες παρατηρείται μια μικρή αύξηση στα 100 μM και περαιτέρω αύξηση στα 2,5 mM. Στα φυτά των 65 ημερών παρατηρείται άνοδος στα επίπεδα MDA στα 100 μM και μεγαλύτερη αύξηση στα 2,5 mM. Συγκεκριμένα, στα 100 μM στις 24 ώρες σημειώνεται αύξηση 2,5 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τις 3 ώρες μετά την εφαρμογή, ενώ στα 2,5 mM στις 24 ώρες παρατηρείται μεγαλύτερη και σημαντικότερη αύξηση (διπλάσια) σε σχέση με τις 3 ώρες (**σχήμα 3.9 A2**).

Τα παραπάνω ποσοτικά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν ποιοτικά μέσω ιστοχημικής ανάλυσης. Σύμφωνα με τις εικόνες του **σχήματος 3.10**, στις 3 ώρες στα 2,5 mM παρατηρείται η εμφάνιση ροζ χρώματος στη χρωμογόνο αντίδραση που πραγματοποιείται ανάμεσα στο MDA-Schiff's, κάτι που δε φαίνεται στις 0 ώρες. Στις 24 ώρες έχουμε την εμφάνιση ροζ χρώματος στα 100 μM κάτι που γίνεται εντονότερο και εμφανέστερο στα 2,5 mM (**σχήμα 3.10**).

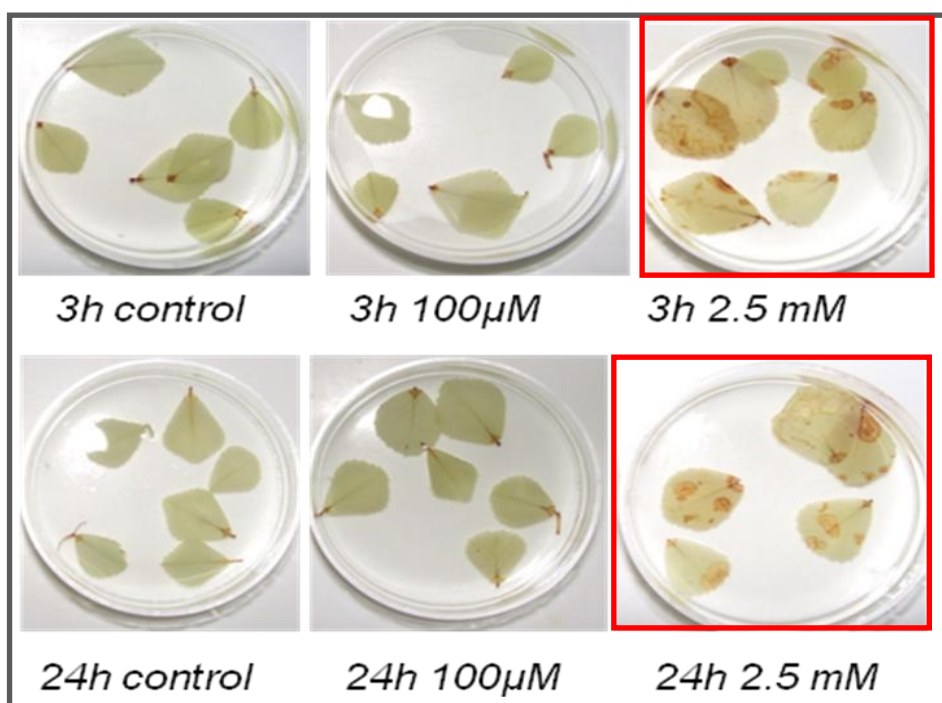
### 3.2.2.5.2 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Το περιεχόμενο του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε κάθε κυτταρικό εκχύλισμα προσδιορίστηκε με φασματοφωτομετρική ανάλυση (ενότητα 2.5.3). Παράλληλα η ιστοχημική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου DAB-HCl (ενότητα 2.4.1).



**Σχήμα 3.11.** Ποσοτικός προσδιορισμός των ενδοκυττάρων επιπέδων του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε φυτά *Medicago truncatula* Jemalong A17 έπειτα από μεταχείριση με διαφορετικές συγκεντρώσεις SNP. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> έγινε φασματοφωτόμετρικά στα φυτά των 40 ημερών (A1) και στα φυτά των 65 ημερών (A2).

Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα, n=3). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.



**Σχήμα 3.12.** Ιστοχημική ανίχνευση του  $H_2O_2$  σε φυτά *Medicago truncatula* Jemalong A17 έπειτα από μεταχείριση με διαφορετικές συγκεντρώσεις SNP. του  $H_2O_2$  (φυτά 65 ημερών)\*<sup>1</sup>.

\*<sup>1</sup> Λόγω των όμοιων αποτελεσμάτων με τα φυτά των 40 ημερών παρατίθενται μόνο τα αποτελέσματα των 65 ημερών.

Γενικότερα, παρατηρούνται χαμηλότερα επίπεδα στις τιμές του  $H_2O_2$  στα φυτά 40 ημερών (ώριμα φυτά) τόσο στις 3 ώρες όσο και στις 24 ώρες σε σχέση με τα φυτά των 65 ημερών (γηρασμένα φυτά) (σχήμα 3.11).

Στις 3 ώρες στα ώριμα και στα γηρασμένα φυτά παρατηρείται μια μικρή αύξηση στα 2,5 mM. Στις 24 ώρες στα φυτά των 40 ημερών παρατηρείται μια μικρή, στατιστικώς μη σημαντική αύξηση στα 100  $\mu$ M ενώ στα 2,5 mM έχουμε μια πιο αισθητή αύξηση. Στα φυτά των 65 ημερών οι διαφορές είναι πιο έντονες με μια μικρή, στατιστικώς σημαντική αύξηση στα 100  $\mu$ M ενώ στα 2,5 mM παρατηρείται ακόμη μεγαλύτερη αύξηση (τριπλάσια συγκριτικά με τις 3 ώρες) (σχήμα 3.11).

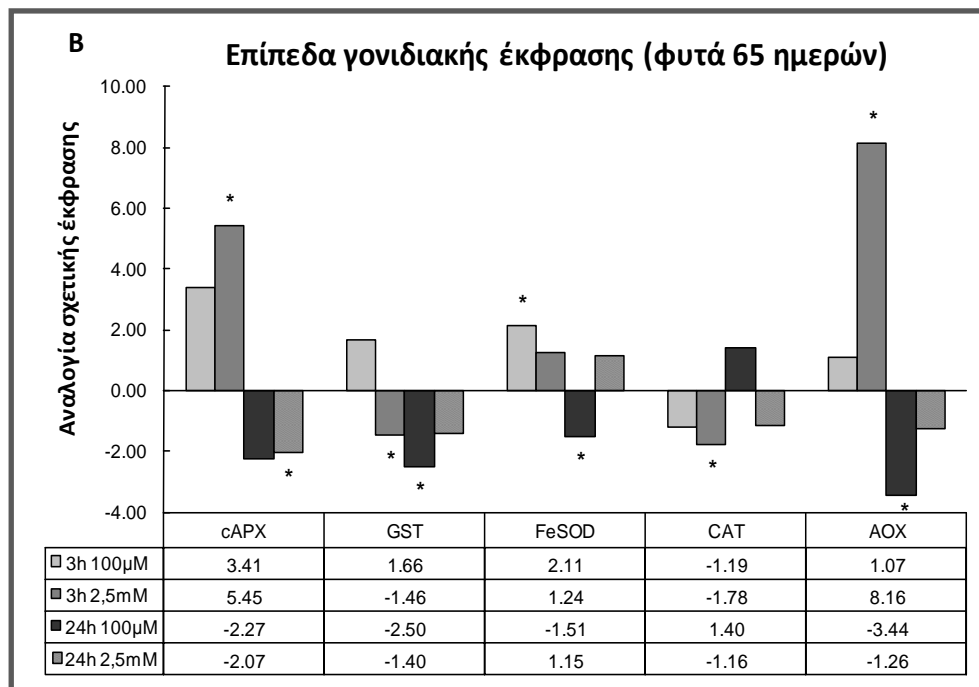
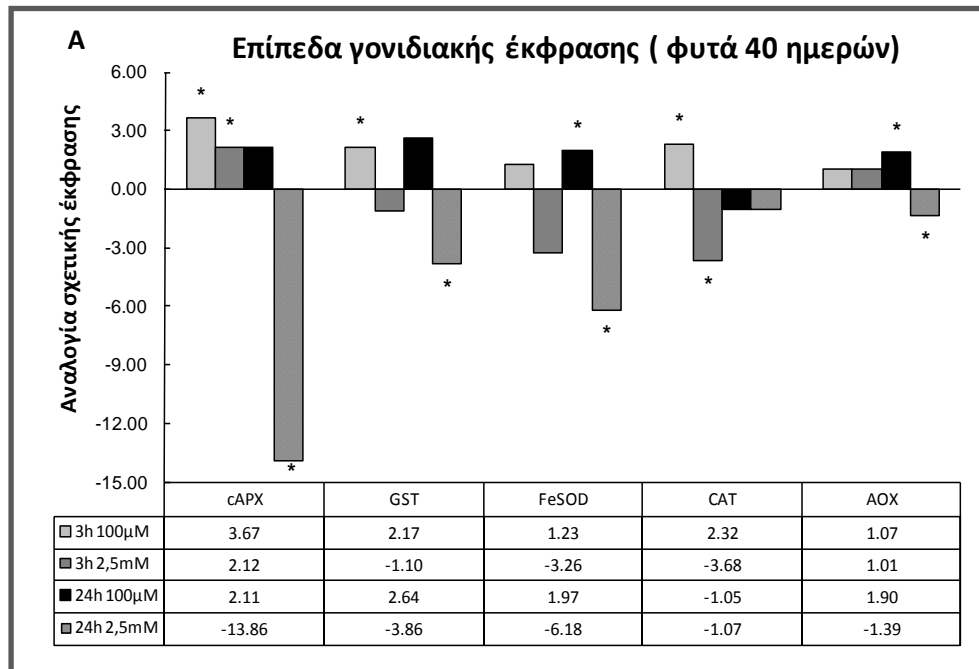
Η ποιοτική ανίχνευση του  $H_2O_2$  με ιστοχημική ανάλυση, επιβεβαίωσε ότι μεγαλύτερη περιεκτικότητα  $H_2O_2$  ήταν εμφανής με τη μορφή καφέ κηλίδων (λόγω του ιζήματος που οφείλεται στο προϊόν της αντίδρασης DAB-  $H_2O_2$ ) στην συγκέντρωση των 2,5 mM τόσο στις 3 ώρες καθώς και στις 24 ώρες, με μεγαλύτερη όμως ένταση στις 24 ώρες (σχήμα 3.12).

### 3.2.2.6 Έλεγχος των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων

Τα επίπεδα έκφρασης αρκετών αντιοξειδωτικών γονιδίων που αποτελούν δείκτες ελέγχου της καταπόνησης (*GST*, *cAPX*, *CAT*, *FeSOD*, *AOX*) και εμπλέκονται στο σύστημα άμυνας του φυτού εξετάστηκαν με τη ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Για κάθε γονίδιο αντιοξειδωτικού ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές. Σαν γονίδιο αναφοράς επιλέγηκε η β-ακτίνη II (ενότητα 2.7).

Όπως φαίνεται στο παρακάτω **σχήμα 3.13**, τα αποτελέσματα από την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης για τα διάφορα αντιοξειδωτικά γονίδια έδειξαν διαφορετική ρύθμιση στα φυτά 40 ημερών (ώριμα) σε σχέση με αυτά των 65 ημερών (γηρασμένα) κάτω από τη δεδομένη κατεργασία με SNP.

Πιο συγκεκριμένα, στα φυτά 40 ημερών, η χαμηλή συγκέντρωση NO (100 μM) οδήγησε σε επαγωγή των αντιοξειδωτικών γονιδίων, ενώ υψηλή συγκέντρωση NO (2,5 mM) οδήγησε σε καταστολή της έκφρασης των αντιοξειδωτικών γονιδίων (**σχήμα 3.13 A**). Αντίθετα, στα φυτά των 65 ημερών είχαμε μια ρύθμιση με αισθητή ποικιλομορφία και μάλιστα διακρίνεται μια ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από το χρόνο (3 h και 24 h αντίστοιχα). Στα φυτά αυτά διακρίνεται καθαρά μια γενική καταστολή της γονιδιακής έκφρασης στις 24 ώρες, κάτι που δεν παρατηρείται αντίστοιχα στα φυτά των 40 ημερών (**σχήμα 3.13 B**).



**Σχήμα 3.13.** Επίπεδα σχετικής έκφρασης γονιδίων αντιοξειδωτικών ενζύμων (*GST*, *cAPX*, *CAT*, *FeSOD*, *AOX*) με ανάλυση qRT-PCR σε φυτά *M. truncatula* 40 ημερών (ώριμα) και 65 ημερών (γηρασμένα) τα οποία μεταχειρίστηκαν με SNP (100µM και 2,5 mM).

Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα,  $n=3$ ). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.

### **3.3 Επίδραση του εξωγενούς μονοξειδίου του αζώτου στη βιοσύνθεση των μεταβολιτών πολυαμινών και προλίνης**

#### **3.3.1 Εισαγωγή**

##### **3.3.1.1 Πολυαμίνες**

###### *Χαρακτηριστικά πολυαμινών και βιοσυνθετικό μονοπάτι*

Οι πολυαμίνες ή αλειφατικές αμίνες είναι οργανικές ενώσεις που έχουν δυο ή περισσότερες αμινοομάδες στο μόριό τους. Οι πιο συχνά απαντώμενες στα βιολογικά συστήματα είναι η πουτρεσκίνη (put), η σπερμιδίνη (spd) και η σπερμίνη (spm). Οι πολυαμίνες και ιδιαίτερα η πουτρεσκίνη και η σπερμίνη είναι απαραίτητες για την επιβίωση διαφόρων οργανισμών γιατί εμπλέκονται σε πολλές διαδικασίες θεμελιώδους σημασίας. Στα φυτά επηρεάζουν πολλές φυσιολογικές διαδικασίες όπως η οργανογένεση, η εμβρυογένεση, η γήρανση των φύλλων και η απόκριση σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις (Malmberg *et al.*, 1998; Bouchereau *et al.*, 1999; Alcázar *et al.*, 2006b; Kusano *et al.*, 2008). Συγκεκριμένα, σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της πουτρεσκίνης (Galston 1991). Παρόλα αυτά η σημασία της αύξησης των πολυαμινών ως απόκριση των αβιοτικών καταπονήσεων δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί (Alcázar *et al.*, 2006; Kusano *et al.*, 2008).

Η βιοσύνθεση των πολυαμινών πραγματοποιείται κυρίως με τη δράση δύο ενζύμων, την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) και την αποκαρβοξυλάση της αργινίνης (ADC). Η αργινίνη αποτελεί το υπόστρωμα της ADC και η ορνιθίνη το υπόστρωμα της ODC. Τα δυο αυτά ένζυμα καταλύουν τη δημιουργία της διαμίνης πουτρεσκίνης, η ODC δρώντας άμεσα στο υπόστρωμα σε μια αντίδραση και η ADC με τη μεσολάβηση δυο ενζύμων σε δύο ξεχωριστές αντιδράσεις. Στη συνέχεια, έχοντας ως δότη μεθυλομάδων το SAM (S-αδενοσυλ-μεθειονίνη) με τη δράση της συνθάσης της σπερμιδίνης και ακολούθως τη συνθάση της σπερμίνης παράγονται η τριαμίνη σπερμιδίνη και η τετραμίνη σπερμίνη αντίστοιχα (εικόνα 2.4) (Slocum *et al.*, 1984).

Για την παραγωγή της πουτρεσκίνης, ανάλογα με τον οργανισμό ευνοείται είτε άμεσα το μεταβολικό μονοπάτι αποκαρβοξυλίωσης της ορνιθίνης (μέσω της ODC) (θηλαστικά και μύκητες) ή έμμεσα το μονοπάτι αποκαρβοξυλίωσης της αργινίνης (μέσω της ADC). Στα φυτά πιο έντονη είναι συνήθως η παρουσία και δράση του ενζύμου ADC η οποία βρίσκεται και δρα στη μεμβράνη των θυλακοειδών των χλωροπλαστών (Borrell *et al.*, 1995; Alcázar *et al.*, 2010b). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το γεγονός πως στην *Arabidopsis thaliana* δε βρέθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί την ODC ούτε το αντίστοιχο ένζυμο (Alcázar *et al.*, 2005).

### ***Αλληλεπίδραση NO και πολυαμινών***

Αρκετά είδη καταπονήσεων οδηγούν στην αύξηση της βιοσύνθεσης των πολυαμινών (Bouchereau *et al.*, 1999). Οι Tun *et al.* (2006) παρατήρησαν ότι οι πολυαμίνες επάγουν τη βιοσύνθεση NO σε σπορόφυτα *A. thaliana* σε ένα μονοπάτι με πρόδρομο μόριο την L-αργινίνη και συμπέραναν ότι το NO συμπεριφέρεται ως συνδετικό μόριο μεταξύ των επαγόμενων από καταπόνηση πολυαμινών και άλλων επαγόμενων μορίων που έχουν σαν ενδιάμεσο μόριο το NO.

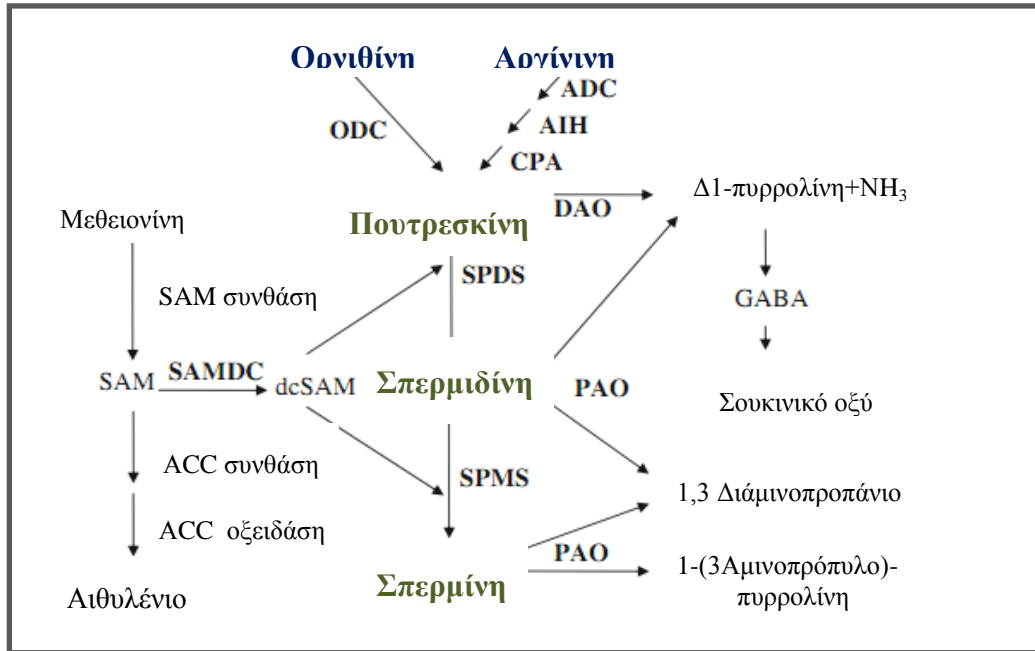
Το μονοξείδιο του αζώτου, οι πολυαμίνες (PAs), καθώς και οι οξειδάσες διαμινών (DAO) και πολυαμινών (PAO) παίζουν σημαντικούς ρόλους σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένων της γήρανσης και των αποκρίσεων άμυνας εναντίον αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων. Αυτή η λειτουργική αλληλεπικάλυψη προτείνει την αλληλεπίδραση του NO και των PAs στη μετάδοση σήματος. Η εξωγενής εφαρμογή πουτρεσκίνης, σπερμιδίνης και σπερμίνης σε σπορόφυτα *A. thaliana* οδήγησε σε επαγωγή της παραγωγής NO (Tun *et al.*, 2006). Συγκρίνοντας τις λειτουργίες του NO και πολυαμινών στην ανάπτυξη του φυτού και στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, κοινές και στα δύο μόρια σήματος, μπορεί να θεωρηθεί πως το NO μπορεί να είναι ένας σύνδεσμος ανάμεσα στις πολυαμινο-εξαρτώμενες αποκρίσεις καταπόνησης. Η παραγωγή του NO από τις πολυαμίνες μπορεί να οφείλεται είτε στο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, το ενδιάμεσο προϊόν της οξειδωσης των πολυαμινών, είτε από άγνωστους μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκονται οι πολυαμίνες (Wimalasekera, 2011).

Επιπρόσθετα του μεγάλου ρόλου που παίζει το αιθυλένιο στη γήρανση των φυτών, το NO και οι πολυαμίνες αποτελούν και αυτά μόρια που εμπλέκονται στα μονοπάτια μετάδοσης σήματος της γήρανσης. Πειραματικές αποδείξεις σε αρκετά φυτά αποδεικνύουν



πως το NO ίσως έχει αντιγηραντικές ιδιότητες (Leshem *et al.*, 1998, Neill *et al.*, 2003). Η πιο κοινή υπόθεση που εξετάζεται είναι η αλληλεπίδραση ανάμεσα στη ρύθμιση πολυαμινών και αιθυλενίου. Η βιοσύνθεση των πολυαμινών και του αιθυλενίου ρυθμίζεται εκμεταλλευόμενη τη διαδικασία γήρανσης (Pandey *et al.*, 2000). Βρέθηκε πως η βιοσύνθεση του NO στην *A. thaliana* είναι επαγόμενη από την κυτοκίνη και τις πολυαμίνες (Tun *et al.*, 2006, 2008). Με βάση τα παρακάτω, προτείνεται πως η αντιγηραντική επίδραση των πολυαμινών μπορεί να συνδέεται μερικώς με το NO.

Πρόσφατες εργασίες ισχυρίζονται την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο NO και τα πολυαμινο-εξαρτώμενα μονοπάτια μετάδοσης σήματος και άλλα μονοπάτια στις αποκρίσεις αβιοτικής καταπόνησης. Η αλλαγή στη βιοσύνθεση των πολυαμινών εμφανίζεται ως απόκριση σε ένα μεγάλο εύρος αβιοτικών καταπονήσεων (Alcázar *et al.*, 2006, Groppa and Benavides, 2008, Alcázar *et al.*, 2010a). Μεταγραφική ανάλυση διαγονιδιακών φυτών ρυζιού, καπνού και ντομάτας που υπερεκφράζουν ένζυμα βιοσύνθεσης των πολυαμινών αποκάλυψαν αλλαγές στην έκφραση αρκετών γονιδίων σχετιζόμενων με καταπόνηση προτείνοντας ότι οι πολυαμίνες μπορεί να παίζουν ρόλο ως μόρια σήματος στις αποκρίσεις καταπόνησης (Alcazar *et al.*, 2010). Κάποιες λειτουργίες του NO μπορεί να εφαρμοσθούν μέσω των S-νιτροζοθειολών (SNOs). Η S-νιτροσογλουταθειόνη (GSNO), λειτουργεί ως κινούμενη δεξαμενή της ρύθμισης βιοδραστικότητας του NO (Durner and Klessig, 1999). Το μόριο GSNO και η αναγωγή της GSNO (GSNOR) παίζουν σημαντικό ρόλο στις συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (Barroso *et al.*, 2006, Belenghi *et al.*, 2007, Lindermayr, and Durner, 2009).



**Εικόνα 3.3.** Σχηματική απεικόνιση της βιοσύνθεσης πολυαμινών

ACC: συνθάση του 1-αμινο-κυκλοπροπάνιο-1-καρβοξυλικού οξέος, ADC: αποκαρβοξυλάση της αργινίνης, AHP: μινουδρολάση της αγματίνης, CPA: αμιδοδρολάση της N-καρβαμοϋλπουτρεσκίνη, DAO: οξειδάση της διαμίνης, dcSAM: αποκαρβοξυλάση της S-αδενοσυλ-μεθειονίνης, GABA: γ-αμινοβουτυρικό οξύ, ODC: αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, PAO: οξειδάση της πολυαμίνης, SAM: S-αδενοσυλμεθειονίνη, SAMDC: αποκαρβοξυλάση της S-αδενοσυλμεθειονίνης, SPDS: συνθάση της σπερμιδίνης, SPMS: συνθάση της σπερμίνης (Alcazar *et al.*, 2010).

### 3.3.1.2 Προλίνη

#### *Χαρακτηριστικά της προλίνης και βιοσυνθετικό μονοπάτι*

Η προλίνη είναι ένα αμινοξύ απαραίτητο για τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και κατ'επέκταση στον πρωτογενή μεταβολισμό. Ο ρόλος της προλίνης εντός του κυττάρου είναι καθοριστικός γιατί δρα ως προστατευτικό μόριο σε φαινόμενα ώσμωσης, διατηρεί το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου, και συμβάλει ως μόριο σήματος στην άνθηση, στην ανάπτυξη του εμβρύου και των ριζών. Ως εσωτερικό ωσμωλυτικό μόριο προστατεύει τις υποκυτταρικές δομές και τα μακρομόρια κάτω από υψηλή ωσμωτική πίεση. Επίσης, η προλίνη αποτελεί συστατικό των πρωτεϊνών που συμπεριφέρονται ως μοριακοί συνοδοί προστατεύοντας άλλες πρωτεΐνες από πιθανή αποικοδόμηση και ενισχύοντας την δραστηριότητα διαφόρων ενζύμων. Παραδείγματα της δράσης αυτής είναι η προστασία του ενζύμου της νιτρικής αναγωγάσης (NR) κατά τη διάρκεια ωσμωτικής καταπόνησης (Sharma and Dubey, 2005).

Στα φυτά η βιοσύνθεση της προλίνης πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα όπου το γλουταμινικό ιόν μετατρέπεται σε γλουταμινική γ-ημιαλδεύδη με τη δράση του ενζύμου  $\Delta^1$ -πυρρολινο-5-καρβοξύλο συνθετάση (p5CS) και ακολούθως παράγεται η πυρρολινο-5-καρβοξύλιο (P5C) (Hu *et al.*, 1992; Savoure *et al.*, 1995). Με τη δράση της P5C αναγωγάσης (p5CR) η P5C μετατρέπεται στην προλίνη (Szoke *et al.*, 1992). Σε συνθήκες καταπόνησης στην *A. thaliana* η συσσώρευση της P5CS1 στους χλωροπλάστες οδηγεί στη βιοσύνθεση της προλίνης στα πλαστίδια. Ακολούθως η προλίνη αποικοδομείται στα μιτοχόνδρια με την οξειδωση της προς P5C και γλουταμινικό ιόν (Laszlo and Arnould, 2009).

Η βιοσύνθεση της προλίνης ελέγχεται από την ενεργοποίηση δυο γονιδίων που κωδικοποιούν την P5CS. Το ένα γονίδιο είναι δομικό και το άλλο είναι συγκεκριμένη ισομορφή που επάγεται σε συνθήκες καταπόνησης. Τα δυο αυτά γονίδια αν και παρουσιάζουν υψηλή ομολογία, η μεταγραφική τους ρύθμιση είναι διαφορετική. Η μεταγραφική ρύθμιση της P5CS ρυθμίζεται από την προλίνη μέσω του μηχανισμού ανάδρασης (feedback inhibition), αφού σε υψηλές συγκεντρώσεις προλίνης στο κύτταρο αναστέλλεται η δράση της (Zhang *et al.*, 1995).

### ***Προλίνη και αβιοτικές καταπονήσεις***

Πολλές εργασίες έδειξαν ότι η περιεκτικότητα της προλίνης στα φυτικά κύτταρα αυξάνεται κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Αύξηση των επιπέδων της προλίνης παρατηρείται κάτω από συνθήκες ξηρασίας (Choudhary *et al.*, 2005; Filippou *et al.*, 2011), υψηλής αλατότητας (Yoshida *et al.*, 1995) , υψηλού φωτισμού και UV ακτινοβολίας (Saradhi *et al.*, 1995) και άλλων αβιοτικών καταπονήσεων (Fabro *et al.*, 2004).

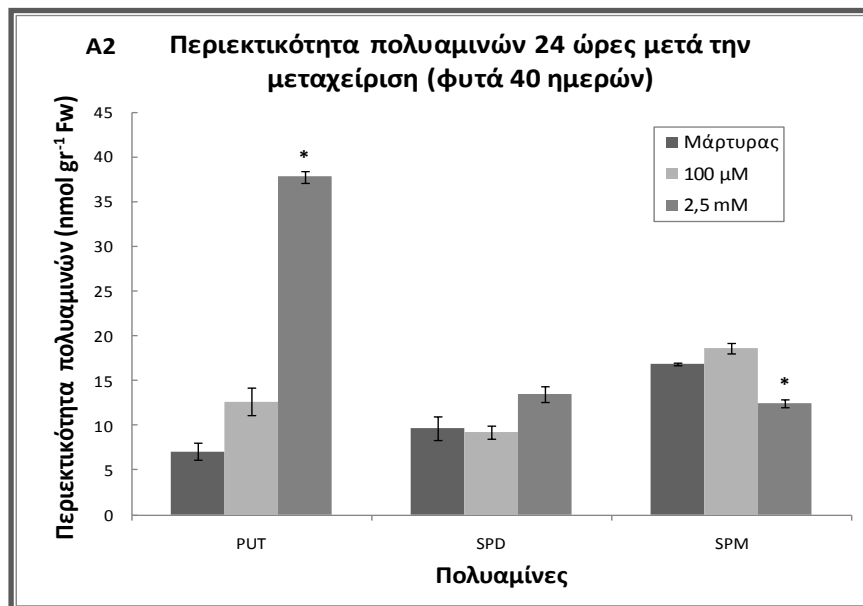
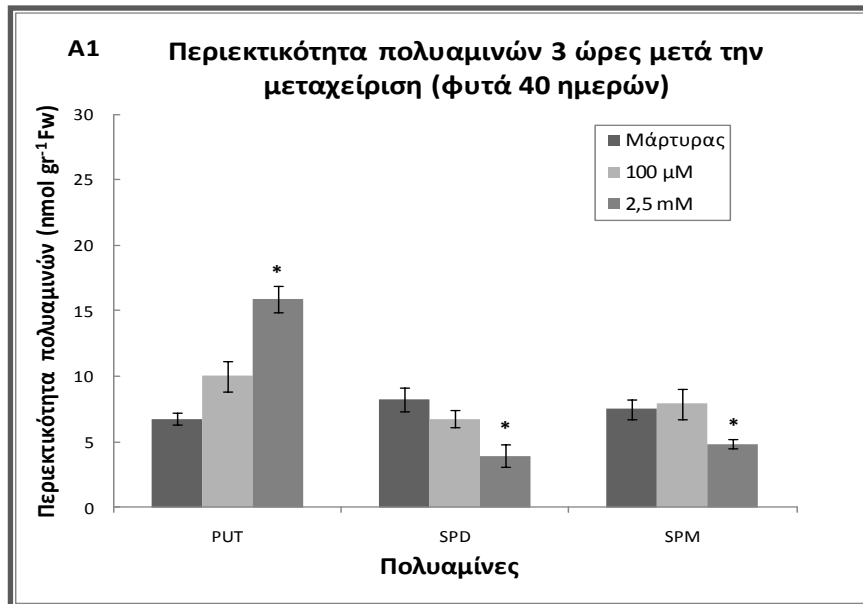
Σε συνθήκες καταπόνησης η προλίνη δρα ως αντιοξειδωτικό δεσμεύοντας και μειώνοντας τη δράση των ROS και του μονήρους οξυγόνου ( $^1\text{O}_2$ ). Επιπλέον ελέγχει τα επίπεδα των ROS στα μιτοχόνδρια και επηρεάζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD). Σε συνθήκες αβιοτικής και βιοτικής καταπόνησης η προλίνη δρα ως μεταβολικό σήμα ρυθμίζοντας τους διάφορους μεταβολίτες ώστε να επικρατεί ισορροπία του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του κύτταρο (οξειδοαναγωγική ισορροπία). Παράλληλα ελέγχει την έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων και επηρεάζει την ανάπτυξη και αύξηση του φυτού (Laszlo and Arnould, 2009).

### **3.3.2 Αποτελέσματα**

#### **3.3.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των πολυαμινών**

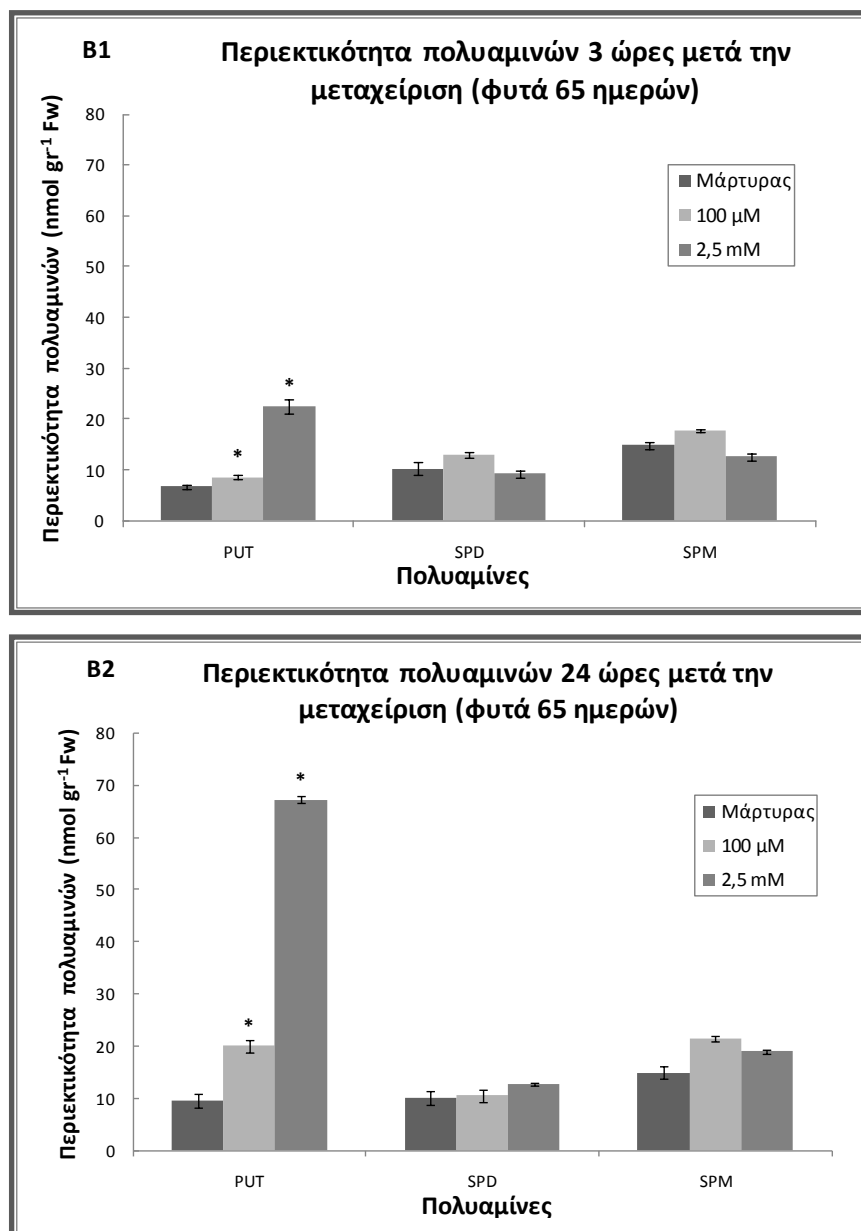
Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι αλλαγές στα ενδοκυττάρια επίπεδα δυο σημαντικών μεταβολιτών (προλίνης και πολυαμινών) στα φυτά που είχαν υποστεί κατεργασία με SNP όπως προαναφέρθηκε. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των τριών κύριων πολυαμινών (put, spd και spm) σε κυτταρικά εκχυλίσματα των φυτών (ενότητα 2.5.6). Ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των τριών πολυαμινών έγινε μέσω αντίδρασης βενζυλίωσης των πολυαμινών και τα βενζυλιωμένα παράγωγα διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο της HPLC (ενότητα 2.5.7).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδωσε την περιεκτικότητα και των τριών ελεύθερων πολυαμινών στα διάφορα φυτικά κυτταρικά εκχυλίσματα, όπως φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (**σχήμα 3.14 και σχήμα 3.15**).



**Σχήμα 3.14.** Επίπεδα ελεύθερων πολυαμινών σε φυτά *M. truncatula*, σε φυτά 40 ημερών μετά από μεταχείριση με SNP. Προσδιορισμός των ελεύθερων πολυαμινών (put, spd, spm) σε εκχυλίσματα φυτών 40 ημερών, 3 ώρες (A1) και 24 ώρες (A2) μετά την εφαρμογή SNP (100μM και 2.5mM).

Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα,  $n=3$ ). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.



**Σχήμα 3.15.** Επίπεδα ελεύθερων πολυαμινών σε φυτά *M. truncatula* 65 ημερών, μετά από μεταχείριση με SNP. Προσδιορισμός των ελεύθερων πολυαμινών (put, spd, spm) σε εκχυλίσματα φυτών 65 ημερών, 3 ώρες (B1) και 24 ώρες (B2) μετά την εφαρμογή SNP (100μM και 2.5mM).

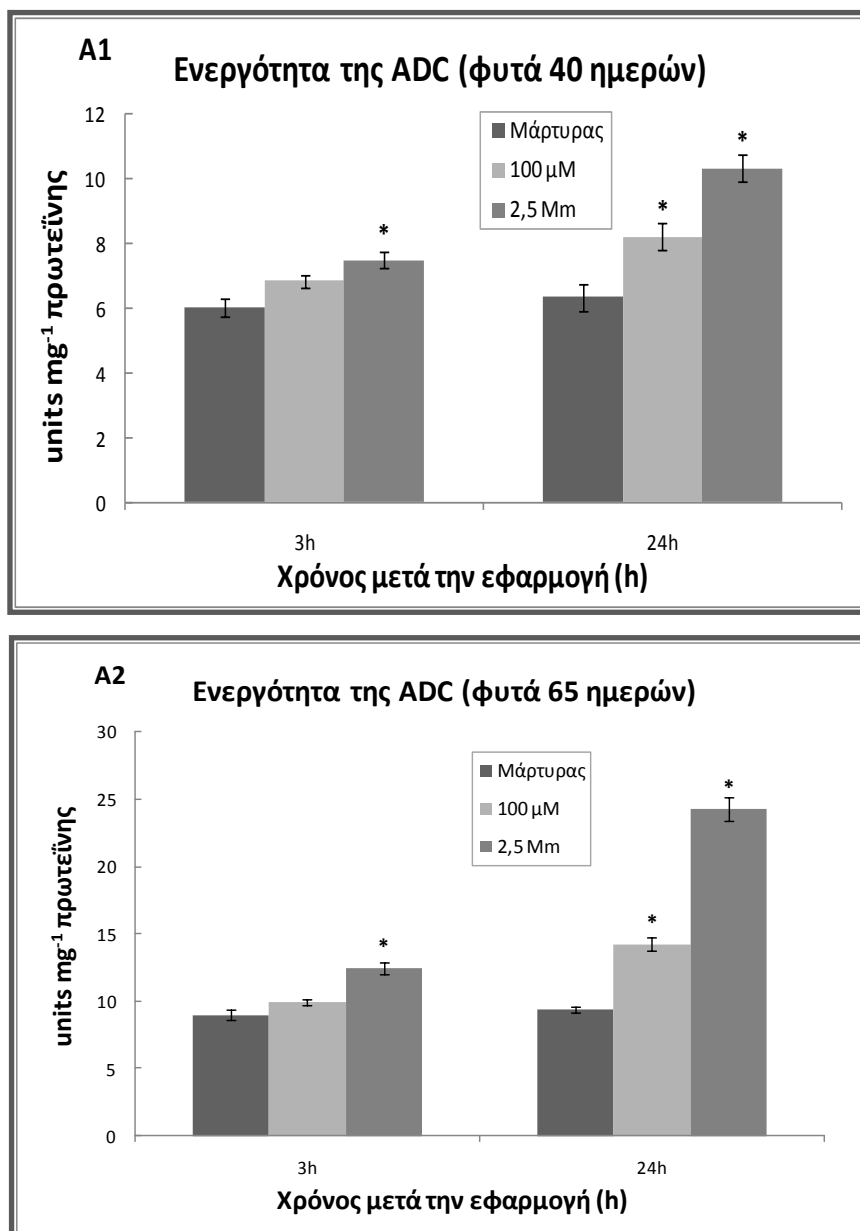
Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα,  $n=3$ ). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.

Από τα αποτελέσματα που παρατίθενται παρατηρείται αύξηση της πολυαμίνης πουτρεσκίνης στα φυτά 40 ημερών στο χρονικό διάστημα των 3 ωρών παρουσία SNP 2.5 mM η οποία αυξάνει περαιτέρω στις 24 ώρες (σχήμα 3.14). Αυτή η ενδοκυττάρια αύξηση της πουτρεσκίνης παρουσιάζεται κατά τον ίδιο τρόπο σε μεγαλύτερο όμως βαθμό στα γήρασμα φυτά (65 ημερών) (σχήμα 3.15). Επομένως σημειώνεται συσσώρευση

πουτρεσκίνης στα 2,5 mM εφαρμογής SNP στα γηρασμένα φυτά των 65 ημερών έπειτα από το μακροπρόθεσμο αποτέλεσμα των 24 ωρών. Οι άλλες δυο πολυαμινές για τις οποίες η πουτρεσκίνη αποτελεί πρόδρομο μόριο διαφοροποιούνται ως εξής: η σπερμιδίνη μειώνεται ελαφρώς ενώ τα επίπεδα σπερμίνης παραμένουν σταθερά και στα δύο αναπτυξιακά φυτά.

### **3.3.2.2 Έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (ADC) και αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (ODC)**

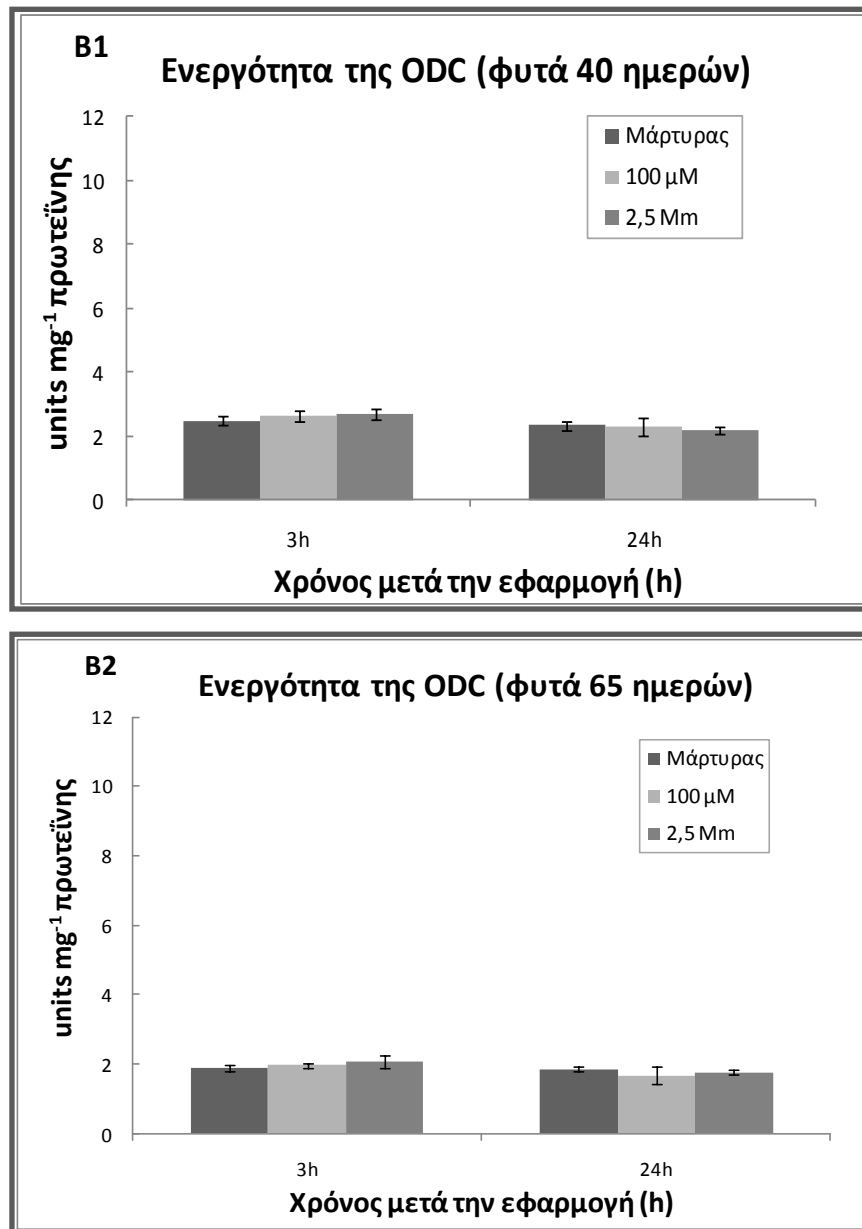
Η ενδοκυττάρια αύξηση της πουτρεσκίνης στα SNP-φυτά έδωσε το έναυσμα για τον περαιτέρω έλεγχο της ενζυμικής δραστηριότητας των σημαντικότερων ενζύμων (ADC και ODC) που πιθανότατα να εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της πουτρεσκίνης. Οι ενζυμικές δραστηριότητες μετρήθηκαν με τη χρήση ραδιενεργών υποστρωμάτων αργινίνης και ορνιθίνης αντίστοιχα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω εκφρασμένα σε μονάδες ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας και για τα δύο ένζυμα (ενότητα 2.6.2).



**Σχήμα 3.16.** Επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης ADC σε φυτά *M. truncatula* μετά από μεταχείριση με SNP. Προσδιορισμός της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης ADC στα εκχυλίσματα των φυτών δυο αναπτυξιακών σταδίων, 40 ημερών (A1) και 65 ημερών (A2) 3 ώρες και 24 ώρες μετά την εφαρμογή SNP (100μM και 2.5mM).

Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα, n=3). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.





**Σχήμα 3.17.** Επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης της ODC σε φυτά *M. truncatula* μετά από μεταχείριση με SNP. Προσδιορισμός της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης της ODC στα εκχυλίσματα των φυτών δυο αναπτυξιακών σταδίων, 40 ημερών (B1) και 65 ημερών (B2) 3 ώρες και 24 ώρες μετά την εφαρμογή SNP (100μM και 2.5mM).

Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα, n=3). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.

Από τις μονάδες της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας της ADC φαίνεται πως η δράση του ενζύμου αυτού αυξάνει παράλληλα με την αύξηση της ενδοκυττάριας πουτρεσκίνης (σχήμα 3.16), δηλαδή έχουμε μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα στα φυτά 65 ημερών σε συγκέντρωση SNP 2,5 mM στις 24 ώρες (σχήμα 3.16 A2). Από την άλλη μεριά, η ODC

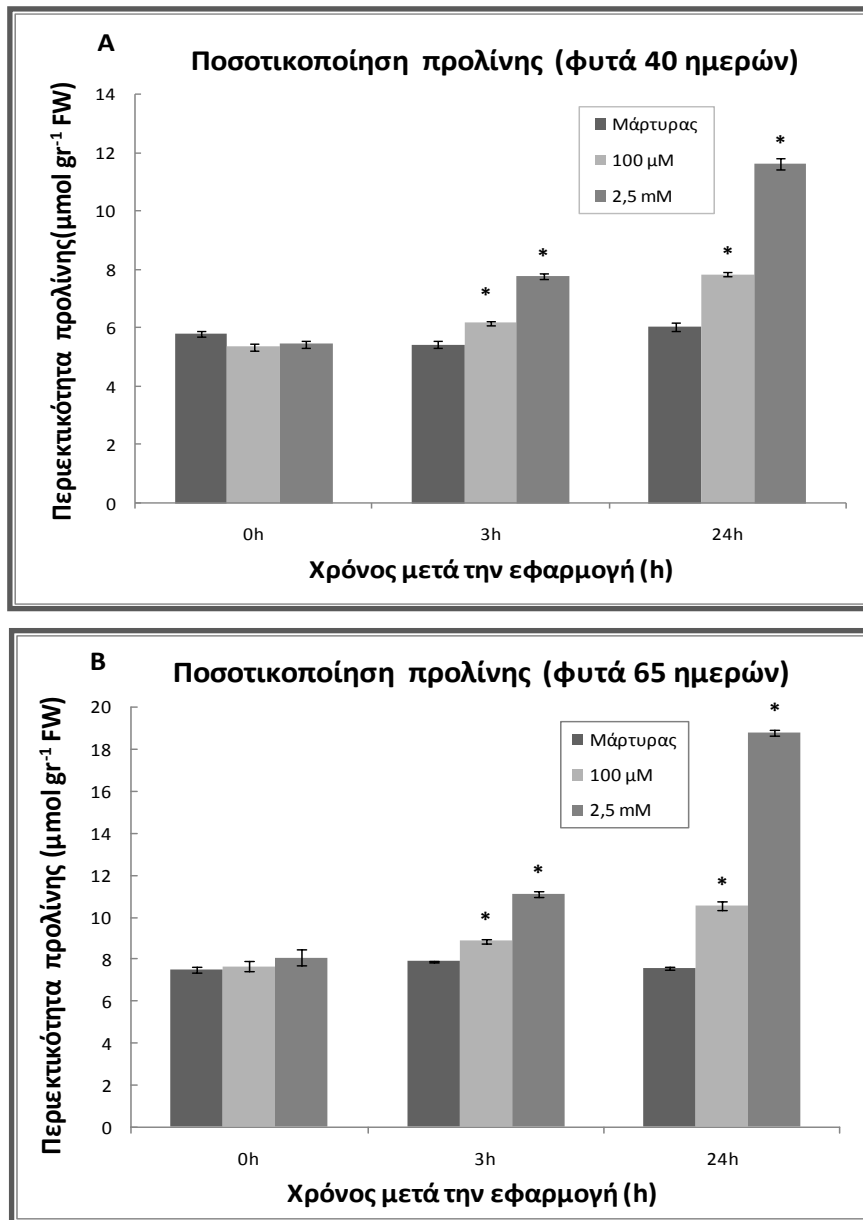
παρουσίασε χαμηλές τιμές ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας και τα επίπεδα αυτά παρέμειναν χαμηλά σε όλες τις μεταχειρίσεις των φυτών με SNP (**σχήμα 3.17**).

### **3.3.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός προλίνης**

Ακολούθησε ο έλεγχος του δεύτερου μεταβολίτη, της προλίνης, για την ίδια σειρά φυτών μεταχειρισμένων με SNP. Αρχικά έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των ενδοκυττάρων επιπέδων της προλίνης και ακολούθως έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας του βασικού ενζύμου (P5CS) που εμπλέκεται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής της.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της προλίνης σε παρόμοια με τα παραπάνω φυτικά κυτταρικά εκχυλίσματα έγινε φασματοφωτομετρικά μέσω της χρωμογόνου αντίδρασης που περιγράφεται αναλυτικά (ενότητα 2.5.5). Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης της προλίνης φαίνονται παρακάτω (**σχήμα 3.18**).

Όπως φαίνεται στο πιο κάτω διάγραμμα (**σχήμα 3.18**) στα φυτά 40 ημερών παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της προλίνης στις 3 ώρες στα 2,5 mM SNP η οποία γίνεται εντονότερη στις 24 ώρες. Στη μικρότερη συγκέντρωση των 100 μM παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση στις 3 ώρες με πιο αισθητή αύξηση στις 24 ώρες (**σχήμα 3.18 A**). Στα γηρασμένα φυτά 65 ημερών παρατηρείται το ίδιο μοτίβο αύξησης της προλίνης στα δυο χρονικά διαστήματα με τη μόνη διαφορά ότι τα επίπεδα προλίνης είναι πιο υψηλά. Επιπλέον, στις 24 ώρες στη συγκέντρωση των 2,5 mM SNP τα επίπεδα της προλίνης είναι σχεδόν διπλάσια των επιπέδων των 3 ωρών, κάτι που μαρτυρά τη συσχέτιση της επίδρασης του NO στα επίπεδα προλίνης με το χρόνο (**σχήμα 3.18 B**).

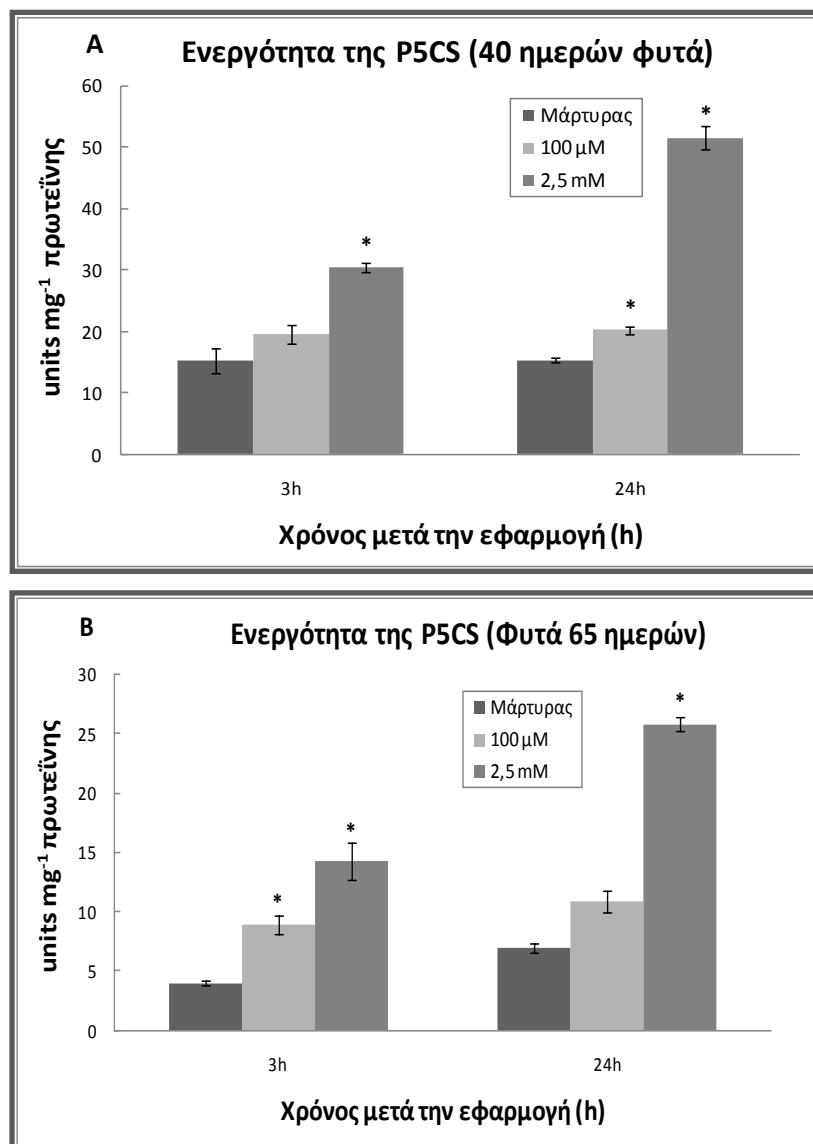


**Σχήμα 3.18.** Επίπεδα προλίνης σε φυτά *M. truncatula* μετά από μεταχείριση με SNP. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε προλίνη των εκχυλισμάτων των φυτών δυο αναπτυξιακών σταδίων, 40 ημερών (A) και 65 ημερών (B) σε τρία χρονικά διαστήματα (0 h, 3 h και 24 h) μετά την εφαρμογή SNP (100μM και 2.5mM). Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα, n=3). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.

### 3.3.2.4 Έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας της $\Delta^1$ -πυρρολινο-5-καρβοξυλο συνθετάσης (P5CS)

Η ενζυμική ενεργότητα του σημαντικότερου ενζύμου που εμπλέκεται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της προλίνης (P5CS) μετρήθηκε με σκοπό να συσχετισθεί με τα αυξημένα επίπεδα της ενδοκυττάριας προλίνης. Η ενζυμική δραστηριότητα της P5CS μετρήθηκε μέσω της *in vitro* ενζυμικής αντίδρασης που καταλύει το συγκεκριμένο ένζυμο, μέσω φασματοφωτομετρικής ανάλυσης (ενότητα 2.6.3).

Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (**σχήμα 3.19**), στα ώριμα φυτά των 40 ημερών στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 2,5 mM παρατηρείται αύξηση στις 3 ώρες που γίνεται εντονότερη στις 24 ώρες. Στη μικρότερη συγκέντρωση των 100  $\mu$ M παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση μόνο στις 24 ώρες (**σχήμα 3.19 A**). Στα φυτά των 65 ημερών παρατηρείται παρόμοια εικόνα με αυτή των 40 ημερών με τη μόνη διαφορά ότι τα επίπεδα της ενζυμικής δραστηριότητας είναι χαμηλότερα (σχεδόν τα μισά) σε σχέση με αυτά των 40 ημερών (**σχήμα 3.19 B**).



**Σχήμα 3.19.** Επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας της P5CS σε φυτά *M. truncatula* έπειτα από μεταχείριση με SNP. Προσδιορισμός της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας της P5CS σε φυτικά εκχυλίσματα δυο αναπτυξιακών σταδίων, 40 ημερών (A) και 65 ημερών (B) 3 και 24 ώρες μετά την εφαρμογή SNP (100μM και 2.5mM).

Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα, n=3). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.

## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το NO παίζει σημαντικό ρόλο στις διάφορες βιολογικές ενδοκυτταρικές διαδικασίες αφού δρα είτε ως μόριο-σηματοδότης (Lamotte *et al.*, 2005) είτε ως τοξικό μόριο στις διάφορες διεργασίες του φυτού (Beligni and Lamattina, 2000; Neill *et al.*, 2003). Ο ρόλος του μικρού αλλά σημαντικού αυτού βιολογικού μορίου στην άμυνα του φυτού σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Song *et al.*, 2006; Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007) δεν έχει ακόμη αποσαφηνισθεί πλήρως.

Λαμβάνοντας υπόψη την έρευνα που έγινε μέχρι τώρα και θέλοντας να διευκρινιστεί η επίδραση του εξωγενούς NO στις αποκρίσεις του φυτού *M. truncatula* σε συνάρτηση με τα σήματα RNS/ROS και την ανάπτυξη του φυτού, πραγματοποιήθηκε εξωγενής εφαρμογή του αντιδραστηρίου SNP στα φυτά.

Η επιλογή του αντιδραστηρίου SNP ως δότης NO έγινε ανάμεσα σε διάφορα άλλα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται (Murgia *et al.*, 2004; Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2006), λόγω της μεγάλης αποδοτικότητάς του (Kumar *et al.*, 2010). Κατά καιρούς εφαρμόστηκαν διάφορες μέθοδοι εφαρμογής εξωγενούς NO στα φυτά (Mur, 2005; Kumari, 2010; Sung, 2010; Kumar *et al.*, 2010). Ως καλύτερη μέθοδος εφαρμογής SNP επιλέχθηκε η υπό κενό μέθοδος στα φύλλα των φυτών 40 ημερών *M. truncatula*, αφού με τη μέθοδο αυτή εντοπίστηκε η μεγαλύτερη επακόλουθη περιεκτικότητα σε NO.

Ανάμεσα στις διάφορες μεθόδους, τη χαμηλότερη συγκέντρωση NO στα φύλλα και επομένως τη μικρότερη απόδοση μεθόδου εφαρμογής SNP έδειξαν οι μέθοδοι της υδροπονίας και του ριζοποτίσματος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει αυτό το αποτέλεσμα αφού και στις δύο αυτές μεθόδους η εφαρμογή παρατηρείται στις ρίζες και το αποτέλεσμα της συσσώρευσης NO μετριέται στα φύλλα.

Μελετώντας έμμεσα με αυτό τον τρόπο το φαινόμενο της διασυστηματικότητας στο φυτό *M. truncatula*, παρατηρείται πως η εφαρμογή στις ρίζες δε δίνει το αντίστοιχο αποτέλεσμα στα φύλλα δηλώνοντας την ανεπαρκή ικανότητα μεταφοράς του NO μέσω των ιστών. Η μεταφορά NO μέσω των φυτικών ιστών (Neil *et al.*, 2003; Misra *et al.*, 2010) αποτελεί σημαντικό αντικείμενο συζήτησης και ερευνών. Μελέτες έδειξαν πως ενώ η εφαρμογή του SNP σε φυτά με ανεπάρκεια σε Fe έγινε στις ρίζες, η ανάκτηση

παρατηρήθηκε στα φύλλα. (Kumar et al., 2010) Αυτή η διαφορά στον εντοπισμό που προτείνει τη μετάδοση σήματος μέσω του NO από τη ρίζα στο βλαστό με διάχυση στα φύλλα διαφοροποιείται από το παρόν σύστημα.

Σύμφωνα με τους Tian *et al.*, 2006, χαμηλή συγκέντρωση (0.2 mM) SNP ανέστειλε την απώλεια νερού στις ρίζες ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις (2 mM) SNP είχαν το αντίθετο αποτέλεσμα (Tian *et al.*, 2006). Επομένως, το αν το NO έχει προστατευτικό ή τοξικό ρόλο στα φυτά φαίνεται να εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωσή του (Beligni and Lamattina, 1999). Η επιλογή της χαμηλότερης συγκέντρωσης SNP (100  $\mu$ M) και της υψηλότερης (2,5 mM) έγινε έτσι ώστε να μελετηθεί η επίδραση του μορίου σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση. Τα επίπεδα του NO διατηρήθηκαν σε παρόμοιες τιμές για τα φυτά και των δύο αναπτυξιακών σταδίων (ώριμα και γηρασμένα), υποδηλώνοντας ότι τα επίπεδα NO οφείλονται κυρίως στην εξωγενή εφαρμογή SNP.

Η μακροσκοπική παρατήρηση των φυτών πέντε μέρες μετά την εφαρμογή έδειξε πως τα χαμηλά επίπεδα NO μέσα στο κύτταρο που παράγονται από το SNP δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα την ανάπτυξη του φυτού, ενώ οι αυξημένες συγκεντρώσεις NO προκάλεσαν αντίθετα αποτελέσματα (χλωρωτικά φύλλα και ξήρανση) στα φυτά των 65 ημερών (γηρασμένα φυτά). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν από τους Shung *et al.* (2010) όπου χαμηλά επίπεδα του NO βρέθηκε να απαιτούνται για την κανονική ανάπτυξη ριζών στο κινέζικο λάχανο ενώ η συσσώρευση NO είχε αντίθετα αποτελέσματα στην αύξηση του ριζικού συστήματος.

Το έναυσμα για τη μελέτη της διαφοροποίησης στα δύο αναπτυξιακά στάδια (ώριμα και γηρασμένα φυτά) έδωσαν μελέτες που έδειξαν πως το NO μπορεί να έχει αντι-γηραντικές ιδιότητες. Ενας σημαντικός ρόλος για το NO στην καθυστέρηση της γήρανσης στα φυτά πιθανόν να επάγεται από την εφαρμογή των NO δοτών (Leshem, 2001). Αρκετές μελέτες τονίζουν τους περιορισμούς στο μηχανισμό της φωτοσύνθεσης και της αγωγιμότητας στομάτων στις αβιοτικές καταπονήσεις (Chaves *et al.*, 2003;Filippou *et al.*, 2011). Το NO βρέθηκε να επηρεάζει άμεσα φυσιολογικές παραμέτρους, αναστέλλοντας τη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του φωτοσυστήματος PSII (Wodala *et al.*, 2008). Πιο συγκεκριμένα, οι Yang *et al.* (2004) μέτρησαν το φθορισμό χλωροφύλλης στα φύλλα πατάτας (αποδοτικότητα φωτοσυστήματος PSII) μεταχειρισμένα με SNP και βρήκαν πως το SNP μειώνει την αναλογία Fv/Fm με ένα τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση, ενώ αντίθετα οι Takahashi and Yamasaki (2002) δεν έδειξαν τροποποίηση

της μέγιστης κβαντικής ικανότητας (Fv/Fm). Οι Tu *et al.* (2003) έδειξαν πως 0.5 mM SNP ενίσχυσε τη διαδικασία της αποικοδόμησης της χλωροφύλλης σε αντίθεση με 0.1 mM SNP που καθυστέρησε τη γήρανση των φύλλων κριθαριού με αναστολή της αποικοδόμησης της χλωροφύλλης (Tian and Lei, 2006). Παρομοίως, η Fv/Fm μέγιστη κβαντική ικανότητα, μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους φθορισμού χλωροφύλλης που δρα ως δείκτης της κυτταρικής ζημιάς, βρέθηκε να μειώνεται αισθητά στη μεγαλύτερη συγκέντρωση SNP στα ώριμα φυτά ενώ στα γηρασμένα η μείωση για την ίδια συγκέντρωση ήταν εντονότερη. Αντίθετα, στη μικρότερη συγκέντρωση SNP δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μεταβολή στη φωτοσυνθετική ικανότητα του φυτού.

Η αγωγιμότητα στομάτων, μια δεύτερη φυσιολογική παράμετρος που μελετήθηκε, έδειξε παρόμοιο μοτίβο με το φθορισμό χλωροφύλλης. Η αγωγιμότητα στομάτων στα φυτά *Phillyrea angustifolia* έπειτα από ξηρασία μειώθηκε στο 90% ενώ οι Patakas *et al.* και Filippou *et al.* (2011 αμφότεροι) έδειξαν παρόμοια ευρύματα στα υπό μελέτη φυτά έπειτα από ξηρασία, κάτι που συμφωνεί με τα παρόντα αποτελέσματα για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση SNP.

Αναφορές στη βιβλιογραφία δείχνουν αλλαγές στα επίπεδα της ολικής χλωροφύλλης στα φυτά *Hydrilla verticillata* L. με βάση τη διαφορετική συγκέντρωση SNP. Πιο συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση 25 - 100  $\mu$ M SNP αυξήθηκαν τα επίπεδα της ολικής χλωροφύλλης ενώ σε συγκέντρωση 200 - 400  $\mu$ M SNP τα επίπεδα παρέμειναν σταθερά ή παρουσίασαν μια μικρή μείωση (Wang *et al.*, 2010). Οι Qian *et al.* (2009) έδειξαν επιπρόσθετα πως η προσθήκη χαμηλής συγκέντρωσης SNP οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων χλωροφύλλης στο *Chlorella vulgaris* ενώ σχετικά υψηλή συγκέντρωση SNP μειώνει τα επίπεδα χλωροφύλλης (Wang *et al.*, 2010). Τα αποτελέσματα από τον ποσοτικό προσδιορισμό της χλωροφύλλης έδειξαν (σε συμφωνία με τα παραπάνω) μια μικρή αύξηση στα επίπεδα της χλωροφύλλης στη συγκέντρωση των 100  $\mu$ M ενώ σε υψηλότερες SNP συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μια αντίστοιχη πτώση στα επίπεδα χλωροφύλλης, κάτι που συμπίπτει και με τα προηγούμενα αποτελέσματα φθορισμού χλωροφύλλης.

Παλαιότερες μελέτες δεν είχαν καθορίσει εάν το NO έχει καμιά επίδραση σε άλλα αντιοξειδωτικά μόρια του φυτού. Επ'αυτού και παράλληλα με τον ποσοτικό προσδιορισμό της χλωροφύλλης, μελετήθηκε η πιθανή επίδραση του NO στα καροτενοειδή. Τα καροτενοειδή είναι αντιοξειδωτικά μόρια και κάτω από το φως μετατρέπουν το διοξείδιο του αζώτου σε NO (Cooney *et al.*, 1994). Η αντιοξειδωτική τους δράση έγκειται στο ότι



κάτω από συνθήκες καταπόνησης δεσμεύουν τα ROS που παράγονται όπως και άλλα αντιοξειδωτικά μόρια (Noctor and Foyer, 1998). Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα των καροτενοειδών είναι σημαντικά για την απόδοση ανθεκτικότητας σε φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες καταπόνησης. Στην χαμηλότερη συγκέντρωση των 100  $\mu\text{M}$  SNP παρατηρείται μια μικρή αύξηση των καροτενοειδών ενώ στις μεγαλύτερες SNP συγκεντρώσεις η μείωση των καροτενοειδών πιθανόν να αποτελεί δείκτη της κυτταρικής ζημιάς που πλέον το φυτό υφίσταται.

Είναι γνωστό πως κάτω από συνθήκες καταπόνησης μπορεί να προκληθεί υπεροξείδωση των λιπιδίων (Shung *et al.*, 2010), ως δείκτης οξειδωτικής καταπόνησης και της ολικής κυτταρικής ζημιάς. Συσσώρευση MDA παρατηρήθηκε στα φυτά που εκτέθηκαν σε SNP υψηλής συγκέντρωσης ενώ στη χαμηλή συγκέντρωση δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη μεταβολή, κάτι που έμμεσα δηλώνει, σε συνδυασμό και με τα προηγούμενα αποτελέσματα, την προστατευτική και τοξική επίδρασή τους αντίστοιχα.

Η προστασία από την κυτταρική ζημιά στη χαμηλότερη συγκέντρωση SNP αποδεικνύεται από τη χαμηλή περιεκτικότητα της υπεροξείδωσης των λιπιδίων των μεμβρανών που παρατηρήθηκε στα φυτά, όπως φαίνεται από τους Tian *et al.* (2006) με μείωση ή ελάχιστη αύξηση του MDA σε φυτά κριθαριού κατεργασμένα με 0,2 mM SNP. Επομένως, το NO σε δεδομένη συγκέντρωση μπορεί να αντιδράσει με τις ρίζες ( $\text{NO}^*$ ) και ( $\text{NOO}^*$ ) σταματώντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Lamotte *et al.* 2004).

Το MDA σχηματίζεται κυρίως μέσω της επαγόμενης από τις ROS αποικοδόμησης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Pryor *et al.*, 1975). Έτσι εμφανίζεται ένας σύνδεσμος της αύξησης των ROS στα φυτά υπο συνθήκες καταπόνησης και της αντίστοιχης κυτταρικής ζημιάς που παρατηρείται (Filippou *et al.*, 2011).

Η προστατευτική δράση του NO μπορεί να σχετίζεται με την ικανότητά του να αντιδρά με κάποια ROS με αποτέλεσμα την αποτοξικοποίηση του κυττάρου (Conner and Grisham 1996). Έτσι, τα φυτά που κατεργάστηκαν με 100  $\mu\text{M}$  SNP είχαν τη μικρότερη περιεκτικότητα σε  $\text{H}_2\text{O}_2$  στα φύλλα τους υποδηλώνοντας την προστατευτική του δράση μέσω αντίδρασης με τις ενεργές μορφές οξυγόνου (Shung *et al.*, 2010) και δέσμευσης αυτών παρεμποδίζοντας την επιβλαβή συνέπεια στις μεμβράνες (MDA). Το NO προκαλεί κάποιες φορές τέτοια μεταβολή στο  $\text{H}_2\text{O}_2$  που τροποποιεί την κυτταρική ισορροπία ανάμεσα στο  $\text{O}^{2-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  αναστέλλοντας τον κυτταρικό θάνατο (Shung *et al.*, 2010).

Πρόσφατα ευρήματα (Tanou *et al.*, 2009, 2010; Filippou *et al.*, 2011) αποδεικνύουν τη συστηματική δραστηριότητα των RNS και ROS σημάτων στα εσπεριδοειδή και στη μηδική αντίστοιχα. Η επαγωγή NO στα φύλλα προάγει την επαγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και το NO βρέθηκε να εμπλέκεται στο μονοπάτι μετάδοσης σήματος της σύνθεσης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, μαρτυρώντας την επαγωγή των δύο μόριων-σημάτων (Wendehenne *et al.*, 2004).

Εκτός από το ότι το NO εμφανίζεται ως αντιοξειδωτικός παράγοντας δεσμεύοντας H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για προστασία των φυτικών κυττάρων από τις τοξικές επιδράσεις, το NO μπορεί επίσης να αντιδράσει με το (O<sup>2-</sup>), οδηγώντας στο σχηματισμό (ONOO<sup>-</sup>), που θεωρείται κυτταροτοξικό (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007). Έμμεσα, αρνητική επίδραση έδειξαν τα προϊόντα μεταβολισμού του NO προκαλώντας καταπόνηση και μειώνοντας την ανάπτυξη ριζών (Bohm *et al.*, 2010), ενώ υψηλές συγκεντρώσεις SNP (2 mM) ανέστειλαν την ανάπτυξη κριθαριού (Tu *et al.*, 2003). Ομοίως, η αυξημένη συγκέντρωση SNP (2,5 mM), οδήγησε σε έντονη αύξηση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, κάτι που υποδηλώνει τις καταστροφικές επιδράσεις που έχει η υψηλή συγκέντρωση NO στο κύτταρο, ενώ τα ευρήματα αυτά επαληθεύτηκαν και μακροσκοπικά, με φαινοτυπική ζημιά καθώς και με περαιτέρω αύξηση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μέσα στο κύτταρο.

Όπως είναι κοινώς αποδεκτό, το NO δρα ως μόριο σηματοδότης και θεωρείται πως η χαμηλή συγκέντρωση NO μπορεί να οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων (Frank *et al.*, 2000). Πρόσφατα, έχει γίνει προσπάθεια συλλογής μοριακής πληροφορίας που ανταποκρίνεται στην απόκριση των φυτών σε περιβαλλοντικούς παράγοντες καταπόνησης. Τα φυτά ανταποκρίνονται στο περιβαλλοντικό ερέθισμα της καταπόνησης με την επαγωγή ομάδας ρυθμιστικών και λειτουργικών γονιδίων (Bartels *et al.*, 2005) με κυτταρικές αποκρίσεις που προκύπτουν εν μέρει από την κυτταρική ζημιά (Ingram and Bartels, 1996). Τόσο το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Foyer and Noctor, 2005; Miller *et al.*, 2010) όσο και το NO (Ramamurthi and Lewis, 1997; Wendehenne *et al.*, 2004) ρυθμίζουν τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων σε μια προσπάθεια επαγωγής του αντιοξειδωτικού μηχανισμού άμυνας του φυτού. Επιπρόσθετα, οι Shi *et al.* (2007) έδειξαν πως η εξωγενής εφαρμογή NO προστατεύει τα φυτά από την οξειδωτική ζημιά ενεργοποιώντας αντιοξειδωτικά ένζυμα και κυρίως την SOD.

Στην παρούσα εργασία σχεδόν όλα τα γονίδια που εξετάστηκαν εμφανίζονται να ρυθμίζονται από το SNP και η ρύθμισή τους είναι ανάλογη της συγκέντρωσης που

εφαρμόζεται καθώς επίσης και του αναπτυξιακού σταδίου στο οποίο βρίσκεται το φυτό. Στα φυτά 40 ημερών, η χαμηλή συγκέντρωση NO (100  $\mu$ M) οδήγησε σε επαγωγή των αντιοξειδωτικών γονιδίων, ενώ η υψηλή συγκέντρωση NO (2,5 mM) οδήγησε σε καταστολή της έκφρασης των αντιοξειδωτικών γονιδίων. Αντίθετα, στα φυτά των 65 ημερών είχαμε μια ρύθμιση με αισθητή ποικιλομορφία και μάλιστα διακρίνεται μια εξάρτηση της γονιδιακής έκφρασης από τον χρόνο (3 h και 24 h αντίστοιχα).

Το NO εκτός των άλλων φαίνεται να εμπλέκεται στη βιοσύνθεση σημαντικών μεταβολιτών του κυττάρου όπως οι πολυαμίνες και η προλίνη, ιδιαίτερα σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης. Στα φυτά υπάρχουν δύο εναλλακτικά μονοπάτια που οδηγούν στη δημιουργία πουτρεσκίνης: η αποκαρβοξυλίωση αργινίνης ή ορνιθίνης. Είναι γνωστό πως πολλοί τύποι αβιοτικών καταπονήσεων προκάλεσαν σημαντική συσσώρευση πουτρεσκίνης στα φυτά ενώ τα επίπεδα των άλλων πολυαμινών παρέμειναν σταθερά (Gońcka *et al.*, 2007). Για παράδειγμα, η μεταχείριση με βαρέα μέταλλα (Cu και Hg) οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της πουτρεσκίνης και μείωση των επιπέδων σπερμιδίνης και σπερμίνης (Ding *et al.*, 2010) ενώ παράλληλα αυξήθηκαν οι δραστηριότητες της ADC και ODC σε φυτά *A. Philoxeroides* έπειτα από μεταχείριση με Cu (Xu *et al.*, 2010). Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την αύξηση των επιπέδων της ενδοκυττάριας πουτρεσκίνης στα SNP-κατεργασμένα ώριμα και γηρασμένα φυτά αλλά όχι των άλλων δύο πολυαμινών. Αντίθετα, οι Maiale *et al.* (2004) έδειξαν πως σε περιόδους αλατότητας η πουτρεσκίνη και σπερμιδίνη μειώνονται ενώ η σπερμίνη συσσωρεύεται (Maiale *et al.*, 2004).

Συσσώρευση Put παρατηρήθηκε και στα SNP φυτά των 2,5 mM, ένα αποτέλεσμα πιο έντονο στα γηρασμένα φυτά. Γενικότερα, μια μαζική συσσώρευση Put θεωρείται τοξική για τα φυτά και οδηγεί στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε υψηλά επίπεδα (Takaο *et al.*, 2006). Για αυτό το λόγο σε φυτά μεταχειρισμένα με 2,5 mM SNP είναι εμφανές τόσο το οξειδωτικό στρες (υψηλή περιεκτικότητα MDA και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) τόσο και η νέκρωση ιστών που παρατηρείται μετά από μακροσκοπική παρατήρηση έπειτα από 5 μέρες. Αντίθετα, στη χαμηλότερη συγκέντρωση SNP (100  $\mu$ M) όπου η αύξηση είναι μικρότερη, οι παραπάνω συνέπειες δεν είναι τόσο εμφανείς.

Η υψηλή περιεκτικότητα σε Put συνδυάστηκε με μια αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της ADC αλλά όχι της ODC. Τα επίπεδα Spd και Spm μειώθηκαν ή παρέμειναν ίδια παρόλη την αύξηση της Put πιθανόν εξαιτίας της ταυτόχρονης αναστολής

των αντίστοιχων μονοπατιών βιοσύνθεσής τους, κάτι που υποδηλώνει τη διατάραξη του μεταβολισμού των πολυαμινών. Άλλος λόγος για τη μείωση της Spd και/ή Spm ίσως να είναι η μεγάλη αύξηση της δραστηριότητας της οξειδάσης πολυαμινών (PAO), το ένζυμο υπεύθυνο για την αποικοδόμηση τους (Xu *et al.*, 2010). Το γεγονός πως τα επίπεδα της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (ODC) είναι πολύ χαμηλά μπορεί να οφείλεται στην πιθανή έλλειψη της δραστηριότητας της ODC σε *M. truncatula*. Αντίστοιχα, φυτά *A. thaliana* παρουσιάζουν παραγωγή Put αποκλειστικά μέσω δραστηριότητας ADC (Hanfrey *et al.*, 2001), γεγονός το οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Είναι γνωστό πως το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού που υφίσταται καταπόνηση επηρεάζει το βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής πολυαμινών. Οι Botella *et al.* (2000) έδειξαν πως ντομάτες κάτω από καταπόνηση αλατότητας σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα πολυαμινών στα φυτά σε προχωρημένο στάδιο γήρανσης. Αντίστοιχες μελέτες από τους Chen and Kao (1991) έδειξαν μια άμεση συσχέτιση της αύξησης στα επίπεδα των πολυαμινών και της δραστηριότητας της ADC στα τελευταία στάδια της γήρανσης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν εν μέρει τα παραπάνω αφού στα γηρασμένα φυτά των 65 ημερών παρουσιάζονται αυξημένες τιμές τόσο στα επίπεδα της Put όσο και στα επίπεδα της ενζυμικής δραστηριότητας της ADC σε σχέση με τα ώριμα φυτά των 40 ημερών.

Το εξωγενές NO ως προστατευτικό μόριο, μπορεί να δρα μειώνοντας την οξειδωτική ζημιά όπως υποστηρίζουν οι Tan *et al.* (2008) που υπέβαλαν σπορόφυτα κριθαριού σε ωσμωτικό στρες. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, διαπίστωσαν επίσης συσσώρευση της ενδοκυττάριας προλίνης, κάτι που συμφωνεί και με άλλες γενικότερες μελέτες που δείχνουν τη συσσώρευσή της σε φυτά που υποβάλλονται σε συνθήκες καταπόνησης (Verbruggen *et al.*, 2008; Filippou *et al.*, 2011). Η προλίνη είναι ένας ωσμωλύτης που συσσωρεύεται σε μεγάλες ποσότητες κάτω από το ωσμωτικό στρες και συμμετέχει στην ωσμωρύθμιση και την ωσμωπροστασία. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν πως η αύξηση στα επίπεδα της προλίνης υπό συνθήκες αλατότητας σχετίζονται με την αντοχή στην καταπόνηση (Tripathi *et al.* 2007) ενώ άλλοι υποδηλώνουν πως η συσσώρευση προλίνης λειτουργεί ως δείκτης καταπόνησης (Lutts *et al.* 1999). Στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση της προλίνης αυξήθηκε βαθμιαία από τη χαμηλότερη συγκέντρωση των 100  $\mu\text{M}$  φθάνοντας σε μέγιστα επίπεδα στην υψηλότερη συγκέντρωση SNP των 2,5 mM.

Η συσσώρευση προλίνης λόγω ξηρασίας μπορεί να οφείλεται στην επαγωγή της σύνθεσής της, στην αναστολή της αποικοδόμησης ή την αδυναμία εισαγωγής της σε πρωτεΐνες (Heuer 1994). Ακολούθως, μετά την παρατήρηση της αύξησης των ενδοκυττάρων επιπέδων προλίνης στα SNP φυτά, διερευνήθηκε το μονοπάτι της βιοσύνθεσής της με προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας ενός καθοριστικού για την κινητική της αντίδρασης ενζύμου, της P5CS (Kavi Kishor *et al.*, 2005). Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου P5CS φαίνεται να αυξάνει σε άμεση συνάρτηση με την αύξηση της συγκέντρωσης του SNP με μέγιστο την υψηλότερη συγκέντρωση, κάτι που συμφωνεί με την ενδοκυττάρια αύξηση της προλίνης. Η αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας P5CS στη συγκέντρωση των 2,5 mM τόσο στα φυτά των 40 όσο και των 65 ημερών υποδηλώνει το σημείο του βιοσυνθετικού μονοπατιού της προλίνης στο οποίο έχει επίδραση το NO δρώντας με ένα άγνωστο μηχανισμό, πιθανότατα σε μεταγραφικό ή μετα-μεταφραστικό επίπεδο.

Το αξιοσημείωτο στο παραπάνω αποτέλεσμα είναι η διαφοροποίηση που παρατηρείται στα επίπεδα της ενζυμικής δραστηριότητας της P5CS στα φυτά των δύο διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Τα ώριμα φυτά των 40 ημερών παρουσιάζουν σε γενικές γραμμές αυξημένα επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας σε σχέση με τα γηρασμένα φυτά των 65 ημερών, πιθανόν λόγω του μηχανισμού ανάδρασης (Zhang *et al.*, 1995) που εμφανίζεται πιο έντονη στα γηρασμένα φυτά. Η συσσώρευση της προλίνης είναι αποτέλεσμα εκτός από την αυξημένη σύνθεσή της και μείωσης της αποικοδόμησής της (Delauney and Verma, 1993). Επομένως, για καλύτερη κατανόηση της απόκρισης του μεταβολισμού της προλίνης στη καταπόνηση με SNP, όπως και στην καταπόνηση αλατότητας, ενδεχομένως να είναι σημαντική η μελέτη του μονοπατιού αποικοδόμησης της προλίνης, μέσω της ρύθμισης της δράσης των ενζύμων καταβολισμού της (López-Carrión *et al.*, 2008).

Εν κατακλείδι, στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε ο ρόλος του NO ως μόριο-σηματοδότης και ως κυτταροτοξικό μόριο στο φυτό *M. truncatula* μέσω αυξανόμενης συγκέντρωσης του εξωγενώς εφαρμοσμένου SNP. Το NO, παρά το γεγονός πως σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δρά ως προστατευτικό μόριο σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να αποτελέσει ένα τοξικό μόριο σε μεγάλες συγκεντρώσεις για το φυτό. Εξαιτίας αυτού, παραμένει πρόκληση να γνωρίσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις του NO και τις διαφοροποιήσεις του σε διάφορους ιστούς ανάλογα με την κατάσταση.

## 5 BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahlfors, R., Brosche, M., Kollist, H. and Kangasjarvi, J. (2009). Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. **58**:1–12.
- Alcázar, R., García-Martínez, J. L., Cuevas, J. C., Tiburcio, A. F. and Altabella, T. (2005) Overexpression of ADC2 in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *Plant J*. **43**:425–436
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patrón, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. F. and Altabella, T. (2006). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol Lett*. **28**:1867–1876.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P. and Tiburcio, A. F. (2010a). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance *Planta*. **231**:1237–1249.
- Alcázar, R., Planas, J., Saxena, T., Zarza, X., Bortolotti, C., Cuevas, J. C., Bitrián, M., Tiburcio, A. F. and Altabella, T. (2010b). Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing the homologous Arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiol Biochem*. **48**:547-52.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishikawa, A., Dixon, R. A., and Lamb, C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*. **92**:773-784.
- Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J. (2007). Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci*. **72**: 876–887.
- Barroso, B. J., Corpas, J. F., Carreras, A., Rodríguez-Serrano, M., Esteban, J. F., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Romero-Puertas, C. M., Valderrama, R., Sandalio, M. L. and del Río, L. A. (2006). Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress, *J Exp Bot*. **57**:1785-1793.
- Bartels, D. and Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci*. **24**:23-58.

- Bates, L.S., Waldren, R.P. & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. **39**:205-208.
- Batista, F.D, Iber D, Neuberger, M.S (2001). B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature*. **411**:489–494.
- Bearden, J.C., Jr. (1978). Quantitation of submicrogram quantities of protein by an Improved protein - Dye binding assay. *Biochim. Biophys. Acta*. **533**,525-529.
- Belenghi, B., Romero-Puertas, C. M., Vercammen, D., Brackener, A., Inzé, D., Delledonne, M. and Breusegem, V. F. (2007). Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue, *J. Biol. Chem.* **282**:1352-1358.
- Beligni, M. V. and Lamattina L. (1999). Is nitric oxide toxic or protective? *Trends in Plant Sciences*. **4**: 299.
- Beligni, M. V. and Lamattina, L. (2000). Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation and inhibits hypocotyl elongation, three lightinducible responses in plants. *Planta*. **210**:215-221.
- Besson-Bard, A., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2008). New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. **59**:21-39.
- Bethke, P. C, Badger, M. R, Jones, R. L. (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*. **16**: 332–341.
- Bethke, P. C., Libourel, I.G.L and Jones R. L. (2006). Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. **57**:517–526.
- Böhm, Z. L. M. F., Ferrarese, L. L. d. M., Zanardo, L. I. D., J., Magalhaes, R. J. and Ferrarese-Filho, O. (2010). Nitric oxide affecting root growth, lignifications and related enzymes in soybean seedlings. *Acta physiologiae plantarum*. **32**:1039-1046.
- Borrell, A., Culiañez-Macià, F. A., Altabella, T., Besford, R. T., Flores, D. and Tiburcio, A. F. (1995). Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. *Plant Physiol*. **109**:771–776.
- Botella, M. Á., del Amor, F., Amorós, A., Serrano, M., Martínez, V., Cerdá, A. (2000). Polyamine, ethylene and other physico-chemical parameters in tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits as affected by salinity. *Physiol Plant*. **109**:428–434.

- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. and Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* **140**:103–125.
- Boveris, A. D., Galatro, A. and Puntarulo, S. (2000). Effect of nitric oxide and plant antioxidants on microsomal content of lipid radicals. *Biological Research.* **33**:159 –165.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M. and Inze, D. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences.* **13**:199-218.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Caro, A. and Puntarulo S. (1998). Nitric oxide decreases superoxide anion generation by microsomes from soybean embryonic axes. *Physiologia Plantarum.* **104**:357 – 364.
- Chaki, M., Valderrama, R. and Fernández-Ocaña, A. M. (2011). Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and a rise of S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany.* **62**:1803–1813.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Camp, W. 1996. Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant J.* **10**:491-503.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P. and Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought—From genes to the whole plant. *Funct Plant Biol.* **30**:239-64.
- Chen, C. T. and Kao, C. H. (1991). Senescence of rice leaves level and polyamine XXIX. Ethylene production, polyamine biosynthetic enzyme activity during senescence *Plant Science.* **78**:193-198.
- Choudhary, N.L., Sairam, R. K. and Tyagi, A. (2005). Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). *Ind. J. Biochem. Biophys.* **42**:366–370.
- Conner, E. M. and Grisham, M. B. (1996). Inflammation, free radicals and antioxidants *Nutrition.* **12**:274-277.



- Cooney, R. V., Harwood, P. J., Custer, L. J. and Franke, A. A. (1994). Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives*. **102**:460-462.
- Cooney, R. V., Harwood, P. J., Custer, L. J. and Franke, A. A. (1994). Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ. Health Perspect.* **102**:460–462.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B. and Del Río, L. A. (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science*, **6**:145-150.
- Corpas, F. J., del Río L.A. and Barroso, J. B. (2007). Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends in Plant Science*. **12**:436–438.
- Corpas, F. J., Chaki, M., Fernández-Ocaña, A., Valderrama, R., Palma, J. M., Carreras, A., Begara-Morales, J. C., Airaki, M., del Río L. A. and Barroso, J. B. (2008). Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.* **49**:1711-1722.
- Corpas, F. J., Leterrier, M., Valderrama, R., Airaki, M., Chaki, M., Palma, J. M. and Barroso, J. B. (2011). Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science* (in press; doi:10.1016/j.plantsci.2011.04.005).
- Courtois, C., Besson, A., Dahan, J., Bourque, S., Dobrowolska, G., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2008). Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca<sup>2+</sup> and protein kinases. *Journal of Experimental Botany*. **59**: 155-163.
- Crawford, N.M. (2006). Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*. **57**: 471-478.
- Cui, X., Zhang, Y., Chen, X., Jin, H. and Wu, X. (2009). Effects of exogenous nitric oxide protects tomato plants under copper stress. *Bioinformatics and Biomedical Engineering, ICBBE 2009*. 3<sup>rd</sup> International Conference on 11–13 June 2009, Beijing, pp 1–7.
- Del Rio, L. A., Lyon, D. S., Olah, I., Glick, B. and Salin, M. L. (1983) Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. *Planta*. **158**:216- 224.

- Del Rio, L. A., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Bueno, P. and Corpas, F. J. (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology and Medicine*. **13**:557-580.
- Delauney, A. J. and Verma, D. P. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants *Plant J*. **4**:215-223.
- Delledone, M., Xia, Y., Dixon, R. A. and Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. **394**:585-588.
- Desikan, R., Soheila, A., Mackerness, H., Hancock, T. J. and Neill, J. S. (2001). Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*. **127**:2001.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., and Neill, S. (2002). A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16314–16318.
- Ding, C. X., Shi, G. X., Xu, X. Y., Yang, H. Y. and Xu, Y. (2010). Effect of exogenous spermidine on polyamine metabolism in water hyacinth leaves under mercury stress. *Plant Growth Regul.* **60**:61–67.
- Duque, A. L. R. S. A. (2010). Transformation of *Medicago truncatula* with the arginine decarboxylase gene to modify polyamine metabolism toward water deficit resistance. Phd Dissertation. Oeiras, November.
- Durner, J., Wendehenne, D, Klessig, D. F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**:10328–10333.
- Durner, J. and Klessig, D. F. (1999). Nitric oxide as signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**:369–374.
- Ederli, L., Morettini, R., Borgogni, A., Wasternack, C., Miersch, O., Reale, L., Ferranti, F., Tosti, N. and Pasqualini, S. (2006). Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants, *Plant Physiology*. **142**:595–608.
- Fabro, G., Kovács, I., Pavet, V., Szabados, L. and Alvarez, M. E. (2004) Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **17**:343–350.

- Fan, H., Guo, S., Jiao, Y., Zhang, R. and Li, J. (2007). Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism, and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Front Agri China*. **1**:308–314.
- Filippou, P., Antoniou, C. and Fotopoulos, V. (2011). Effect of drought and rewatering on the antioxidant response of *Medicago truncatula* plants. *Plant Signal Behav.* **6**:270-277.
- Flores, H.E., Galston, A.W. (1982). Polyamines and plant stress: Activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. *Science* **217**:1259-1261.
- Floryszak-Wieczorek, J., Milczarek, G., Arasimowicz, M. and Ciszewski, A. (2006). Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* **224**:1363-1372.
- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. **17**:1866-75.
- Frank, S., Kämpfer, H. and Podda, M. (2000). Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem. J.* **346**:719-728.
- Furchgott, R. F. (1995). Special topic: nitric oxide. *Annual Review of Physiology*. **57**: 659–682.
- García-Mata C. and Lamattina, L. (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol.* **126**:1196–1204.
- Garcia-Rios, M., Fujita, T., LaRosa, P.C., Locy, R.D., Clithero, J.M., Bressan, R.A., & Csonka, L.N. (1997). Cloning of a polycistronic cDNA from tomato encoding  $\gamma$ -glutamyl kinase and gamma-glutamyl phosphate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:8249–8254.
- Godber, B. L. J., Doel, J. J., Sapkota, P. G., Blake, R. D., Stevens, R. C., Eisenthal, R. and Harrison, R. (2000). Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*. **275**:7757–7763.
- Gońrecka, K., Cvikrova, M., Kowalska, U., Eder, J., Szafran´ska, K., Gońrecki, R. and Janas, K. M. (2007). The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in anther culture of carrot. *Plant Physiol Biochem.* **45**:54–61.

- Grant, J.J. and Loake, G.J. (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* **124**:21-29.
- Griess, P. (1879). Bemerkungen zu der Abandlung der H.N. Weselskykend Benedikt. Uebereinige Azoverbindungen. *Ber. Dt.chem. Ges. Bd.* **12**:426-8.
- Groppa, D. M. and Benavides, P. M. (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances, *Amino Acids.* **34**:35-45.
- Grun, S., Lindermayr, C., Sell, S. and Durner, J. (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany.* **57**:507.
- Guo, B., Liang, Y. and Zhu, Y. (2009). Does salicylic acid regulate antioxidant defense system, cell death, cadmium uptake and partitioning to acquire cadmium tolerance in rice? - *J. Plant. Physiol.* **166**:20-31.
- Haba, P., Aguerra, E., Benvtez, L. and Maldonado, J. M. (2001). Modulation of nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) roots. *Plant Sci.* **161**:231-237.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*, (4th ed.) Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 851pp.
- Hamid, S.B.A., Othman, D., Abdullah, N. (2003) Structurally Complex Molybdenum Oxide Model Catalysts For The Selective Oxidation of Propene. *Top. Catal.* **24**, 87–95.
- Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M. J., Burtin, D. and Michael, A. J. (2001). Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity *The Plant Journal.* **27**:551-560.
- Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radical Biology Medicine.* **33**: 774–797.
- Heath, R.L. & Racker, L. (1968). Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts I Kinetics and Stoichiometry of Fatty and Peroxidation. *Archives in Biophysics.* **125**:189-198.
- Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E. and Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Rev Mol Cell Biol.* **6**:150–166.
- Heuer B. (1994). Osmoregulatory role of proline in water and salt-stressed plants. In: Pessaraki M, Ed. *Handbook of Plant and Crop Stress*. NY: Marcel Dekker. pp363-381.

- Hu, C.A., Delanney, J. A. and Verma, P. D. (1992). A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyses the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:9354–9358.
- Hu, K. D., Hu, L. Y., Li, Y. H., Zhang, F. Q. and Zhang, H. (2007). Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. *Plant Growth Regul.* **53**:173–183.
- Huang, H. C., Kodama, F., Akashi, K., and Konno, K. (2002). Impact of crop rotation on soilborne diseases of kidney bean: A case study in northern Japan. *Plant pathology Bulletin.* **11**: 87-96.
- Ingram, J. and Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Phys.* **47**:377-403.
- Jasid, S., Simontacchi, M. and Puntarulo S. (2008). Exposure to nitric oxide protects against oxidative damage but increases the labile iron pool in sorghum embryonic axes. *J Exp Bot.* **59**:3953-62.
- Khan, R. H., Paull, G. J., Siddique, M. H. K. and Stoddard, L. F. Faba bean breeding for drought-affected environments: A physiological and agronomic perspective. *Field Crops Research.* **115(3)**:279-286.
- Kishor, K. P. B., Sangam, S., Amrutha, R. N., Laxmi, S. P., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan, P. and Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance *Curr. Sci.* **88**:424-438.
- Klepper, L. A. (1975). Evolution of nitrogen oxide gases from herbicide treated plant tissues. *WSSA Abstr.* **184**, 70.
- Kotzabasis, K., Hampsas-Christakis, M. D. and Angelakis-Roubelakis, K. A. (1993). A Narrow-Bore HPLC Method for the Identification and Quantitation of Free, Conjugated and Bound Polyamines *Analytical Biochemistry.* **214**:484-489.
- Kumar, D. and Klessig, D. F. (2000). Differential induction of tobacco MAP kinases by the defence signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene and jasmonic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**:347-351.

- Kumar, P., Rao, D.G., Lakshmayya, S. & Ramachandria, S. (2008). Hepatoprotective Effect of Ethanol Extract of Tubers of *Momordica Taberosa* cogn. In Thioacetamide Induced Hepact Damage. *Pharmacologyonline*. **3**:181-189.
- Kumar, P., Tewari, R. K. and Sharma, P. N. (2010). Sodium nitroprusside-mediated alleviation of iron deficiency and modulation of antioxidant responses in maize plants *AoB Plants*. **2010**:1-11.
- Kumari, A., Sheokand, S. and Kumari, S. (2010). Nitric oxide induced alleviation of toxic effects of short term and long term Cd stress on growth, oxidative metabolism and Cd accumulation in Chickpea Braz. *J. Plant Physiol*. **22**:271-284.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C. and Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*. **228**:367–381.
- Kyriakidis, D.A., Heller, J.S, & Canellakis, E.S. (1978). Modulation of Ornithine Decarboxylase Activity in *Esherichia coli* by Positive and Negative Effectors. *Proc, Natl, Acad, Sci. U,S,A*, **75**: 4699-4703,
- Lamattina, L., Beligni, M. V., Garcia-Mata, C. and Laxalt, A. M. (2001). Method of enhancing the metabolic function and the growing conditions of plants and seeds. US Patent. US 6242384 B1.
- Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M. and Pagnussat, G. (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol*. **54**:109–136.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2004). Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein *Plant Physiol*. **135**:516-529.
- Lamotte, O., Courtois, C., Barnavon, L., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2005). Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta*. **221**:1-4.
- Laszlo, S. and Arnould, S. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. **15**:89-97.
- Leshem, Y. Y., Willis, B. H.R. and Veng-Va Ku, V. (1998). Evidence for the function of the free radical gas - nitric oxide (NO•) - as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants, *Plant Physiol. Biochem*. **36**:825-833.

- Leshem, Y. Y. (2001). Nitric Oxide in Plants. Kluwer Academic Publishers, London.
- Lindermayr, C. and Durner, J. (2009). S-Nitrosylation in plants: pattern and function, J. Proteomics. **73**:1–9.
- Liu, Rudd, M. A., Freedman, J. E. and Loscalzo, J. (1998). S-transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. **284**:526–534.
- López-Carrión, A. I., Castellano, R., Rosales, M. A, Ruiz, J. M. and Romero, L. (2008). Role of nitric oxide under saline stress: implications on proline metabolism *Biologia Plantarum*. **52(3)**:587-591.
- Loreto F. & Velikova V. (2001). Isoprene Produced by Leaves Protects The Photosynthetic Apparatus Against Ozone Damage, Quenches Ozone Products, and Reduces Lipid Peroxidation of Cellular Membranes. *Plant Physiol*. **127(4)**:1781-7.
- Lum, H. K., Butt, Y. K. and Lo, S. C. (2002). Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Nitric Oxide*. **6**:205 –213.
- Lum, K. H., Lee, H. C., Butt, C. K. Y. and Lo, L. C. S. (2005). Sodium nitroprusside affects the level of photosynthetic enzymes and glucose metabolism in *Phaseolus aureus* (mung bean), *Nitric Oxide*. **12**:220–230.
- Lutts, S., Majerus, V., Kinet, J. M. (1999). NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings *Physiol. Plant*. **105**:450-458.
- Mackerness, S. A-H., John, C. F., Jordan, B. and Thomas, B. (2001). Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters*. **489**:237–242.
- Magalhaes, J. R., Monte, D. C. and Durzan, D. (2000). Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. **6**:117–127.
- Mahalingam, R., Jambunathan, N., Gunjan, S. K., Faustin, E., Weng, H., and Ayoubi, P. (2006). Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*. **29**:1357–1371.
- Maiale, S., Sánchez, D. H., Guirado, A., Vidal, A., Ruiz, O. A. (2004). Spermine accumulation under salt stress *J. Plant Physiol*. **161**:35–42.

- Malmberg, R. L., Watson, M. B., Galloway, G. L. and Yu, W. (1998). Molecular genetic analyses of plant polyamines. *Crit Rev Plant Sci.* **17**:199–224.
- Mano, J., Ohno, C., Domae, Y. and Asada, K. (2001). Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: Its relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1504(2-3)**:275-287.
- Mano, J. (2002). Early events in environmental stresses in plants. Induction mechanisms of oxidative stress. In: Inze D, van Montagu M (eds). *Oxidative stress in plants*. London, Taylor and Francis, pp 217–246.
- Martínez-Ruíz, A. and Lamas, S. (2009). Two decades of new concepts in nitric oxide signaling: from the discovery of a gas messenger to the mediation of nonenzymatic posttranslational modifications, *IUBMB Life*. **61**:91–98.
- Mata, C. G. and Lamattina, L. (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol.* **126**:1196–1204.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* **33**:453-67.
- Misra, A.N., Srivastava, A. and Strasser, J. R. (2001). Utilization of fast chlorophyll fluorescence technique in assessing the salt/ion sensitivity of mung bean and Brassica seedling. *J. Plant Physiol.* **158**:1173-1181.
- Misra, A. N., Misra, M. and Singh, R. (2010). Nitric oxide biochemistry, mode of action and signalling in plants *J. Med. Plant. Res.* **4**:2729-2739.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**:405–410.
- Mur, L. A. J., Santosa, I. E., Laarhoven, L. J. J., Holton, N. J., Harren, F. J. M. and Smith, A. R. (2005). Laser Photoacoustic Detection Allows in Planta Detection of Nitric Oxide in Tobacco following Challenge with Avirulent and Virulent *Pseudomonas syringae* Pathovars *Plant Physiol.* **138**:1247–1258.
- Murgia, I., de Pinto, M. C., Delledonne, M., Soave, C. and Gara, L. D. (2004). Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death and cell redox state in plant cells. *J. Plant Physiol.* **161**:777-783.



- Modolo, L. V., Augusto, O., Almeida, I. M. G., Magalhaes, J. R. and Salgado, I. (2005). Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Letters*. **579**:3814–382.
- Molassiotis, A. and Fotopoulos, V. (2011). Oxidative and nitrosative signaling in plants: Two branches in the same tree? *Plant Signal. Behav.* **6**:210-214.
- Morilla, A., Garcia, J.M & Albi, M.A. (1996). Free Polyamine Contents and Decarboxylase Activities During Tomato Development and Ripening. *J Agric Food Chem.* **44**:2608–2611.
- Neill, S. J., Desikan, R. and Clarke, A. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *J Exp Bot.* **53**:1237–1242.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T., (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* **159**, 11–35
- Nishimura, H., Hayamizou, T. and Yanagisavva, Y. (1986). Reduction of NO<sub>2</sub> to NO by rush and other plants. *Environ. Sci. Technol.* **20**:413–416.
- Noctor, G. and Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **49**:249-279.
- Pandey, S., Ranade, A. S., Nagar, K. P. and Kumar, N. (2000). Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence, *J. Biosci.* **25**:291-299.
- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D. W. and Goldman, S. L. (2004). Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* **2**:359-366.
- Patakas, A. A., Zotos, A. and Beis, A. S. (2010). Production, localisation and possible roles of nitric oxide in drought-stressed grapevines *Aust. J. Grape Wine R.* **16**:203-209.
- Pfaffl, M.W, Horgan, G.W, Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res.* **30**: e36.
- Pompella, A, Maellaro, E, Casini A.F, Ferrali M, Ciccoli, L, Comporti, M. (1987). Measurement of lipid Peroxidation in Vivo: A Comparison of Different Procedures. *Lipids. Istituto di Patologia Generale -Università di Siena.* **22**:206-211.

- Pryor, W. A. and Stanley, J. P. (1975). A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem.* **40**:3615-7.
- Qian, H. F., Chen, W., Li, J. J., Wang, J., Zhou, Z., Liu, W. P. and Fu, Z. G. (2009). The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*. *Aquat. Toxicol.* **92**:250-257.
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **101**:4003–4008.
- Ramamurthi, A. and Lewis, R. S. (1997). Measurement and modelling of nitric oxide release rates for nitric oxide donors. *Chem Res Toxicol.* **10**:408-13.
- Richardson, A.D, Duigan, S.P, Berlyn, G.P (2002). An Evaluation Of Noninvasive Methods to Estimate Foliar Chlorophyll Content. *New Phytol.***153**: 185-194.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., and Kaiser, W.M. (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* **53**: 103–110.
- Romero-Puertas, M. C., Laxa, M., Matte, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I, Jones, A. M., Perazzolli, M., Vandelle, E., Dietz, K. J. and Delledonne, M. (2007). S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *The Plant Cell.* **19**:4120–30.
- Saito, S., Yamamoto-Katou, A., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K. (2006). Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology.* **47**:689–697.
- Sang, J., Jiang, M., Lin, F., Xu, S., Zhang, A. and Tan, M. (2008). Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular antioxidant defense in maize plants. *J Integr Plant Biol.* **50**:231–243.
- Saradhi, P. P., Alia, A. S. and Prasad, K. V. (1995). Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**:1–5.
- Savoure', A., Jaoua, S., Hua, X. J., Ardiles, W., Van Montagu, M. and Verbruggen, N. (1995). Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **372**:13–19.

- Schmidt, H.H.H.W and Walter, U. (1994). NO at work. *Cell*. **78**:919–925
- Shamsul, H. (2010). Nitric oxide in plant physiology. Wiley-Blackwell, (Weinheim).
- Slocum, R. D., Kaur-Sawhney, R. and Galston, A. W. (1984) The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch Biochem Biophys*. **235**:283–303.
- Sharma, P. and Dubey, R.S. (2005). Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J Plant Physiol*. **162**:854–864.
- Sharma, P., Sharma, N. and Deswal, R. (2005). The molecular biology of the low-temperature response in plants, *Bioessays*. **27**:1048–1059.
- She, X. P., Song, X. G. and He, J. M. (2004) The role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba*. *Acta Bot Sin*. **46**:1292–1300.
- Sheokand, S., Kumari, A., Sawhney, V. (2008). Effect of nitric oxide and putrescine on antioxidative responses under NaCl stress in chickpea plants. - *Physiol. mol. Biol. Plants*. **14**:355-362.
- Shi, S., Wang, G., Wang, Y., Zhang, L. (2005). Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide*. **13**:1–9.
- Shi, Q., Ding, F., Wang, X. and Wei, M. (2007). Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress *Plant Physiol Biochem*. **45**:542-550.
- Shingles, R., Roh, M. H. and McCarty, R. E. (1996). Nitrite transport in chloroplast inner envelope vesicles. I. Direct measurement of proton-linked transport. *Plant Physiol*. **112**:1375–1381.
- Siddiqui, Z. S., Khan, A. M., Kim, G. B., Huang, S. J. and Kwon, R. T. (2008). Physiological responses of *Brassica napus* genotypes to combined drought and salt stress. *Plant Stress*. **2**:78-83.
- Singh, J. R., Hogg, N., Joseph, J. and Kalyanaraman, B. (1996). Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols, *Journal of Biological Chemistry*. **271**:18596–18603.
- Singh, K., Misra, A. and Pandey, N. S. (2008). Responses of *Lemna minor* L. (duckweed) plants to the pollutants in industrial waste water. *Res. Environ. Life Sci*. **1**:5-8.

- Song, L. L., Ding, W., Zhao, M. G., Sun, B. T. and Zhang, L. X. (2006). Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Sci.* **171**:449-458.
- Stamler, S. J., Singel, J. D. and Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* **258**:1898-1902.
- Stamler, J. S., Lamas, S. and Fang, F. C. (2001). Nitrosylation: the prototypic redox based signaling mechanism. *Cell.* **106**:675-683.
- Stöhr, C. and W. R. Ullrich. (2002). Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany.* **53**: 2293–2303.
- Sung, C. H. and Hong, J. K. (2010). Sodium nitroprusside mediates seedling development and attenuation of oxidative stresses in Chinese cabbage *Plant Biotechnol Rep.* **4**:243-251.
- Sumanta, T., Chuanwei Z., Victor, M.Y., & Sarma, D.S. (2008). Time-Reversal Symmetry Breaking by a (*d+id*) Density-Wave State in Underdoped Cuprate Superconductors. *Phys. Rev. Lett.* **100**, 217004
- Takahashi, S. and Yamasaki, H. (2002). Reversible inhibition of phosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett.* **512**:145-148.
- Takao, K., Rickhag, M., Hegardt, C., Oredsson, S. and Persson, L. (2006). Induction of apoptotic cell death by putrescine. *Int J Biochem Cell Biol.* **38**:621–628.
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M. and Diamantidis, G. (2009). Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *Plant J.* **60**:795-804.
- Tanou, G., Job, C., Belghazi, M., Molassiotis, A., Diamantidis, G. and Job, D. (2010). Proteomic signatures uncover hydrogen peroxide and nitric oxide cross-talk signaling network in citrus plants. *J Proteome Res.* **9**:5994-6006.
- Tatoyan, A. and Giulivi, C. (1998). Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry.* **273**:11044-11048.
- Tewari, R. K., Hahn, E. J., Paek, K. Y. (2008). Modulation of copper toxicity induced oxidative damage by nitric oxide supply in the adventitious roots of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep.* **27**:171–181.

- Tian, X. and Lei, Y. (2006). Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum*. **50**:775-778.
- Tripathi, S. B., Gurumurthi, K., Panigrahi, A. K. Shaw, B. P. (2007). Salinity induced changes in proline and betaine contents and synthesis in two aquatic macrophytes differing in salt tolerance. *Biol. Plant*. **51**:110-115.
- Tu, J., Shen, W. B. and Xu, L. L. (2003). Regulation of nitric acid on the aging process of wheat leaves. *Acta bot. sin.* **45**:1055-1062.
- Tun, N. N., Claudete, S. C. Tahmina, B., Vanildo, S., Walter, H., Eny, I. S. I. F. and Günther, F. E. S., (2006). Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol*. **47**:346–354.
- Tun, N. N., Livaya, M., Kieber, J. J. and Scherer, E. F. G. (2008). Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. *New Phytologist*. **178**:515-531.
- Uchida, A., Jagendorf, A. T., Hibino, T., Takabe, T. and Takabe, T. (2002). Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci*. **163**:515-523.
- Valderrama, R., Corpas, J. F., Carreras, A., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., Gómez-Rodríguez, V. M., Colmenero-Varea, P., DelRío, L. A. and Barroso, B. J. (2007). Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters*. **581**:453–461.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., and Inzé, D. 1998. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: Redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci*. **3**:330-334.
- Velikova, V., Fares, S. and Loreto, F. (2008). Isoprene and nitric oxide reduce damages in leaves exposed to oxidative stress, *Plant Cell and Environment*. **31**:1882–1894.
- Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*. **35**:753-759.
- Vitecek J, Reinohl V, Jones RL. (2008). Measuring NO Production by Plant Tissues and Suspension Cultured Cells. *Mol Plant*. **1**:270–284.
- Vranova, E., Inze, D. and Brensegem, F. V. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot*. **53**:1227-1236.

- Wan, X. Y. and Liu, J. Y. (2008). Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. *Mol. Cell Proteomics* **7**:1469–1488.
- Wang, Y. S. and Yang, Z. M. (2005). Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.* **46**:1915–1923.
- Wang, H., Zhang, S., Zhang, W., Wei, C. and Wang, P. (2010). Effects of nitric oxide on the growth and antioxidant response of submerged plants *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle *African Journal of Biotechnology.* **9**:7470-7476.
- Weihua, Q. and Liu-Min, F. (2008). Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology.* **50**:1238-1246.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. F. and Durner, J. (2001). Nitric oxide: Comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science.* **6**:177-183.
- Wendehenne, D., Durner, J., Klessig, D. F. (2004). Nitric oxide: A new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol.* **7**:449-55.
- Wimalasekera, R., Tebartz, F. and Günther, F. E. (2011). Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development abiotic and biotic stresses. *Plant Science* (in press; doi:10.1016/j.plantsci.2011.04.002).
- Wink, D. A., Hanbauer, I., Krishna, M. C., Degraff, W., Gamson, J. and Mitchell, J. B. (1993). Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **90**:9813-9817.
- Wink, D. A. and Mitchell, J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* **25**:434–456.
- Wodala, B., Deak, Z., Vass, I., Erdei, L., Altorjay, I. and Horvath, F. (2008). In Vivo Target Sites of Nitric Oxide in Photosynthetic Electron Transport as Studied by Chlorophyll Fluorescence in Pea Leaves *Plant Physiology.* **146**:1920–1927.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322**:681–692.
- Wojtaszek, P. (2000). Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry.* **54**:1–4.

- Xu, J., Wang, W. Y., Yin, H. X., Liu, X. J., Sun, H. and Mi, Q. (2010). Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. *Plant Soil*. **326**:321–330.
- Xu, X., Shi, G., Ding, C., Xu, Y., Zhao, J., Yang, H. and Pan, Q. (2010). Regulation of exogenous spermidine on the reactive oxygen species level and polyamine metabolism in *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb under copper stress *Plant Growth Regul.* **63**:251-258.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. and Takahashi, S. (1999). An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science*. **4**:128-129.
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro Y. and Sakihama, Y. (2001). Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide*. **5**:261–270.
- Yamasaki, H. (2005). The NO• world for plants: Achieving balance in an open system. *Plant, Cell and Environment*. **28**:78-84.
- Yang, J. D., Zhao, H. L., Zhang, T. H. and Yun, J. F. (2004). Effects of exogenous nitric oxide on photochemical activity of photosystem II in potato leaf tissue under non-stress condition. *Acta Bot Sin.* **46**:1009-1014.
- Yang, S.L., Lan, S. S. and Gong, M..(2009). Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *J. Plant Physiol.* **166**:1694–1699.
- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y. and Shinozaki, K. (1995) Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* **7**:751–760.
- Yu, C. C., Hung, T. K. and Kao, H. C. (2005). Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH<sub>4</sub><sup>+</sup> accumulation in rice leaves. *Journal of Plant Physiology*. **162**:1319—1330.
- Zhang, C.S., Lu, O. and Verma, D. P. (1995). Removal of feedback inhibition of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **270**:20491–20496.

- Zhang H, Li Y.H, Hu L.Y, Wang S.H, Zhang F.Q and Hu K.D. (2008). Effects of exogenous nitric oxide donor on antioxidant metabolism in wheat leaves under aluminum stress. *Russ J Plant Physiol* **55**:469–474
- Zhao, Z., Chen, G. and Zhang, C. (2001). Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Australian J Plant Physiol.* **28**:1055–1061.
- Zhao, L., Zhang, F., Guo, J., Yang, Y., Li, B., Zhang, L. (2004). Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. - *Plant Physiol.* **134**:849-857.
- Zhao, M. G., Tian, Q. Y. and Zhang, W. H. (2007). Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in Arabidopsis, *Plant Physiol.* **144**:206-217.
- Zhou, S.J., Goodenough, B.J. & Dabrowski B.(2005). Exchange Interaction in the Insulating Phase of  $RNiO_3$ . *Phys. Rev. Lett.* **95**:127204.
- Zottini, M, Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Schiavo, F. L. and Terzi, M. (2002). Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Lett.* **515**:75–78.